

**Experimentelle Untersuchung zum Einfluss inhalativer oder
intravenöser Vasodilantien auf Hämodynamik und Gasaustausch in
einem Tiermodell der pulmonalen Hypertension**

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

vorgelegt von Christiane Inholte
aus Haselünne

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. Ludger Fink

Tag der Disputation: 11.06.07

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Obertshausen, 14.12.2006

Christiane Inholte

Für Karienen und den Hasengott

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Ätiologie und Einteilung der Pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH)	1
1.2	Pathophysiologie der PAH	3
1.3	Therapie der PAH	5
1.4	Zielsetzung der nachfolgenden Untersuchungen.....	9
2	Material.....	10
2.1	Chemische Substanzen und Bezugsquellen.....	10
2.2	Verwendete Geräte und Hersteller	11
2.3	Materialien und Bezugsquellen	11
3	Methoden	13
3.1	Das Ganztiermodell	13
3.1.1	Versuchstiere	13
3.1.2	Intaktes Tiermodell.....	13
3.1.3	Narkose.....	13
3.1.4	Präparation des Kaninchens und Integration in das Messsystem	14
3.1.5	Ventilationsparameter	15
3.1.6	Durchführung von Blutentnahmen	15
3.1.7	Registrierung und Auswertung der Messwerte	16
3.2	Vorstellung des Versuchablaufs ohne Multiple Inert Gas Elimination Technique (MIGET)	16
3.2.1	Erzeugung einer Pulmonalen Hypertonie (PH)	16
3.2.2	Weiterführender experimenteller Versuchsablauf mit Medikamentenapplikation	17
3.2.3	Verneblung von Substanzen	17
3.2.4	Intravenöse Verabreichung von Substanzen	18

3.3	Vorstellung des Versuchablaufs mit MIGET	18
3.3.1	Darstellung der Experimente.....	18
3.3.2	Theoretische Grundlagen der MIGET	19
3.3.3	Durchführung der MIGET im Ganztiermodell	22
3.3.4	Auswertung der durch die MIGET gewonnene Daten	25
3.4	Vorstellung und Wirkweise verwendeter Substanzen	26
3.4.1	Iloprost	26
3.4.2	UT 15	27
3.4.3	Sildenafil	27
3.4.4	8-Methoxy-1-Methyl-3-Isobutylxanthin	28
3.5	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	U46619 induzierte PH und Etablierung der MIGET beim intakten Tiermodell.....	29
4.2	Effekte inhalativer Prostanoiden auf die U46619 induzierte PH: Vergleich von Iloprost und UT 15	31
4.3	Wirkungen des PDE-Inhibitors Sildenafil auf die U46619 induzierte PH.....	35
4.3.1	Vergleich von inhalativer versus intravenöser Applikation des PDE 5-Inhibitors Sildenafil auf Hämodynamik und Gasaustausch	35
4.3.2	Effekte verschiedener Kombinationstherapien mit i.v. verabreichtem Sildenafil, dem i.v. applizierten PDE 1 Inhibitor 8MM-IBMX und inhalativem Iloprost	40
5	Diskussion.....	45
5.1	U46619 induzierte PH und Etablierung der MIGET beim intakten Tiermodell.....	45
5.1.1	U46619 induzierte PH	45
5.1.2	MIGET.....	46

5.2	Effekte der Prostanoidanaloga Iloprost und UT 15 auf die U46619 induzierte PH.....	47
5.3	Wirkungen des PDE 5 Inhibitors Sildenafil auf die durch U46619 induzierte PH.....	53
5.3.1	Effekte von intravasal und inhalativ verabreichtem Sildenafil.....	53
5.3.2	Vergleich verschiedener Kombinationstherapien mit intravenösem Sildenafil, dem i.v. verabreichten PDE 1-Inhibitor 8MM-IBMX und inhalativem Iloprost.....	56
6	Zusammenfassung	62
	Summary	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Publikationsverzeichnis	73
9	Danksagung	74
10	Lebenslauf.....	75

Abkürzungsverzeichnis

aBG	arterielle Blutgase
AC	Adenylatcyclase
AF	Atemfrequenz
AMV	Atemminutenvolumen
AUC	Area Under the Curve
AZV	Atemzugvolumen
AZ	Atemzug
BE	Blutentnahme
C	Compliance
CAM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosin-3'5' - Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3'5' - Monophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
ECD	Elektroneneinfangdetektor
ETa-Rezeptor	Endothelin-A-Rezeptor
ETb-Rezeptor	Endothelin-B-Rezeptor
FID	Flammenionisationsdetektor
FiO ₂	Inspiratorische Atemgasfraktion
Flow	Atemgasflussrate
GC	Guanylatzyklase
GPCR	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren
Hb	Hämoglobin
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
IP	Inositoltriphosphat
i.v.	Intravenös
low V/Q	schwache Ventilation bei physiologischer Perfusion
Mean	Mittlere Beatmungsdrücke
Mean Q	Mittelwert der Einzelperfusionen
MIGET	Multiple Inert Gas Elimination Technique
min.	Minuten
mmHg	Torr
NO	Stickstoffmonoxid
Norm V/Q	Normale Gasaustauschbedingungen
NYHA	New York Heart Assoziation
O ₂	Sauerstoff
P	Druck
Pa	alveolärer Partialdruck
PA-Druck	Pulmonal-arterieller Druck
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PAI I	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I
PA-Katheter	Pulmonal-arterieller Katheter

PAP	pulmonal arterial pressure
Pc	Pulmonaler Kapillärer Verschlussdruck
PCO ₂	CO ₂ -Partialdruck
PDE	Phosphodiesterase
Peak	Spitzenbeatmungsdruck
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PGI ₂	Prostazyklin
PH	Pulmonale Hypertonie
Pi	inspiratorischer Partialdruck
PKG	Pyruvatkinase G
PKA	Pyruvatkinase A
PO ₂	O ₂ -Partialdruck
Pv	venöser Partialdruck
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
Q	Perfusion
R	Retention
RSS	Remaining Sum of Squares
s	Sekunden
SD Q	Standardabweichung der Perfusion
SD V	Standardabweichung der Ventilation
Ti	Inspirationszeit
Te	Expirationszeit
t-PA	tissue-Plasminogen-Activator
TXA ₂	Thromboxan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Ve	expiratorische Ventilation
VBG	venöse Blutgase
VEC	Gefäßendothelzellen
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
Vi	inspiratorische Ventilation
V/Q-Verhältnis	Ventilations-/Perfusionsverhältnis
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
λ	Löslichkeitskoeffizient
ZVD	Zentraler Venendruck

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Einteilung der Pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH)

Das Krankheitsbild der Pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) beschreibt eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Mitteldrucks (PAP) – >25 mmHg in Ruhe und >30 mmHg unter Belastung – im Gegensatz zum Gesunden, der mittlere PAP-Werte zwischen 9-18 mmHg aufweist. Es betrifft allein in Deutschland 2000-3000 Patienten. In den 80er Jahren lag die Prognose für die Betroffenen bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 2,8 Jahren nach Diagnosestellung (32). Eine erste große prospektive Studie ergab eine Überlebensrate von 68-77% im ersten Jahr, von 40-56% im dritten Jahr und von 22-38% im fünften Jahr. Die erschreckende Prognose konnte in den letzten Jahren durch neu gewonnene Erkenntnisse der Pathologie und den dadurch gezielten medikamentösen Eingriff verbessert werden.

Nach der „Venedig“-Klassifikation von 2003 (1) zählen zur PAH erstens die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH), bei der die Ursache der Entstehung nicht bekannt ist. Zweitens die familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie (FPAH). Drittens die PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen, etwa Vaskulitiden, Kollagenosen oder dem Raynaud-Syndrom. Weiterhin gehören in diese Gruppe etwa die PAH bei angeborenem systemisch-pulmonalen Shunt, bei portaler Hypertension, bei HIV-Infektion, bei Medikamenten wie Appetitzüglern und bei Toxinen. Viertens die PAH mit relevanter venöser/kapillärer Beteiligung. Dazu zählen die pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und die pulmonale kapilläre Hämangiomatosis (PCH). Und fünftens die persistierende Pulmonale Hypertonie (PH) beim Neugeborenen.

Die PAH ist dadurch charakterisiert, dass der pulmonal-vaskuläre Gefäßwiderstand (PVR), der sich mit Hilfe von pulmonal-arteriellem Druck (PAP), pulmonal-kapillärem Verschlussdruck (Pc) und Herzzeitvolumen (HZV) berechnen lässt, erhöht ist. Dadurch ist im fortgeschrittenen Stadium das HZV schon in Ruhe stark reduziert, kann unter Belastung nur noch geringfügig ansteigen und führt aus diesem Grund zu entsprechender Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Weiterhin kommt es zu einer Druckbelastung des rechten muskelschwachen Herzens. Als Folge kann durch Hypertrophie und/oder Dilatation ein Cor pulmonale entstehen.

Eingeteilt wird die PH in vier verschiedene klinische Schweregrade, die von der New York Heart Association 1998 modifiziert worden sind (31):

- NYHA I: PH ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität
- NYHA II: PH mit Einschränkung bei verstärkter körperlicher Aktivität durch Dyspnoe, Abgeschlagenheit oder Synkopen, keine Ruhedyspnoe
- NYHA III: PH mit Einschränkung bei leichter körperlicher Aktivität, mit Dyspnoe, Abgeschlagenheit und Brustschmerz bei Belastung, keine Ruhedyspnoe
- NYHA IV: PH mit Einschränkung bei jeder Form der körperlichen Aktivität, Ruhedyspnoe, Abgeschlagenheit und drohendes Rechtsherzversagen

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik wird die Krankheit häufig nicht oder erst im Stadium NYHA III erkannt. Durch späte Behandlung wird die genannte Lebenserwartung von 2,8 Jahren noch drastisch verschlechtert. Dabei liegt das mittlere Alter, etwa von Patienten mit IPAH, bei 36 ± 15 Jahren. Frauen sind 1,7 mal häufiger betroffen (2).

1.2 Pathophysiologie der PAH

Histopathologisch wird bei der PAH meist eine VASOKONSTRIKTION gefunden, in Verbindung mit strukturellen Veränderungen der Pulmonalarterien (REMODELLING= Intimafibrose, Hypertrophie der Tunica media, Proliferation der Adventitia der Arteriolen & Abnahme der Gefäßelastizität) bei chronischem Verlauf. Das führt zu einer Verengung des Lumens der kleinen Gefäße. Die Lungenstrombahn wird dadurch kleiner. Als Konsequenz nimmt der Gefäßquerschnitt ab und der Perfusionswiderstand steigt an.

Bei Gesunden wird durch humorale und nervale Regelmechanismen eine optimale Ventilations-/Perfusionsverteilung erreicht. Durch die pathologischen Veränderungen bei der PAH sind diese Mechanismen nicht mehr in vollem Umfang gewährleistet (OBLITERATION). Der strukturelle Umbau kann zur Zerstörung der Gefäße mit Gefäßverlust führen (RAREFIKATION) (41), was ebenfalls zur PAH beiträgt. Ebenso können die durch Schädigung des Gefäßendothels freigesetzten Substanzen, z.B. Thromboxan oder Endothelin zu einer PAH führen, indem sie etwa zu Vasokonstriktion oder auch Thrombenbildung führen.

Der progressive Umbau und die damit verbundene Zerstörung des pulmonalen Gefäßsystems, in Kombination mit Thrombosierungen, führt zur Zunahme der Rechtsherzbelastung und somit in letzter Konsequenz zu Rechtsherzversagen und Tod (2,4).

Molekularpathologisch sind hauptsächlich drei Mediatoren an der abnormalen Proliferation und Kontraktion von glatten Muskelzellen in pulmonalen Arterien bei Patienten mit PAH beteiligt: Endothelin, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (30).

ENDOTHELIN-I – entsteht u.a. in den Endothelzellen der Lungengefäße aus Pre-proendothelin. Nach der Freisetzung kann es entweder an den **Endothelinrezeptor A** oder **B** der glatten Muskelzellen binden. Der

Endothelin-A (ET_a)-Rezeptor bewirkt eine Konstriktion der Lungengefäße, die Bindung an den Endothelin-B (ET_b)-Rezeptor dagegen eine Bronchokonstriktion (51). Bei Patienten mit PAH wird Endothelin I in hohen Konzentrationen gefunden und spielt dort als potenter Vasokonstriktor eine wichtige Rolle (8,106). Zudem scheint die mitosefördernde Wirkung des Endothelins am strukturellen Gefäßumbau beteiligt zu sein (10). Die Arbeitsgruppen um Galie N et al. und Rubens C et al. vermuten, dass eine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von Endothelin und Prognose besteht (11,12).

STICKSTOFFMONOXID (NO) – entsteht in pulmonalen Gefäßendothelzellen aus L-Arginin. In glatten Muskelzellen fördert es die Erhöhung von intrazellulärem, zyklischem Guanosin-3´5´-Monophosphat (cGMP). So löst es eine Kaskade von Reaktionen aus, die als Endreaktion eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen bewirken. Das Gas hat außerdem eine antiproliferative Wirkung. Kommt es zu alveolärer Hypoxie nimmt die Konzentrationen von NO allerdings ab. Auch bei Patienten mit IPAH verringert sich die Synthese von NO und der NO-Synthetase (6,7).

PROSTAZYKLIN – entsteht in Endothelzellen der Lungengefäße aus Arachidonsäure. In glatten Gefäßmuskelzellen fördert es die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und führt dadurch zur Vasodilatation (30). Zudem hat Prostazyklin eine antiproliferative Wirkung und hemmt die Thrombozytenaggregation. Es ist ein stark wirksamer Vasodilatator, der bei dysfunktionellem Endothel vermindert gebildet wird. Bei mangelnder Bildung von Prostazyklin kommt es zum Überwiegen des komplementär agierenden Thromboxans (TXA₂). Dadurch wird sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die Vasokonstriktion begünstigt (9). Auch proliferative und proinflammatorische Effekte scheinen gefördert zu werden. Bei Patienten mit IPAH wurde außer verminderten Prostazyklin-Konzentrationen auch eine verringerte Expression der Prostazyklin-Synthetase festgestellt (13).

1.3 Therapie der PAH

Ziel der Therapie ist es unter anderem in die drei oben genannten Regulationswege einzugreifen und sie als therapeutische Angriffspunkte zu nutzen.

Wirkung über die **Endothelinrezeptoren**:

Therapeutisch wird der Effekt mit Hilfe von zwei Medikamenten genutzt. Zum einen von dem unselektiven oral applizierbaren Bosentan. Die Substanz blockiert beide Rezeptoren (52). Die zweite Substanz ist der selektive Et_a -Rezeptor-Antagonist Sildenafil (53). Der positive Effekt beider Medikamente – sich äußernd in verbesserter Belastbarkeit mit niedrigeren pulmonalen Drücken, höherer Auswurfraction des Herzens und Zunahme der Lebensqualität – ist in beiden Fällen durch randomisierte, doppelblinde Studien bewiesen worden und gut aufgeklärt (18).

Wirkung über **cGMP**:

Hier gilt das Gas NO als ein hochpotenter Vasodilatator, mit pulmonaler (46) und intrapulmonaler (47) Selektivität. Die Nachteile von NO liegen in geringer Halbwertszeit (HWZ) von wenigen Sekunden (46). Ursache ist die hohe Bindungsaffinität zum Hämoglobin (Hb) beim Übertritt von den Alveolen ins Gefäßsystem. Ein weiterer Nachteil ist das Auftreten eines Reboundeffektes mit nachfolgendem Druckanstieg beim plötzlichen Absetzen der Inhalation (48-50). Das kann in Extremfällen in einem Rechtsherzversagen enden.

Phosphodiesterasen sind Enzyme, die den Abbau von cGMP und cAMP bewirken können (45,73). Zum jetzigen Zeitpunkt sind elf PDE-Familien bekannt, die auf einer Vielzahl unterschiedlicher Gene kodiert sind (45,74,77,78). In den Zellen des Lungenparenchyms konnten v.a. die Isoenzyme PDE 1, 2, 3, 4 und 5 nachgewiesen werden (79). Die cGMP-selektive PDE 5 konnten in hohen Konzentrationen im Lungengewebe nachgewiesen werden (80,81).

Der PDE 5/6-Inhibitor Sildenafil hat eine besondere Affinität zu cGMP. Das Medikament ist ursprünglich zur Therapie von Patienten mit erektiler Dysfunktion auf den Markt gebracht worden (37,92). Sildenafil gilt als potenter Vasodilatator, dessen pulmonale Selektivität in mehreren klinischen Studien belegt werden konnte (82,86,89,90). Galie N et al. konnten die Effekte nun in der großen multizentrischen, placebo-kontrollierten SUPER-Studie mit 278 Patienten bestätigen (17). Die Wirksamkeit der Substanz konnte sowohl bei akuten (87) als auch bei chronischen (82,88) Formen der PH belegt werden. Erstaunlicherweise konnten synergistische Effekte bei der Kombination von Sildenafil (Wirkung über cGMP) und Prostazyklin (Wirkung über cAMP) mehrfach nachgewiesen werden (15,82,86). Der Vorteil von Sildenafil liegt in der oralen Applikation. Zudem sind die Tagestherapiekosten im Gegensatz zu den Prostanoiden niedrig. Seit Januar 2006 ist Sildenafil für die Behandlung von PAH-Patienten zugelassen (Gruppe I der WHO-Klassifikation).

Wirkung über **cAMP**:

Prostazyklin und auch sein stabiles Analogon Iloprost bewirken – was schon lange bekannt ist – im pulmonal-arteriellen System über Bindung an IP-Rezeptoren und nachfolgende cAMP-Freisetzung eine Vasodilatation (40,54). Aus diesem Grund wurde es schon in den 80iger Jahren zur intravenösen (i.v.) Therapie der PH erfolgreich verwendet (108). Prostazyklin besitzt ein vielfältiges Wirkspektrum, das über Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation hinausgeht. So wurden beispielsweise antiproliferative Effekte in Kulturen glatter Muskelzellen nach Stimulation des IP-Rezeptors festgestellt (56,57). Iloprost stimuliert die Wirkung von VEGF in vitro (58). Das scheint im Zusammenhang mit Endothelzellproliferation von entscheidender Bedeutung zu sein. Dem Prostazyklinanalogon wird zudem eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen (59,60). Der Vorteil des Iloprost gegenüber Prostazyklin liegt in seiner Stabilität in Wasser und der damit verlängerten HWZ von 20-30 min versus 1-2 min beim Prostazyklin (62). Zusätzlich soll die relaxierende Wirkung des Iloprost größer sein, da mit etwa

1/3 der Wirkstoffmenge vergleichbare hämodynamische Effekte erzielt werden können (63-67). Iloprost ist auch heute noch das Mittel der Wahl. Bei intravasaler Applikation liegen die Nachteile in geringerer pulmonaler Selektivität, in kurzer HWZ und in der Tachyphylaxie. Diese erfordert eine kontinuierliche Steigerung der Infusionsrate, so dass sehr hohe Kosten durch die Behandlung entstehen (41).

Die erste bedeutende Veröffentlichung, die die inhalativen Effekte von Iloprost bei Patienten mit PAH beschrieb, erschien 1996 (40). Die AIR-Studie (**A**erosolized **I**loprost **R**andomized **P**lacebo **C**ontrolled **S**tudy) war die erste europäische, multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Studie, die den wirkungsvollen Effekt von Iloprost bei 203 PH-Patienten belegt hat (61). Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Sechs-Minuten-Gehstrecke (Maßstab der Belastbarkeit) im Vergleich zur Placebogruppe. Vorteil der Aerosoltechnologie ist die selektive pulmonale Wirksamkeit. Ein Nachteil ist die kurze Wirkdauer, die häufige (6 bis 9), technisch aufwendige Inhalationen erfordert und nachts zum Pausieren der Therapie zwingt (41).

Treprostinil (UT 15) ist ebenfalls ein stabiles Prostazyklinanalogon, das zur subkutanen Therapie über Minipumpen-Systeme kontinuierlich verabreicht wird. Es hat intravenös appliziert eine HWZ von etwa 45 min, subkutan von drei bis vier Stunden (3,98). Die therapeutische Wirksamkeit ist in einer multizentrischen, randomisierten, placebokontrollierten Studie mit 470 PH-Patienten belegt worden (69). Als Nebenwirkungen treten häufig lokale Schmerzen auf.

Beraprost gilt als stabiles, orales Prostazyklinanalogon mit einem raschen Wirkungseintritt innerhalb von 30 min und einer HWZ von 30-40 min. Die Wirksamkeit wurde etwa in einer unkontrollierten (71) und einer placebokontrollierten multizentrischen (72) Studie belegt. Ein Nachteil der Therapie mit Beraprost ist, dass es häufig zu systemischen Effekten kommt. Diese sind allerdings nur zu Therapiebeginn vorhanden.

Wirkung über cAMP und cGMP:

Die Kalzium/Calmodulin (CAM)-stimulierte PDE 1 baut sowohl cAMP als auch cGMP ab (45,75,79). Die PDE 3 hat ebenfalls eine hohe Affinität zu beiden Substraten. cAMP wird dabei in noch stärkerem Maße abgebaut als cGMP (42,76,79). Das Enzym wird v.a. in glatten Gefäßmuskelzellen gefunden. Die PDE 4 hat eine besondere Affinität zum cAMP. Sie hydrolisiert auch in ganz geringen Maßen cGMP (73,74,79,76). Das Enzym wird v.a. in glatten Gefäßmuskelzellen gefunden. Alle Substanzen, die die drei PDE inhibieren und dadurch zu einer Vasodilatation der Pulmonalarterien führen, befinden sich noch in experimentellen Stadien. So wurde etwa der PDE 1 Inhibitor 8MM-IBMX in der vorliegenden Arbeit getestet.

Die Wirkung potenter Vasodilatoren wie NO und Prostazyklin kann zudem durch Substanzen mit synergistischen Effekten verlängert und verstärkt werden (82). Dieses wird etwa bei der Kombination von Prostazyklin mit Endothelin-Rezeptoragonisten oder PDE-Hemmern genutzt (18,82). Je besser die Wirkweisen der jeweiligen Substanzen verstanden werden und je effektiver die Applikation, umso größer ist der Benefiz für die Patienten mit PAH – vor allem hinsichtlich ihrer schlechten Prognose.

1.4 Zielsetzung der nachfolgenden Untersuchungen

Anknüpfend an die bisher genannten und bekannten Erkenntnisse der PAH sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- I. Charakterisierung der hämodynamischen Effekte eines neuen inhalativ applizierten Prostazyklinanalogons UT 15 (Treprostinil). Zum Vergleich wurde der bekannte, vielseitig beschriebene und langjährig in der Klinik eingesetzte Prostanoidabkömmling Iloprost verwendet.

- II. Etablierung der MIGET (Multiple Inert Gas Elimination Technique) am Modell der PH beim intakten Tiermodell und Untersuchung der pulmonalen und intrapulmonalen Auswirkungen von intravenös versus inhalativ verabreichtem Sildenafil auf den Gasaustausch der durch U46619 induzierten PH.

- III. Bestimmung weiterer Regulationsmechanismen von Sildenafil bei der PH im intakten Tiermodell. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob eine Wirkungsverstärkung der Kombinationstherapie durch Aktivierung der PDE 1 oder durch indirekte Aktivierung von cAMP erreicht wird, wurde zudem der selektive PDE 1-Inhibitor 8MM-IBMX und das gut untersuchte Prostanoidanalogon Iloprost eingesetzt.

Das intakte Tiermodell bot für die vorliegenden Untersuchungen ideale Voraussetzungen, da neben physiologischen Reaktionen der Lunge komplexe Systeme wie beispielsweise das Herzkreislaufsystem und extrapulmonale metabolische Prozesse miterfasst werden konnten. Es sollten durch Analyse der Substanz-Applikationen und Erprobung weiterer Darreichungsformen neue Optionen für die Therapie der PAH und Hinweise auf die Wirkmechanismen von Sildenafil evaluiert werden.

2 Material

2.1 Chemische Substanzen und Bezugsquellen

Aceton	Merck, D-Darmstadt
Arterenol [®] , Norepinephrinhydrochlorid	Hoechst AG, D-Frankfurt am Main
Braunoderm [®]	Braun Medical AG, D-Melsungen
Diethylether	Merck, D-Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, D-Darmstadt
Elektrolyt N II	Serag-Wiessner KG Naila, D-Bayern
Ethanol	Baker Chemicals, Holland, Deventer
Halothan	Hoechst AG, D-Frankfurt am Main
Instillagel [®] 2% Lidocainhydrochlorid	Farco-Pharma GmbH, D-Köln
Isotone Kochsalzlösung [®] 0,9%	Braun-Medical, D-Melsungen
Ketanest [®] Ketaminhydrochlorid	Pharmacia & Upjohn GmbH, D-Erlangen
Liquemin [®] N 25000 Heparin	Hoffmann-La Roche AG, D-Grenzach-Wyhlen
Natriumhydrogencarbonat 8,4%	Braun Medical, D-Melsungen
Pancuronium Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH, D-Freiburg
Rompun [®] 2% Xylazinhydrochlorid	Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen
Softasept N	Braun Melsungen, D-Melsungen
U-46619 (9,11-Dideoxy-11a,9a-Epoxymethanoprostaglandin F2a)	Sigma, D-Deisenhofen
Xylocain [®] 2% Lidocainhydrochlorid	ASTRA Chemicals GmbH, D-Wedel/Holstein

2.2 Verwendete Geräte und Hersteller

ABL 330 [®] , Blutgasanalysegerät	Radiometer, Holland-Copenhagen
Babylog 8000 plus [®] , Beatmungsgerät	Dräger, D-Lübeck
Cat/Rabbit Ventilator 6025 [®]	Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten
Elektronenfangdetektor Carlo Erba HRGC	Carlo Erba, Italien
Eppendorf [®] -Pipetten	Eppendorf, D-Hamburg
Flammenionisationsdetektor-Varian 3000 [®]	Varian, USA
Integrator-SP 4290 [®]	Spectraphysics, D-Darmstadt
Perfusor [®] Secura-Injektomat	Fresenius, D-Bad Homburg
Präzionswaage-Mettler AJ 100 [®]	Mettler-Toledo GmbH, D-Gießen
Thermo Lux [®] Wärmeschrank	memmert GmbH&Co, D- Schwalbach
Wasserschüttelbad	GFL 1092, D-Burgwedel

2.3 Materialien und Bezugsquellen

Arrow Berman Angiographics Ballon Catheter [®]	Reading, PA, USA
Druckaufnehmer Combitrans [®]	
Monitoring-Set	Braun Medical, D-Melsungen
Braun Injekt [®] , Einmalspritze (2-20ml)	Braun Medical, D-Melsungen
Combi Stopper	Braun Medical, D-Melsungen
Disofix [®] Dreiwegehahn	Braun Medical, D-Melsungen
ECOJECT [®] Plus, Perfusorspritze 50ml	Dispomed Witt oHG, D-Gelnhausen
Glasspritzen	Dickinson&Co, B-D Yale, Becton, USA
Hamiltan Präzisionsspritze	Hamiltan, D-Darmstadt
Injekt F [®] , Einmalspritze 1ml	Braun Medical, D-Melsungen

Intrafix [®] Air, Infusionssystem	Braun Medical, D-Melsungen
LS-Verbinder	Braun Medical, D-Melsungen
Microlance [®] , Kanüle steril	Becton Dickinson GmbH, Spanien
Neojact [®] , Einmalkanülen	Braun Medical, D-Melsungen
Perfusorleitung Typ N	Braun Medical, D-Melsungen
Trachealabsauger	Dahlhausen GmbH, D-Köln
Vasocan [®] , Braunüle	Braun Medical, D-Melsungen

3 Methoden

3.1 Das Ganztiermodell

3.1.1 Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden männliche Kaninchen der Rasse New Zealand White Bastard verwendet. Das mittlere Alter der Tiere lag bei 4 ½ Monaten und sie wogen zwischen 2,8 kg und 3,4 kg.

3.1.2 Intaktes Tiermodell

Bei den vorliegenden Experimenten wurde ein intaktes Ganztiermodell verwendet: Ein sediertes und beatmetes Kaninchen wurde über den gesamten Versuchsablauf kontinuierlich überwacht. Ein pulmonal-arterieller Katheter (PA-Katheter) und eine intraarterielle Blutdruckmessung ermöglichten eine permanente Messwerterfassung. Zudem konnten über die Katheter durch Blutentnahmen verschiedene Blutparameter erhoben und auch verschiedene Substanzen appliziert werden. Ein Auskühlen der Tiere wurde mit Hilfe einer unter den Kaninchen platzierten Wärmedecke verhindert. Im Unterschied zum Modell der „Isolierten Lunge“ bietet das Ganztiermodell die Möglichkeit, physiologische Organreaktionen darzustellen und somit auch metabolische und humorale Einflüsse beobachten zu können.

3.1.3 Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurde dem Kaninchen über einen venösen Zugang in der rechten Ohrrendvene 700 µl eines Ketavet-/Rompungemisches (2:3) infundiert. Zusätzlich fand eine Antikoagulation mit einem Heparin-Bolus von 1000 I.E. statt. Nach ausreichender Narkotisierung wurde das Tier in Rückenlage, auf einer Wärmematte liegend, fixiert. Danach wurde ein Infusionssystem an den Zugang in der rechten Ohrrendvene angeschlossen. Per Perfusor konnte das Kaninchen durch kontinuierliche Infusion mit einem

Ketavet-/ Rompungemisch (7 ml/h) und einer Elektrolyt-Lösung (24 ml/h) ausreichend sediert und Volumen substituiert werden.

3.1.4 Präparation des Kaninchens und Integration in das Messsystem

Nachdem Desinfektion der Halsregion des Kaninchens mit Braunol, wurde subkutan 10 ml Xylocain 10 % oberhalb des Sternums injiziert. Im Injektionsbereich wurden anschließend die Haut, das subkutane Fettgewebe, Teile des Muskel- und Thymusgewebes entfernt, bis die Trachea freipräpariert war. Atmung und Tiefegrad der Narkose wurden währenddessen kontinuierlich überwacht. Anschließend wurde die Luftröhre mit einem Faden unterführt. Nach einer Querinzision unterhalb des Kehlkopfes konnte ein Tracheostoma in die Trachea eingeführt und mit dem Faden fixiert werden. Direkt im Anschluss daran wurden Beatmungsschlauch und Tracheostoma konnektiert und das Tier danach über die Beatmungspumpe ventiliert. Der nächste Schritt bestand im Freilegen der linken Arteria carotis. Diese wurde ebenfalls mit zwei Fäden unterlegt, wobei der distale Teil direkt abgebunden wurde. Der proximale Faden wurde erst nach Einführen einer Braunüle in das arterielle Gefäß verknotet, so dass der Zugang fixiert war. Danach wurde ein elektromagnetischer Druckwandler an die Braunüle in der Arterie angeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt konnte der arterielle Blutdruck per Computer verfolgt werden. Im nächsten Schritt musste die rechte Vena jugularis freigelegt und ebenfalls mit zwei Fäden unterlegt werden. Auch hier wurde der distale Teil direkt abgebunden und der proximale Faden erst nach Einführen einer Schleuse in das Lumen der Vene. Ein PA-Katheter, in dessen Spitze sich ein Druckmess-Katheter befand, wurde ebenfalls an das Druckaufnehmersystem angeschlossen und konnte dann durch die Schleuse in das Gefäß eingeführt werden. Über die Vena jugularis und das rechte Herz wurde der PA-Katheter bis in der Arteria pulmonalis vorgeschoben. Je nach Versuchsschema wurde das Kaninchen mit weiteren venösen Zugängen, z.B. in der linken Ohrrendvene versorgt. Es erhielt zudem einen Blasenkatheeter, um Überblick über die Flüssigkeitsbilanz zu erhalten.

3.1.5 Ventilationsparameter

Bei einem Teil der Versuche (siehe Ergebnisse 4.2 und 4.32) wurde das Kaninchen mittels einer Kleintierbeatmungspumpe (6025 Cat/Rabbit-Ventilator) kontinuierlich beatmet. Folgende Beatmungsparameter fanden bei diesen Versuchen Verwendung:

Atemfrequenz (AF):	40/min
Atemzugvolumen (AZV):	20 ml
Positiver endexpiratorischer Druck (PEEP):	1 cm H ₂ O
Inspiratorische Atemgasfraktion (FiO ₂):	0,5

Eine gewisse Variabilität waren bei AZV und AF gegeben, da etwa bei respiratorischer Azidose ein geringer Handlungsspielraum sinnvoll sein konnte.

Bei einem anderen Teil der Versuche (siehe Ergebnisse 4.31) wurde zur Beatmung des Kaninchens ein Babylog 8000 plus verwendet, der bei Früh- und Neugeborenen eingesetzt wird. Durch Online-Registrierung konnten die Beatmungsparameter auf dem PC abgebildet werden. Dadurch war eine kontinuierliche Überwachung der Beatmungssituation durch Darstellung von Druck-Volumen-Kurven des Kaninchens möglich. Am Beatmungsgerät konnten Parameter wie der PEEP (Positiver Endexpiratorischer Druck), Inspirations (T_i)- & Expirationszeit (T_e), der inspiratorische Spitzendruck (Peak) und das FiO₂ (Inspiratorische Atemgasfraktion) eingestellt werden. Zudem waren AZV (Atemzugvolumen), AMV (Atemminutenvolumen) und dynamische Compliance (C) auf dem Display zu sehen. Der Babylog 8000 plus ermöglichte eine genaue Anpassung der Beatmung an die Ansprüche des Versuchsmodells. Zudem ermöglichte das Gerät eine optimale Überwachung des Versuchsverlaufes sowie eine engmaschige Dokumentation der Daten durch Zwei-Sekunden-Takt-Online-Registrierung.

3.1.6 Durchführung von Blutentnahmen

Die Kenntnis einiger wichtiger Blutparameter wie z.B. des Sauerstoffpartialdrucks (pO₂), Kohlendioxidpartialdrucks (pCO₂) und des pH-

Werts machten kontinuierliche Blutentnahmen nach der Baseline-Periode sowie vor und nach den verschiedenen Interventionen notwendig. Zu diesem Zweck wurden je 0,5ml venöses Blut über den PA-Katheter und 0,5ml arterielles Blut über den arteriellen Zugang entnommen. Anschließend wurden die Proben zur Überprüfung in einen ABL 300 eingespritzt, der innerhalb von drei Minuten das Ergebnis lieferte. Für die Herzzeitvolumen-Berechnung (HZV) wurden die gleichen Proben zur Bestimmung von Hämoglobin (Hb) - und O₂-/CO₂-Sättigungswerten zusätzlich im O₂-Oxymeter aufgegeben. Anschließend erfolgte die Berechnung des HZV mit dem Fickschen Prinzip. Die Sauerstoffaufnahme der Tiere wurde mittels eines O₂-Kontrollers gemessen.

3.1.7 Registrierung und Auswertung der Messwerte

Die kontinuierliche Messung des pulmonal-arteriellen, des systemisch-arteriellen und des Atemwegdrucks wurde über einen elektromagnetischen Druckwandler, der als Druckaufnehmer diente, erreicht. Über ein System mit Signalwandler, Messverstärker und zugehöriger Software konnte die Darstellung der jeweiligen Mitteldrücke ermöglicht werden. Um eine Vergleichbarkeit der Daten sicherzustellen wurden die Druckaufnehmer vor jedem Versuch neu kalibriert.

3.2 Vorstellung des Versuchablaufs ohne Multiple Inert Gas Elimination Technique (MIGET)

3.2.1 Erzeugung einer Pulmonalen Hypertonie

Dem Versuchsbeginn folgte eine zehnminütige Stady-State-Phase. Ziel war eine Stabilisierung aller Ausgangswerte. Im Anschluss daran erfolgten eine Blutentnahme (BE) und der Beginn einer kontinuierlichen intravenösen (i.v.) Gabe (1,57-2,1 µg/kg*min) des stabilen Thromboxan A₂-Analogons U46619 (9,11-Dideoxy-11a,9a-epoxymethanoprostaglandin F_{2a}) über einen Perfusor. U46619 erzeugte durch eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes – überwiegend im präkapillärem Bereich – eine Vasokonstriktion. Das hatte eine pulmonal-arterielle Druckerhöhung (PAP-Erhöhung) zur Folge. Über einen Zeitraum von

etwa 40min wurde ein Plateau mit mittleren PAP-Werten zwischen 20-30 mmHg erreicht (Ausgangsniveau: 12-16 mmHg).

3.2.2 Weiterführender experimenteller Versuchsablauf mit Medikamentenapplikation

Nach Erreichen eines stabilen Plateaus fanden die Interventionen in Form von i.v.-Bolusgaben, Verneblungen oder Kombinationen aus beidem statt. Vor und nach den Interventionen erfolgten arterielle und venöse BE. Über einen Zeitraum von etwa 40 min wurde die Agenzienantwort bzw. die pulmonale Reaktion beobachtet.

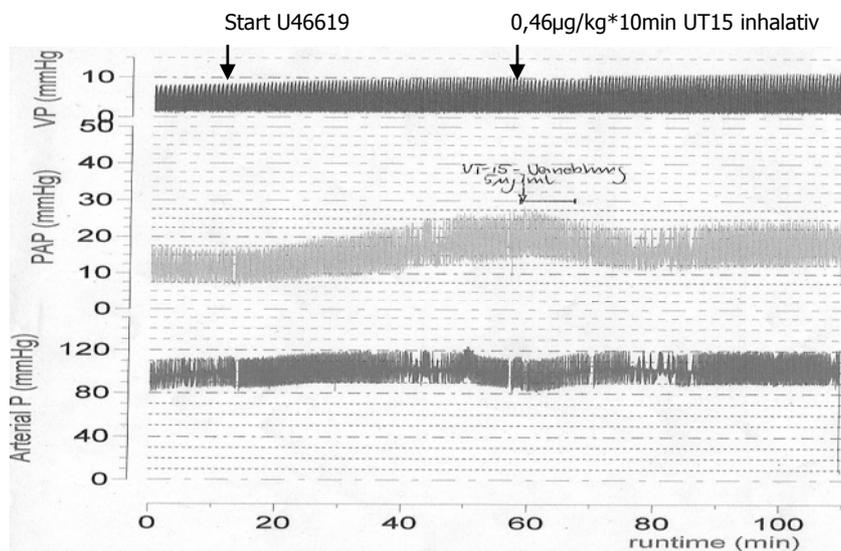


Abb. 3.1: Originalregistrierung des Versuchs Nr. 1: Durch Infusion von U46619 induzierte Vasokonstriktion, die inhalativ mit UT 15 (stabiles Prostazyklinanalogon) behandelt wurde.

Anhebung des pulmonal-arteriellen Druckes durch kontinuierliche Infusion von U46619 auf ein Plateau von 20-22 mmHg. Es folgte eine zehnmütige Verneblung mit 0,46 µg/kg*10min UT15. Die Intervention führte zu einer signifikanten Senkung des PAP. Der systemische arterielle Druck fiel während der Verneblungsperiode leicht ab, zeigte sich aber im darauf folgenden Verlauf konstant.

3.2.3 Verneblung von Substanzen

Die Deposition der inhalativ verabreichten Substanzen in der Lunge wurde über einen OPTINEB Ultraschallvernebler erreicht, der über den inspiratorischen Schenkel in das Beatmungssystem integriert wurde. Die Verneblungsdauer betrug 10 min bei unveränderten Beatmungsparametern.

3.2.4 Intravenöse Verabreichung von Substanzen

Eine i.v.-Applikation der Substanzen konnte dadurch erreicht werden, dass eine Kurzinfusion über die V.jugularis infundiert wurde. Die applizierte Menge war zuvor durch Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt worden.

3.3 Vorstellung des Versuchablaufs mit MIGET

3.3.1 Darstellung der Experimente

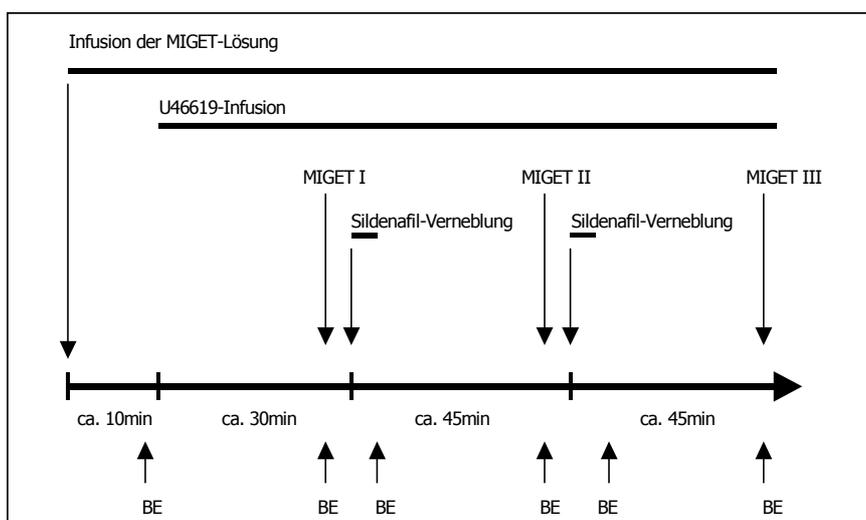


Abb. 3.2: Versuchsschema der MIGET-Versuche am Beispiel von Sildenafil-Verneblungen.

Während einer kurzen Baseline-Periode fanden eine arterielle und venöse Blutentnahme (BE) zur Bestimmung der Perfusions-/Ventilationsverhältnisse und des Säure-Base-Haushalts statt. Danach begann die kontinuierliche Infusion mit U46619. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus folgten eine arterielle und venöse BE und die erste MIGET-Abnahme. Im Anschluss daran fand eine fünfminütige Verneblung mit Sildenafil statt, der sich weitere BEs und ein ca. 45 minütiger Beobachtungszeitraum anfügten. Nach dieser Phase folgte eine weitere Verneblungsperiode, die in der Durchführung dem ersten Zyklus entsprach.

Während der zehnmütigen Anlaufphase wurde das Kaninchen mit einem T_i von 0,5, einem T_e von 0,9 und einem PEEP von 1 mbar beatmet. Anschließend wurde der PEEP auf 3 mbar erhöht. Nach weiteren 10 min wurde mit der Dauerinfusion des Thromboxanalogons U46619, infundiert über die linke Ohrdrandvene, begonnen. Nach etwa 30 min stellte sich ein Plateau mit einem mittleren PAP von ungefähr 19 mmHg ein. Nach Erreichen des Plateau folgte die erste MIGET-Abnahme. Je nach Versuchsgruppe fand nun eine 45 minütige Leerlaufphase

(Kontrollgruppe), eine kontinuierliche Dauerinfusion mit Sildenafil oder eine fünfminütige Sildenafil-Verneblung mit anschließender Beobachtungsperiode statt. Etwa 45 min später folgte die zweite MIGET- Abnahme. Je nach Versuchsgruppe wiederholte sich dasselbe Prozedere. Mit einer dritten MIGET- Abnahme endete der Versuch.

3.3.2 Theoretische Grundlagen der MIGET

Die MIGET stellt ein Verfahren dar, bei dem ein Computeralgorithmus durch Errechnen der Retention und Elimination von sechs verschiedenen inerten Gasen – mit unterschiedlichen Löslichkeits-Koeffizienten – die Gasaustauschverhältnisse der Lunge darstellen kann. 1974 wurde die auf der Theorie der Elimination inerner Gase beruhende Berechnung der Ventilations-/Perfusionsverhältnisse durch das Fortran-Programm erstmals von Wagner PD et al. beschrieben (99). Es stellt seit 1992 eine etablierte Methode am Modell der isolierten Kaninchen-Lunge dar (96). Die Idee der MIGET erklärt sich durch das Bestreben der sechs verschiedenen, inerten Gase – Schwefelhexafluorid (SF₆), Ethan, Zyklopropan, Halothan, Diethyläther und Azeton – sich in flüssigen und gasförmigen Medien unterschiedlich zu verteilen. Durch Bestimmung vorhandener Gase im arteriellen Blut (Retention), die Ermittlung ihrer Zunahme im Expirat (Exkretion), oder die Bestimmung ihrer Persistenz im venösen Blut, ließ sich ein Eindruck über den Gasaustausch gewinnen. Die Lunge wird hierzu in sogenannte Kompartimente – bestehend aus Alveole und Kapillare – unterteilt, die als funktionelle Einheiten zusammenwirken. Davon ausgehend, dass inspiratorische (V_i) und expiratorische Ventilation (V_a), die Perfusion (Q), venöse (P_v) und inspiratorische Partialdrücke (P_i) konstant sind, stellt sich ein Diffusionsgleichgewicht mit identischen Partialdrücken von Alveole (P_a) und kapillärer Endstrecke (P_c) ein. Nach der Gleichung von Fahri (1967) gilt für die Elimination inerner Gase:

$$\frac{P_A}{P_V} = \frac{P_c}{P_V} = \frac{\lambda}{\lambda + \frac{V_a}{Q}} \quad (3.1)$$

λ bezeichnet den Verteilungskoeffizienten, der sich aus der Löslichkeit des Gases aG (ml/ml*Torr) und einer Konstanten k (torr), errechnet aus dem Luftdruck+T in Celsius, zusammensetzt.

Bedingung für die Gültigkeit ist allerdings, dass der Nettotransport von Gas aus den Kapillaren in die Alveole identisch mit der Nettoelimination durch die Expiration ist und somit ein Gleichgewicht des Gasaustauschs im Lungenkompartiment vorliegt. Gleichzeitig sollten durch das Diffusionsgleichgewicht endkapillärer und alveolärer Partialdruck der Gase identisch sein. Der Hämatokrit-Wert der Lungenkompartimente sollte sich nicht unterscheiden. Zudem muss bei den Untereinheiten der Lunge eine parallele Anordnung bestehen, so dass keine Verbindungen zwischen Inspiration und Expiration möglich sind. Überträgt man die Überlegungen in ein Multikompartimentmodell, so stellt der gemischte arterielle Partialdruck den perfusionsabhängigen Mittelwert aller endkapillären Partialdrücke dar und es gilt für inerte Gase:

$$R \equiv \frac{P_a}{P_v} = \frac{\sum_{j=1}^{j=N} \lambda * q_j}{\lambda + \frac{V_a}{Q_j}} \quad (3.2)$$

R bezeichnet die Retention des Gases, also das Verhältnis von arteriellem zu venösem Partialdruck. R stellt bei den sechs gemessenen Gasen eine bekannte Größe dar. Unbekannte Größen sind die Einzelperfusionen q_1 - q_N . Eine Berechnung der Gleichung mit 50 unbekanntem Größen ($N=50$) würde sich nur schwer lösen lassen. Aus diesem Grund misst man zeitgleich mehrere Gase mit unterschiedlichen Löslichkeitskoeffizienten. Im Fall der MIGET bestehen so sechs Gleichungen mit variabler Retention (R) und Löslichkeit (λ), die aber in den Einzelperfusionen übereinstimmen.

Voraussetzungen für die Berechnung sind:

I) Die Summe der Einzelperfusionen muss 1 sein.

II) Es darf keine negativen Perfusionen geben.

Für die Gleichung sechs inerter Gase und 50 Kompartimente gilt:

$$R = \sum_{i=1}^{i=6} \sum_{j=1}^{j=50} \left(q_j * \frac{\lambda_i}{\lambda_i + \frac{V_a}{Q_j}} \right) \quad (3.3)$$

Der Vektor q steht für 50 unbekannte Perfusionen der V_a/Q - Kompartimente, die auf einer logarithmischen Skala in 50 gleich große Bereiche eingeteilt sind. Sie stellen damit bekannte Größen dar. Der nächste Schritt ist die Anwendung der Kleinste-Quadrate-Analytik auf die bekannte Retention R und einen Satz von q . Es verbleibt die Summe der kleinsten Quadrate durch auftretende Fehler.

Zur Stabilisierung der resultierenden Verteilung und zur Erleichterung der numerischen Analyse wurde der Ausgleichsfaktor Z eingeführt (29). Beim weiteren Vorgehen errechnet der Computer die Retention von jedem der sechs Gase, wobei N Kompartimenten entsprechende Perfusionen q zugeteilt werden, ohne dass die tatsächliche Verteilung entscheidend ist. Die errechneten Retentionen werden mit den gemessenen Retentionen – durch Ermittlung der verbleibenden Summe der Quadrate (Remaining Sum of Squares = RSS) der sechs Gase – verglichen. Um die Differenz zwischen gemessener und errechneter Retention zu verkleinern, verändert der Computer den Blutfluss von jedem Kompartiment bis die Summe der verbleibenden Quadrate nicht mehr kleiner wird. Der Blutfluss darf dabei nicht negativ werden. Nach Wagner et al. müssen 90% der $RSS \leq 10,645 + 50\%$ der $RSS \leq 5,348$ sein, um eine mathematische Korrektheit der ermittelten Werte sicherzustellen (97). Die Löslichkeitskoeffizienten des löslichsten (Aceton mit $\lambda=250 \rightarrow$ gute Eignung für die Berechnung großer V/Q -Bereiche) und unlöslichsten (SF_6 mit $\lambda=0,0024 \rightarrow$ gute Eignung bei der Ermittlung sehr kleiner V/Q -Bereiche) Gases bestimmen die Grenzen der V/Q -Bereiche. Gänzlich unsensitiv wird die Berechnung der

Retention, wenn V/Q-Bereiche um eine Größenordnung (\pm) vom Löslichkeitskoeffizienten abweichen. Der Löslichkeitskoeffizient, also das von der Löslichkeit des Gases abhängige Gleichgewicht zwischen gasförmiger und flüssiger Phase, ist abhängig von der Temperatur, dem Salzgehalt und der Art der verwendeten Lösung. Er wurde für die MIGET-Gase von Walmrath D et al. ermittelt (96).

Tab. 3.1: Löslichkeitskoeffizienten der verwendeten inerten Gase

Inertes Gas	Löslichkeitskoeffizient
SF ₆	0,0024
Ethan	0,0259
Zyklopropan	0,16
Halothan	0,64
Diethyläther	9
Azeton	250

3.3.3 Durchführung der MIGET im Ganztiermodell

3.3.3.1 Herstellung der MIGET-Lösung

Zur Herstellung der MIGET-Lösung wurden 23 ml Natriumbikarbonat zu 1000 ml Elektrolytlösung N II hinzugefügt. Von diesem Gemisch wurden anschließend 250 ml in einen gasdichten Beutel luftblasenfrei abgefüllt und gewogen. Nachfolgend wurden schrittweise die sechs Gase zugesetzt:

- I) 1 ml Halothan
- II) Gasmisch (10 % SF₆ 3.0, 20 % Zyklopropan 2.0, 70 % Ethan 2.5)
- III) 0,5 ml Äther
- IV) 2 ml Azeton

Zu beachten war, dass das Perfusatgemisch mindestens eine halbe Stunde vor Entnahme des Blutes mit einer Flussrate von 40 ml/h infundiert wurde. Dadurch konnte eine vollständige Verteilung im Blut des Kaninchens und damit ein Gleichgewicht zwischen Retention und Elimination der Gase sichergestellt

werden. Des Weiteren sollte die MIGET-Lösung peripher, z.B. über eine Ohrrendvene, appliziert werden. Das diene zur Reduktion von Messfehlern, entstanden durch verfälschte Konzentrationen im entnommenen arteriellen und vor allem zentralvenösen Blut.

3.3.3.2 Geräte

Beim Flammenionisationsdetektor (FID), einem Varian 3000[®], werden Kohlenwasserstoffverbindungen über einer Wasserstoffflamme verbrannt. Dabei entstehen Ionen, die ein elektrisches Signal auslösen, das an einen Integrator weitergeleitet und ausgewertet wird. Der FID diene der MIGET zur Erfassung der Gase Ethan, Zyklopropan, Halothan, Diethyläther und Azeton.

Der Elektroneneinfangdetektor (ECD), ein Carlo Erba HRGC[®], enthält einen Betastrahler und es findet eine kontinuierliche Elektronenemissionsmessung statt. Durchfließt Analysegas den ECD, absorbiert es Elektronen, was einen Abfall des Elektronensignals mit daraus resultierender Spannungsänderung zur Folge hat. Dies wird an einen geschlossenen Integrator weitergeleitet. Der ECD diene der MIGET zur Bestimmung der Gase SF₆ und Sauerstoff.

Das Schüttelwasserbad der Firma GFL, eingestellt mit einer Temperatur von 38,5°C, wurde eingesetzt um den Übertritt der – sich im venösen und arteriellen Blut befindlichen – MIGET-Gase in das gasförmige Medium Stickstoff zu ermöglichen. Wagner et al. ermittelten, dass sich nach etwa 30-40 min ein von der Löslichkeit des Gases abhängiges Gleichgewicht zwischen gasförmiger und flüssiger Phase einstellt (19,20). Das Wasserbad arbeitete mit einer Schüttelfrequenz von 135/min.

3.3.3.3 Blut- und Gasprobenentnahme

Zur Vorbereitung der Probenentnahmen mussten zunächst die für die arteriellen und venösen MIGET-Abnahmen vorgesehenen gasdichten 50 ml Glasspritzen heparinisiert werden. Grund für die Heparinisierung war die bessere Abdichtung der Spritzen, um Gasaustritt zu verhindern.

BLUTENTNAHMEN (BE) – Die venösen BE – durchgeführt über den PA-Katheter – und die arteriellen BE – durchgeführt über den arteriellen Zugang in der A. carotis – sollten möglichst zeitgleich entnommen werden. Die Flussgeschwindigkeit sollte durch den venösen Blutfluss bestimmt werden. Es wurden jeweils 2,5 ml Blut entnommen. Im Anschluss erfolgte eine venöse und arterielle Astrup-Entnahme zur Bestimmung der Blutgase.

GASPROBENENTNAHME (GE) – Die Gasprobenentnahme erfolgte über den expiratorischen Schenkel der Beatmung. Es wurden während der Expiration des Kaninchens etwa 30 ml Expirat entnommen.

Bei der Nachbereitung wurden die Spritzen mit den Blutproben einzeln gewogen, das Gewicht dokumentiert und die Differenz zum Leergewicht bestimmt. Anschließend wurde das Blut mit Stickstoff (ECD-Qualität) überschichtet, so dass sich etwa die dreifache Menge (etwa 10 ml) im Lumen befand. Der nächste Schritt bestand in einer 40 minütigen Inkubation im Wasserbad bei 38,5°C. Die Gasproben wurden über denselben Zeitraum bei 40°C im Wärmeschrank bereitgehalten.

3.3.3.4 Vorbereitung zur Analyse der Proben

BLUTPROBE – Nach Ablauf der Äquilibrierungszeit wurde das Volumen der Proben bestimmt. Anschließend wurde der Gasüberstand (etwa 7 ml) in eine zweite Spritze geleitet. Die Glasspritzen mussten nun für mindestens 5 min im Wärmeschrank gelagert werden, da die Temperatur zur gaschromatographischen Analyse 40°C betragen sollte.

GASPROBE – Die Temperatur der Gasprobe betrug durch zeitgleiche Lagerung im Wärmeschrank 40°C und konnte deshalb direkt der Analyse zugeführt werden.

3.3.3.5 Gasprobenanalyse

FID – Nacheinander wurden die gasgefüllten Spritzen dem Wärmeschrank entnommen und etwa 3 ml Gas zur gaschromatographische Analyse in das Gerät eingespritzt.

ECD – Derselbe Vorgang wurde beim ECD wiederholt. Jedoch war eine Menge von 1 ml zur Analyse der zu bestimmenden Gase ausreichend.

3.3.4 Auswertung der durch die MIGET gewonnene Daten

Das von Wagner PD entwickelte Fortran-Programm ermöglichte die Berechnung der Ventilations-/Perfusionsverhältnisse (V/Q-Verhältnisse) der 50 imaginären Lungenkompartimente, auf die bei den theoretischen Grundlagen der MIGET näher eingegangen wurde. Zur Analyse der V/Q-Verhältnisse benötigte das Programm die aus der Berechnung der Gaschromatographen gewonnenen Peakhöhen der einzelnen Gase, die Probengewichte, deren Gesamtvolumina, die Beatmungsparameter AZV und FiO_2 , das HZV des Kaninchens, die Löslichkeitskoeffizienten der inerten Gase sowie die bei den Astrupentnahmen gewonnenen arteriellen und venösen Blutgase (PO_2 , PCO_2 , pH, Hb, HK). Das Fortran-Programm ermöglichte die Darstellung der zwei wichtigen Bereiche PERFUSION und VENTILATION, indem es die Perfusions- und Ventilations-Verhältnisse errechnete. Bei der Darstellung der PERFUSIONSVERHÄLTNISSE beschreibt die „low V/Q- Perfusion“ (mit V/Q-Verhältnissen zwischen 0,005-0,1) einen Zustand physiologischer Perfusion bei schwacher Ventilation. Die „norm V/Q-Perfusion“ (V/Q-Verhältnis von 0,1-10) beschreibt optimale Gasaustauschbedingungen mit perfundierten und zeitgleich ventilierten Bereichen. Die „high V/Q-Areale“ (mit einem V/Q-Verhältnis von 10-100) zeigen zwar eine hohe Ventilation aber gleichzeitig eine schwache Perfusion an. V/Q-Verhältnisse $< 0,005$ gelten als nicht mehr ventiliert und geben Hinweise auf den Shuntfluss in jenen Lungenkompartimenten. Analog zu den

Perfusionsverhältnissen werden die VENTILATIONSVERHÄLTNISSE dargestellt. Steigt das V/Q-Verhältnis über 100 an ($V/Q=\infty$), spricht man von Totraumventilation (anatomischer + physiologischer Totraum). Dabei gelten belüftete Bereiche als nicht mehr perfundiert. Als Qualitätsfaktor der gewonnenen Daten wird die Remaining Sum of Square berechnet, auf die im Theorieteil näher eingegangen wurde. Werte $< 10,645$ weisen hier auf eine exakte Berechnung der Ventilation und Perfusion hin (95,97,99).

3.4 Vorstellung und Wirkweise verwendeter Substanzen

3.4.1 Iloprost

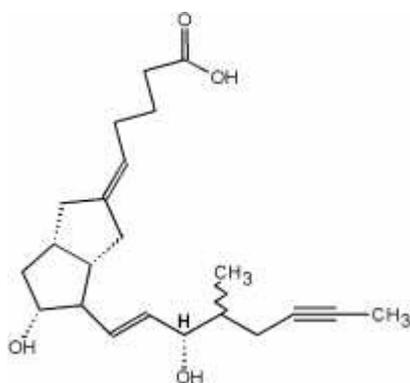


Abb. 3.3: Strukturformel Iloprost

Iloprost ist ein stabiles Analogon des endogenen Prostazyklins mit IP-Rezeptor-vermittelnder Wirkung.

Lösungsmittel:	NaCl 0,9%
Applikationsdosis:	0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$
Applikationsform:	Inhalation (10 min)

3.4.2 UT 15

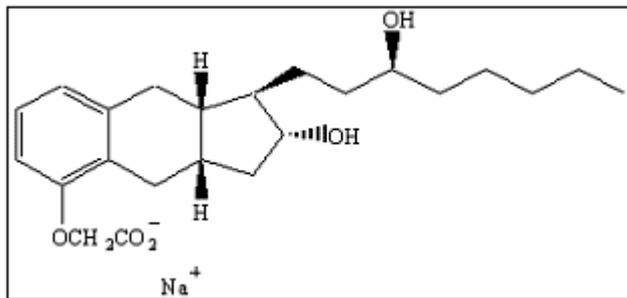


Abb. 3.4: Strukturformel UT 15

UT 15 ist ein chemisch stabiles Benzidinanalogon von Epoprostenol und erzielt seine Wirkung über IP-Rezeptor-Bindung.

Lösungsmittel:	NaCl 0,9%
Applikationsdosis:	0,025 µg/kg/min
	0,071 µg/kg/min
	0,37 µg/kg/min
Applikationsform:	Inhalation (10 min)

3.4.3 Sildenafil

Sildenafil inhibiert die cGMP, PKG und PKA (Pyruvatkinasen G/A)-stimulierte PDE5 und auch die Transduzin-stimulierte, Photorezeptor-spezifische PDE6. Beide PDE-Familien haben cGMP als Substrat.

Lösungsmittel:	NaCl 0,9%
Applikationsdosis:	1,6 µg/kg/min
	0,35 µg/kg*min
	0,35 µg/kg*min
Applikationsform:	i.v.-Bolus (2 min)
	Inhalation (5 min)
	Dauerinfusion (2*45 min)

3.4.4 8-Methoxy-1-Methyl-3-Isobutylxanthin

8MM-IBMX ist ein Kalzium/Calmodulin (CAM)-stimulierter PDE1-Inhibitor (35,43) und hemmt dadurch den cAMP- und cGMP-Abbau.

Lösungsmittel:	Ethanol
	NaCl 0,9%
Applikationsdosis:	93,7 µg/kg/min
	0,19 mg/kg/min
	0,93 mg/kg/min
Applikationsform:	i.v.-Bolus (2 min)

3.5 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanzdarstellung beim statistischen Vergleich mehrerer Versuchsreihen wurde mittels der Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galt bei allen Vergleichen als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 U46619 induzierte Pulmonale Hypertonie und Etablierung der MIGET beim intakten Tiermodell

Bei Versuchsbeginn waren der pulmonal-arterielle Druck (PAP), der systemisch-arterielle Druck (SAP) und die arteriellen und venösen Blutgase der Kaninchen in einem physiologischen Bereich. Eine halbstündige Infusion des stabilen Thromboxananalogs U46619 mit Infusionsraten zwischen 1,57 und 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ führte zu einem signifikanten Anstieg des PAP. Die Werte stiegen von durchschnittlich $15,9 \pm 0,3$ mmHg auf $25,9 \pm 0,4$ mmHg ($p < 0,05$ versus unbehandelt). Es kam zu keinen signifikanten Änderungen der hämodynamischen Parameter und der Blutgase (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Hämodynamik und Blutgase zu Versuchsbeginn und nach durch U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie

	P _{SA} , mmHg	P _{PA} , mmHg	HZV, ml/min	P _a O ₂ , mmHg	PH _a	P _a CO ₂ , mmHg	P _v O ₂ , mmHg	PH _v	P _v CO ₂ , mmHg
Basalwerte	107 ±3	15.6 ±0.4	453 ±17	197 ±9	7.45 ±0.01	40.2 ±1.8	42.4 ±1.5	7.38 ±0.02	45.3 ±1.4
U46619	106 ±3	25.4* ±0.3	438 ±24	188 ±7	7.39 ±0.02	42.4 ±1.1	39,8 ±1,7	7.33 ±0.02	50.3 ±1.8

Um die Frage zu klären, ob bei dem PDE 5/6 Inhibitor Sildenafil außer der pulmonalen auch eine intrapulmonale Selektivität besteht, wurde als weiteres Modell die MIGET beim intakten Tiermodell etabliert (siehe Zielsetzung). Dabei werden sechs verschiedene Gase mit unterschiedlichen Löslichkeitskoeffizienten infundiert. Anschließend werden die Werte in venösem und arteriellen Blut und im Expirat gemessen. Die Ergebnisse lassen auf die Ventilations- und Perfusionsverhältnisse der Lungen schließen. Walmrath D et al. hat die Methode erfolgreich bei Kaninchen im Modell der Isolierten Lunge angewendet (102). Im Unterschied zum anderen Versuchsmodus wurde ein Babylog 8000 als Beatmungsgerät verwendet. Dadurch war es möglich verschiedene

Beatmungsparameter festzulegen. So wurden die Lungen mit einem FiO_2 (inspiratorische Atemgasfraktion) von 1 beatmet und der PEEP, Inspirations- und Expirationszeiten festgelegt.

Nach Erreichen der durch U46619 induzierter Pulmonalen Hypertonie (PH) lag der Anteil der normalventilierten und perfundierten Lungenareale (norm V/Q) bei $94,7 \pm 2,9\%$ (Abb.4.8) und fiel bis zum Versuchende auf $88,8 \pm 4,9\%$ ($p < 0,05$). Mit Infusion des Thromboxanalogons veränderten sich die Ventilations-/Perfusions-Verhältnisse (V/Q-Verhältnisse) nicht signifikant. Nach 45 min ($t=0$) lag der Shuntfluss bei $5,2 \pm 2,5\%$ (Abb. 4.9) und sank nach 135 min ($t=90$) auf $2,5 \pm 1,1\%$ ($p < 0,05$). Die low-V/Q-Areale (schwache Ventilation bei physiologischer Perfusion) stiegen zunächst bis auf $4,8 \pm 2,6\%$ ($t=45$), waren aber bis zum Zeitpunkt $t=90$ mit $1,3 \pm 0,7\%$ rückläufig ($p < 0,05$). Im Zeichen der Umverteilung nahm die mittlere Perfusion (mean of Q) zunächst von 1,1 ($t=0$) auf 0,5 ($t=45$) ab und anschließend auf 0,7 ($t=90$) zu ($p < 0,05$). Die mean of Q gibt an, bei welchem V/Q-Verhältnis der Mittelwert der Einzelperfusionen liegt. Sie sinkt bei steigendem Shuntfluss oder steigender Perfusion von low-V/Q-Arealen. Konträr dazu verhalten sich seine Standardabweichung (SD Q) und die Standardabweichung der mittleren Ventilation (SD V), hier exemplarisch für die SD Q dargestellt: $t=0$: 0,3; $t=45$: 0,9; $t=90$: 0,4 ($p < 0,05$). Die Totraumventilation lag zum Zeitpunkt des Druckplateaus bei $46,4 \pm 12,1\%$ und stieg bis zum Versuchende signifikant auf $55,9 \pm 16,4\%$ an.

4.2 Effekte inhalativer Prostanoiden auf die U46619 induzierte PH: Vergleich von Iloprost und UT 15

Um die Effekte des Prostanoidanalogons UT 15 bei der durch U46619 induzierten PH zu bewerten, wurde es mit dem gut untersuchten Prostanoidanalogon Iloprost verglichen. Nach Inhalation der Substanzen wurden die Parameter von Hämodynamik und Blutgasen bestimmt. Wie in Abb. 4.1 zu erkennen ist, senkten beide Substanzen nach zehnminütiger Verneblung signifikant den PAP. UT 15 war der effektivere Vasodilatator: Schon mit 25 $\eta\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ konnte der PAP von $23,4 \pm 0,8$ mmHg auf $21,3 \pm 0,8$ mmHg gesenkt werden. 71 $\eta\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ UT 15 senkte den PAP von $24,3 \pm 1,0$ mmHg auf $20,8 \pm 0,9$ mmHg und 0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ UT 15 sogar von $26,1 \pm 1,1$ mmHg auf $20,8 \pm 1,0$ mmHg. Die zehnminütige Verneblung mit 0,48 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ Iloprost übertraf knapp die geringste Dosisgruppe von UT 15 ($25,8 \pm 0,6$ mmHg auf $22,7 \pm 0,4$ mmHg). Der SAP, der arterielle pCO_2 und pH-Wert änderten sich bei keiner Versuchsgruppe signifikant (Abb.4.2) Der arterielle pO_2 sank durch die Verneblung von Iloprost nicht signifikant von 183 ± 12 mmHg auf 177 ± 10 mmHg und bei der höchsten Dosierung mit UT 15 signifikant um 25 mmHg auf 151 ± 15 mmHg. Wie in Abb. 4.3 zu sehen ist, stieg das Herzzeitvolumen (HZV) signifikant, sowohl unter Iloprost-Verneblung (432 ± 27 ml/min auf 452 ± 25 ml/min) und stärker noch bei mittlerer (403 ± 18 ml/min auf 468 ± 12 ml/min) und höchster (467 ± 27 ml/min auf 519 ± 29 ml/min) UT 15-Dosierung an.

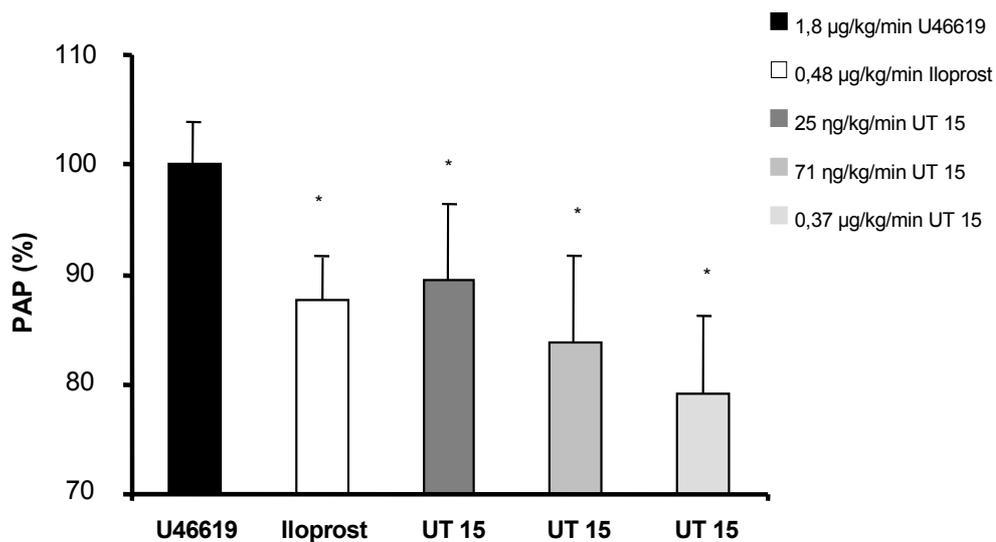


Abb. 4.1: Auswirkungen der Aerosolapplikation von UT 15 auf den PAP nach U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Der PAP wurde durch eine kontinuierliche Infusion von U46619 auf 23-27 mmHg angehoben und mit verschiedenen Konzentrationen von UT 15 (25 ng/kg*min, 71 ng/kg*min, 0,37 µg/kg*min) durch zehninütige Inhalation gesenkt (Mittelwert ± SEM aus n=8 Experimenten). *p<0.05 versus U46619

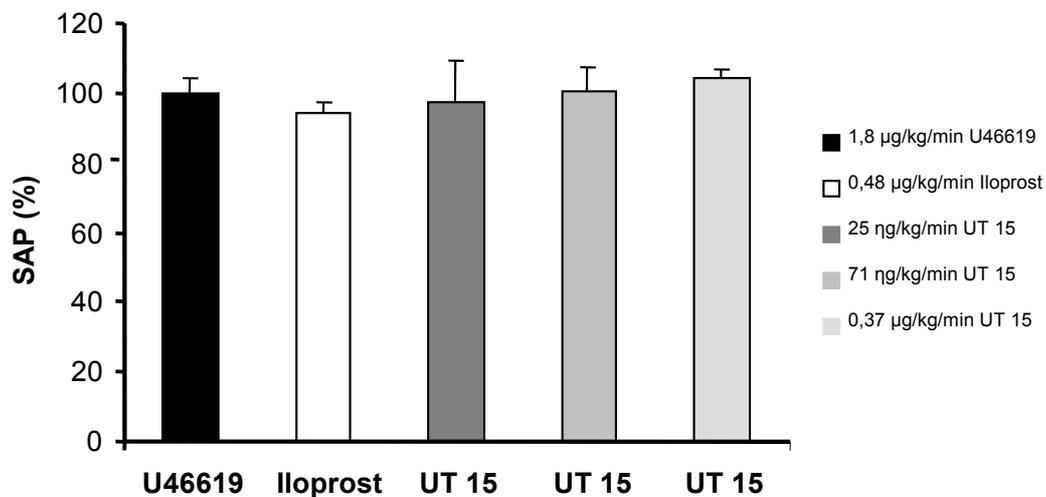


Abb. 4.2: Auswirkungen der Aerosolapplikation von UT 15 auf den SAP nach U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Vergleich des SAP während der kontinuierlichen U46619-Infusion mit dem SAP nach zehninütiger Verneblung mit 0,48 µg/kg*min Iloprost und der Verneblung mit drei Dosisgruppen UT 15 (25 ng/kg*min, 71 ng/kg*min, 0,37 µg/kg*min) (Mittelwert ± SEM aus n=8 Experimenten).

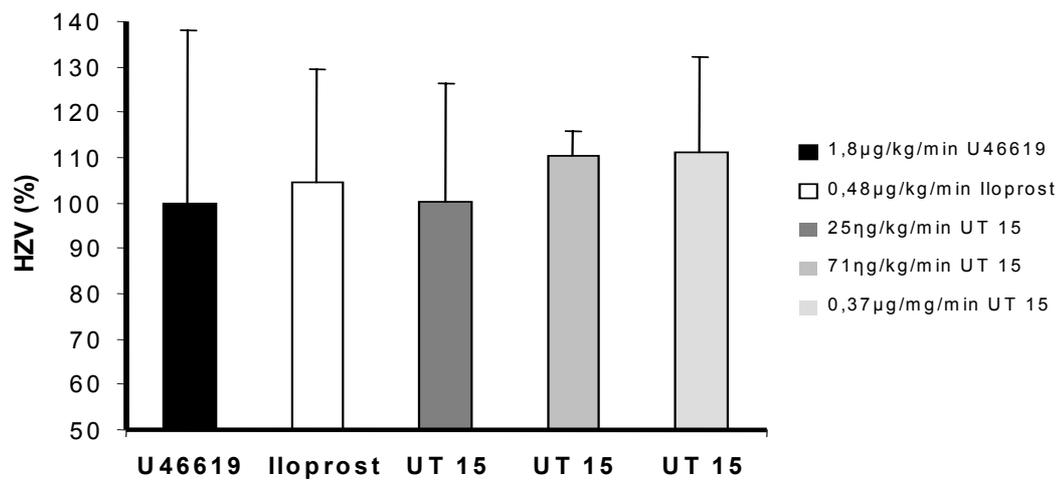


Abb. 4.3: Auswirkungen der Aerosolapplikation von UT 15 auf das HZV nach U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie

Vergleich des HZV während der kontinuierlichen U46619-Infusion mit dem HZV nach zehnminütiger UT 15 Verneblung. Es fand eine Gegenüberstellung von drei Dosisgruppen (25 ng/kg*min, 71 ng/kg*min, 0,37 µg/kg*min) statt (Mittelwert \pm SEM aus n=8 Experimenten).

Beim Vergleich der inhalativen Langzeiteffekte auf den PAP von 0,48 µg/kg*min Iloprost mit 0,37 µg/kg*min UT 15 unterschied sich die Wirkung der Substanzen signifikant (Abb. 4.4). Während bei Iloprost nach 30-40 min das durch U46619 erzeugte Plateau wieder erreicht war, lag der PAP bei UT 15-Verneblung auch nach 60 min noch weit unter seinen Ausgangswerten. Interessant waren auch die Wirkungen auf den systemischen Blutdruck (Abb.4.5), der noch während der Inhalation durch Iloprost gesenkt, durch UT 15 jedoch eher erhöht wurde ($p > 0,05$).

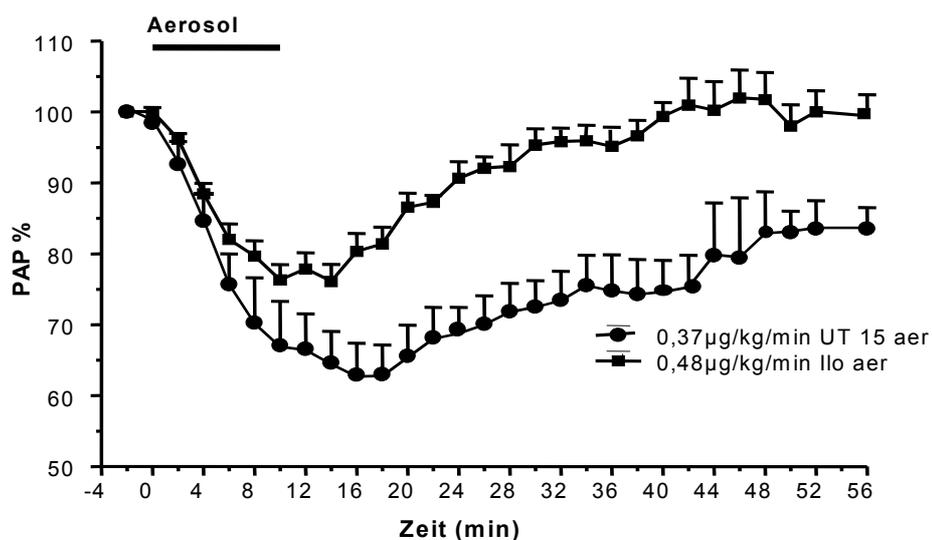


Abb. 4.4: Einfluss der Aerosolapplikation von Prostanoidanaloga auf den PAP bei durch U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Der PAP wurde durch U46619 auf ein Druckplateau von 23-27 mmHg angehoben. Die Aerosolapplikation von Iloprost (0,48 µg/kg*min) senkte den PAP signifikant um ca. ¼ seines Ausgangswertes. Das Druckplateau wurde nach 30-40 min wieder erreicht. Die UT 15-Inhalation (0,37 µg/kg*min) hingegen führte zu einer Drucksenkung um mehr als 1/3 des Ausgangswertes. Der PAP lag auch nach 60 min noch weit unterhalb des anfänglichen Druckniveaus (Mittelwert ± SEM aus n=8 Experimenten).

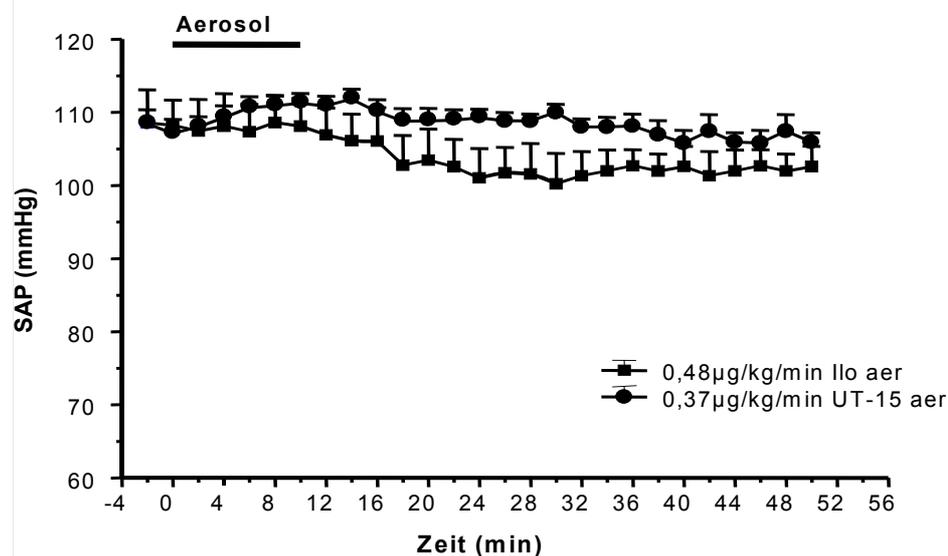


Abb. 4.5: Einfluss der Aerosolapplikation von Prostanoidanaloga auf den SAP bei durch U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Darstellung der SAP-Entwicklung während eines standardisierten Versuchsablaufs, bei dem durch kontinuierliche Infusion von U46619 ein pulmonales Druckplateau zwischen 23-27 mmHg erzeugt wurde. Anschließend fand eine zehnmünütige Verneblung mit Iloprost (0,48 µg/kg*min) oder UT 15 (0,37 µg/kg*min) statt (Mittelwert ± SEM nach n=8 Experimenten).

4.3 Wirkungen des PDE-Inhibitors Sildenafil auf die U46619 induzierte PH

Die Wirksamkeit des zur Therapie der erektilen Dysfunktion zugelassenen PDE 5 Inhibitor Sildenafil bei der PAH konnte in experimentellen und kleineren klinischen Studien belegt werden (37,92). Jedoch gab es zur Wirkweise noch Klärungsbedarf. Die Ergebnisse der nachfolgenden Versuchsreihen geben Hinweise auf die Wirkweise der Substanz, die zum Zeitpunkt der Experimente bereits im Off-Label-Use bei der PH verwendet wurde.

4.3.1 Vergleich von inhalativer versus intravenöser Applikation des PDE 5-Inhibitors Sildenafil auf Hämodynamik und Gasaustausch

Um neben der bekannten pulmonalen Selektivität von Sildenafil (39) auch auf eine intrapulmonale Selektivität schließen zu können, wurden die inhalative und systemische Applikationform hinsichtlich Hämodynamik und Gasaustausch miteinander verglichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei beiden Verumgruppen eine signifikante Senkung des PAP (Abb. 4.6). 0,35 µg/kg*min intravenöses Sildenafil senkte den PAP signifikant von $18,8 \pm 0,4$ mmHg auf $15,2 \pm 0,4$ mmHg bis zum Zeitpunkt $t=45$ und hielt sich weitere 45 min fast konstant bei diesen Werten ($t=90$: $15,3 \pm 0,6$ mmHg). Bei fünfminütiger Inhalation mit Sildenafil und einer Depositionsdosis von durchschnittlich 0,35 µg/kg*min fiel der PAP signifikant von $18,9 \pm 0,3$ mmHg auf $16,9 \pm 0,8$ mmHg nach der ersten Verneblungsperiode und auf $14,3 \pm 0,9$ mmHg nach einem weiteren Inhalationszeitraum. Der SAP sank in allen drei Versuchsgruppen zum Versuchsende hin ab (Kontrolle: von $82,1 \pm 3,6$ auf $82,1 \pm 3,4$ mmHg und $70,1 \pm 4,7$ mmHg / Sildenafil aer: von $86,2 \pm 2,9$ mmHg auf $87,2 \pm 2,8$ mmHg und $74,3 \pm 4,4$ mmHg), wobei die intravenöse Applikation direkt nach Beginn der kontinuierlichen Infusion ein Senkung zur Folge hatte (von 83 ± 3 mmHg auf $71,6 \pm 3,2$ mmHg und $71,8 \pm 4,2$ mmHg). Die Änderungen des SAP waren nicht signifikant.

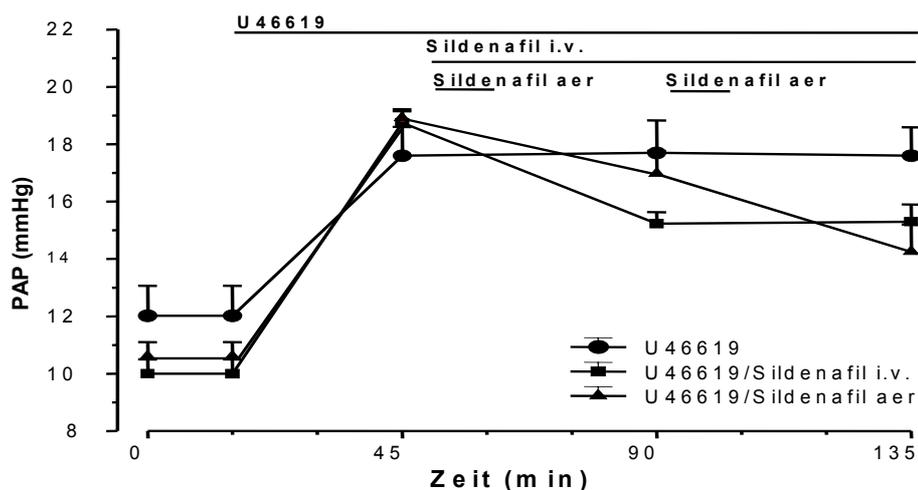


Abb. 4.6: Einfluss von intravenös und inhalativ verabreichten Sildenafil auf den PAP bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der PAP wurde durch U46619 auf ein Druckplateau von 17-19 mmHg angehoben. Im Anschluss daran fand entweder keine weitere Intervention, eine zehnmütige Inhalation ($0,35 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) oder eine kontinuierliche Infusion ($0,35 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) mit Sildenafil statt (Mittelwert \pm SEM aus $n=5$ Experimenten) ($t=0$ entspricht 45 min, $t=45$ entspricht 90 min, $t=90$ entspricht 135 min).

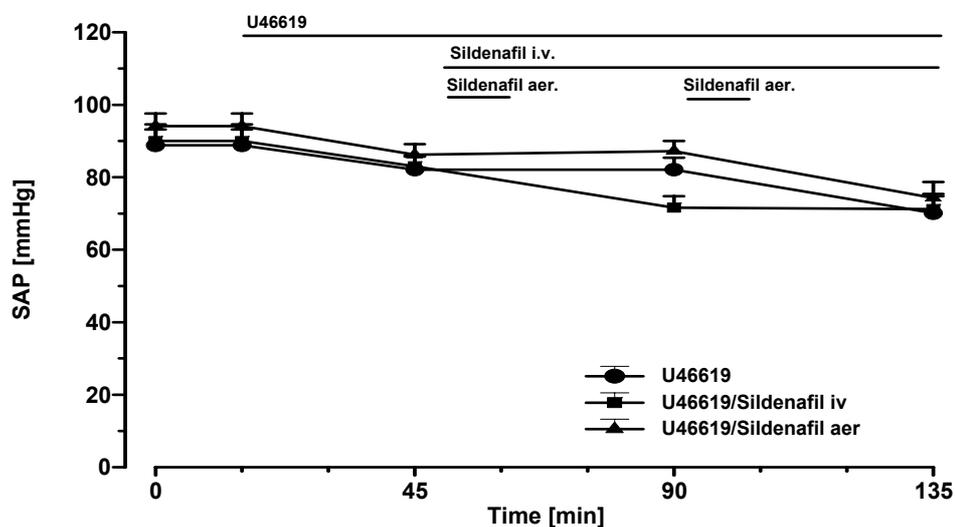


Abb. 4.7: Einfluss von intravenös und inhalativ verabreichtem Sildenafil auf den SAP bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Darstellung der SAP-Entwicklung während eines standardisierten Versuchsablaufs bei dem durch kontinuierliche Infusion von U46619 ein pulmonales Druckplateau zwischen 17-19 mmHg erzeugt wurde und anschließend entweder keine weiteren Interventionen, eine zehnmütige Inhalation ($0,35 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) oder eine kontinuierliche Infusion ($0,35 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) mit Sildenafil stattfanden (Mittelwert \pm SEM aus $n=5$ Experimenten) ($t=0$ entspricht 45 min, $t=45$ entspricht 90 min, $t=90$ entspricht 135 min).

Durch das hohe Sauerstoffangebot von 100 % lagen die aPO_2 -Werte sehr hoch. Die arteriellen P_aO_2 -Werte änderten sich in der Kontrollgruppe und durch die Infusion mit Sildanfil nicht signifikant. Die Aerosolierung von Sildenafil führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der O_2 -Partialdrücke (von 453 ± 19 mmHg auf 521 ± 6 mmHg ($t=45$) und $t=90$: 492 ± 5 mmHg). Das HZV stieg bei alleiniger U46619-Infusion signifikant an (von 565 ± 59 ml/min auf 826 ± 186 ml/min und 806 ± 206 ml/min). Unter Sildenafil-Infusion stieg es ebenfalls signifikant von 430 ± 57 ml/min auf 468 ± 76 ml/min und 470 ± 77 ml/min an. Durch die Verneblung fiel das HZV zunächst von 526 ± 23 ml/min auf 511 ± 35 ml/min, um dann wieder auf 543 ± 56 ml/min) anzusteigen ($p>0,05$). Bei den restlichen arteriellen und venösen Blutgasen gab es ebenfalls keine signifikanten Änderungen. Alle Werte sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tab. 4.2: Ergebnisse von Hämodynamik und Blutgasen im Modell der durch U46619 induzierten Pulmonalen Hypertonie beim intakten Tiermodell (Mittelwert \pm SEM aus $n=5$ Experimenten).

	U46619/Kontrolle				U46619/Sil. i.v.				U46619/Sil. aer.			
	prä	U46	45'	90'	prä	U46	45'	90'	prä	U46	45'	90'
P_{SA}	88.8	82.1	82.1	70.1	89.9	83.0	71.6	71.8	94.1	86.2	87.2	74.3
mmHg	± 4.4	± 3.6	± 3.4	± 4.7	± 4.6	± 3.0	± 3.2	± 4.2	± 3.5	± 2.9	± 2.8	± 4.4
P_{PA}	12.0	17.6	17.7	17.6	10.0	18.8	15.2	15.3	10.6	18.9	16.9	14.3
mmHg	± 1.1	± 1.0	± 1.1	± 1.0	± 0.5	± 0.4	± 0.4	± 0.6	± 0.5	± 0.3	± 0.8	± 0.9
HZV,	576	565	826	806	610	430	468	470	657	526	511	543
ml/min	± 52	± 59	± 186	± 206	± 68	± 57	± 76	± 77	± 63	± 23	± 35	± 56
P_aO_2 ,	467	451	459	467	481	467	459	463	457	453	521	492
mmHg	± 11	± 16	± 14	± 8	± 10	± 22	± 16	± 19	± 15	± 19	± 6	± 5
PH_a	7.51	7.40	7.35	7.35	7.48	7.43	7.38	7.33	7.49	7.45	7.36	7.36
	± 0.02	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.02
P_aCO_2 ,	32.5	36.1	35.2	32.2	36.7	40.5	39.1	33.2	35.3	36.9	36.8	34.8
mmHg	± 1.5	± 0.8	± 1.8	± 0.9	± 2.5	± 3.1	± 2.4	± 1.6	± 2.3	± 2.0	± 1.5	± 1.5
P_vO_2 ,	42.1	41.0	47.9	45.0	36.2	30.5	33.9	32.7	37.2	33.6	39.0	39.0
mmHg	± 1.5	± 2.9	± 4.6	± 4.3	± 0.3	± 0.9	± 2.1	± 3.5	± 1.4	± 2.8	± 2.3	± 1.8
PH_v	7.46	7.33	7.28	7.25	7.43	7.36	7.31	7.22	7.45	7.40	7.30	7.28
	± 0.01	± 0.03	± 0.03	± 0.03	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.01	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.02
P_vCO_2 ,	38.0	46.4	45.7	47.8	41.3	52.9	54.5	56.8	40.4	46.8	47.8	47.2
mmHg	± 1.8	± 1.6	± 2.2	± 3.6	± 3.4	± 3.9	± 3.6	± 3.4	± 2.1	± 2.0	± 1.8	± 1.6

Nachdem die Wirkung der intravenösen und inhalativen Applikationsform auf den PAP gezeigt werden konnte, wurden die Gasaustauschbedingungen in der Lunge der Kaninchen miteinander verglichen. Nach intravenöser Applikation von Sildenafil kam es zu einer Optimierung der norm V/Q-Areale (Abb.4.8), ausgehend von $95,7 \pm 2,3\%$ auf $96,4 \pm 2,2\%$ nach 45 min und auf $99,5 \pm 0,5\%$ nach 90 min ($p > 0,05$). Die durch U46619-Infusion hervorgerufene, geringe Shuntperfusion (Abb.4.9) von $2 \pm 1\%$ sank bis zum Versuchsende auf 0 ($p > 0,05$). Denselben Trend spiegelte die low-V/Q wider. Analog dazu verhielten sich die Werte von SD Q (t=0: $1 \pm 0,2$ auf $0,4 \pm 0,02$ bis t=90) und SD V (t=0: $0,9 \pm 0,2$ auf $0,4 \pm 0,02$ bis t=90). Die Totraumventilation stieg signifikant von $42,9 \pm 8,9\%$ (unter Plateau-Bedingungen) auf $59,2 \pm 10,6\%$ bis zum Versuchsende an. Durch die Inhalation von Sildenafil veränderte sich die norm-V/Q von $93,5 \pm 4,3\%$ (t=0) über $97,5 \pm 1,5\%$ (t=45) auf $96,4 \pm 4,3\%$ zum Zeitpunkt der letzten MIGET ($p > 0,05$). Der durch U46619 induzierte Shuntfluss von $3,2 \pm 1,7\%$ nahm nach 45 min ab ($1,4 \pm 0,6\%$) und stieg zum Ende auf $2,4 \pm 1,2\%$ an ($p > 0,05$). Der Anteil der low-V/Q-Areale sank zunächst von $5,7 \pm 2\%$ (t=0) auf $1,6 \pm 0,4\%$ (t=45), um dann wieder bis $4,6 \pm 2\%$ anzusteigen ($p > 0,05$). Die SD Q fiel von $0,9 \pm 0,2$ (t=0) über $0,6 \pm 0,2$ (t=45) auf $0,7 \pm 0,1$ (t=90). Die Totraumventilation fiel unter Inhalation von Sildenafil signifikant von $67,5 \pm 14\%$ (t=0) nach 45 min auf $52,5 \pm 10,1\%$ und zum Versuchsende auf $50,9 \pm 11,9\%$.

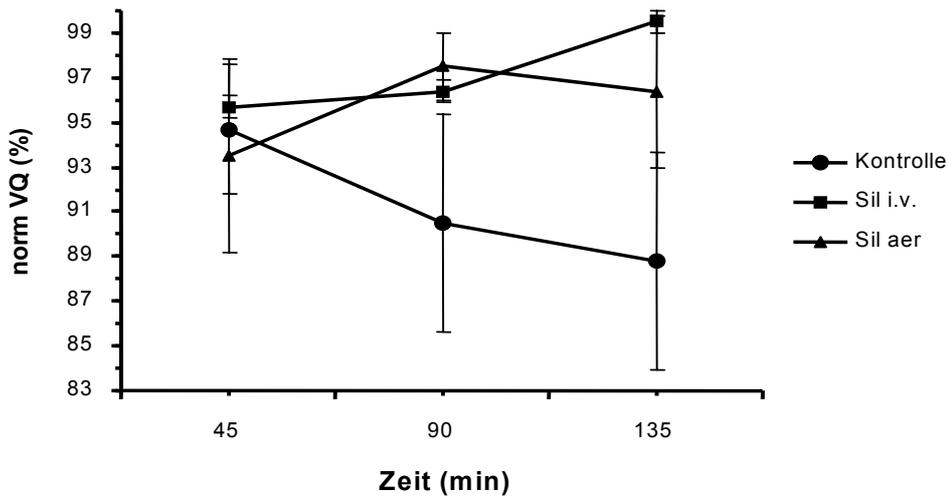


Abb. 4.8: Einfluss von intravenös und inhalativ verabreichtem Sildenafil auf die Ventilation (norm V/Q %) bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die norm V/Q der Sildenafil-Gruppen beider Applikationswege verbesserte sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen – jedoch nicht signifikant (Mittelwert \pm SEM aus n=5 Experimenten) (t=0 entspricht 45 min, t=45 entspricht 90 min, t=90 entspricht 135 min).

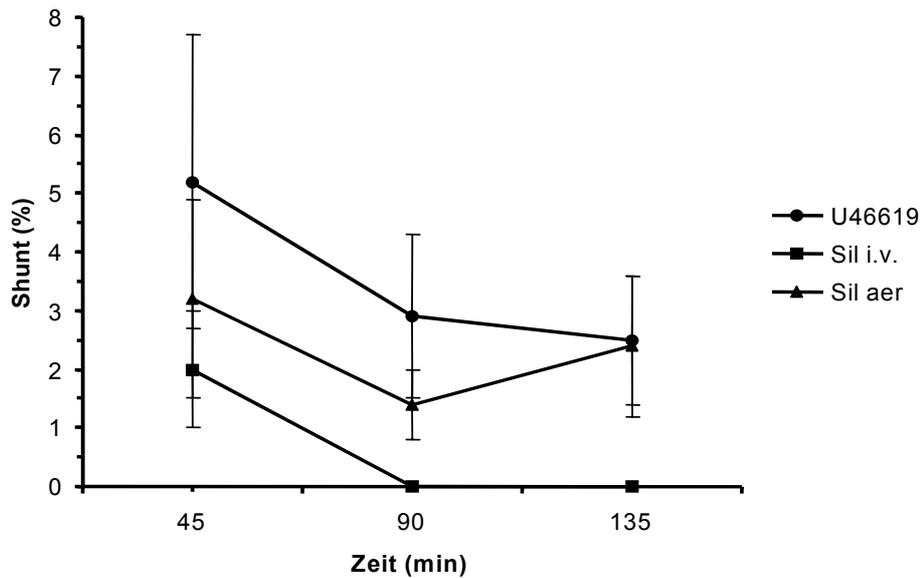


Abb. 4.9: Einfluss von intravenös und inhalativ verabreichtem Sildenafil auf den Shuntfluss bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nach Infundieren von Sildenafil wurde der Shuntfluss aufgehoben. Bei der Kontrollgruppe sank er leicht. Nach Inhalation mit Sildenafil sank der Shuntfluss zunächst ab, um in den darauffolgenden 45 min wieder anzusteigen. Die Veränderungen waren nicht signifikant (Mittelwert \pm SEM aus n=5 Experimenten) (t=0 entspricht 45 min, t=45 entspricht 90 min, t=90 entspricht 135 min).

4.3.2 Effekte verschiedener Kombinationstherapien mit i.v. verabreichtem Sildenafil, dem i.v. applizierten PDE 1 Inhibitor 8MM-IBMX und inhalativem Iloprost

Die Kombination mit dem gut untersuchten Prostanoidanalogon Iloprost und dem selektiven PDE 1 Inhibitor 8MM-IBMX sollte Hinweise auf die Wirkweise von Sildenafil geben. Zunächst wurden die Dosiswirkungskurven der PDE Inhibitoren erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Sildenafil als auch 8MM-IBMX den PAP signifikant senkten, sich die Dosierungen jedoch um zwei Größenordnungen unterschieden (Abb. 4.10). Wie in Abb. 4.11 zu sehen ist, war die pulmonale Drucksenkung bei 8MM-IBMX (Dosierungen von 6-600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) mit einer signifikanten systemischen Drucksenkung verbunden, nicht so bei Sildenafil (Dosierungen von 0,1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$).

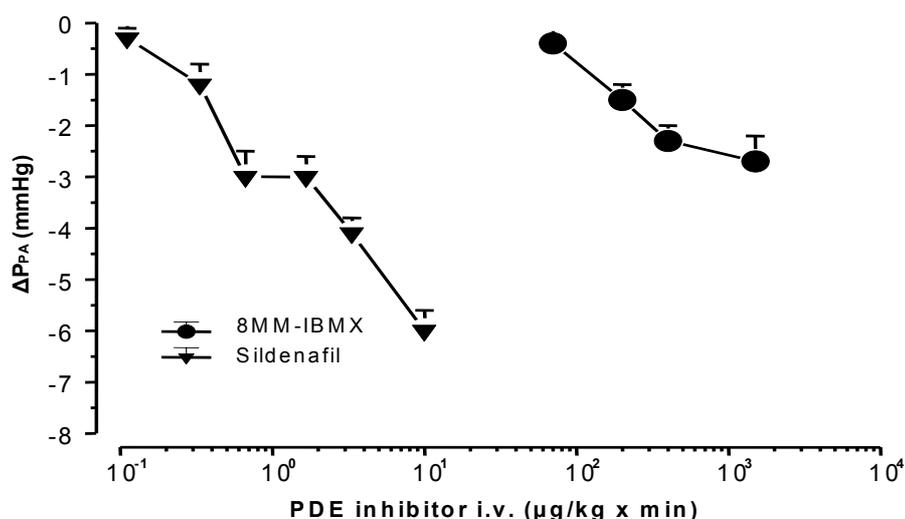


Abb. 4.10: Dosiswirkungskurven von PDE- Inhibitoren auf den PAP bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie. Auswirkung von intravenösen Sildenafil- und 8MM-IBMX-Bolusgaben auf den PAP. Dieser war durch kontinuierliche Infusion von U46619 auf ein Druckplateau zwischen 23-25 mmHg eingestellt worden (Mittelwert \pm SEM aus n=6 Experimenten).

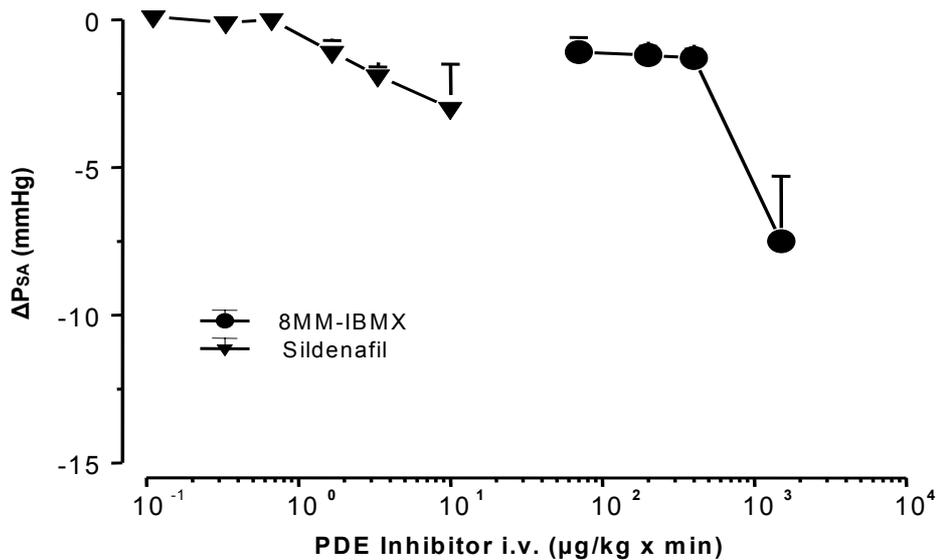


Abb. 4.11: Dosiswirkungskurven von PDE-Inhibitoren auf den SAP bei durch U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Auswirkungen von intravenösen Sildenafil- und 8MM-IBMX-Bolusgaben auf den SAP während eines standardisierten Versuchsablaufs. Durch kontinuierliche Infusion von U46619 war ein stabiles pulmonales Druckplateau von 23-25 mmHg erzeugt worden (Mittelwert \pm SEM aus n=6 Experimenten).

Die zehnmütige Inhalation mit $0,48 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ des gut untersuchten Iloprost in Kombination mit intravenöser Bolusgabe von durchschnittlich $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ Sildenafil führte zu einer signifikanten Senkung des durch U46619 induzierten PAP von $25,7 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ auf $21,8 \pm 0,3 \text{ mmHg}$. Der SAP änderte sich nicht signifikant. Das HZV stieg signifikant von $444 \pm 19 \text{ ml}/\text{min}$ auf $488 \pm 35 \text{ ml}/\text{min}$. Arterielle und venöse Blutgase änderten sich nicht signifikant. Alle Werte sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Durch die Kombination beider Substanzen konnte eine signifikante Verlängerung der Wirkdauer von etwa 40 min – bei alleiniger Iloprost-Verneblung – auf $> 60 \text{ min}$ erreicht werden (Abb. 4.12). Das spiegelt sich besonders in der Darstellung der AUC (Area Under the Curve, Abb. 4.14) wider.

Die Kombination einer zehnmütigen Inhalation mit $0,48 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ Iloprost und anschließender Bolusgabe von $93,7 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ 8MM-IBMX über zwei Minuten senkte den PAP ebenfalls signifikant von $24,8 \pm 0,7 \text{ mmHg}$ auf $21,1 \pm 0,8 \text{ mmHg}$. Auch bei dieser Kombination änderten sich der SAP und die

Blutgase nicht signifikant. Nur der arterielle PO_2 sank signifikant von 228 ± 7 mmHg auf 188 ± 12 mmHg und das HZV stieg ebenfalls signifikant von 393 ± 24 ml/min auf 437 ± 29 ml/min an. Bei Betrachtung der Gesamtwirkdauer verlängerte sich der vasodilatatorische Effekt durch die Kombination von Iloprost und 8MM-IBMX signifikant um mehr als 20 min im Vergleich zur alleinigen Iloprost-Inhalation (Abb. 4.12). Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Effekten der Kombinationen Iloprost/Sildenafil (AUC: $1183 \pm 136\% \Delta P_{PA} \cdot \text{min}$) und Iloprost/8MM-IBMX (AUC: $1206 \pm 177\% \Delta P_{PA} \cdot \text{min}$), was besonders in der AUC-Grafik (Abb. 4.14) ins Auge fällt.

Die Kombination einer zehnminütigen Iloprost-Inhalation mit $48 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$, einer intravenösen Bolusgabe von $1,6 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$ Sildenafil und einem abschließenden Bolus von $93,7 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$ 8MM-IBMX senkte den PAP signifikant von $25,0 \pm 0,4$ mmHg auf $20,4 \pm 0,3$ mmHg. Auch durch die Dreifachkombination änderte sich der SAP und die Blutgase nicht signifikant. Das HZV stieg nach Gabe der Substanzen signifikant auf Werte bis 505 ± 30 ml/min an (vor der Intervention: 454 ± 27 ml/min). Die drucksenkenden pulmonal-arteriellen Effekte der Dreifach-Substanzkombination lagen signifikant über denjenigen der alleinigen Iloprost-Verneblung. Im Vergleich zu den Kombinationen Iloprost/Sildenafil und Iloprost/8MM-IBMX gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Das zeigt sich ebenfalls besonders bei Betrachtung der AUC-Grafik (Abb. 4.14). Der vasodilatierende Effekt überstieg mit >60 min den der alleinigen Iloprost-Verneblung. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Iloprost/Sildenafil- oder Iloprost/8MM-IBMX-Kombination. Die Wirkung der kombinierten Gabe aller drei Vasodilatoren auf den systemischen Blutdruck war – prozentual gesehen – höher als bei allen anderen Substanz-Variationen ($p > 0,05$).

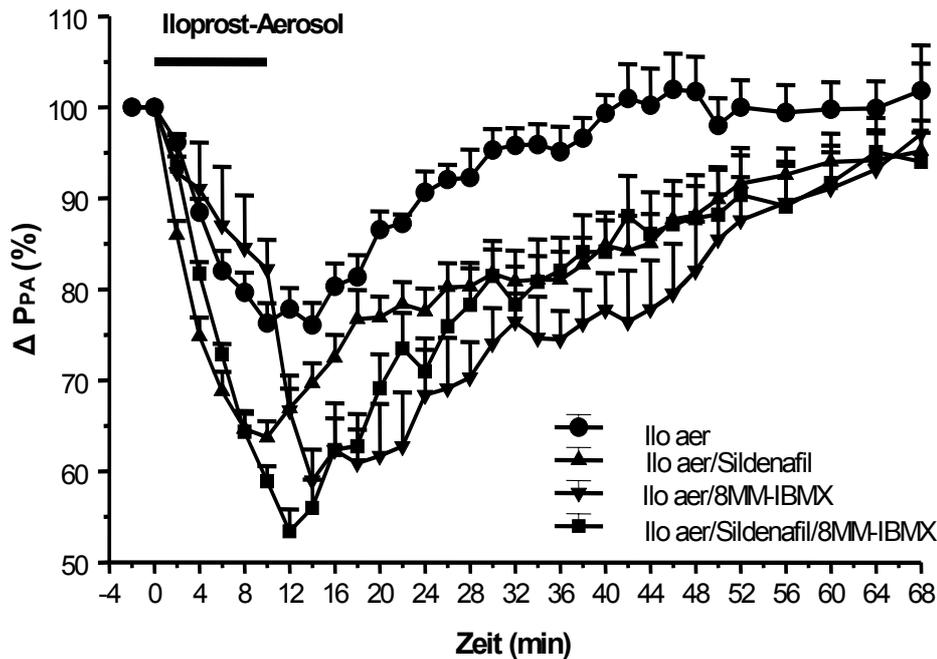


Abb. 4.12: Einfluss der Iloprost-Aerosolapplikation und seiner Kombination mit verschiedenen intravenös verabreichten PDE-Inhibitoren auf den PAP bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Nach Erreichen eines stabilen pulmonal-arteriellen Druckplateaus fand eine zehninminütige Inhalation mit Iloprost statt ($0,48 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$). Dieser folgte – je nach Versuchsmodus – eine Bolusapplikation der PDE-Inhibitoren: $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ Sildenafil u./o. $93,7 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ 8MM-IBMX (Mittelwert \pm SEM aus $n=8$ Experimenten).

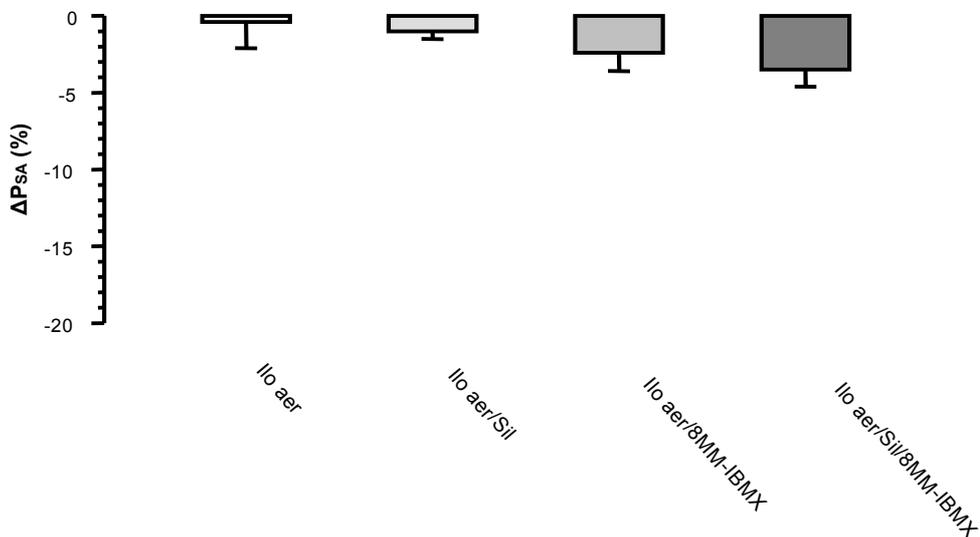


Abb. 4.13: Einfluss der Iloprost-Verneblung und seiner Kombination mit verschiedenen intravenös verabreichten PDE-Inhibitoren auf den SAP bei U46619 induzierter Pulmonaler Hypertonie.

Die Versuchsreihen entsprechen denen in Abb. 4.12. Der P_{SA} (in % zum Ausgangsniveau) wurde am Ende der Verneblungsperiode bestimmt (Mittelwert \pm SEM nach $n=8$ Experimenten).

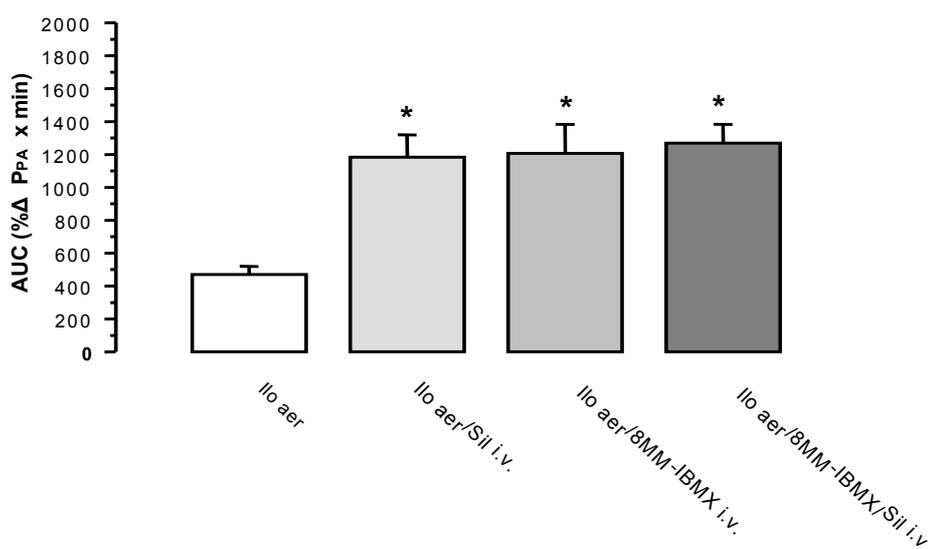


Abb. 4.14: Einfluss von PDE-Inhibitoren auf die AUC (area under the curve) der durch Iloprost induzierten Senkung des pulmonal-arteriellen Drucks(P_{PA}).

Die Einheit der Standardtechnik der AUC ist $\% \Delta P_{PA} \times \text{min}$. Die Werte entsprechen den Versuchsreihen, die in Abb.4.12 dargestellt sind (*, $p < 0,05$ im Vergleich zur alleinigen Iloprost-Verneblung).

Tab. 4.3: Ergebnisse von Hämodynamik und Blutgasen im Modell der durch U46619 induzierten Pulmonalen Hypertonie beim Ganztier.

	U46619/Ilo		U46619/Ilo/ Sil		U46619/Ilo/ 8MM-IBMX		U46619/Ilo/ 8MM-IBMX/Sil	
	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post
P_{SA} , mmHg	109 ±3	102 ±3	106 ±3	105 ±2	107 ±2	104 ±4	93 ±4	92 ±4
P_{PA} , mmHg	25.8 ±0.6	22.7* ±0.4	25.7 ±0.2	21.8* ±0.3	24.8 ±0.7	21.1* ±0.8	25.0 ±0.4	20.4* ±0.3
HZV, ml/min	432 ±27	452 ±25	444 ±19	488 ±35	393 ±24	437 ±29	454 ±27	505 ±30
P_aO_2 , mmHg	183 ±12	177 ±10	191 ±6	203 ±4	228 ±7	188 ±12	171 ±10	173 ±11
PH_a	7.37 ±0.03	7.32 ±0.01	7.36 ±0.02	7.32 ±0.02	7.41 ±0.02	7.38 ±0.02	7.35 ±0.02	7.34 ±0.02
P_aCO_2 , mmHg	41.5 ±2.0	40.7 ±1.0	42.0 ±4.1	45.2 ±4.0	36.2 ±1.6	37.7 ±1.5	45.9 ±1.7	47.6 ±1.4
P_vO_2 , mmHg	39.9 ±1.7	42.6 ±1.2	39.7 ±2.3	44.9 ±1.4	35.8 ±1.5	39.7 ±2.1	39.7 ±2.5	44.9 ±2.6
PH_v	7.34 ±0.03	7.29 ±0.01	7.23 ±0.02	7.20 ±0.02	7.37 ±0.02	7.31 ±0.03	7.29 ±0.02	7.28 ±0.02
P_vCO_2 , mmHg	48.9 ±2.3	49.7 ±1.1	59.2 ±1.6	60.6 ±1.4	44.6 ±2.5	44.9 ±2.5	53.8 ±2.0	52.9 ±2.2

5 Diskussion

5.1 U46619 induzierte Pulmonale Hypertonie und Etablierung der MIGET beim intakten Tiermodell

5.1.1 U46619 induzierte Pulmonale Hypertonie

Der Einsatz von U46619 zur Erzeugung einer Pulmonalen Hypertonie (PH) wurde schon zur Testung einer Vielzahl vasodilatativer Substanzen im Ganztiermodell (100,101), aber auch bei anderen Versuchsmodellen – beispielsweise dem Modell der isolierten Lunge (5,102) – getestet. In einem Zeitraum von etwa einer halben Stunde gelang es in den vorliegenden Versuchsreihen, ein stabiles pulmonales Druckplateau zu erzeugen. Dabei wurden Substanzmengen von 1,57 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ bis 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ benötigt. Auch nach den Interventionen in Form von Inhalationen oder intravenöser Substanzapplikation konnte das Ausgangsniveau wieder erreicht werden. Beim Einstellen des pulmonalen Druckplateaus wurde der pulmonal-arterielle Druck (PAP) gezielt nur derart erhöht, dass es zu keiner Veränderung des systemisch-arteriellen Druckes (SAP) kam. Der Einsatz der systemischen und der intrapulmonalen Druckmessung ermöglichte diesbezüglich eine adäquate Steuerung. Einflüsse von U46619 machten sich etwa durch leichtes Ansteigen des HZV (Herzzeitvolumen) oder Absinken des arteriellen PO_2 (Sauerstoff-Partialdruck) bemerkbar. Andere Messwerte wie die venösen Blutgase und die Nierenfunktion (kontrolliert durch die Urinausscheidung mittels Blasenkatheter) wurden hingegen kaum oder gar nicht beeinflusst. U46619 stellte somit eine geeignete Substanz für die vorliegenden Versuchsreihen dar.

Die Wirkung des Thromboxanmimetikums U46619 wird über den TP-Rezeptor vermittelt, dessen endogener Ligand TXA_2 darstellt (105). Hohe Level von TP-mRNA-Expression wurden im Thymus gefunden, gefolgt von Milz, Lunge und Nieren. Kleinere Mengen werden auch in Herz, Uterus und Gehirn exprimiert

(14). Die Signaltransduktion erfolgt G-protein-gekoppelt. Hierdurch werden Kalzium/DAG (Diacylglycerol) aktiviert (33,91). Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration im Serum erhöht sich, was eine Kontraktion der glatten Muskelzellen zur Folge hat. Durch die kurze Halbwertszeit von U46619 lässt sich beim Ganztiermodell ein stabiles Druckplateau erzeugen. Der PAP kann so gezielt eingestellt werden. Die induzierte Stimulation des pulmonalen Gefäßsystems wirkt sich vornehmlich in einer Erhöhung des präkapillären Widerstandes aus (102,103). Dies könnte einen Grund dafür darstellen, dass die Lungen der Kaninchen postmortal wenig ödematöse Veränderungen zeigten, da die präkapilläre Vasokonstriktion interstitieller Ödembildung vorbeugte. (Hierauf wird in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen). Bei einigen Autoren wird auch eine partiell venös lokalisierte Vasokonstriktion durch U46619 beschrieben (5,102).

5.1.2 MIGET

Die MIGET stellt seit Jahren eine bewährte Methode zur Untersuchung von Gasaustauschstörungen der PH im Modell der „Isolierten Lunge“ (44,96,102) dar. Mit der vorliegenden Arbeit wurde die MIGET erstmals zur Untersuchung der Gasaustauschverhältnisse der PH im intakten Tiermodell herangezogen. Hierdurch wurde eine umfassende Untersuchung beim Vergleich der Effekte von intravenös versus inhalativ appliziertem Sildenafil und der dadurch entstehenden Auswirkungen auf die Lungenfunktion ermöglicht. Die Ventilation mit dem Babylog 8000-Respirator, standardmäßig im Ganztiermodell mit MIGET-Einsatz verwendet, ermöglichte es, einen Überblick über die Wirkung der Substanz auf den Gasaustausch zu erhalten.

Insgesamt waren – im Gegensatz zur Literatur (44,102) – nur mäßige Gasaustauschstörungen durch U46619 nachweisbar. Dies könnte durch das vorliegende Versuchsmodell und die darin veränderte Administration und Dosierung des Thromboxanalogons erklärt werden: Beim Modell der „Isolierten Lunge“ können die PAP ohne Rücksicht auf den SAP verabreicht

werden. Die Titrierung über das Perfusat erfolgt gezielt nur auf die Lungenstrombahn. Dadurch konnten die Lungen in jenen Versuchsreihen stärker geschädigt werden, ohne das Herz-Kreislaufsystem als limitierenden Faktor zu haben. Die Entwicklung eines U46619-induzierten Lungenödems mit derart schweren Funktionsstörungen des Gasaustausches wurden in den vorliegenden Versuchsreihen gar nicht erreicht.

5.2 Effekte der Prostanoidanaloga Iloprost und UT 15 auf die U46619 induzierte PH

Iloprost zeigte sich mit einer durchschnittlichen Dosierung von 0,48 µg/kg*min als potenter Vasodilatator im Modell der U46619-induzierten PH. Es konnte eine reversible Senkung des PAP beobachtet werden. Etwa 30 min nach der Inhalation wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Diese Beobachtungen decken sich mit früheren Veröffentlichungen (39,100). Die vasodilatativen Effekte der Prostanoiden werden über PG-Rezeptoren vermittelt. Dabei handelt es sich um Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die in der Plasmamembran verankert sind. Bei Bindung des Liganden erfolgt die Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine, bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Bei Rezeptoraktivierung kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit und zu deren Dissoziation. In der Folge kann die α -Untereinheit, beladen mit GTP, die Adenylatzyklase aktivieren oder hemmen oder aber die Phospholipase C aktivieren. Intrazellulär entstehen als second messengers entweder cAMP oder durch Spaltung von Phosphatidylinositolbiphosphat Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (93). cAMP gilt als Hauptmediator der Iloprost-vermittelten vasodilatativen Effekte in glatten Muskelzellen (22,38,105) und wirkt über eine Aktivierung der Proteinkinase A. IP₃ wirkt über Aktivierung liganden-aktivierter Kalziumkanäle im Endoplasmatischen Retikulum. Diacylglycerin agiert über eine Aktivierung der Proteinkinase C (93). Durch inhalative Administration entfaltete Iloprost in der vorliegenden Arbeit noch während der zehnminütigen Verneblung seine

pulmonal-arterielle, drucksenkende Wirkung. Systemische Wirkungen, in Form eines Abfalls des SAP, traten erst gegen Ende der Verneblungen ein. Ursächlich kommt für diese Beobachtungen eine rasche Verteilung des Wirkstoffes auf der gesamten belüfteten Lungenoberfläche und eine damit verbundene rasche Bindung an PG-Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen in Betracht. Es entfaltet sich somit eine pulmonale Wirkung, ehe Iloprost in den Intravasalraum gelangen und eine systemische Antwort auslösen kann. Für das Abklingen der Wirkung nach einer knappen halben Stunde können drei mögliche Mechanismen verantwortlich gemacht werden:

- I) ein Übertritt der Substanzen ins Blut und/oder
- II) eine Abnahme des cAMP-Spiegels und/oder
- III) eine Desensibilisierung der PG-Rezeptoren.

Diese Theorien erklären sich aus folgenden Tatsachen: Mit PDE-Inhibitoren kann eine Verlängerung der pulmonalen Vasodilatation durch Abbauhemmung von cAMP erreicht werden. Weiterhin führt eine Verlängerung der Inhalationsdauer zu keiner verlängerten oder intensivierten pulmonalen Antwort.

Die Versuche mit dem stabilen Prostazyklinanalogon UT 15 im Modell der Pulmonalen Hypertonie wurden mit drei verschiedenen Dosisgruppen durchgeführt (25 $\eta\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, 71 $\eta\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, 0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$). Noch während der zehnmütigen Inhalationsphase trat die pulmonal-arteriell drucksenkende Wirkung der Substanz ein. Dabei wurde der PAP schon bei der geringsten Dosisgruppe signifikant gesenkt. Der rasche Wirkeintritt erklärt sich durch eine schnelle Bindung an Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen. Bei Betrachtung des systemischen Blutdrucks konnte bei der niedrigsten Depositionsgruppe eine drucksenkende Wirkung beobachtet werden. Bei der 71 $\eta\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ -Gruppe blieb der SAP nahezu konstant. Bei der 0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ -Gruppe stieg er sogar an. Diese Tatsache wirft die Frage auf, ob inhaliertes UT 15 eine direkte Wirkung auf das systemische Gefäßsystem ausübt. Die Effekte könnten auch

indirekt über venöses Pooling (nach Vasodilatation) im Lungenkreislauf und durch vermehrte Herzarbeit (durch Anstieg des kardialen Volumenangebotes) bei nachlassender pulmonaler Vasokonstriktion entstanden sein. Die Tatsache, dass das HZV bei der geringsten Depositionsgruppe nahezu konstant blieb, bei höherer Dosierung aber anstieg, könnte die vorangehende Theorie bestätigen. Der PO_2 sank in allen drei Versuchsgruppen. Grund hierfür könnte eine kürzere alveolar-kapilläre Kontaktzeit bei steigendem HZV sein. Der $aPCO_2$ aller drei Interventionsreihen stieg unspezifisch an. Dies könnte in Kombination mit gleichzeitig, leicht sinkenden pH-Werten auf eine vermehrte Arbeitsbelastung des Organismus hindeuten.

Beide Substanzen stellten sich in den vorliegenden Versuchsreihen als potente Vasodilatoren dar. Es konnte gezeigt werden, dass UT 15 direkt nach der Verneblung eine stärkere pulmonal-arterielle Wirkung erzielt als Iloprost. Um eine Aussage darüber machen zu können, worin sich die Wirkweisen beider Substanzen unterscheiden, wurden auch die Wirkungen der Inhalation von $0,48 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ Iloprost mit denjenigen von $0,37 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ UT 15 über einen längeren Zeitraum verglichen. Es zeigte sich, dass die pulmonal drucksenkende Wirkung beider Substanzen unvermittelt nach Beginn der Verneblung einsetzte und der PAP fast linear abnahm. Nach Ende der zehnminütigen Verneblungsperiode stagnierte die drucksenkende Wirkung von Iloprost und die Werte kehrten innerhalb von etwa 30 min zu ihrem Ursprung zurück. Anders bei UT 15: Auch nach Beendigung der Verneblung erfuhr der PAP eine weitere – wenn auch weniger starke – Minderung. Erst im Anschluss daran stiegen die Werte wieder an. Jedoch wurde auch nach 60 min das Druckplateau noch nicht wieder erreicht. Die Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Clapp LH et al. Die Forschergruppe konnte belegen, dass UT 15 eine hohe Effektivität in der Möglichkeit der intrazellulären cAMP-Steigerung hatte. Zudem wurden deutlich verlängert erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel nachgewiesen (57). Wird beim Vergleich von Iloprost und UT 15 zusätzlich der SAP betrachtet, so fällt Folgendes auf: Die Iloprost-Wirkung trat

nach ungefähr 10 min ein. Dies entsprach einem Druckabfall gegen Ende der Inhalationsperiode. Bei UT 15 hingegen war während der Verneblungsperiode ein leichter Anstieg des SAP zu beobachten. Es zeigten sich anschließend nur geringe Tendenz zum Abfall des Blutdrucks.

Die unterschiedlichen Wirkweisen könnten auf folgende Ursachen zurückzuführen sein:

- ◆ Die vasodilatierende Wirkung beider Substanzen erfolgt teilweise oder vollständig über verschiedene Prostanoid-Rezeptoren.
- ◆ Die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) erfolgt über unterschiedliche Isoformen.
- ◆ Die Wege der Signaltransduktion variieren.
- ◆ Es bestehen Unterschiede in der chemischen Stabilität, im Bindungsverhalten an Plasma- und Gewebeproteine oder auch in der Metabolisierung beider Substanzen.

Die Theorie, dass variierende Effekte auf die chemische Stabilität zurückzuführen sind, ist sehr unwahrscheinlich, da PGI₂-Analoga in der Literatur als stabil in wässrigen Lösungen beschrieben wurden (107). Das Bindungsverhalten der Substanzen kann aufgrund der Tatsache vernachlässigt werden, dass durch die inhalative Applikationsform direkt der Wirkort erreicht wird, ohne Blut als Transportmedium nutzen zu müssen. Es ist zwar eine Wirkung durch Metabolismus rezirkulierender Substanzen über β -Oxidation in der Leber denkbar, da aber die Metabolisierung beiderseits über die β -Oxidation erfolgt, ergibt sich auch hieraus kein Anhalt für differierende Verhaltensweisen. Um eine Aussage über unterschiedliche Rezeptoraffinitäten und Signaltransduktionswege zu treffen, müssen nachfolgende Erkenntnisse einbezogen werden: Primäre Prostanoid-Interagieren mit acht spezifischen Rezeptoren aus der Familie der G-protein-gekoppelten Rezeptoren: EP, FP, IP, TP, DP (33). Diese Siebentransdomänen-Rezeptoren der Familie A haben allseits ihr eigenes Profil der Ligandenbindung und einen vom bindenden Liganden abhängigen Signaltransduktionsweg. Die Ligandenbindung kann sowohl über extrazelluläre Bindungsregionen als auch über transmembranöse

Sequenzen erfolgen. Prostanoiden sind hydrophil und damit wenig membrangängig (107). Damit ist die Wirkung wahrscheinlich rezeptorvermittelt. In der Literatur werden die endogenen Liganden der PG-Familie als Substanzen mit sehr ähnlichen geometrischen Strukturen beschrieben (33). Das hat zur Folge, dass sie sich mit höchster Affinität an ihren artverwandtesten PG-Rezeptor binden. Es können jedoch auch Kreuzreaktionen mit anderen Rezeptoren der Familie vorkommen. Dasselbe gilt auch für Prostanoid-Analoga und spiegelt sich in den durch die Versuchsreihen gewonnenen Ergebnissen wider. Iloprost gilt als IP/EP₁-selektiver Agonist. Die vasodilatatorisch vermittelte Wirkung wird vor allem über oben genannte IP-Rezeptoren vermittelt (100). Über den EP₁-Rezeptor erfolgt eine Vasokonstriktion. Das könnte für die schwächere Wirksamkeit von Iloprost im Gegensatz zu UT 15 verantwortlich sein. Es werden zusätzlich Bindungen an EP₂-, EP₃-, EP₄- und DP-Rezeptoren beschrieben (33). Clapp LH et al. demonstrierten in ihren Versuchsreihen, dass UT 15 ebenfalls ein potenter Stimulator des IP-Rezeptors ist (57). Die Erkenntnisse klären jedoch nicht die signifikanten Unterschiede in der pulmonal-arteriellen Wirkung, die in den Versuchsreihen für die vorliegende Arbeit gewonnen werden konnten. Auch die hämodynamischen Differenzen können nicht eindeutig geklärt werden. Es ist zu vermuten, dass UT 15 – ebenso wie Iloprost – neben der Wirkung auf IP-Rezeptoren weitere Affinitäten zu anderen PG-Rezeptoren besitzt. Das könnte einer der Gründe für die höhere Wirkpotenz von UT 15 darstellen. Eine interessante Diskussionsgrundlage stellen der EP₂- und EP₄-Rezeptor dar. Die mRNA beider Rezeptoren wurde zu großen Teilen in der Lunge nachgewiesen (26,27). Für den EP₂-Rezeptor ist eine Relaxation glatter Muskelzellen *in vitro* beschrieben (26,28,36). Für EP₄ liegen Daten über beeindruckende vasodilatatorische Effekte im venösen und arteriellen Gefäßsystem vor (24,25,105). Zusätzlich besteht zwischen beiden G-protein-gekoppelten EP-Rezeptoren eine große strukturelle Gemeinsamkeit. Lediglich die Länge des C-terminalen Teils weist einen Unterschied auf. Das führt dazu, dass der EP₄-Rezeptor mit seinem längeren Teil für Phosphorylierung und Desensibilisierung verantwortlich ist, während der EP₂-

Rezeptor die Empfindlichkeit dieses Regulationsmechanismus steuert (24). Das Zusammenspiel beider Rezeptoren könnte ein Grund für die durch UT 15 vermittelte längere Wirkdauer darstellen. Dieses kann allerdings letztlich nur durch weitere Versuchsreihen geklärt werden.

Ein weiterer Diskussionsansatz beruht auf der Hypothese, dass die Wirkung von Iloprost und UT 15 über unterschiedliche AC-Isoformen vermittelt wird. Für die Lunge sind fünf AC-Isoformen – Typ 2, 3, 4, 7, 9 – vorbeschrieben (104), die jede für sich ihren spezifischen Signaltransduktionsweg aufweist. Clapp LH et al. vermuteten ebenfalls eine unterschiedliche Affinität der Prostaglandin-Analoga zu den verschiedenen AC-Isoformen. Sie führten zu diesem Zweck verschiedene Versuche mit den AC-Inhibitoren DDA (2,5´Dideoxyadenosine) und SQ 22536 durch. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von DDA die Wirkung von UT 15 signifikant einschränkte. Im Gegensatz dazu bewirkte SQ 22536 kaum etwas, ebenso wenig die Kombination beider Inhibitoren. Bei Iloprost zeigte sowohl die Wirkung von DDA als auch diejenige von SQ 22536 Effekte. DDA schränkte die Iloprost-Wirkung jedoch stärker ein. Die Kombination beider Inhibitoren verstärkte hier, ganz anders als bei UT 15, die Effekte. Clapp LH et al. konnten mit ihren Versuchsreihen belegen, dass in diesem Ansatzpunkt ebenfalls ein Schlüssel für die unterschiedlichen Wirkweisen beider Substanzen liegt (57).

Für die Unterschiede von Iloprost und UT 15 bezüglich der hämodynamischen Wirkungen weisen vorliegende Veröffentlichungen konträre Ergebnisse zu den gewonnenen UT 15-Daten auf (98). Die paradoxen Ergebnisse erklären sich wahrscheinlich durch Unterschiede in der Darreichung. Während bislang intravenöse oder subkutane Applikationen beschrieben wurden, stellt die für die vorliegende Arbeit angewandte Inhalation eine Verabreichungsform dar, die UT 15 direkt am gewünschten Wirkort positioniert. Dadurch konnten die systemischen Wirkungen dezimiert oder bei nahezu selektiver Wirkung auf ein Minimum reduziert werden. UT 15 könnte somit eine interessante Therapie-Alternative zu Iloprost bei Patienten mit PAH darstellen.

5.3 Wirkungen des PDE 5 Inhibitors Sildenafil auf die durch U46619 induzierte PH

5.3.1 Effekte von intravasal und inhalativ verabreichtem Sildenafil

In den vorliegenden Versuchsreihen sollte untersucht werden, ob sich Sildenafil positiv auf den Gasaustausch auswirkt. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Darreichungsformen miteinander verglichen: Zum Einen die intravenöse Applikation von Sildenafil, um zu bestätigen, dass die Substanz eine pulmonale Selektivität aufweist. Zum Anderen der Vergleich mit der inhalativen Verabreichung, um zu erfassen, ob zudem eine intrapulmonale Selektivität vorliegt. Das bedeutet, dass im Zielorgan Lunge bevorzugt die gut belüfteten Areale erreicht und Wirkungen dort entfaltet werden. Gegenübergestellt wurde beiden Versuchsreihen eine Kontrollgruppe, die lediglich die MIGET-Lösung erhielt, aber ansonsten ohne weitere Interventionen blieb.

Es zeigte sich, dass sowohl durch inhalative als auch durch intravenöse Sildenafil-Gaben die PAP-Werte signifikant gesenkt werden. Signifikante PAP-Senkungen bei intravenöser Applikation von Sildenafil wurden bereits in früheren Veröffentlichungen durch Schermuly RT et al. und Ryhammer PK et al. beschrieben (23,39). Ichinose F et al. konnten bei Schafen durch Inhalation von Sildenafil eine Senkung des PAP beobachten (83). Eine Gegenüberstellung beider Applikationsformen sollte zeigen, ob die direkte alveoläre Deposition von Sildenafil per Ultraschallvernebler einen Vorteil gegenüber der intravenösen Gabe erbringen konnte. Bei Betrachtung der Ergebnisse stellte sich heraus, dass durch intravenöse Applikation die PAP-Werte im ersten Versuchszeitraum stärker gesenkt wurden als unter inhalativen Bedingungen. Erst im zweiten Beobachtungszeitraum wurde der PAP durch Inhalation stärker gesenkt. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Die potenzierende Wirkung durch die zweite Aerosolierung lässt vermuten, dass bei einmaliger Inhalation das maximal drucksenkende Wirkpotenzial noch nicht erreicht wurde. Gründe hierfür könnten sein, dass bei einmaliger Verneblung ein Teil der

Aerosolpartikel im anatomischen Totraum verblieb. Erst im nachfolgenden Interventionsschritt erreichten sie den Zielort und wirkten somit alveolär. Insgesamt zeigt die i.v.-Gruppe im Gegensatz zur Inhalations-Gruppe ein stabileres Drucksenkungsniveau. Basale Drücke wurden von beiden Gruppen nicht wieder erreicht. Ein Tachyphylaxie-bedingter Anstieg der pulmonalen Drücke machte sich nicht bemerkbar. Die leichte Drucksenkung des SAP durch Sildenafil – bei relativ konstantem HZV – lässt auf eine schwache außerpulmonale Wirkung des Agens schließen. Die Beobachtungen decken sich mit Veröffentlichungen, die das Vorhandensein von PDE u.a. in glatten Muskelzellen von Gefäßen und Eingeweiden beschreiben (45). Abschließend lässt sich festhalten, dass Sildenafil ein unbestritten hohes Wirkprofil besitzt. Die Potenz der inhalativen Verabreichung auf den PAP bestätigt ein Vorhandensein von PDE 5 in den glatten Gefäßmuskelzellen des Lungenparenchyms. Sildenafil wirkt direkt am Zielorgan. Systemische Nebenwirkungen konnten dadurch reduziert werden.

Beim Vergleich der drei Versuchsreihen hinsichtlich des Gasaustauschs zeigten sich nur geringfügige Veränderungen. Während die normalventilierten und perfundierten Bereiche (norm V/Q) bei der Kontrollgruppe bis zum Versuchsende hin sanken, konnten sowohl bei intravenöser, als auch bei inhalativer Sildenafil-Applikation hohe norm V/Q -Werte erzielt werden. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschrieben drastischen Störungen des Gasaustausches unter U46619-Einfluss (102) gab es bei den vorliegenden Versuchsreihen nur mäßige Änderungen. Der registrierte Shuntfluss lag zum Zeitpunkt $t=0$ in allen drei Vergleichsgruppen unter 10%. Auch der Anteil der low V/Q -Areale (schwache Ventilation bei physiologischer Perfusion) war nur mäßig erhöht. Diese Beobachtungen gehen mit den Effekten von mean Q (Mittelwert der Einzelperfusionen) und SD Q/V (Standardabweichung der Perfusion/Ventilation) konform. Lediglich die Totraumventilation nahm in der Kontroll- und i.v.-Gruppe zu. Bei der Inhalation von Sildenafil nahm sie jedoch

signifikant ab, wodurch auch die signifikante Verbesserung der pO_2 -Werte erklärt werden könnte.

Bei den Blutgasen war durch Beatmung des Kaninchens mit einem FiO_2 (Inspiratorische Oxygenierungsfraktion) von 1,0 eine überdurchschnittlich hohe Oxygenierung zu jedem Versuchszeitpunkt in allen Versuchsgruppen vorhanden. Nach kontinuierlicher U46619-Infusion fielen die PaO_2 (arterielle Sauerstoffpartialdrücke) in allen drei Versuchsgruppen, lagen aber bedingt durch die Ausgangssituation noch immer über physiologischem Niveau. Tendenziell stieg der PaO_2 der Kontrollgruppe nach PAP-Erhöhung wieder auf sein Ausgangsniveau an. Dies könnte unter anderem Folge des erhöhten PEEP (positive end expiratory pressure) und der damit verbundenen erhöhten Gasaustauschfläche sein. Auch ein einfacher Adaptionsvorgang an erhöhte pulmonale Druckverhältnisse wäre denkbar. Den größten Vorteil hinsichtlich des PaO_2 erzielte die Aerosolgruppe. Hier übertrafen die Werte nach Inhalation mit Sildenafil sogar die Werte bei Versuchsbeginn. Die intrapulmonale Substanzdeposition scheint die Wirksamkeit am Ort der Schädigung hinsichtlich der Oxygenierung am positivsten zu beeinflussen.

Mit den vorliegenden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Sildenafil eine positive Wirkung auf U46619 induzierte Gasaustauschstörungen hat. Beide Therapieformen mit Sildenafil weisen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Neben dem Gasaustausch hat Sildenafil auch einen positiven Einfluss auf die Oxygenierung des Blutes. Die Ergebnisse decken sich mit Veröffentlichungen von Ryhammer PK et al., die bei ihren Untersuchungen einen Anstieg des Oxygenierungsindex beobachten konnten (23), und Kleinsasser A et al. (84). Mit der vorliegenden Versuchsreihe konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich durch Inhalation und der damit verbundenen Effekte am Wirkort die PaO_2 -Werte über das Ausgangsniveau hinaus verbessern ließen. Die aerosolierte Darreichungsform war somit der intravenösen hinsichtlich der positiven Wirkung auf die Oxygenierung

überlegen. Sildenafil stellt folglich ein hervorragendes Therapeutikum in der Therapie der PAH dar und weist zusätzlich die Qualität für unterschiedliche Darreichungsformen auf. Eine weitere interessante Erkenntnis der vorliegenden Arbeit war, dass der PDE 5-Inhibitor Sildenafil außer bekannter pulmonaler auch eine intrapulmonale Selektivität aufweist.

5.3.2 Vergleich verschiedener Kombinationstherapien mit intravenösem Sildenafil, dem i.v. verabreichten PDE 1-Inhibitor 8MM-IBMX und inhalativem Iloprost

Mit den vorliegenden Versuchsreihen sollten Hinweise auf die Wirkweise des bei Patienten mit PAH bereits im Off-Label-Use verwendeten PDE 5-Inhibitors Sildenafil gewonnen werden. Dazu wurde die Substanz mit dem bekannten und gut untersuchten Prostazyklinanalogon Iloprost und dem als selektiven PDE 1 Inhibitor bekannten 8MM-IBMX kombiniert und verglichen.

Phosphodiesterasen gelten – da sie hauptverantwortliche Enzyme des cAMP- und cGMP-Abbaus darstellen – als limitierende Faktoren für die Wirkdauer von Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO) und deren vasodilatierende Wirkung. PDE-Inhibitoren stellen aus diesem Grund interessante Agenzien für die Therapie der PAH dar. Es wurden bis heute elf verschiedene PDE beschrieben, deren Substrate je nach Typ cAMP, cGMP oder beide Nukleotide sind. Sie variieren in Genlokalisierung, zellulärer Expression und Regulationsmechanismen (45,55,68,76).

Der PDE 5/6-Inhibitor Sildenafil, ursprünglich zugelassen zur Therapie der erektilen Dysfunktion, zeigt mit seiner cGMP-vermittelten Wirkung nach systemischer Applikation eine eindrucksvolle pulmonale Vasodilatation in verschiedenen Tiermodellen (23,39).

8MM-IBMX inhibiert die PDE 1. Maurice DH et al. berichten über PDE 1 Expression sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Gefäßendothelzellen (45). Die PDE 1 entfaltet ihre kontraktile Wirkung sowohl über cAMP als auch über cGMP (35).

Bei Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven beider PDE-Inhibitoren im intakten Tiermodell konnte – kongruent zu bestehenden Veröffentlichungen – für beide Substanzen nach systemischer Applikation eine nachweisbar vasodilatierende Wirkung aufgezeigt werden. Sildenafil stellte sich als effektivere Substanz dar. Die Substanz zeigte bei zwei bis drei Potenzen geringeren Applikations-Konzentrationen stärkere pulmonal drucksenkende Effekte bei geringerem systemischen Druckabfall. Verschiedene Faktoren können ursächlich für die unterschiedlichen Wirkweisen sein:

- ◆ Sildenafil besitzt eine stärkere pulmonale Selektivität als 8MM-IBMX.
- ◆ Die Wirkung des Sildenafils umfasst neben der Inhibierung von PDE 5/6 noch weitere Phosphodiesterasen.
- ◆ Die eindrucksvolle drucksenkende Wirkung von Sildenafil entsteht nicht allein durch die Blockade der Hydrolyse von cGMP, sondern auch durch eine zeitgleiche Hydrolysehemmung von cAMP.

Beide Substanzen besitzen ein unterschiedliches pharmakologisches Profil. Das spiegelt sich bei Betrachtung der IC_{50} Werte wider (Sildenafil = $0.003\mu\text{M}$ gegen PDE 5, 8MM-IBMX = $4\mu\text{M}$ gegen PDE 1 (94)). Das konnte allerdings nicht alleinige Ursache für die differierenden Effekte sein.

Die kombinierte Gabe von Iloprost/Sildenafil führte zu einer signifikanten Verlängerung der durch Iloprost induzierten Vasorelaxation. Frühere Forschungsergebnisse zeigen – sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch (41,85,87) – dass PDE 5-Inhibitoren eine sehr effektive Wirkung bei PAH aufweisen. Iloprost entfaltet seine vasodilatierende Wirkung bekanntlich über cAMP (22,38,105). Rein rational betrachtet sollte eine Verstärkung der pulmonal vasodilatierenden Wirkung deshalb bei einer Kombination mit einer cAMP-stimulierenden Substanz erfolgen. Die Wirkung von Sildenafil erfolgt allerdings über die NO-cGMP-Signaltransduktionsschiene (21). Trotzdem kam es beim Zusammenspiel beider Substanzen zu einer Potenzierung der Wirkung. Ursachen könnten sein:

- ◆ Sildenafil entfaltet seine Wirkung zusätzlich über die Hemmung einer PDE mit selektiver Affinität zu cAMP.
- ◆ Sildenafil wirkt neben der bekannten PDE 5/6-Inhibition über eine Phosphodiesterase, die nichtselektiv cAMP und cGMP als Substrat hat.
- ◆ Sildenafil wirkt über eine Interaktion des cAMP/cGMP-Wirkungsweges.

Bei Betrachtung weiterer hämodynamischer Parameter ließ sich ein positiver Effekt auf das HZV durch das Zusammenspiel beider Substanzen beobachten. Der SAP sank nicht signifikant.

Die gemeinsame Verabreichung von Iloprost und 8MM-IBMX führte sowohl zu einer verstärkten pulmonalen Drucksenkung als auch zu einer Verlängerung der Post-Iloprost-relaxierenden Wirkung. Schon Rabe KF et al. beschrieben in ihrer Publikation die Effekte von 8MM-IBMX auf menschliche Pulmonalarterien und damit das dortige Vorhandensein der PDE 1 (79). Die synergistischen Effekte beider Substanzen erklären sich durch die verringerte Hydrolyse von cAMP. 8MM-IBMX hemmt die PDE 1 und vergrößert dadurch das cAMP-Kontingent. Der systemische Druckabfall könnte als verminderte pulmonale Selektivität von 8MM-IBMX gedeutet werden. Maurice DH et al. berichteten über PDE 1-Expression in kardialen Geweben, etwa Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Gefäßendothelzellen beim Menschen und weiteren Spezies (45). Das steigende HZV – eventuell Ausdruck einer peripheren Vasodilatation mit eingeschränktem venösen Rückstrom – könnte ebenfalls ein Grund für den sinkenden SAP sein.

Bei der Kombination von inhalativem Iloprost mit intravenös injiziertem Sildenafil und 8MM-IBMX erfuhr die Iloprost-Wirkung sowohl hinsichtlich der Dauer als auch der Ausprägung der pulmonalen Drucksenkung etwa eine Verdopplung ihrer Wirkintensität. Im Vergleich zu den Versuchen Iloprost/Sildenafil und Iloprost/8MM-IBMX verstärkte sich die vasorelaxierende Wirkung nicht signifikant. Jedoch fiel der SAP etwas stärker ab.

Es ergeben sich folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- ◆ Sildenafil inhibiert außer den PDE 5/6 auch die PDE 1, so dass bei Kombination beider Substanzen keine Wirkungsverstärkung eintritt.
- ◆ Sildenafil wirkt über einen Interaktionsweg von cGMP und cAMP, so dass ein ähnliches Wirkprofil wie beim PDE 1-Inhibitor entsteht.
- ◆ Sildenafil wirkt über eine direkte Stimulation von Regulatorenzymen, so dass eine gemeinsame Endstrecke von Sildenafil und 8MM-IBMX entsteht.

Für die erste Annahme spricht – auch bei leicht differierenden Kurvenverläufen von Sildenafil und 8MM-IBMX – die Tatsache, dass eine Dreifachkombination der Substanzen zu keiner Wirkungsverstärkung führt. Die zweite Annahme, dass es nach der Gabe von Sildenafil zu einer Interaktion von cAMP und cGMP kommt, wurde schon von Ghofrani HA et al. vermutet. Die Arbeitsgruppe nahm an, dass für die potenzierte Wirkung von Iloprost nach Sildenafilgabe eine Induktion der cGMP und eine damit verbundene Hemmung der PDE 3 ursächlich sein könnte (82). Bei der dritten Annahme würde es sich um einen komplett neuen Wirkmechanismus handeln, der in noch keiner Publikation diskutiert worden ist.

Zusammenfassend führen die aufgestellten Beobachtungen und Theorien zu folgenden Schlussfolgerungen:

I) Die durch Sildenafil induzierte Signaltransduktion führt über den Weg einer gemeinsamen cAMP/cGMP-Stimulation. Das ist durch nachfolgende Betrachtungen als wahrscheinlich anzunehmen:

- ◆ Sildenafil verstärkt als PDE 5/6-Inhibitor die Iloprost-Wirkung. Dieses agiert erfahrungsgemäß über cAMP. Aus den Beobachtungen folgt, dass Sildenafil zu einer Hemmung der Hydrolyse von cAMP fähig sein muss oder es möglicherweise seine Wirkung über die PDE 1 entfaltet.
- ◆ Die cAMP-vermittelte Wirkung erfolgt über einen weiteren selektive cAMP-regulierten PDE-Inhibitor, etwa der PDE 3 und PDE 4.

Gegen die Inhibition der PDE 3 und PDE 4 durch Sildenafil sprechen verschiedene Versuchsreihen: Zum einen Versuche mit dem dualselektiven PDE 3/4-Inhibitor Tolafentrine (39), bei denen die Substanzkombinationen der drei Wirkstoffe Iloprost/Sildenafil/Tolafentrine keine signifikante Verlängerung oder Verstärkung gegenüber der vasodilatierenden Wirkung von Iloprost/Sildenafil oder Iloprost/Tolafentrine zeigten. Zum anderen führten auch Versuche mit dem hoch selektiven PDE 3-Inhibitor Motapizone zu keiner Wirkverstärkung (34).

Dahingegen gibt es schon frühere Publikationen, etwa von Rabe KF et al., in denen ein Zusammenhang zwischen cAMP/cGMP-Regulationswegen als Ursache für die PDE 5-Interaktionen vermutet wird (79). Maurice et al. beschrieben den möglichen biochemischen Mechanismus der Wirkweise des PDE 5/6-Inhibitors Sildenafil (45), der an dieser Stelle in Form einer Grafik dargestellt werden soll:

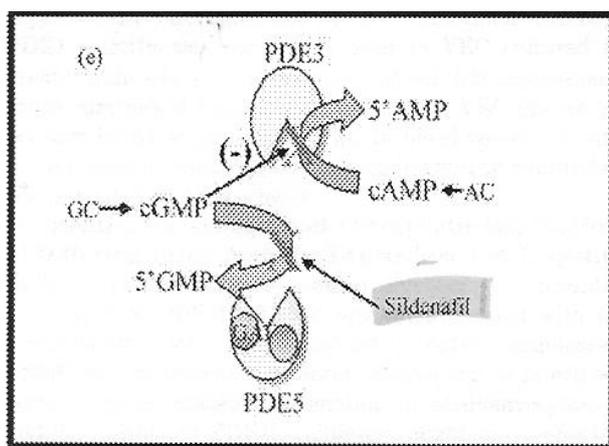


Abb. 5.1: Signaltransduktion durch Sildenafil (Maurice DH et al. 2003. Fig.1 (e)).

Intrazelluläres cGMP inhibiert die PDE 3. Eine signifikante Inhibition durch Sildenafil führt zur Akkumulation von cGMP was zur Hemmung der PDE 3 führt. Der Abbau von cAMP zu 5'AMP findet nicht statt und somit kommt es zu einer prolongierten Vasodilatation.

Ein weiterer – nicht cGMP-vermittelter – Wirkmechanismus wäre über eine Inhibition der PDE 1 durch pulmonal zirkulierendes Sildenafil denkbar. Beim Vergleich des selektiven PDE 1-Inhibitors 8MM-IBMX/Iloprost mit Sildenafil/Iloprost konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit festgestellt werden und auch die Substanzkombination brachte kaum eine

Verstärkung der vasodilatierenden Effekte. Dies könnte auf eine direkte Wirkung von Sildenafil auf die PDE 1 zurückzuführen sein.

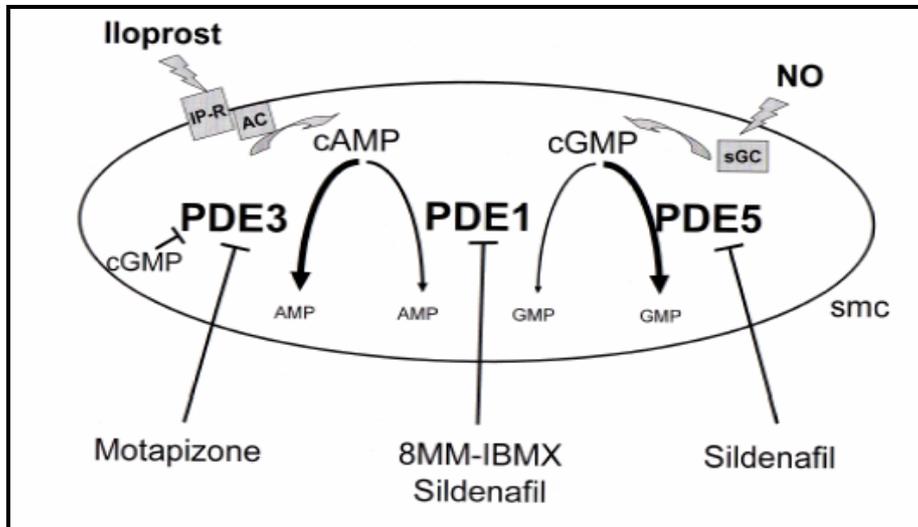


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels verschiedener Phosphodiesterasen (PDE) und der Effekte der PDE-Inhibitoren auf cAMP (cyclic adenosine monophosphat) und cGMP (cyclic guanosine monophosphat). Verschiedene Agonisten wie z.B. Prostanoiden oder Stickstoffmonoxid (NO) erhöhen die intrazelluläre Konzentration der second messenger cAMP und cGMP. PDE-Inhibitoren stabilisieren die second messenger und verstärken dadurch die Effektivität der Agonisten. (IP-R, prostacyclin receptor; AC, adenylate cyclase; sGC, soluble guanulate cyclase; smc, smooth muscle cell).

Beide Wege, sowohl der indirekten Inhibition von PDE 3 durch cGMP, als auch der direkten Hemmung der PDE 1 bieten eine Erklärung für die Wirkungsverstärkung von Iloprost bei der Kombination mit Sildenafil.

II) Die vasodilatierende Wirkung von Sildenafil erfolgt über eine PKG und PKA vermittelte Phosphorylierung, die sowohl über cAMP als auch über cGMP vasodilatative synergistische Effekte in Kombination mit Iloprost bewirkt. Hierzu kann jedoch im Anschluss an die vorgenommenen Versuchsreihen keine adäquate Aussage getroffen werden.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten aus der vorliegenden Arbeit folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

I. Vergleich der zwei Prostanoidanaloga Iloprost und UT 15 hinsichtlich ihrer Effekte und Schlussfolgerung auf bestehende Regulationsmechanismen: Bekanntermaßen erfolgen die vasodilatierenden Reaktionen der Prostanoiden über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und der nachfolgenden Bildung von cAMP. Das Resultat des Substanzvergleichs von erstmals inhaliertem UT 15 und dem gut untersuchten Iloprost legte unterschiedliche Rezeptorspezifitäten und -affinitäten nahe. Zusätzlich verlängerte UT 15 signifikant den PAP im Vergleich zu Iloprost. Es stellt damit eine interessante neue Therapieoption dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuchsreihen konnten nun in einer klinischen Studie bei Patienten mit PH von Voswinckel R et al. reproduziert werden.

II. Etablierung der MIGET (Multiple Inert Gas Elimination Technique) am Modell der PH beim intakten Tiermodell und Untersuchung der pulmonalen und intrapulmonalen Auswirkungen von intravenös versus inhalativ verabreichtem Sildenafil auf den Gasaustausch der durch U46619 induzierten PH:

Am Modell der PH beim Ganztier wurde in der vorliegenden Arbeit als neue Methode die MIGET etabliert und charakterisiert. Die Methode ermöglichte die Erhebung von Daten über die Gasaustauschbedingungen, etwa die Ventilations- und Perfusionsverhältnisse. Sildenafil erwies sich in den vorliegenden Versuchsreihen als potentes Therapeutikum, sowohl bei intravenöser als auch bei inhalativer Applikation, wobei es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen beiden Darreichungsformen kam.

Zudem konnte belegt werden, dass Sildenafil eine pulmonale und eine intrapulmonale Selektivität hat.

III. Schlussfolgerungen aus der Kombinationstherapie mit PDE 5-Inhibitor Sildenafil, dem PDE 1-Inhibitor 8MM-IBMX und dem Prostanoidanalogon Iloprost auf die Wirkmechanismen des Sildenafil-vermittelten Signaltransduktionsweges:

Der Vergleich sowohl der beiden Versuchsgruppen Iloprost/Sildenafil und Iloprost/8MM-IBMX als auch der Vergleich jener mit der Dreifach-Kombination der Substanzen ergab keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Wirkpotenzial. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Sildenafil außer der PDE 5/6 auch die PDE 1 inhibiert. Zudem könnte akkumulierendes cGMP die PDE3 hemmen, die wiederum einen Abbau von cAMP zu 5'AMP verhindert könnte. Das Zusammenspiel beider Wirkungen ergäbe eine verlängerte Vasodilatation.

Summary

Conclusion of the experimences:

In catheterized rabbits with acute pulmonary hypertension induced by continuous infusion of the stable thromboxane analogue U46619, we compared the prostacyclin analogues UT 15 and Iloprost. A significant pulmonary vasodilatory response was noted for both prostanoids, but UT 15 was more effective. Second, we established the multiple inert gas elimination technique (MIGET) in catheterized rabbits with acute pulmonary hypertension induced by continuous infusion of U46619. We compared the effects of inhaled versus intravenous Sildenafil in experimental acute pulmonary hypertension on vascular tone and gas exchange. We demonstrated that aerosolization of sildenafil is as effective as infusion in relieving pulmonary hypertension. When administered via this route instead of being infused intravascularly, sildenafil is capable of improving ventilation-perfusion matching, suggesting selective vasodilation in well-ventilated lung areas. Third, we combined inhaled Iloprost with intravenous 8-Methoxymethyl IBMX (PDE1 inhibitor) and Sildenafil. Strong amplification of the iloprost-induced vasodilatation was noted when iloprost was combined with sildenafil and/or 8MM-IBMX. We conclude that coadministration of selective PDE inhibitors markedly enhance and prolongs the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost, with maintenance of pulmonary selectivity and ventilation perfusion matching. The prominent effect of sildenafil may operate via both PDE1 and PDE5 or possibly by PDE 3 which is inhibitable by cGMP.

7 Literaturverzeichnis

[1]	Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. Clinical classification of Pulmonary Hypertension. J Am Col Cardiol 2004; 43: 5-12.
[2]	Rich S. Executive Summary from the world Symposium on Primary Pulmonary Hypertension 1998. http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html .
[3]	Hoeper MM, Galie N, Simonneau G, Rubin LJ. New treatments for pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:1209-16.
[4]	Gaine S. Pulmonary hypertension. JAMA. 2000;284:3160-8.
[5]	Rimar S, Gillis CN. Site of pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide in the perfused lung. J Appl Physiol. 1995;78:1745-9.
[6]	Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1995;333:214-21.
[7]	Giaid A. Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. Chest 1998;114:208-212.
[8]	Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1993;328:1732-9.
[9]	Christmann BW, McPerstron CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med 1992;327:70.
[10]	Bailey CL, Channick RN, Rubin LJ. A new era in the treatment of primary pulmonary hypertension. Heart. 2001;85:251-2.
[11]	Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. Chest 2001;120:1562-9.
[12]	Galie N, Grigioni F, Bacchi-Reggiani L. Relation of endothelin-1 to survival in patients with primary pulmonary hypertension. Eur J Clin Invest 1996;26:48.
[13]	Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1925-32.
[14]	Namba T, Sugimoto Y et al. Mouse thromboxan A2 receptor: cDNA cloning, expression and northern blot analysis. Biochem Biophysiol Res Commun 1992;184:119-203.
[15]	Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H et al. J Am Coll Cardiol 2003; 42:1.

[16]	Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. <i>Lancet</i> 2002;360:895-900.
[17]	Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ et al. Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. <i>N Eng J Med</i> 2006; 354:2400-1.
[18]	Hoepfer MM, Faulenbach C, Golpon H et al. Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary arterial hypertension. <i>Eur Respir J</i> 2004; 24:1007-10.
[19]	Wagner PD, Naumann PF, Lavavuso RB. Simultaneous measurement of eight foreign gases in blood by gas chromatography. <i>J Appl Physiol</i> 1974; 36:151:600-605.
[20]	Wagner PD, Lopez FA. Gas chromatography techniques in respiratory physiology. <i>Respir Physiol</i> 1984; 403:1-24.
[21]	Ballard SA, Gingell C, Tang K. The effects of sildenafil on relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. <i>J Urol</i> 1998; 159:2164-2171.
[22]	Turcato S, Clapp LH. The effects of adenylate cyclase inhibitor SQ22536 and Iloprost-induced vasorelaxation and cAMP elevation in isolated guinea-pig aorta. <i>Br J Pharmacol</i> 1999; 126:845-847.
[23]	Ryhammer PK, Shekerdemian LS, Penny DJ, Ravn HB. Effects of intravenous Sildenafil on Pulmonary Hemodynamics and Gas Exchange in the presence and absence of Acute Lung Injury in piglets. <i>Pediatric Research</i> 2006;59:6.
[24]	Nishigaki N, Negishi SP, Ichikawa A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. <i>Mol Pharmacol</i> 1996;50:1031-37.
[25]	Coleman RA, Grix SP, Head SA et al. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. <i>Prostanoids</i> 1994;47:151-68.
[26]	Gardiner PJ. Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (psi) using a highly selective agonist TR 4979. <i>Br J Pharmacol</i> 1986;87:45-56.
[27]	Breyer R, Davis L, Nian C, Redha R, Stilman B et al. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP4 receptor. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i> 1996;270:485-93.
[28]	Nemoto K, Pilbeam CC, Bilak S, Raisz L. Molecular cloning and expression of the rat prostaglandin E2 receptor of the EP2 subtype. <i>Prostaglandins</i> 1997;54:713-25.
[29]	Evans JW, Wagner PD. Limits of V_A/Q distributions from analysis of experimental inert gas elimination. <i>J Appl Physiol</i> 1977; 42:889-898.
[30]	Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. <i>N Engl J Med</i> 2004; 351:1425-36.
[31]	British Cardiac Society Guidelines and Medical Practice Committee. Recommendations on the management of pulmonary hypertension in medical practice. <i>Heart</i> 2001; 86:1:1-13.

[32]	D' Alzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry. <i>Ann Intern Med</i> 1991;115:343-9.
[33]	Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. <i>Annu Rev Pharmacol Toxicol</i> 2001;41:661-90.
[34]	Schermuly RT, Roehl A, , Weissmann N, Ghofrani HA, Schudt C, Tenor H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Subthreshold doses of specific PDE type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. <i>J Pharmacol Exp Ther</i> 2000, 292:512-520.
[35]	Kakkar R, Raju RV, Sharma RK. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). <i>Cell Mol Life Sci</i> 1999;55:1164-86.
[36]	Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R et al. Cloning, functional expression and characterization of the human prostaglandin E ₂ receptor EP ₂ -subtype. <i>J Biol Chem</i> 1994; 269:11873-77.
[37]	Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. <i>Int J Impot Res</i> 1996;8:47-52.
[38]	Wharton J, Davie N, Upton PD, Yacoub MH, Polak JM, Morrell NW. Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. <i>Circulation</i> 2000;102:3130-6.
[39]	Schermuly RT, Krupnik E, et al. Selective phosphodiesterase inhibition and iloprost in pulmonary hypertension. Department of Internal Medicine, JLU-Giessen, Germany
[40]	Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. <i>Ann Intern Med</i> 1996;124:820-4.
[41]	Ghofrani HA, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F.[Sildenafil for treatment of severe pulmonary hypertension and commencing right-heart failure], <i>Pneumologie</i> 2002;56:665-72.
[42]	Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. <i>Br J Pharmacol</i> 2002;137:1187-94.
[43]	Zhao AZ, Yan C, Sonnenburg WK, Beavo JA. Recent advances in the study of Ca ²⁺ /CaM-activated phosphodiesterases: expression and physiological functions. <i>Adv Second Messenger Phosphoprotein Res</i> 1997;31:237-51.
[44]	Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Leuchte H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. <i>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</i> 2001;281:1361-8.

[45]	Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. <i>Mol Pharmacol</i> 2003;64:533-46.
[46]	Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. <i>Lancet</i> 1991;338:1173-4.
[47]	Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. <i>N Engl J Med</i> 1993;328:399-405.
[48]	Miller OI, Tang SF, Keech A, Celermajer DS. Rebound pulmonary hypertension on withdrawal from inhaled nitric oxide. <i>Lancet</i> 1995;346:51-2.
[49]	Lavoie A, Hall JB, Olson DM, Wylam ME. Life-threatening effects of discontinuing inhaled nitric oxide in severe respiratory failure. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 1996;153:1985-7.
[50]	Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. <i>Br J Pharmacol</i> 1993;108:833-7.
[51]	Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. <i>Circulation</i> 2000;102:2434-40.
[52]	Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, et al. Bosentan in patients with pulmonary artery hypertension: a randomized, placebo controlled, multicenter study. <i>N Eng J Med</i> 2002;364:896-930.
[53]	Barst RJ, Rich S, Horn EM, McLaughlin VV, Kerstein D, Widlitz AC, McFarlin JD, Dixon RAF. Efficacy and safety of chronic treatment with the oral selective endothelin-A receptor blocker sicasentan in pulmonary arterial hypertension (PAH). <i>Circulation</i> 2000;102:II-427.
[54]	Walch L, Labat C, Gascard JP, de Montpreville V, Brink C, Norel X. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. <i>Br J Pharmacol</i> 1999;126:859-66.
[55]	Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 2000;97:3702-7.
[56]	Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. <i>Mol Pharmacol</i> 1995;48:890-6.
[57]	Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 2002;26:194-201.
[58]	Hoper MM, Voelkel NF, Bates TO, Allard JD, Horan M, Shepherd D, Tuder RM. Prostaglandins induce vascular endothelial growth factor in a human monocytic cell

	line and rat lungs via cAMP. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 1997;17:748-56.
[59]	D'Acquisto F, Sautebin L, Iuvone T, Di Rosa M, Carnuccio R. Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in J774 macrophages. <i>FEBS Lett</i> 1998;440:76-80.
[60]	Lo CJ, Fu M, Lo FR. Prostaglandin I2 analogue, iloprost, down regulates mitogen-activated protein kinases of macrophages. <i>J Surg Res</i> 1998;76:159-64.
[61]	Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higgenbottom T et al. Inhaled iloprost in severe pulmonary hypertension. <i>N Eng J Med</i> 2002;347:322-9.
[62]	Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. <i>Drugs</i> 1992;43:889-924.
[63]	Jones RL, Qian YM, Wise H, Wong HN, Lam WL, Chan HW, Yim AP, Ho JK. Relaxant actions of nonprostanoid prostacyclin mimetics on human Pulmonary artery. <i>J Cardiovasc Pharmacol</i> 1997;29:525-35.
[64]	Higenbottam TW, Butt AY, Dinh-Xuan AT, Takao M, Cremona G, Akamine S. Treatment of pulmonary hypertension with the continuous infusion of a prostacyclin analogue, iloprost. <i>Heart</i> 1998;79:175-9.
[65]	Butt A.Y., Dinh Xuan A.T., Takao M, Cremona G, Higgenbottam T.W. Treatment of pulmonary hypertension with prostacyclin analogue iloprost. <i>J Am Coll Spec Issue</i> 1994; 375A.
[66]	Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Cremona G, Butt AY. Acute and long-term effects of Prostacyclin and Iloprost on pulmonary haemodynamics and exercise tolerance of patients with primary pulmonary hypertension. <i>Am Rev Respir Dis</i> 1992;145:4-716.
[67]	Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J. The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. <i>Br J Clin Pract</i> 1990;44:231-4.
[68]	Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1999;96:7071-6.
[69]	Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ; Treprostinil Study Group. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2002;165:800-4.
[70]	Hamilton G, Saba T, Corris P, Delcroix M, Simonneau G, Sitbon O, Torbicki A, Kuca P, Peacock AJ. Improvement of exercise tolerance due to uniprost in patients with pulmonary arterial hypertension is related to baseline performance. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2001;163:A540.
[71]	Saji T, Ozawa Y, Ishikita T, Matsuura H, Matsuo N. Short-term hemodynamic effect of a new oral PGI2 analogue, beraprost, in primary and secondary pulmonary hypertension. <i>Am J Cardiol</i> 1996;78:244-7.

[72]	Galie N, Humbert M, Vachieri JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, Sitbon O, Torbicki A, Delcroix M, Naeije R, Hoeper M, Chaouat A, Morand S, Besse B, Simonneau G; Arterial Pulmonary Hypertension and Beraprost European (ALPHABET) Study Group. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. <i>J Am Coll Cardiol</i> 2002;39:1496-502.
[73]	Torphy TJ. Phosphodiesterase isoenzymes: Molecular targets for novel antiasthma agents. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 1998;157:351-370.
[74]	Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. <i>Physiol Rev</i> 1995;75:725-48.
[75]	Ahn HS, Foster M, Cable M, Pitts BJ, Sybertz EJ. Ca/CaM-stimulated and cGMP-specific phosphodiesterases in vascular and non-vascular tissues. <i>Adv Exp Med Biol</i> 1991;308:191-7.
[76]	Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degermann E. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. <i>Arch Biochem Biophys</i> 1995;322:1-13.
[77]	Beavo JA, Reifsnnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. <i>Trends Pharmacol Sci</i> 1990;11:150-5.
[78]	Conti M, Nemoz G, Sette C, Vicini E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. <i>Endocr Rev</i> 1995;16:370-89.
[79]	Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. <i>Am J Physiol</i> 1994;266:L536-43.
[80]	Hanson KA, Burns F, Rybalkin SD, Miller JW, Beavo J, Clarke WR. Developmental changes in lung cGMP phosphodiesterase-5 activity, protein, and message. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 1998;158:279-88.
[81]	Giordano D, De Stefano ME, Citro G, Modica A, Giorgi M. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2001;1539:16-27.
[82]	Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. <i>Ann Intern Med</i> . 2002;136(7):515-22. Summary for patients in: <i>Ann Intern Med</i> 2002;136:135.
[83]	Ichinose F, Erana-Garcia J, Hromi J, Raveh Y, Jones R, Krim L, Clark MW, Winkler JD, Bloch KD, Zapol WM. Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. <i>Crit Care Med</i> 2001;29:1000-5.

[84]	Kleinsasser A, Loeckinger A, Hoermann C, Puehringer F, Mutz N, Bartsch G, Lindner KH. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2001;163:339-43.
[85]	Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Fujino Y, Clark MW, Bloch KD, Zapol WM. Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. <i>Anesthesiology</i> 2000;92:1702-12.
[86]	Wilkins H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, Bohm M, Sybrecht GW. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. <i>Circulation</i> 2001;104:1218-22.
[87]	Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. <i>Circulation</i> 2001;104:424-8.
[88]	Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. <i>N Engl J Med</i> 2000;343:1342.
[89]	Abrams D, Schulze-Neick I, Magee AG. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. <i>Heart</i> 2000;84:E4.
[90]	Ichinose F, Adrie C, Hurford WE, Bloch KD, Zapol WM. Selective pulmonary vasodilation induced by aerosolized zaprinast. <i>Anesthesiology</i> 1998;88:410-6.
[91]	Kinsella JP, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (T α) functionally couples to the G protein Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostone 8-epi prostaglandin F2 alpha. <i>J Pharmacol Exp Ther</i> 1997;281:957-64.
[92]	Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Sildenafil Study Group. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. 1998. <i>J Urol</i> 2002;167:1197-203.
[93]	Löffler Georg. <i>Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie</i> , Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 3.Auflage.
[94]	Schermuly RT, Ghofrani HA, Weissmann N. Prostanoids and Phosphodiesterase Inhibitors in Experimental Pulmonary Hypertension. <i>Developmental Biology</i> 2005;67.
[95]	Powel FL, Wagner PD. Measurement of continuous distribution of ventilation-perfusion in non-alveolar lungs. <i>Respir Physiol</i> 1982; 48:219-232.
[96]	Walmrath D, Konig R, Ernst C, Bruckner H, Grimminger F, Seeger W. Ventilation-perfusion relationships in isolated blood-free perfused rabbit lungs. <i>J Appl Physiol</i> 1992;72:374-82.
[97]	Wagner PD, West JB, et al. <i>Pulmonary gas exchange</i> . Academic press, New York 1980; 233-235.
[98]	Galie N, Manes A, Branzi A. The new clinical trials on pharmacological treatment in pulmonary arterial hypertension. <i>Eur Respir J</i> 2002;20:1037-49.

[99]	Wagner PD, Saltzman HA, West JB. Measurement of continuous distributions of ventilation-perfusion ratios: theory. <i>J Appl Physiol</i> 1974;36:588-99.
[100]	Schermuly RT, Krupnik E, Tenor H, Schudt C, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D, Ghofrani HA. Coaerosolization of phosphodiesterase inhibitors markedly enhances the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension. Maintenance of lung selectivity. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2001;164:1694-700.
[101]	Schermuly RT, Ghofrani HA, Enke B, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schudt C, Walmrath D. Low-dose systemic phosphodiesterase inhibitors amplify the pulmonary vasodilatory response to inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 1999;160:1500-6.
[102]	Walmrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. <i>Eur Respir J</i> 1997;10:1084-92.
[103]	Lindeborg DM, Kavanagh BP, Van Meurs K, Pearl RG. Inhaled nitric oxide does not alter the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance. <i>J Appl Physiol</i> 1995;78:341-8.
[104]	Simonds WF. G protein regulation of adenylate cyclase. <i>Trends Pharmacol Sci</i> 1999 ;20:66-73.
[105]	Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. <i>Pharmacol Rev</i> 1994;46:205-29.
[106]	Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? <i>Ann Intern Med</i> 1991;114:464-9.
[107]	Hildebrand M. Inter-species extrapolation of pharmacokinetic data of three prostacyclin-mimetics. <i>Prostaglandins</i> 1994;48:297-312.
[108]	Higgenbottam T, Weeldon D, Wells F, Wallwork J. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous epoprostenol (prostazyklin). <i>Lancet</i> 1984;1:1046-1047.
[109]	Voswinckel R, Enke B, Reichenberger F, Kohstall M, Kreckel A, Krick S, Gall H, Gessler T, Schmehl T, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grimminger F, Rubin LJ, Seeger W, Olschewski H. Favorable Effects of Inhaled Treprostinil in Severe Pulmonary Hypertension. <i>JACC</i> 2006:1672-81.

8 Publikationsverzeichnis

Schermuly RT, Inholte C, Ghofrani HA, Gall H, Weissmann N, Weidenbach A, Seeger W, Grimminger F. Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors. *Respiratory Research* 2005, 6:76

9 Danksagung

Für die Bereitstellung eines Dissertationsthemas und für die Möglichkeit Einblicke in Forschung und wissenschaftliches Arbeiten zu gewinnen möchte ich Herrn Professor Werner Seeger und Herrn Professor Friedrich Grimminger ganz herzlich danken. Ihre Begeisterung für die Entdeckung neuer Strategien, möglicher Zusammenhänge und Unbekanntem fasziniert mich sehr.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Ralph Schermuly, der mir bei Planung und Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite stand, der stets ein offenes Ohr für Probleme hatte und bei scheinbar unlöslichen „Hindernissen“ einen Ausweg fand.

Ein ganz besonderer Dank gebührt den MTA´s, insbesondere Frau Karin Quanz, und meinen Mitdoktoranden, die die Laborzeit mit mir durchlebt, mich nach allen Kräften unterstützt haben und für mich wie eine Familie gewesen sind.

Mein Dank gilt auch Herrn Jens Biermann, der mich in die Kunst der MIGET eingewiesen hat und anschließend für auftretende Probleme stets zur Verfügung stand.

Des weiteren danke ich Herrn Professor Dieter Walmrath – von dem ich viel über Lunge und Beatmung gelernt habe – und Herrn Professor H. Ardeshir Ghofrani, die mir bei auftretenden Fragen weiterhalfen.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Dr. Harald Schuy und Frau Bärbel Scheffels, die in ihrer Freizeit für eine fehlerfreie Doktorarbeit gesorgt haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern, meinem Bruder Ralf und meiner Schwester Borga, ohne die und ohne deren Unterstützung all dies gar nicht möglich gewesen wäre und die immer an mich geglaubt haben.

10 Lebenslauf

Name	Christiane Inholte
Geburtsdatum	14. April, 1975
Geburtsort	Haselünne
Eltern	Maria H. Inholte, geb. Schmidt Paul B. Inholte
Schule	1981-1985 Grundschule St. Josef, Essen-Kupferdreh 1985-1994 BMV-Schule, Essen-Holsterhausen Juni 1994 Abitur
Aushilfstätigkeiten	1.09.1994-31.08.1995 Freiwilliges Soziales Jahr 1.09.1995-31.07.1997 Krankenhaus Philippusstift (Pflegehelferin) 07.1998-08.2004 Medizinische Intensivstation, Uniklinikum Giessen (Sitzwache) 10.1999-06.2001 Studienassistentin der klinischen Phase III- Studie BYK 2001 (FK 1004-1005) 01.03.2004-31.12.2004 Studienassistentin der klinischen Studie BYK 2001/M1-007 Venticute® 01.09.2004-31.12.2004 Studienassistentin der klinischen Heparinstudie SAFEFIB
Studium	WS '97/98 Studentin der Humanmedizin an der Justus Liebig Universität Giessen SS'00 Physikum SS'01 1.Staatsexamen,anschließend Beginn der vor- liegenden Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. W. Seeger SS'03 2.Staatsexamen SS'04 3.Staatsexamen
Beruflicher Werdegang	10.04-10.05 ascent, unabhängiger Investmentfondvermittler 10.05-heute Ärzte Zeitung, Neu-Isenburg, Redaktionsvolontariat