

**Einfluss von NO und Iloprost auf pulmonal  
vaskuläre Effekte akuter und chronischer  
alveolärer Hypoxie**

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

vorgelegt von  
Boris Gerigk  
aus Gladbeck

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der  
Medizinischen Klinik II und Poliklinik  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. N. Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. D. Schranz

Tag der Disputation: 11.04.2011

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)	4
1.2 Pathologie der PAH	5
1.3 Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie	7
1.4 Formen der pulmonalen Hypertonie (PH)	7
1.5 Einteilung der PH in Schweregrade	9
1.6 Symptome und Zeichen der PH	10
1.7 Diagnose der PH	10
1.8 Therapie der PH	11
<b>2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)</b>	<b>15</b>
2.1 Klinische Bedeutungen der HPV	15
<b>3 Hintergrund und Fragestellung der Dissertation</b>	<b>17</b>
<b>4 Methoden</b>	<b>20</b>
4.1 Chronische Hypoxie	20

4.2.1 Käfigsystem zur Haltung von Kaninchen unter chronischer, normobarer Hypoxie	20
4.2.2 NO-Inhalation	21
4.2.3 Technik der Bestimmung des exhalativen NO	21
4.3 Medikamentenzufuhr	22
4.4 Aufbau des Arbeitsplatzes	23
4.5 Reinigung des Perfusionssystems	26
4.6 Präparation zur isolierten Lunge (ILU)	26
4.7 Hypoxische Manöver während der (ILU)	29
4.8 Herzpräparation	30
4.9 Statistik	31
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>6 Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>8 Summary</b>	<b>62</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>64</b>
9.1 Chemische Substanzen und Bezugsquellen	64

9.2 Herstellernachweis von verwendeten Geräten	65
9.3 Materialien und Bezugsquellen	66
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>12 Publikationsverzeichnis</b>	<b>78</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALK1	Activin-receptor-like-Kinase 1
BMPR2	Bone-morphogenic-protein-Rezeptors 2
BNP	brain natriuretic peptide
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
ET <sub>A</sub> -Rezeptor	Endothelin-A-Rezeptor
ET <sub>B</sub> -Rezeptor	Endothelin-B-Rezeptor
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET-4	Endothelin-4
FPAH	familiäre pulmonalarterielle Hypertonie
g	Gramm
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hg	Quecksilber
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HWZ	Halbwertszeit
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
ILU	isolierte Lunge

iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
i.v.	intravenös
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
KCl	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LV	linker Ventrikel
L-NMMA	$\text{N}_G$ -Monomethyl-L-Arginin
LVP	linksventrikulärer Druck
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
n	Anzahl der Einzeldaten
$\text{N}_2$	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthetase
$\text{O}_2$	Sauerstoff
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PC	Personal Computer
Pc	pulmonalkapillärer Druck
PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomas
PDE5	Phosphodiesterase Typ 5

PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PH	pulmonale Hypertonie
ppb	parts per billion
PPHN	persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen
ppm	parts per million
PVOD	pulmonale venookklusive Erkrankung
PVP	pulmonalvenöser Druck
PVR	pulmonalvaskulärer Gefäßwiderstand
RV	rechter Ventrikel
SE	Standardfehler
SERT	Serotonin-Transporters
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan-A <sub>2</sub>
U	Unit
U-46619	Thromboxan-Mimetikum
VP	Beatmungsdruck
Vol	Volumen
ZVK	zentraler Venenkatheter

# 1 Einleitung

## 1.1 Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

Die pulmonale Hypertonie wurde erstmalig 1891 durch Ernst von Romberg beschrieben und bezeichnet einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf, wobei mit zunehmender Dauer mit einer Rechts-Herzinsuffizienz gerechnet werden muss.

Das Krankheitsbild der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) beschreibt eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (PAP) über 25 mmHg in Ruhe und über 30 mmHg unter Belastung. Desweiteren ist der pulmonalvaskuläre Gefäßwiderstand (PVR), der sich mit Hilfe von pulmonalarteriellem Druck (PAP), pulmonalkapillärem Druck (Pc) und Herzzeitvolumen (HZV) berechnen lässt, erhöht. Daher ist bei schwerer PAH das HZV schon in Ruhe stark reduziert und kann unter Belastung nur noch geringfügig ansteigen, was zu einer deutlichen Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit führt. Im ausgeprägten Stadium kommt es zu einer übermäßigen Druckbelastung der rechten Herzhälfte, was wiederum zu einer Hypertrophie und/oder Dilatation mit Entstehung eines Cor pulmonale führen kann.

Die PAH ist eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz beträgt 1 bis 2: 1.000.000. In den 80er Jahren lag die Prognose nach Diagnosestellung für die Betroffenen bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 2,8 Jahren (17). Eine große prospektive Studie ergab im ersten Jahr eine Überlebensrate von 68-77%, im dritten Jahr 40-56% und im fünften Jahr 22-38%. Diese erschreckende Prognose konnte in den letzten Jahren durch neu gewonnene Erkenntnisse der Pathologie und entsprechend neu entwickelten medikamentösen Eingriffen verbessert werden. Eine Heilung der Erkrankung ist aber bisher nicht möglich.

## 1.2 Pathologie der PAH

Histopathologisch wird bei der chronischen PAH ein Gefäßumbau, das sogenannte Remodelling, beobachtet. Dabei kommt es zu strukturellen Veränderungen der Pulmonalarterien die mit Intimafibrose, Hypertrophie der Tunica media, Proliferation der Arteriolenadventitia und Abnahme der Gefäßelastizität einhergehen kann. Das führt zu einer Verengung des Lumens insbesondere auch der pulmonalarteriellen Widerstandsgefäße. Der Gesamtquerschnitt der Lungenstrombahn wird dadurch kleiner. Als Konsequenz steigt der Perfusionswiderstand an. Zudem kann es zu einer endothelialen Zellschädigung und Dysfunktion kommen, was zu einer gesteigerten Vasokonstriktion und beeinträchtigten Vasodilatation führen kann. Die Synthese von vasodilatierenden Substanzen wie NO und Prostazyklin ist aufgrund einer reduzierten Expression von endothelialer Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) und Prostazyklinsynthetase vermindert (12, 37). Dagegen ist Endothelin, ein potenter Vasokonstriktor, in der Lunge von Patienten mit pulmonaler Hypertonie überexprimiert (36, 52, 115). Der fortschreitende Gefäßumbau führt zur Zunahme der Rechtsherzbelastung und somit in letzter Konsequenz zu einem Rechtsherzversagen mit Todesfolge (32).

Endothelin, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin sind Mediatoren, die für die pathologischen Veränderungen bei der PAH von wesentlicher Bedeutung sind (55).

ENDOTHELIN – ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, das seine Wirkung unter anderem an den glatten Muskelzellen der Gefäße entfaltet. Als vasoaktive Substanz ist es ein Bestandteil des körpereigenen Systems zur Regulierung des Blutdrucks und ein hochwirksamer Vasokonstriktor.

Es werden mindestens 3 bekannte Varianten des Endothelins beschrieben. Von ihnen zeichnet sich Endothelin-1 (ET-1) durch eine besonders potente Wirkung im Herz-Kreislauf-System aus und entsteht u.a. in den

Endothelzellen der Lungengefäße. Darüber hinaus werden die Isoformen Endothelin-2 (ET-2), Endothelin-3 (ET-3) und Endothelin-4 (ET-4) gebildet. Endothelin vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Endothelinrezeptoren. Derzeit sind 2 Rezeptorsubtypen des Endothelinrezeptors bekannt, die als ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> bezeichnet werden. ET<sub>A</sub>-Rezeptoren können unter anderem in glatten Muskelzellen der Blutgefäße gefunden werden, wo sie für die durch ET-1 verursachte Vasokonstriktion verantwortlich sind. ET<sub>B</sub>-Rezeptoren hingegen sind auf Endothel, Epithelzellen und glatten Muskelzellen nachweisbar. Eine Aktivierung endothelialer ET<sub>B</sub>-Rezeptoren durch ET-1 oder ET-3 kann sowohl eine Vasodilatation als auch eine Vasokonstriktion zur Folge haben (71).

STICKSTOFFMONOXID (NO) – entsteht unter anderem in pulmonalen Gefäßendothelzellen aus L-Arginin. In glatten Muskelzellen fördert es die Erhöhung von zyklischem Guanosin-3'5'-Monophosphat (cGMP). So löst es eine Kaskade von Reaktionen aus, die als Endreaktion eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen bewirken. Kommt es zu alveolärer Hypoxie, nimmt die Konzentration von NO ab, was zur pulmonalen Hypertonie beitragen kann. Auch bei Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie (IPAH) verringert sich die Synthese von NO und der NO-Synthetase (37, 38).

PROSTAZYKLIN – entsteht in Endothelzellen der Lungengefäße aus Arachidonsäure. In glatten Gefäßmuskelzellen fördert es die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und führt dadurch zur Vasodilatation (55). 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 (TXA<sub>2</sub>). Dadurch wird sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die Vasokonstriktion verstärkt (12). Bei Patienten mit IPAH wurden außer einer verminderten Prostazyklin-

Konzentration auch verringerte Expression der Prostazyklin-Synthetase festgestellt (118).

### **1.3 Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie (IPAH)**

Die Ursachen einer idiopathischen pulmonalerteriellen Hypertonie sind nicht genau bekannt. Eine verstärkte Freisetzung von blutgefäßkontrahierenden Faktoren, wie z. B. Endothelin und Thromboxan, eine verminderte Produktion relaxierender Faktoren, wie z. B. Stickstoffmonoxid und Prostazyklin, werden als Ursachen für einen erhöhten Tonus der Blutgefäße diskutiert. Die bei Patienten mit einer idiopathischen pulmonalerteriellen Hypertonie erhöhten Serotonin-Spiegel werden als eine Ursache für die serotoninvermittelte Umgestaltung der Gefäßmuskulatur angesehen. In diesem Prozess können auch proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle spielen (21). Auf genomischer Ebene wird eine Mutation des Bone-morphogenic-protein-Rezeptors 2 (BMPR2) als eine mögliche Ursache für die familiäre Häufung dieser Erkrankung angesehen. Auch eine Mutation der Activin-receptor-like-Kinase 1 (ALK1) und die Polymorphie des Promotors des Serotonin-Transporters (SERT) werden als eine mögliche Ursache für die pulmonale Hypertonie diskutiert (54).

### **1.4 Formen der pulmonalen Hypertonie (PH)**

Die Klassifikation und Nomenklatur der Pulmonalen Hypertonie (PH) wurde im Jahr 2003 auf der dritten Weltkonferenz für PH in Venedig grundlegend revidiert. Die pulmonalerterielle Hypertonie wurde von anderen Formen der PH abgegrenzt und wird weiter in 5 Subklassen unterteilt. Die korrekte Diagnosestellung und eine präzise Klassifikation sind entscheidend für die Planung eines gezielten Therapieverfahrens.

Nach der Klassifikation der WHO-Konferenz in Venedig von 2003 (111) unterscheidet man folgende Formen der PH:

### 1) Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

- 1.1) Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)
- 1.2) Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH)
- 1.3) Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie (APAH)
  - 1.3.1) bei Kollagenosen
  - 1.3.2) bei kongenitalen systemisch-pulmonalen Shuntvitien
  - 1.3.3) bei portaler Hypertension
  - 1.3.4) bei HIV-Infektion
  - 1.3.5) nach Drogen- und Medikamenteneinnahme
  - 1.3.6) bei anderen Erkrankungen (z.B. der Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheiten, M.Gaucher, hereditäre Teleangiektasie, Hämoglobinopathien, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie)
- 1.4) Assoziiert mit signifikanter venöser / kapillärer Beteiligung
  - 1.4.1) bei pulmonaler venookklusiver Erkrankung (PVOD)
  - 1.4.2) bei pulmonaler kapillärer Hämangiomatosis (PCH)
- 1.5) Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie der Neugeborenen (PPHN)

### 2) Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung

- 2.1) Linksatriale oder linksventrikuläre Erkrankungen
- 2.2) Linksseitige Klappenerkrankungen

### 3) Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Hypoxie

- 3.1) bei chronisch obstruktiver Lungenkrankheit (COPD)
- 3.2) bei interstitieller Lungenkrankheit
- 3.3) bei Schlafapnoesyndrom
- 3.4) bei Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation
- 3.5) bei Höhenbewohnern
- 3.6) bei pulmonalen Entwicklungsstörungen

#### 4) Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer thrombotischer und/oder embolischer Erkrankungen

- 4.1) bei Thrombembolie der proximalen Lungenarterien
- 4.2) bei Obstruktion der distalen Lungenarterien
- 4.3) bei Lungenembolie (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)

#### 5) Sonstiges

Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangioliomyomatose, Gefäßkompression von außen (Lymphknoten, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

### **1.5 Einteilung der PH in Schweregrade**

Eingeteilt wird die PH in vier verschiedene klinische Schweregrade, nach der New York Heart Association von 1998 (10):

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

## 1.6 Symptome und Zeichen der PH

Symptome: -Belastungsdyspnoe

- Schwindel
- Synkopen
- Pektangiose Beschwerden
- Hämoptysen
- Raynaud-Syndrom

Zeichen: -Erweiterte Jugularvenen

- Prominenter Herzspitzenstoss über dem rechten Herz
- Betonung der pulmonalen Komponente des zweiten Herztones
- Rechtsbetonter dritter Herzton
- Insuffizienzgeräusch der Trikuspidalklappe
- Hepatomegalie
- Periphere Ödeme

## 1.7 Diagnose der PH

Die Diagnose der PAH kann direkt über eine Herzkatheteruntersuchung mittels eines Swan-Ganz-Katheters erfolgen oder alternativ über eine indirekte Messung des pulmonalarteriellen Blutdrucks mit Hilfe der Echokardiografie. Das Röntgen des Thorax kann Hinweise auf eine pulmonale Hypertonie aufzeigen, eine evtl. sekundäre Herzinsuffizienz kann bei der Blutuntersuchung durch ein erhöhtes brain natriuretic peptide (BNP) diagnostiziert werden. Der „6-Minuten-Gehtest“, bei dem die Strecke ermittelt wird, die der Patient in sechs Minuten zurücklegen kann, liefert Erkenntnisse über die körperliche Belastbarkeit des Patienten.

Trotz der genannten Untersuchungstechniken ist eine Diagnosestellung der PAH sehr schwierig, da sie sich nur durch sehr unspezifische Symptome manifestiert. Dies hat für den Patienten häufig die fatale Folge, dass die Erkrankung sehr spät oder zu spät erkannt wird. Durch die späte Behandlung

wird die zuvor genannte Lebenserwartung von 2,8 Jahren noch drastisch verschlechtert. Dabei liegt das mittlere Alter, etwa von Patienten mit IPAH, bei  $36 \pm 15$  Jahren. Frauen sind 1,7-mal häufiger von IPAH betroffen als Männer.

## 1.8 Therapie der PH

Ziel der Therapie sollte es sein, den Gefäßumbauprozess aufzuhalten. Ansätze bestehen z.B. darin in die drei genannten Regulationsmechanismen einzugreifen und die bisher gewonnen Erkenntnisse zu nutzen.

### Therapie durch Endothelin-Rezeptor-Antagonisten:

Therapeutisch wird der Effekt von zwei Medikamenten genutzt. Zum einen von dem unselektiven oral applizierbaren Bosentan. Bosentan verdrängt als Antagonist das Endothelin, das stärkste bekannte körpereigene Blutgefäßkonstringenz, von seinen Rezeptoren (insbesondere  $ET_A$  und  $ET_B$ -Rezeptoren (98)) und unterdrückt somit akut den durch Endothelin verursachten Anstieg des pulmonalarteriellen Blutdrucks, sowie chronisch die durch Endothelin verursachte Strukturveränderung der Blutgefäße, das so genannte Remodelling. Zum anderen über eine zweite Substanz, den selektiven  $ET_A$ -Rezeptor-Antagonisten Sitaxentan. Beide Substanzen steigern die körperliche Leistungsfähigkeit bei Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie und verlangsamen das Fortschreiten der Krankheitssymptome. Gleichzeitig verbessert sich die Durchblutung der Lunge durch Dilatation der Pulmonalarterien (5).

### Therapie durch cGMP-Erhöhung:

NO ist ein hochpotenter Vasodilatator, mit pulmonaler (89) und intrapulmonaler (95) Selektivität. NO bewirkt indirekt, durch eine Erhöhung des cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat)-Spiegels, eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit eine Vasodilatation mit nachfolgender Blutdrucksenkung (9). Damit ist NO u.a. ein Regulator des systemischen und

pulmonalen Gefäßwiderstands (15, 113). 1991 erzielten Pepke-Zeba und Higenbottam mit der NO-Inhalation eine selektive Vasodilatation in der Lungenstrombahn ohne systemischen Druckabfall (28, 89). Über die Ventilation werden Widerstandsgefäße in belüfteten Bezirken der Lunge von extravasal erreicht. Die Nachteile einer Therapie mit NO liegen in der u.a. Halbwertszeit (HWZ) von nur wenigen Sekunden (89). Ursache ist die hohe Bindungsaffinität zum Hämoglobin (Hb) beim Übertritt von den Alveolen ins Gefäßsystem und der hohen Reaktivität von NO. Ein weiterer Nachteil ist das Auftreten eines Reboundeffektes mit nachfolgendem pulmonalen Druckanstieg beim plötzlichen Absetzen der NO-Inhalationstherapie (2, 64, 79).

Neben NO ist Sildenafil zu nennen. Sildenafil ist ein wirksamer und selektiver Hemmstoff der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase Typ 5 (PDE5). Sildenafil bewirkt eine Erhöhung des cGMP in den Zellen der glatten Muskulatur, was zu einer Relaxation führt. Bei Patienten mit pulmonalerarterieller Hypertonie kann dies eine selektive Vasodilatation des pulmonalen Gefäßbetts und, in geringerem Ausmaß, eine Vasodilatation im Körperkreislauf bewirken (110).

#### Therapie durch cAMP-Erhöhung:

Prostazyklin (Epoprostenol) und auch seine Analoga Iloprost, Trepostinil und Beraprost bewirken im pulmonalarteriellen System über Bindung an IP-Rezeptoren eine cAMP-Freisetzung und somit eine Vasodilatation (81,120). Aus diesem Grund wurde es schon in den 80iger Jahren zur intravenösen (i.v.) Therapie der PH erfolgreich verwendet (44). Prostazyklin bewirkt eine Vasodilatation und hemmt u.a. die Thrombozytenaggregation.

Dem Prostrazyklinanalogon wird zudem eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen (17,70). 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 (39). Zusätzlich soll die relaxierende Wirkung des Iloprost größer sein, da mit etwa 1/3 der Wirkstoffmenge vergleichbare hämodynamische Effekte erzielt werden können (11, 18, 45,

59, 106). Iloprost muss bei einer intravenösen Anwendung kontinuierlich über einen implantierten Katheter gegeben werden. Demgegenüber verlängert eine Iloprost-Inhalation die Wirkdauer im Vergleich zu einer Infusion und wirkt außerdem bevorzugt in der Lunge, da es diese zuerst über eine Inhalation erreicht. Dadurch wird direkt eine Vasodilatation der Lungengefäße erreicht, ohne dass man stärkere Nebenwirkungen an den anderen Organen in Kauf nehmen muss.

Trotz der zuvor erwähnten Einflussmechanismen ist die medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie sehr schwierig.

Je nach Schweregrad der Erkrankung empfehlen die internationalen Leitlinien der Konsensuskommission des 3. PAH-Weltsymposiums in Venedig 2003 (30)

im NYHA-Stadium III:

- Bosentan, unselektiver Endothelin-Rezeptorantagonist oder
- Sitaxentan, selektiver Endothelin-Rezeptorantagonist
- Epoprostenol, Prostacyclin-Analogon

in zweiter Linie

- Sildenafil, PDE-5-Hemmer
- Iloprost, stabiles Prostacyclin-Analogon
- Treprostinil, Prostacyclin-Analogon oder
- Beraprost, Prostacyclin-Analogon

im NYHA-Stadium IV:

- Epoprostenol

in zweiter Linie

- Bosentan
- Sitaxentan
- Treprostinil
- Prostaglandin E1 (PGE1)
- Iloprost i. v.

oder evtl. eine Atrioseptostomie oder eine Lungentransplantation.

## **2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)**

Bei akuter alveolärer Hypoxie kommt es zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV). Diese dient der Anpassung der Perfusions- an die Ventilationsbedingungen in der Lunge.

Auch in gesunden Lungen gibt es Bereiche die besser und solche, die weniger gut belüftet sind (16). Ein Extremum sind nicht ventilierte Areale. In diesen Arealen kann es zu einem sogenannten „Shuntfluss“ kommen, d.h. Blut durchfließt den Lungenkreislauf ohne mit Sauerstoff angereichert zu werden. Um die Oxygenierung des Blutes zu optimieren, passt sich die Perfusion der Ventilation an. Dabei kommt es in hypoxischen alveolären Arealen der Lunge zu einer Vasokonstriktion der betroffenen pulmonalarteriellen Gefäße (hypoxische pulmonale Vasokonstriktion). Dadurch wird nicht nur die Perfusion in hypoxischen Lungenarealen minimiert, sondern der Blutfluss in gut ventilierte Abschnitte umgeleitet, was eine optimale Sauerstoffanreicherung des Blutes sicherstellt.

Dieses Prinzip nennt man auch von Euler-Liljestrand-Mechanismus nach ihren Entdeckern Hans von Euler und Göran Liljestrand, die dieses Prinzip 1946 beschrieben (119).

Man kann die HPV bei hypoxischer Ventilation in 2 Phasen einteilen.

In der ersten, akuten Phase kommt es innerhalb von Sekunden nach hypoxischer Ventilation zu einer Vasokonstriktion, welche partiell nach weiteren 5 bis 15 Minuten wieder etwas nachlassen kann.

In der zweiten subakuten Phase kommt es in vielen Untersuchungen bei anhaltender Hypoxie zur erneuten Zunahme der Vasokonstriktion (19, 65, 78, 94).

### **2.1 Klinische Bedeutungen der HPV**

Eine generalisierte Hypoxie führt zur HPV in der gesamten Lunge. Bei Sistieren der Situation (chronische alveoläre Hypoxie) kommt es zu einem sog. „Remodelling“ mit einer Hypertrophie und Hyperplasie der Tunica media

der Pulmonalgefäße (23, 68). Dieser Zustand fixiert so die pulmonale Hypertonie. Da der rechte Ventrikel gegen einen erhöhten Widerstand arbeiten muss, kann sich ein Cor pulmonale entwickeln.

Bei Menschen, die in großer Höhe leben, findet man ebenfalls eine globale alveoläre Hypoxie mit daraus resultierender Rechtsherzbelastung.

Dagegen findet man bei Patienten mit Pneumonie oder Sepsis häufig eine verminderte bis fehlende HPV. Dadurch nimmt der Shuntfluss des Blutes in der Lunge zu und das Blut kann nur unzureichend oxygeniert werden (109, 117). Das ist häufig eine Ursache für Hypoxämien.

Der gesteigerte pulmonalvaskuläre Widerstand bei generalisierter alveolärer Hypoxie durch die HPV kann so zu einer Verstärkung der PH beitragen. Umgekehrt kann eine Verringerung der HPV bei regionaler alveolärer Hypoxie zu einer mangelnden Oxygenierung des Blutes beitragen. Vor diesem Hintergrund ist bisher nicht geklärt, welche Auswirkung die chronische alveoläre Hypoxie auf die akute HPV hat und wie sich eine Therapie der PH auf die HPV auswirkt.

### 3 Hintergrund und Fragestellung der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit lag der Focus der Untersuchungen auf der akuten HPV. Es wurden Effekte einer Therapie mit NO und Iloprost auf die Effekte der chronischen Hypoxie auf die HPV am Kaninchen untersucht.

Frühere Studien, meistens bezogen auf Ratten, haben widersprüchliche Ergebnisse auf die Effekte der chronischen alveolären Hypoxie in Bezug auf die akute HPV gezeigt. Einige Studien zeigten eine Reduktion der HPV (7, 43, 75, 76, 91, 127), andere berichteten über einen Anstieg oder ein Persistieren der Stärke der HPV nach chronischer alveolärer Hypoxie (7, 22, 62). Bei Wistar-Ratten stellte man eine Konstanz oder ein Ansteigen der Stärke der HPV fest, wohingegen in Sprague-Dawley-Ratten eine Herunterregulation gesehen wurde. Die Beobachtung, dass die Vasokonstriktion auf die chronische Hypoxie in unterschiedlichen Rattenstämmen variiert, wird durch Studien von OU und Kollegen unterstützt (84, 85). Ebenfalls ist die Rolle der NO-Synthese in der Lunge, in Bezug auf die HPV nach chronischer Hypoxie, noch nicht vollständig geklärt. Auch bei den wenigen Untersuchungen zu NO-Effekten auf die akute HPV kam man zu inkonsistenten Ergebnissen an Ratten und an Menschen (13, 26, 57, 66, 67, 80, 99). Die unterschiedlichen Ergebnisse betreffend der HPV nach chronischer alveolärer Hypoxie und des NO-Effektes variieren somit sowohl in unterschiedlichen Spezies als auch in verschiedenen Untersuchungen an der gleichen Spezies.

In anderen Studien hypoxieinduzierter PH konnte bereits gezeigt werden, dass durch vasodilatatorische Therapien ein Ansteigen des pulmonalen Gefäßwiderstandes, die Rechtsherzhypertrophie sowie ein Ansteigen der Muskularisation in den Pulmonalgefäßen reduziert werden kann und es zu einer verbesserten symptomatischen und hämodynamischen Situation kommt (4, 31, 50, 63, 90, 107, 128, 129).

In dieser Dissertation wurde der Effekt aus einer separaten sowie kombinierten Applikation von inhaliertem NO und intravenösem Iloprost auf die hypoxieinduzierte pulmonale Hypertonie verglichen.

Vor dem Hintergrund der bisher publizierten Daten ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

Zeigt sich eine Hemmung der (HPV) nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung?

Wie ändert sich die HPV im Zeitverlauf chronischer Hypoxie?

Kommt es nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung zu Veränderungen im pulmonalen NO-System?

Welchen Einfluss haben sowohl die separate Applikation von inhalativem NO und intravenösem Iloprost als auch die kombinierte Verabreichung beider Agenzien während der chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung auf die HPV und die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie?

Inwieweit sind die charakteristischen Parameter einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie, wie Rechtsherzhypertrophie, PAP und HPV, funktionell voneinander abhängig?

Um diese Fragen zu beantworten wurden die Effekte einer Therapie mit NO und Iloprost auf die Effekte der chronischen alveolären Hypoxie am Kaninchen untersucht. Die Kaninchen wurden für 1-42 Tage in dafür angefertigte Expositionskammern gehalten. Die erste Gruppe wurde einer normobaren Hypoxie (10% O<sub>2</sub>) ausgesetzt. Der zweiten Gruppe wurden zusätzlich 15 ppb NO in der Einatemungsluft hinzugefügt und/oder intravenöses Iloprost verabreicht. Die Kontrollgruppe blieb für diese Zeit unter 21% O<sub>2</sub>. Im Anschluss daran wurden die Lungen in einem ex vivo Versuch isoliert und mit einer Pufferlösung perfundiert, um die pulmonale Hämodynamik ohne Interferenz mit dem restlichen Körper und der Blutzirkulation zu untersuchen (121). Dabei wurde die hypoxieinduzierte HPV

mit der durch das Thromboxan-Analogon U-46619 hervorgerufenen hypoxieunabhängigen Vasokonstriktion verglichen. Desweiteren wurde die NO-Exhalation in den ex vivo perfundierten Lungen gemessen sowie pharmakologisch mittels L-NMMA (Methylarginin) NO blockiert, um die Rolle der NO-Synthese nach einer chronischen Hypoxieexposition zu bestimmen. Anschließend wurde eine mögliche Rechtsherzhypertrophie bestimmt.

## **4 Methoden**

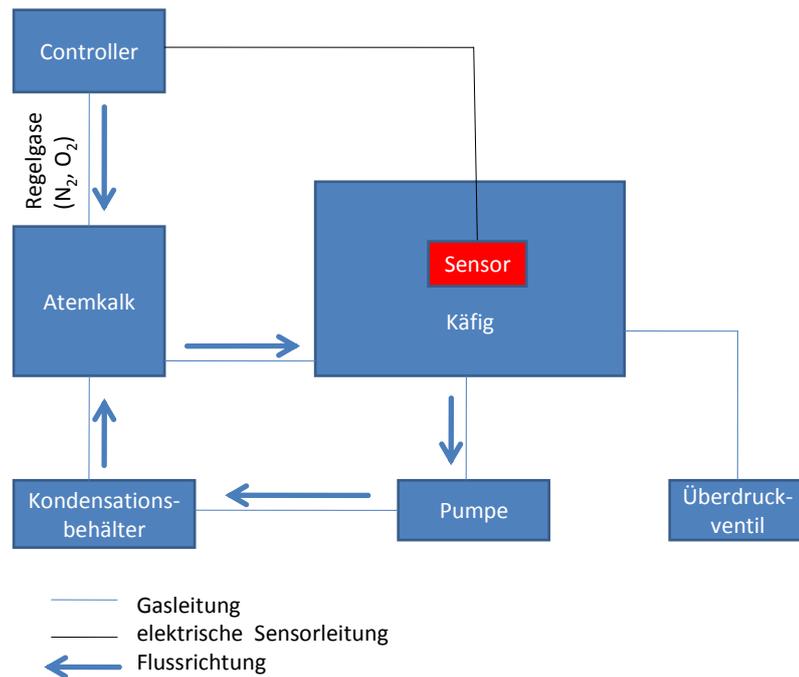
### **4.1 Chronische Hypoxie**

Alle Tierexperimente waren vom Regierungspräsidium Gießen, Nummer 17a-10c-20-15(1)-Gi20/10-3/95 und 25.3-19c 20/15(1)-Gi20/10-20/99 genehmigt. Als Versuchstiere wurden Kaninchen (Chinchilla bastard) beiderlei Geschlechts (2,5-3,2kg) verwendet. Die Tiere wurden in normobaren hypoxischen Expositionskammern ausgesetzt (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>). Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (21% O<sub>2</sub>).

#### **4.2.1 Käfigsystem zur Haltung von Kaninchen unter chronischer, normobarer Hypoxie**

Die Expositionskammern wurden nach Tierhaltungsrichtlinien konstruiert und hatten eine Größe von 57 x 73 x 57cm (Breite x Länge x Höhe). In diesen befand sich jeweils ein Plastik-Käfig-Einsatz (Tecniplast, Buguggiate, Italien) mit Lochboden. Kot und Urin der Versuchstiere fielen durch den perforierten Boden in eine Kotschale. An der Versuchskäfigtür wurde eine 0,5l Trinkflasche (Tecniplast, Buguggiate, Italien) befestigt. Jede Expositionskammer war zudem mit einer Futterschale aus Ton ausgestattet und wurde einmal pro Tag zur Reinigung, wie auch zum Futterwechsel für 10 min geöffnet.

Der Hypoxiegrad in den Käfigen wurde durch einen O<sub>2</sub>-Sensor gemessen und durch eine Autoregulationskontroll-Einheit (O<sub>2</sub> Kontroller 4010, Labotect, Göttingen) mittels entsprechender Zufuhr von entweder Sauerstoff oder Stickstoff konstant gehalten. Durch den Käfig (Merk, Wiesbaden) strömte ein rezirkulierendes Atemgasgemisch. Das Atemgasgemisch wurde mittels Pumpe (KNF Neuberger, Freiburg) aus dem Käfig über ein geschlossenes Schlauchsystem abgesaugt und anschließend dem Wasserbad zur Kühlung und Atemkalk zugeführt. Danach gelangte das Gas zurück in den Käfig.



#### 4.2.2 NO-Inhalation

Zudem wurde einigen Kaninchen in den Hypoxiekäfigen (10%O<sub>2</sub>) und den Kontrollkäfigen (21%O<sub>2</sub>) über einen separaten Zugang, unabhängig von dem Atemgassystem, NO-Gas zugeführt.

Eine Flasche mit einer NO-Gaskonzentration von 2000ppm wurde über einen separaten Flowmeter direkt mit dem Käfigsystem verbunden. Eine konstante NO-Konzentration von 15 ppb wurde durch permanentes Zuführen von NO-Gas unter Kontrolle des NO-Pegels mit Hilfe eines Dräger Multiwarn (Drägerwerk AG, Lübeck) und Sievers NO Analyzer (Sievers NO Analyser NO A-280, Sievers, Colorado, USA) sichergestellt.

#### 4.2.3 Technik der Bestimmung des exhalativen NO

Die Technik wurde im Jahre 1995 an dem hier beschriebenen Modell der isolierten, artifiziell ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge etabliert und angewendet (112). Über eine luftdicht verschlossene Verbindung wurde kontinuierlich ein Aliquot des ausgeatmeten Gases einem

Chemilumineszenz-NO-Analysator (Sievers NO Analyser, NO A-280, Sievers, Colorado, USA) zugeführt. Dieser quantifizierte die NO-Konzentration in ppb [in Teilen pro Billion (vol/vol)]. Die gemessenen Werte wurden von einem analogen XY-Schreiber aufgezeichnet.

### **4.3 Medikamentenzufuhr**

Die intravenöse Langzeitapplikation von Medikamenten erfolgte über einen Zentralvenen-Katheter (Hickman Katheter, Baxter Deutschland GmbH), der operativ in die linke Vena jugularis implantiert wurde.

Vor der Operation wurde der Bereich über einer Ohrrendvene rasiert und desinfiziert, um eine Injektionsnadel unter sterilen Bedingungen zu plazieren und die intravenöse Narkose einzuleiten. Die Narkose wurde mit Ketamin (15-25mg/kg KG) und Xylazin (3-5mg/kg KG) durchgeführt und soweit vertieft, dass das Tier analgetisiert und relaxiert war, jedoch noch spontan atmen konnte. Das Kaninchen wurde in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und die Operationsfelder am Hals und am Nacken ebenfalls rasiert und desinfiziert. Nun wurde ein Längsschnitt von etwa 3cm, ca. 3cm kaudal des Kehlkopfes und ca. 1,5cm lateral der Trachea durchgeführt und die Vena jugularis stumpf freipräpariert. Nach dem Unterfahren der V.jugularis mit zwei Fäden konnte ein subkutaner Tunnel Richtung Halswirbelsäule angelegt werden. Mit einem kleinen Schnitt wurde der Tunnel in Höhe der Halswirbelsäule eröffnet und von dort aus der Katheter in Richtung der V.jugularis vorgezogen. Der kraniale Faden wurde nun an der V.jugularis zugezogen. Daraufhin wurde die V.jugularis zwischen beiden Fäden quer inzisiert und der vorbereitete Katheter bis kurz vor die rechte Herzhälfte vorgeschoben. Durch eine große Schleife des extravenösen Teils des Katheters wurde eine Zugentlastung geschaffen, die die volle Beweglichkeit des Kopfes und des Rumpfes des Tieres gewährleistete, ohne dass ein Herausziehen des Katheters aus der V. jugularis möglich war. Nachdem der Katheter mit dem zweiten Faden fixiert wurde, wurden die Operationsfelder an Hals und Wirbelsäule mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Kurz

vor Beendigung der Narkose wurde der Multiday Infusor (Multidayinfusor 0.5ml/h, Baxter, Deutschland GmbH) an dem Kaninchen fixiert und mit dem extrakorporalen Teil des Katheters konnektiert. Über diesen Multiday Infusor wurden verschiedene Agenzien mit einer Geschwindigkeit von 0,5ml/h injiziert. Die Multidayinfusoren wurden zu Beginn mit 14ml steriler 0,9% NaCl-Lösung, 250 U Heparin/kg KG/24h sowie einem Antibiotikum (Baytril 10%, 0,2ml/kg KG/24h) gefüllt. Die Infusoren hatten eine Pumpenkapazität von 0,5ml/h. Somit reichten 12ml Flüssigkeit für die Versorgung der Versuchstiere für 24 Stunden aus. Um ein Leerlaufen und damit eine Luftembolie der Kaninchen zu vermeiden, verblieben 2ml Flüssigkeit als Reserve im Infusor. Nach der Kontrolle der infundierten Menge wurden die Infusoren täglich zur gleichen Zeit mit 12ml NaCl-Lösung und Heparin aufgefüllt.

Eine Woche nach der Zentralvenen-Katheterimplantation (Hickman Katheter, Baxter Deutschland GmbH) wurden die Kaninchen in die Expositionsammern überführt (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) und der NaCl-Lösung kontinuierlich Iloprost zugesetzt. Die Dosis betrug 15ng/kg KG/min. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>) mit kontinuierlicher Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung. Heparin und Baytril wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr verabreicht. Nach 42 Tagen wurden die Lungen der Tiere isoliert, artifiziell perfundiert und ventiliert sowie der Analyse zugeführt.

#### **4.4 Aufbau des Arbeitsplatzes**

Die Perfusion der isolierten, artifiziell ventilierten Lunge erfolgte über eine Schlauch-Peristaltikpumpe (Cole Parmer Masterflex, Barrinton, USA), die für einen kontinuierlichen Perfusatfluss sorgte. Vor dieser Pumpe befanden sich im Kreislauf zwei mit je max. 300ml Füllvolumen doppelwandige, temperierte Perfusatbehälter, die einen Perfusatwechsel ohne Unterbrechung ermöglichten. Im Anschluss an die Schlauch-Peristaltikpumpe befand sich ein Spezialfilter (Pall Biochemical Inc., Fajardo, USA), der für

ausgewaschene Zellen nicht passierbar war. Von dort aus gelangte das Perfusionsmedium über einen im Wasserbad (Wasserbad 7P mit Thermoelement Thermomix B beides Braun Medical, Melsungen) befindlichen Wärmetauscher und anschließend über einen Membranoxygenator, der auch als Blasenfalle diente, in die Arteria pulmonalis. Dieser Membranoxygenator sorgte für physiologische gemischtvenöse Gaspartialdrücke und verhinderte gleichzeitig Luftembolien. Nach Durchlaufen der Lungenstrombahn floss das Perfusat über ein im linken Ventrikel befindliches Verbindungsstück, bei einem hydrostatischen Druck von 2,0mmHg, zurück in die Perfusatbehälter, so dass der Kreislauf geschlossen war. Der arterielle Katheter wurde in der Arteria pulmonalis fixiert und der venöse direkt im linken Ventrikel. In den beiden Kathetern wurden dünne Druckmesskatheter plziert, die mit einem elektromechanischen Druckwandler (Combitrans Monitoring-Set, Braun Medical, Melsungen) verbunden waren. Die Signale wurden dann über einen Messverstärker (Bridge Amplifier Module Type 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) und einer Analog/Digital-Wandlerkarte (PCL-818Hb, Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen) auf einen Personalcomputer übertragen. Mit Hilfe einer dafür vorgesehenen Software auf dem Computer (Labtec Notebook/LE, Spectra Computersystem GmbH, Leinfelden-Echterdingen) wurden die Signale kontinuierlich mit 2Hz aufgezeichnet. Die Messung des Beatmungsdrucks in der Trachea erfolgte auf gleiche Weise. Neben der Druckregistrierung war auch die Wägezelle (Wägezelle U16, Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt) über den Messverstärker und die Analog/Digital-Wandlerkarte mit dem PC verbunden, um z.B. Gewichtsveränderungen der Lunge zu erfassen.

Der die Lunge umfassende, mit Temperierflüssigkeit durchströmte Trog diente zur Sicherung von Temperatur- und Feuchtigkeitskonstanz. In dem arteriellen Schenkel kurz vor Eintritt des Katheters in die A.pulmonalis befand sich eine Injektionsmöglichkeit für bestimmte, während des Versuches zu verabreichenden Agenzien, die alternativ über die Reservoirgefäße gegeben werden konnten.

Das Perfusatmedium wurde zu Beginn der Präparation durch ein Kühlgerät (Frigomix U, Braun Medical, Melsungen) auf 4°C gekühlt und die Perfusion zu Beginn mit 10ml/min gestartet. Am Ende der Präparation, nach Herstellung eines geschlossenen Kreislaufsystems, wurde mittels Thermopumpe und Wärmetauscher langsam auf die physiologische Temperatur von 38,5°C erwärmt und gleichzeitig die Perfusion auf 150ml/min gesteigert. Das Füllvolumen des Perfusionssystems betrug 250ml. Nach Erreichen dieser Werte wurde das Organ für 20 Minuten beobachtet (steady state-Phase) und bei Druck- und Gewichtsstabilität der Versuch fortgesetzt.

Perfusionsmedium-Zusammensetzung:

-CaCl <sub>2</sub>	2,4mM
-MgCl <sub>2</sub>	1,3mM
-KCl	4,3mM
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1mM
-NaCl	125,0mM
-Glucose	275mg/100ml

-Adjustierung des pH-Wertes auf 7,4 durch Zugabe von 8,4 % NaHCO<sub>3</sub>

Die Ventilation der Kaninchenlunge erfolgte über eine spezielle Beatmungspumpe (Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem Beatmungsvolumen von 30ml, einer Beatmungsfrequenz von 30/min und einem positiv endexpiratorischem Druck (PEEP) von 1 cm Wassersäule.

Durch eine entsprechende Gasventilinstallation war ein schneller Wechsel von unterschiedlichen Gasen innerhalb weniger Sekunden möglich.

Zusammensetzung der Gase (in Volumenprozent):

-Raumluft

-Normoxisches Gasmisch (21%O<sub>2</sub>, 5,3%CO<sub>2</sub>, 73,7%N<sub>2</sub>)

-Hypoxisches Gasmisch (3%O<sub>2</sub>, 5,3%CO<sub>2</sub>, 91,7%N<sub>2</sub>)

#### **4.5 Reinigung des Perfusionssystems**

Zur Vorbereitung auf den Versuch wurde das Perfusionsschlauchsystem mit 2 Litern destilliertem Wasser, 2 Litern NaCl und 2 Litern mit Natriumbikarbonat versetztem Perfusat gereinigt und anschließend vollständig entlüftet.

Nach Beendigung des Versuches wurde das Schlauchsystem mit Leitungswasser gespült und an den vorgesehenen Stellen dekonnektiert. Daraufhin wurden die einzelnen Schläuche mit den Glasgefäßen in einer Spülmaschine (Miele-Labor G 7783, Gütersloh) gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült, sowie anschließend sterilisiert. Die Injektionsstopfen und Filter wurden ersetzt.

#### **4.6 Präparation zur isolierten Lunge (ILU)**

Das Model der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge wurde bereits früher beschrieben (108, 121).

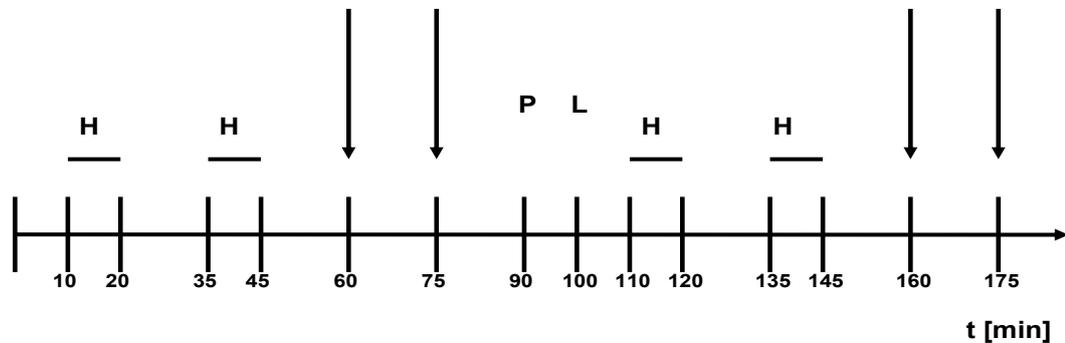
Den Tieren wurde zu Beginn die laterale Ohrrendvene durch Abrasieren der Haare freigelegt und anschließend die Punktionsstelle desinfiziert. Nach dem Fixieren einer Injektionsnadel in dieser Ohrrendvene wurde das Kaninchen über diese mit einem Gemisch aus Ketamin (30-50mg/kg KG) und Xylazin (13-22mg/kg KG), unter Erhaltung der Spontanatmung, analgetisiert, narkotisiert und heparinisiert (1000U/kg KG). Mit Lidocain wurde nun ca. 5 cm kranial des Sternums eine Lokalanästhesiequaddel in die Subcutis injiziert und unter Schonung der A.carotis, der V.jugularis, sowie des Nervus vagus, die Trachea freipräpariert und mit einem Faden unterfahren. Nach der Tracheotomie wurde der Beatmungstubus eingeführt, mit dem zuvor vorgelegten Faden fixiert und zunächst das Kaninchen mit Raumluft (30ml Beatmungsvolumen und 30/min Beatmungsfrequenz) beatmet. Anschließend wurde die A.carotis freipräpariert und mit zwei Fäden unterfahren. Zwischen diesen Fäden wurde eine Braunüle mit einem Dreiwegehahn plziert. Mit dem kranialen Faden wurde die A.carotis abgebunden und mit dem kaudalen

Faden die Braunüle fixiert. An den Dreiwegehahn wurde die Druckmessung angeschlossen und die Messung gestartet. Die Braunüle diente einerseits zur arteriellen Druckmessung und andererseits zur Blutentnahme. Weiterhin wurde unter manueller Kontrolle der Herztätigkeit die Narkose vertieft und anschließend mit einem Hautschnitt 2cm kaudal des Xiphoids eine Oberbauchlaparotomie durchgeführt. Dabei wurde der Processus xiphoideus angeklemt und das Epigastrium vorsichtig eröffnet. Nachdem nun das Diaphragma unter Sicht der beatmeten Lunge vom Rippenbogen abpräpariert und das Pericard und der Thymus stumpf vom Thorax gelöst wurden, wurde mit einer Nadel 1cm kaudal der A.pulmonalis das Herz inzidiert, so dass anschließend ein Katheter in die A.pulmonalis vorgeschoben und die Druckmessung gestartet werden konnte. Über einen separaten Schenkel an diesem Katheter und über die Braunüle in der A.carotis wurde dann venöses und arterielles Blut entnommen, um die O<sub>2</sub>-Sättigung (in %) und den Hämatokrit (in %) zu bestimmen. Nach Sternotomie wurden die Thoraxhälften mittels zweier Klemmen nach lateral gespreizt und fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Pericard und der Thymus entfernt und die Herzspitze angeklemt. Unter freier Sicht auf die Aorta ascendens und die A.pulmonalis wurden diese nun mit einem Faden unterfahren und unter laufender Perfusion (10ml/min) bei 4°C wurde, nach Entfernen des zuvor beschriebenen Druckkatheters aus der A.pulmonalis, der Perfusionskatheter in diese vorgeschoben und mit einem Faden fixiert. Anschließend wurde die Herzspitze reseziert und durch Zubinden der Aorta ascendens das Kaninchen durch Kreislaufstillstand in tiefer Narkose getötet. Die Beatmung wurde mit dem Einbinden des pulmonalarteriellen Katheters auf ein normoxisches Gasgemisch (73,7%N<sub>2</sub>, 21%O<sub>2</sub>, 5,3%CO<sub>2</sub>) umgestellt (30ml Beatmungsvolumen und 30/min Atmungsfrequenz). Nach Beenden der Raumlufbeatmung wurde unter Zuführung des normoxischen Gasgemisches das Herz-Lungen-Paket unter Lösung des mediastinalen Bindegewebes aus dem Thorax isoliert. Folgend wurden einerseits die Papillarmuskeln aus dem linken Ventrikel entfernt, um einen gesicherten Abfluss zu erhalten, und andererseits das linke Herzohr mittels Ligatur abgebunden. Mit Entfernen der

rechten Herzhälfte und dem Einbringen eines Verbindungsstücks in den linken Ventrikel mittels Tabaksbeutelnaht wurde die Herzpräparation beendet und die Lunge an einer Wägezelle in einem temperierten Gefäß platziert. Durch das folgende Konnektieren dieses Verbindungsstücks mit dem Perfusionssystem wurde ein geschlossener Kreislauf hergestellt. Nach dem Konnektieren wurde der Perfusatfluss langsam, unter Kontrolle des pulmonalarteriellen Drucks (PAP), des pulmonalvenösen Drucks (PVP), des Ventilationsdrucks (VP) und der Lungenmassenveränderungen, von 10ml/min auf 150ml/min und zeitgleich die Temperatur von 4°C auf 38,5°C gesteigert. Bei einer Temperatur von 32,5°C wurde der Filter aus dem System genommen und die Lunge mit einem PEEP (1cm H<sub>2</sub>O) beatmet. Ebenfalls wurde bei dieser Temperatur ein Perfusatwechsel vollzogen, um Blutreste auszuspülen.

Nach einer Beobachtungszeit von 20 Minuten wurde, bei Druck- und Gewichtsstabilität der Lunge, sowie Ödem- und Atelektasefreiheit, der Versuch fortgesetzt.

## 4.7 Hypoxische Manöver während der ILU



**Abb. 1 Zeitliche Darstellung eines isolierten Lungenversuches**

Zeitachse t [min] während eines isoliert perfundierten und ventilierten Lungenversuches

**H** = Hypoxische Ventilation

↓ = U46619 Bolus-Applikation

**P** = Perfusatwechsel

**L** = L-NMMA Applikation

Die hypoxischen Manöver während des isolierten Lungenversuches wurden durch eine Veränderung der O<sub>2</sub>-Zufuhr von 21% auf 3% durchgeführt (121-123, 125). Dabei wurde ein CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5,3% verwendet. Die zweimaligen hypoxischen Manöver von 10 Minuten Dauer wurden durch 15 minütige normoxische Phasen unterbrochen. 15 Minuten nach dem Beenden der Hypoxie wurden 2 Boli des Thromboxan-Analogons U-46619 (0,5nM) in einem Abstand von weiteren 15 Minuten gegeben (41, 122-124). 15 Minuten nach der zweiten U-46619-Gabe wurde das Lungengefäßsystem mit einem Liter frischem Perfusionsmedium ausgespült und nach weiteren 10 Minuten 400µM L-NMMA dem Perfusat hinzugegeben. 10 Minuten später wurde wieder mit einem hypoxischen Manöver begonnen und der Versuch wie vor dem Perfusatwechsel fortgesetzt. In die Analyse wurden jeweils die maximale Stärke jeder 2. Hypoxiephase und jeweils jeder 1. U-46619-Phase

aufgenommen, da diese im Vergleich zur 1. Hypoxiephase bzw. 2. U-46619 Bolusapplikation die geringsten Schwankungen aufwiesen. Der normoxische vaskuläre Tonus wurde nach der Steady-State-Phase sowie 35 Minuten nach der L-NMMA-Gabe gemessen.

#### 4.8 Herzpräparation

Nach dem isolierten Lungenversuch wurde das Herz von der Lunge getrennt und der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel disseziert, um später das Verhältnis von rechten zu linkem Ventrikel inkl. Septum zu berechnen.

Von der zuvor, während der Lungenpräparation, abgetrennten Herzspitze wurde die linke Ventrikelspitze von der rechten getrennt und auf ein gewogenes Objektträgerglas plaziert. Anschließend wurden von der ebenfalls zuvor erhaltenen rechten Ventrikelwand die Fettreste entfernt und auf das für das rechte Herz bereits genannte Objektträgerglas aufgebracht. Von dem verbliebenen Herz wurden das Fett, die Gefäße und die Vorhöfe entfernt, so dass nur die linke Ventrikelwand übrig blieb. Diese wurden ebenfalls auf das vorgesehene Objektträgerglas plaziert. Nun wurden diese Objektträgergläser für eine Woche bei 40°C in einem Wärmeschrank (Thermo Lux Wärmeschrank, Memmert GmbH & Co. KG, Tuttingen) getrocknet und nach dieser Zeit, da keine Feuchtigkeit mehr vorhanden war, auf einer Präzisionswaage-Mettler AJ 100 (Mettler Toledo GmbH, Gießen) gewogen und das Verhältnis zwischen rechtem und linkem Ventrikel inkl. Septum bestimmt.

$$x = (a-b) : (c-d)$$

x= Verhältnis zwischen dem rechten und dem linken Ventrikel inkl. Septum

a= Gewicht des trockenen rechten Ventrikels + leerer Objektträger

b= Gewicht Objektträger leer

c= Gewicht des trockenen linken Ventrikels + Septum + leerer Objektträger

d= Gewicht Objektträger leer

Aus diesem Verhältnis konnte somit eine mögliche vorhandene Rechtsherzventrikelhypertrophie gegenüber den Kontrolltierherzen nachgewiesen werden, wenn sich die Masse des linken Ventrikels nicht ändert.

#### **4.9 Statistik**

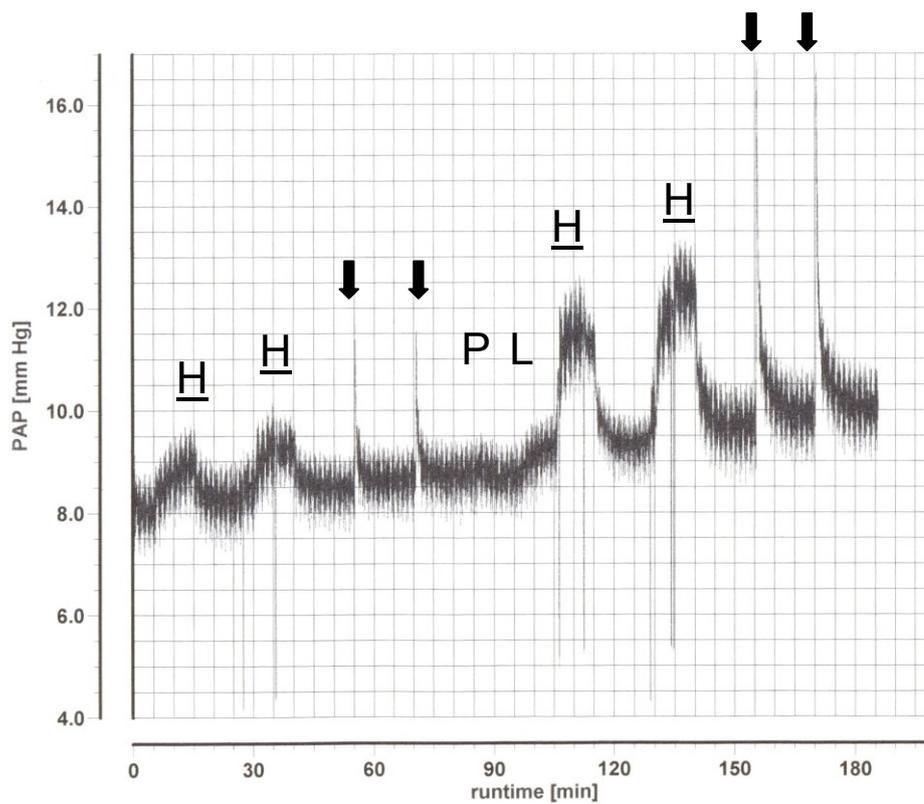
Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanzberechnung beim statistischen Vergleich mehrerer Versuchsgruppen wurde nach ANOVA mittels des Student-Newman-Keuls-Tests und des Dunett-Tests durchgeführt. Der Student-Newman-Keuls-Test ist ein multipler Vergleichstest, der jede Gruppe mit jeder anderen Gruppe vergleicht. Dieser Test wurde verwendet, um die einzelnen Tiergruppen untereinander zu vergleichen. Der Dunett-Test vergleicht jede Gruppe zu einer Kontrollgruppe. Dieser Test wurde verwendet, um die einzelnen Gruppen mit der normoxischen Kontrollgruppe zu vergleichen.

Signifikante Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  angenommen.

## 5 Ergebnisse

Nach chronischer Hypoxieexposition wurden den Kaninchen die Lungen entnommen und die pulmonale Hämodynamik an der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge verglichen. Die Messungen wurden nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 42 Tagen chronischer Hypoxieexposition vorgenommen.

In Abb. 2 ist eine Originalaufzeichnung eines isolierten Lungenversuches dargestellt. Zunächst wurde zweimalig eine Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) im Wechsel mit einer Normoxie (21% O<sub>2</sub>) durchgeführt. Dies führte in der Hypoxiephase zu einem PAP-Anstieg mit einem Maximum. Der PAP fiel unter Normoxie wieder ab. Anschließend wurden unter Normoxie 2 Boli des Thromboxanmimetikums U-46619 (0,5nM) verabreicht. Diese führten jeweils zu einem raschen, kurzen PAP-Anstieg. Dann wurde das Lungengefäßsystem zunächst mit frischem Perfusionsmedium gespült, was zu einer geringen PAP-Senkung führte. Im Anschluss wurde L-NMMA hinzugefügt, was den PAP wiederum gering ansteigen ließ. Der weitere Versuch wurde wie vor dem Perfusatwechsel durchgeführt. Die hypoxischen Manöver sowie die U-46619-Boli ließen den PAP nach Blockade der NO-Synthese deutlicher ansteigen (**Abb. 2**).



**Abb. 2 Originalaufzeichnung eines isolierten Lungenversuches**

Pulmonalarterieller Druck (PAP) während eines isoliert perfundierten und ventilerten Lungenversuches

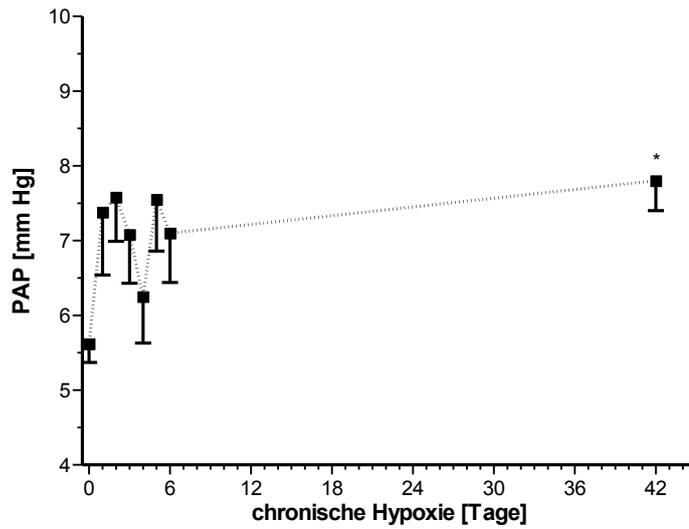
H = Hypoxische Ventilation

↓ = U46619 Bolus-Applikation

**P** = Perfusatwechsel

**L** = L-NMMA Applikation

Nach 42 Tagen chronischer alveolärer Hypoxie zeigte sich eine signifikante Erhöhung des PAP im Vergleich zu den normoxisch gehaltenen Tieren (Abb. 3).

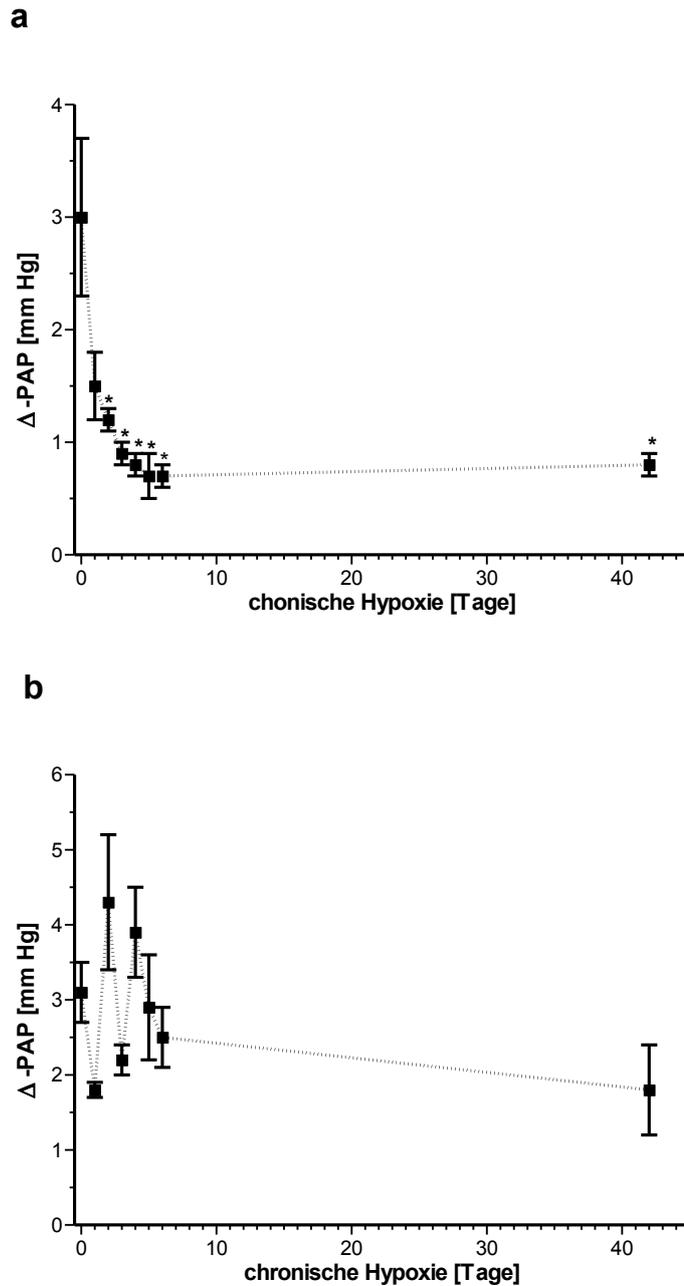


**Abb. 3 Normoxischer pulmonalerterieller Druck in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge nach chronischer Hypoxieexposition von 1 bis 42 Tagen.**

Pulmonalerterieller Druck (PAP) in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge. Die Daten wurden aus Lungen nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) erhoben. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (1-42 Tage, 21% O<sub>2</sub>). Daten (Mittelwert ± SEM; n=4-7 Tiere/Gruppe). \* signifikante Unterschiede im Vergleich zu nicht hypoxieexponierten Tieren. Die statistische Analyse wurde mittels des Dunnett-Tests durchgeführt.

(Kontrollgruppe n=4; 1, 2, 4 Tage chronische Hypoxie n=5; 3, 5, 6, 42 Tage chronische Hypoxie n=7)

Eine akute hypoxische Ventilation mit 3% O<sub>2</sub> führte bereits nach 2 Tagen chronischer Hypoxieexposition zu einer signifikanten Verringerung der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Die Verringerung hatte nach 5 Tagen das Maximum erreicht und blieb über den weiteren Verlauf der chronischen Hypoxieexposition bestehen (**Abb. 4a**). Eine Bolusapplikation durch U-46619 führte zu keiner signifikanten Reduktion der pulmonalen Vasokonstriktion im Verlauf der chronischen Hypoxieexposition (**Abb. 4b**).



**Abb. 4 Stärke der Vasokonstriktion auf eine akute hypoxische Ventilation (a) und nach U-46619 Bolusapplikation (b) nach chronischer Hypoxieexposition von 1 bis 42 Tagen.**

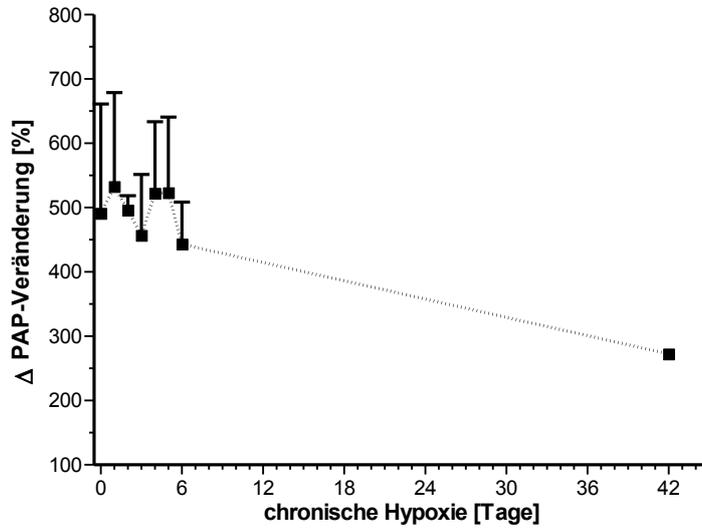
Die Stärke der Vasokonstriktion wurde nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) gemessen. Die Stärke der Vasokonstriktion ist durch den pulmonalarteriellen Druckanstieg ( $\Delta$  PAP) angegeben. \* signifikante Unterschiede im Vergleich zu nicht hypoxieexponierten Tieren. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (1-42 Tage, 21% O<sub>2</sub>). Die statistische Analyse wurde mittels des Dunett-Tests durchgeführt. (Kontrollgruppe n=4; 1, 2, 4 Tage chronische Hypoxie n=5; 3, 5, 6, 42 Tage chronische Hypoxie n=7)

**a** Maximale Stärke der Vasokonstriktion ausgelöst durch eine akute hypoxische Ventilation nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>).

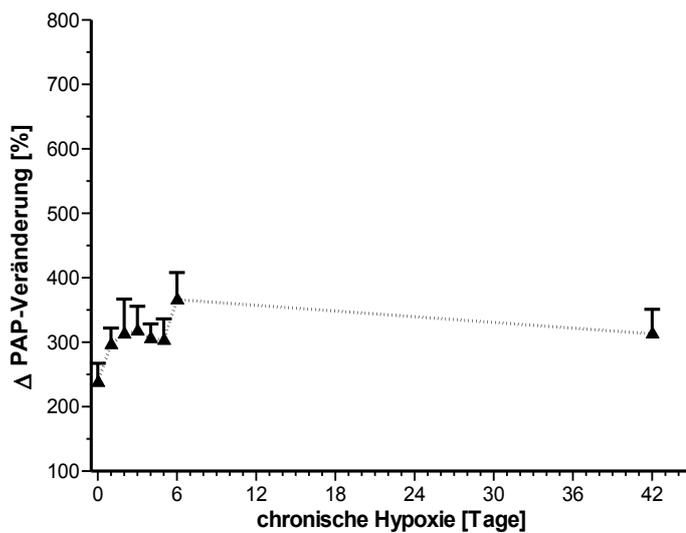
**b** Maximale Stärke der Vasokonstriktion ausgelöst durch eine Bolusapplikation mit U-46619.

Die Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge durch den Zusatz von 400µM L-NMMA ließ den normoxischen Vasotonus nur gering ansteigen (um 26,2% ± 2,2% des Ausgangswerts innerhalb von 35 Minuten). Die NO-Synthese-Blockade führte zu einer Verstärkung der pulmonalen Vasokonstriktion während einer akuten hypoxischen Ventilation (**Abb. 5a**). Die in Abwesenheit von L-NMMA beobachtete Verringerung der HPV durch chronische Hypoxieexposition war in Anwesenheit von L-NMMA jedoch nicht mehr beobachtbar. L-NMMA hatte auch, ausgelöst durch U-46619, eine Verstärkung der Vasokonstriktion zur Folge (**Abb. 5b**). Die Verstärkung der pulmonalen vasokonstriktorisches Antwort durch L-NMMA war für die akute hypoxische Ventilation im Vergleich zum U-46619-Bolus größer. Dieser Unterschied war nach 42 Tagen chronischer Hypoxieexposition nicht mehr messbar.

**a**



**b**



**Abb. 5 Verstärkung der Vasokonstriktion nach Hemmung der NO-Synthese.**

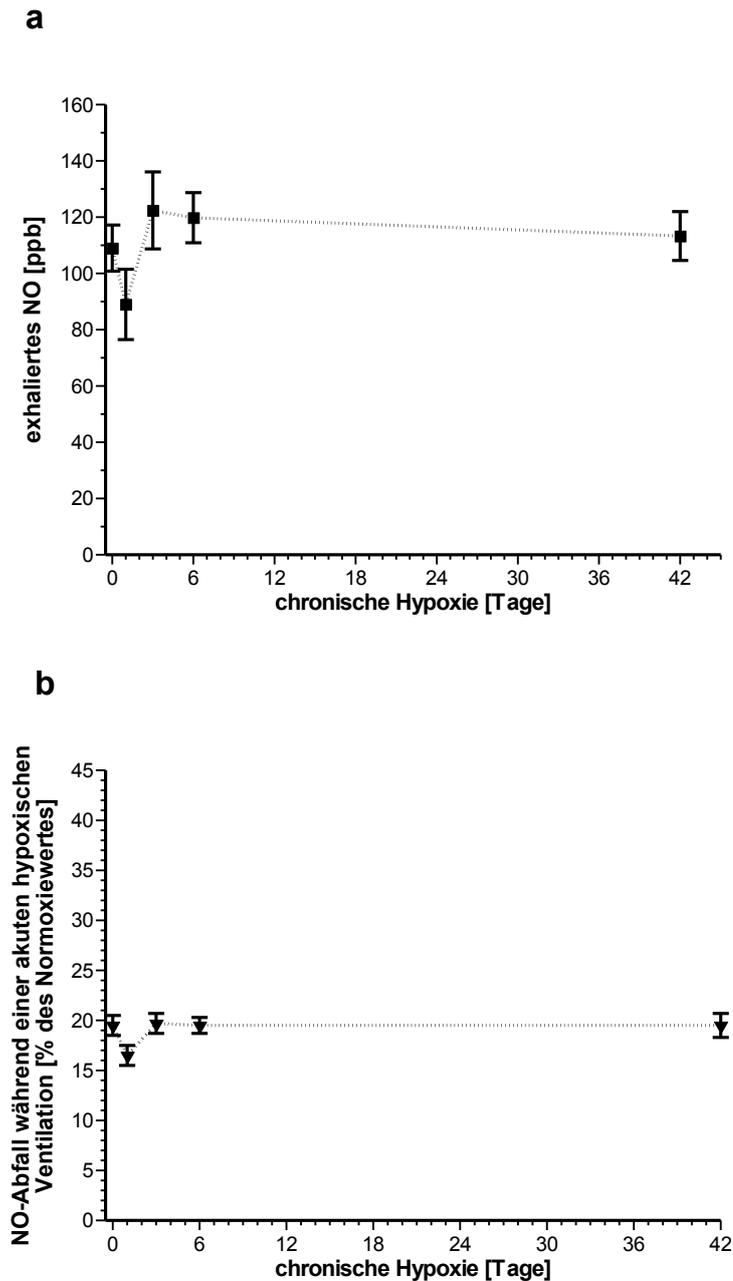
Die Verstärkung der Vasokonstriktion ist bezogen auf den jeweiligen Wert vor der Hemmung der NO-Synthese in der Lunge (=100%) in Prozent angegeben (siehe Methoden). Die Stärke der Vasokonstriktion wurde nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) gemessen. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (1-42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

(Kontrollgruppe n=4; 1, 2, 4 Tage chronische Hypoxie n=5; 3, 5, 6, 42 Tage chronische Hypoxie n=7)

**a** Verstärkung der Vasokonstriktion während der akuten hypoxischen Ventilation nach Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge durch den Zusatz von 400μM N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (400μM L-NMMA).

**b** Verstärkung der U-46619 induzierten Vasokonstriktion nach Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge.

Die Konzentration von NO im Exhalat wies nach chronischer Hypoxieexposition in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge keine signifikanten Unterschiede zwischen der normoxischen Kontroll-Gruppe und den chronischen Hypoxie-Gruppen auf (**Abb. 6a**). Eine akute hypoxische Ventilation bewirkte einen spontanen Abfall der gemessenen NO-Konzentration im Exhalat, was im Verlauf von 1-42 Tagen chronischer alveolärer Hypoxie nicht signifikant verändert war (**Abb. 6b**). Nach der akuten hypoxischen Ventilation kam es wieder zum Anstieg der gemessenen NO-Exhalation auf den Ausgangswert, d.h. der spontane Abfall war voll reversibel. Eine U-46619 induzierte Vasokonstriktion bewirkte keinen Abfall der NO-Konzentration im Exhalat.



**Abb. 6 NO-Exhalation während einer normoxischen Beatmung und NO-Konzentrations-Abfall während einer akuten hypoxischen Ventilation.**

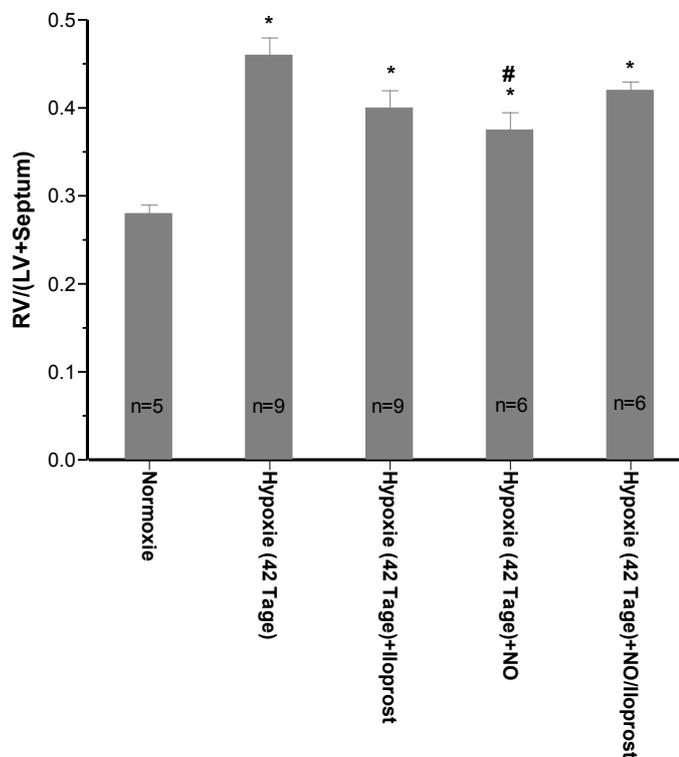
Die NO-Exhalation wurde nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) gemessen. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (1-42 Tage, 21% O<sub>2</sub>). Die Angabe erfolgt in % des Wertes direkt vor dem jeweiligen Hypoxiebeginn (=100%).

(Kontrollgruppe n=4; 1 Tag chronische Hypoxie n=5; 3, 6, 42 Tage chronische Hypoxie n=7)

**a** Exhalierendes NO-Konzentration während einer normoxischen Ventilation in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge.

**b** Maximaler NO-Konzentrations-Abfall während einer akuten hypoxischen Ventilation (3% O<sub>2</sub>).

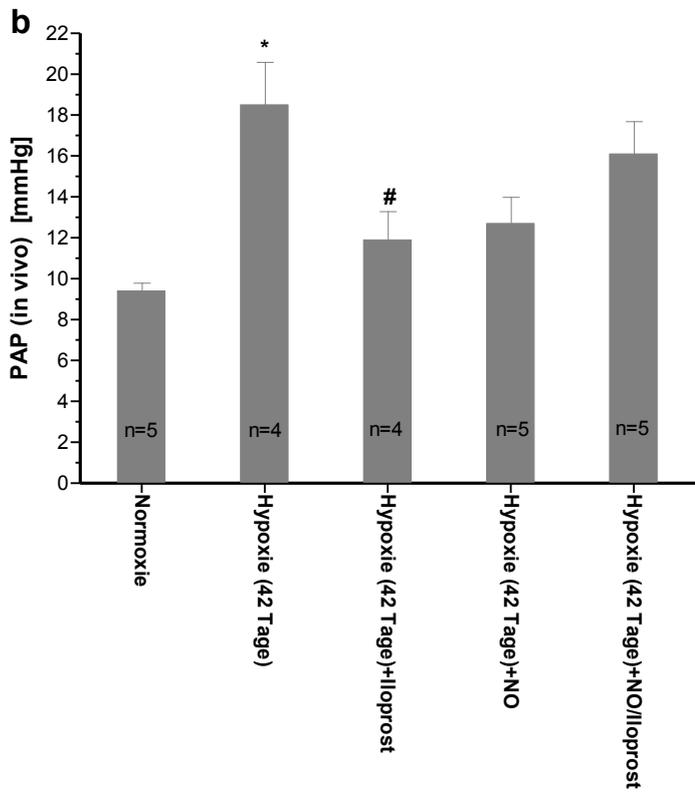
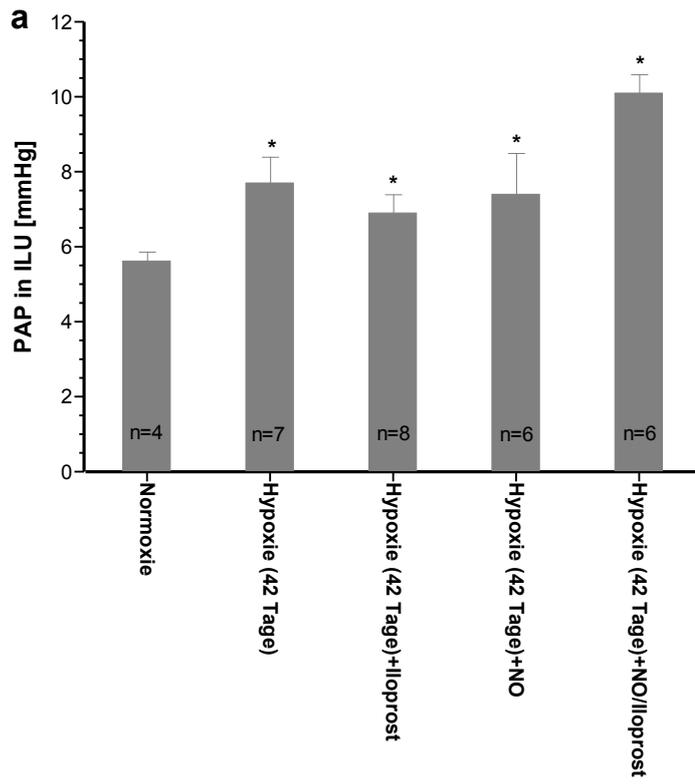
Die chronische normobare hypoxische Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) führte zu einer signifikanten Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>). Zusätzlich haben die Tiere in einer separaten Versuchsreihe über diesen Zeitraum kontinuierlich eine NO-Konzentration von 15ppb inhaliert, sowie kombiniert oder separat intravenöses Iloprost erhalten. Wie in der folgenden Abbildung zu sehen, kam es nur bei der separaten NO-Inhalation zu einer signifikanten Reduktion der Rechtsherzhypertrophie. Die Behandlung der Tiere mit intravenösem Iloprost oder gleichzeitiger Verabreichung beider Agenzien zeigte keine signifikante Prävention vor Rechtsherzhypertrophie (**Abb. 7**).



#### Abb. 7 Rechtsherzhypertrophie

Bestimmt wurde das Verhältnis vom rechten Ventrikel (RV) zum linken Ventrikel inkl. Septum (LV+Septum). Diese Graphik zeigt einerseits die Daten aus Lungen nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) und andererseits die Daten aus Lungen nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) + NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprost-Verabreichung. \* signifikante Unterschiede im Vergleich zu nicht hypoxieexponierten Tieren (Dunnett-Test). # signifikante Unterschiede im Vergleich zur Hypoxiegruppe, welche nur NaCl (Placebo) erhielt (Student-Newman-Keuls-Test). Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

Nach 42 Tagen chronischer Hypoxieexposition zeigte sich im Vergleich zu den normoxisch gehaltenen Tieren in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge eine signifikante Erhöhung des PAP in den einzelnen Behandlungsgruppen. Zwischen diesen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 8a**). Nach 42 Tagen chronischer Hypoxieexposition zeigte sich in der Gruppe die keine Therapie erhielt im Vergleich zu den normoxisch gehaltenen Tieren in vivo eine signifikante Erhöhung des in vivo gemessenen PAP. In den übrigen Behandlungsgruppen zeigte sich keine signifikante Erhöhung dieses Wertes. In vivo war die Behandlung mit intravenösem Iloprost die einzig effektive zur Prävention einer pulmonalen Hypertonie, da nur hier ein signifikanter Unterschied zur Hypoxiegruppe ohne Therapie detektierbar war (**Abb. 8b**).



**Abb. 8 Pulmonalarterieller-Druck (PAP) in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge (ILU) und in vivo.**

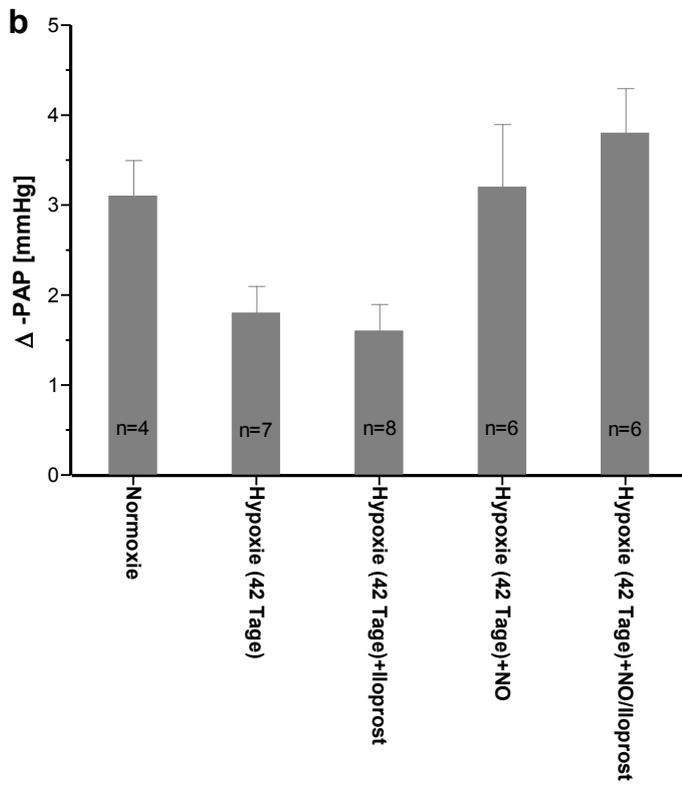
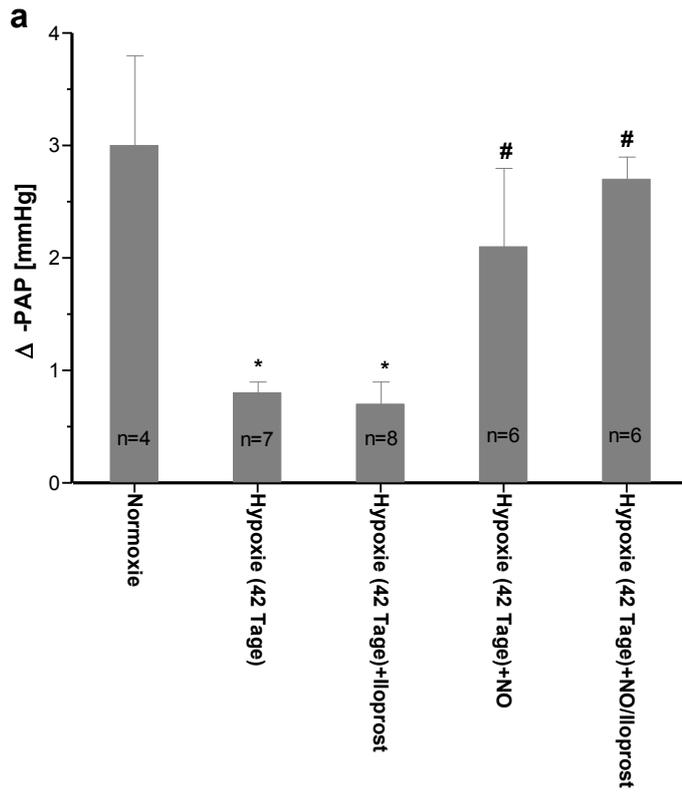
Der PAP wurde einerseits nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) ohne Therapie andererseits nach einer chronischen normobaren Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) mit NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprost-Verabreichung gemessen.

\* signifikante Unterschiede im Vergleich zu nicht hypoxieexponierten Tieren (Dunett-Test). # signifikante Unterschiede im Vergleich zur Hypoxiegruppe, welche nur NaCl (Placebo) erhielt (Student-Newman-Keuls-Test). Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

**a** PAP in der isoliert perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge (ILU).

**b** PAP in narkotisierten, aber spontan atmenden Kaninchen (in vivo).

Eine chronische Hypoxieexposition von 42 Tagen führte zu einer signifikanten Verringerung der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion von  $3,0 \pm 0,8$  auf  $0,8 \pm 0,1$  mmHg. Die signifikante Verringerung der akuten HPV wurde auch in der Behandlungsgruppe mit separater Verabreichung von intravenösem Iloprost gemessen. Die kontinuierliche Inhalation von 15ppb NO oder die Kombination mit intravenösem Iloprost verhinderte die nach 42 Tagen chronischer alveolärer Hypoxie auftretende Verringerung der akuten Vasokonstriktion auf eine akute hypoxische Ventilation (3% O<sub>2</sub>) und war im Vergleich zur Hypoxiegruppe, die keine Therapie erhielt, sogar signifikant verstärkt (**Abb. 9a**). Eine Bolusapplikation durch U-46619 führte nach 42 Tagen chronischer Hypoxieexposition zu keiner signifikanten Reduktion der pulmonalen Vasokonstriktion. Die vasokonstriktorische Antwort blieb unbeeinflusst bzw. führte in den Behandlungsgruppen mit NO zu einem tendentiellen Anstieg der vasokonstriktorischen Antwort (**Abb. 9b**).



**Abb. 9 Stärke der Vasokonstriktion auf eine akute hypoxische Ventilation (a) und auf eine U-46619 Bolusapplikation (b) nach chronischer Hypoxieexposition von 42 Tagen.**

Die Stärke der Vasokonstriktion wurde einerseits nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) ohne Therapie andererseits nach einer chronischen normobaren Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) mit NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprost-Verabreichung gemessen.

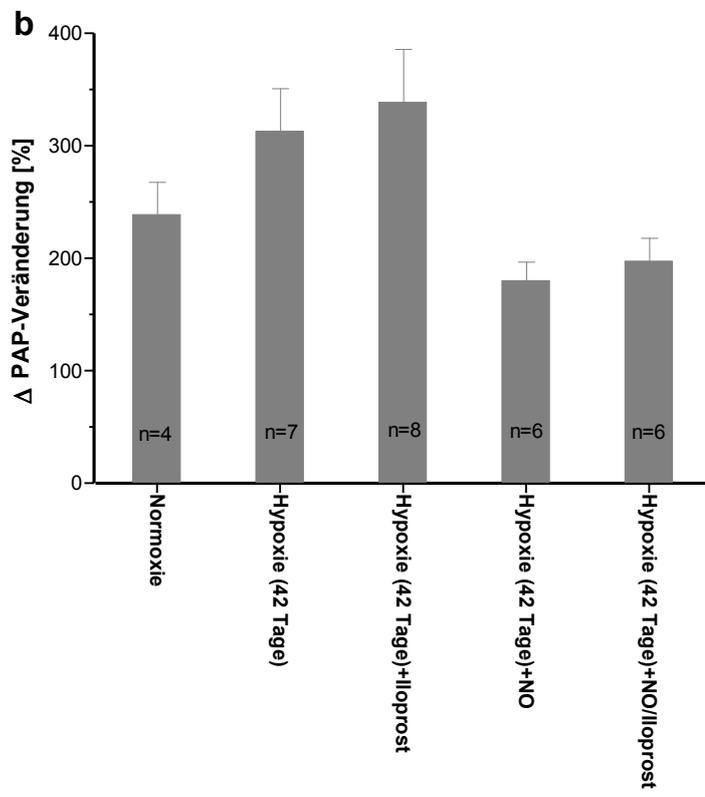
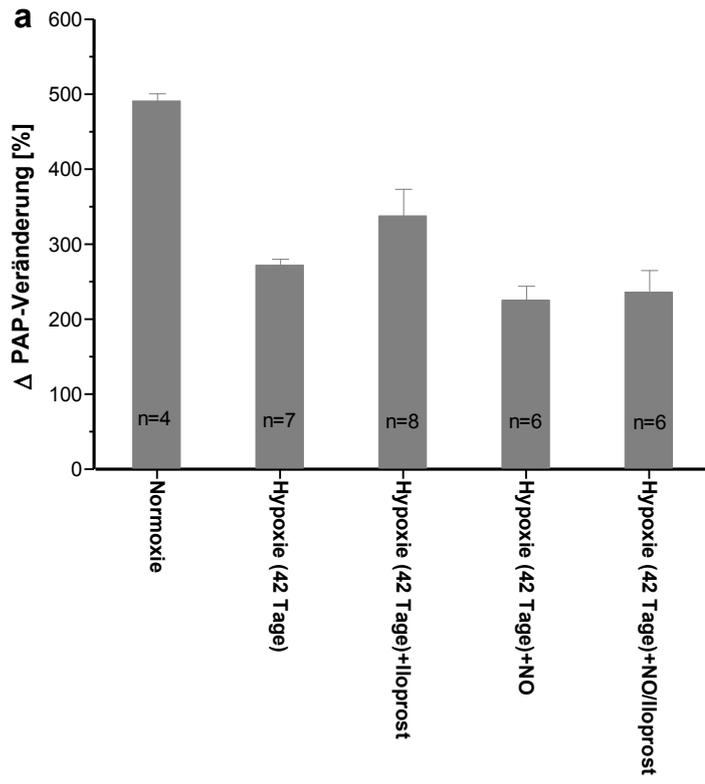
Die Stärke der Vasokonstriktion ist durch den pulmonalarteriellen Druckanstieg ( $\Delta$  PAP) angegeben.

\* signifikante Unterschiede im Vergleich zu nicht hypoxieexponierten Tieren (Dunnett-Test). # signifikante Unterschiede im Vergleich zur Hypoxiegruppe, welche nur NaCl (Placebo) erhielt (Student-Newman-Keuls-Test). Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

**a** Maximale Stärke der Vasokonstriktion ausgelöst durch eine akute hypoxische Ventilation nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>).

**b** Maximale Stärke der Vasokonstriktion ausgelöst durch eine Bolusapplikation mit U-46619.

Die Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge durch den Zusatz von 400 $\mu$ M L-NMMA führte während einer akuten hypoxischen Ventilation zu einer Steigerung des PAP-Anstiegs auf 491% $\pm$ 10% (Wert ohne L-NMMA = 100%). In der Hypoxiegruppe und in den Behandlungsgruppen mit NO-Inhalation und/oder Gabe von intravenösem Iloprost nach chronischer Hypoxieexposition war die PAP-Steigerung nach Hemmung der pulmonalen NO-Synthese tendentiell geringer, aber es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (**Abb. 10a**). L-NMMA führte bei einer Bolusapplikation von U-46619 zu einer geringeren Verstärkung der so induzierten Vasokonstriktion. Die Verstärkung der U-46619 induzierten Vasokonstriktion war signifikant geringer als die Verstärkung der HPV (in Abb. 10a). In der Hypoxie- und in der Behandlungsgruppe mit Iloprost war die Steigerung des U-46619 induzierten PAP-Anstiegs tendentiell größer. Unter den Gruppen bestand aber kein signifikanter Unterschied (**Abb. 10b**).



**Abb. 10 Verstärkung der Vasokonstriktion durch Hemmung der NO-Synthese.**

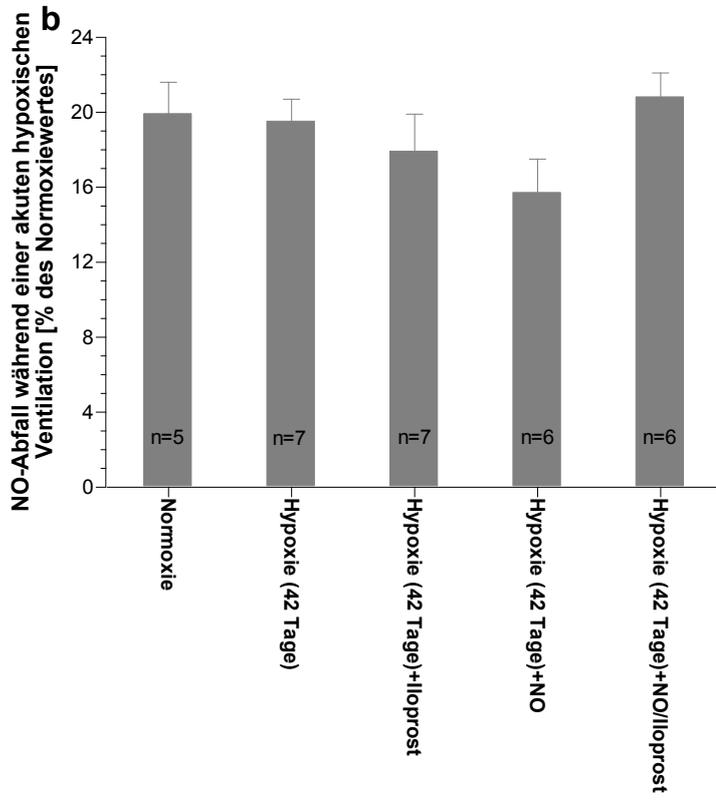
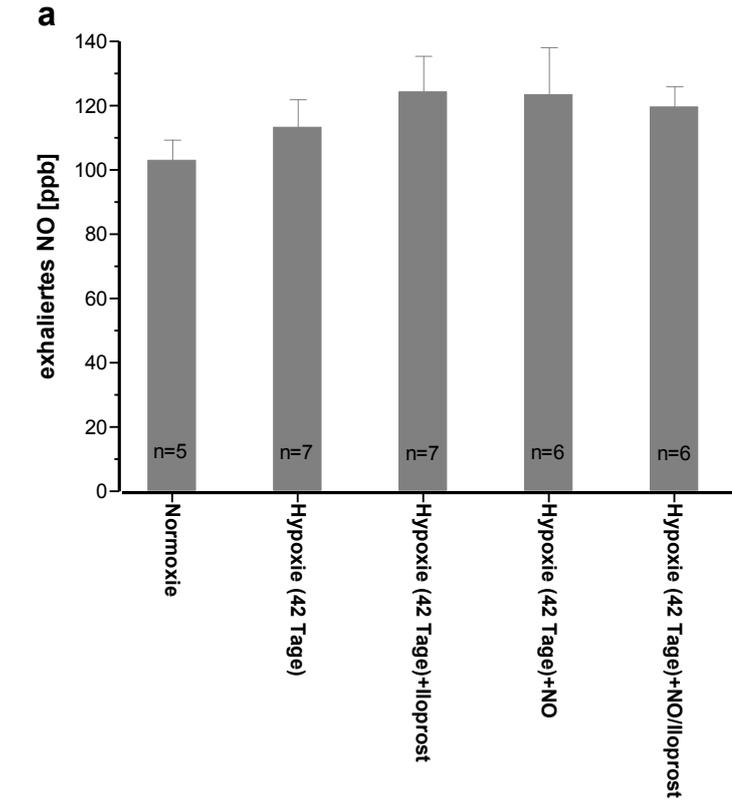
Die Verstärkung der Vasokonstriktion ist bezogen auf den jeweiligen Wert vor der Hemmung der NO-Synthese in der Lunge (=100%) in Prozent angegeben (siehe Methoden).

Die Stärke der Vasokonstriktion wurde einerseits nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) ohne Therapie andererseits nach einer chronischen normobaren Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) mit NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprost-Verabreichung gemessen. Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

**a** Verstärkung der Vasokonstriktion während der akuten hypoxischen Ventilation durch Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge durch den Zusatz von 400µM N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (400µM L-NMMA).

**b** Verstärkung der U-46619 induzierten Vasokonstriktion durch Hemmung der NO-Synthese in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge.

Das exhalierete NO wies nach chronischer Hypoxieexposition in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge keine signifikanten Unterschiede zwischen der normoxischen Kontroll-Gruppe, der Hypoxie-Gruppe und den Behandlungsgruppen auf (**Abb. 11a**). Eine akute hypoxische Ventilation bewirkte einen Abfall der NO-Exhalation. Dieser Abfall war in der Hypoxiegruppe sowie in den übrigen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (**Abb. 11b**).



**Abb. 11 NO-Exhalation während einer normoxischen Beatmung und NO-Konzentrations-Abfall während einer akuten hypoxischen Ventilation.**

Die NO-Exhalation wurde einerseits nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) ohne Therapie, andererseits nach einer chronischen normobaren Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) mit NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprost-Verabreichung gemessen.

Als Kontrolle dienten normoxisch gehaltene Tiere (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>).

**a** Exhalierete NO-Konzentration während einer normoxischen Ventilation in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge.

**b** Maximaler NO-Konzentrations-Abfall während einer akuten hypoxischen Ventilation (3% O<sub>2</sub>).

## 6 Diskussion

Frühere Studien an Ratten haben widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Stärke der HPV während einer akuten hypoxischen Ventilation nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung erbracht. Einige Untersuchungen zeigten eine Reduktion (7, 43, 75, 76, 91, 127), andere eine Erhöhung oder ein Persistieren der Stärke der HPV (7, 22, 127). Interessanterweise wurde eine Erhöhung oder ein Persistieren nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung lediglich in Wistar-Ratten festgestellt. In Sprague-Dawley-Ratten hingegen wurde eine Herunterregulation der HPV-Stärke gemessen. Die Unterschiede in verschiedenen Rattenstämmen stimmen auch mit den Ergebnisse von Ou und Kollegen überein (84, 85). Karamsetty und Kollegen (62) zeigten in ihren Studien eine Verringerung der Stärke der HPV, wenn die Lungen mit 0% O<sub>2</sub> beatmet wurden und ein Persistieren, wenn die Lungen mit 2% O<sub>2</sub> ventiliert wurden. Zhao und Kollegen (127) kamen zu dem Ergebniss, dass die HPV nach 15 Stunden und 2 Tagen chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung herunterreguliert wurde, aber nach 7 Tagen wiederum unverändert war. Ebenso bestehen widersprüchliche Ergebnisse betreffend der pulmonalen Vasoreaktion im Hinblick auf die hypoxieunabhängige Vasokonstriktion (22, 43, 61, 72-76, 92, 116) nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung.

Um diese Ergebnisse zu hinterfragen, wurden in dieser Dissertation Kaninchen untersucht, eine Spezies, welche in Bezug auf die Gefäßreaktion nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung noch nicht untersucht wurde. Die Untersuchung der Stärke der HPV in isoliert perfundierter und ventilerter Lunge (ILU) ermöglichte Untersuchungen der pulmonalen Gefäßreaktion ohne Interferenzen mit dem restlichen Körper (121). Darüber hinaus ermöglichte dieses Modell die NO-Freisetzung der Lunge zu erfassen (40, 112).

Im ersten Teil dieser Dissertation wurden die Effekte der chronischen Hypoxie auf die Vasokonstriktion von Kaninchenlungen während einer akuten hypoxischen Ventilation und einer U-46619 induzierten Vasokonstriktion nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) untersucht. U-46619 ist ein Thromboxan-Mimetikum, welches unter anderem in Thrombozyten gebildet wird und zum einen deren Aggregation bewirkt und zum anderen zu einer Vasokonstriktion führt.

Im zweiten Teil wurden die Effekte der pulmonalen Hämodynamik nach einer Therapie mit inhaliertem NO (15ppb) und intravenösem Iloprost nach chronischer Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) untersucht.

Zunächst wurde der PAP in der ILU während einer akuten hypoxischen Ventilation sowie während der Bolusapplikation des Thromboxanmimetikums U-46619, nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) gemessen. Die chronische normobare hypoxische Tierhaltung bewirkte eine pulmonale Hypertonie, welche sich in einem Anstieg des PAP und in einer Rechtsherzhypertrophie zeigte. Sehr interessant war die Beobachtung, dass bereits nach 5 Tagen chronische hypoxischer Tierhaltung die Vasokonstriktion auf eine akute hypoxische Ventilation herunterreguliert war und sich im Verlauf bis zu 42 Tagen hypoxischer Tierhaltung nicht mehr veränderte. Diese Verringerung der Stärke der HPV war für die akute hypoxische Ventilation spezifisch, da eine signifikante Veränderung der Vasokonstriktion durch U-46619-Applikation nicht festgestellt werden konnte. Die unveränderte pharmakologisch induzierte Vasokonstriktion nach chronischer Hypoxieexposition stimmt auch mit den Studien von Eddahibi und Kollegen (20) in isolierten Rattenlungen überein. Diese Arbeit beschreibt die Erhaltung der nicht-hypoxieinduzierten Vasokonstriktion nach 28 Tagen chronischer Hypoxieexposition in Ratten. Hampl und Kollegen (43) stellten dagegen ein Ansteigen der Vasokonstriktion auf eine U-46619-Bolusapplikation unter analogen Bedingungen fest.

Im Hinblick auf die Verringerung der Stärke der akuten hypoxischen Vasokonstriktion nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung ist

diese möglicherweise als Schutzmechanismus gegen eine Rechtsherzinsuffizienz zu interpretieren.

Da NO der einzige bisher bekannte Vasodilatator ist, welcher spezifisch die HPV supprimiert (40, 61, 125), wurden Veränderungen der pulmonalen NO-Freisetzung, nach chronischer hypoxischer Tierhaltung, untersucht. Durch die Applikation von 400  $\mu$ M L-NMMA, einem Inhibitor aller Isoformen der NO-Synthase und somit ein Hemmer der endogenen NO-Produktion (40, 112), konnte zunächst ein geringer Anstieg des PAP in der Kontrollgruppe sowie in den chronischen Hypoxiegruppen festgestellt werden. Dieser Anstieg steht im Gegensatz zu Untersuchungen an isolierten Rattenlungen (3) und isolierten Rattenarterien (73), in denen nach L-NMMA-Applikation ein stärkerer Anstieg des PAP zu verzeichnen war. Übereinstimmung findet sich jedoch mit den Ergebnissen von Zhao und Kollegen (127), die ebenfalls nur einen moderaten Anstieg des PAP feststellten. Liu und Kollegen (69) verzeichneten einen starken PAP-Anstieg sowie ein massives Ödem bei der Blockade der NO-Synthese, welches durch die Hemmung der Cyclooxygenase verhindert werden konnte. Ursache für diesen starken PAP-Anstieg und dieses Lungenödems könnte die Verwendung eines mit Blut perfundierten Lungenmodells, die Gabe eines anderen als den hier verwendeten NO-Synthese-Inhibitor oder speziebedingt gewesen sein. In dieser Dissertation war, nach Blockierung der NO-Synthese, die akute hypoxische Vasokonstriktion signifikant stärker als die U-46619 induzierte Vasokonstriktion (40). Dieses konnte in den Gruppen bis zu 6 Tage chronischer Hypoxie festgestellt werden, war aber nach 42 Tagen chronischer Hypoxie nicht mehr zu erkennen. Der Verlust dieses L-NMMA-Effektes stand nicht im Zusammenhang mit der NO-Exhalation, da sich über die gesamte Dauer der chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung keine Veränderungen in der exhalierten NO-Quantität ergaben. Der Abfall der exhalierten NO-Konzentration während einer akuten hypoxischen Ventilation war unabhängig von der Dauer der chronische hypoxischen Tierhaltung. Dieser Abfall des exhalierten NO verlief parallel mit dem Anstieg des PAP und war komplett reversibel. Nach Beendigung der akuten

hypoxischen Ventilation stieg die exhalierte NO-Konzentration wieder auf die Ausgangswerte (40).

Die unveränderte NO-Exhalation der Kaninchen-Lungen nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung unterschied sich von Untersuchungen an Ratten (57, 80, 99), in welchen sich ein Ansteigen der NO-Freisetzung oder ein Ansteigen der NO-Synthese feststellen ließ (25, 67). Diese Unterschiede können speziesbedingt sein. In neugeborenen Schweinen wurde ein Abfall der NO-Synthese während einer chronischen, Hypoxieexposition festgestellt (26).

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden die Effekte der pulmonalen Hämodynamik nach einer Therapie mit inhaliertem NO (15 ppb) und intravenösem Iloprost nach chronischer Hypoxieexposition untersucht.

Die Bedeutung von NO wurde 1980 mit der Entdeckung, dass die Acetylcholin-induzierte arterielle Relaxation Endothelzell-abhängig verläuft (29) und der Identifikation von NO als endotheliales Vasodilatator, dem Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF), durch Palmer und Ignarro 1987 (56, 86), erkannt. Anschließend kam es zu einer Vielzahl von klinischen Untersuchungen, auch auf dem Gebiet der pulmonalen Hypertonie (89).

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch das Enzym NOS (NO-Synthetase) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff gebildet.

Die Aktivität der NO-Synthetase kann durch Hypoxie gehemmt sein, da der molekulare Sauerstoff ein Substrat für das Enzym ist. Somit mag die verminderte NO-Produktion während einer Hypoxie zur pulmonalen vasokonstriktorischen Antwort beitragen (60).

In Mäusen führt ein Mangel an NOS zu einem hypoxischen pulmonalen Gefäßumbau mit Steigerung der pulmonalen Hypertonie und der Hypertrophie des rechten Ventrikels (114).

Es sind drei NOS-Isoformen bekannt:

- neuronale NOS (nNOS)
- induzierbare NOS (iNOS)
- endotheliale NOS (eNOS)

nNOS ist wesentlich in Neuronen lokalisiert. Im Gehirn übernimmt NO die Funktion eines Botenstoffes (second messengers), wo es unter anderem die Synthese von cGMP erhöht.

iNOS kommt unter anderem in Makrophagen vor, wo es unter inflammatorischen Bedingungen stark exprimiert wird. Dort übernimmt es die Wirkung eines Schutzmechanismus, indem es zum Abtöten von Bakterien und anderen Zellen beiträgt. Eine übermäßige Produktion von NO kann aber auch zu einer gefährlichen Absenkung des Blutdrucks führen, wie er bei einem septischen Schock auftreten kann.

eNOS wird insbesondere in den Endothelzellen exprimiert. NO bewirkt indirekt, durch eine Erhöhung des cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat)-Spiegels, eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit eine Vasodilatation mit nachfolgender Blutdrucksenkung (9). Somit ist NO u.a. ein Regulator des systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstands (15, 113).

Inhalierendes NO induziert auch bei pulmonaler Hypertonie eine pulmonale Vasodilatation. Dabei senkt es den pulmonalen und systemischen Gefäßwiderstand, verbessert die Oxygenierung und wirkt sich positiv auf die Effizienz des rechten Ventrikels aus (15, 28, 47, 58, 93, 96, 113, 130). Ebenso werden intravenöse oder inhalative Prostanoiden zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt (46). In dieser Dissertation wurde intravenöses Iloprost verwendet. Iloprost ist ein synthetisches Analogon des natürlichen Prostacyklins mit ähnlichen biologischen Eigenschaften, welches in intravenöser oder inhalativer Form bei pulmonaler Hypertonie gegeben

werden kann (46, 87, 97). Prostazyklin aktiviert intrazellulär die Adenylatzyklase und führt über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Abnahme des intrazellulären, freien  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. zu einer Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausches, was eine Relaxation der glatten Muskulatur zur Folge hat (81, 120). Prostazyklin und seine Analoga bewirken eine selektive pulmonale Vasodilatation, reduzieren den pulmonalen Gefäßwiderstand sowie den pulmonalen arteriellen Druck (81, 83), steigern die Auswurfraction des Herzens und verbessern die venöse und arterielle Oxygenierung bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (81, 97). Das vasodilatative und antiaggregatorische Prostazyklin wurde 1976 entdeckt und erstmals 1980 bei pulmonaler Hypertonie eingesetzt.

Prostazyklin wird mit Hilfe der Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure gebildet. Die Cyclooxygenase ist ein intrazelluläres Enzym der Prostaglandinsynthese. Sie hat eine zentrale Stellung in der Regulation des Entzündungsgeschehens. Ebenso spielt sie bei der Blutgerinnung, der Nierenfunktion, als auch bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle. Cyclooxygenasen finden sich unter anderem in Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Ihre Wirkung besteht in der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin  $\text{G}_2$  und  $\text{H}_2$ , welche weiter zu Thromboxanen ( $\text{TXA}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ ) und weiteren Prostaglandinen ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ) umgebaut werden können.  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$  wirken gefäßerweiternd, Thromboxan gefäßverengend.

In dieser Dissertation wurden nach separater und kombinierter Applikation von NO und Iloprost die Rechtsherzhypertrophie, die pulmonale Hämodynamik sowie die NO-Exhalation untersucht. Die chronische normobare hypoxische Tierhaltung (42 Tage, 10%  $\text{O}_2$ ) führte zu einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie mit einem signifikanten Anstieg des PAP und einer signifikanten Rechtsherzhypertrophie. Diese Effekte waren mit denen anderer Spezies wie Maus und Ratte vergleichbar (100, 128).

Durch die kontinuierliche NO-Inhalation (15ppb) konnte nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung, wie aus den Daten der

PAP-Messung in vivo und der Rechtsherzhypertrophie ersichtlich war, eine Reduktion der pulmonalen Hypertonie festgestellt werden. Dieses stimmt auch mit Studien an Ratten überein (50). Interessanterweise konnte die separate oder die kombinierte NO-Inhalation mit Iloprost den Verlust der HPV-Stärke auf eine akute hypoxische Ventilation antagonisieren, was sich in einem Anstieg der Stärke der HPV ausdrückte. Dabei kam es weder zu Veränderungen des exhalierten NO in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge zwischen normoxisch gehaltenen Tieren (42 Tage, 21% O<sub>2</sub>), Tieren nach chronischer Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>), noch bei Kaninchen nach chronischer Hypoxieexposition (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) mit kontinuierlicher NO-Inhalation (15ppb) und/oder intravenöser Iloprostapplikation. Ebenso hatten die NO-Inhalation und die Iloprostapplikation während einer akuten hypoxischen Ventilation in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge keinen Einfluss auf die Reduktion des exhalierten NO. Durch die permanente NO-Inhalation kam es nach chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung zu einer Verringerung der Rechtsherzhypertrophie (50, 63). Zudem war die fehlende signifikante Reduktion des PAP in der ILU nach permanenter NO-Inhalation übereinstimmend mit den Ergebnissen in Ratten von Frank und Kollegen (27).

Ein Synergieeffekt aus permanenter NO-Inhalation und intravenöser Verabreichung von Iloprost nach chronischer Hypoxieexposition konnte in Bezug auf die Rechtsherzhypertrophie und der pulmonalen Hypertonie nicht festgestellt werden. Die Entwicklung der Rechtsherzhypertrophie ging mit dem des PAP-Anstiegs parallel. Dieses stimmt auch mit Studien überein, welche eine Korrelation zwischen PAP-Anstieg und Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie demonstrieren (1, 24).

Dennoch bewirkte die Kombination aus NO und Iloprost einen Anstieg der Stärke der HPV auf eine akute hypoxische Ventilation im Vergleich zur Therapie mit separater Verabreichung von NO und intravenösem Iloprost. Die Steigerung der Stärke der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nach separater oder kombinierter NO-Inhalation könnte hinsichtlich der

Ventilations- und Perfusionsverteilung ein Vorteil sein, indem es in Hypoxiearealen der Lunge zu einer verbesserten Vasokonstriktion der betroffenen Lungengefäße beiträgt. Dadurch wird nicht nur die Perfusion in den hypoxischen Lungenarealen minimiert, sondern der Blutfluss in besser ventilerten Abschnitten umgeleitet, was eine höhere Sauerstoffanreicherung des Blutes mit sich führt (von Euler-Liljestrand-Mechanismus).

Die separate Therapie mit intravenösem Iloprost nach chronischer Hypoxieexposition führte zu keinem Anstieg der Stärke der HPV und auch zu keiner signifikanten Reduktion der Rechtsherzhypertrophie. Allerdings war eine signifikante Verringerung des PAP in vivo zu messen. In der ILU wurde dagegen nur eine geringe Verringerung des PAP nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei der Messung des PAP im narkotisierten Tier mit möglichen Unterschieden der Auswurfraction des Herzens gerechnet werden musste. Neurale und humorale Effekte konnten bei der ILU ausgeschlossen werden. Weitere Faktoren, die für eine unterschiedliche PAP-Messung in vivo und in der ILU verantwortlich sein könnten, sind möglicherweise eine geringere Flussrate der Perfusation in der ILU, sowie Mediatoren die in vivo eine Rolle spielen und in der ILU fehlen.

Iloprost verbessert die Belastbarkeit im Gehstreckentest über sechs Minuten bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie und führt zu einer Verbesserung der Symptomatik einer PH (42, 45, 48, 82, 87).

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Verringerung der Stärke der HPV nach wenigen Tagen chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung spezifisch für die HPV ist, da die Vasokonstriktion auf U-46619 erhalten blieb. Man kann die Möglichkeit nicht ausschließen, dass Veränderungen in der NO-Kaskade oder einer Interaktion der Cyclooxygenase- und der NO-Synthese-Produkte für die beobachteten Effekte verantwortlich sind (88). Die NO- und die Cyclooxygenase-Produkte tragen in unterschiedlichem Ausmaß in verschiedenen Tieren zum niedrigen physiologischen PAP bei (69).

Die unterschiedliche Stärke der HPV nach chronischer Hypoxie in verschiedenen Tieren kann u.a. mit dem Vorhandensein von Vasodilatoren

und Vasokonstriktoren sowie dem Arachidonsäuremetabolismus zusammenhängen (129), indem bei Überwiegen der Vasokonstriktoren der PAP steigt und bei Überwiegen der Vasodilatoren fällt.

Zur kombinierten Applikation verschiedener Vasodilatoren gab es bisher keine Untersuchungen zur Hämodynamik nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung. Man hätte erwarten können, dass eine Kombination aus Stimulation der cGMP durch inhaliertes NO und Stimulation der cAMP durch intravenöses Iloprost einen additiven schützenden Effekt auf die Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie und der Rechtsherzhypertrophie und somit der Rechtsherzinsuffizienz, nach einer chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung, hervorruft. Dieses konnte jedoch in dieser Dissertation nicht festgestellt werden. Diese Arbeit zeigt, dass kombinierte Therapien mit unterschiedlichen Vasodilatoren nachteilige Effekte haben können, welche bisher nicht erwartet wurden.

Trotzdem werden in Zukunft zur Therapie der pulmonalen Hypertonie kombinierte Therapieverfahren eingesetzt werden müssen, da die Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie mehrere endogene Mediatoren beeinflusst (8) und Monotherapien wie zum Beispiel mit Prostanoiden, NO, Endothelinrezeptorantagonisten oder Phosphodiesterasehemmern keine kurative, sondern nur eine palliative Wirkung haben (6, 14, 69, 77, 98). Bei den neueren Therapieoptionen zur Behandlung der PAH sind Kombinationen aus Prostaglandinen, Endothelinrezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterasehemmer zu nennen (33-35, 49, 51, 53, 101-105, 126), welche eine deutlich verbesserte Symptomatik für den Patienten mit PAH darstellen.

Eine weitere Schlussfolgerung dieser Dissertation ist, dass die charakteristischen Parameter einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie, wie Rechtsherzhypertrophie, PAP und HPV unter chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung unterschiedlich beeinflusst werden können und nicht notwendigerweise streng von einander abhängig sind.

## 7 Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) erlaubt der Lunge die Perfusion der lokalen Ventilation anzupassen. Dies geschieht durch gezielte Vasokonstriktion der entsprechenden Lungengefäße in Arealen alveolärer Hypoxie. Dieses Prinzip ist auch als von Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannt. Bei Persistieren einer chronischen, generalisierten Hypoxie kommt es zu einem sog. „Remodelling“, bei der es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der Media der Pulmonalgefäße kommt. Dieser Zustand bedingt einen erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand, zu dem auch eine Daueraktivierung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion beitragen kann. Im Gefolge kommt es zu einer Rechtsherzhypertrophie.

Frühere Studien haben widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf den Effekt von chronischer alveolärer Hypoxie auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion gezeigt. Einige Studien zeigten eine Hemmung, andere ein Persistieren oder eine Verstärkung der Stärke der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nach chronischer alveolärer Hypoxie. Ziel dieser Dissertation war es zugrunde liegende Mechanismen sowie die Effekte von NO und Iloprost auf akute und chronische Effekte einer chronischen Hypoxieexposition am Kaninchen zu untersuchen. Darüber hinaus sollten Synergieeffekte einer Kombinationstherapie zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie untersucht werden. Die Vasokonstriktion auf eine akute hypoxische Ventilation wurde innerhalb von 5 Tagen chronischer normobarer Hypoxie (1-42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) herunterreguliert und änderte sich nicht mehr im Verlauf der chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung wohingegen die Vasokonstriktion auf das Thromboxanmimetikum U-46619 erhalten blieb. Die Herunterregulation der Stärke der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion war unabhängig vom pulmonalen NO-System, gemessen am exhalieren NO, sowie dem Effekt von N<sub>G</sub>-Monomethyl-L-Arginin. Die chronische normobare hypoxische Tierhaltung führte zu einer Rechtsherzhypertrophie sowie zu einer Steigerung des pulmonalarteriellen Drucks in vivo. Die Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie mit

kontinuierlicher NO-Inhalation (15ppb) während der chronischen normobaren hypoxischen Tierhaltung (42 Tage, 10% O<sub>2</sub>) führte zu einer Reduktion der Rechtsherzhypertrophie sowie zu einer Erhaltung der Vasokonstriktionsstärke auf eine akute hypoxische Ventilation, aber zu keiner pulmonalarteriellen Drucksenkung. Diese Veränderungen waren unabhängig von der endogenen NO-Synthese der Lunge.

Es konnte gezeigt werden, dass eine präventive Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie mit dem Prostazyklin-Derivat Iloprost vor einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie schützt, die Rechtsherzhypertrophie bei der hypoxieinduzierten pulmonalarteriellen Hypertonie jedoch nicht reduzierte. In Bezug auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion konnte die Verringerung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktionsstärke durch die separate NO-Inhalation oder die kombinierte Therapie mit intravenösem Iloprost wiederhergestellt werden, nicht aber durch die separate Gabe von Iloprost. Dieses konnte nicht auf Veränderungen des NO-Systems zurückgeführt werden.

Es ergaben sich keine Synergieeffekte bei einer Kombinationstherapie mit Iloprost und NO. Die vorliegende Arbeit zeigte zu dem, dass kombinierte Therapien in Bezug auf die pulmonalarterielle Hypertonie mit unterschiedlichen Vasodilatoren eventuell auch nachteilige Effekte haben können und dass die charakteristischen Parameter einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie, wie Rechtsherzhypertrophie, pulmonalarterieller Druck und hypoxische pulmonale Vasokonstriktion unter chronischer normobarer hypoxischer Tierhaltung nicht notwendigerweise funktionell gekoppelt sind.

## 8 Summary

The mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) enables the lung to adapt perfusion to local ventilation. Within hypoxic areas of the lung, precapillary vessels constrict and thus blood flow is directed into better ventilated, normoxic areas to ensure optimum oxygenation of the blood. This principle is also known as the von Euler-Liljestrand mechanism. Under conditions of chronic, generalised hypoxia, however, in addition to HPV a vascular remodelling process can occur, characterized by hypertrophy and hyperplasia of the media of the pulmonary arterial vessels. This condition causes an increased pulmonary vascular resistance with possible contribution of a permanent activation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. As a consequence, right ventricular hypertrophy (Cor pulmonale) occurs. Previous studies have indicated contradictory results concerning the effect of chronic alveolar hypoxia on hypoxic pulmonary vasoconstriction. Several studies showed an inhibition, others a persistence or an intensification of hypoxic pulmonary vasoconstriction after chronic alveolar hypoxia. The aim of this dissertation was to investigate the effects of chronic hypoxia on hypoxic pulmonary vasoconstriction in a rabbit model, as well as the effects of NO and Iloprost on acute and chronic effects of hypoxic exposition. Furthermore, possible synergetic effects of a combination therapy for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension were examined. The vasoconstrictive response to an acute hypoxic ventilation was reduced within five days of normobaric hypoxia (1-42 days, 10% O<sub>2</sub>) and did not change in the course of chronic normobaric hypoxic animal exposure (10% O<sub>2</sub>), whereas the vasoconstrictive response to the thromboxane mimetic U-46619 was preserved. The downregulation of the hypoxic pulmonary vasoconstriction was independent of the pulmonary NO system as measured by the amount of exhaled NO as well as the effects of a pharmacological blockage of NO synthesis by N<sub>G</sub>-Monomethyl-L-Arginin. Chronic normobaric hypoxic animal exposure (42 days, 10% O<sub>2</sub>) caused right ventricular hypertrophy, as well as an increase of the pulmonary arterial pressure in

vivo. Therapy with a constant inhalation of NO (15ppb) in the course of a chronic normobaric hypoxic animal exposure (42 days, 10% O<sub>2</sub>) led to a reduction of right ventricular hypertrophy while maintaining vasoreactivity to acute hypoxic ventilation, but did not lead to a decrease of pulmonary arterial pressure. These alterations were independent of the endogenous pulmonary NO system.

It could be proved that a therapy of pulmonary arterial hypertension with the prostacycline derivative Iloprost prevented hypoxia-induced pulmonary hypertension whereas it could not reduce right ventricular hypertrophy. Concerning hypoxic pulmonary vasoconstriction, a reduction of the intensity of hypoxic pulmonary vasoconstriction could be restored by inhalation of NO alone or a combined therapy with intravenous Iloprost but not by sole application of Iloprost. This fact could not be attributed to the NO metabolism. No synergetic effects of a combination therapy of Iloprost and NO were observed. Furthermore, the current study indicates that combination therapies of pulmonary arterial hypertension with different vasodilators can also have unfavourable effects at least in rabbits and that the characteristic parameters of hypoxia induced pulmonary hypertension like right ventricular hypertrophy, pulmonary arterial hypertension, and hypoxic pulmonary vasoconstriction are not necessarily fully linked.

## 9 Anhang

### 9.1 Chemische Substanzen und Bezugsquellen

Baytril 10%	Braun Medical, Melsungen
Braunoderm	Braun Medical, Melsungen
hypoxisches Gasgemisch	Messer, Sulzbach
Iloprost	Bayer Schering Pharma AG, Berlin
isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun Medical, Melsungen
Ketavet, Ketaminhydrochlorid	Pharmacia GmbH, Erlangen
Heparin-Natrium-25000	Merckle GmbH, Blaubeuren
L-NMMA	Calbiochem, Bad Soden
Natriumhydrogencarbonat 8.4%	Braun Medical, Melsungen
NO	Messer, Sulzbach
normoxisches Gasgemisch	Messer, Sulzbach
Perfusat	Serag-Wiessner KG, Naila
Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
U-46619	Sigma, Deisenhofen
Xylocain 2% Lidocainhydrochlorid	ASTRA Chemicals GmbH, Wedel/Holstein

## 9.2 Hestellernachweis von verwendeten Geräten

ABL 330, Blutgasanalysegerät	Radiometer, Copenhagen
Analog/Digital-Wandlerkarte	PCL-818Hb, Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen
Autoregulationskontroll-Einheit	O <sub>2</sub> Kontroller 4010, Labotect, Göttingen
Cat/Rabbit Ventilator 6025	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Dräger Multiwarn	Drägerwerk AG, Lübeck
Präzisionswaage-Mettler AJ 100	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Frigomix U	Braun Medical, Melsungen
Käfigsystem	Merk, Wiesbaden
Messverstärker	Bridge Amplifier Module Type 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PC	Labtec Notebook/LE, Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden- Echterdingen
Plastik-Käfig-Einsatz	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Pumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Schlauch-Peristaltikpumpe	Cole Parmer Masterflex, Barrington, USA
Sievers Nitric Oxide Analyzer	Sievers, Colorado, USA
Spezialfilter	Pall Biochemical Inc., Fajardo, USA
Spülmaschine	Miele-Labor G 7783, Gütersloh

Thermofrix BM	Braun Medical, Melsungen
Trinkflasche	0,5 l, Tecniplast, Buguggiate, Italien
Thermo Lux Wärmeschrank	Memmert GmbH&Co, Schwalbach
Wasserbad	Wasserbad 7P mit Thermoelement Thermomix B beides Braun Medical, Melsungen
Wägezelle U16	Hottinger                      Baldwin Messtechnik                      GmbH, Darmstadt
Zentrifuge	TPC, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

### 9.3 Materialien und Bezugsquellen

Braun Injekt, Einmalspritze (2-20ml)	Braun Medical, Melsungen
Butterfly Micro-flo	LDKS Oversan, Mailand, Italien
Disofix, Dreiwegehahn	Braun Medical, Melsungen
Druckwandler	Combitrans Monitoring-Set, Braun Medical, Melsungen
Glasspritze	Dickinson & Co, B-D Yale, Becton, USA
Microlance, Kanüle steril	Becton Dickinson GmbH, Spanien
Multiday Infusor 0.5ml/h	Baxter, Deutschland GmbH
Nahtmaterial-Mersilene	Ethicon, Norderstedt
Trachealabsauger	Dahlhausen GmbH, Köln
Zentralvenen-Katheter	Hickman Katheter, Baxter Deutschland GmbH

## 10 Literaturverzeichnis

1. **Adachi S, Ito H, Ohta Y, Tanaka M, Ishiyama S, Nagata M, Toyozaki T, Hirata Y, Marumo F, Hiroe M.** Distribution of mRNAs for natriuretic peptides in RV hypertrophy after pulmonary arterial banding. *Am J Physiol* 1995; 268: H162-H169.
2. **Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S.** Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 833-7.
3. **Barer G, Emery C, Stewart A, Bee D and Howard P.** Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats. *J Physiol* 1993; 463: 1-16.
4. **Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, Mc Goon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, et al.** A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1477-8.
5. **Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin V, McFarlin J.** Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Chest*. 2002; 121: 1860-8.
6. **Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence EC, Shapiro S, Naeije R, Galie N, STRIDE-2 Study Group.** Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: 536-7.
7. **Bee D, Wach RA.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Respir Physiol* 1984; 56: 91-103.
8. **Benza RL, Park MH, Keogh A, Girgis RE.** Management of pulmonary arterial hypertension with a focus on combination therapies. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 437-46.
9. **Blitzer ML, Loh E, Roddy MA, Stamler JS, Creager MA.** Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 591-6.
10. **British Cardiac Society Guidelines and Medical Practice Committee.** Recommendations on the management of pulmonary hypertension in clinical practice. *Heart* 2001; 86 Suppl 1: I1-13.
11. **Butt AY, Dinh Xuan AT, Takao M, Cremona G, Higenbottam TW.** Treatment of pulmonary hypertension with prostacyclin analogue iloprost. *J Am Coll Spec Issue* 1994; 375A.
12. **Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM et al.** An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.

13. **Clini E, Cremona G, Campana M, Scotti C, Pagani M, Bianchi L, Giordano A and Ambrosino N.** Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-Doppler assessment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 446-450.
14. **Cozzi F, Montisci R, Marotta H, Bobbo F, Durigon N, Ruscazio M, Sfriso P, Iliceto S, Todesco S.** Bosentan therapy of pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Eur J Clin Invest* 2006; 36 Suppl 3: 49-53.
15. **Cremona G, Higenbottam T, Takao M, Hall L, Bower EA.** Exhaled nitric oxide in isolated pig lungs. *J Appl Physiol* 1995; 78: 59-63.
16. **Cutaia M, Rounds S.** Hypoxic pulmonary constriction. *Chest* 1997; 706-718.
17. **D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115: 343-9.
18. **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. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 4-716.
19. **Domino KB, Chen L, Alexander CM, Williams JJ, Marshall C, Marshall BE.** Time course and responses of sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Anaesthesiology* 1984; 60: 562-566.
20. **Eddahibi S, Adnot S, Carville C, Blouquit Y, Raffestin B.** L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 1992; 263: L194-L200.
21. **Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S.** Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2002; 20: 1559-72.
22. **Emery CJ, Bee D and Barer GR.** Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clin Sci* 1981; 61: 569-580.
23. **Emery CJ.** Vascular remodelling in the lung. *Eur Respir J* 1994; 7: 217-219.
24. **Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Bezstarosti K, Dekkers DH, Duncker DJ, Helbing WA, Lamers JM.** Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. *Proteomics* 2005; 5: 2519-2530.
25. **Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG, Hoedt-Miller M, Vidmar S, McMurtry IF, Rodman DM.** Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia- induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 2001; 2: 306-313.
26. **Fike CD, Kaplowitz MR, Thomas CJ, Nelin LD.** Chronic hypoxia decreases nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase in newborn pig lungs. *Am J Physiol* 1998; 274: L517-L526.

27. **Frank DU, Horstman DJ, Rich GF.** The effect of prolonged inhaled nitric oxide on pulmonary vasoconstriction in rats. *Anesth Analg* 1998; 87: 1285-1290.
28. **Frostell CG, Blomqvist H, Hedenstierna G, Lundberg J, Zapol WM.** Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology*. 1993; 78: 427-35.
29. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
30. **Galie N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ.** Comparative Analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 81-88.
31. **Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tudor RM, Voelkel NF.** Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1999; 103: 1509-1515.
32. **Gaine S.** Pulmonary hypertension. *JAMA* 2000; 284: 3160-8.
33. **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. *Ann Intern Med* 2002; 136: 515-22.
34. **Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Wiedemann R, Weissmann N, Schudt C, Tenor H, Seeger W, Grimminger F.** Amplification of the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost by subthreshold phosphodiesterase types 3 and 4 inhibition in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2002; 30: 2489-92.
35. **Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Wiedemann R, Kreckel A, Weissmann N, Ghofrani S, Enke B, Seeger W, F.** Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 158-64.
36. **Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H et al.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
37. **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.
38. **Giaid A.** Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114: 208-212.
39. **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. *Drugs* 1992; 43: 889-924.
40. **Grimminger F, Priestersbach R, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W.** Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1509-1515.

41. **Grimminger F, Weissmann N, Spriestersbach R, Becker E, Rosseau S, Seeger W.** Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Physiol* 1995; 268: 747-752.
42. **Halank M, Kolditz M, Opitz C, Hoeffken G, Ewert R.** Successful switch from long-term intravenous iloprost to non-invasive combination therapy in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 54-9.
43. **HAMPL V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK.** Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1748-1757.
44. **Higenbottam T, Weeldon D, Wells F, Wallwork J.** Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* 1984; 1: 1046-1047.
45. **Higenbottam TW, Butt AY, nh-Xaun AT, Takao M, Cremona G, Akamine S.** Treatment of pulmonary hypertension with the continuous infusion of a prostacyclin analogue, iloprost. *Heart* 1998; 79: 175-179.
46. **Higenbottam T, Butt AY, McMahon A, Westerbeck R, Sharples L.** Long-term intravenous prostaglandin (epoprostenol or iloprost) for treatment of severe pulmonary hypertension. *Heart* 1998; 80: 151-5.
47. **Hillman ND, Cheifetz IM, Craig DM, Smith PK, Ungerleider RM, Meliones JN.** Inhaled nitric oxide, right ventricular efficiency, and pulmonary vascular mechanics: selective vasodilation of small pulmonary vessels during hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 1006-13.
48. **Hoepfer MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M, Fabel H.** Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 2000; 342: 1866-70.
49. **Hoepfer MM, Markevych I, Spiekerkoetter E, Welte T, Niedermeyer J.** Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005; 26: 858-63.
50. **Horstman DJ, Frank DU, Rich GF.** Prolonged inhaled NO attenuates hypoxic, but not monocrotaline-induced, pulmonary vascular remodeling in rats. *Anesth Analg* 1998; 86: 74-81.
51. **Howard LS, Morrell NW.** New therapeutic agents for pulmonary vascular disease. *Paediatr Respir Rev* 2005; 6: 285-91.
52. **Hsu HH, Rubin LJ.** Iloprost inhalation solution for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacotherapy* 2005; 6: 1921-30.
53. **Huffman MD, McLaughlin VV.** Pulmonary Arterial Hypertension: New Management Options. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2004; 6: 451-458.

54. **Humbert M, Trembath RC.** Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur Respir J* 2002; 20: 741-9.
55. **Humbert M, Sitbon O, Simonneau G.** Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351: 1425-36.
56. **Ignarro LJ, Buga GM, Woods KS, Byrnes RE, Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produces and released from artery and veins is nitric oxid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
57. **Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL.** Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 1994; 76: 933-940.
58. **Jacobs BR, Brill R, Ballard RT, Passerini DJ, Smith DJ.** Aerosolized soluble nitric oxide donor improves oxygenation and pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1536-42.
59. **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. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29: 525-35.
60. **Kantrow SP, Huang YC, Whorton AR, Grayck EN, Knight JM, Millington DS, Piantadosi CA.** Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am J Physiol* 1997; 272: 1167-73.
61. **Karamsetty VS, Kane KA, Wadsworth RM.** The effects of chronic hypoxia on the pharmacological responsiveness of the pulmonary artery. *Pharmacol Ther* 1995; 68: 233-246.
62. **Karamsetty VS, MacLean MR, McCulloch KM, Kane KA, Wadsworth RM.** Hypoxic constrictor response in the isolated pulmonary artery from chronically hypoxic rats. *Respir Physiol* 1996; 105: 85-93.
63. **Kouyoumdjian C, Adnot S, Levame M, Eddahibi S, Bousbaa H, Raffestin B.** Continuous inhalation of nitric oxide protects against development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* 1994; 94: 578-584.
64. **Lavoie A, Hall JB, Olson DM, Wylam ME.** Life-threatening effects of discontinuing inhaled nitric oxide in severe respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1985.
65. **Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JPT.** Hypoxicvasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994; 266: 223-231.
66. **Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, Morris KG, Tudor RM, McMurtry IF, Johns RA, Abman SH.** Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase expression in the adult rat lung . *J Clin Invest* 1998; 101: 795-801.

67. **Le Cras TD, McMurtry IF.** Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 575-582.
68. **Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA.** Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333-13340.
69. **Liu C, Chen J.** Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;
70. **Lo CJ, Fu M, Lo FR.** Prostaglandin I<sub>2</sub> analogue, iloprost, down regulates mitogenactivated protein kinases of macrophages. *J Surg Res* 1998; 76: 159-64.
71. **Lüscher TF, Barton M.** Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102: 2434-40.
72. **MacLean MR, McCulloch KM, Baird M.** Effects of pulmonary hypertension on vasoconstrictor responses to endothelin-1 and sarafotoxin S6C and on inherent tone in rat pulmonary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 822-830.
73. **MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Pollard K.** Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 201-204.
74. **McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR.** Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1621-1630.
75. **McMurtry IF, Petrun MD, Reeves JT.** Lungs from chronically hypoxic rats have decreased pressor response to acute hypoxia. *Am J Physiol* 1978; 235: 104-109.
76. **McMurtry IF, Morris KG, Petrun MD.** Blunted hypoxic vasoconstriction in lungs from short-term high-altitude rats. *Am J Physiol* 1980; 238: 849-857.
77. **Michelakis ED, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, Lien D, Wang SH, Modry D, Archer SL.** Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003; 108: 2066-9.
78. **Michelakis AD, Thébaud B, Weir EK, Archer SL.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O<sub>2</sub>-sensitive K channels by mitochondrial O<sub>2</sub> sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Biol Cell Cardiol* 2004; 37: 1119-1136.
79. **Miller OI, Tang SF, Keech A, Celermajer DS.** Rebound pulmonary hypertension on withdrawal from inhaled nitric oxide. *Lancet* 1995; 346: 51-2.
80. **Muramatsu M, Tyler RC, Rodman DM, McMurtry IF.** Thapsigargin stimulates increased NO activity in hypoxic hypertensive rat lungs and pulmonary arteries. *J Appl Physiol* 1996; 80: 1336-1344.

81. **Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W.** Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 1996; 124: 820-4.
82. **Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Höper MM, Behr J, Kleber FX, Seeger W.** Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. *Ann Intern Med* 2000; 132: 435-43.
83. **Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W.** Aerosolized Iloprost Randomized Study Group. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002; 347: 322-9.
84. **Ou LC, Hill NS, Tenney SM.** Ventilatory responses and blood gases in susceptible and resistant rats to high altitude. *Respir Physiol* 1984, 58: 161-170.
85. **Ou LC, Sardella GL, Hill NS, Tenney SM.** Acute and chronic pulmonary pressor responses to hypoxia: the role of blunting in acclimatization. *Respir Physiol* 1986; 64: 81-91.
86. **Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature* 1987; 327: 524-526.
87. **Paramothayan NS, Lasserson TJ, Wells AU, Walters EH.** Prostacyclin for pulmonary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2003.
88. **Pelligrino DA, Wang Q.** Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 1-18.
89. **Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallworl J.** Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338: 1173-1174.
90. **Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW.** Cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogues in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: 103-15.
91. **Reeve HL, Michelakis E, Nelson DP, Weir EK, Archer SL.** Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2249-2256.
92. **Resta TC, O'Donoghue TL, Earley S, Chicoine LG and Walker BR.** Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 1999; 276: 122-130.
93. **Roberts JD Jr, Roberts CT, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD.** Continuous nitric oxide inhalation reduces pulmonary arterial structural changes, right ventricular hypertrophy, and growth retardation in the hypoxic newborn rat. *Circ Res* 1995; 76: 215-22.
94. **Robertson PT, Hague DE, Aaronson PI, Ward JPT.** Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 2000; 525: 669-680.

95. **Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM.** Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-405.
96. **Roos CM, Frank DU, Xue C, Johns RA, Rich GF.** Chronic inhaled nitric oxide: effects on pulmonary vascular endothelial function and pathology in rats. *J Appl Physiol* 1996; 80: 252-60.
97. **Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, Diehl JH, Crow J, Long W.** Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* 1990; 112: 485-91.
98. **Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G.** Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 896-903.
99. **Sato K, Rodman DM, McMurtry IF.** Hypoxia inhibits increased ETB receptor-mediated NO synthesis in hypertensive rat lungs. *Am J Physiol* 1999; 276: 571-581.
100. **Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Lehoux S, Loirand G, Pacaud P.** Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery. *Circ Res* 2003; 93: 630-637.
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. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1500-6.
102. **Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F.** Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004; 94: 1101-8.
103. **Theo Schermuly R, Ardeschir Ghofrani H, Weissmann N.** Prostanoids and phosphodiesterase inhibitors in experimental pulmonary hypertension. *Curr Top Dev Biol* 2005; 67: 251-84.
104. **Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pullamsetti S, Schulz A, Gessler T, Dumitrascu R, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W.** Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 358-63.
105. **Schermuly RT, Inholte C, Ghofrani HA, Gall H, Weissmann N, Weidenbach A, Seeger W, F.** Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors. *Respir Res* 2005; 6: 76.
106. **Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J.** The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. *Br J Clin Pract* 1990; 44: 231-4.

107. **Sebkhil A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR.** Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 107: 3230-3235.
108. **Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schutte H, Kramer HJ, Ermert L, Kiss L.** Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol* 1994; 233: 549-584.
109. **Seeger W, Lasch HG.** Respiratorische Insuffizienz. *Internist* 1995; 36: 318-326.
110. **Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn S, Chattipakorn N.** Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1303-11.
111. **Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A.** Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 5-12.
112. **Spriestersbach R, Grimminger F, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W.** Online measurement of nitric oxide generation in buffer-perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1502-1508.
113. **Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA.** Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89: 2035-40.
114. **Studel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM.** Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest* 1998; 101: 2468-77.
115. **Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D.** Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114: 464-9.
116. **Teng GQ, Barer GR.** In vitro responses of lung arteries to acute hypoxia after NO synthase blockade or chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1995; 79: 763-770.
117. **Theissen JL, Meißner A.** Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. *Anaesthesist* 1996; 45: 643-652.
118. **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.
119. **Von Euler US, Liljestrand G.** Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946; 12: 301-320.
120. **Walch L, Labat C, Gascard JP, de Montpreville V, Brink C, Norel X.** Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 859-66.
121. **Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W.** Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995; 100: 159-169.

122. **Weissmann N, Grimminger F, Voswinckel R, Conzen J, Seeger W.** Nitro blue tetrazolium inhibits but does not mimic hypoxic vasoconstriction in isolated rabbit lungs. *Am J Physiol* 1998; 274: 721-727.
123. **Weissmann N, Voswinckel R, Hardebusch T, Rosseau S, Ghofrani HA, Schermuly R, Seeger W, Grimminger F.** Evidence for a role of protein kinase C in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1999; 276: 90-95.
124. **Weissmann N, Tadic A, Hanze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F.** Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 683-690.
125. **Weissmann N, Voswinckel R, Tadic A, Hardebusch T, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F.** Nitric oxide (NO)-dependent but not NO independent guanylate cyclase activation attenuates hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 222-227.
126. **Wilkins H, Guth A, König J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, Böhm M, Sybrecht GW.** Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 1218-22.
127. **Zhao L, Crawley DE, Hughes JM, Evans TW, Winter RJ.** Endothelium-derived relaxing factor activity in rat lung during hypoxic pulmonary vascular remodeling. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1061-1065.
128. **Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR.** Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 424-428.
129. **Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ, Jacobs ER.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: 1526-1533.
130. **Zwissler B, Welte M, Habler O, Kleen M, Messmer K.** Effects of inhaled prostacyclin as compared with inhaled nitric oxide in a canine model of pulmonary microembolism and oleic acid edema. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995; 9: 634-40.

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Norbert Weißmann für die Bereitstellung eines Dissertationsthemas und für die Möglichkeit Einblicke in Forschung und wissenschaftliches Arbeiten zu gewinnen. Besonders bedanken möchte ich mich für die sehr gute menschliche und fachliche Betreuung, sowie die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Ebenso danken möchte ich Frau Quanz (MTA), die durch ihre routinierte technische Hilfe beim Durchführen der Experimente einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes leistete.

Ganz besonders danke ich meinem Freund James Nagarajah, sowie meiner Schwägerin Ursula, die in ihrer Freizeit für eine möglichst fehlerfreie Doktorarbeit gesorgt haben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Frau Christiane, meinen Töchtern Johanna und Mathilda, meinen Eltern, meinem Bruder Patrik und meiner ganzen Familie, ohne deren langjährige Unterstützung und Motivation diese Dissertation gar nicht möglich gewesen wäre.

## 12 Publikationsverzeichnis

**Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ardeschir Ghofrani H, Schermuly RT, Gunther A, Quanz K, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F.** Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284(3): H931-8.

**Weissmann N, Gerigk B, Kocer O, Nollen M, Hackemack S, Ghofrani HA, Schermuly RT, Butrous G, Schulz A, Roth M, Seeger W, Grimminger F.** Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir Med.* 2007; 101(10): 2125-32.

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

Gladbeck, den 01.09.2010

Boris Gerigk