

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Wirkung unterschiedlicher NO-Donatoren bei Phorbol-ester-induzierter akuter
pulmonaler Hypertonie am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten
Kaninchenlunge**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Florian Axel Finter
aus Erbach/Donau

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. med. M. Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. med. O. Elert

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2005

Der Promovend ist Arzt

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Pulmonale Hypertonie.....	1
1.1.1 Einteilung/Definition	2
1.1.2 Ätiologie, Genetik.....	3
1.1.3 Pathologie und Pathophysiologie.....	6
1.2 Therapiestrategien bei pulmonaler Hypertonie	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge	12
2.1.1 Versuchsaufbau	12
2.1.2 Versuchsvorbereitung	14
2.1.3 Präparation	15
2.1.4 Kalibrier- und Aufwärmphase.....	17
2.1.5 Steady-State-Phase 1	17
2.2 Messgrößen und Messtechnik	18
2.2.1 Messung des pulmonalarteriellen und linksventrikulären Perfusions- druckes	18
2.2.2 Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$)	18
2.2.3 Bestimmung der Compliance	21
2.2.4 Bestimmung der Retention (ΔW).....	21
2.2.5 Bestimmung des pulmonalkapillären Druckes (PCP).....	21
2.2.6 Bestimmung der Gefäßwiderstände (R_a , R_v).....	22
2.3 Versuchsdurchführung	23
2.3.1 Versuchsablauf und Stimulation.....	23
2.4 Biochemische Analytik	24
2.4.1 NO-Bestimmung	24
2.4.2 cGMP Bestimmung	25
2.5 Substanzen	27
2.6 Statistische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 Verlauf der pulmonalarteriellen Drücke	28
3.2 Pulmonalkapillärer Druck und pulmonale Gefäßwiderstandsverteilung	34
3.3 Gefäßpermeabilität und Compliance	38
3.4 NO-Freisetzung.....	42
3.5 cGMP-Gehalt des Lungengewebes	44
4. Diskussion	47
4.1 Diskussion des Modells.....	47
4.2 PMA-induzierte pulmonale Hypertonie.....	47
4.3 Applikation der Vasodilatoren	49

4.4 Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck	50
4.5 Lokale NO-Freisetzung und biologische Wechselwirkungen	52
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Der pathophysiologische Symptomkomplex der pulmonalen Hypertonie ist Bestandteil einer Reihe von Krankheitsbildern mit teils akuten oder chronischen Krankheitsverläufen.

1891 wurde das pathologische Bild erstmalig von Romberg bei einer Autopsie geschildert (Romberg 1891). Danach wurde über das Krankheitsbild nur noch selten berichtet. Erst mit Einführung der Herzkatheteruntersuchung in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die Diagnose häufiger gestellt und in der Literatur beschrieben. Dresdale schuf 1951 den Begriff der primären pulmonalen Hypertonie (Dresdale et al. 1951). Zusätzlich wurde immer häufiger auch über akute Verläufe der pulmonalen Hypertonie vor allem begleitend bei Sepsis berichtet (Kuida et al. 1958). Die beschriebenen Verläufe waren häufig assoziiert mit dem pathophysiologischen Symptomenkomplex eines akuten Lungenversagens ("acute respiratory distress syndrome" = ARDS), das bis zum heutigen Tage durch eine relativ hohe Mortalität und unzureichende Therapierbarkeit gekennzeichnet ist. Geprägt wurde der Begriff "ARDS" durch Fallberichte von Ashbaugh et al. (Ashbaugh et al. 1967). Zapol berichtete in den 70er Jahren von 30 Patienten mit ARDS und begleitender pulmonaler Hypertonie (Zapol and Snider 1977).

Trotz der zunehmenden Häufigkeit der Diagnosestellung einer akuten oder chronischen pulmonalen Hypertonie sind die pathophysiologischen und biochemischen Mechanismen dieser Erkrankung in weiten Teilen unklar. Zwar sind eine Reihe von Erkrankungen bzw. Faktoren und Mediatoren, die das Auftreten einer PH begünstigen oder verursachen, bekannt, endgültige Klarheit über die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge besteht aber nicht.

Zudem ist die Nomenklatur des chronischen Krankheitsbildes verwirrend. Begriffe wie "primär", "idiopathisch" oder "plexogene Arteriopathie" werden nicht immer einheitlich verwendet und tragen zur Konfusion von Ärzten und Patienten bei (Voelkel and Tuder 1999). Die eigentliche Form der primären pulmonalen Hypertonie ist ein äußerst seltenes Krankheitsbild mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro 1 Million Einwohnern einer durchschnittlichen Bevölkerung (0,0002 %). Sind Faktoren vorhanden, welche die Krankheit beeinflussen (z.B. Anorektika, HIV-Infektion, portale

Hypertension etc.) steigt der Inzidenzwert an (Rich 1998; Rubin 1997). Frauen sind insgesamt häufiger betroffen als Männer ($\text{♂}:\text{♀} = 1:1,7-2,3$) (Abenheim et al. 1996; Rich et al. 1987).

1.1.1 Einteilung/Definition

Chronisch pulmonale Hypertonie

Die manifeste pulmonale Hypertonie ist definiert durch einen mittleren pulmonalarteriellen Druck (mPAP) größer 25 mmHg in Ruhe, bzw. größer 30 mmHg unter Belastung (Rich et al. 1987). Bisher wurde die pulmonale Hypertonie nach ihrem zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismus (Lokalisation) in präkapilläre (z.B. primäre pulmonale Hypertonie, kongenitale Herzerkrankung, Medikamente), passive (erhöhter linksventrikulärer Druck und damit erhöhter pulmonalvenöser Druck; z.B. bei Linksherzinsuffizienz) und reaktive Formen eingeteilt. Eine neue diagnostische Klassifikation wurde 1998 von einer Expertenkommission in Evian erarbeitet und berücksichtigt dabei stärker klinische Belange (Rich 1998). Zusätzlich wurde an gleicher Stelle zur Abschätzung des Schweregrades der PH eine an die NYHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz angelehnte Einteilung geschaffen. Beim 3. "World Symposium on Pulmonary Hypertension" in Venedig 2003 wurde die Einteilung von 1998 überarbeitet und aktualisiert (Tabelle 1). Ein zentraler Bestandteil ist die Änderung des Terminus "primäre" in "idiopathische" pulmonale Hypertonie (Simoneau et al. 2004).

Akute pulmonale Hypertonie und akutes Lungenversagen

Der Begriff "ARDS" beschreibt keine genau spezifizierte Erkrankung, sondern vielmehr ein großes pathophysiologisches Syndrom. Eine Einteilung kann nach den Empfehlungen der "American-European Consensus Conference on ARDS" von 1994 vorgenommen werden (Bernard et al. 1994) und ist wie folgt definiert:

- Akutes Auftreten
- Röntgen Thorax mit bilateralen Infiltraten
- Pulmonalkapillärer Verschlussdruck ≤ 18 mmHg oder kein klinischer Hinweis auf einen erhöhten linksatrialen Druck

In dieser Einteilung wird noch zwischen akuter Lungenschädigung und akutem Lungenversagen unterschieden, wobei als Kriterium das Ausmaß der Hypoxämie gilt.

Bei einem Quotienten $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ spricht man von einer akuten Lungenschädigung, fällt der Quotient unter 200 mmHg so bedeutet dies ein akutes Lungenversagen.

Tabelle 1: Neue Einteilung der pulmonal-hypertensiven Erkrankungen (Venedig 2003)

Diagnostische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	
1.	Pulmonalarterielle Hypertonie (PH)
1.1	Idiopathisch
1.2	Familiär
1.3	Assoziiert mit <ul style="list-style-type: none"> • <i>Kollagenosen</i> • <i>angeborenen oder systemischen Shunts</i> • <i>portaler Hypertonie</i> • <i>HIV-Infektion</i> • <i>Medikamenten/Toxinen (Anorektika oder andere)</i> • <i>persistierender PH des Neugeborenen</i> • <i>anderen</i>
1.4	Assoziiert mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung <ul style="list-style-type: none"> • <i>pulmonalvenöse Verschlusskrankheit</i> • <i>pulmonalkapilläre Hämangiomatose</i>
2.	Pulmonalvenöse Hypertonie
2.1	Linksatriale bzw. linksventrikuläre Herzerkrankung
2.2	Linksseitige valvuläre Herzerkrankung
3.	Pulmonale Hypertonie bei respiratorischen Erkrankungen und/oder Hypoxämie
3.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
3.2	Interstitielle Lungenerkrankung
3.3	Schlafapnoesyndrome
3.4	Alveoläre Hypoventilation
3.5	Chronischer Aufenthalt in Höhenlagen
3.6	Entwicklungsdefekte
4.	Pulmonale Hypertonie bei chronischen thromboembolischen Erkrankungen
4.1	Thromboembolische Obstruktion der proximalen Pulmonalarterien
4.2	Obstruktion der distalen Pulmonalarterien
4.3	Nicht-thrombotische pulmonale Embolisation (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)
5.	Verschiedene
	Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangiomatose, pulmonale Gefäßkompression (Tumor, Adenopathie, fibröse Mediastinitis)

1.1.2 Ätiologie, Genetik

Chronisch pulmonale Hypertonie

Neben den so genannten sekundären Ursachen (Lungenembolien, kongenitale Herzerkrankungen) gibt es eine Reihe von Faktoren, die das Auftreten einer pulmonalen Hypertonie begünstigen bzw. beeinflussen.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über Risikofaktoren, die möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie spielen.

**Tabelle 2: Einschätzung von Risikofaktoren
(Einteilung nach (Rich 1998))**

A. Medikamente und Toxine

1. Sicher
 - Aminorex
 - Fenfluramin
 - Dexfenfluramin
 - Toxisches Rapsöl
2. Sehr wahrscheinlich
 - Amphetamine
 - L-Tryptophan
3. Möglich
 - Meta-Amphetamine
 - Kokain
 - Chemotherapeutika
4. Unwahrscheinlich
 - Antidepressiva
 - Orale Antikonzeptiva
 - Östrogentherapie
 - Rauchen

B. Demographische und Medizinische Bedingungen

1. Sicher
 - Geschlecht
2. Möglich
 - Schwangerschaft
 - Systemischer Bluthochdruck
3. Unwahrscheinlich
 - Adipositas

C. Krankheiten

1. Sicher
 - HIV-Infektion
2. Sehr wahrscheinlich
 - Portale Hypertension
 - Kollagenose
 - Kongenitale Shunts
3. Möglich
 - Schilddrüsenerkrankungen

Zwischen 1965 und 1972 konnte man den Appetitzügler Aminorex in Deutschland, der Schweiz und Österreich rezeptfrei kaufen. In dieser Zeit stieg in diesen Ländern die Inzidenz einer pulmonalen Hypertension auf den 10fachen Wert an (Fishman 1999). Das Medikament wurde daraufhin 1972 vom Markt genommen. Auch für andere Anorektika wie Fenfluramin und Dexfenfluramin konnte ein erhöhtes PH-Risiko gezeigt werden. Abenheim et al. (Abenheim et al. 1996) konnten belegen, dass bei einer länger als drei Monate dauernden Therapie mit Anorektika die Wahrscheinlichkeit, an einer PH zu erkranken, signifikant um mehr als das 10fache zunimmt. Die Ursachen hierfür sind nicht eindeutig geklärt.

Diskutiert wird eine Beeinträchtigung spannungsgesteuerter K^+ -Kanäle (K_v). Durch eine verzögerte Repolarisation

kommt es nachfolgend zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einfluss mit verstärkter Vaso-konstriktion (Weir et al. 1996; Yuan et al. 1998). Anorektika sind serotoninerge Substanzen und es gibt Hinweise, dass erhöhte Serotonin-Spiegel von Bedeutung sind (Belohlávková et al. 2001). Nichtsdestotrotz ist die Inzidenz der PH unter Anorektikakonsumenten gering. Sie wird zwischen 0,006 und 0,01 % angegeben (Galiè et al. 1998).

Der erste Fall einer pulmonalen Hypertension bei einem HIV-Infizierten wurde 1987 beschrieben (Kim and Factor 1987). In den folgenden Jahren wurde diese Beobachtung durch andere Fallberichte und Studien (Petitpretz et al. 1994) bestätigt. Die Gründe für die Entwicklung einer PH bei HIV-Patienten sind unklar. Es wird eine Infektion der Gefäße oder der Einfluss von Wachstumsfaktoren vermutet. Das Krankheitsbild gleicht sowohl symptomatisch als auch pathologisch der klassischen PPH. Die Inzidenz wird mit 0,5 % unter HIV-Infizierten angegeben (Galiè et al. 1998). Neben der idiopathischen PH (früher sporadische PPH) ist auch noch eine familiäre Form (FPPH bzw. FPAH) beschrieben. Im Jahr 2000 waren weltweit (USA, EUR, AUS, CAN, J) mehr als 100 betroffene Familien bekannt (Thomson and Trembath 2000). Es wird geschätzt, dass ca. 6 % aller PPH-Fälle einer familiären Form zugeschrieben werden können (Rich et al. 1987). Bei genauer Familienanamnese können viele "sporadische" PPH-Fälle als familiär identifiziert werden (Newman et al. 2001). Der Vererbungsmodus ist autosomal dominant, allerdings beträgt die Penetranz nur 20%. In den genetischen Familienanamnesen zeigte sich darüber hinaus eine Antizipation, d.h. eine von Generation zu Generation immer frühere und schwerere Manifestation der Krankheit (Loyd et al. 1984; Loyd et al. 1995). Der betroffene Genlocus wurde 1997 von zwei unabhängig forschenden Arbeitsgruppen auf Chromosom 2q31-32 identifiziert ("PPH1 Gen") (Morse et al. 1997; Nichols et al. 1997). Dieses Intervall umfasste jedoch noch ca. 25 cM (Centimorgan, 1cM = 0,9 Mb, Megabasenpaare) (Strachan and Read 1996) und war daher noch sehr ungenau. Weitere Forschung konnte den relevanten Bereich, der nun allerdings im Bereich 2q33 liegt, auf etwa 3 cM eingrenzen (Deng et al. 2000a). Bei Patienten mit FPPH wurden innerhalb des PPH1-Genlocus Mutationen des BMPR2-Gens ("bone morphogenetic protein receptor") gefunden, das einen gleichnamigen Rezeptor kodiert (Deng et al. 2000b; Lane et al. 2000). Die dazugehörigen BM-Proteine gehören zur TGF- β Superfamilie, die Regulatoren von Gewebsreparatur und -wachstum sind. Dieser Defekt kann als Hinweis auf eine Störung innerhalb des Zellwachstums gedeutet werden. Um an einer pulmonalen Hypertonie zu erkranken ist es allerdings wahrscheinlich, dass noch weitere Gendefekte oder Begleitumstände vorliegen, da nur ca. 10-20 % der beschriebenen Gendefektträger tatsächlich betroffen sind (Newman et al. 2001; Tudor et al. 2001).

Akutes Lungenversagen

Ursachen und Begleiterkrankungen eines ARDS sind sehr inhomogen. Man unterscheidet zwischen einer direkten und indirekten Lungenschädigung. Zu den häufigsten bzw. risikoreichsten Ursachen zählen (nach (Bernard et al. 1994; Taylor and Trotter 2000)):

1. Direkt:

- Aspiration von Magensaft
- schwere Pneumonie
- Beinaheertrinken
- Inhalationstrauma
- schwere Lungenkontusion

2. Indirekt:

- Sepsis, Multiorganversagen
- schweres nicht-thorakales Trauma (Polytrauma, Verbrennungen)

1.1.3 Pathologie und Pathophysiologie

Chronisch pulmonale Hypertonie

Charakteristisch für die chronisch hypertensiven Lungenerkrankungen sind strukturelle Gefäßveränderungen ("vascular remodelling"). Diese treten sowohl bei den "primären" (z.B. PH bei HIV oder Anorektika) als auch bei den "sekundären" Formen (z.B. PH bei Rechts-Links-Shunt) auf (Wagenvoort and Wagenvoort 1970). Bereits 1958 teilten Heath und Edwards diese Veränderungen in 6 Stufen ein (Heath and Edwards 1958):

1. Mediahypertrophie ohne Intimaveränderungen
2. Mediahypertrophie mit Intimaproliferation
3. Mediahypertrophie, Intimaproliferation und Intimafibrose
4. progressive Vasodilatation und –okklusion durch Intimafibrose
5. plexiforme Gefäßveränderungen
6. nekrotisierende Arteriitis

Diese Einteilung soll in Zukunft jedoch zugunsten einer rein pathologisch-deskriptiven Klassifizierung verlassen werden (Rich 1998).

So genannte plexiforme Gefäßveränderungen treten häufig bei der PH auf (Pietra et al. 1989), ihre Ätiopathogenese ist unklar. Morphologisch handelt es sich um

disorganisierte Gefäßknäuel, bestehend aus proliferierenden Endothelzellen, glatter Muskulatur, Myofibroblasten und Entzündungszellen. Diese "wachsen" von der Pulmonalarterienwand ins Gefäßlumen. Die plexiformen Läsionen ähneln den glomeruloiden Gefäßen, die maligne Gliome umgeben, und dort eine Form der Neovaskularisation darstellen (Rich 1998; Tudor et al. 1994). Mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren konnte gezeigt werden, dass diese Läsionen hauptsächlich endothelialen Ursprungs sind (Cool et al. 1999; Tudor et al. 1994). Unter anderem spielen dabei der "vascular endothelial growth factor" (VEGF) (Voelkel et al. 1996) und der dazugehörige KDR-Rezeptor sowie das Faktor VIII (v.Willebrand) verwandte Antigen (FVIII-r.ag) (Cool et al. 1997) eine wichtige Rolle. Diese Beobachtungen werden als Ausdruck einer fehlgeleiteten Angiogenese gedeutet.

Zudem zeigen die Zellen der plexiformen Läsionen noch weitere Auffälligkeiten. Die Prostacyclin-Synthetase (PGI₂S) (Tudor et al. 1999) und die NO-Synthetase (Giaid and Saleh 1995) sind vermindert oder fehlen ganz. Im Gegensatz dazu werden Endothelin-1-Rezeptoren überexprimiert (Giaid et al. 1993), genauso wie die 5-Lipoxygenase und das 5-Lipoxygenase activating protein (FLAP), die für die Leukotriensynthese bedeutsam sind (Wright et al. 1998). Insgesamt scheint eine Mediator-Dysbalance vorzuliegen, die einen starken Einfluss auf die Vasomotorik hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die "tumorartige" endotheliale Proliferation der plexiformen Läsion bei den "primären" Formen monoklonalen Ursprungs sind, im Gegensatz zu "sekundären" Formen (kongenitale Herz-erkrankung, CREST-Syndrom), die eine polyklonale Entstehungsweise haben (Lee et al. 1998; Tudor et al. 1998).

Akutes Lungenversagen

Ausgelöst wird das Lungenversagen durch eine massive Entzündungsreaktion, welche Alveolen und Endothel schwer schädigt. Die pathologischen Veränderungen der Lunge verlaufen dabei typischerweise in 3 aufeinander folgenden Stadien, nämlich einer exsudativen, einer proliferativen und einer fibrotischen Phase (Flick 1994). Die initiale Schädigung sowohl des mikrovaskulären Endothels als auch des alveolären Epithels führen zu einem exsudativen, interstitiellen und alveolären Lungenödem mit der Ausbildung hyaliner Membranen (Fibrin, Proteine, Zelldetritus). Eine wichtige Rolle bei der Pathogenese nehmen die neutrophilen Granulozyten ein (Weiland et al. 1986). Bei deren Aktivierung spielen unter anderem Zytokine wie z.B.

IL-1 und TNF- α eine zentrale Rolle. Sie werden durch gewebsständige Makrophagen sezerniert und vermitteln in der Frühphase der Entzündung eine Reihe von Gewebsreaktionen (Armstrong and Millar 1997; Pugin et al. 1996; Pugin et al. 1999). Über weitere chemotaktische Reize (z.B. LTB₄, PAF, IL-8), Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selektin, ICAM-1 und ICAM-2), aber auch antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1ra, sTNF-R, IL-10) werden diese Vorgänge moduliert (Chollet-Martin et al. 1996). Die polymorphkernigen Granulozyten (PMN) produzieren eine Reihe zytotoxischer Substanzen, wie Oxidantien und Radikale (z.B. Superoxid, Hydrogenperoxid, Hydroxyl-Radikale, Hypochlorsäure), sowie proteolytische Enzyme (z.B. Elastase, Kollagenase) (Taylor and Trottier 2000). Allerdings sind auch ARDS-Fälle bei neutropenischen Patienten beschrieben (Braude et al. 1985; Laufe et al. 1986), so dass wahrscheinlich die jeweiligen Ursachen über verschiedene Entzündungsmechanismen mit unterschiedlicher Gewichtung der einzelnen Mediatoren zu einem ARDS führen. Dies sollte bei einer zukünftigen Einteilung des ARDS im Hinblick auf daraus resultierende Therapieoptionen berücksichtigt werden (Abraham et al. 2000). Neben der Verschlechterung der Oxygenierung des arteriellen Blutes durch Bildung intrapulmonaler Rechts-Links-Shunts und einem Ventilations/Perfusions-Missverhältnis, kommt es häufig zur pulmonalen Hypertonie mit Rechtsherzinsuffizienz und gleichzeitiger Erhöhung des Gefäßwiderstandes (Sibbald et al. 1978; Zapol and Snider 1977), welche die Letalität weiter erhöhen können. Als möglicher Mechanismus hierfür wird eine Störung in der Regulation der Vasomotorik vermutet. Der potente Vasokonstriktor Endothelin-1 wird z.B. vermehrt exprimiert (Druml et al. 1993).

Der Verlauf eines ARDS kann recht unterschiedlich sein. Bei manchen Patienten erholt sich die Lunge nach der akuten Phase relativ gut und schnell, bei anderen hingegen kommt es zu einem fibrosierenden Verlauf mit erhöhter Mortalität (Martin et al. 1995).

1.2 Therapiestrategien bei pulmonaler Hypertonie

Grundsätzliche Ansatzpunkte zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie sind die Beeinflussung der Gefäßmuskulatur über Prostazykline, die cAMP-vermittelt zu einer Vasorelaxation führen (Übersicht bei (Scheeren and Radermacher 1997)) und die cGMP-vermittelte Vasodilatation durch Stickstoffmonoxid (NO) (Übersicht bei (Weinberger et al. 1999)).

So werden schon seit über 100 Jahren organische Nitrite und Nitrate zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung eingesetzt. 1846 wurde von Sobrero zum ersten Mal Glyceroltrinitrat synthetisiert. Bei der Herstellung von Sprengstoff durch Nobel in den späten 1860ern fiel eine positive Wirkung bei Arbeitern mit Angina pectoris auf. Seitdem sind die Nitrate wesentlicher Bestandteil der Standardtherapie bei koronaren Herzerkrankungen (Förstermann 1996). Der genaue molekulare Wirkmechanismus dieser Substanz, mit Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch NO und Bildung von cGMP mit konsekutiver Vasorelaxation, wurde aber erst Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts aufgeklärt (Arnold et al. 1977; Gruetter et al. 1979). 1987 wurde erstmals NO als körpereigener Mediator identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass NO mit dem bisher schon bekannten EDRF identisch ist (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987).

Chronisch pulmonale Hypertonie

Die medikamentöse Behandlung der chronischen pulmonalen Hypertonie stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Zum Einsatz kommen dabei orale Calcium-Antagonisten (Rich et al. 1992) und die intravenöse Gabe von Prostazyklin (Epoprostenol=Prostaglandin I₂) (Barst et al. 1996).

Als Nachteil der intravenösen Gabe von Prostazyklinen werden systemische Nebenwirkungen (schwere Hypotension), sowie bei kontinuierlicher Gabe eine Tachyphylaxie mit notwendiger Dosissteigerung angesehen. Außerdem ist ein dauerhafter zentralvenöser Zugang mit all seinen Komplikationen (Infektionsrisiko) notwendig und es fallen extrem hohe Behandlungskosten (ca. 700.000 EUR/Jahr) an (Olschewski 2002).

Als eine mögliche Alternative kommt die Applikation von Prostanoiden als Aerosol in Betracht. Eine solche topische Therapie hat im Idealfall den Vorteil einer lokalen Wirkung, ohne dass schwere systemische Nebenwirkungen auftreten müssen. Erste klinische Studien mit dem stabilen Prostazyklinanalogon Iloprost haben sich dabei als Erfolg versprechend erwiesen (Hoepfer et al. 2000; Olschewski et al. 2002; Olschewski et al. 1996).

Seit kurzem ist außerdem eine orale Therapie mit dem unspezifischen Endothelinantagonisten Bosentan verfügbar (Channik et al. 2001; Rubin et al. 2002). Erste Studien sind ebenfalls sehr vielversprechend.

Darüber hinaus scheinen auch Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, wie das zur Zeit zur Therapie der erektilen Dysfunktion eingesetzte Sildenafil (Viagra[®]), bei der

Behandlung von chronischen und akuten Verläufen der pulmonalen Hypertonie wirksam zu sein (Ghofrani et al. 2002; Michelakis et al. 2002; Watanabe et al. 2002).

Akutes Lungenversagen

Zur Notfalltherapie des akuten Lungenversagens (ARDS) und beim persistierenden pulmonalen Hypertonus des Neugeborenen kommt die inhalative Gabe von NO-Gas (INO) zur Anwendung (Roberts et al. 1997; Rossaint et al. 1993). Mit diesem Therapieprinzip kann über eine selektive Vasodilatation in belüfteten Lungenabschnitten eine Verbesserung der arteriellen Oxygenierung, sowie eine Senkung des pulmonalvaskulären Widerstandes mit nachfolgender Erniedrigung eines bestehenden pulmonalen Hypertonus erreicht werden (Rossaint et al. 1993). In den Körperkreislauf gelangtes NO wird durch Hämoglobin rasch inaktiviert. So wird eine systemische Hypotension verhindert (Rimar and Gillis 1993). Für den Einsatz beim Neugeborenen besitzt NO in den Vereinigten Staaten eine FDA-Zulassung (U.S. Food and Drug Administration). Der Einsatz beim Erwachsenen ist weit verbreitet, jedoch nicht zugelassen ("off-label use"). Seit der FDA-Zulassung für INO sind die Therapiekosten extrem angestiegen (Lowson 2002). In klinischen Studien (gemischte Kollektive; pulmonale Hypertonie aufgrund von Sepsis, Pneumonie, Trauma und seltenen Ursachen) konnten zwar die oben genannten Effekte bestätigt werden, eine Verbesserung des outcome, gekennzeichnet durch eine Senkung der Letalität bei mit INO behandelten Patienten, konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (Dellinger et al. 1998; Lundin et al. 1999; Troncy et al. 1998).

Eine Applikation und alveoläre Deposition von alternativen NO-Liberatoren befindet sich zum größten Teil noch im experimentellen Stadium und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die pulmonale Hypertonie als pathophysiologisches Syndrom kann sowohl in akuten als auch in chronischen Krankheitsverläufen auftreten. Bei den akuten Formen ist sie häufig mit einem akuten Lungenversagen (ARDS), verursacht hauptsächlich durch Sepsis oder Trauma, vergesellschaftet.

Sowohl akute als auch chronische Verläufe sind therapeutisch schwer beeinflussbar. Das Vollbild eines ARDS ist darüber hinaus mit einer hohen Mortalität assoziiert. Zur vasorelaxiven Therapie des pulmonalen Hypertonus stehen eine Reihe von Substanzen mit teilweise verschiedenen Wirkmechanismen zur Verfügung. Dabei kann grundsätzlich zwischen einer systemischen und einer lokalen Wirkstoffapplikation unterschieden werden. Hierbei spielt Stickstoffmonoxid (NO) als potenter Vasodilatator eine wichtige Rolle.

Am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge lässt sich durch Gabe eines potenten Vasokonstriktors – in unserem Fall ein Phorbol-ester – ein pulmonaler Hypertonus provozieren. Aufgrund der Organisolierung lassen sich systemische Einflüsse ausschließen und ermöglichen eine isolierte Betrachtung.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung zweier klinisch etablierter (*Natriumnitroprussid* und *Glyceroltrinitrat*) und eines experimentellen (*S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin*) NO-Donors im Vergleich zwischen inhalativer und systemischer Applikation an einem isolierten Lungenmodell mit einem durch Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) provozierten pulmonalen Hypertonus zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollen die folgenden pathophysiologischen und biochemischen Parameter bestimmt werden:

- Richtung und Ausmaß einer möglichen Beeinflussung des pulmonalarteriellen Druckes und Widerstandes durch NO-Donoren mittels kontinuierlicher Druckmessung
- Richtung und Ausmaß einer möglichen Beeinflussung der Gefäßpermeabilität mittels Bestimmung des pulmonalen kapillären Filtrationskoeffizienten
- Verlauf der Nitrit- bzw. Nitratkonzentration im Perfusat
- Höhe der cGMP-Spiegel im Lungengewebe

Anhand der so gewonnenen Ergebnisse soll die Wirkung der drei NO-Donoren bei pulmonaler Hypertonie, vor allem auch im Hinblick auf ihre jeweilige vasodilative Potenz bei inhalativer Anwendung, miteinander verglichen und diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Modell der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge

Das verwendete Organmodell wurde bereits 1912 von Knowlton und Starling beschrieben. Eine modifizierte Form kommt seit 1996 an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg in der Arbeitsgruppe von Dr. H. Wahn zur Anwendung.

2.1.1 Versuchsaufbau

In einem geschlossenen Kreislauflsystem wurden die Lungen kontinuierlich mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (GAMBRO PP10-1a) flusskonstant perfundiert. Das dazu verwendete PVC-freie Schlauchsystem (TYGON®, NORTON, Akron USA) ist in einen prä- und einen postpulmonalen Abschnitt unterteilt. Dabei waren arterielles und venöses System auf der einen Seite durch die Lungen, auf der anderen Seite durch zwei parallel geschaltete doppelwandige Vorratsbehälter (Glas, 400 ml; Glasgerätebau OCHS, 37120 Bovenden), die als Reservoir dienten, verbunden. Mit Hilfe einer Verteilerbank (B.BRAUN, 34209 Melsungen) und zwei Glashähnen (BRAND), die an die Vorratsbehälter konnektiert wurden, erfolgten die Ableitung des Ausflusses sowie der Perfusatwechsel. Weitere in den Kreislauf integrierte Dreivegehähne (B.BRAUN, 34209 Melsungen) ermöglichten die Probeentnahmen. Ein zwischen der Pumpe und den Lungen eingebrachter Transfusionsfilter (40 µm SQ 40SE; PALL Biomedizin GmbH, 63303 Dreieich) und eine Blasenfalle dienten dem Schutz der Lunge vor Embolien.

Das Perfusat floss über einen während der Präparation in der A. pulmonalis platzierten Katheter direkt in den Lungenkreislauf. Der Abfluss wurde über einen im linken Ventrikel platzierten Katheter sichergestellt. Anschließend gelangte das Perfusat über ein kaskadenförmiges Leitersystem wieder zurück in das Vorratsgefäß. Dieses Leitersystem ermöglichte durch Abklemmen der untersten Kaskadensprosse ein Ansteigen des pulmonalvenösen Druckes um einen definierten Wert (Hydrostatic Challenge). Die Druckerhöhung, durch den Sprossenabstand definiert, war in unseren Experimenten mit 10 cm H₂O festgelegt.

Das Herzlungenpaket wurde während des ganzen Versuchs in einer feuchten Kammer (Glas, doppelwandig; Glasgerätebau OCHS), zum Schutz vor Austrocknung, bei 37°C gelagert. Die Feuchtkammer wie auch die beiden Vorratsgefäße wurden mittels Wärmetauscher (HKB 2219 Multitemp II; BROMMA) durch eine

zirkulierende Flüssigkeit temperiert. Dadurch konnte die Perfusatemperatur nach Wunsch eingestellt werden.

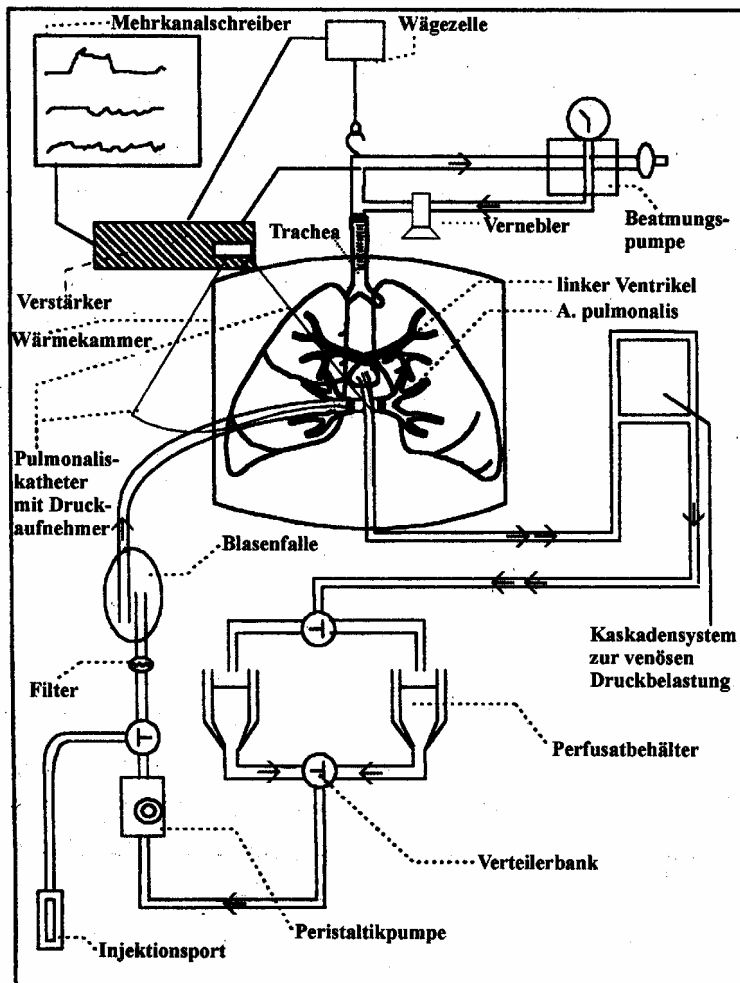


Abb. 1: schematische Darstellung der isolierten Kaninchenlunge

Während des Versuchs hing die Lunge freischwebend an einem Kraftaufnehmer mit Wägezelle (Messkonverter MC3; HOTTINGER BALDWIN, Darmstadt), die mit einem Messverstärker (Eigenbau) verbunden war. Die pulmonalarteriellen (PAP) und pulmonalvenösen (LVP) Drücke wurden mittels dünnlumiger Innenkatheter aufgezeichnet und über Druckaufnehmer (Combitrans Monitoring-Set venös; B.BRAUN) ebenfalls an den Messverstärker weitergeleitet. Die kontinuierliche Registrierung der Parameter erfolgte über einen Mehrkanalschreiber (Servogor 960; BBC GOERZ). Alle zum Druckausgleich im System benötigten Entlüftungseinrichtungen an Vorratsbehältern und Kaskadensystem waren durch hydrophobe, bakteriendichte Filtereinheiten mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ gesichert (ReZist 30/0,2; SCHLEICHER + SCHUELL, 37582 Dassel).



Abb. 2:
Versuchsanlage

2.1.2 Versuchsvorbereitung

Alle an der Versuchsdurchführung beteiligten Systeme wurden mittels Spülmaschine gereinigt und im Dampfsterilisator sterilisiert.

Der prä- und der postpulmonale Teil des Schlauchsystems wurden installiert und kurzgeschlossen. Nach Befüllung des Systems mit 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl 0.9 Infusionslösung; FRESENIUS AG, 61346 Bad Homburg) und anschließender Entlüftung erfolgte der Austausch der zirkulierenden Flüssigkeit durch alternierendes Befüllen der parallel geschalteten Vorratsgefäße (Gesamtvolumen der pyrogen-freien Spülflüssigkeit ca. 1 l). Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen

Kontamination nochmals reduziert. Daran anschließend befüllte man die Vorratsbehälter mit proteinfreiem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB; SERAG WIESNER, 95119 Naila) (Zusammensetzung: NaCl 132,8 mM, KCl 5,2 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, NaHCO₃ 24,1 mM, CaCl 2,4 mM, MgPO₄ 1,3 mM und Glucose 240 mg/dl) und es erfolgte die erneute Durchspülung der Systemschläuche. Während allen Spüldurchgängen musste darauf geachtet werden, dass keine Luft aus den Vorratsbehältern in die Schläuche gelangte. Ebenso entlüftete man die Messkatheter für die pulmonal-arteriellen und -venösen Druckmessungen. Nach Abschalten der Pumpe wurden der arterielle und der venöse Teil des Schlauchsystems mit Kocherklemmen (alle Instrumente AESCULAP, Tuttlingen) gegen ein versehentliches Auslaufen während der Präparation gesichert.

2.1.3 Präparation

Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard (Fellfarbe grau, braun, schwarz; CHARLES RIVER Deutschland GmbH, 88353 Kißlegg) mit einem Gewicht zwischen 2,2 und 2,8 kg verwendet. Eine behördliche Genehmigung zur Tiertötung lag vor. Die Präparation des Kaninchens gliederte sich in Narkoseeinleitung, Intubation, Narkose, Operation und eigentliche Präparation der Lunge.

Zur Narkoseeinleitung wurde ein Ohr des Kaninchens oberflächenanästhesiert (Xylocain[®] Pumpspray; ASTRA GmbH, 22876 Wedel). Nach einer gewissen Einwirkungszeit wurde dann mit einer Butterfly-Kanüle (Venofix[®] S ID 0,5 mm; B.BRAUN) ein venöser Zugang in die Ohrvene gelegt und fixiert. Dem Kaninchen wurde etwa 1 ml des verwendeten Narkosegemisches, bestehend aus 25 mg (S)-Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®] S 5 mg/ml, 5 ml Injektionslösung; PARKE-DAVIS GmbH, Berlin) und 88 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2 %, 25 ml Injektionslösung; BAYER AG, Leverkusen), als Einschlafdosierung injiziert. Danach erfolgte eine gewichtsadaptierte (1000 I.E./kg Körpergewicht) Heparinisierung des Tieres mit Heparin-Natrium (Liquemin[®] N 25000, 5 ml Injektionslösung mit 5000 I.E./ml; HOFFMANN-LA ROCHE AG, 79630 Grenzach-Whylen).

Das Tier wurde auf dem Rücken gelagert und prätracheal rasiert. Im Bereich zwischen oberer Thoraxapertur und Larynx wurde mit 5 ml Lidocain 2 % (Xylocain[®] 2 % 5 ml Injektionslösung; ASTRA) eine Quaddel zur Lokalanästhesie gesetzt. Schließlich wurde das restliche Präparationsgebiet über Thorax und Abdomen freigeschoren und mit einem Hautantiseptikum (Braunol[®]; B.BRAUN) behandelt. Es

erfolgte eine Tracheotomie und anschließende künstliche Beatmung mittels eines Kleintierrespirators (Rodent Ventilator 7025; UGO BASILE, Comero/Italien). Als Beatmungsgas diente Raumluft mit einem Atemzugvolumen von 10 ml/kg KG.

Nun erfolgte die Gabe des Narkotikums. Unter kontinuierlicher Kontrolle des Herzschlags wurden weitere 4 ml des Gemisches langsam (ca. 0,1 ml/15-30 s) injiziert.

Die Operation begann mit der Entfernung der Haut unterhalb des Xyphoids. Entlang präformierter Stichkanäle wurde die Haut dann Y-förmig über Abdomen und Thorax entfernt. Im Epigastrium wurde die Muskulatur fingerbreit durchtrennt und der Processus xyphoideus mit einer Kocherklemme gefasst. Von diesem Einschnitt ausgehend, erfolgte dann eine quere Oberbauchlaparatomie. Der sternale Zwerchfellansatz wurde mit einer spitzen gebogenen Pinzette unterfahren und dann mit einer Darmklemme gefasst. Das Diaphragma wurde oberhalb der Darmklemme am Sternalansatz durchtrennt und der Thorax durch leichten Zug eröffnet. Mit Einreißen der Pleura entstand ein artifizieller Pneumothorax und die Lunge löste sich von der Pleura. Auf Grund der Überdruckbeatmung kollabierte die Lunge nicht. Das Diaphragma wurde beidseits den Rippenbogen entlang durchtrennt. Unter Schonung von Aorta und Vena cava wurden auch die anderen durch das Zwerchfell tretenden Strukturen durchtrennt. Das Herz wurde nach Durchtrennung des vorderen Mediastinums von der Brustwand losgelöst. Anschließend erfolgte eine parasternale Thorakotomie mittels Knochenschere. Die beiden Thoraxhälften wurden durch den Assistenten mit 2 Klemmen aufgehalten. Nach stumpfer Entfernung des Thymus wurde das Perikard eröffnet und vorsichtig entfernt.

Aorta und A. pulmonalis wurden am Gefäßursprung mit jeweils einem Faden angeschlungen. Der rechte Ventrikel wurde dann knapp unterhalb der Klappenebene eröffnet und der vorbereitete Pulmonalkatheter unter minimalem Flow in die Arterie eingeführt und eingebunden. Die Herzspitze wurde unter Eröffnung beider Ventrikel entfernt. Danach wurde die Aorta ligiert und der Beatmungsluft CO₂ zur pH-Regulation zugesetzt. Dies war nötig, da die Lunge nun vom restlichen Körper isoliert war. Die Trachea wurde oberhalb des Tubus durchtrennt und die Lunge dann am Tubus hängend aus dem Brustkorb entnommen.

Zur weiteren Präparation erfolgte die Befestigung an einem Stativ. Die Hälfte der rechten Ventrikelwand wurde ebenso wie die linksseitigen Papillarmuskeln entfernt. Das linke Herzohr wurde mit einer Fadenligatur verschlossen. Mittels einer

Tabaksbeutelnaht in den linken Ventrikel wurde dann der Adapter für den venösen Abfluss eingenäht (Mersilene[™]; Ethicon[®]). Die Lunge wurde in der feuchten Kammer freischwingend an der Wägezelle (Messkonverter MC3; HOTTINGER BALDWIN, Darmstadt). aufgehängt.

Es erfolgte dann der Anschluss des venösen Schlauchteils an den Adapter und somit das Schließen des Kreislaufs. Die eventuell in den venösen Schlauchabschnitt eingedrungene Luft wurde manuell durch das Schlauchsystem Richtung Vorratsbehälter geleitet. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug zu diesem Zeitpunkt 25 ml/min bei einer Perfusatemperatur von 4°C.

2.1.4 Kalibrier- und Aufwärmphase

Die Druckaufnehmer wurden mittels Dreiwegehähne an die Innenkatheter angeschlossen, entlüftet und kalibriert. Der Luftdruck in Hilushöhe wurde als Nullpunkt definiert. Die Temperatur am Wärmetauscher wurde auf 37°C gestellt und es startete die Aufwärmphase. Begleitend zur Erwärmung des Perfusats wurde auch die Perfusionsgeschwindigkeit langsam erhöht (15°C: 50 ml/min, 25°C: 75 ml/min, 35°C: 100 ml/min). Der LVP wurde am Ende der Aufwärmphase mittels der höhenverstellbaren Kaskadenvorrichtung auf 2 mmHg eingestellt.

Der pH-Wert des Perfusats wurde in regelmäßigen Abständen (15°C, 25°C, 37°C, sowie nach Perfusatwechsel) an einem BGA-Meßgerät (ABL 30; RADIOMETER COPENHAGEN) gemessen. Dabei wurde der pH-Wert mittels variabler CO₂-Zumischung zur Beatmungsluft zwischen 7,35 und 7,45 möglichst konstant gehalten. Nachdem in der Feuchtkammer eine Temperatur von 37°C herrschte, wurde das Perfusat gewechselt und der pH-Wert nochmals kontrolliert.

Durch die beschriebene Versuchsanordnung und -durchführung konnte ein nahezu Endotoxin-freies rezirkulierendes Perfusat erreicht werden, was bereits in anderen Versuchsreihen gezeigt wurde (Grimminger et al. 1995).

2.1.5 Steady-State-Phase 1

Die Steady-State-Phase 1 dauerte 45 Minuten und war durch folgende Aspekte gekennzeichnet:

- Kein Perfusatverlust an den Einbindungsstellen der Katheter.
- Homogen weiß entblutete Lunge.
- Keine Atelektasen oder Ödeme.
- Keine Gewichts- oder Druckzunahme.

Nur bei Erfüllung dieser Kriterien wurden die Lungen für den anschließenden Versuch zugelassen.

2.2 Messgrößen und Messtechnik

Die Druckregistrierung und -darstellung erfolgte in der Maßeinheit mmHg bzw. Torr, welche nach der internationalen SI-Vereinbarung nicht mehr aktuell, jedoch in der Medizin weit verbreitet ist. Zur Berechnung der Widerstände erfolgte die Umrechnung in Pascal analog dem Umrechnungsfaktor: $133,322 \text{ Pa} = 1 \text{ Torr}$

2.2.1 Messung des pulmonalarteriellen und linksventrikulären Perfusionsdruckes

Die Messung der prä- und postpulmonalen Perfusionsdrücke erfolgte mit flüssigkeitsgefüllten Kathetern, welche über klinikübliche Einmaldruckwandler (s.o.) an den Messverstärker geleitet wurden. Die Druckregistrierung erfolgte kontinuierlich mit Hilfe eines Mehrkanalschreibers (Papiervorschub 2 mm/min , Empfindlichkeit 1 mm/mmHg).

Um Schreiberungenauigkeiten vorzubeugen, wurde während des Versuchs in regelmäßigen Abständen der Nullpunkt bestimmt.

2.2.2 Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$)

Physiologie: Beim Flüssigkeitsaustausch zwischen Intravasalraum und Interstitium stellt sich ein Fließgleichgewicht über der Kapillarwand ein. Dieser durch Filtration und Reabsorption gekennzeichnete Vorgang wird hauptsächlich durch die hydrostatischen (Δp) und kolloidosmotischen ($\Delta\pi$) Drücke in den jeweiligen Kompartimenten bestimmt. Der effektive Filtrationsdruck (p_{eff}) wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$p_{\text{eff}} = \Delta p - \Delta\pi = (p_c - p_{is}) - (\pi_{pl} - \pi_{is}) \quad (2.2.2 - 1)$$

p_c : hydrostatischer Kapillardruck

p_{is} : hydrostatischer Druck im Interstitium

π_{pl} : kolloidosmotischer Druck im Plasma/Perfusat

π_{is} : kolloidosmotische Druck im Interstitium

Beim $K_{f,c}$ handelt es sich um eine rechnerisch ermittelte Größe, die ein Maß für die Kapillarpermeabilität bei isotonen Flüssigkeiten darstellt. Er ist das Produkt aus Leitfähigkeit der Kapillarwand und Austauschfläche.

Die so genannte Starling-Gleichung (Starling 1896) beschreibt das pro Zeiteinheit filtrierte Volumen (I_v):

$$I_v = K_{f,c} \cdot p_{eff} = K_{f,c} [(p_c - p_{is}) - \sigma(\pi_{pl} - \pi_{is})] \quad (2.2.2 - 2)$$

σ : Reflexionkoeffizient

Für nicht-isogravimetrische Zustände, d.h. bei einem Ungleichgewicht zwischen Filtration und Reabsorption, gilt $\sigma = 0$. Dadurch wird I_v direkt proportional zur effektiven Druckdifferenz ($\Delta p = p_{eff}$) zwischen Perfusat und Interstitium.

Es gilt somit:

$$K_{f,c} = \frac{I_v}{\Delta p} \quad (2.2.2 - 3)$$

I_v ist außerdem proportional der Gewichtszunahme der Lunge ΔW pro Zeiteinheit Δt und somit eine bekannte Messgröße:

$$I_v = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot \rho} \quad (2.2.2 - 4)$$

ρ : Perfusatdichte [$\rho = 1 \text{ g / cm}^3$]

Somit gilt:

$$K_{f,c} = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot \Delta p \cdot \rho} \quad (2.2.2 - 4) \text{ in } (2.2.2 - 3)$$

Experimentelle Bestimmung: Die experimentelle Bestimmung des $K_{f,c}$ erfolgte durch eine Störung des während der steady-state-Phase eingetretenen Fließgleichgewichtes ($\Delta p = 0$). Der linksventrikuläre Druck (und konsekutiv auch der

intrakapillare) wurde um einen definierten Wert von 10 cmH₂O über einen Zeitraum von 8 min erhöht (Hydrostatic Challenge) (Richardson et al. 1979). Der in der Folge einsetzende Volumenstrom des Perfusats aus dem Intravasalraum in das Interstitium, welcher über die resultierende Gewichtszunahme registriert wurde (Papiervorschub 15 mm/min, Empfindlichkeit 10 mm/g), führte zur Einstellung eines neuen Gleichgewichtes auf einem höherem Niveau. Der Volumenstrom nahm dabei bis zur Einstellung des neuen Fließgleichgewichts in vergleichbaren Zeitintervallen um einen jeweils entsprechenden prozentualen Anteil ab. Folgende Exponentialfunktion beschreibt den $K_{f,c}$ in Abhängigkeit von der Zeit:

$$K_{f,c(t)} = K_{f,c} \cdot e^{-kt}$$

e: Euler'sche Zahl, $e = 2,718\dots$

k: Proportionalitätsfaktor

Der initial überproportional starke Gewichtsanstieg des Hydrostatic Challenge (HC) wurde durch die druckpassive Füllung der Gefäße verursacht (→ Compliance). Dies machte die Bestimmung von $I_{v(0)}$ als Steigung der Gewichts-Zeit-Kurve zum Zeitpunkt $t = 0$ min des HC unmöglich. Deshalb war es notwendig, $I_{v(t)}$ zu den Zeitpunkten $t = 3,4,5,6,7,8$ min zu ermitteln und nach Logarithmieren der so berechneten Werte ($K_{f,c(t)}$) den $K_{f,c}$ als Steigung einer Regressionsgeraden durch diese Werte zu berechnen (Gaar et al. 1967). Nach Delogarithmierung des so ermittelten Wertes wurde dieser auf das Lungenfeuchtgewicht (wet weight lung, WWL) bezogen. Dieses wurde nach folgender Formel aus dem Körpergewicht (body weight, BW) des verwendeten Versuchstieres berechnet (Seeger et al. 1986):

$$WWL = BW \cdot 0,0024 \quad [g]$$

Der $K_{f,c}$ hat damit folgende Dimension:

$$[cm^3 / s \cdot cmH_2O \cdot g]$$

2.2.3 Bestimmung der Compliance

Die Compliance ist Maß für die druckpassive Dehnung der pulmonalen Gefäße bei Volumenbelastung. Es gilt folgende Beziehung:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$$

Unter Versuchsbedingungen wurde die Volumenzunahme durch die Erhöhung des LVP (→ HC) erreicht.

Der Zahlenwert wurde abgeschätzt durch Anlegen einer Tangente an die Gewichts–Zeit–Kurve des Hydrostatic Challenge bei $t=2$ min und Extrapolation der gesamten Gewichtszunahme der Lunge von diesem Zeitpunkt zurück auf den Beginn des Hydrostatic Challenge ($t=0$ min). Der so gefundene Wert wurde auf den Betrag der linksventrikulären Druckerhöhung bezogen (Richardson et al. 1979).

Als Dimension von C ergibt sich somit:

$$[C = \text{g} / \text{cmH}_2\text{O}]$$

2.2.4 Bestimmung der Retention (ΔW)

Die Differenz des Lungengewichts vor und nach Ablauf des Hydrostatic Challenge wird als Retention ΔW [g] bezeichnet. Sie ist ein Maß für die irreversible Zunahme der interstitiellen Flüssigkeit im Verlauf der Druckkaskade.

Bei der ΔW -Bestimmung zeigte sich, dass nach Ende des Hydrostatic Challenge das Gewicht sich ebenfalls gemäß einer Exponentialfunktion seinem neuen (um ΔW erhöhten) Ausgangswert näherte. Deshalb wurde die Retention nicht zu einem vorher definierten Zeitpunkt gemessen, sondern individuell nach Einstellung des neuen Gleichgewichts mit ihrem kleinstmöglichen Wert.

2.2.5 Bestimmung des pulmonalkapillären Druckes (PCP)

Der PCP wurde mit Hilfe der “Double–Occlusion–Methode“ bestimmt. Unter simultanem Abklemmen des prä- und postpulmonalen Abschnitts des Schlauchsystems erfolgte die Herausnahme der Lunge aus dem Perfusionskreislauf für 30 Sekunden. Parallel hierzu wurde ein Bypass eröffnet, so dass die Pumpe nicht

abgeschaltet werden musste. Die Druckregistrierung (Papiervorschub 60 mm/min) lieferte nun den Druck im Kapillarbett, der mit dieser Methode hinreichend genau bestimmt werden konnte (Townsend et al. 1986).

2.2.6 Bestimmung der Gefäßwiderstände (R_a , R_v)

Der pulmonalarterielle (R_a) und der pulmonalvenöse (R_v) Widerstand wurden jeweils mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes berechnet:

$$R = \frac{P_{eff}}{Q} \quad (2.2.6 - 1)$$

R: Widerstand

p_{eff} : Druckgefälle

Q: Stromstärke

Somit gilt für R_a :

$$R_a = \frac{p_a - p_{cap}}{Q} \quad (2.2.6 - 2)$$

R_a : pulmonalarterieller Widerstand

p_a : pulmonalarterieller Druck

p_{cap} : pulmonalkapillärer Druck

Q: Perfusionsgeschwindigkeit (konstant 100 ml/min)

Analog gilt für R_v :

$$R_v = \frac{p_{cap} - p_v}{Q} \quad (2.2.2 - 3)$$

R_v : pulmonalvenöser Widerstand

p_v : pulmonalvenöser Druck

Die Widerstände werden in folgender Einheit angegeben:

[Pa·s / ml]

(Zur Berechnung erfolgte die Umrechnung der Drücke von Torr nach Pascal)

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Versuchsablauf und Stimulation

Nach der ersten steady state Phase (45 min) wurde zum Zeitpunkt $t = -45$ min in reinem Ethanol gelöstes Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) (200 nM) als Bolus in den Perfusatbehälter gegeben. In Vorversuchen konnte die neutrale Wirkung geringer Mengen reinen Ethanols auf das Lungenmodell gezeigt werden. PMA, ein Phorbol-ester, ist bekannt als potentes lungenschädigendes Agens, das unter anderem auch eine pulmonale Hypertonie verursacht (O'Flaherty et al. 1980; Perry and Taylor 1988). Die optimale Konzentration, gekennzeichnet durch eine maximal mögliche Druckerhöhung ohne gleichzeitige Dekompensation des Lungenmodells, wurde in Vorversuchen ermittelt.

Es erfolgte der Start einer zweiten, ebenfalls 45-minütigen steady state Phase. Alle Lungen befanden sich am Ende dieser Phase auf einem konstant verlaufenden Druckniveau. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde der jeweilige NO-Donator entweder als Bolus in den arteriellen Schenkel gespritzt ("S(oluble)-Gruppe"), oder mittels eines Verneblers als Aerosol ("A-Gruppe") appliziert. Hierzu wurde ein kleiner Ultraschallvernebler (PortaSonic D8500, Sunrise Medical/DeVilbiss, Malsch) in den Inspirations-schenkel des Beatmungsschlauches zwischengeschaltet (Abb.2).

Das vernebelte Flüssigkeitsvolumen entsprach dem der systemischen Gabe (3 ml), wobei NaCl 0,9 % als Verdünnungslösung verwendet wurde. Die Verneblungszeit bewegte sich dabei zwischen 5 und 8 Minuten.

Folgende Stoffe wurden in jeweils gleicher Menge systemisch und als Aerosol appliziert:

S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) 3 μmol (Aerosol $n=8$; system. $n=8$)

Nitroprussidnatrium (SNP) (Nipruss[®]) 3 μmol (Aerosol $n=7$; system. $n=8$)

Glyceroltrinitrat (TNG) (Nitrolingua[®]) 0,1 μmol (Aerosol $n=7$; system. $n=7$)

(in Klammern die jeweiligen Versuchszahlen)

Die eingesetzten Stoffmengen wurden ebenfalls in Vorversuchen ermittelt. Eine weitere Erhöhung der Stoffmenge brachte keinen stärkeren Effekt im Sinne der

Drucksenkung. Neben den getesteten Substanzen wurden auch Leerkontrollen mit PMA (n=4) als alleinigem Stimulus und ohne jeglichen Stimulus (n=3) durchgeführt. Der pulmonalkapilläre Druck (PCP) wurde zu den Zeitpunkten $t = -75$ min; -30 min; 15 min und 45 min bestimmt. Der kapilläre Filtrationskoeffizient ($K_{f,c}$) wurde zu den Zeitpunkten $t = -60$ min; -15 min und 30 min bestimmt. Die Proben zur NO-Bestimmung wurde zu den Zeitpunkten $t = -75$; 0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 15 ; 30 und 45 min abgenommen. Der Versuch wurde spätestens nach einer Versuchsdauer von $46,5$ min (+2 mal Steady State) abgebrochen. Zur cGMP-Bestimmung wurde dann sofort eine schockgefrorene Gewebprobe der Lunge entnommen. Die NO Perfusatproben wurden für maximal eine Woche bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Biochemische Analytik

2.4.1 NO-Bestimmung

Die Quantifizierung der NO-Bildung wurde mittels einer modifizierten Griess-Methode (Griess 1879) durchgeführt, die neben der Nitrit- (NO_2^-) auch die Nitratbestimmung (NO_3^-) (Miranda et al. 2001) berücksichtigte.

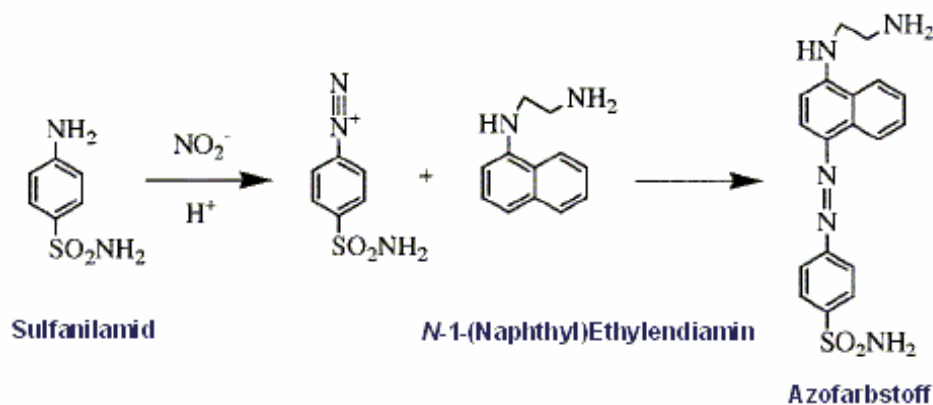


Abb.3: Griess Reaktion

Nitrit ist das einzige stabile Endprodukt der Autooxidation von NO in wässrigen Lösungen. Das Prinzip der Griess-Reaktion besteht in einer Diazotierung des Sulfanilamids in saurer Lösung durch Nitrit und der anschließenden Verbindung mit Ethylendiamin zu einem rosaviolett gefärbten Azofarbstoff. Vanadium(III) dient zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit.

Das Griess Reagenz besteht aus zwei Lösungen: 1.) Lösung A (0,2 g in 100 ml) enthält 0,2 % N-(1-Naphtylen)-Ethylendiamin-Dihydrochlorid in H₂O 2.) Lösung B (1 g in 50 ml) 2 % Sulfanilamid in 5 %-iger Phosphorsäure. Wegen der Lichtsensitivität von Lösung A wurden beide Lösungen erst unmittelbar vor Gebrauch gemischt. Eine gesättigte Vanadium-(III)-Chlorid-Lösung (400 mg VCl₃) wurde in 1 M HCl hergestellt (50 ml).

Die Perfusatproben (2 ml) wurden mittels einer Zentrifuge (Fa. Eppendorf) mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Überstände (ca. 1 ml) wurden in ein separates, mit 100 µl 1 M NaOH befülltes Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden bei -20°C für maximal eine Woche aufbewahrt. Es wurden Standardkurven für NaNO₂ erstellt. Dabei wurden folgende Konzentrationen in sterilem Wasser verwendet: 0,39 / 0,78 / 1,56 / 3,13 / 6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100 µM. Dann erfolgte die photometrische Doppelbestimmung der Proben und Standardkurven. Zu 100 µl Probe wurden unmittelbar hintereinander 100 µl VCl₃ und 100 µl Griess Reagens in die Küvetten gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Dann erfolgte im Photometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 3000) die Bestimmung der optischen Dichte bei 540 nm und die jeweilige Konzentration (in µmol/l) der Versuchssprobe wurde mit Hilfe der Standardkurve errechnet. Aus den beiden, zum jeweiligen Messzeitpunkt gewonnenen, Werten wurde der Mittelwert errechnet.

2.4.2 cGMP Bestimmung

Die Bestimmung von Guanosin 3',5'-cyclomonophosphat (cGMP) erfolgte mit einem, auf polyklonalen Kaninchenantikörpern basierenden, kommerziellen Enzyme-Linked-Immuno-Assay (ELISA)-Kit (Fa R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt). Die Gewebeproben wurde am Versuchsende unter noch laufender Perfusion und Ventilation mittels einer in flüssigem Stickstoff (-74°C) heruntergekühlten Klemme vom linken Unterlappen gewonnen und sofort im Gefrierschrank bei -80°C bis zur endgültigen Verarbeitung aufbewahrt. Nach dem Wiegen der jeweiligen Probe wurde 0,1M HCl im Verhältnis 1:10 dazugegeben und mit Hilfe eines Schüttlers homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit 600 g zentrifugiert und der Überstand in eine 50 µl Probe zur Gesamtproteinbestimmung und in eine 300 µl Probe zur cGMP-Bestimmung aufgeteilt. Es wurden Standardkurven mit folgenden Konzentrationen verwendet: 0,08 / 0,4 / 2,0 / 10,0 / 50,0 pmol/ml.

Der cGMP-ELISA wurde analog der Anleitung des Kit-Herstellers durchgeführt. Die cGMP-Konzentrationsbestimmung erfolgte dann mittels Photometrie (405 nm) und anhand der Standardkurven.

Die Bestimmung des Proteingehalts der Proben erfolgte photometrisch nach der "Lowry-Methode" (Waterborg and Matthews 1994). Die Proben wurden 1:3 mit H₂O verdünnt. Es folgte die Herstellung von Standardlösungen mit einer Proteinkonzentration von 0 / 20 / 40 / 60 / 80 µg/ml. 50 µl wurden jeweils aliquot der Standardlösung und den Proben entnommen. Anschließend wurden jeweils 50 µl 1 M NaOH und 900 µl H₂O hinzugefügt. Zu diesen Mischungen gab man jeweils 1 ml Lowry-Reagenz. Es folgte eine 20-minütige Inkubationsperiode bei Zimmertemperatur. Danach wurde Folinlösung hinzugegeben. Nach Beendigung einer nochmaligen Inkubationsperiode (30 Minuten) bestimmte man die optische Densität bei 450 nm und errechnete anschließend die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Standardkurven. Auch hier erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung mit Mittelwertberechnung. Die cGMP-Konzentrationen wurden schließlich ins Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration gesetzt ([cGMP] = nmol/g).

2.5 Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten und hier aufgeführten Pharmaka, Reagenzien und Chemikalien wurden von den angegebenen Firmen bezogen:

Tabelle 3: Substanzverzeichnis

Stoff	Hersteller/Lieferant
ELISA-Kit zum Nachw. von cGMP	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
Glyceroltrinitrat (Nitrolingual [®] infus.)	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co., 25551 Hohenlockstedt
HCl 1 M	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
Heparin-Natrium (Liquemin [®])	Hoffmann-La Roche AG, 79630 Grenzach-Whylen
(S)-Ketaminhydrochlorid (Ketanest S [®])	Parke-Davis GmbH, Berlin
Krebs-Henseleit-Puffer	Serag Wiesner, 95119 Naila
Lidocain (Xylocain [®] 2%)	Astra GmbH, 22876 Wedel
NaCl 0.9 % Infusionslösung	Fresenius AG, 61346 Bad Homburg
Nitroprussidnatrium (Nipruss [®])	Schwarz Pharma AG, 40789 Monheim
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP)	Alexis-Deutschland GmbH, Grünberg
Naphtylen-Ethylendiamin	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
Vanadium(III)Chlorid	Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen
Xylazinhydrochlorid (Rompun [®] 2 %, Injektionslösung)	Bayer AG, Leverkusen

2.6 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM), wenn nicht ausdrücklich auf eine andere Darstellung hingewiesen wird. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA ermittelt (wurde angenommen, wenn $p < 0,05$).

3. Ergebnisse

In den Versuchsreihen wurde das unterschiedliche Verhalten der drei verschiedenen NO-Donatoren S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP), Nitroprussidnatrium (SNP) und Glyceroltrinitrat (TNG) auf einen durch Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) provozierten pulmonalen Hypertonus untersucht.

3.1 Verlauf der pulmonalarteriellen Drücke

Die Ergebnisse der Druckmessungen sind graphisch in den Abbildungen 1-9 zusammengefasst.

In den Kontrollversuchen ohne jeglichen Stimulus lag der PAP am Ende des zweiten steady-state's bei $6,6 \pm 0,4$ torr und stieg über die Versuchsdauer von 45 min nicht weiter an. Am Ende der Versuchsdauer lag der PAP bei $6,3 \pm 0,3$ torr. Bei der alleinigen vasokonstringierenden Stimulation mit PMA (200 nM) stieg der PAP von $6,2 \pm 0,3$ torr zum Zeitpunkt $t = -45$ min innerhalb von 15 Minuten auf $17,6 \pm 1,6$ torr und weiter auf $22,3 \pm 1,7$ torr zum Zeitpunkt $t = 0$ min an. Dann flachte der Druckanstieg etwas ab und stieg in den folgenden 45 Minuten noch bis auf $27,8 \pm 2,9$ torr an.

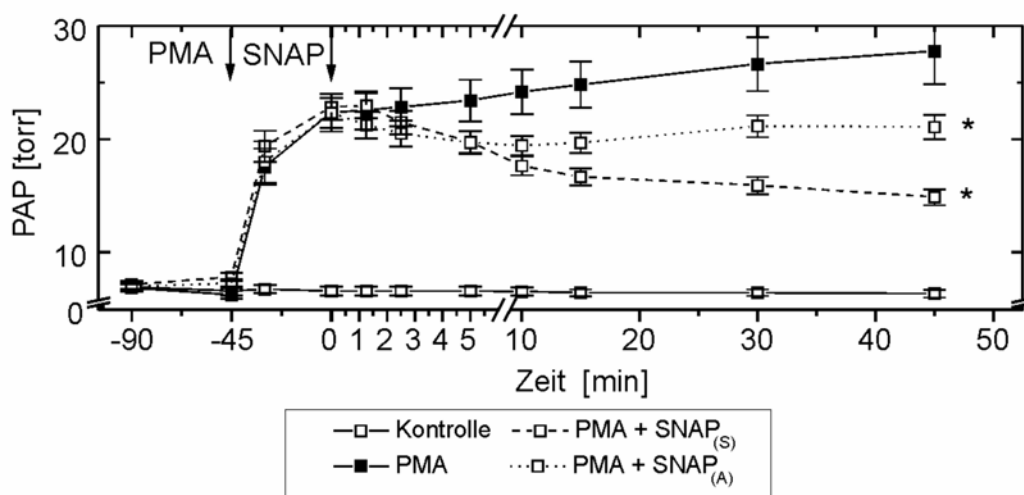


Abb. 4: Druck-Zeit Diagramm Versuchsreihen "SNAP"

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Abbildung 4 fasst die Druckverläufe für **SNAP** und Kontrollgruppen zusammen. In den Versuchsreihen mit SNAP lag der Ausgangsdruckwert nach Stimulation mit PMA

bei $22,8 \pm 1,1$ torr in der systemischen Gruppe bzw. $22,3 \pm 1,3$ torr in der aerosolierten Gruppe. Der Druck sank bei der aerosolierten Applikation initial etwas schneller im Vergleich zur direkten Gabe in das Perfusat. Dafür bewirkte die systemische Gabe eine kontinuierlich bis zum Versuchsende anhaltende, gegen Ende dann nicht mehr so starke Drucksenkung, während der PAP durch vernebeltes SNAP nicht anhaltend gesenkt werden konnte, sondern nach ca. 10 Minuten wieder anstieg.

Ins Perfusat gegebenes SNAP senkte den PAP nahezu um 35 % ($PAP_{45(S)} = 14,9 \pm 0,7$ torr) in Relation zum Ausgangsdruck ($PAP_{0(S)} = 22,8 \pm 1,1$ torr) in dieser Gruppe und um 46 % in Relation zum Vergleichswert in der PMA-Leerkontrolle ($PAP_{45(PMA)} = 27,8 \pm 2,9$ torr).

Wurde SNAP vernebelt, sank der Druck innerhalb von 10 Minuten ($PAP_{10(A)} = 19,4 \pm 0,9$ torr) um ca. 13 % in Relation zum Ausgangsdruck ($PAP_{0(A)} = 22,3 \pm 1,3$ torr) und um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle ($PAP_{10(PMA)} = 24,2 \pm 2,0$ torr). Der pulmonalarterielle Druck bei Verneblung zu Versuchsende ($PAP_{45(A)} = 21,1 \pm 1,1$ torr) war nur um ca. 5,5 % niedriger als zum Zeitpunkt $t = 0$ min.

Abbildung 5 fasst die Druckverläufe in der Versuchsreihe mit **Nitroprussidnatrium (SNP)** zusammen. Die Ausgangsdruckwerte zum Zeitpunkt $t = 0$ min. lagen bei $21,2 \pm 1,4$ torr (S-Gruppe) bzw. $23,5 \pm 1,7$ torr (A-Gruppe).

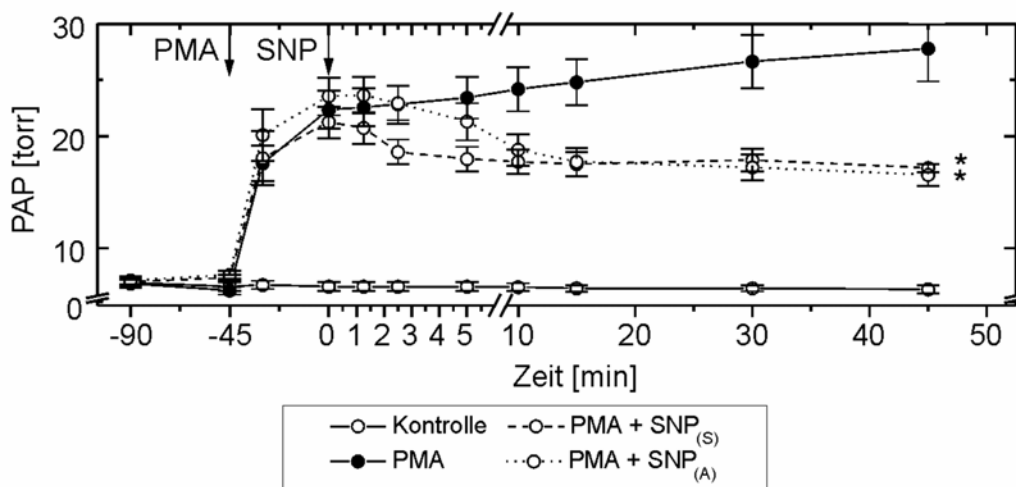


Abb. 5: Druck-Zeit Diagramm Versuchsreihen "SNP"

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Ins Perfusat gegebenes SNP senkte den PAP etwas rascher als nach Verneblung. Dabei sank der Druck innerhalb der ersten 5 Minuten von $21,2 \pm 1,4$ torr auf $18 \pm 1,1$ torr, was einer 15-prozentigen Reduktion entsprach. Danach war die Drucksenkung deutlich schwächer bis zum Endwert $\text{PAP}_{45(\text{S})} = 17,2 \pm 0,4$ torr, was in Relation zum Anfangsdruck einer ca. 19-prozentigen Reduktion entsprach. Bezogen auf den Vergleichsdruck in der PMA-Kontrolle waren dies ungefähr 38 % weniger. Wurde SNP als Aerosol appliziert, so sank der PAP deutlich langsamer. Innerhalb der ersten 5 Minuten ging der Druck von $23,5 \pm 1,7$ torr auf $21,3 \pm 1,7$ torr (ca. 9%ige Reduktion) zurück. Nach 15 Minuten ($\text{PAP}_{15(\text{A})} = 17,7 \pm 1,3$ torr) flachte die Drucksenkungskurve deutlich ab bis zum Endwert $\text{PAP}_{45(\text{A})} = 16,5 \pm 1$ torr. Dies entsprach einer auf den Anfangsdruck bezogenen Druckreduktion um nahezu 30 %. Im Vergleich zur PMA-Kontrolle waren es beinahe 41 % weniger. In beiden Gruppen war aber tendenziell bis zum Versuchsende eine anhaltende Drucksenkung zu beobachten.

Abbildung 6 fasst die Druckverläufe in der Versuchsreihe mit **Glyceroltrinitrat (TNG)** zusammen.

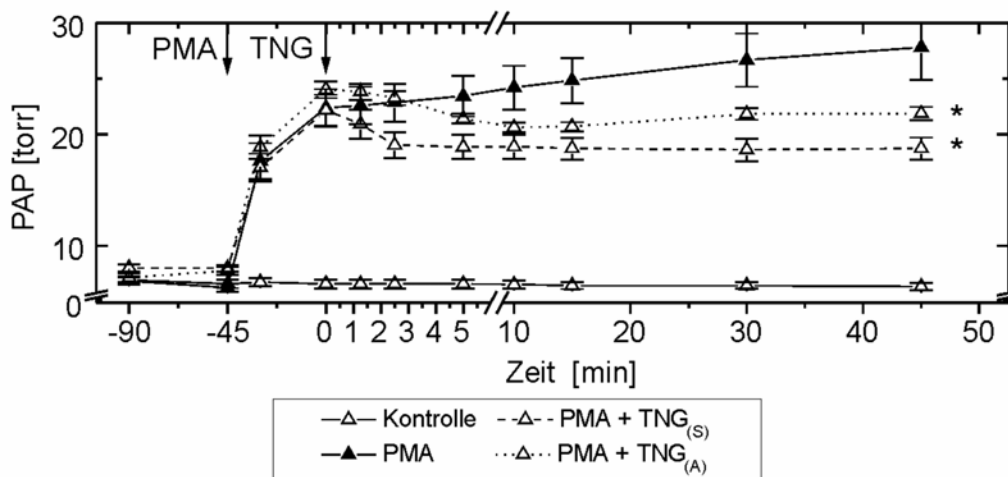


Abb. 6: Druck-Zeit Diagramm Versuchsreihen "TNG"

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Der PAP zu Versuchsstart ($t = 0$ min) lag bei $22,1 \pm 1,4$ torr in der "S-Gruppe" bzw. bei $24 \pm 0,7$ torr in der "A-Gruppe". Dabei wurde der PAP von systemisch

gegebenem TNG innerhalb von 5 Minuten auf $18,8 \pm 1,1$ torr gesenkt und veränderte sich bis zum Versuchsende nicht mehr. Der Endwert bei 45 Minuten betrug $18,7 \pm 1$ torr. Dies entsprach im Vergleich zum Ausgangsdruck einer ca. 15%igen, und im Vergleich zum PMA-Vergleichswert einer nahezu 33%igen Reduktion.

Vernebeltes TNG senkte den PAP etwas langsamer über einen Zeitraum von ca. 10 min ($PAP_{10(A)} = 20,6 \pm 0,5$ torr) (14%ige Reduktion in Relation zu $PAP_{0(A)}$) und stieg danach nur geringfügig an ($PAP_{45(A)} = 21,8 \pm 0,6$ torr). Der Enddruck entsprach in Relation zum Anfangsdruck einer 9%igen bzw. in Relation zur PMA-Kontrolle einer 22%igen Reduktion.

Es zeigte sich, dass die Höhe der maximalen Druckänderung ($\Delta PAP_{max.}$) nach Vasorelaxantienapplikation abhängig war vom Ausgangsdruckwert zum Zeitpunkt $t=0$ min. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes wurde $\Delta PAP_{max.}$ der einzelnen Versuche jeweils in Korrelation mit dem dazugehörigen Wert für $PAP_{(t=0)}$ gesetzt. Durch die entstehenden Wertepaare wurde jeweils eine Regressionsgerade gelegt. Die Werte für $\Delta PAP_{max.}$ wurden nachträglich mit folgenden Formeln errechnet:

$$\Delta PAP_{max.} = PAP_{(t=0)} - PAP_{min.} \text{ für die Versuche mit NO-Donatoren}$$

$$\Delta PAP_{max.} = PAP_{max.} - PAP_{(t=0)} \text{ für die Kontrollversuche mit PMA.}$$

Die Steigung der Regressionsgeraden wird dadurch zum Wirksamkeitsmaß der vasodilatorischen Potenz. Dabei sieht man in den PMA-Kontrollen durch den immer eintretenden Druckerhöhung nach PMA-Stimulation eine positive Steigung der Regressionsgeraden. Die entsprechenden Schaubilder sind in den Abbildungen 7, 8 und 9 dargestellt, wobei die PMA-Kontrolle (links) mit dem vernebeltem (rechts) und dem gelöstem (Mitte) NO-Donator verglichen wird.

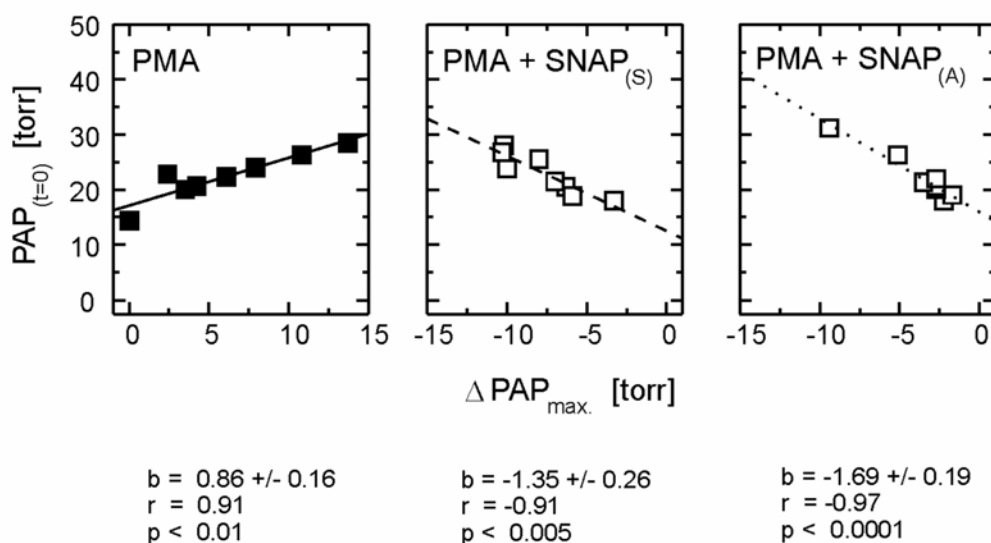


Abbildung 7: Verhältnis zwischen maximalem Druckabfall und PAP zum Zeitpunkt $t=0$ min nach Injektion (mittleres Schaubild) bzw. Verneblung (rechtes Schaubild) von SNAP; zum Vergleich Verhältnis Druckanstieg und Ausgangsdruck in der PMA-Kontrolle (linkes Schaubild); dargestellt sind die Regressionsgeraden, Steigung der Regressionsgeraden (b), Korrelationskoeffizienten (r) und statistische Signifikanz (p).

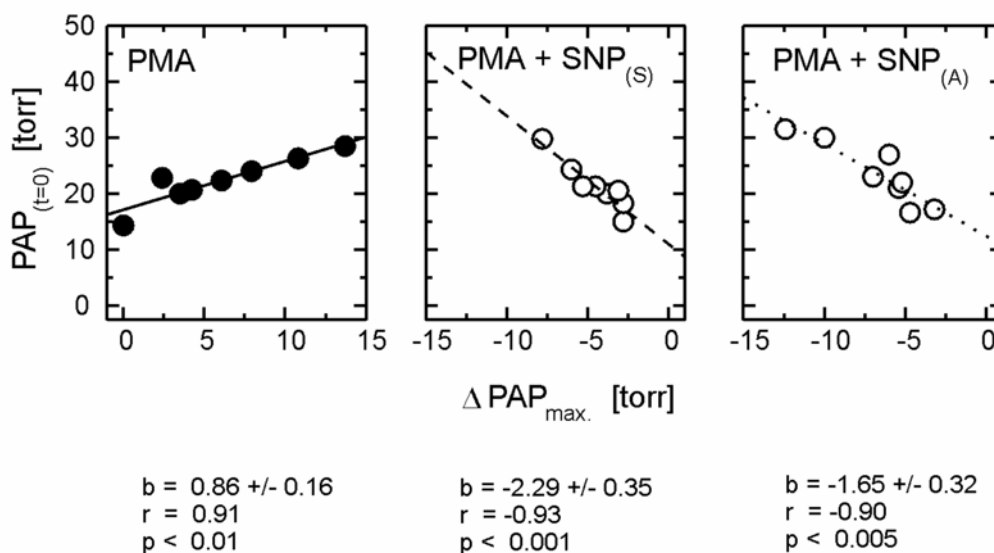


Abbildung 8: Verhältnis zwischen maximalem Druckabfall und PAP_0 bei der Anwendung von SNP

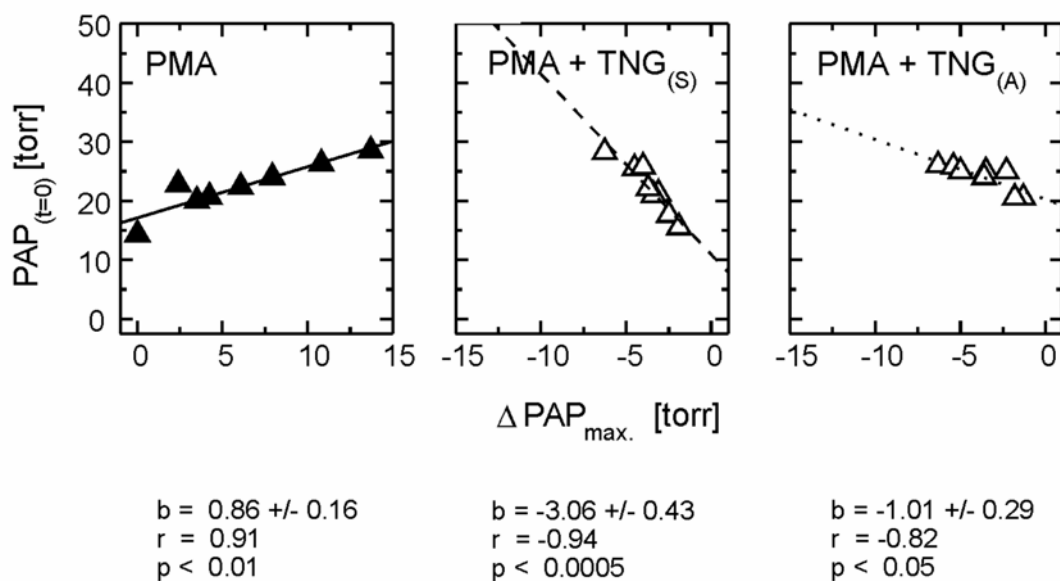


Abbildung 9: Verhältnis zwischen maximalem Druckabfall und PAP₀ bei der Anwendung von TNG

Es zeigte sich, dass SNAP und SNP als Aerosol gegeben, ungefähr gleich potent waren, während TNG etwas schwächer wirkte. Im Gegensatz dazu war TNG bei der systemischen Gabe etwas potenter als SNP und auch als SNAP, welches die schwächste Potenz bei systemischer Applikation aufwies.

3.2 Pulmonalkapillärer Druck und pulmonale Gefäßwiderstandsverteilung

Der PCP und pulmonale Gefäßwiderstand wurde mit der in Kap. 2.2.5 beschriebenen "double-occlusion-Methode" bestimmt. Die daraus gewonnenen Messergebnisse sind in den Abbildungen 10-12 graphisch verdeutlicht.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse für die Versuchsreihen mit SNAP dargestellt. Im linken Schaubild wird der PCP der unterschiedlichen Versuche zum gleichen Zeitpunkt miteinander verglichen. Dabei sieht man, dass in der Kontrollgruppe der PCP relativ konstant um 3 torr blieb.

In der PMA-Kontrolle stieg dieser von $3,4 \pm 0,2$ torr ($t = -75$ min) auf $5,8 \pm 0,4$ torr ($t = -30$ min), um von dort noch geringfügig anzusteigen ($PCP_{PMA\ 45} = 7,0 \pm 0,4$ torr). Wurde SNAP ins Perfusat gegeben, änderten sich die Werte geringfügig. Der PCP war zum Zeitpunkt $t = 15$ min etwas kleiner ($PCP_{PMA\ 15} = 7,4 \pm 0,6$ torr vs. $PCP_{SNAP(S)15} = 6,1 \pm 0,4$ torr).

Wurde SNAP als Aerosol deponiert, ergab sich ebenfalls keine signifikante Änderung in den PCP-Werten ($PCP_{SNAP(A)45} = 7,2 \pm 0,5$ torr) im Vergleich zur PMA-Kontrolle bzw. zur systemischen Gabe.

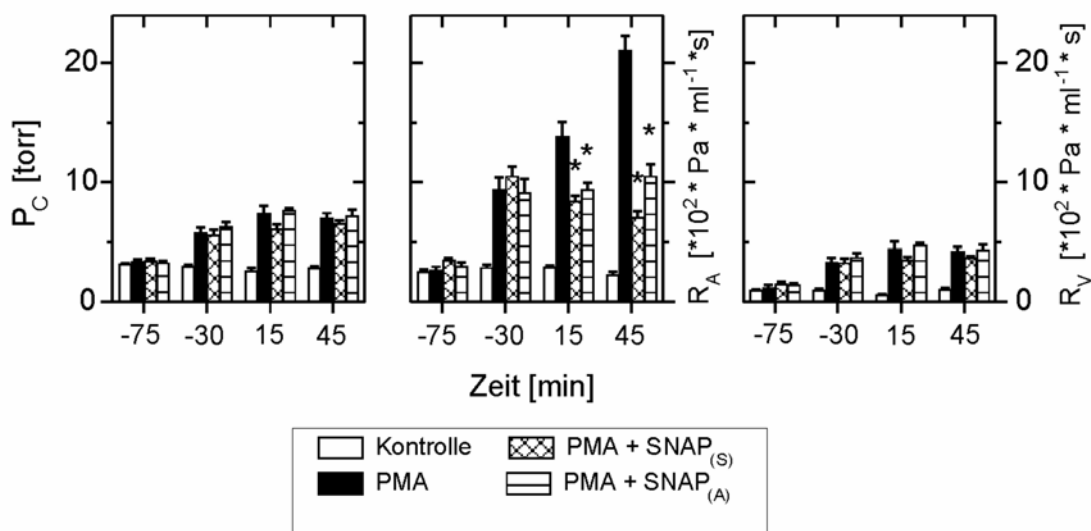


Abb. 10: PCP, R_A und R_V in den Versuchsreihen mit SNAP

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Der pulmonalarterielle Widerstand, der in den Leerkontrollen während der gesamten Versuchsdauer nahezu konstant $<300 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$ war, stieg in der PMA-Kontrolle kontinuierlich und erreichte am Versuchsende $2109 \pm 123 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$.

Wurde SNAP ins Perfusat dazugegeben, so betrug der R_A zum Zeitpunkt $t = 15 \text{ min}$ noch $840 \pm 44 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$ und sank bis zum Versuchsende auf $706 \pm 50 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$ ab. Dies entsprach im Vergleich zur PMA-Kontrolle einer Verminderung um ca. 39 % zum Zeitpunkt $t = 15 \text{ min}$ und um rund zwei Drittel bei Versuchsende.

Wurde SNAP vernebelt, betrug die Reduktion bei 15 min ca. 32 % ($937 \pm 60 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$) und blieb dann nahezu konstant. Dies entsprach in etwa der Hälfte in Relation zum entsprechenden PMA-Wert (1053 ± 100 vs. $2109 \pm 166 \text{ Pa}\cdot\text{s/ml}$). Sie war somit etwas geringer ausgeprägt als bei der Gabe ins Perfusat.

Der pulmonalvenöse Widerstand stieg, wegen der konstanten Einstellung des venösen Druckes auf 2 torr, analog der pulmonalkapillären Druckerhöhung etwas an. Es kam aber zu keinem Anstieg des pulmonalvenösen Druckes, was auf eine überwiegend im präkapillären Gefäßbett lokalisierte Vasokonstriktion hinweist.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse für die Versuchsreihen mit SNP dargestellt. Die Ergebnisse für die Leerkontrolle bzw. PMA-Kontrolle sind bereits oben dargestellt.

Der PCP wurde durch den Einsatz von SNP ebenfalls nur schwach beeinflusst. Bei der systemischen Gabe betrug der PCP zum Zeitpunkt $t = 15 \text{ min}$ $6,7 \pm 0,4 \text{ torr}$ (vs. $\text{PCP}_{\text{PMA } 15} = 7,4 \pm 0,6 \text{ torr}$) und änderte sich bis zum Versuchsende nicht signifikant ($\text{PCP}_{\text{SNP } 45} = 6,8 \pm 0,2 \text{ torr}$). Wurde SNP vernebelt, so entsprach der 15-Minutenwert dem bei Systemgabe.

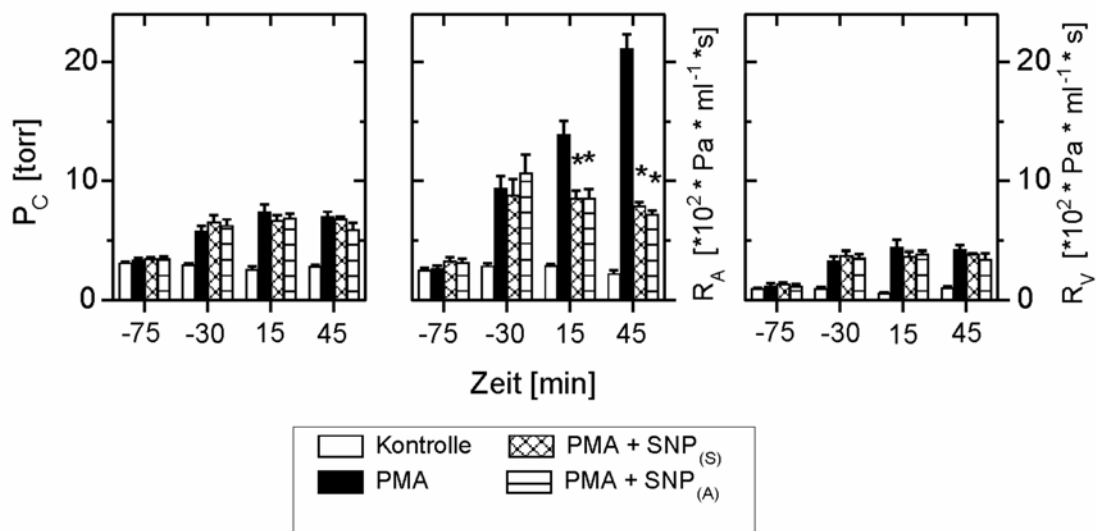


Abb. 11: PCP, R_A und R_V in den Versuchsreihen mit SNP

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Die Ergebnisse für R_A in den Leerkontrollen bzw. PMA-Kontrollen sind analog zu den bereits unter SNAP dargestellten Messwerten. Wurde SNP ins Perfusat dazugegeben, so betrug R_A nach 15 Minuten noch 855 ± 63 Pa·s/ml, was ca. 38 % unter dem Vergleichswert nach alleiniger PMA-Gabe lag. Bis zum Versuchsende war der Widerstand auf 787 ± 37 Pa·s/ml abgesunken. Dies entsprach einer nahezu 63%igen Reduktion im Vergleich zur PMA-Kontrolle. Wurde SNP als Aerosol appliziert, betrug der 15-Minutenwert 854 ± 78 Pa·s/ml (ebenfalls 38%ige Reduktion). Der R_A bei Versuchsende lag um ca. 66 % (720 ± 31 Pa·s/ml) unter dem PMA-Vergleichswert.

Abbildung 12 stellt die Messergebnisse der Versuche dar, die mit TNG durchgeführt wurden. Der PCP bei systemischer Anwendung von TNG betrug zum Messzeitpunkt "15 Minuten" $8,5 \pm 0,9$ torr. Dies entsprach in etwa dem Wert bei Verneblung. Bis zum Versuchsende ergab sich auch hier keine signifikante Veränderung der gemessenen Drücke.

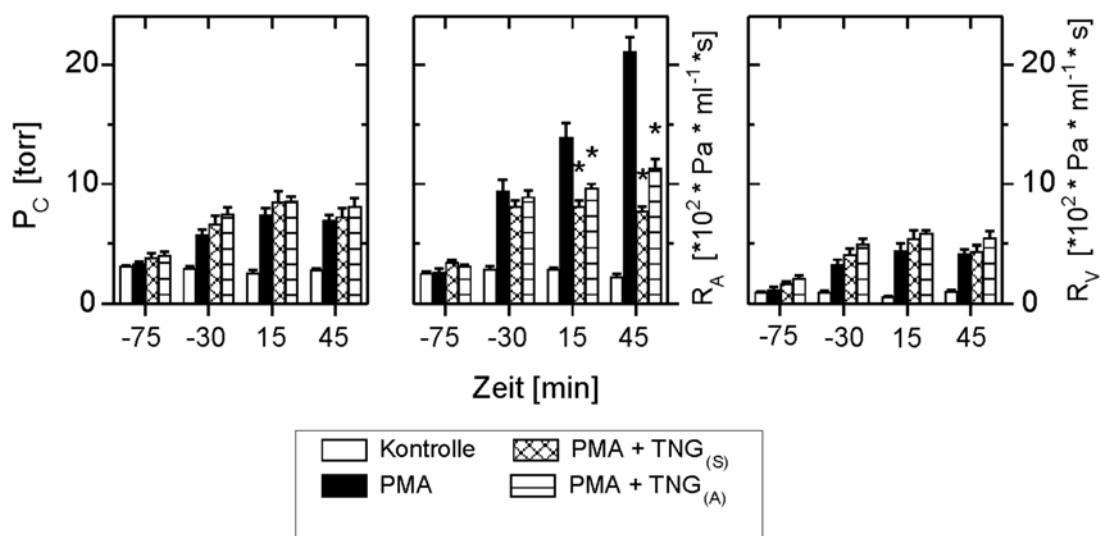


Abbildung 12: PCP, R_A und R_V in den Versuchsreihen mit TNG

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Bei direkt ins Perfusat gegebenem TNG betrug der pulmonalarterielle Widerstand zum Zeitpunkt $t = 15$ min. $813 \pm 51 \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{ml}$, was ungefähr 41 % unter dem PMA-Vergleichswert lag. Bei Versuchsende lag der R_A um 63 % niedriger ($774 \pm 38 \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{ml}$).

In den Verneblungsversuchen lag der R_A höher und betrug nach 15 Minuten $967 \pm 32 \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{ml}$ (30 % unter den PMA-Vergleichswerten), was sogar noch über dem 30-Minutenwert lag. Bis zum Versuchsende stieg der Widerstand dann weiter an ($1133 \pm 74 \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{ml}$) und lag ungefähr 46 % unter dem PMA-Wert.

3.3 Gefäßpermeabilität und Compliance

Die Ergebnisse für den kapillären Filtrationskoeffizienten, Compliance und Gewichtsänderung sind in den Tabellen 4-6 dargestellt.

Nach dem ersten "steady-state" gab es zwischen allen Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied in $K_{f,c}$, C und ΔW . Im weiteren Verlauf zeigte sich in der PMA-Kontrolle ein Anstieg des $K_{f,c}$ um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Leerkontrolle. Die $K_{f,c}$ -Werte der verschiedenen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant, waren aber in keinem Fall größer als in der PMA-Kontrolle.

Die Compliance wurde im Vergleich zur Leerkontrolle durch Zugabe von PMA gesenkt, der Einsatz der verschiedenen NO-Donoren erzeugte aber keine signifikante Änderung.

Die Anwendung der NO-Liberatoren erbrachte keine signifikante Veränderung von ΔW im Vergleich zur PMA-Kontrolle.

Tabelle 4: $K_{f,c}$, C und ΔW für Versuchsreihen mit SNAP; Daten errechnet aus der Gewichtszeitkurve während des Hydrostatic Challenge

		Hydrostatic challenge			
Gruppe		Steady state 1 t = -60 min	Steady state 2 t = -15 min	Experiment t = 30 min	
Kontrolle	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.02 ± 0.11	0.99 ± 0.14	1.62 ± 0.21
	C	[g/cm H ₂ O]	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
	ΔW	[g]	1.28 ± 0.15	1.62 ± 0.08	1.67 ± 0.13
PMA	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.14 ± 0.17	1.20 ± 0.11	3.45 ± 1.32
	C	[g/cm H ₂ O]	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	ΔW	[g]	0.88 ± 0.34	0.94 ± 0.09	2.75 ± 0.51
PMA + SNAP _(S)	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.18 ± 0.13	1.28 ± 0.14	1.86 ± 0.18
	C	[g/cm H ₂ O]	0.35 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	ΔW	[g]	0.75 ± 0.13	1.44 ± 0.25	2.72 ± 0.32
PMA + SNAP _(A)	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.25 ± 0.15	1.28 ± 0.09	2.33 ± 0.14
	C	[g/cm H ₂ O]	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.03
	ΔW	[g]	1.29 ± 0.30	2.00 ± 0.36	3.06 ± 0.52

Tabelle 5: $K_{f,c}$, C und ΔW für Versuchsreihen mit SNP; Daten errechnet aus der Gewichtszeitkurve während des Hydrostatic Challenge

		Hydrostatic challenge			
Gruppe		Steady state 1	Steady state 2	Experiment	
		t = -60 min	t = -15 min	t = 30 min	
<i>Kontrolle</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.02 ± 0.11	0.99 ± 0.14	1.62 ± 0.21
	C	[g/cm H ₂ O]	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
	ΔW	[g]	1.28 ± 0.15	1.62 ± 0.08	1.67 ± 0.13
<i>PMA</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.14 ± 0.17	1.20 ± 0.11	3.45 ± 1.32
	C	[g/cm H ₂ O]	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	ΔW	[g]	0.88 ± 0.34	0.94 ± 0.09	2.75 ± 0.51
<i>PMA + SNP_(S)</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.14 ± 0.19	1.02 ± 0.15	3.28 ± 1.15
	C	[g/cm H ₂ O]	0.35 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	ΔW	[g]	0.89 ± 0.15	1.70 ± 0.28	2.72 ± 0.32
<i>PMA + SNP_(A)</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.25 ± 0.15	1.28 ± 0.09	2.33 ± 0.14
	C	[g/cm H ₂ O]	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.03
	ΔW	[g]	1.29 ± 0.03	2.00 ± 0.36	3.06 ± 0.52

Tabelle 6: $K_{f,c}$, C und ΔW für Versuchsreihen mit TNG; Daten errechnet aus der Gewichtszeitkurve während des Hydrostatic Challenge

		Hydrostatic challenge			
		Steady state 1 t = -60 min	Steady state 2 t = -15 min	Experiment t = 30 min	
<i>Kontrolle</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.02 ± 0.11	0.99 ± 0.14	1.62 ± 0.21
	C	[g/cm H ₂ O]	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
	ΔW	[g]	1.28 ± 0.15	1.62 ± 0.08	1.67 ± 0.13
<i>PMA</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.14 ± 0.17	1.20 ± 0.11	3.45 ± 1.32
	C	[g/cm H ₂ O]	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	ΔW	[g]	0.88 ± 0.34	0.94 ± 0.09	2.75 ± 0.51
<i>PMA + TNG_(S)</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	1.18 ± 0.17	0.92 ± 0.14	2.15 ± 0.59
	C	[g/cm H ₂ O]	0.39 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	ΔW	[g]	1.00 ± 0.26	1.37 ± 0.29	2.03 ± 0.33
<i>PMA + TNG_(A)</i>	$K_{f,c}$	$[10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$	0.93 ± 0.15	1.20 ± 0.18	2.30 ± 0.12
	C	[g/cm H ₂ O]	0.48 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.03
	ΔW	[g]	0.43 ± 0.30	1.08 ± 0.49	2.80 ± 0.11

3.4 NO-Freisetzung

Die Messergebnisse der Nitritbestimmungen, die als indirektes Maß für die NO-Freisetzung verwendet wurden, sind in den Abbildungen 13-15 dargestellt.

Dabei sieht man, dass es in der Leerkontrolle zu keinem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration im Perfusat kam. Diese blieb während der gesamten Versuchsdauer $< 3 \mu\text{mol/l}$. Auch in der PMA-Kontrolle bewegten sich die Nitritkonzentrationen auf gleich niedrigem Niveau.

In den Versuchsreihen mit SNAP (Abb. 13) sieht man bei der systemischen Gabe einen raschen Anstieg der Nitritkonzentration, nach 2 Minuten bei $8,6 \pm 2,1 \mu\text{mol/l}$ und im weiteren Verlauf bis $12,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ (nach 5 Minuten), die sich dann bis zum Versuchsende auf ähnlichem Niveau hielten.

Während der Verneblung von SNAP stieg die Nitritkonzentration bereits nach der ersten Minute auf $5,1 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$, hielt sich dann aber bis zum Versuchsende relativ konstant. Die Nitritkonzentration nach direkter Perfusatgabe war somit ungefähr doppelt so hoch.

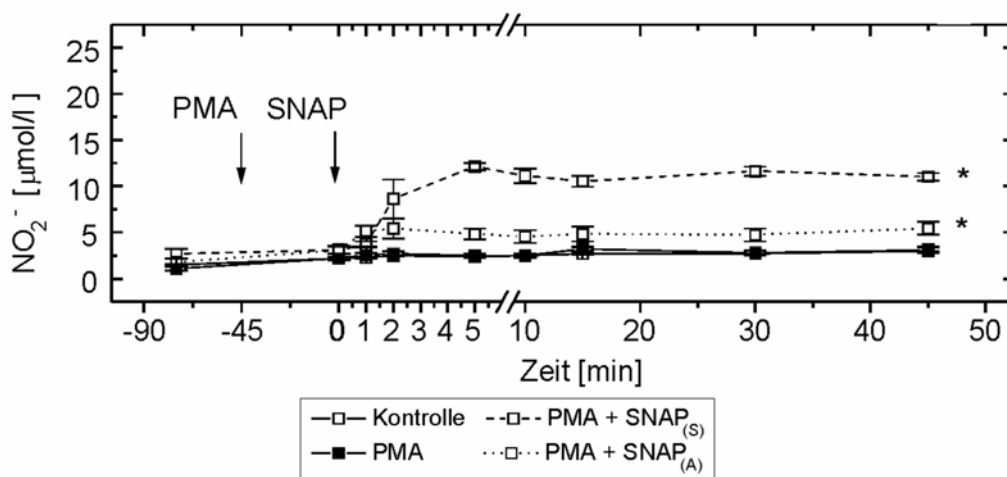


Abbildung 13: Zeitverlauf der Nitritkonzentration im Perfusat für SNAP

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Bei der systemischen Anwendung von SNP (Abb. 14) fiel ein noch stärkerer Anstieg der Nitritkonzentration auf. Nach 5 Minuten betrug sie schon $32 \pm 4,7 \mu\text{mol/l}$ und hielt sich dann bis Versuchsende relativ konstant auf diesem Niveau. Bei der

aerosolisierten Applikation war erst nach 10 Minuten ein Anstieg auf $4,2 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ zu verzeichnen, die noch bis zum Versuchsende auf $5,0 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$ anstieg. Die Nitritkonzentration nach systemischer Applikation war also um mehr als 6 mal höher, als bei Verneblung.

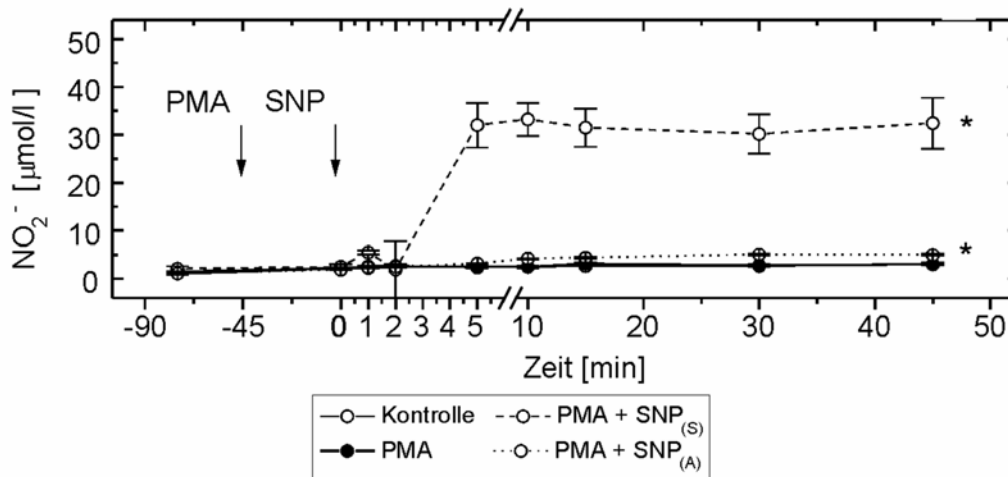


Abbildung 14: Zeitverlauf der Nitritkonzentration im Perfusat für SNP

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

In Abbildung 15 sind der Zeitverlauf der Nitritkonzentrationen in den TNG-Versuchsreihen dargestellt. Wurde TNG direkt ins Perfusat gegeben, so kam es innerhalb der ersten Minute zu einem raschen Anstieg der Nitritkonzentration ($[\text{NO}_2^-]_{1\text{min}} = 8,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$). Nach einer weiteren Minute erreichte sie den vorläufigen Höchstpunkt ($[\text{NO}_2^-]_{2\text{min}} = 16,0 \pm 2,1 \mu\text{mol/l}$), um im weiteren Verlauf etwas zu sinken, aber gegen Versuchsende wieder ansteigend zu sein ($[\text{NO}_2^-]_{45\text{min}} = 15,6 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$). Dagegen kam es während der Applikation als Aerosol zu einem minimalen Ansteigen der Nitritkonzentration ($[\text{NO}_2^-]_{10\text{min}} = 3,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$), die bis zum Versuchsende nahezu konstant blieb ($[\text{NO}_2^-]_{45\text{min}} = 4,0 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$). Die Nitritkonzentrationen während systemischer Gabe waren somit ungefähr 4-mal so hoch wie nach Verneblung.

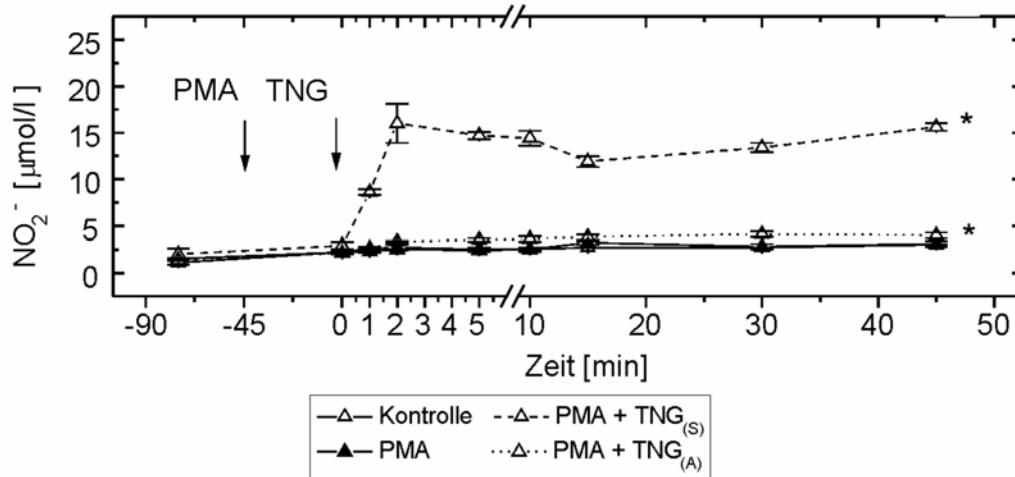


Abbildung 15: Zeitverlauf der Nitritkonzentration im Perfusat für TNG

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

3.5 cGMP-Gehalt des Lungengewebes

In den Leerkontrollen lag der Gehalt von cGMP im Lungengewebe bei $1,84 \pm 0,3$ nmol/g. Durch den alleinigen Einsatz von PMA in den PMA-Kontrollen wurde dieser signifikant auf $0,97 \pm 0,22$ nmol/g reduziert. Die Anwendung der verschiedenen NO-Donatoren führte wieder zu einem Anstieg des cGMP-Gewebegehaltes, so dass sich der cGMP am Versuchsende nicht mehr signifikant von der Leerkontrollgruppe unterschied (Abbildungen 16-18).

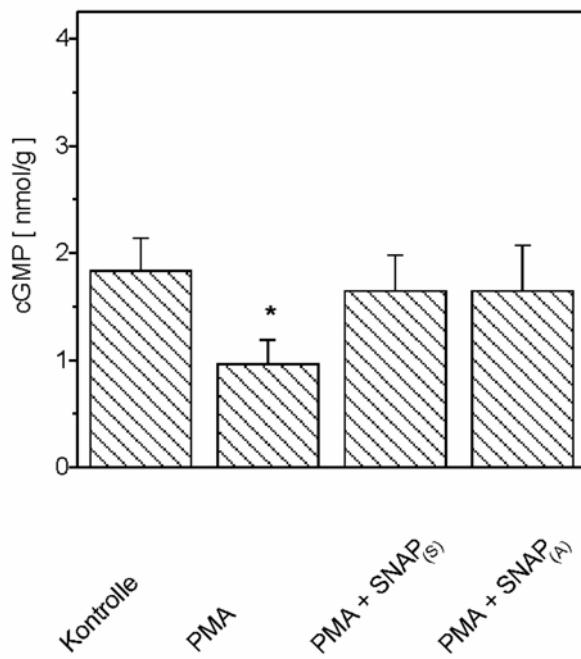


Abbildung 16: Gehalt an cGMP im Lungengewebe in der SNAP-Versuchsreihe

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

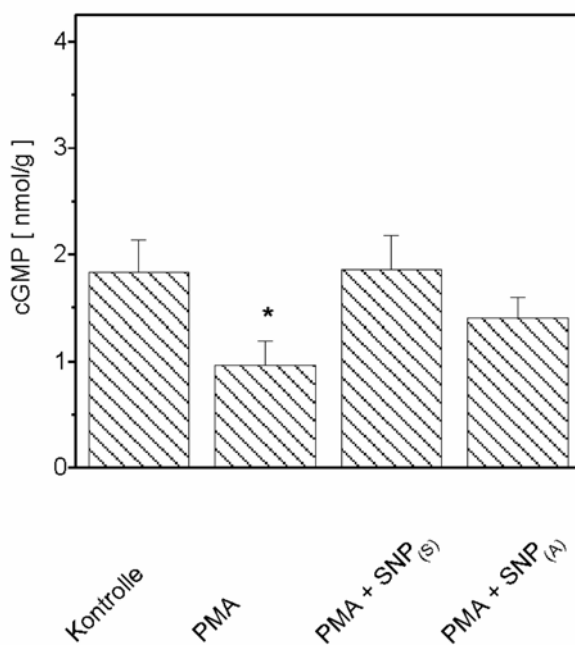


Abbildung 17: Gehalt an cGMP im Lungengewebe in der SNP-Versuchsreihe

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

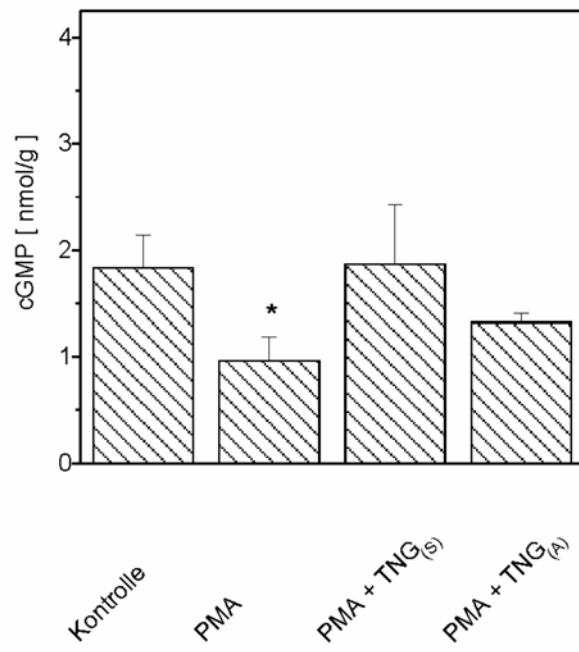


Abbildung 18: Gehalt an cGMP im Lungengewebe in der TNG-Versuchsreihe

* statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

4. Diskussion

4.1 Diskussion des Modells

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge ist eine seit langem anerkannte und gut etablierte Methode zur Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation.

Vorteile sind: die Möglichkeit am isolierten Organ zu arbeiten mit dem Vorhandensein lokaler physiologischer Reaktionen. Der Einfluss von systemischen Mediatoren, Hormonen und Blutbestandteilen kann kontrolliert, oder - wie in unserem Fall - komplett ausgeschlossen werden. Verschiedene physiologische Parameter können direkt "on-line" (z.B. PAP) oder indirekt (z.B. $K_{f,c}$) gemessen werden. Das Puffermedium kann biochemisch auf lokale Mediatoren (z.B. NO-Produktion) oder metabolische Veränderungen (z.B. pH-Wert) analysiert werden.

Dem Modell sind aber auch Grenzen gesetzt: Die verschiedenen biochemischen und hämodynamischen Messwerte können nicht ohne weiteres genau den verschiedenen Zelltypen des Lungengewebes, den Anteilen des Gefäßsystems oder deren Interaktion zugeordnet werden. Auch nach ausgiebiger Spülung der Lunge mit Krebs-Henseleit-Puffer ist ein Verbleiben von ortsständigen Leukozyten (Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen) im Gefäßsystem, und somit eine Beeinflussung der Versuche, nicht sicher auszuschließen. Die unabhängige, isolationsbedingte Aktivierung verschiedener biochemischer oder metabolischer Vorgänge kann trotz der "Steady-State-Bedingungen" nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Haltbarkeit der Lunge im Versuchsaufbau ist zeitlich auf einige Stunden begrenzt – Langzeitversuche sind nicht möglich. Die Abkopplung von der neuronal-vegetativen Steuerung kann sowohl als Vorteil, wie auch als bisher unbekanntes Störmöglichkeit angesehen werden (Seeger et al. 1994).

4.2 PMA-induzierte pulmonale Hypertonie

Phorbol-Myristat-Acetat ist schon seit langem ein bekanntes lungenschädigendes Agens in verschiedenen in-vivo (Johnson and Ward 1982; Loyd et al. 1983; Taylor et al. 1985) und in-vitro Lungenmodellen (Carpenter et al. 1987).

Folgende Effekte wurden dabei in-vivo an Kaninchenlungen beschrieben (O'Flaherty et al. 1980; Shasby et al. 1982):

- 1.) Aggregation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten
- 2.) Thrombozytenaggregation
- 3.) Thrombozyto- und Neutropenie
- 4.) Lungentoxizität mit proteinreichem Ödem.

Perry et al. konnten in isolierten Lungenmodellen nach PMA-Stimulation ein Ansteigen des pulmonalarteriellen Druckes zeigen, unabhängig davon, ob Blut oder ein zellfreies Perfusionsmedium verwendet wurde (Perry et al. 1990). Eine Erhöhung des $K_{f,c}$ als Permeabilitätsmarker des Endothels und somit Indikator eines Lungenödems war dabei an das Vorhandensein von Blutbestandteilen gebunden (Perry and Taylor 1988; Zanaboni et al. 1990).

In unseren Versuchen erhöhte sich der $K_{f,c}$ nur geringfügig, was wir eher als indirekten hydrostatischen Effekt deuten, denn als eine direkte Gewebeschädigung. Diese These wird auch durch die Ergebnisse der "double-occlusion"-Manöver unterstützt, die eine Erhöhung des pulmonalvenösen Widerstandes (R_V) zeigten, welche sich auch durch die Gabe von NO-Donatoren nicht senken ließ.

PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C, wobei die genaue Wirkungsweise noch nicht hinreichend erklärt ist (Castagna et al. 1982).

In unseren PMA-Kontrollversuchen fiel eine bisher nicht beschriebene Verminderung des cGMP-Gehalts des Lungengewebes auf. Wie in den anderen Arbeitsgruppen konnten auch wir in unseren Versuchen eine anhaltende Erhöhung des PAP nach einmaliger Gabe von 200 nM PMA sehen ($PAP_{t-45}=6,2\pm 0,3$ torr vs. $PAP_{t0}=22,3\pm 1,7$ torr). Dieser kontinuierliche Effekt blieb auch nach Austausch des Perfusats bestehen (Daten nicht näher dargestellt), womit ein nachlassender Effekt, unabhängig von den gegebenen NO-Donatoren, ausgeschlossen werden konnte.

Im Gegensatz zum Thromboxanalogon U-46619, einem anderen in isolierten Lungenmodellen gut etablierten pulmonalen Vasokonstriktor (Rimar and Gillis 1995), der kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer verabreicht werden muss, ist bei Verwendung von PMA als Stimulus nur eine einmalige Gabe nötig, um eine stabil anhaltende pulmonale Hypertonie zu erreichen. Der pulmonalarterielle Druckanstieg

entsprach dabei in unseren Versuchen in etwa der Größenordnung wie bei Verwendung von U-46619 (Schütte et al. 1997).

4.3 Applikation der Vasodilatoren

Die systemische Applikation der Substanzen erfolgte in den arteriellen Schenkel, so dass das pulmonale Gefäßbett innerhalb kürzester Zeit erreicht wurde. Der vasodilative Effekt setzte bei Glyceroltrinitrat und Nipruss bereits nach 1,25 Minuten und bei SNAP nach 2,5 Minuten ein.

Zur Aerosolierung wurde ein Ultraschallvernebler verwendet. Dieser zeichnet sich im Vergleich zu anderen Verneblungssystemen, wie z.B. dem "Jet-Vernebler" mit einem high-flow-System, durch einen hohen Effizienzgrad, geringer Verneblungszeit und geringeren Aerosolverlusten aus. Der mindestens gleichwertige Wirksamkeitsgrad konnte sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien gezeigt werden (Fok et al. 1997; Gessler et al. 2001).

Eine zur alveolären Deposition notwendige mittlere mediane aerodynamische Partikelgröße zwischen 1 und 5 μm wird ebenfalls durch die meisten Ultraschallsysteme erreicht. Unvermeidbare Verluste des vernebelten Agens treten durch Haftenbleiben der Aerosolpartikel am Beatmungs- und Verneblungssystem auf. In der tierexperimentellen Studie von Fok et al. konnte ein pulmonaler Depositionsanteil von 5,29 % des ultraschallvernebelten Agens gezeigt werden (Fok et al. 1997). Der Depositionsanteil wurde in unseren Versuchen nicht untersucht, jedoch kann aufgrund des guten vasodilatativen Effekts aller 3 Substanzen von einer ausreichenden Menge ausgegangen werden.

Bei einer Verneblungszeit zwischen 5 und 8 Minuten und einem jeweils konstanten Verneblungsvolumen von 3 ml trat der vasodilative Effekt bei SNAP und Glyceroltrinitrat spätestens nach 1,25 min, bei Nipruss nach spätestens 2,5 min ein. Im Hinblick auf die o.g. Zeiten des Wirkungseintritts bei systemischer Gabe ergab sich somit kein signifikanter Unterschied in der Anschlagszeit. Nach Ende der Verneblung stieg der Druck tendenziell spätestens nach 10 min wieder an. Nur bei Nipruss konnte eine bis zum Schluss anhaltende Drucksenkung gezeigt werden, was die Wirksamkeit dieser Substanz als Aerosol unterstreicht.

Von Vorteil ist die beatmungsdruckneutrale Stoffapplikation der Ultraschallsysteme. Bei Jet-Systemen addiert sich der zur Verneblung notwendige Gasfluss zum vom Beatmungsgerät abgegebenen Inspirationsvolumen, das dann entsprechend korrigiert werden muss, um ein Barotrauma zu vermeiden (Zwissler 2002).

Ein genereller Vorteil dieser inhalativen Therapiestrategie ist die relative Einfachheit und damit auch Wirtschaftlichkeit dieses Systems, was auch bei entsprechender Indikation eine ambulante Therapie zulässt. Diese Vorzüge gelten auch im Vergleich zu der relativ aufwendigen und teuren Technik, die bei der Gabe von NO-Gas notwendig ist.

Ziel inhalativer Therapiestrategien vieler pulmonaler Erkrankungen ist eine möglichst lokale Wirkung ohne systemische Nebenwirkungen. Die in unseren Versuchen ermittelten deutlich niedrigeren Nitritkonzentrationen im Perfusat bei aerosolierter Anwendung der NO-Donatoren, lassen eine relative pulmonalselektive Wirkung vermuten.

4.4 Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck

Alle drei zur Drucksenkung verwendeten Substanzen sind so genannte prodrugs, die das für den vasodilatativen Effekt verantwortliche NO erst freisetzen müssen. Die beiden im klinischen Alltag häufig verwendeten Substanzen Glyceroltrinitrat und Nitroprussid wurden aufgrund ihrer bekannten und bewährten vasodilatativen Wirkung ausgewählt.

In frühen Versuchsreihen wurde versucht, einen trotz intravenöser Gabe möglichst pulmonalselektiven Vasodilatator zu finden. Prielipp et al. konnten in einer in-vivo-Studie bei Schafen eine im Vergleich zu unseren Versuchen ähnliche pulmonalvasodilatative Potenz von systemisch gegebenen Nitroprussid und Glyceroltrinitrat aufzeigen (Prielipp et al. 1988). Die direkte systemische Anwendung von Nitroprussid beim Menschen zeigte zwar eine potente pulmonale Drucksenkung, die aber unter anderem auch mit einem starken Abfall des systemischen Druckes und einer deutlichen Zunahme des Shuntvolumens verbunden war (Radermacher et al. 1988).

Aufgrund der nicht unerheblichen Nebenwirkungen bei systemischer Gabe scheint die inhalative Gabe als therapeutisch erfolgversprechend. Theoretisch soll so eine auf die pulmonale Zirkulation beschränkte Wirkung mit besonderer Selektivität auf gut ventilierte Abschnitte erreicht werden.

Ein ähnlicher Ansatz wird auch durch den therapeutischen Einsatz von NO-Gas zur Therapie der pulmonalen Hypertension verfolgt, welcher nachweislich eine pulmonale Vasodilatation ohne systemischen Druckabfall ermöglicht. Frostell et al. konnten diesen Effekt an einer in-vivo-Studie bei Schafen zeigen. Dabei konnten der durch das Thromboxanalogon U46619 erhöhte pulmonalarterielle Druck und

pulmonalvaskuläre Widerstand jeweils reversibel gesenkt werden (Frostell et al. 1991). Ein entsprechender Effekt wurde kurz darauf auch am Menschen demonstriert (Pepke-Zaba et al. 1991).

Alle drei von uns untersuchten Substanzen zeigten nach inhalativer Anwendung eine gute Senkung des pulmonalarteriellen Drucks. Dabei ließ sich der Trend erkennen, dass die absolute maximale Drucksenkung jeweils mit der Höhe des Ausgangsdruckes zum Zeitpunkt $t=0$ min korrelierte. Der Druckabfall nach Verneblung erfolgte zumindest bei SNP und TNG im Vergleich zur systemischen Gabe über einen etwas längeren Zeitabschnitt, was mit der speziellen Pharmakokinetik und NO-Freisetzung nach Inhalation zusammenhängen dürfte (s.u.).

Während es bei Glyceroltrinitrat zu einer ähnlichen Wirkung - unabhängig von der Darreichungsform - kam, war bei Nipruss sogar eine stärkere Wirkung nach Inhalation zu verzeichnen. Entscheidend ist aber, dass der pulmonalarterielle Druck bei allen Substanzen auch nach Ende der Verneblung unterhalb des Ausgangsdruckes blieb, wobei dieser Effekt bei Nipruss am stärksten ausgeprägt war, während es bei SNAP und Glyceroltrinitrat wieder zu einem leichten Druckanstieg kam. Dies steht im Gegensatz zur Anwendung von NO, bei dem nach Beendigung der Gaszufuhr wieder ein sofortiger deutlicher Druckanstieg zu verzeichnen ist (Frostell et al. 1991).

Die gute vasodilatorische Wirkung von vernebeltem Nipruss konnte auch in anderen Tiermodellen gezeigt werden, die jedoch andere pulmonalhypertensive Stimuli verwendeten. In Versuchsreihen mit Mini-pigs wurde durch Lungenlavage (Yu and Saugstad 1999) oder Hypoxie bzw. Gruppe-B-Streptokokken (Meadow et al. 1998) ein pulmonaler Hypertonus provoziert. Dabei konnten beide Arbeitsgruppen eine Senkung des pulmonalen Druckes durch Nitroprussid zeigen. Schreiber et al. konnten eine gleichwertige Drucksenkung von Nitroprussid vs. NO-Gas bei einem durch Hypoxie induziertem pulmonalen Hypertonus aufzeigen (Schreiber et al. 2002). Bei diesen in-vivo-Versuchen wurde der systemische Blutdruck durch SNP nicht beeinflusst. Bei Verwendung des Thromboxan-Analogons U46619 als pulmonalhypertensiven Stimulus konnten Walmrath et al. in einem ähnlichen Kaninchenlungenmodell ebenfalls eine Wirkung von Nitroprussid nachweisen, wohingegen vernebeltes Glyceroltrinitrat nur einen schwachen Effekt zeigte (Walmrath et al. 1997).

Die Anwendung und Wirkung von inhaliertem Prostaglandin I₂ bei der pulmonalen Hypertonie ist durch experimentelle Studien (Walmrath et al. 1997) und in der Zwischenzeit auch durch klinische Studien (Hoepfer et al. 2000; Olschewski et al. 2002) gesichert. Nachteilig sind aber auch hier die teilweise hohen Behandlungskosten, welche sich auf ca. 75000 € pro Jahr und Patient belaufen (Spiekerkoetter et al. 2001).

Eine günstige Alternative könnte hierbei, speziell bei Notfalltherapien, das von uns getestete, inhalativ verabreichte Nitroprussid sein. Dem Autor ist bislang eine veröffentlichte kleine klinische Studie bei Neugeborenen mit schwerer Hypoxämie bekannt. Hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Oxygenierungssituation bei unbeeinflusstem systemischen Blutdruck. Der pulmonalarterielle Blutdruck wurde nicht bestimmt (Palhares et al. 1998). Weitere klinische Studien sollten deshalb folgen.

4.5 Lokale NO-Freisetzung und biologische Wechselwirkungen

Bei Betrachtung der Lungenselektivität ist es von Interesse, ob die NO-Donoren komplett im Alveolar- und Interstitialraum verbleiben und es dort zur NO-Freisetzung und somit zum Verbrauch kommt, oder ob signifikante Mengen in den Körperkreislauf gelangen und dort systemische Nebenwirkungen entfalten können.

Über die genauen Permeabilitätscharakteristika des Alveolarepithels für die einzelnen Stoffe ist wenig bekannt. Ein denkbarer Ansatz wäre, je hydrophiler der Stoff, desto erschwerter ist der passive Übertritt vom Alveolarraum über die Alveolarepithelschranke in den Interstitialraum und somit in den intravaskulären Raum. Lipophile Stoffe mit der Möglichkeit einer transmembranösen und somit transzellulären Passage könnten leichter und schneller in den Intravasalraum gelangen. Wenn man unsere gemessenen Nitritkonzentrationen betrachtet, so sieht man für alle drei Stoffe ähnliche Werte nach Verneblung, die deutlich unterhalb der gemessenen nach systemischer Gabe liegen. Man kann daher den indirekten Schluss ziehen, dass es aufgrund der lipophileren Stoffeigenschaften, wie z.B. bei Glyceroltrinitrat der Fall, zu keinem übermäßigen Übertritt des Prodrugs in den Intravasalraum im Vergleich zu hydrophileren Stoffen (Nitroprussid) kommt. Das Alveolarepithel bzw. der interstitielle Raum scheinen eine gute Barriere gegenüber den von uns untersuchten NO-Donoren zu sein. Man muss daher hauptsächlich von

einer lokalen NO-Freisetzung ausgehen. In der Literatur sind unterschiedliche NO-Freisetzungswege für die einzelnen Substanzen beschrieben:

S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) ist ein synthetisches S-Nitrosothiol, das als potenter NO-Donor häufig zu experimentellen Zwecken verwendet wird. Die NO-Freisetzung von Nitrosothiolen *in vitro* kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Dies sind die photochemische Zersetzung, die Metallionen-vermittelte Zersetzung (v.a. durch Kupfer) und die Transnitrosation, d.h. die Übertragung von NO von einem stabilen S-Nitrosothiol (z.B. SNAP) zu einem Thiol (z.B. Cystein), wobei ein relativ instabiles S-Nitrosothiol (z.B. S-Nitrosocystein) entsteht, welches dann im Beisein von Kupfer-Ionen NO freisetzt (Singh et al. 1996). Auch in unseren Versuchen konnte eine NO-Freisetzung anhand der gemessenen Nitritkonzentrationen und des vasodilativen Effektes gezeigt werden. Welcher der genannten Mechanismen den größten Anteil an der NO-Produktion hat, kann nicht gesagt werden, sicher scheint aber auf jeden Fall die zentrale Rolle der Kupfer-Ionen zu sein (Al-Sa'Doni and Ferro 2000). Die in der Literatur angegebenen Plasmahalbwertszeiten variieren zwischen 1,15 h (Mathews and Kerr 1993) und 4,6 h (Ignarro et al. 1981), was vermutlich auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen (z.B. Kupfergehalt des Versuchsmilieus) zurückzuführen ist. Inwieweit diese Halbwertszeiten für den Alveolar- und Interstitialraum gelten, kann nicht beurteilt werden.

Die pulmonalvasodilative Potenz von aerosolisiertem und systemisch gegebenen Nitroprussidnatrium (SNP, Nipruss®) ist ähnlich. Nitroprussidnatrium, ein Eisen-Nitrosyl-Komplex, setzt NO ebenfalls nicht-enzymatisch frei. Dabei spielt die Reduktion des Komplexes welche z.B. mit Hilfe von Thiolen oder Myoglobin erfolgt, unter Freisetzung von potentiell toxischem Cyanid, eine entscheidende Rolle (Al-Sa'Doni and Ferro 2000; Bates et al. 1991), was gleichzeitig die maximal applizierbare Dosis limitiert. Ein weiterer Freisetzungsmechanismus wird durch Licht vermittelt. Vor allem Nitroprussid gilt als äußerst potenter und gut steuerbarer (Plasmahalbwertszeit 3-4 min) Vasodilator, der sowohl im venösen als auch im arteriellen Gefäßbett gleich stark wirkt.

Bei Glyceroltrinitrat wurde lange Zeit einzig von einer nicht-enzymatischen Freisetzung unter der intermediären Bildung von S-Nitrosothiolen (Ignarro et al. 1981) ausgegangen. Es gab aber auch Ansätze, die parallel eine enzymatische Freisetzung vermuten ließen (Seth and Fung 1993; Tsuchida et al. 1990; Yeates et al. 1989). In jüngerer Zeit wurde von Chen et. al eine Arbeit veröffentlicht mit der Erklärung eines plausiblen enzymatischen NO-Freisetzungsmechanismus. Dieser befindet sich innerhalb der Mitochondrien der glatten Muskelzellen. Dabei erfolgt die Freisetzung durch eine Aldehyd-Dehydrogenase unter der Bildung von 1,2-Glyceryl-Dinitrat und gleichzeitiger Abspaltung von Nitrit (NO_2^-), welches zu NO reduziert wird (Chen et al. 2002). Die Plasmahalbwertszeit wird mit 2-3 Minuten angegeben. In welchem Kompartiment genau (Alveolar-, Interstitialraum oder intrazellulär innerhalb des Alveolarepithels bzw. der Gefäßmuskulatur) die NO-Donoren intrapulmonal Stickstoffmonoxid freisetzen, kann durch unsere Versuche nicht beurteilt werden.

NO ist extrem lipophil und diffundiert somit leicht durch Zellmembranen entlang seines Konzentrationsgefälles. Daneben kann NO nach seiner Freisetzung neben der Aktivierung der Guanylatcyclase einige biologische wichtige Reaktionen eingehen. In wässrigen sauerstoffhaltigen Lösungen reagiert es hauptsächlich zu dem inaktiven Metabolit Nitrit (NO_2^-) und in geringerer Menge zu Nitrat (NO_3^-) (Ignarro et al. 1993). Durch Reaktion von NO mit Superoxid (O_2^-) entsteht das extrem reagible Oxidans Peroxynitrit (ONOO^-) (Koppenol et al. 1992). Erhöhte Konzentrationen von Peroxynitrit können zur Oxidation, Peroxidation oder Nitrierung und somit direkten Schädigung von wichtigen Zellstrukturen (Lipide, Proteine und DNA) führen (Übersicht bei (Szabo 1996)).

Auf der anderen Seite besitzt endogenes NO durchaus lungenprotektives Potential (Übersicht bei (Weinberger et al. 1999)) und Peroxynitrit spielt z.B. bei der Immunantwort durch Makrophagen eine wichtige Rolle (Carreras et al. 1994; Ischiropoulos et al. 1992). Des Weiteren kann die Reaktion mit Thiolgruppen, z.B. von Proteinen oder Aminosäuren (z.B. Cystein), erfolgen. Dabei entstehen Nitrosothiole (z.B. S-Nitrosocystein), welche NO wieder freisetzen können, sich aber durch eine längere Halbwertszeit auszeichnen. Darüber hinaus kann es zu einer Modulation der Proteinwirkung (z.B. Rezeptorwirkung) kommen (Simon et al. 1996). Durch die Reaktion mit Hämoglobin entsteht Methämoglobin (Gibson and Roughton 1957; Young et al. 1994), was unter anderem auch mitverantwortlich für die Pulmonalselektivität ist (Rimar and Gillis 1993).

Versuche an isolierten Pulmonalarterien vom mini-pig deuten auf eine NO-Freisetzung von Nitroprussid und SNAP sehr nahe am Effektor (intrazelluläre Guanylatcyclase der glatten Gefäßmuskulatur) hin. Dies könnte von Vorteil in Bezug auf eine verminderte Bildung des potentiell toxischen Peroxynitrit sein, welche hauptsächlich außerhalb der Muskelzelle stattfindet. Die inhalative Gabe dieser Substanzen könnte somit Vorteile gegenüber der direkten Applikation von NO-Gas haben, welches direkt durch diesen Raum diffundiert und somit zu einer gesteigerten Peroxynitritproduktion führen kann (López-López et al. 2001). Versuche an isolierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta und Makrophagen der Maus zeigen außerdem ein niedrigeres DNA-Schädigungspotential von Nitroprussid und SNAP im Vergleich zu Peroxynitrit (Szabo et al. 1996), wenngleich Nitroprussid durch seine Cyanidfreisetzung durchaus ein toxisches Potential besitzt.

Durch seine Lipophilie löst sich NO hervorragend im Surfactant. In-vitro wurde allerdings ein schädigendes Potential von NO oder einer seiner beschriebenen Reaktionsprodukte auf den Surfactant nachgewiesen (Haddad et al. 1994; Hallman et al. 1996).

5. Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie ist ein pathophysiologisches Syndrom, das in akuten und chronischen Krankheitsbildern vorkommt und mit einer hohen Letalität behaftet ist. Eine Therapie ist schwierig und mit schwerwiegenden Nebenwirkungen sowie teilweise hohen Kosten verbunden.

Eine inhalative Anwendung verschiedener Therapeutika hat sich in den letzten Jahren als interessanter und vielversprechender Ansatz in der Therapie der pulmonalen Hypertonie herauskristallisiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt der inhalativen und systemischen Anwendung von 3 NO-Liberatoren, nämlich S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) (3 μmol), Nitroprussidnatrium (SNP) (3 μmol) und Glyceroltrinitrat (TNG) (0,1 μmol) an isolierten Kaninchenlungen überprüft. In verschiedenen Versuchsgruppen wurde der drucksenkende Effekt der verwendeten Stoffe bei systemischer und inhalativer Anwendung miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich bei inhalativer Gabe im Vergleich zur systemischen Anwendung ein guter pulmonalvasodilatativer Effekt aller 3 Substanzen. Ein Ansteigen der Perfusionnitritkonzentration war im Gegensatz zur systemischen Anwendung bei der inhalativen Anwendung nicht zu verzeichnen. Die Auswirkungen auf den pulmonalarteriellen Widerstand verliefen analog der jeweiligen Drucksenkung.

Die gute Wirkung des NO-Donors Nitroprussid, welche bereits durch andere experimentelle und eine klinische Studie gesichert ist, könnte somit eine effektive und relativ kostengünstige Alternative, vor allem bei Versagen der bisherigen Standardtherapien, darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G and Bégaud B.** Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 335: 609-616, 1996.
2. **Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent J-L, Cohen J, Opal SM, Glauser M, Parsons P, Fisher Jr. CJ and Repine JE.** Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. *Critical Care Medicine* 28: 232-235, 2000.
3. **Al-Sa'Doni H and Ferro A.** S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical Science* 98: 507-520, 2000.
4. **Armstrong L and Millar AB.** Relative production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 52: 442-446, 1997.
5. **Arnold WP, Mittal C, Katsuki S and Murad F.** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 74: 3203-3207, 1977.
6. **Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL and Levine BE.** Acute respiratory distress in adults. *The Lancet* 2(7511): 319-323, 1967.
7. **Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves B, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Clayton LM, Joebsis M, Blackburn SD, Shortino D and Crow JW.** A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 334: 296-301, 1996.
8. **Bates JN, Baker MT, Guerra Jr R and Harrison DG.** Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical Pharmacology* 42 Suppl: S157-S165, 1991.
9. **Belohlávková S, Simák J, Kokesová A, Hnilicková O and Hampl V.** Fenluramine-induced pulmonary vasoconstriction: role of serotonin receptors and potassium channels. *Journal of Applied Physiology* 91: 755-761, 2001.
10. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A and Spragg R.** Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and trial coordination. *Intensive Care Medicine* 20: 225-232, 1994.

11. **Braude S, Apperley J, Krausz T, Goldman JM and Royston D.** Adult respiratory distress syndrome after allogeneic bone-marrow transplantation: evidence for a neutrophil-independent mechanism. *The Lancet* 1(8440): 1239-1242, 1985.

12. **Carpenter LJ, Johnson KJ, Kunkel RG and Roth RA.** Phorbol myristate acetate produces injury to isolated rat lungs in the presence and absence of perfused neutrophils. *Toxicology and Applied Pharmacology* 91: 22-32, 1987.

13. **Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ and Boveris A.** Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Letters* 341: 65-68, 1994.

14. **Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U and Nishizuka Y.** Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 7847-7851, 1982.

15. **Channik RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M and Rubin LJ.** Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *The Lancet* 358: 1119-1123, 2001.

16. **Chen Z, Zhang J and Stamler JS.** Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99: 8306-8311, 2002.

17. **Chollet-Martin S, Jourdain B, Gibert C, Elbim C, Chastre J and Gougerot-Pocidallo MA.** Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154: 594-601, 1996.

18. **Cool C, Stewart J, Werahera P, Miller G, Williams R, Voelkel N and Tuder R.** Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. *The American Journal of Pathology* 155: 411-419, 1999.

19. **Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF and Tuder RM.** Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathology* 28: 434-442, 1997.

20. **Dellinger RP, Zimmermann JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ, Davis Jr K, Hyers TM and Papadakos P.** Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: Results of a randomized phase II trial. *Critical Care Medicine* 26: 15-23, 1998.

21. **Deng Z, Haghghi F, Helleby L, Vanterpool K, Horn EM, Barst RJ, Hodge SE, Morse JH and Knowles JA.** Fine mapping of PPH1, a gene for familial primary pulmonary hypertension, to a 3-cM region on chromosome 2q33. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 1055-1059, 2000a.

22. **Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE and Knowles J.** Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *The American Journal of Human Genetics* 67: 737-744, 2000b.
23. **Dresdale DT, Schultz M and Michtom RJ.** Primary pulmonary hypertension. *American Journal of Medicine* 18: 686-705, 1951.
24. **Druml W, Steltzer H, Waldhausl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, Gasic S and Wagner O.** Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *American Review of Respiratory Diseases* 148: 1169-1173, 1993.
25. **Fishman AP.** Aminorex to Fen/Phen - An epidemic foretold. *Circulation* 99: 156-161, 1999.
26. **Flick MR.** Pulmonary edema and acute lung injury. In: *Textbook of Respiratory Medicine* (2nd Ed. ed.), edited by Murray JF and Nadel JA. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, p. 1725-1777.
27. **Fok T-F, Al-Essa M, Monkman S, Dolovich M, Girard L, Coates G and Kirpalani H.** Pulmonary deposition of salbutamol aerosol delivered by metered dose inhaler, jet nebulizer, and ultrasonic nebulizer in mechanically ventilated rabbits. *Pediatric Research* 42: 721-727, 1997.
28. **Förstermann U.** Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: die Blutgefäße - Nitrovasodilatoren, NO-Donatoren. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker* (7. Aufl. ed.), edited by Forth W, Henschler D, Rummel W and Starke K: Spektrum Akademischer Verlag, 1996, p. 415-419.
29. **Frostell C, Fratacci M-D, Wain JC, Jones R and Zapol WM.** Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83: 2038-2047, 1991.
30. **Gaar KA, Taylor AE, Owens LJ and Guyton AC.** Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. *American Journal of Physiology* 213: 910-914, 1967.
31. **Galiè N, Manes A, Urgoccioni L, Serafini F, De Rosa M, Branzi A and Magnani B.** Primary pulmonary hypertension - Insights into pathogenesis from epidemiology. *Chest* 114: 184S-194S, 1998.
32. **Gessler T, Schmehl T, Hoepfer MM, Rose F, Ghofrani HA, Olschewski H, Grimminger F and Seeger W.** Ultrasonic versus jet nebulization of iloprost in severe pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 17: 14-19, 2001.

33. **Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly R, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W and Grimminger F.** Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *The Lancet* 360: 895-900, 2002.
34. **Giaid A and Saleh D.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs from patients with pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 333: 214-221, 1995.
35. **Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP and Steward DJ.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 328: 1732-1739, 1993.
36. **Gibson QH and Roughton FJ.** The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *Journal of Physiology* 136: 507-524, 1957.
37. **Griess JP.** *Ber. Deutsch Chem. Ges.* 12: 426, 1879.
38. **Grimminger F, Wahn H, Kramer HJ, Stevens J, Mayer K, Walmrath D and Seeger W.** Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology* 268: H2252-2259, 1995.
39. **Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ and Ignarro LJ.** Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *Journal of Cyclic Nucleotide Research* 5: 211-224, 1979.
40. **Haddad IY, Crow JP, Hu P, Ye Y, Beckman J and Matalon S.** Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *American Journal of Physiology* 267: L242-L249, 1994.
41. **Hallman M, Waffarn F, Bry K, Turbow R, Kleinman MT, Mautz WJ, Rasmussen RE, Bhalla DK and Phalen RF.** Surfactant dysfunction after inhalation of nitric oxide. *Journal of Applied Physiology* 80: 2026-2034, 1996.
42. **Heath D and Edwards JE.** The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease: A description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 18: 533-547, 1958.

43. **Hoeper M, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M and Fabel H.** Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *The New England Journal of Medicine* 342: 1866-1870, 2000.
44. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 84: 9265-9269, 1987.
45. **Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE and Byrns RE.** Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90: 8103-8107, 1993.
46. **Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ and Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 218: 739-749, 1981.
47. **Ischiropoulos H, Zhu I and Beckman JS.** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298: 446-451, 1992.
48. **Johnson KJ and Ward PA.** Acute and progressive lung injury after contact with phorbol myristate acetate. *The American Journal of Pathology* 107: 29-35, 1982.
49. **Kim KK and Factor SM.** Membranoproliferative glomerulonephritis and plexogenic pulmonary arteriopathy in a homosexual man with acquired immunodeficiency syndrome. *Human Pathology* 18: 1293-1296, 1987.
50. **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H and Beckman JS.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical Research in Toxicology* 5: 834-842, 1992.
51. **Kuida H, Hinshaw LB, Gilbert RP and Visscher MB.** Effect of gram-negative endotoxin on pulmonary circulation. *American Journal of Physiology* 192: 335-344, 1958.
52. **Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips III JA, Loyd JE, Nichols WC and Trembath RC.** Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nature Genetics* 26: 81-84, 2000.
53. **Laufe MD, Simon RH, Flint A and Keller JB.** Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *American Journal of Medicine* 80: 1022-1026, 1986.

54. **Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF and Tuder RM.** Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 101: 927-934, 1998.
55. **López-López JG, Pérez-Vizcaíno F, Cogolludo AL, Ibarra M, Zaragoza-Arnáez F and Tamargo J.** Nitric oxide- and nitric oxide donors-induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *British Journal of Pharmacology* 133: 615-624, 2001.
56. **Lowson SM.** Inhaled alternatives to nitric oxide. *Anesthesiology* 96: 1504-1513, 2002.
57. **Loyd J, Primm R and Newman J.** Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *American Review of Respiratory Diseases* 129: 194-197, 1984.
58. **Loyd JE, Butler MG, Foroud TM, Conneally PM, Phillips III JA and Newman JH.** Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152: 93-97, 1995.
59. **Loyd JE, Newman JH, English D, Ogletree ML, Meyrick BO and Brigham KL.** Lung vascular effects of phorbol myristate acetate in awake sheep. *Journal of Applied Physiology* 54: 267-276, 1983.
60. **Lundin S, Mang H, Smithies M, Stenqvist O and Frostell C.** Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study. *Intensive Care Medicine* 25: 911-919, 1999.
61. **Martin C, Papazian L, Payan M-J, Saux P and Gouin F.** Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. *Chest* 107: 196-200, 1995.
62. **Mathews WR and Kerr SW.** Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 267: 1529-1537, 1993.
63. **Meadow W, Rudinsky B, Bell A and Hipps R.** Effects of nebulized nitroprusside on pulmonary and systemic hemodynamics during pulmonary hypertension in piglets. *Pediatric Research* 44: 181-186, 1998.
64. **Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K and Archer SL.** Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension - Comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105: 2398-2403, 2002.
65. **Miranda KM, Espey MG and Wink DA.** A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5: 62-71, 2001.

66. **Morse JH, Jones AC, Barst RJ, Hodge SE, Wilhelmsen KC and Nygaard TG.** Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32. *Circulation* 95: 2603-2606, 1997.
67. **Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips III JA and Loyd JE.** Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *The New England Journal of Medicine* 345: 319-324, 2001.
68. **Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, Siemieniak DR, Wheeler L, Phillips III JA, Newman JH, Conneally PM, Ginsburg D and Loyd JE.** Localization of the gene for primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nature Genetics* 15: 277-280, 1997.
69. **O'Flaherty JT, Cousart S, Lineberger AS, Bond E, Bass DA, De Chatelet LR, Leake ES and McCall CE.** Phorbol myristate acetate - In vivo effects upon neutrophils, platelets and lung. *The American Journal of Pathology* 101: 79-92, 1980.
70. **Olschewski H.** Medikamentöse Therapie des primären und sekundären pulmonalen Hochdruckes. *Herz* 27: 463-467, 2002.
71. **Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer M, 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 and Seeger W.** Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 347: 322-329, 2002.
72. **Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani HA, Grimminger F and Seeger W.** Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Annals of Internal Medicine* 124: 820-824, 1996.
73. **Palhares DB, Figueiredo CS and Moura AJ.** Endotracheal inhalatory sodium nitroprusside in severely hypoxic newborns. *Journal of Perinatal Medicine* 26: 219-224, 1998.
74. **Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
75. **Pepke-Zaba J, Higenbottam T, Dinh-Xuan AT, Stone D and Wallwork J.** Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *The Lancet* 338: 1173-1174, 1991.
76. **Perry M and Taylor AE.** Phorbol myristate acetate-induced injury of isolated perfused rat lungs: neutrophil dependence. *Journal of Applied Physiology* 65: 2164-2169, 1988.

77. **Perry ML, Kayes SG, Barnard JW and Taylor AE.** Effects of phorbol myristate acetate-stimulated human leukocytes on rat lung. *Journal of Applied Physiology* 68: 235-240, 1990.
78. **Petitpretz P, Brenot F, Azarian R, Parent F, Rain B, Herve P and Simonneau G.** Pulmonary hypertension in patients with human immunodeficiency virus infection - Comparison with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 89: 2722-2727, 1994.
79. **Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves B, Levy PS, Reid LM, Vreim CE and Williams GW.** Histopathology of primary pulmonary hypertension a qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 80: 1189-1206, 1989.
80. **Prielipp RC, Rosenthal MH and Pearl RG.** Vasodilator therapy in vasoconstrictor-induced pulmonary hypertension in sheep. *Anesthesiology* 68: 552-558, 1988.
81. **Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM and Martin TR.** Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 153: 1850-1856, 1996.
82. **Pugin J, Vergheze G, Widmer M-C and Matthay MA.** The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine* 27: 304-312, 1999.
83. **Radermacher P, Huet Y, Pluskwa F, Herigault R, Mal H, Teisseire B and Lemaire F.** Comparison of ketanserin and sodium nitroprusside in patients with severe ARDS. *Anesthesiology* 68: 152-157, 1988.
84. **Rich S.** Executive summary from the world symposium on primary pulmonary hypertension. <http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html>. 1998
85. **Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, Levy PS, Reid LM, Vreim CE and Williams GW.** Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Annals of Internal Medicine* 107: 216-223, 1987.
86. **Rich S, Kaufmann E and Levy PS.** The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 327: 76-81, 1992.
87. **Richardson PD, Granger DN and Taylor AE.** Capillary filtration coefficient: the technique and its application to the small intestine. *Cardiovascular Research* 13: 547-561, 1979.

88. **Rimar S and Gillis N.** Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation* 88: 2884-2887, 1993.
89. **Rimar S and Gillis N.** Site of pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide in the perfused lung. *Journal of Applied Physiology* 78: 1745-1749, 1995.
90. **Roberts JD, Fineman JR, Morin FC, Shaul PW, Rimar S, Schreiber MD, Polin RA, Zwass MS, Zayek MM, Gross I, Heymann MA and Zapol WM.** Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The inhaled nitric oxide study group. *The New England Journal of Medicine* 336: 605-610, 1997.
91. **Romberg E.** Über Sklerose der Lungenarterien. *Deutsches Archiv Klinische Medizin* 48: 197-215, 1891.
92. **Rossaint R, Falke KJ, López F, Slama K, Pison U and Zapol WM.** Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 328: 399-405, 1993.
93. **Rubin LJ.** Primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 336: 111-117, 1997.
94. **Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galiè N, Black SM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M and Simonneau G.** Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* 346: 896-903, 2002.
95. **Scheeren T and Radermacher P.** Prostacyclin (PGI₂): new aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. *Intensive Care Medicine* 23: 146-158, 1997.
96. **Schreiber MD, Dixit R, Rudinsky B, Hipps R, Morgan SE, Keith A and Meadow W.** Direct comparison of the effects of nebulized nitroprusside versus inhaled nitric oxide on pulmonary and systemic hemodynamics during hypoxia-induced pulmonary hypertension in piglets. *Critical Care Medicine* 30: 2560-2565, 2002.
97. **Schütte H, Grimminger F, Otterbein J, Spriestersbach R, Mayer K, Walmrath D and Seeger W.** Efficiency of aerosolized nitric oxide donor drugs to achieve sustained pulmonary vasodilatation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282: 985-994, 1997.
98. **Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer H-J, Ermert L and Kiss L.** Adult Respiratory Distress Syndrome: Model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods in Enzymology* 233: 549-584, 1994.
99. **Seeger W, Walmrath D, Menger M and Neuhofer H.** Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *Journal of Applied Physiology* 61: 1781-1789, 1986.

100. **Seth P and Fung HL.** Biochemical characterization of a membrane-bound enzyme responsible for generating nitric oxide from nitroglycerin in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology* 46: 1481-1486, 1993.
101. **Shasby DM, Vanbenthuisen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurty I and Repine JE.** Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: role of oxygen radicals. *American Review of Respiratory Diseases* 125: 443-447, 1982.
102. **Sibbald WJ, Paterson NA, Holliday RL, Anderson RA, Lobb TR and Duff JH.** Pulmonary hypertension in sepsis: measurement by the pulmonary arterial diastolic-pulmonary wedge pressure gradient and the influence of passive and active factors. *Chest* 73: 583-591, 1978.
103. **Simon DI, Mullins ME, Jia L, Gaston B, Singel DJ and Stamler JS.** Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93: 4736-4741, 1996.
104. **Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman AP.** Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43: 5S-12S, 2004
105. **Singh RJ, Hogg N, Joseph J and Kalyanaraman B.** Mechanism of nitric oxide release from S-Nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 18596-18603, 1996.
106. **Spiekerkoetter E, Fabel H and Hoepfer M.** Behandlung der schweren pulmonalen Hypertonie. *Deutsches Ärzteblatt* 98: A 2104-2108, 2001.
107. **Starling E.** On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *Journal of Physiology (London)* 19: 312-326, 1896.
108. **Strachan T and Read AP.** Die genetische Kartierung. In: *Molekulare Humangenetik*, edited by Strachan T and Read AP. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Verlag, 1996, p. 367-393.
109. **Szabo C.** The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6: 79-88, 1996.
110. **Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M and Salzman AL.** DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93: 1753-1758, 1996.

111. **Taylor RG, McCall CE, Thrall RS, Woodruff RD and O'Flaherty JT.** Histopathologic features of phorbol myristate acetate-induced lung injury. *Laboratory Investigation* 52: 61-70, 1985.
112. **Taylor RW and Trottier SJ.** Pathophysiology of acute lung injury. In: *Textbook of Critical Care* (4th Ed. ed.), edited by Shoemaker WC, Ayres SM, Grenvik A and Holbrook PR: W. B. Saunders Company, 2000, p. 1382-1393.
113. **Thomson JR and Trembath RC.** Primary pulmonary hypertension: the pressure rises for a gene. *Journal of Clinical Pathology* 53: 899-903, 2000.
114. **Townsley MI, Korthuis RJ, Rippe B, Parker JC and Taylor AE.** Validation of double vascular occlusion method for P_{c,i} in lung and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 61: 127-132, 1986.
115. **Troncy E, Collet J-P, Shapiro S, Guimond J-G, Blair L, Ducruet T, Francoer M, Charbonneau M and Blaise G.** Inhaled nitric oxide in acute respiratory distress syndrome - A pilot randomized controlled study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 1483-1488, 1998.
116. **Tsuchida S, Maki T and Sato K.** Purification and characterization of glutathione transferases with an activity toward nitroglycerin from human aorta and heart. Multiplicity of the human class Mu forms. *Journal of Biological Chemistry* 265: 7150-7157, 1990.
117. **Tuder R, Groves B, Badesch D and Voelkel N.** Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American Journal of Pathology* 144: 275-285, 1994.
118. **Tuder R, Radisavljevic Z, Shroyer K, Polak J and Voelkel N.** Monoclonal endothelial cells in appetite suppressant-associated pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158: 1999-2001, 1998.
119. **Tuder R, Yeager M, Geraci M, Golpon H and Voelkel N.** Severe pulmonary hypertension after the discovery of the familial primary pulmonary hypertension gene. *European Respiratory Journal* 17: 1065-1069, 2001.
120. **Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch DB and Voelkel NF.** Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159: 1925-1932, 1999.
121. **Voelkel N and Tuder R.** Severe pulmonary hypertensive diseases: a perspective. *European Respiratory Journal* 14: 1246-1250, 1999.
122. **Voelkel NF, Hoepfer M, Maloney J and Tuder RM.** Vascular endothelial growth factor in pulmonary hypertension. *Annals of the New York Academy of Science* 31: 186-193, 1996.

123. **Wagenvoort CA and Wagenvoort N.** Primary pulmonary hypertension: A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* 42: 1163-1184, 1970.
124. **Walrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F and Seeger W.** Effects of inhaled *versus* intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 10: 1084-1092, 1997.
125. **Watanabe H, Kyoichi O, Takeuchi K, Yamashita K, Yokoyama T, Tran QK, Satoh H, Terada H, Ohashi H and Hayashi H.** Sildenafil for primary and secondary Pulmonary Hypertension. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 71: 398-402, 2002.
126. **Waterborg JH and Matthews HR.** The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32: 1-4, 1994.
127. **Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM and Gadek JE.** Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *American Review of Respiratory Diseases* 133: 218-225, 1986.
128. **Weinberger B, Heck DE, Laskin DL and Laskin JD.** Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacology & Therapeutics* 84: 401-411, 1999.
129. **Weir EK, Reeve HL, Huang JMC, Michelakis E, Nelson DP, Hampl V and Archer SL.** Anorexic agents aminorex, fenfluramine, and dexfenfluramine inhibit potassium current in rat pulmonary vascular smooth muscle and cause pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 94: 2216-2220, 1996.
130. **Wright L, Tuder RM, Wang J, Cool CD, Lepley RA and Voelkel NF.** 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity in lungs from patients with primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 219-229, 1998.
131. **Yeates RA, Schmid M and Leitold M.** Antagonism of glycerol trinitrate activity by an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochemical Pharmacology* 38: 1749-1753, 1989.
132. **Young JD, Dyar O, Xiong L and Howell S.** Methaemoglobin production in normal adults inhaling low concentrations of nitric oxide. *Intensive Care Medicine* 20: 581-584, 1994.
133. **Yu X-Q and Saugstad OD.** Nebulization of sodium nitroprusside in lung-lavaged newborn piglets. *Pediatric Research* 45: 255-259, 1999.

134. **Yuan XJ, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV, Gaine SP, Orens JB and Rubin LJ.** Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98: 1400-1406, 1998.
135. **Zanaboni PB, Bradley JD, Baudendistel LJ, Webster RO and Dahms TE.** Cyclooxygenase inhibition prevents PMA-induced increases in lung vascular permeability. *Journal of Applied Physiology* 69: 1494-1501, 1990.
136. **Zapol WM and Snider MT.** Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *The New England Journal of Medicine* 296: 476-480, 1977.
137. **Zwissler B.** Inhalierte Vasodilatoren. *Der Anaesthesist* 51: 603-624, 2002.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Allen, die mir beim Erstellen der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.
- Herrn Professor Dr. med. G. Ertl für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Untersuchungen durchführen zu dürfen.
- Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. M. Schmidt für die kritische Durchsicht der Arbeit.
- Herrn Professor Dr. med. O. Elert für die Übernahme des Korreferats.
- Herrn Dr. med. Hans Wahn für Stellung des Themas, seine freundschaftliche Betreuung und hilfreichen Ratschläge während der Experimente sowie für die konstruktive Durchsicht der Arbeit.
- Herrn Henning Kaufmann für die immer freundschaftliche und gute Zusammenarbeit im Versuch und bei der OP-Assistenz an vielen langen Messtagen und -nächten! Ich werde diese Zeit immer positiv in Erinnerung behalten.
- Frau Soledad Guevara für die geduldige Einarbeitung in Versuch und OP-Technik.
- Frau Helga Wagner für ihre jederzeit freundliche und kompetente Hilfsbereitschaft vor allem bei Problemen der biochemischen Analytik!
- Frau Charlotte Dienesch, Frau Lisa Bauer und Frau Andrea Leupold für die Unterstützung bei unserer Labororganisation.
- Meiner Freundin Dr. med. Constanze Kräutle für ihre motivierende und verständnisvolle Art.
- Frau Isolde Kräutle für Durchsicht der Arbeit und ihre große Gastfreundschaft.
- Schließlich meinen Eltern für kritisches Lesen der Arbeit und vor allem für ihre stete Förderung. Sie haben mir dies alles ermöglicht!

Lebenslauf

23. Februar 1975

geboren in Ulm/Donau

Schulbildung:

1981 bis 1985

Grund- und Hauptschule Erbach

1985 bis 1994

Hans und Sophie Scholl Gymnasium Ulm

Zivildienst:

1994 bis 1995

Rettungsdienst DRK KV Ulm, dort
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Hochschulausbildung:

Mai 1996

Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

März 1998

Ärztliche Vorprüfung

März 1999

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2002

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Universität Würzburg)

April 2002

1. Tertial des Praktischen Jahres; Abt.
Chirurgie, Klinik am Eichert Göppingen

August 2002

2. Tertial des Praktischen Jahres; Innere
Medizin, Klinik am Eichert Göppingen

Dezember 2002

3. Tertial des Praktischen Jahres; Urologie,
Universitätsklinikum Ulm

Mai 2003

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Universität Ulm)

Facharztausbildung:

August 2003 bis September 2004

Arzt im Praktikum

Urologische Universitätsklinik Ulm

Oktober 2004 bis Januar 2005

Assistenzarzt

Urologische Universitätsklinik Ulm

Seit Februar 2005

Assistenzarzt

Chirurgische Abteilung Katharina Kasper

Kliniken gGmbH Frankfurt am Main

Two handwritten signatures in black ink, one on the left and one on the right, both appearing to be stylized and possibly representing the same person or different individuals.