

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck**

**Vasoaktive Effekte von Brain Natriuretic Peptide auf den
Lungenkreislauf im Modell der isoliert ventilierten und
blutfrei perfundierten Kaninchenlunge**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Jens Callegari
aus
Herborn
2010**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Behr

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rainald Fischer
Prof. Dr. Franz-Xaver Beck**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Hanno Leuchte**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	6
1. Einleitung	
1.1 Physiologie der Lungenstrombahn	8
1.2 Pulmonale Hypertonie, Definition und Klassifikation	9
1.3 Definition der pulmonal-arteriellen Hypertonie	11
1.3.1 Pathophysiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie	11
1.3.1.1 Vasokonstriktoren	14
1.3.1.2 Vasodilatoren und zyklische Nukleotide in der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie	15
1.3.1.3 Die Stimulation zyklischer Nukleotide als Gegenregulationsmechanismus der pulmonalen Hypertonie	17
1.4 Natriuretische Peptide	18
1.4.1 B-Type Natriuretic Peptide (BNP)	19
1.4.1.1 Synthese	20
1.4.1.2 Rezeptor und Signaltransduktion	20
1.4.1.3 Abbau und Elimination	23
1.4.1.4 Biologische Wirkung	24
1.4.1.5 Therapeutische Anwendung	26
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit	27
2. Methoden	
2.1 Modell der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge	28
2.1.1 Beschreibung des Organmodells	28
2.1.2 Die Präparation der Lunge	28
2.1.3 Das Perfusionssystem	30
2.1.4 Das Beatmungssystem	31
2.1.5 Das Aerosolierungssystem	31
2.1.6 Registrierung der Parameter	31
2.2 Modell der Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie	32

2.3 Modell der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie	32
2.4 Bestimmung von zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP)	33
2.4.1 Radioimmunoassay (RIA)	33
2.5 Statistische Auswertung	34
3. Versuchsreihen	35
3.1 Untersuchungen am Modell Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie	36
3.1.1 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie	36
3.1.2 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit Dosiswirkungskurve von intravasal appliziertem BNP	36
3.1.3 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol als Placebo	37
3.1.4 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol	37
3.2 Untersuchungen am Modell der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie	37
3.2.1 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie	37
3.2.2 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol	37
3.2.3 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol	38
3.3 Standardisierte Vorgänge	38
3.4 Definition der Vergleichspunkte	38
4. Ergebnisse	
4.1 Kontrollversuche	40
4.2 Thromboxan-Versuchsreihe	40
4.2.1 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie	40
4.2.2 Dosiswirkungskurve von intravasal appliziertem BNP bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie	40
4.2.3 Pharmakodynamik einer Einzeldosis von intravasal appliziertem BNP bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie	41
4.2.4 Placeboaerosolierung bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie	43
4.2.5 Auswirkung des BNP-Aerosols auf die Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie	43
4.3 Endothelin-1-Versuchsreihe	45
4.3.1 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie	45

4.3.2 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit Placeboaerosolierung	46
4.3.3 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosolierung	46
5. Diskussion	48
6. Ausblick	54
7. Zusammenfassung	56
8. Literaturverzeichnis	58
9. Materialien	
9.1 Substanzen/Herstellerangaben	91
9.2 Geräte/Herstellerangaben	91
10. Danksagung	93
11. Lebenslauf	94
12. Anhang	
Tabellen	

Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ALK 1	Activin receptor-like kinase 1
ANF	atrialer natriuretischer Faktor (früher für ANP)
ARDS	akutes Lungenversagen (adult respiratory distress syndrome)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain (B-Type) Natriuretic Peptide
BMPR	Bone-morphogenic-protein-Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Type Natriuretic Peptide
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTEPH	chronisch Thromboembolische Pulmonale Hypertonie
DAG	Dacylglycerol
ECE	Endothelin Converting Enzyme
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
ETRA	Endothelinrezeptorantagonist
GTP	Guanosintriphosphat
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HZV	Herzzeitvolumen
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kv	spannungsabhängiger Kalium-Kanal (voltage-gated)
LVP	LVEDP; Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase

MLCP	Myosin-Leichtketten-Kinase-Phosphatase
MKP	mitogen-aktivierte Proteinkinase-Phosphatase
NEP	neutrale Endopeptidase
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NP	natriuretische Peptide
NPR	Natriuretic Peptide-Rezeptor
NT-proBNP	N-Terminales proBNP
NYHA	New York Heart Association
PA	Pulmonalarterie
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
mPAP	mittlerer Pulmonalarteriendruck
P _c	pulmonal-kapillärer Druck
PCR	polymerase chain reaction
PCWP	pulmonaler kapillärer Verschlussdruck (pulmonary capillary wedge pressure)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
PEA	pulmonale Endarteriektomie
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
pGC	rezeptorgebundene (particulate) Guanylatcyclase
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (Prostazyklin)
PH	pulmonale Hypertonie
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PVOD	pulmonal-venöse Verschlusskrankheit (pulmonary veno-occlusive disease)
PVR	pulmonaler Gefäßwiderstand (pulmonary vascular resistance)
RIA	Radioimmunoassay
sGC	lösliche (soluble) Guanylatcyclase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TxA ₂	Thromboxan A ₂

TP-R	Thromboxan-Prostanoid-Rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VP	Ventilationsdruck
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Physiologie der Lungenstrombahn

Die Physiologie der Lungenstrombahn unterscheidet sich wesentlich von der anderer Organe. Ein um das siebenfache erhöhter Blutfluss, beispielsweise durch eine Steigerung des Herzzeitvolumens unter Belastung, führt nicht einmal zur Verdopplung des Drucks in der Pulmonalarterie ¹. Grund hierfür ist die druckpassive Ausdehnung des pulmonal-vaskulären Systems, die Rekrutierung zuvor nicht perfundierter Areale sowie die aktive Vasodilatation ^{2;3}. Einen weiteren Unterschied zwischen Lungenstrombahn und der Regulation anderer Organsysteme stellt die Fähigkeit zur Vasokonstriktion bei einem Abfall des alveolären Sauerstoffpartialdrucks unter etwa 70 mmHg dar ⁴. Diese, als Euler-Liljestrand-Mechanismus oder hypoxische pulmonale Vasokonstriktion bezeichnete Autoregulation, steht im Gegensatz zur Vasodilatation lokaler Gefäße anderer Organe bei Abfall des Sauerstoffpartialdrucks und/oder des pH.

Eine wichtige Größe zur Beurteilung der pulmonalen Zirkulation ist der pulmonal-vaskuläre Widerstand (PVR). Dieser errechnet sich analog dem Ohmschen Gesetz aus dem Druckunterschied zwischen dem mittleren Pulmonalarteriendruck (mPAP) und dem Druck in den Lungenkapillaren (P_c) und dem Herzzeitvolumen (HZV):

$$PVR = (mPAP - P_c) / HZV$$

Somit ist der Pulmonalarteriendruck von pulmonalem Gefäßwiderstand und Herzzeitvolumen abhängig:

$$mPAP = PVR \cdot HZV + P_c$$

Unter physiologischen Bedingungen wird ein mittlerer Druck in der Pulmonalarterie von 20 mmHg in Ruhe nicht überschritten. Dieser ist alters- und geschlechtsunabhängig ⁵.

1.2 Pulmonale Hypertonie, Definition und Klassifikation

Seit der im Rahmen der WHO Konferenz 2008 in Dana Point aktualisierten Definition spricht man von einer pulmonalen Hypertonie, sobald der pulmonal-arterielle Mitteldruck (mPAP) auf mindestens 25 mmHg erhöht ist ⁶. In einer großen Datenanalyse konnte mittlerweile gezeigt werden, dass der mPAP beim Gesunden 20 mmHg in Ruhe nicht überschreitet, wohl aber 30 mmHg unter Belastung. Zudem ist der mPAP unter Belastung abhängig vom Alter, so dass die allgemeingültige Belastungsdefinition der pulmonalen Hypertonie zunächst verworfen wurde ⁵. Daraufhin wurde ein Grenzwertbereich definiert, sobald der mPAP 20 mmHg übersteigt, 25 mmHg jedoch noch nicht erreicht.

Die Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach ätiologischen Gesichtspunkten ist auf Grund unterschiedlicher therapeutischer Ansätze und Prognosen notwendig. Diese Klassifikation wurde auf den Weltkonferenzen für pulmonale Hypertonie in Evian 1998 und Venedig 2003 entwickelt und zuletzt in Dana Point 2008 modifiziert ^{7;8}. Seit der Venedig Konferenz gilt die Unterteilung in primäre und sekundäre pulmonale Hypertonie als obsolet. Die aktualisierte Dana Point-Klassifikation gliedert die pulmonale Hypertonie in fünf Gruppen: 1. Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), 2. die pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen, 3. die Hypoxie-bedingten Formen der pulmonalen Hypertonie, 4. die pulmonalen Hypertonie-Erkrankungen auf Grund chronisch-thromboembolischer Prozesse und 5. die in einer Gruppe zusammengefassten sonstigen assoziierten Erkrankungen (Details in Tabelle, Dana Point-Klassifikation 2008, nach Simoneau et al, 2009) ⁸.

Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Dana Point 2008)

- 1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)**
 - 1.1. idiopathische PAH
 - 1.2. erbliche PAH
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. ALK1, Endoglin (mit oder ohne HHT)
 - 1.2.3. Unbekannt
 - 1.3. Medikamenten-, Drogen- oder Toxin-induziert
 - 1.4. Assoziiert mit
 - 1.4.1. Bindegewebserkrankungen
 - 1.4.2. HIV-Infektion
 - 1.4.3. Portaler Hypertension
 - 1.4.4. Angeborenen Herzerkrankungen
 - 1.4.5. Schistosomiasis
 - 1.4.6. Chronisch Hämolytischer Anämie
 - 1.5. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
- 1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder kapilläre Hämangiomatose (PCH)**
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen**
 - 2.1. Systolische Herzinsuffizienz
 - 2.2. Diastolische Herzinsuffizienz
 - 2.3. Herzklappenerkrankungen
- 3. Pulmonale Hypertonie bei chronischen Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie**
 - 3.1. chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2. Interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3. andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiver und obstruktiver Ventilationsstörung
 - 3.4. Schlaf-assoziierte Atemstörung
 - 3.5. Alveoläre Hypoventilation
 - 3.6. Chronische Höhenexposition
 - 3.7. Entwicklungsstörungen
- 4. Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie**
- 5. Multifaktoriell ausgelöste pulmonale Hypertonie**
 - 5.1. Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferativ, Splenektomie
 - 5.2. Systemerkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitits
 - 5.3. Stoffwechselerkrankungen: Glykogenspeichererkrankungen, M. Gaucher, SD-Erkrankungen
 - 5.4. Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz unter Dialyse

Nach Simoneau et al, 2009, JACC ⁸

1.3 Definition der pulmonal-arteriellen Hypertonie

Die pulmonal-arterielle Hypertonie wird charakterisiert durch einen mPAP ≥ 25 mmHg in Ruhe bei normalem pulmonal-kapillärem Verschlussdruck (PCWP) (≤ 15 mmHg) ^{6,9}. Die verschiedenen Formen werden in der Gruppe 1 der Dana Point-Klassifikation zusammengefasst. Auf die verschiedenen klinischen Erscheinungsformen, die in der Klassifikation von Dana Point beschrieben werden, soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden ⁸.

1.3.1 Pathophysiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie

Die Ursachen und Mechanismen der PAH sind sehr vielfältig, variieren in den einzelnen Ätiologien und sind bis heute nicht abschließend geklärt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, in der eine genetische Prädisposition, äußere Einflüsse und co-existente Erkrankungen eine Rolle spielen ¹⁰⁻¹². Als gesichert gilt der Einfluss einer Mutation im Bone-morphogenic-protein-Rezeptor (BMPR)-II-Gen auf die Entstehung der familiären PAH ¹³⁻¹⁶. Allerdings ist die Penetranz bei Familien mit Trägern der BMPR-II-Gen-Mutation nur inkomplett. Vermutlich bedarf es eines weiteren Auslösers, der dann die Erkrankungskaskade auf der mikrovaskulären Ebene startet. Weitere Auslöser, die auf dem Boden einer genetischen Prädisposition zur Entstehung einer pulmonalen Hypertonie führen, sind zum Beispiel die Hypoxie und Scherkräfte, aber auch immunologische Faktoren spielen eine Rolle. Diese führen dann unter anderem zu einer Kaskade, die an einen Inflammationsprozess erinnert ¹⁷⁻¹⁹.

Histopathologisch ist die pulmonal-arterielle Hypertonie gekennzeichnet durch einen Befall der kleinen pulmonalen, präkapillären Arterien mit einem Innendurchmesser geringer als 200 μm . Die Erkrankung führt zu einer Verengung des Gefäßlumens. Wichtige pathogenetische Mechanismen sind der chronische Gefäßumbau (Remodelling), die in situ Thrombosen und die Vasokonstriktion ²⁰.

In diese Prozesse sind in den meisten Fällen alle Kompartimente der Gefäßwand, das Endothel, die glatten Gefäßmuskelzellen der Media und die Fibroblasten der Adventitia involviert. Eine Schlüsselrolle nimmt das Endothel ein. Unter physiologischen Bedingungen stellt es die Barriere zwischen Blut auf der einen und Gefäßmuskelzellen sowie Fibroblasten auf der anderen Seite dar. Es fungiert als Sensor äußerer Einflüsse wie Hypoxämie, Scherkräfte, Inflammation, Toxine und vasoaktiver Substanzen. Darüber hinaus ist es für die Bildung und

Freisetzung zahlreicher Mediatoren verantwortlich. Diese wirken autokrin auf die Endothelzelle selbst und parakrin auf die sie umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten. Die endotheliale Dysfunktion ist ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese der PAH. Zu dem spielt die Dysbalance verschiedener Mediatoren eine entscheidende Rolle. Von großer Bedeutung ist hier das Ungleichgewicht pro- und antiproliferativ wirkender endogener Substanzen, vasodilatierender und vasokonstriktiver sowie prothrombotischer gegenüber antithrombotischen Mediatoren^{17;21;22}. Diese Mediatoren werden in den folgenden Abschnitten differenziert dargestellt.

Chronischer Gefäßumbau

Der chronische Gefäßumbau ist ein fortschreitender Prozess, der aus einem Ungleichgewicht apoptotischer und proliferativer Vorgänge resultiert^{20;23}. Bedeutenden Einfluss hat die Überexpression mitogener Mediatoren wie Endothelin-1, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Platelet-derived growth factor (PDGF), Serotonin und weiterer Wachstumsfaktoren. Dem gegenüber kommt es zur verminderten Produktion der antiproliferativ wirkenden Substanzen Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid (NO)^{24;25}.

Im Rahmen des chronischen Gefäßumbaus befinden sich die drei gefäßwandbildenden Zelltypen Endothelzelle, glatte Muskelzelle und Fibroblast in einem hyperproliferativen Zustand. Die Hyperplasie der Endothelzellen manifestiert sich dabei vor allem im Rahmen der plexogenen Arteriopathie (plexiform lesions)^{20;26}. Diese beschreibt die örtlich vermehrte Ansammlung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix²⁷. Zudem wird eine sich nach distal ausbreitenden Muskularisierung normalerweise nicht muskularisierter kleiner Arterien (Durchmesser 15-80µm) beobachtet (De Novo-Muskularisierung). Das Einwandern von Myofibroblasten in die subendotheliale Schicht begünstigt die Fibrosierung und Bildung einer „Neointima“²⁷.

Die Fibroblasten weisen ebenfalls erhöhte Mitoseraten auf²⁸. Sowohl Myozyten als auch Fibroblasten synthetisieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteine²⁹. Aus den beschriebenen Veränderungen resultieren eine Verdickung der Gefäßwand mit Elastizitätsverlust und eine Reduktion des vaskulären Querschnitts. Die Folge ist die Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstands.

Thrombosis in situ

Bei den in-situ-Thrombosen handelt sich um rekanalisierte, mural-organisierte Thromben in den kleinen und kleinsten Aufzweigungen des pulmonal-arteriellen Gefäßbaumes. Ob diese

sekundär im Verlauf einer PAH entstanden oder initialer Stimulus einer PAH sind, ist bisher unklar. Fest steht, dass sie das Fortschreiten der PAH begünstigen^{30;31}. In den Prozess der in-situ-Thrombosen sind ein dysfunktionales Endothel und eine abnorme Thrombozytenaktivierung entscheidend involviert. Große Bedeutung wird dem Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Mediatoren sowie einem Überwiegen thrombogener Vorgänge zugeschrieben. Insbesondere betrifft dies die Erhöhung der thrombozytenstimulierenden oder -aktivierenden Mediatoren Thromboxan, Serotonin, platelet-activating factor (PAF) und VEGF^{32;33}. Weitere Faktoren, die die Ausbildung von in-situ-Thrombosen begünstigen, sind ein erniedrigter Blutfluss und *verstärkte* Scherkräfte, die beide durch den erhöhten pulmonalen Widerstand entstehen. Zusätzlich zur zentralen Rolle der Thrombozyten im Initialstadium der in-situ-Thrombose kommt die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems. Die Endstrecke dieser Gerinnungskaskade ist dann die histopathologisch nachweisbare in-situ-Thrombose, diese bedingt eine weitere Reduktion des Gefäßlumens und somit eine Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes im Sinne eines circulus vitiosus.

Vasokonstriktion

Die Vasokonstriktion gilt als frühe Komponente in der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie²⁰. Zu den Hauptursachen zählen die abnorme Funktion und Expression spannungsabhängiger Kalium-Kanäle (Kv)^{34;35} und die Dysbalance zwischen endogenen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren³⁶. Gemeinsamer Endpunkt ist die intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration der pulmonal-arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen, die zur Zunahme des Gefäßtonus führt.

Intrazelluläres Kalzium bindet in der glatten Muskelzelle an Calmodulin. Der entstandene Komplex aktiviert die Myosin-leicht-Ketten-Kinase (Myosin light chain kinase, MLCK). Die MLCK phosphoryliert unter ATP-Verbrauch das Myosinmolekül, sodass es durch die Querbrückenbildung mit Aktin zum Ablauf der Kontraktion kommt.

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird im Wesentlichen durch zwei Mechanismen reguliert: Zum einen bewirkt die Änderung des Membranpotentials den Ca^{2+} -Einstrom über membranständige L-type Ca^{2+} Kanäle. Des Weiteren kommt es durch die Bindung vasokonstringierender Substanzen an ihren Rezeptor zur Aktivierung eines G-Proteins. Dies führt über Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von 1,4,5,-Inositol-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, vor allem dem sarkoplasmatischen Retikulum. Es wird vermutet, dass IP_3 zudem den Ca^{2+} -

Einstrom über die Zellmembran erhöht. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC bewirkt über die Phosphorylierung der Myosin-leicht-Ketten-Phosphatase deren Hemmung und dadurch die Ca^{2+} -Sensitivierung der kontraktilen Einheiten. Die Folge ist, dass bereits geringe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu starker Muskelkontraktion führen.

Eine wichtige Komponente der Vasokonstriktion im Rahmen der PAH ist das Ungleichgewicht vasoaktiver Mediatoren. Unter physiologischen Bedingungen kommt es in der Lungenstrombahn permanent zur Bildung von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren. Im Verlauf der PAH stellt sich ein Übergewicht zu Gunsten vasokonstringierender Faktoren wie Endothelin-1 (ET-1), Thromboxan A_2 (TxA_2) und Serotonin gegenüber vasodilatierendem NO und Prostazyklin (PGI_2) ein.

1.3.1.1 Vasokonstriktoren

Das endothelial gebildete 21 Aminosäuren große Peptid ET-1 spielt eine Hauptrolle im Prozess der Vasokonstriktion³⁷. Das endothelial ausgekleidete pulmonale Gefäßbett ist nicht alleine aufgrund seiner großen Fläche Hauptproduktionsort für ET-1 und Effektor, sondern ist ganz zentral für die Elimination (Clearance) des ET-1 aus der Zirkulation verantwortlich. Die ET-1-Plasmaspiegel sind bei Patienten und Tieren mit pulmonaler Hypertonie unterschiedlicher Ätiologien erhöht^{38,39}. Die ET-1-Spiegel korrelieren mit dem Schweregrad der PAH⁴⁰. Neben einer vermutlich gesteigerten Synthese kommt es bei der pulmonalen Hypertonie aber auch zur verminderten Elimination von ET-1 durch das pulmonale Gefäßbett⁴¹. Die biologische Wirkung wird hauptsächlich über die ET-Rezeptoren A und B (ET_A und ET_B) vermittelt. ET_A und ET_B werden vor allem auf glatten Muskelzellen der pulmonalen Widerstandsgefäße exprimiert⁴². Die Bindung von ET-1 führt über die Bildung von IP_3 und DAG zur Vasokonstriktion⁴³. Der ET_B -Rezeptor findet sich auch auf Endothelzellen, wo er zwei weitere Funktionen erfüllt. Zum einen eliminiert er zirkulierendes ET-1 und fungiert in dieser Funktion als Clearance-Rezeptor. Zum anderen vermittelt er die Synthese von vasodilatierendem NO und PGI_2 ^{10,44} und erfüllt damit die Funktion eines Antagonisten zu den auf der glatten Muskelzelle gelegenen Rezeptoren. Im physiologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen den endothelial vermittelten Effekten und den Effekten, die durch die Rezeptoren auf der glatten Muskelzelle vermittelt werden. Im Falle einer pulmonal-arteriellen Hypertonie kommt es zu einer Imbalance zu Gunsten der Vasokonstriktion. Dem entsprechend ist der Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ETRA) ein wichtiger und etablierter Ansatz in der

Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie. Sowohl die selektiven ET_A-Antagonisten Ambrisentan und Sitaxsentan als auch der duale (ET_A und ET_B) Rezeptor-Antagonist Bosentan haben ihre Wirksamkeit in klinischen Studien gezeigt und sind zur therapeutischen Anwendung zugelassen⁴⁵⁻⁴⁸.

Das Eikosanoid Thromboxan A₂ ist ein vasokonstriktiver Metabolit des Arachidonsäurestoffwechsels⁴⁹. Bei Patienten mit PAH werden erhöhte TxA₂-Plasmaspiegel beobachtet²⁴. Darüber hinaus wurden in Tierexperimenten unter Hypoxiebedingungen Veränderungen in der Verteilung der pulmonalen Thromboxan-Prostanoid-Rezeptoren (TP-R) festgestellt. In kleinen, distalen Pulmonalarterien, in denen unter physiologischen Bedingungen keine TP-R ausgebildet werden, wurden nach dreitägiger Hypoxie TP-R vermehrt exprimiert⁵⁰. Die Synthese von TxA₂ wird über die Cyclooxygenase und die Thromboxansynthase reguliert⁴⁹. Nach Bindung an TP-R kommt es über intrazelluläre Bildung von IP₃ und DAG zur Vasokonstriktion⁵¹.

Des Weiteren kommt es durch TxA₂ zur gesteigerten Sensitivität der kontraktile Einheit der pulmonalen glatten Gefäßmuskelzelle⁵². Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) inhibiert zudem spannungsabhängige K⁺-Kanäle. Die resultierende Depolarisation führt zum Ca²⁺-Einstrom und zur Vasokonstriktion⁵³.

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein potenter Vasokonstriktor, der sowohl in der Lunge als auch im Gastrointestinaltrakt gebildet und in Thrombozyten gespeichert wird^{20;54}. Bei Patienten mit PAH unterschiedlicher Ätiologie kommt es zur Erhöhung des 5-HT-Plasmapiegels⁵⁵. Die vasokonstriktive Potenz von Serotonin wird durch den 5-HT_{1B}-Rezeptor vermittelt, dessen Aktivierung die Reduktion von intrazellulärem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Folge hat^{20;56;57}.

1.3.1.2 Vasodilatoren und zyklische Nukleotide in der Pathophysiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie

Prostazyklin (PGI₂) ist ein wichtiger endothelial gebildeter Vasodilatator und Thrombozytenaggregationshemmer²⁰. PGI₂ stammt aus dem Arachidonsäurestoffwechsel und wird über das Enzym Prostazyklinsynthase synthetisiert¹⁰. Der PGI₂-Plasmaspiegel kann über einen im Urin nachweisbaren Metaboliten abgeschätzt werden und ist bei Patienten mit idiopathischer PAH reduziert²⁴. Darüber hinaus ist die Aktivität der Prostazyklinsynthase in Endothelzellen bei Patienten mit PAH vermindert⁵⁸. In pulmonalen Gefäßmuskelzellen bewirkt

PGI₂ durch Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Vasodilatation¹⁰. Ein therapeutisches Prinzip bei der Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie ist seit 1995 die Substitution des fehlenden PGI₂. Zunächst erfolgte die kontinuierliche Infusionstherapie über einen zentralvenösen Verweilkatheter (Epoprostenol). Systemische Nebenwirkungen sind limitierende Faktoren der intravenösen Therapie, so kann durch Überdosierung und eine fehlende pulmonale Selektivität eine Vasodilatation mit systemischer Hypotension ausgelöst werden. Da auch intrapulmonal während der Infusion eine unselektive Gefäßerweiterung stattfindet, kann es zur Verstärkung von Ventilations-/Perfusionsfehlverteilungen mit nachfolgender Hypoxämie kommen. Durch eine akzidentielle Unterbrechung der kontinuierlichen Applikation kann es zudem zu einem lebensbedrohlichen kurzfristigen Anstieg des pulmonalen Drucks und Abfall des Herzvolumens kommen. Eine weitere schwere Nebenwirkung ist die Infektion des zentralvenös angelegten Katheters, der zur Verabreichung dieser Substanz erforderlich ist. Zur Vermeidung dieser Nebenwirkungen wurde die inhalative Verabreichung des stabilen PGI₂-Analogon Iloprost etabliert⁵⁹⁻⁶¹.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein endothelialer vasodilatierender Faktor (EDRF), der eine wesentliche Stellung in der Regulation des pulmonalen Gefäßtonus einnimmt^{62;63}. NO wird durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert. NO aktiviert die zytosolische Guanylatzyklase, was über die Generierung zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) zur Vasorelaxation führt⁶⁴ (genaue Beschreibung, siehe Seite 21).

Der beschriebene NO-Signalweg bietet diverse therapeutische Ansätze zur Behandlung der PAH, nicht zuletzt weil die endotheliale NOS (eNOS) bei Patienten mit PAH vermindert exprimiert wird²⁵ und dies auch in Tiermodellen einer Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie beobachtet werden konnte⁶⁵.

Experimentell schützt die kontinuierliche NO-Inhalation vor Ausbildung einer PAH in einem Modell der chronischen Hypoxie bei Ratten⁶⁶. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie bewirkt die Inhalation von NO eine Reduktion des pulmonal-vaskulären Widerstands und eine Verbesserung der Hämodynamik⁶⁷. Jedoch ist die chronische Applikation des NO äußerst schwierig, auch weil im Falle einer Unterbrechung der kontinuierlichen Inhalation ein signifikanter Rebound-Effekt auftreten kann und toxische Nebenwirkungen möglich sind. Außerdem limitiert das sehr variable Ansprechen auf eine solche Therapie enorm die klinische Anwendbarkeit der therapeutischen Möglichkeiten des NO³². Weitere Ansätze, die allerdings noch nicht in größeren Studien getestet wurden, sind die Verabreichung von löslichen NO-Donatoren per Aerosol und eine Erhöhung des Substratangebots durch Gabe von L-Arginin^{10;68;69}.

NO generiertes cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut, das betreffende Hauptenzym scheint die Phosphodiesterase 5 (PDE5) zu sein (siehe auch Seite 21) ⁷⁰.

Eine sichere und selektive Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie stellen die oral verfügbaren PDE5-Inhibitoren Sildenafil (Revatio®), Vardenafil (Levitra®) und Tadalafil (Adcirca®) dar ⁷¹⁻⁷³. In klinischen und experimentellen Studien wurden der vasodilatierende als auch der antiproliferative Effekt von PDE5-Inhibitoren auf die pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen ⁷⁴⁻⁷⁷.

Ähnliches gilt für Inhibitoren der cAMP-spezifischen PDE-Isoformen 3 und 4, wenn gleich diese auf Grund geringer pulmonaler Selektivität und stärkerer Nebenwirkungen noch keine klinische Anwendung finden ^{78;79}.

Von besonderem Nutzen scheint die Co-Applikation von Nukleotid-generierenden Substanzen wie Iloprost oder NO mit Inhibitoren der PDE-Isoformen 3, 4 und 5 zu sein ^{71;80-82}.

Die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP sind als „second messenger“ entscheidend an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Beide Signalwege sind eng miteinander verknüpft und unterliegen gegenseitiger Beeinflussung ^{83;84}. Sie vermitteln in der Lunge und vielen anderen Geweben vasodilatatorische und antiproliferative Effekte. Im Rahmen der pulmonal-arteriellen Hypertonie nehmen cGMP und cAMP eine zentrale Rolle ein. Nukleotid-generierende Substanzen wie Prostazyklin und NO werden bei Patienten mit PAH vermindert synthetisiert. Zudem kommt es zur gesteigerten Enzyminduktion der abbauenden Phosphodiesterasen. Die cGMP-hydrolysierende PDE5 wird bei Patienten mit PAH vermehrt exprimiert ⁷⁵. Somit stellen die verminderte Produktion sowie der gesteigerte Abbau der Nukleotide bedeutende pathophysiologische Mechanismen dar.

Auch aus therapeutischer Sicht rücken die Nukleotide zunehmend in den Mittelpunkt. Die Nukleotid-generierenden Substanzen Iloprost und NO sind für die Behandlung der PAH zugelassen. Der PDE5-Inhibitor Sildenafil ist ein sicheres und etabliertes therapeutisches Mittel bei pulmonal-arterieller Hypertonie.

Diagnostisches Potenzial haben Substanzen wie das Atriale natriuretische Peptid (ANP), Brain (oder B-Type) Natriuretic Peptide (BNP) oder Adrenomedullin, die über zyklische Nukleotide gegenregulatorische Mechanismen induzieren.

1.3.1.3 Die Stimulation zyklischer Nukleotide als Gegenregulationsmechanismus der pulmonalen Hypertonie

Im Verlauf einer pulmonal-hypertensiven Erkrankung kommt es zur Aktivierung verschiedener gegenregulatorischer, unter anderem vasodilatierend wirkender Mechanismen. Bei akuten pulmonal-hypertensiven Zuständen werden das NO- und das Prostazyklin-System induziert, wobei in späteren Stadien verminderte Aktivitäten beobachtet werden³². Mit fortschreitender Krankheit kommt es zu steigenden Plasmaspiegeln des über cAMP vasodilatierend wirkenden Peptids Adrenomedullin^{85;86}. Von besonderer Bedeutung ist die gesteigerte Aktivität des Systems der natriuretischen Peptide. ANP und BNP sind bei pulmonaler Hypertonie, unabhängig von der Ätiologie, erhöht⁸⁷⁻⁸⁹. Die Synthese von ANP wird bei erhöhter Volumenbelastung der Herzvorhöfe und das BNP bei gesteigerter Druckbelastung der Ventrikel induziert und von den Kardiomyozyten sezerniert. Am Zielorgan führt BNP über die Aktivierung der rezeptorgebundenen Guanylatzyklase (pGC) zur Bildung von cGMP⁹⁰. Die Plasmaspiegel von BNP korrelieren mit dem Schweregrad der rechtsventrikulären Belastung, dem pulmonal-vaskulären Widerstand und dem pulmonal-arteriellen Mitteldruck^{88;91}. Daher wird BNP als nicht-invasiver Marker und prognostischer Faktor bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie verwendet^{88;92}. Außerdem ist das BNP als diagnostischer Marker bei chronischer Linksherzinsuffizienz etabliert⁹³⁻⁹⁵. Erhöhte BNP-Plasmaspiegel werden nicht nur im Rahmen von chronischen ventrikulären Überbelastungen ermittelt. Nach akuten Ereignissen wie Myokardinfarkt oder pulmonaler Embolie werden bereits nach wenigen Stunden erhöhte BNP-Werte beziehungsweise Spaltprodukte der Vorstufe im Serum gemessen^{96;97}.

1.4 Natriuretische Peptide

Auf die Familie der natriuretischen Peptide wurde man im Jahr 1981 erstmals aufmerksam. De Bold und Mitarbeiter⁹⁸ konnten die Wasser- und Salzausscheidung bei Ratten durch Verabreichung eines aus dem Vorhofmyokard der Ratte gewonnenen Extrakts steigern. Die Untersuchungen legten den Grundstein für die darauf folgende Isolierung und Sequenzierung des humanen atrialen natriuretischen Faktors (ANF, später ANP genannt)⁹⁹ und die Entdeckung weiterer strukturell als auch funktionell verwandter Peptide. Das B-Type Natriuretic Peptide (BNP)¹⁰⁰ und C-Type Natriuretic Peptide (CNP)¹⁰¹ wurden zuerst aus dem

Schweinehirn isoliert und zeigten vasorelaxierende Potenz an der glatten Muskulatur des Hühnerrektums. Im Laufe der Jahre kam es zur Isolierung weiterer, meist parakrin wirkender Peptide, die auf Grund ähnlicher Strukturmerkmale und Wirkungen dem erweiterten Kreis der natriuretischen Peptide zugeschrieben wurden¹⁰²⁻¹⁰⁵. Durch ihre vasodilatative, natriuretische und diuretische Wirkung nehmen sie eine wichtige Rolle in der Kreislaufregulation ein¹⁰⁶.

1.4.1 B-Type Natriuretic Peptide (BNP)

1988 isolierten Sudoh und Mitarbeiter das B-Type Natriuretic Peptide zunächst aus dem Schweinehirn¹⁰⁰, weshalb die Bezeichnung „Brain Natriuretic Peptide“ verwendet wurde. Das humane BNP besteht aus 32 Aminosäuren. Zwei Cysteinreste bilden eine Disulfidbrücke, wodurch das Peptid die Form einer Haarnadel ausbildet. Die aus 17 Aminosäuren bestehende Ringstruktur ist konstantes Strukturmerkmal der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP. Sie ist für die Bindung an den Rezeptor und somit für die biologische Aktivität der Hormone essentiell^{107;108}.

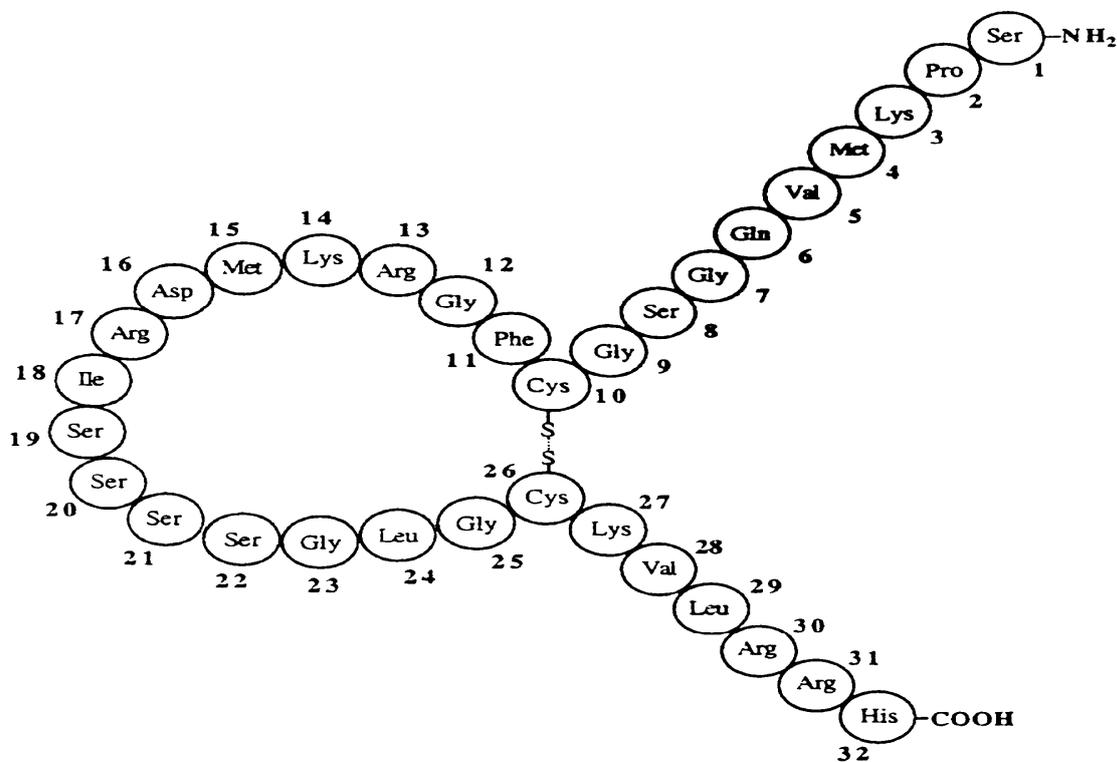


Abb 1.4a: Aminosäuresequenz und Struktur von humanem BNP.

1.4.1.1 Synthese

Der überwiegende Anteil des sezernierten BNP entstammt beim Menschen aus den Myozyten der Herzventrikel ¹⁰⁹. In geringen Mengen wird BNP in den Vorhöfen und extrakardial in Lunge, Nieren und Nebennieren gebildet ¹¹⁰. Zunächst wird BNP in Form eines aus 134 Aminosäuren bestehenden Prä-pro-Hormons translatiert. Nach Abspaltung der Signalsequenz ergibt sich das 108 Aminosäuren umfassende Prohormon. Anschließend kommt es durch eine bisher nicht klar identifizierte Endoprotease zu dessen Spaltung in ein inaktives 76-AS-großes N-terminales Fragment (NT-proBNP) und das biologisch aktive Peptid ^{111;112}. In der Vorhofmuskulatur gebildetes ANP wird zunächst in Vesikeln gespeichert. Die Daten hinsichtlich einer vergleichbaren Speicherung des BNP sind nicht eindeutig. Zwar scheint auch BNP in Kardiomyozyten gespeichert und auf beispielsweise Hypoxiereiz sezerniert werden zu können ¹¹³, allerdings ist diese Fraktion eher gering. Der größte Anteil wird unmittelbar nach einer kurzfristig gesteuerten Synthese aus den Ventrikeln in die Blutbahn sezerniert und über die Koronarsinus drainiert ¹¹⁴.

Das BNP-Gen (Nppb) ist wie das ANP-Gen (Nppa) auf Chromosom 1(p36.2) lokalisiert ¹¹⁵. Die Aktivität des Nppb unterliegt mechanischen als auch zahlreichen hormonellen Einflüssen. Durch mechanische Dehnung der Myokardzellen, auftretend hauptsächlich bei Druck- aber auch Volumenbelastung des Ventrikels, kommt es zur Aktivierung des BNP-Gen-Promoters ¹¹⁶ und zur gesteigerten Transkription von BNP mRNA. Außerdem bewirken ET-1, Trijodthyronin (T₃), Angiotensin II, Interleukin-1, Prostaglandin F_{2α}, adrenerge Signalwege und hypoxische Zustände eine vermehrte Expression von Nppb ^{112;117-120}.

1.4.1.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

Die biologische Aktivität von BNP wird über den Natriuretic Peptide Receptor A (NPR-A) vermittelt ^{90;121}. Exprimiert wird der NPR-A in zahlreichen Zielorganen, darunter in der glatten Gefäßmuskulatur der Lunge ^{122;123}. NPR-A ist ein membranständiger Rezeptor, der mit hoher Affinität ANP und BNP gleichermaßen bindet ¹²⁴. Er besteht aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer transmembranösen und einer Guanylatzyklasegekoppelten Domäne ^{125;126}. Auf Grund der Guanylatzyklaseaktivität wird der NPR-A in der Literatur häufig unter dem Synonym Guanylatzyklase-A (GC-A) geführt. Die Bindung von BNP bewirkt über eine intrazelluläre Konformationsänderung die Aktivierung der pGC und

dadurch die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) ^{127;128}. Der second messenger cGMP nimmt eine Schlüsselrolle in der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur ein. Endothelial gebildetes Nitric Oxide (NO) führt durch Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase (sGC) ebenfalls zur Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration ^{129;130}. Somit stellt cGMP die gemeinsame Endstrecke des NO- und NP-Signalwegs dar ¹³¹. sGC und pGC unterliegen einem reziproken Regulationsschema ¹³². Dies gewinnt bei Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie besondere Bedeutung. Bei chronisch-hypoxischen Ratten ist die sGC-abhängige Vasodilatation vermindert, die pGC-vermittelte Vasodilatation unverändert ¹³³.

cGMP führt durch Bindung zur Aktivierung dreier verschiedener Effektormoleküle. Die Bindung von cGMP an unspezifische Kationen-Kanäle spielt nach heutigem Kenntnisstand in NPR-A exprimierenden Zellen keine Rolle und wird deshalb hier nicht weiter behandelt ^{90;134}. Außerdem bindet cGMP an Phosphodiesterasen (PDE). Diese hydrolysieren cGMP zu inaktivem 5'-GMP und nehmen als Abbauenzym entscheidenden Einfluss auf die cGMP-Konzentration ¹³⁵. Bisher wurden 11 Isoenzyme der PDE (PDE1-PDE11) beschrieben, die einer gewebsspezifischen Verteilung unterliegen und cGMP und cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) mit unterschiedlicher Affinität binden und inaktivieren ¹³⁶⁻¹³⁸. Die PDE5 und PDE6 sind als cGMP-spezifische PDE charakterisiert, wobei in den glatten Gefäßmuskelzellen der Lunge nur PDE5 in hohem Maße exprimiert wird ^{70;139}. Die PDE5 besteht aus drei Untereinheiten, den GAF-A- und -B-Domänen und der katalytisch-aktiven Untereinheit. Die mit hoher Affinität cGMP-bindende GAF-A-Domäne ist maßgeblich für die Regulation der Katalyseaktivität verantwortlich ¹⁴⁰⁻¹⁴². Neben dieser allosterischen Regulation ist die cGMP-abhängige Phosphorylierung der PDE5 entscheidend an der Enzymaktivierung beteiligt ^{143;144}. Durch die genannten Mechanismen werden durch cGMP große Amplituden und anhaltend hohe cGMP-Konzentrationen unterbunden ¹³⁹.

Die Haupteffektormoleküle des cGMP sind die Proteinkinasen G (PKG) I und II. In Lunge, glatten Muskelzellen, Kleinhirn und Thrombozyten wird lediglich die PKG I in hohen Konzentrationen exprimiert ¹⁴⁵. Diese nimmt durch die Phosphorylierung zahlreicher Moleküle regulierenden Einfluss auf die Genexpression und den Kalziumhaushalt der Zielzelle ^{146;147}. Somit wird deutlich, dass der cGMP/PKG-Signalweg entscheidend in die Prozesse des chronischen Gefäßumbaus und der Vasodilatation der glatten Gefäßmuskelzellen eingreift.

Induktion vasodilatierender Nukleotide

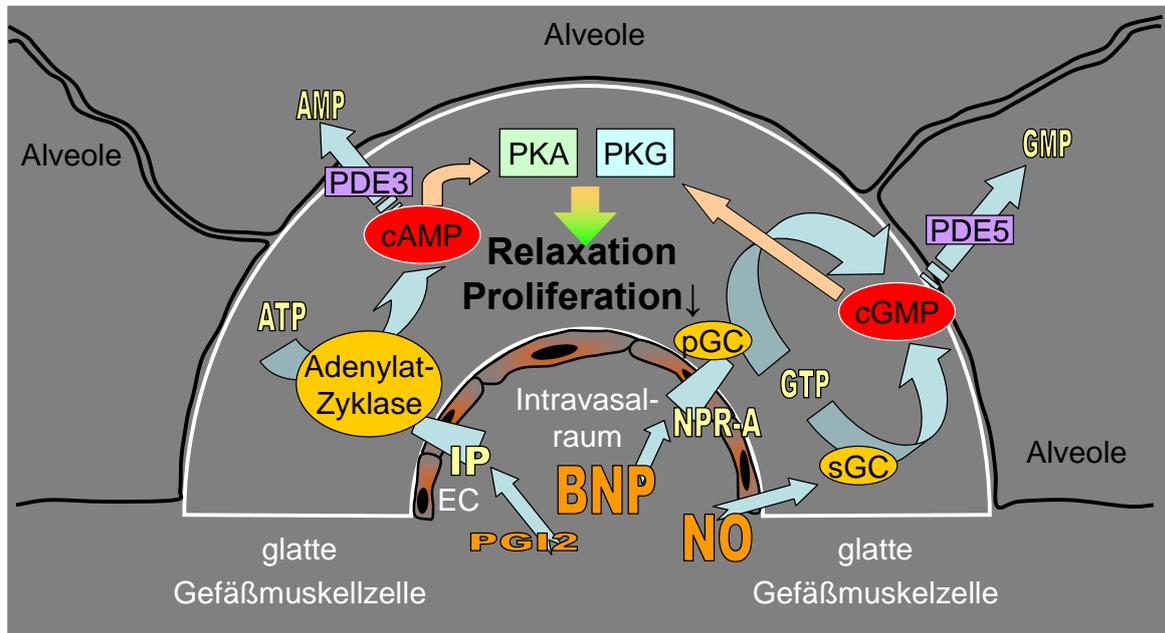


Abb 1.4b: Signalwege der zyclischen Nukleotide cGMP und cAMP: Die Aktivierung der membranständigen (pGC) und der löslichen Guanylatzyklase (sGC) führt zur Bildung zyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP). Die Synthese zyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) wird über die Adenylatzyklase vermittelt. Die Relaxation der glatten Muskelzelle als auch apoptotische Effekte werden durch Bindung an die Effektormoleküle Proteinkinase G (PKG) und Proteinkinase A (PKA) erreicht. Der Abbau der Nukleotide erfolgt durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE).

Einfluss der cGMP/PKG auf den chronischen Gefäßumbau

Bisher wurden mehr als 50 Gene beschrieben, die einer cGMP/PKG-Regulation unterliegen¹⁴⁶. Die molekularen Mechanismen sind bis heute nicht abschließend aufgeklärt. Bedeutend scheint die Inaktivierung von MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinasen) wie Erk-1/2, p38 und JNK über die MAPK-Phosphatase-1 (MKP-1) zu sein¹⁴⁸. Außerdem ist die Reduktion von zellzyklusfördernden Zyklinen A, D1 und E für die antiproliferative Wirkung von cGMP verantwortlich^{149;150}. Weitere Einflüsse stellen die direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren¹⁵¹ und posttranskriptionelle Modulation der mRNA dar^{152;153}.

In glatten Muskelzellen und Fibroblasten hemmt die PKG die Proliferation, Migration und fördert apoptotische Vorgänge¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. In Endothelzellen sind sowohl Apoptose-induzierende als auch proliferationsfördernde Eigenschaften von cGMP beschrieben^{158;159}.

Der Einfluss von cGMP/PKG auf die Vasodilatation

Der Kontraktionszustand einer glatten Gefäßmuskelzelle ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$. Die Aktivierung der cGMP/PKG- und cAMP/PKA-Signalwege führt über eine Abnahme der zytosolischen Kalziumkonzentration zur Vasodilatation^{10;64}.

Die Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ wird über verschiedene Mechanismen eingeleitet. Die PKG aktiviert Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle. Der K^+ -Ausstrom resultiert in einer Hyperpolarisation, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle gehemmt wird¹⁶⁰. Die Phosphorylierung membranständiger Ca^{2+} -Kanäle führt ebenfalls zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle¹⁶¹. cGMP aktiviert über PKG die Ca^{2+} /ATPase-Pumpen der Zellmembran und intrazellulärer Speicher, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Diese reduzieren $[Ca^{2+}]_i$ durch aktiven Transport von Ca^{2+} aus der Zelle hinaus oder in intrazelluläre Speicher hinein^{162;163}. Außerdem wird durch PKG-abhängige Phosphorylierung der IP_3 -Rezeptor des SR gehemmt, wodurch der Ca^{2+} -Efflux ins Zytoplasma verhindert wird^{164;165}. Darüber hinaus wird die Generierung von IP_3 durch Inhibition der PLC reduziert¹⁶⁶. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Desensitivierung des kontraktiven Apparats für Kalzium. Die Aktivierung der Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) führt zur Abnahme phosphorylierter Myosin-Leicht-Ketten (MLC)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Das Resultat der beschriebenen Vorgänge ist schließlich die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

1.4.1.3 Abbau und Elimination

Die Elimination zirkulierender natriuretischer Peptide wird durch zwei Mechanismen reguliert. Als gesichert gilt die Clearance von intaktem BNP über den Natriuretic Peptide Receptor C (NPR-C). Inhalt aktueller Forschung ist der enzymatische Abbau von BNP, wobei unstrittig ist, dass die Zink-Metalloproteinase Neprilysin (neutrale Endopeptidase 24.11, NEP) in diesen Prozess involviert ist. Der Anteil der beiden Systeme am Abbau von BNP ist beim Menschen unklar, wobei bei Schafen die Eliminationsleistung gleichermaßen verteilt ist¹⁷⁰. Der NPR-C wurde 1987 von Maack und Mitarbeitern als „clearance receptor“ postuliert¹⁷¹. Der Rezeptor wird in zahlreichen Organen auf der Zelloberfläche exprimiert, darunter in pulmonalen glatten

Muskelzellen, Niere und Atrium^{122;172;173}. Auf Grund des Fehlens einer gekoppelten Guanylatzyklase¹⁷⁴ wurde dem NPR-C lange keine intrinsische Aktivität zugeschrieben. Neuere Studien widerlegen diese These. Demnach führt in experimentellen Studien die selektive Aktivierung von NPR-C zur Stimulation eines inhibitorischen G-Proteins (G_i-Protein)¹⁷⁵. Die daraufhin verminderte cAMP-Synthese bewirkt einen verminderten Ca²⁺-Einstrom und eine gesteigerte Aktivität der NOS^{176;177}. Daraus resultiert die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

Andere Studien belegen den gesteigerten Abbau von BNP durch NPR-C. Nach Bindung von BNP an NPR-C kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. BNP wird anschließend lysosomal abgebaut, während NPR-C an die Zelloberfläche zurückkehrt^{178;179}.

Der enzymatische Abbau von BNP ist Gegenstand aktueller Forschung. ANP und CNP sind Substrate der neutralen Endopeptidase 24.11, wohingegen humanes BNP-32 (hBNP-32) resistent gegenüber NEP 24.11 ist¹⁸⁰⁻¹⁸². NEP werden auf der Zelloberfläche von Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten, renalen Tubuluszellen sowie auf pulmonalen Epithel- und Endothelzellen exprimiert, wobei die Konzentration auf Letzteren wohl gering ist^{106;183;184}. Eine Studie von Pankow und Mitarbeitern beschreibt die sukzessive enzymatische Degradierung von BNP der Maus in der Niere. Demnach wird hBNP-32 zunächst von der Metalloendopeptidase Meprin gespalten. Das entstandene mBNP7-32 besitzt biologische Aktivität und hat höhere Affinität zu NEP 24.11 als das zirkulierende mBNP-32. In einem zweiten Schritt erfolgt die Spaltung durch NEP 24.11 in eine biologisch inaktive Form¹⁸⁵.

1.4.1.4 Biologische Wirkung

BNP besitzt ein breites Wirkungsspektrum, das große Ähnlichkeit mit dem des ANP aufweist. Es bewirkt eine Reduktion des systemischen Blutdrucks, fördert in der Niere sowohl Natriurese als auch Diurese, hemmt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die Bildung von Endothelin-1 und nimmt durch direkte Wirkung auf das zentrale Nervensystem Einfluss auf den Salz- und Wasserhaushalt^{106;186;187}. Zudem werden dem BNP antifibrotische, antimitogene und antiproliferative Wirkungen zugeschrieben¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Vasoaktive Potenz

Die These einer vasodilatierenden Potenz natriuretischer Peptide wird durch experimentelle und klinische Untersuchungen gestützt. Wobei die Ergebnisse bezüglich der pulmonalen

Vasoreagibilität nicht eindeutig sind. Schermuly und Mitarbeiter beobachteten bei Kaninchen mit U46619 (Thromboxanmimetikum)-induzierter pulmonal-arterieller Hypertonie während einer Kurzinfusion von Urodilatin, ein in der Niere durch alternative Spaltung des proANP entstehendes natriuretisches Peptid ¹⁹¹, eine nicht-selektive Reduktion des pulmonalarteriellen und systemischen Drucks ¹⁹². In vitro wiesen BNP und ANP bei Hypoxie-induzierter pulmonaler Vasokonstriktion am isolierten PA-Ring und quasi in vivo am Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Rattenlunge eine vasodilatierende Wirkung auf ¹⁹³. In einem weiteren in vitro-Modell ET-1- und U46619-konstringierter isolierter Pulmonalarterienringe vom Schwein bewirkte die Gabe von BNP eine Vasorelaxation von bis zu 60% ¹⁹⁴. Das Phänomen der BNP-induzierten Gefäßrelaxation konnte auch an isolierten Koronararterien vom Hund beobachtet werden ¹⁹⁵.

Darüber hinaus belegen klinische Studien die vasodilatierende Wirkung im pulmonalen Gefäßbett bei Gesunden. Cargill und Lipworth erreichten bei gesunden Probanden mit akuter Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie durch die Infusion von BNP eine signifikante Reduktion von pulmonal-vaskulärem Widerstand und mittlerem pulmonal-arteriellem Druck. Dieser Effekt war dabei deutlicher ausgeprägt als bei Infusion equimolarer Mengen ANP ¹⁹⁶. In einer weiteren Studie wurden Patienten mit schwerer pulmonaler Hypertonie mittels einer Kombinationstherapie, bestehend aus oralem Phosphodiesterasehemmer (Sildenafil) und intravenös appliziertem BNP, akut getestet. Verglichen mit der Monotherapie aus Sildenafil oder BNP zeigte die kombinierte Behandlung eine stärkere Reduktion von pulmonal-vaskulärem Widerstand und pulmonal-arteriellem Mitteldruck. Allerdings konnte dabei durch die BNP-Infusion alleine keine signifikante Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik erzielt werden.

Die Wirkung einer kontinuierlichen BNP-Infusion auf die Entstehung einer chronischen Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie wurde von Klinger und Mitarbeitern untersucht. In diesem Modell gelang es, durch kontinuierliche systemische BNP-Applikation die Entstehung einer artifiziellen pulmonalen Hypertonie am Rattenmodell abzumildern. Darüber hinaus entwickelten transgene Mäuse, die eine Überexpression von ANP aufwiesen, nach Exposition chronischer Hypoxie keine pulmonale Hypertonie ¹⁹⁷. Dem gegenüber bilden ANP-Knock-Out-Mäuse eine verstärkte Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie aus.

1.4.1.5 Therapeutische Anwendung

BNP wird therapeutisch bei akut dekompensierter Linksherzinsuffizienz eingesetzt. Seit August 2001 ist es in den USA in Form des Nesiritid (Natrecor®, Scios Inc.) bei Patienten der NYHA-Stadien III und IV als Ergänzung zur Standardtherapie zugelassen¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Das Nesiritid wird mittels rekombinanter Technologie hergestellt, ist strukturidentisch mit humanem BNP und wird durch initialen Bolus (2µg/kg), gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion (0,01µg/kg/min), intravenös appliziert (Scios Inc.).

Beobachtet wird eine Verbesserung der Hämodynamik sowie des klinischen Status (Dyspnoe). Die Effekte beruhen unter anderem auf einer dosisabhängigen Reduktion des pulmonal-kapillären Verschlussdrucks (PCWP), des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP), des systemischen vaskulären Widerstands und eines erhöhten Herzminutenvolumens^{198;201}.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die pulmonal-arterielle Hypertonie stellt eine schwere Erkrankung mit stark eingeschränkter Lebenserwartung dar. Dabei nimmt die Vasokonstriktion eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie ein. Die therapeutischen Möglichkeiten sind bis heute begrenzt. Somit ist die Erprobung weiterer therapeutischer Ansätze notwendig.

Bei BNP handelt es sich nach heutigem Wissensstand um ein kardiales „Stresshormon“ mit natriuretischer und vasodilatierender Potenz. Die Wirkung von BNP auf die Lungenstrombahn wurde an unterschiedlichen Modellen der chronischen Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie untersucht. In der PAH sind die Vasokonstriktoren Thromboxan und ET-1 erhöht und von pathophysiologischer Bedeutung. Der Effekt von BNP auf die pulmonale Vasoreaktivität im Modell der Thromboxan oder ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie wurden bisher nicht untersucht. Daher untersuchten wir (1) den Effekt von intravasal appliziertem BNP im Modell der Thromboxan induzierten akuten pulmonalen Hypertonie an einem quasi in-vivo-Modell der isolierten Kaninchenlunge.

Systemische Nebenwirkungen bei intravenöser Verabreichung bedeuten erhebliche Einschränkungen in der Therapie der PAH. Deshalb erscheint der therapeutische Ansatz der Applikation via Aerosolisierung interessant und zukunftsweisend. Auf diesem Weg haben sich nukleotid-generierende Medikamente wie Iloprost oder PDE-Inhibitoren bewährt. Daher stellte sich die Frage, ob (2) die Aerosolierung von BNP eine positive Auswirkung auf die pulmonale Vasoreaktion im Modell der akuten Vasokonstriktion entfaltet und somit möglicherweise eine zukünftige Therapieoption bei der pulmonalen Hypertonie darstellen könnte. Zusätzlich sollten (3) die Ergebnisse der Aerosolveruchsreihe im Modell der Endothelin-1 induzierten akuten pulmonalen Hypertonie bestätigt werden.

Die Bestimmung von cGMP sollte (4) Rückschlüsse auf die BNP-Signaltransduktion bei pulmonaler Vasodilatation zulassen.

2. Methoden

2.1 Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge

2.1.1 Beschreibung des Organmodells

Das Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge wurde bereits mehrfach beschrieben²⁰²⁻²⁰⁷. Hierbei wird das intakte Lungen-/Herz Organpaket entnommen und damit eine für das Experiment frei zugängliche Situation geschaffen. Diese ist unabhängig von zentralen, humoralen und metabolischen Einflüssen. Während der nachfolgend beschriebenen Versuchsreihe wurden die Parameter pulmonal-arterieller, linksatrialer Druck und Beatmungsdruck sowie das relative Lungengewicht kontinuierlich registriert.

2.1.2 Die Präparation der Lunge

Verwendete Versuchstiere waren Kaninchen der Rasse New Zealand White Bastard beiden Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 2,2 kg und 2,5 kg.

Zunächst wurde die Narkose mit Ketamin (Ketamin Inresa®, Inresa, Freiburg, Germany) (30 – 50 mg/kg KG) und Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) eingeleitet.

Hierzu wurde eine der Ohrvenen punktiert und behutsam die intravenöse Narkose eingeleitet. Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit erfolgte die Antikoagulation mit Heparin-Natrium (1000 IU/kg KG) und die mechanische Fixierung des Versuchstieres auf dem Operationstisch. Unter Vertiefung der Narkose wurde eine prätracheale subkutane Lokalanästhesie mit 10ml Xylocain durchgeführt. Nach Kontrolle der Narkosetiefe durch Schmerzreiz wurde bei erhaltener Spontanatmung die Trachea freipräpariert. Anschließend wurde die Trachea operativ eröffnet und mittels eines Tubus kanüliert. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft über einen Harvard-Kleintierventilator (Ventilator Typ UB 6025, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland), bei einer Atemfrequenz von 30 Atemzügen in der Minute und einem Atemzugvolumen von 8-12 ml/kg Körpergewicht.

Nach kontinuierlicher Vertiefung der Narkose erfolgte nach Rasur und Desinfektion von Thorax und Abdomen die sorgfältige Präparation von Haut und Muskulatur und nachfolgender Eröffnung des Bauchraums mit Hilfe einer Laparotomie im epigastrischen Winkel. Nach Fixierung des Diaphragmas am Xyphoid wurde durch Ablösung des Zwerchfells vom

Rippenbogen die Thoraxhöhle eröffnet. Im Anschluss folgte eine mediane Sternotomie und Fixierung der beiden Thoraxhälften.

Nach stumpfer Entfernung des Thymus und Eröffnung des Herzbeutels wurden Pulmonalarterie sowie Aorta mittels eines Zwirnsfadens vorsichtig umschlungen. Bei schlagendem Herzen wurde durch Inzision am Übergang von rechtem Ventrikel und Pulmonalarterie der vorgesehene Katheter in der Pulmonalarterie platziert und behutsam fixiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Lunge des Versuchstiers mit 4°C kaltem Krebs-Henseleit-Puffer (120 mM NaCl, 4,3 mM KCl, 1,1 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2,4 mM CaCl_2 , 1,3 mM MgPO_4 , 2,4 g/L Glucose) und 2,5% Hydroxyethylamylopectine (Molekulargewicht 200,000) (Serag Wiessner, Naila, Deutschland) als onkotisches Agens perfundiert. Hierzu diente eine Rollerpumpe (MCP Standard, Ismatec, Deutschland). Anschließend erfolgte die Eröffnung beider Herzventrikel durch Abtrennung der Herzspitze und die Ligatur der Aorta. Danach trat der Tod des Tieres ein.

Ab dem Zeitpunkt der artifiziellen Perfusion der Lunge erfolgte die Beimischung von 4% CO_2 zur ventilierten Raumluft, um einen physiologischen Perfusat-pH-Wert von 7,34 bis 7,38 zu erhalten. Unter permanenter Ventilation und Perfusion wurden Herz und Lunge aus dem umgebendem Mediastinum freipräpariert. Nach der Entnahme wurde das Organpaket von Fett- und Bindegewebe befreit. Nachfolgend wurde der rechte Ventrikel entfernt und die linke Herzkammer nach Entfernen von Mitralklappe und Papillarmuskeln mit einer Tabaksbeutelnaht versehen, ohne diese zu verschließen. Es folgte das Einführen eines Katheters in den linken Ventrikel, der durch Zuziehen der Naht fixiert wurde. Das Perfusat strömte nun ausschließlich über diesen eingelegten Katheter ab. Das linke Herzohr wurde abschließend durch Ligatur von der Perfusionszirkulation ausgeschlossen. Die Innendurchmesser der eingebrachten Perfusionskatheter betragen 3 mm für den Pulmonalkatheter und 4mm für den Katheter des linken Ventrikels.

Nach Aufhängung des Organpräparats an den vorgesehenen Kraftüberträger erfolgte das Einbringen der Lunge in ein doppelwandiges Glasgefäß als funktioneller Thorax. Es folgte der Anschluss des linksventrikulären Katheters an das Perfusionssystem, so dass nun ein geschlossenes Kreislaufsystem entstand. Anschließend wurde der Druck im linksventrikulären Ausflusstrakt auf 1,2 bis 1,5 mmHg, Referenzpunkt Lungenhilum, festgelegt, um Westzone-III-Bedingungen in den endexpiratorischen Phasen zu erzielen. Zudem wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1,2 bis 1,5 cm Wassersäule eingestellt. Unter Erwärmung des gesamten Systems auf 37°C mittels doppelwandiger Glasgefäße und einer

Thermopumpe (DC 5 Thermopumpe, Haake, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte die stufenweise Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit auf maximal 100 ml/min.

Für die Studien wurden ausschließlich Lungen verwendet, die während der künstlichen Perfusion eine homogene weiße Oberfläche und während der Versuchsvorlaufphase keine Hinweise auf Hämostase oder Lungenödembildung (Gewichtszunahme) aufwiesen. Kranke Versuchstiere wurden ausgeschlossen.

2.1.3 Das Perfusionssystem (siehe auch Abb 2.1)

Die Perfusion wurde über eine Rollerpumpe mit pulsatilem Flow (MCP Standard, Ismatec, Deutschland) aufrechterhalten, die während der Versuche eine konstante Perfusion von 100 ml/min lieferte. Das Perfusat passierte einen der Rollerpumpe vorgeschalteten Filter (Iso-Gard Filter S Hudson RCI, High Wycombe, England). Dieser wurde vor Beginn des Versuchs vom Perfusionssystem ausgeschlossen. Die im Perfusionssystem folgende Blasenfalle diente der Sicherstellung einer blasenfreien Lungenperfusion und der Vermeidung pulmonal-arterieller Luftembolien. Der linksatriale Abfluss wurde über ein Kaskadensystem abgeleitet, das eine Widerstandsregulierung ermöglichte.

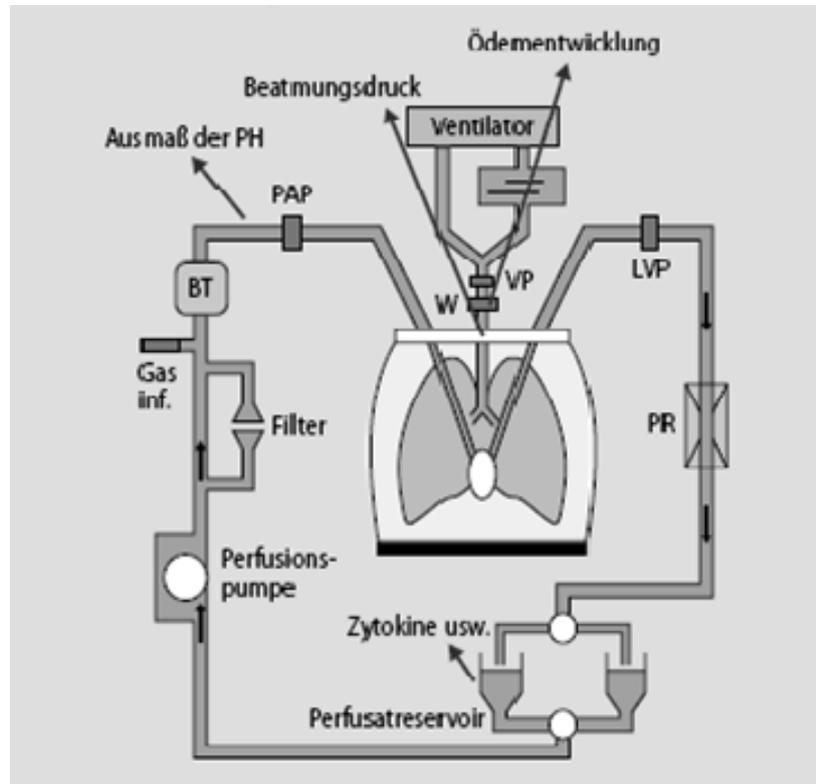


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus;

BT= Blasenfalle, PAP= Pulmonal-arterieller Druck, W= Gewicht,

VP= Ventilationsdruck, LVP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck;

2.1.4 Das Beatmungssystem

Die Beatmung erfolgte über einen Harvard-Kleintierventilator (Ventilator Typ UB 6025, Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland). Die Atemfrequenz betrug 30/Minute bei einem Atemzugvolumen von 27-30 ml. Mit Beginn der artifiziellen Perfusion wurden der inspirierten Raumlaut 4% CO₂ beigemischt. Die Expiration wurde über ein PEEP-System abgeleitet. Der damit eingestellte positive endexpiratorische Druck betrug 1,2 bis 1,5 cm Wassersäule.

2.1.5 Das Aerosolierungssystem

Die inhalative Verabreichung von NaCl 0,9% und BNP erfolgte über einen Ultraschallvernebler (Optineb ®, Nebu-Tec, Elsenfeld, Deutschland), der für den Verabreichungszeitraum in den Inspirationsschenkel des Beatmungssystems eingebracht wurde. Der Vernebler produziert ein Aerosol mit einer mittleren Teilchengröße von 4 µm bei einer geometrischen Standardabweichung von 1,6 µm. Die absolute Aerosoldeposition wurde von Schmehl und Mitarbeitern²⁰⁸ in einem vergleichbaren Modell bestimmt und betrug 25±0.02%.

2.1.6 Registrierungen der Parameter

Die kontinuierliche Aufnahme der Drücke in der Pulmonalarterie, im linken Vorhof und in der Trachea wurden mittels dünner Katheter innerhalb der Perfusionskatheter beziehungsweise des Beatmungstubus ermöglicht. Diese waren parallel an einen Druckaufnehmer angeschlossen (Single-Use-Pressure-Transducer, Firma Braun, Deutschland), der mit einem PlugSys DBA Verstärker (Hugo Sachs, Deutschland) in Verbindung stand. Zu dem konnten über die Innenkatheter von Pulmonalarterie und linkem Vorhof jederzeit Perfusatproben entnommen werden, um die Messgrößen pH, PO₂ und PCO₂ zu kontrollieren.

Das relative Lungengewicht wurde mittels Kraftübertragung an einer elektronischen Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Angeschlossen wurde die Wägezelle an einen Messverstärker („Scout 55“, Hottinger Baldwin Messtechnik).

Die Registrierung der Drücke und des Gewichts erfolgte durch Anschluss der Verstärker an einen Personal Computer über eine AD/DA-Wandlerkarte (Firma Decision).

2.2 Modell der Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie an der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge

Das Modell der Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie wurde gut charakterisiert und etabliert ^{79;209}. Durch individuelle Titration des Thromboxanmimetikums U46619 (9,11-Dideoxy-11,9-Epoxy-Methano-Prostaglandin F₂) (Paesel&Lorei, Frankfurt/Main, Deutschland) in die zirkulierende Pufferlösung kommt es zu einer überwiegend präkapillären, stabilen pulmonalen Hypertonie ²⁰⁹.

Die Großzahl der bisherigen Studien nutzte dabei die Infusion des stabilen Thromboxanmimentikums zur Induktion eines Modells des akuten Lungenversagens (ARDS). Dieses Modell ist gekennzeichnet durch das Vorliegen einer massiven Gasaustauschstörung, die auf eine stark ausgeprägte pulmonale Hypertonie (Pulmonalarteriendruck ca. 34 mmHg) und eine Lungenödementwicklung mit einer relativen Gewichtseinlagerung von ≥ 10 g zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Pulmonalarteriendruckniveau gewählt, bei dem es nicht zu einem signifikanten Lungenödem kommt, welches die Untersuchung der pulmonalen Vasoreaktivität beeinflussen würde. In den vorliegenden Versuchen wurde ein Pulmonalarteriendruck von ca. 25 mmHg eingestellt. Unter der Verwendung eines onkotischen Agens bei diesem Druck entwickelten die isolierten Organe bis zum Versuchsende kein relevantes Lungenödem.

2.3 Modell der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie an der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge

Endothelin-1 (ET-1) ist einer der stärksten Vasokonstriktoren in der pulmonalen Strombahn und wird bei pulmonaler Hypertonie vermehrt gebildet ³⁸. Zu dem konnten Schmeck und Mitarbeiter ²¹⁰ an der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge nach einmaliger intravasaler ET-1-Gabe eine unmittelbare Erhöhung des pulmonal-arteriellen Mitteldrucks beobachten. Unsere Gruppe konnte das Modell einer konstanten pulmonalen Hypertonie durch eine Einmalapplikation im isolierten Lungenmodell etablieren. In diesen Versuchen führte die Verabreichung von 0.1 μ M ET-1 zu einem kontinuierlichen Druckanstieg über eine Stunde, um danach in einem konstanten Druckniveau von ca. 25 mmHg zu münden ²¹¹. Auch im hier verwendeten ET-1-Modell wurde bei einem Druckniveau von ca. 25 mmHg keine

Lungenödembildung beobachtet. Damit sollen hier ebenfalls zur Beobachtung der Vasoreaktivität möglichst optimale Verhältnisse geschaffen werden.

2.4 Bestimmung von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)

In der Kontrollgruppe wurden alle 30 Minuten, in der Interventionsgruppe zu den Zeitpunkten „Baseline“ (t=0, unmittelbar vor U46619-Intervention), „Druckplateau“ (t=30, unmittelbar vor BNP-Applikation) und in der Folge alle 15 Minuten dem linksventrikulären Ausflusstrakt 2ml Perfusat entnommen. Dieses wurde anschließend über 5 Minuten mit 5000 U/min zentrifugiert, abpipettiert und bei -80°C gelagert. Daraufhin erfolgte die Konzentrationsbestimmung des zyklischen Guanosin-3',5'-monophosphats (cGMP) mittels eines handelsüblichen Radioimmunoassay-Kits (RIA) (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland).

2.4.1 Radioimmunoassay (RIA)

Der Radioimmunoassay ist eine etablierte Methode zum Nachweis zyklischer Nukleotide²¹². Dieser beruht auf dem Prinzip zweier konkurrierender Antigene um die Bindung an einen spezifischen Antikörper.

Im vorliegenden Fall sollte im isolierten Lungenmodell gebildetes cGMP nachgewiesen werden. Das in den Perfusatproben befindliche und zu quantifizierende cGMP konkurriert dabei mit einer bekannten Menge an mit radioaktivem Jod (¹²⁵J) - markiertem cGMP. Gemessen wird letztlich die Konzentration des Komplexes aus radioaktiv markiertem cGMP und Antikörper. Das Ergebnis verhält sich dabei reziprok zur Konzentration des unmarkierten antikörpergebundenen cGMP aus den Perfusatproben.

Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Um eine höhere Affinität des cGMPs zum Antikörper zu erreichen, wurde zunächst den Perfusatproben ein Acetylierungsreagens hinzugefügt. Darauf folgte die Beimischung des cGMP-spezifischen Antiserums. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das radioaktive ¹²⁵J-cGMP zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei Temperaturen von 2-8°C über 15-18 Stunden inkubiert, so dass sich folgendes Reaktionsgleichgewicht einstellte:



In einem weiteren Schritt galt es, die Antigen-Antikörper-Komplexe von freien cGMP-Molekülen zu trennen. Hierfür wurde ein weiterer Antikörper zur Bindung des Antigen-Antikörper-Komplexes hinzugefügt, anschließend zentrifugiert und der Überstand mit freiem cGMP abpipettiert.

In gleicher Weise wurde mit Hilfe definierter cGMP-Mengen eine Standardkurve erstellt.

Im letzten Schritt wurde mit einem Gammastrahlenszähler zunächst die Radioaktivität der Standardproben bestimmt. Wie beschrieben verhält sich die zu messende Radioaktivität des ^{125}Jod umgekehrt zu der vorhandenen cGMP Konzentration in den Perfusatproben. Durch Abgleich mit den Standardkurven wurden dann die cGMP-Konzentrationen in den Perfusatproben ermittelt.

2.5 Statistische Auswertung

Ausgewertet wurden die Parameter pulmonal-arterieller Mitteldruck (mPAP) und Ventilationsdruck (VP) sowie das relative Lungengewicht. Außerdem erfolgte der statistische Vergleich der cGMP-Konzentrationen.

In der U46619-Versuchsreihe wurden die Messparameter in 15-minütigen Zeitintervallen nach Etablierung eines stabilen PAP-Niveaus erfasst. Die genauen Vergleichszeitpunkte waren $t = 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135$ und 150 . Verglichen wurde die U46619-Gruppe mit den Versuchen mit intravasaler Applikation von BNP. Die Versuche mit BNP-Aerosol wurden mit U46619 Versuchen verglichen, bei denen NaCl-Aerosol vernebelt wurde.

In der ET-1-Versuchsreihe wurden ebenfalls 15 Minutenintervalle ausgewertet, nachdem ein stabiler pulmonaler Hypertonus etabliert war. Die Zeitpunkte waren hier $t = 0, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180$ und 195 .

Zum Vergleich der cGMP-Konzentrationen wurden die Perfusatproben zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135$ und 150 herangezogen. Verglichen wurden die Gruppe der U46619 behandelten Lungen ohne weitere Intervention mit der Gruppe intravasaler BNP-Applikation (10 nM). In der Aerosol-Versuchsreihe wurden die Gruppen NaCl-Aerosol und BNP-Aerosol (200 nM) miteinander verglichen.

Als Kontrollgruppe diente eine solche ohne jegliche Intervention. Vergleichszeitpunkte hier waren $t = 0, 30, 60, 90, 120$ und 150 . ($n=3$ je Gruppe)

Als statistischer Test diente entweder der gepaarte t-Test oder die einfaktorielle ANOVA (Analysis of Variance) mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Als statistisch signifikant galten Werte mit $p < 0,05$.

3. Versuchsreihen

In den Versuchsreihen wurden die Auswirkungen synthetisch hergestellten BNPs auf die pulmonale Hämodynamik und den Ventilationsdruck, die Konzentration des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) und das relative Lungengewicht in zwei unterschiedlichen Modellen einer pulmonalen Hypertonie untersucht.

Hierfür wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Welche Auswirkung hat die systemische Applikation von BNP auf den pulmonal-arteriellen Mitteldruck am Modell der Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie? Besteht dabei eine Dosis-/Wirkungsbeziehung?
2. Ist eine Beeinflussung des pulmonal-arteriellen Mitteldrucks durch Aerosolierung von BNP sowohl am Modell der Thromboxan als auch ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie möglich?
3. Werden die beobachteten Effekte über das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt?

Folgende Versuchsgruppen wurden zur Beantwortung der Fragen definiert:

Kontrollgruppe, n=4: keinerlei Intervention

Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie, n=6

Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit systemischer BNP-Dosiswirkungskurve, n=4

Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol als Placebo, n=5

Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol, n=5

Endothelin-1 induzierte pulmonale Hypertonie, n=4

Endothelin-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol als Placebo, n=4

Endothelin-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol, n=4

3.1 Untersuchungen am Modell der Thromboxan induzierten pulmonalen Hypertonie

3.1.1 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie

Nach 30minütiger Steady-State-Phase wurde das Thromboxanmimetikum U46619 nach individueller Titration kontinuierlich infundiert. Die jeweilige Dosis wurde so gewählt, dass ein stabiles pulmonal-arterielles Druckniveau von ~25mmHg Mitteldruck erreicht wurde.

Zur Herstellung einer Stammlösung wurde zunächst 1mg U46619 (9,11-Dideoxy-11,9-Epoxy-Methano-Prostaglandin F₂) (Paesel & Lorei, Frankfurt, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 350,5g/Mol in 1200 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und in 25µl Aliquots mit einer Konzentration von 2,4mM bei -20°C gelagert. 25µl der Stammlösung wurden mit 50ml Perfusat verdünnt und in eine Perfusorspritze (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgezogen. Die Lösung wurde mittels einer Perfusorpumpe (Firma Braun, Melsungen, Deutschland) über einen separaten Perfusionsschenkel vor der Blasenfalle in das Perfusionssystem eingeleitet. Die zugeführte U46619-Menge wurde am Ende des Versuchs über die Perfusionsspritzenskalierung ermittelt und betrug 65 bis 650 pmol/kg/min.

3.1.2 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit Dosiswirkungskurve von intravasal appliziertem BNP

Nach Beobachtung eines 15minütigen stabilen Druckniveaus unter U46619-Infusion wurde das BNP intravasal appliziert. In den Versuchen wurde BNP in den Konzentrationen 1nM, 5nM, 10nM und 100nM (jeweils n=4) verabreicht. Dabei wurde BNP pro Versuch nur in einer der genannten Dosen appliziert.

Hierfür wurde 1mg BNP (MondoBiotech, Basel, Schweiz) mit einem Molekulargewicht von 3464,04 g/Mol in 1ml NaCl 0,9% gelöst und in 100µl Aliquots mit einer Konzentration von 0,3mM bei -80°C gelagert. Die intravasale Applikation erfolgte als Einmalbolus in den Perfusativorratsbehälter.

3.1.3 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol als Placebo

Nach Beobachtung eines 15-minütigen stabilen Druckniveaus unter U46619-Infusion wurden 1200 µl NaCl 0,9% über 15 Minuten aerosolisiert. Die Aerosolierung erfolgte mittels eines Ultraschallverneblers (Optineb®, Nebu-Tec, Elsenfeld, Deutschland), der für den Verabreichungszeitraum in den Inspirationsschenkel eingebracht wurde.

3.1.4 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol

Nach Beobachtung eines 15-minütigen stabilen Druckniveaus unter U46619-Infusion erfolgte in Analogie zur Placebo-Inhalation die Vernebelung des BNP-Aerosols über 15 Minuten. Hierfür wurde BNP wie beschrieben aufgelöst, mit 1200 µl NaCl 0,9% weiter verdünnt und mit einer Konzentration von 200 nM, bezogen auf das zirkulierende Perfusatvolumen, aerosolisiert.

3.2 Untersuchungen am Modell der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie:

3.2.1 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie

Nach einer 30-minütigen Aquilibrierungsphase wurde ET-1 mit einer einmaligen Dosis von 5 nM in Perfusativorratsbehälter (intravasal) appliziert. Nach Voruntersuchungen aus unserem Labor²¹¹ ist es möglich, mit dieser Dosis ein stabiles pulmonal-arterielles Druckniveau von ~25 mmHg zu erreichen.

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 500 µg ET-1 (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 2492 g/mol in 62,5 µl 80%iger Essigsäure gelöst und mit 937,5 µl destilliertem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde auf 10 µl Aliquots mit einer Konzentration von 0,2 mM verteilt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit NaCl-Aerosol als Placebo

Nach 15-minütiger Beobachtung eines stabilen Druckniveaus nach ET-1 Applikation wurde NaCl 0,9% in Analogie zu der U46619-Versuchsreihe, über 15 Minuten aerosolisiert.

3.2.3 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosol

Nach 15-minütiger Beobachtung eines stabilen Druckniveaus nach ET-1 Applikation wurde BNP in einer Konzentration von 200nM analog zu der U46619-Veruchsreihe, über 15 Minuten aerosoliert.

3.3 Standardisierter Versuchsablauf

In allen Versuchsreihen erfolgte die kontinuierliche Registrierung der hämodynamischen und ventilatorischen Parameter sowie des relativen Lungengewichts. Des Weiteren wurde in der U46619-Veruchsgruppe mit systemischer BNP-Applikation von 10nM die Konzentration von cGMP mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Perfusatproben wurden hierfür zu den Zeitpunkten *Baseline* (unmittelbar vor U46619 Titration, $t=0$), nach Dokumentation des stabilen Druckniveaus über 15 Minuten ($t=30$) und nachfolgend in 15-minütigen Abständen ($t=45$ bis 150 Minuten) entnommen. In der Aerosolgruppe erfolgte die Perfusatprobenentnahme zu den Zeitpunkten „Baseline“ ($t=0$), „Druckplateau“ (unmittelbar vor Beginn des BNP-Aerosols, $t=30$), am Ende der BNP-Aerosolierung ($t=45$) und nachfolgend in 15-minütigen Abständen ($t=60$ bis $t=150$). Zu den genannten Zeitpunkten erfolgte ebenfalls die Auswertung der Parameter Ventilations- (VP) und pulmonal-arterieller (PAP), linksventrikulärer (LVP) Druck und des relativen Lungengewichts. Im Rahmen der Kontrollgruppe wurden die Perfusatproben zu den Zeitpunkten $t=0, 30, 60, 90, 120$ und 150 entnommen. In der ET1-Veruchsreihe erfolgten die Vergleiche unmittelbar vor Intervention und $60, 75, 90, 100, 115, 130, 145, 160, 175$ und 190 Minuten nach ET1-Applikation.

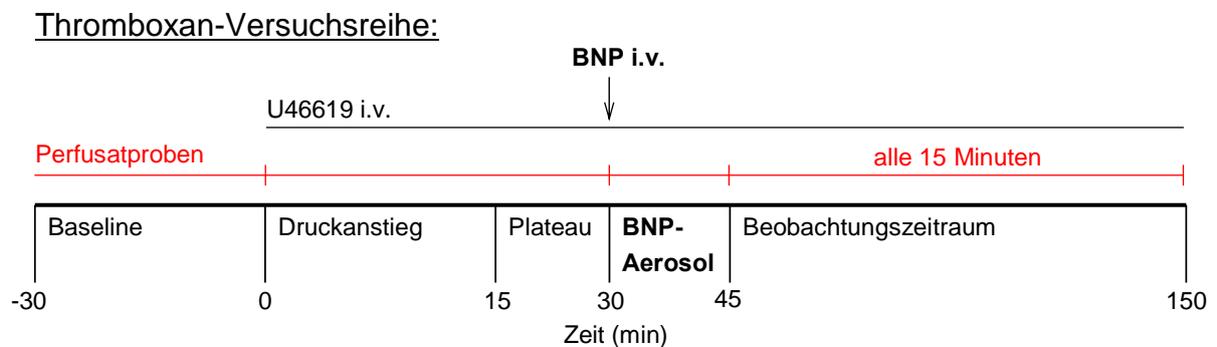
3.4 Definition der Vergleichszeitpunkte

Die Äquilibrierungsphase endete mit dem Beginn der U46619-Infusion oder der ET-1-Applikation. Die Intervention definiert in allen Versuchen den Zeitpunkt „ $t=0$ “.

In der U46619-Versuchsreihe beziehen sich die Zeitangaben auf den Start der U46619-Infusion. Die Applikation von BNP oder Placebo erfolgte zum Zeitpunkt „ $t=30$ “. Der

anschließende Beobachtungszeitraum wurde auf 120 Minuten festgelegt. Die gesamte Versuchsdauer (ohne Aquilibrierungsphase) betrug demnach 150 Minuten.

Bezugspunkt der ET-1-Versuchsreihe ist der Zeitpunkt der ET-1-Bolusapplikation. Die Aerosolierung von BNP oder Placebo erfolgte zum Zeitpunkt „t=75“. Der folgende Beobachtungszeitraum wurde ebenfalls auf 120 Minuten festgelegt, die gesamte Versuchsdauer erstreckte sich damit insgesamt über 195 Minuten.



Endothelin-Versuchsreihe:

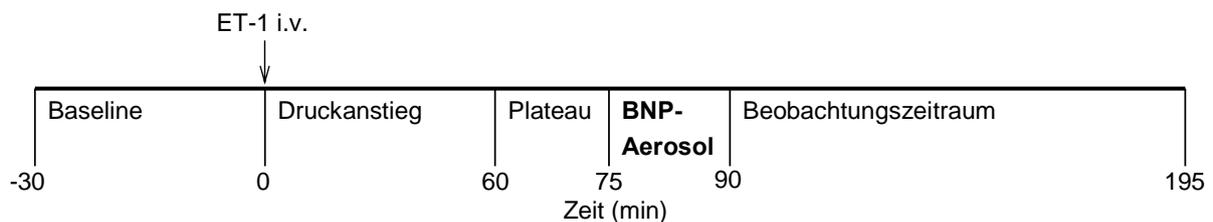


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollversuche

Am Ende der 30-minütigen Äquilibrationsphase lagen die registrierten Drücke in der Pulmonalarterie (PAP) zwischen 5 und 6 mmHg und die Ventilationsdrücke (VP) bei 2 – 4 cmH₂O. Es wurde keine signifikante Veränderung des Lungengewichts beobachtet. Über einen Zeitraum von 6 Stunden wiesen weder die hämodynamischen Parameter noch der VP oder das Lungengewicht signifikante Änderungen auf.

Allerdings stieg die cGMP-Konzentration im Verlauf des Versuches von $0,83 \pm 0,2$ pmol/ml bis zum Zeitpunkt „t=150“ etwa linear an, auf Werte von $5,07 \pm 1,38$ pmol/ml.

4.2 Thromboxan-Versuchsreihe

4.2.1 Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie (Tabelle im Anhang)

Nach individueller Titration von U46619 wurde nach 15 Minuten die angestrebte pulmonal-arterielle Drucksteigerung von $4,76 \pm 0,4$ mmHg auf $25,5 \pm 0,26$ mmHg erzielt. Ohne weitere Intervention blieb das Druckniveau über 135 Minuten konstant und erreichte zum Ende des Versuches einen PAP von $25,53 \pm 0,9$ mmHg (Zeitpunkt „t=150“). Weder Ventilationsdruck noch Lungengewicht wiesen über den Beobachtungszeitraum signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe auf.

Die cGMP-Konzentration stieg unter U46619-Infusion von $0,91 \pm 0,11$ pmol/ml auf $3,95 \pm 0,83$ pmol/ml an, ohne damit signifikant von der Kontrollgruppe abzuweichen.

4.2.2 Dosiswirkungskurve von intravasal appliziertem BNP bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie (Abb 4.2a und Tabelle im Anhang)

Nach Etablierung eines stabilen PAP-Niveaus über 15 Minuten (t=30) durch die kontinuierliche U46619-Infusion wurde BNP als Bolus intravasal appliziert. Je nach Versuch wurden unterschiedliche Dosierungsgruppen für das BNP verwendet (1 nM, 5 nM, 10 nM und 100 nM). Bereits ab einer Dosis von 5 nM konnte eine rasche und dosisabhängige PA-

Druckminderung registriert werden. Die maximale Drucksenkung wurde bei einer Dosis von 10 nM beobachtet. Dieser Effekt konnte durch eine Dosissteigerung auf 100 nM nicht verstärkt werden. Hier wurde jedoch zu einem früheren Zeitpunkt die maximale Druckreduktion beobachtet. Bei Dosen von 5 nM und 10 nM zeigte sich die maximale Druckreduktion 25 bis 30 Minuten nach BNP-Applikation, während bei einer Dosis von 100 nM die niedrigsten PAP-Werte bereits 10 Minuten nach Applikation registriert wurden. Verglichen mit der Kontrollgruppe wurden bei allen Versuchen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Ventilationsdruck und Lungengewicht registriert.

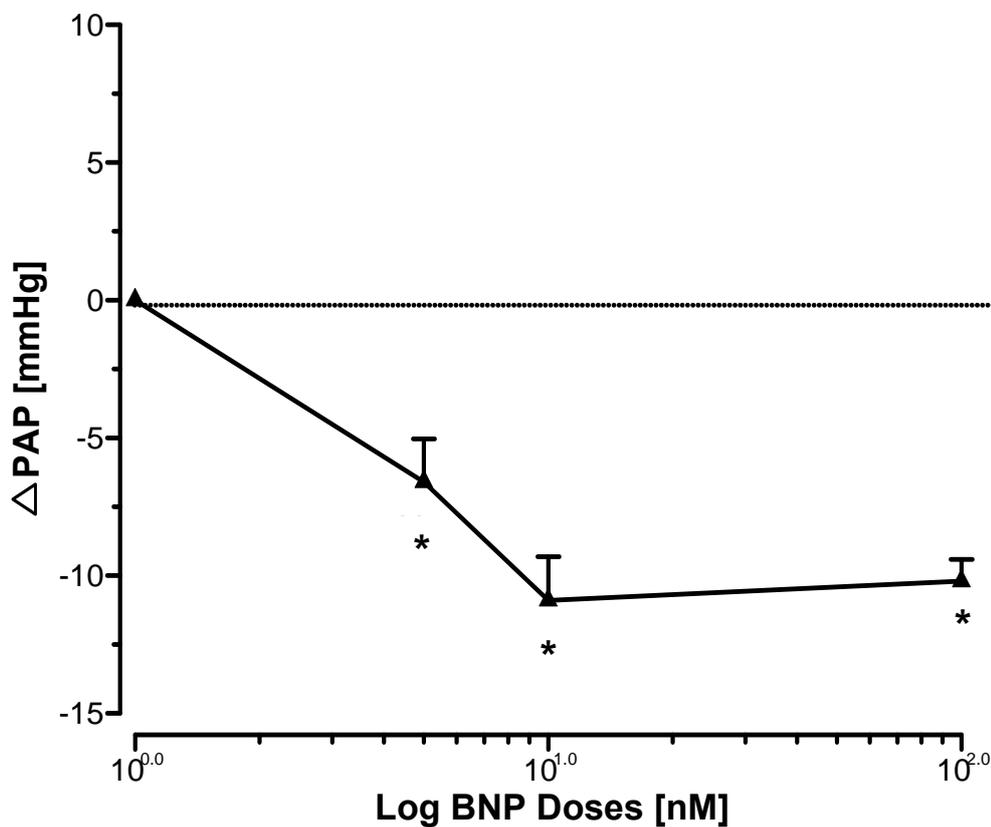


Abb. 4.2a: Dosis-/Wirkungskurve von intravasal appliziertem BNP auf den mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie. Als Referenz gelten die mPAP-Werte der Thromboxan behandelten Lungen ohne weitere Intervention (* $p < 0,01$) ($n = 4$ je Gruppe).

4.2.3 Pharmakodynamik einer Einzeldosis von intravasal appliziertem BNP bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie (Abb 4.2b und Tabelle im Anhang)

Nach intravasaler Applikation von 10nM BNP wurde eine unmittelbare PAP-Reduktion von $25,5 \pm 0,26$ mmHg auf $18,13 \pm 0,95$ mmHg binnen 15 Minuten beobachtet ($p < 0,01$). Im Versuchsverlauf kam es zu einer weiteren Drucksenkung auf ein Minimum von $16,5 \pm 1,59$ mmHg. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums wurde die Abnahme des Effektes mit einem erneuten PAP-Anstieg auf $18,48 \pm 3,72$ mmHg registriert, womit der drucksenkende Effekt signifikant blieb ($p < 0,05$).

Bei vergleichbarer Ausgangskonzentration für das cGMP wurde die PAP-Senkung von einem raschen Anstieg der cGMP-Konzentration begleitet, die am Ende des Versuchs ($t=150$) den 6-fachen Wert der U46619-Kontrollgruppe aufwies ($p < 0,001$).

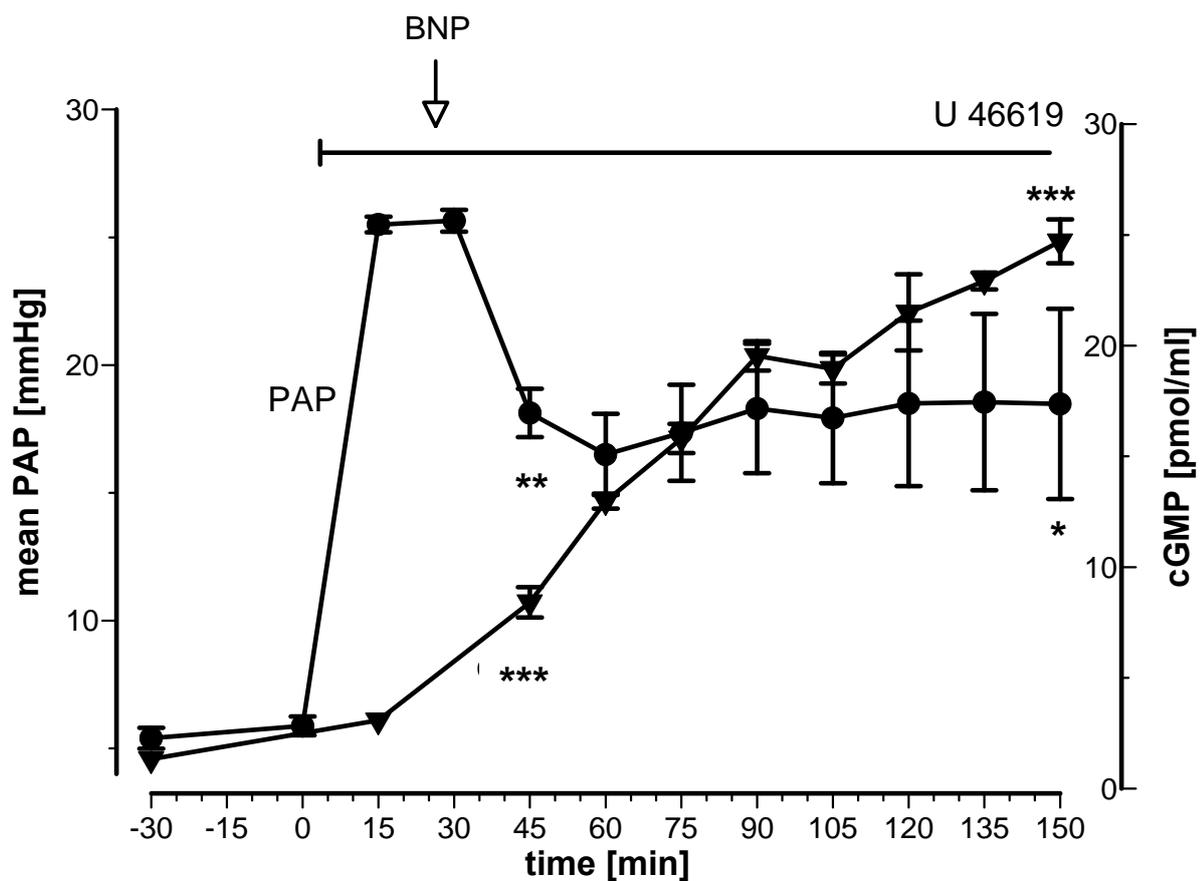


Abb. 4.2b: Darstellung des mPAP (●) und der cGMP-Konzentration (▼) nach systemischer Applikation von 10 nM BNP. Als Referenz gelten die Messwerte für mPAP und cGMP zu den jeweiligen Zeitpunkten der Thromboxan behandelten Lungen ohne jegliche Intervention.

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) ($n=4$ für mPAP-Messwerte; $n=3$ für cGMP-Konzentrationsmessung).

4.2.4 Placebo-Aerosolierung bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie (Abb 4.2c und Tabelle im Anhang)

Die 15-minütige Kochsalz-Aerosolierung erfolgte 30 Minuten nach Beginn der U46619-Infusion unter stabilen Druckbedingungen (PAP: $26,5 \pm 0,56$ mmHg). Diese hatte keine signifikanten Auswirkungen auf PAP ($27,12 \pm 1,06$ mmHg am Ende des Versuchs), VP oder Lungengewicht.

Bezüglich der cGMP-Konzentration wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt, verglichen mit der Kontrollgruppe.

4.2.5 Auswirkung des BNP-Aerosols auf die Thromboxan induzierte pulmonale Hypertonie (Abb. 4.2c und Tabelle im Anhang)

Die Aerosolierung synthetischen BNPs führte binnen 15 Minuten zu einer raschen und signifikanten Reduktion des PAP von $25,96 \pm 0,55$ mmHg auf $23,52 \pm 0,65$ mmHg ($p < 0,05$). Im Verlauf folgte eine weitere Drucksenkung bis auf ein Minimum von $22 \pm 2,1$ mmHg am Ende des Beobachtungszeitraums. Der drucksenkende Effekt wurde von einem unmittelbaren Anstieg der cGMP-Konzentration begleitet. Diese wies am Ende des Versuchs eine 3fache Erhöhung im Vergleich zur Placeboaerosolgruppe auf ($p < 0,05$). Ventilationsdrücke und Lungengewicht wichen nicht signifikant von der Kontrollgruppe ab (siehe Abb 4.2d).

Sowohl PAP-Reduktion als auch cGMP-Zunahme waren in ihrer Ausprägung nicht so stark wie nach intravasaler Applikation von BNP (siehe Abb 4.2d).

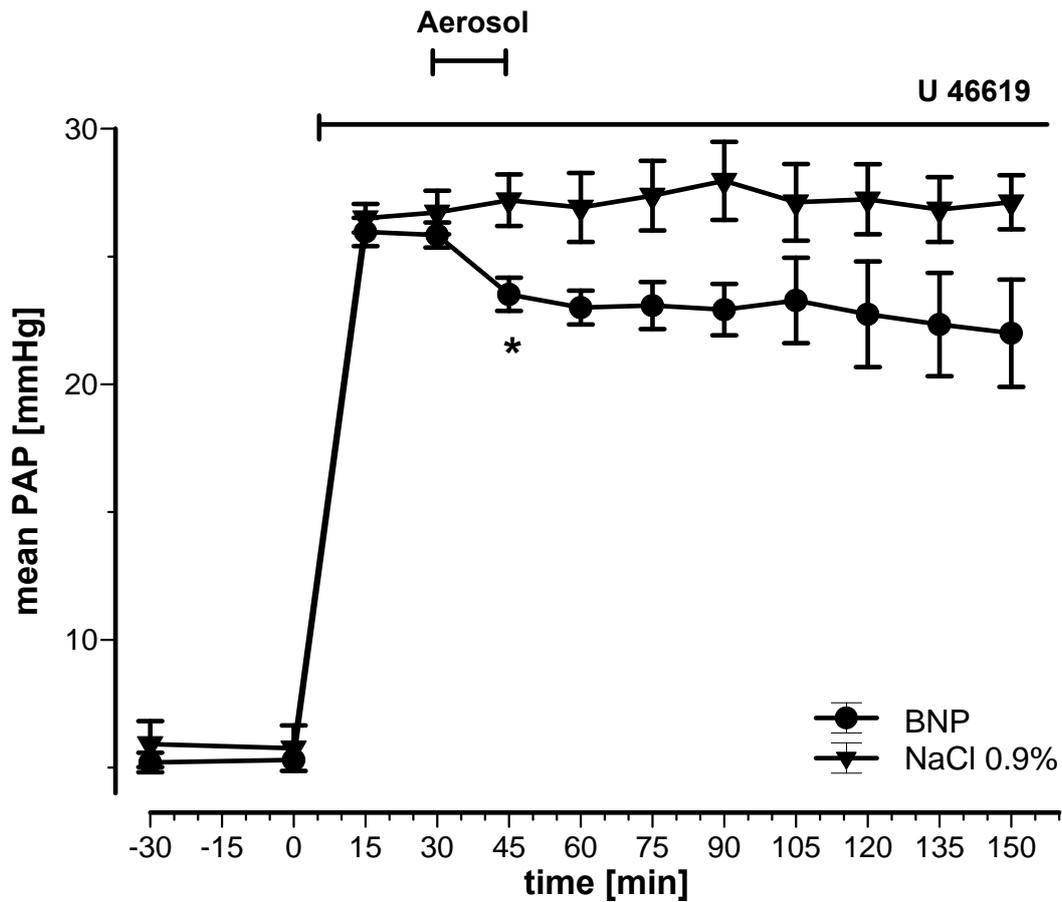


Abb. 4.2c: Einfluss der Aerosolierung von BNP (●) und NaCl (▼) auf den mPAP bei Thromboxan induzierter PH. Verglichen wurde der mPAP der beiden Gruppen an den jeweiligen Zeitpunkten (* $p < 0,05$) ($n = 5$ je Gruppe).

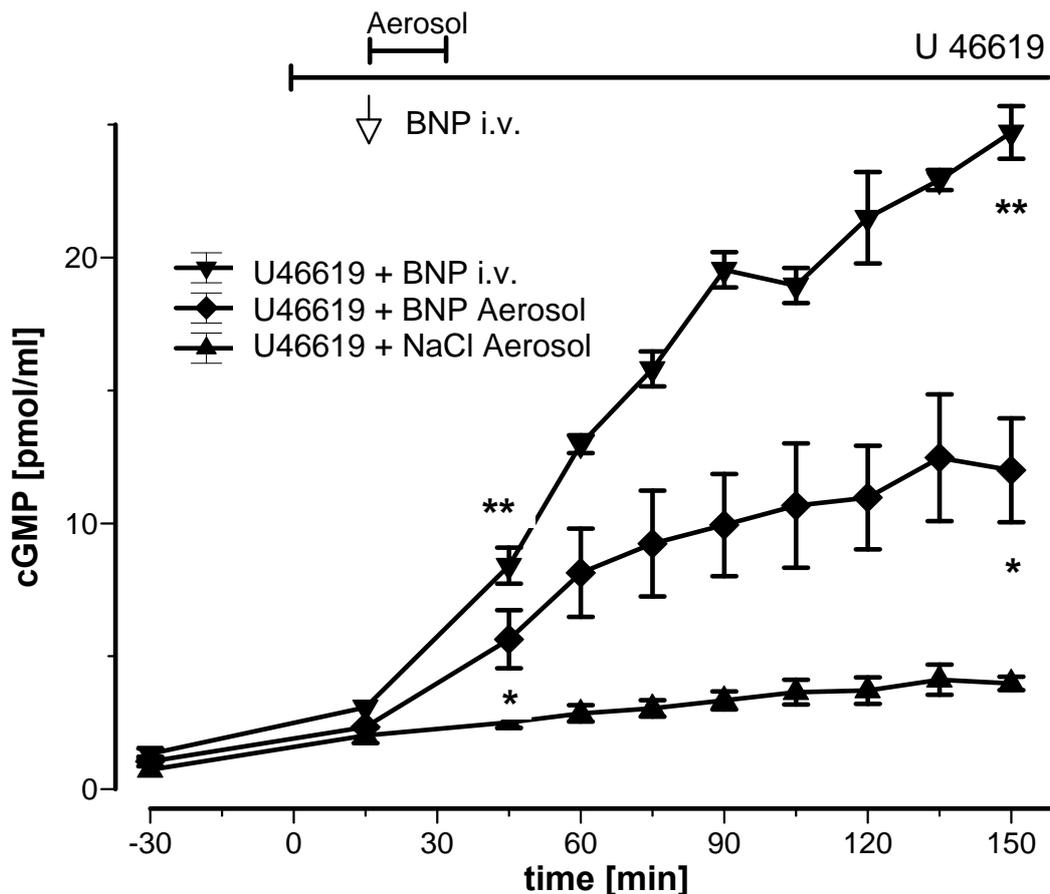


Abb. 4.2d: Vergleich der cGMP-Konzentration bei Thromboxan induzierter pulmonaler Hypertonie. Verglichen wurden die Gruppen ohne weitere Intervention (Kurve nicht dargestellt) und nach systemischer BNP-Applikation (▼), sowie die Gruppen NaCl-Aerosol (▲) und BNP-Aerosol (◆). Die Werte der Gruppen ohne weitere Intervention und NaCl-Aerosol zeigten keine signifikanten Abweichungen untereinander (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$) ($n=3$ je Gruppe).

4.3 Endothelin-1-Versuchsreihe

4.3.1 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie (Tabelle im Anhang)

Nach 30-minütiger Äquilibrationsphase wurde ET-1 als Bolus intravasal appliziert. Dieser bewirkte einen raschen und kontinuierlichen PAP-Anstieg über 60 Minuten und gipfelte schließlich in einem Plateau von $25,78 \pm 1,95$ mmHg. Dies blieb ohne weitere Intervention über 135 Minuten konstant. Ventilationsdruck und Lungengewicht wiesen, verglichen mit der Kontrollgruppe, wiederum keine signifikanten Abweichungen auf.

4.3.2 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit Placebo-Aerosolierung (Abb 4.3 und Tabelle im Anhang)

Unter stabilen Druckbedingungen von $27 \pm 2,16$ mmHg erfolgte die Kochsalz-Aerosolierung über eine Dauer von 15 Minuten, 60 Minuten nach der ursprünglichen ET-1 Applikation. Während der Verneblungsphase und in den folgenden 120 Minuten wurden keine signifikanten Abweichungen von der Kontrollgruppe bezüglich PAP, VP und Lungengewicht beobachtet. Das PA-Druckplateau war darüber hinaus bis zum Ende des Versuchs stabil (PAP auf $25,8 \pm 1,71$ mmHg).

4.3.3 ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie mit BNP-Aerosolierung (Abb 4.3 und Tabelle im Anhang)

Die Aerosolierung von BNP bewirkte binnen 15 Minuten eine rasche und signifikante PAP-Reduktion von $24,88 \pm 2,13$ mmHg auf $21,8 \pm 2,13$ mmHg ($p < 0,05$). Im Verlauf kam es zu einer weiteren Abnahme des PAP ($19,9 \pm 2,51$ mmHg) 30 Minuten nach Start der Aerosolierung ($t=105$) und erreichte ein Minimum von $17,1 \pm 2,47$ mmHg ($p < 0,05$) am Ende des Versuchs. Dabei wurden weder Ventilationsdruck noch Lungengewicht signifikant beeinflusst.

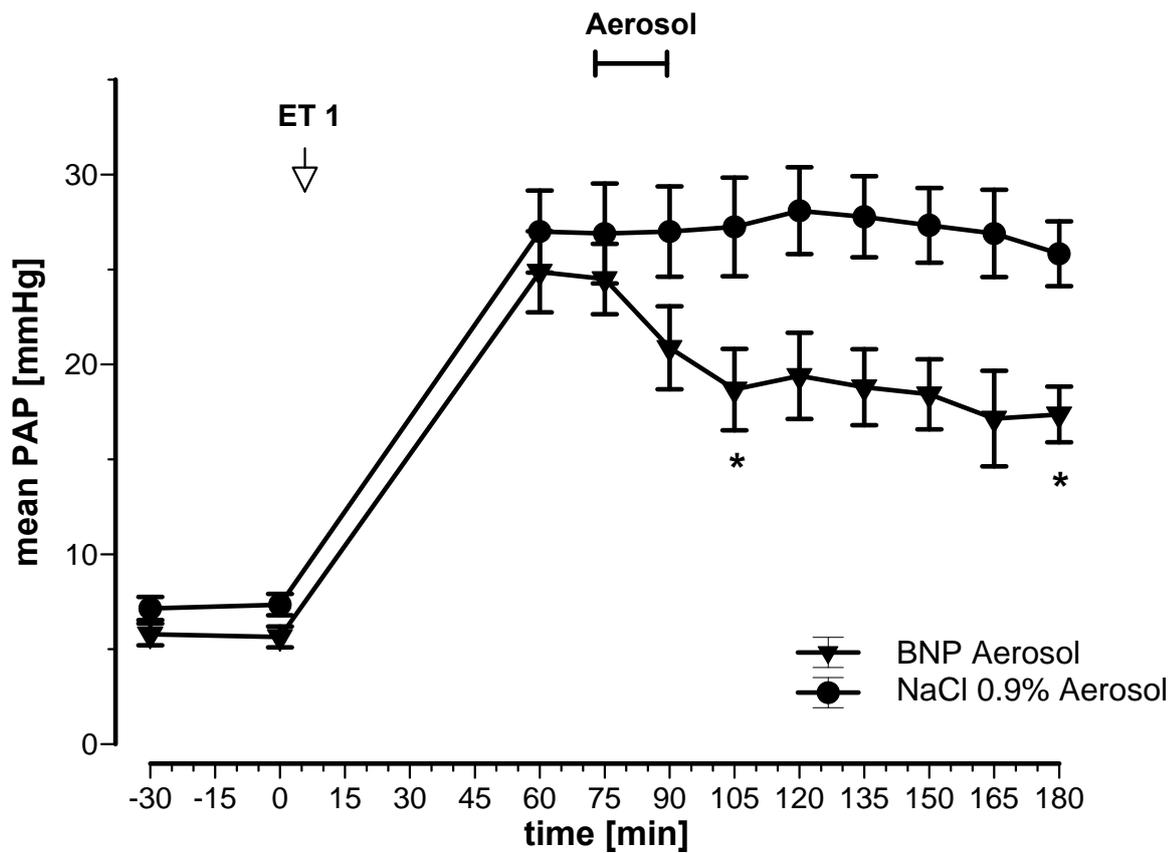


Abb. 4.3: Einfluss der Aerosolierung von BNP (▼) und NaCl (●) auf den mPAP bei ET-1 induzierter PH. Verglichen wurde der mPAP der beiden Gruppen an den jeweiligen Zeitpunkten (* $p < 0,05$) ($n = 3$ je Gruppe).

5. Diskussion

Die pulmonale Hypertonie stellt eine schwere Erkrankung mit schlechter Prognose dar. Dabei nimmt die Vasokonstriktion als frühe Komponente eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie ein. Bis heute sind die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt, nicht zuletzt auf Grund systemischer Nebenwirkungen bei intravenöser Applikation. Daraufhin hat sich die Aerosolierung von vasodilatierenden Substanzen wie NO und Prostazyklin als therapeutischer Ansatz etabliert. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie sind die BNP-Serumspiegel kompensatorisch erhöht. Die natriuretischen und vasodilatierenden Eigenschaften von BNP werden bereits im Rahmen der Herzinsuffizienz therapeutisch genutzt.

Die vorliegenden Untersuchungen an der isolierten Kaninchenlunge zeigen die akute pulmonal vasodilatierende Potenz von exogenem BNP in zwei unterschiedlichen nicht-hypoxischen Modellen der pulmonalen Hypertonie. Diese Effekte wurden sowohl nach systemischer Applikation als auch nach Aerosolierung von BNP beobachtet. Mit dieser Untersuchung gelingt der Nachweis einer erhaltenen Vasoaktivität eines natriuretischen Peptides nach seiner Verneblung in die Lunge.

Eine anhaltende pulmonale Vasokonstriktion ist ein Charakteristikum der pulmonalen Hypertonie²¹³. Entscheidende Mediatoren in der Vermittlung einer solchen pulmonalen Vasokonstriktion sind Thromboxan und Endothelin-1^{24;38}. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Etablierung einer stabilen pulmonalen Vasokonstriktion das Thromboxanmimetikum U46619 und Endothelin-1 verwendet. Deren Applikation führt zu einer Steigerung des pulmonal-vaskulären Widerstands über eine vorwiegend präkapilläre pulmonale Vasokonstriktion^{42;214}. Sie sind etablierte Mediatoren zur Ausbildung einer artifiziellen pulmonalen Hypertonie^{211;215;216}. Dabei ist zu bemerken, dass gerade das U46619 im Vorfeld meist als Modell zur Entwicklung eines akuten Lungenversagens genutzt wurde, da es zusätzlich zur pulmonalen Vasokonstriktion auch zu einer Extravasation von Perfusionsflüssigkeit führt und damit zur Ausbildung eines Lungenödems. Die damit verbundenen Störungen des Gasaustauschs sind ein klassisches Charakteristikum des akuten Lungenversagens²¹⁷. Da allerdings die Ausbildung eines Lungenödems die Untersuchung der pulmonalen Vasoreaktivität nachhaltig beeinflussen kann, wurde im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen in dieser Arbeit eine stabile pulmonale Vasokonstriktion angestrebt ohne gleichzeitige Entwicklung eines signifikanten Lungenödems. Dies konnte sowohl durch die kontinuierliche Infusion von U46619 erreicht werden, als auch durch die einmalige Bolusgabe von ET-1. In den angewandten Dosierungen führte die jeweilige Applikation in etwa zu einer

vierfachen Erhöhung des Pulmonalarteriendruckes ohne Ausbildung eines Lungenödems. Die Etablierung eines stabilen Druckniveaus war entscheidend, um eine an die Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie angeglichenen Situation zu erreichen. Über den gesamten Versuchszeitraum von etwa zwei Stunden konnte nach einem (bei ET-1 und U46619 unterschiedlich langen) Druckanstieg eine Plateauphase erreicht werden, die es erlaubte, die biologischen Effekte des BNP anhand seiner vasodilatierenden Eigenschaften zu untersuchen. Steigende Dosierungen von BNP wurden in die Pufferlösung der U46619-vorbehandelten Lungen appliziert. Wenige Minuten nach Applikation wurde eine signifikante Reduktion des PAP beobachtet. Das Ausmaß der Wirkung war dabei klar dosisabhängig. In den entsprechenden Versuchen zur Beschreibung der Pharmakodynamik während eines zweistündigen Beobachtungszeitraums ließ sich der PA-drucksenkende Effekt über den gesamten Zeitraum nachweisen.

Die antagonisierende Wirkung exogenen BNPs auf die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion bei gesunden Probanden wurde bereits von Cargill und Mitarbeitern beschrieben ¹⁹⁶. Zudem bewirkt die chronische Infusion von BNP die Abschwächung des Remodellingprozesses bei chronisch Hypoxie-exponierten Ratten ²¹⁸. Da die NO-Bildung sauerstoffabhängig ist, kommt es unter alveolär-hypoxischen Zuständen zur Verminderung der endothelialen NO-Produktion und damit zu einer verminderten cGMP-Generierung. Dies erklärt unter anderem, warum in solch defizitären Zuständen das exogen zugeführte NO als Prototyp eines pulmonalen Vasodilatators gilt ⁶⁴. Der natriuretische Peptid- und der NO-Signalweg werden im arteriellen Gewebe anscheinend invers reguliert. So kommt es in isoliertem vaskulären Gewebe durch experimentelle Hemmung des NO/sGC-Signalwegs zur Sensitivierung des NP/pGC-Signalwegs und umgekehrt. Außerdem führt die Aktivierung eines der beiden Signalwege zur Hemmung des Anderen ¹³². Dies könnte die gesteigerte und vermutlich gegenregulatorische Bedeutung von BNP im Rahmen der beschriebenen Studien miterklären. Es ist allerdings festzustellen, dass die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion einen physiologischen Reflex darstellt, der die Umverteilung des Blutflusses von minderventilierten zu normoventilierten Lungenarealen sichert. In den genannten Studien wurde dieser Reflex durch die Gabe exogenen BNPs allerdings antagonisiert, so dass eine vermehrte Shuntperfusion und arterielle Hypoxämie resultieren könnte. Bisher wurde die vasodilatierende Potenz von BNP noch nicht an einem nicht-hypoxischen quasi in-vivo-Modell der pulmonalen Hypertonie untersucht.

Die verschiedenen biologischen Effekte von BNP werden über den natriuretischen Peptid Rezeptor Typ A (NPR-A) vermittelt. Die rezeptorgebundene Guanylatzyklase (pGC) führt zur

Generierung von zyklischem GMP (cGMP) ²¹⁹. Wie bereits erwähnt, führt auch NO zur gesteigerten cGMP-Synthese, jedoch über die lösliche Guanylatzyklase (sGC) ²²⁰. Daher gilt cGMP als ein bedeutender second-messenger in der Vermittlung vasodilatierender Effekte an der glatten pulmonalen Gefäßmuskelzelle ⁶⁴.

Die zentrale Bedeutung der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP in der Regulation des pulmonal-vaskulären Tonus wurde mehrfach gezeigt. Erhöhte cGMP-Spiegel, entweder über eine gesteigerte Produktion oder über die Inhibition des vorherrschenden Abbauenzym, der Phosphodiesterase 5 (PDE5), haben akute vasodilatierende Effekte in der experimentellen pulmonalen Hypertonie. cGMP-generierendes NO und der PDE5-Inhibitor Sildenafil sind inzwischen etablierte therapeutische Ansätze im Rahmen der PAH ^{64;221;222}.

Analog dazu verhalten sich cAMP-generierende Substanzen wie PGI₂ und Iloprost beziehungsweise solche Substanzen, die den Abbau der cAMP metabolisierenden Isoenzyme der Phosphodiesterasen (PDE3 und -4) hemmen. Die pulmonal vasodilatierende Potenz der genannten Substanzen wurde in experimentellen wie klinischen Studien belegt ^{78-81;192}. Darüber hinaus führt die chronische Applikation cAMP erhöhender Substanzen zu positiven Effekten auf chronische Umbauvorgänge der Lungengefäßwand ²²³. Von entscheidender Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang die enge Verknüpfung der cGMP- und cAMP-Signalwege sein. cGMP bewirkt über Inhibition der Phosphodiesterase Typ 3 (PDE3) einen verminderten Abbau von cAMP und folglich eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ²²⁴. Zudem führen hohe cGMP-Konzentrationen zu einer Kreuzaktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) ⁸⁴. Die Folge sind vasodilatierende und direkt antiproliferative Effekte. Alle bisher zur Therapie der pulmonalen Hypertonie etablierten Substanzen haben vasodilatierende Effekte. Die Vasodilatation ist gleichbedeutend mit einer Reduktion der bei hypertensiven Zuständen auf das pulmonale Gefäßbett wirkenden Scherkräfte. Diese wiederum stellen einen Reiz für den chronischen Gefäßumbau dar. Schlussfolgernd könnten akut vasodilatierende Effekte per se einen hemmenden Einfluss auf den chronischen Gefäßumbau ausüben. Dies wiederum würde die Bedeutung eines akuten vasodilatativen Effekts als therapeutischen Ansatz im chronischen Prozess der PAH unterstreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Radioimmunoassay die Perfusatkonzentration zirkulierenden cGMPs bestimmt. Unmittelbar nach nur einmaliger intravasaler BNP-Bolusapplikation wurde ein dramatischer Anstieg der cGMP-Konzentration beobachtet. Der cGMP-Spiegel stieg über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig an und erreichte Maximalwerte am Ende des Versuchs. Verglichen mit der U46619-Kontrollgruppe wiesen

diese um mehr als das sechsfache gesteigerte Konzentrationen auf. Die cGMP-Erhöhung wurde von einem signifikanten Abfall des Pulmonalarteriendrucks begleitet.

Die Ergebnisse unterstreichen, dass die Lunge über Kapazitäten verfügt, signifikante und biologisch wirksame Mengen cGMP zu synthetisieren. Des Weiteren sind die Beobachtungen gut mit der Annahme vereinbar, dass dieses Potential NPR-A-vermittelt erreicht werden kann.

Die Ergebnisse einer gesteigerten cGMP-Konzentration nach intravasaler Verabreichung natriuretischer Peptide werden von klinischen und experimentellen Untersuchungen gestützt. Holmes und Mitarbeiter beobachteten einen unmittelbaren cGMP-Anstieg nach Beginn einer BNP-Infusion bei gesunden Probanden ²²⁵. McGregor et al berichteten von einer signifikant vermehrten renalen cGMP-Ausscheidung während einer BNP-Infusion bei Gesunden ²²⁶.

In einer experimentellen Studie von Schermuly et al. führte die Infusion von Urodilatin, einer in der Niere synthetisierten alternativen ANP-Spaltvariante, zu einem Anstieg der cGMP-Plasmakonzentration und zur nicht-selektiven systemischen und pulmonalen Vasodilatation im Kaninchen-Ganztiermodell ¹⁹². Da die inhalative Co-Applikation eines PDE5-Inhibitors eine zusätzliche Steigerung des vasodilatierenden Effekts bewirkte, wurde schlussfolgernd die Lunge als Hauptbildungsorgan für cGMP im Ganztiermodell betrachtet. Jedoch bleibt in diesem Modell eine extrapulmonale, durch Urodilatin vermittelte Rezeptoraktivierung und cGMP-Generierung möglich, womit die Lunge als cGMP-Bildungsort nicht abschließend bestimmt werden kann. Unsere Daten ergänzen die Beobachtungen von Schermuly et al, da wir eine extrapulmonale cGMP-Synthese in Abhängigkeit von BNP am isolierten Lungenmodell ausschließen können. Darüber hinaus konnten wir eine gesteigerte cGMP-Produktion nicht nur nach intravasaler Verabreichung, sondern auch nach BNP-Aerosolierung beschreiben.

Die intravasale Verabreichung pulmonal-vasodilatierender Substanzen kann zur Verschlechterung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses beitragen. Durch eine Perfusionssteigerung in bereits minderventilierte Lungenareale wird ein Abfall der arteriellen Sauerstoffsättigung und die klinische Verschlechterung des Patienten begünstigt ⁶⁴. Zur Vermeidung dieses Problems hat die inhalative Verabreichung vasodilatierender Substanzen wie Prostazyklin oder NO beigetragen ^{32;215}. Dadurch kann sowohl eine pulmonale als auch intrapulmonale Selektivität mit bevorzugter Vasodilatation im Bereich gut ventilierter Lungenareale erreicht werden.

In der vorliegenden Studie wurde BNP via Aerosol über die Dauer von 15 Minuten appliziert. Unmittelbar nach Beginn der Aerosolierung wurde eine signifikante Reduktion des mPAP registriert, der über den gesamten Beobachtungszeitraum anhielt. Analog zur intravasalen BNP-Applikation wurde eine in enger zeitlicher Relation stehende Erhöhung der zirkulierenden

cGMP-Konzentration gemessen. Diese erreichte den maximal 3-fachen Wert verglichen mit der Placebo-Aerosolgruppe am Ende des Versuchs. In der BNP-Aerosolversuchsreihe waren diese Effekte signifikant, jedoch weniger ausgeprägt als nach intravasaler Applikation von BNP.

Nach unserem Wissensstand stellen die beschriebenen Versuche die erste Studie über eine BNP-Applikation via Aerosol dar. Damit ist es die erste Studie zur Vernebelung natriuretischer Peptide und die zweite Studie zur Vernebelung von Peptiden im Rahmen der pulmonalen Hypertonie überhaupt. So konnte in klinischen Studien die erhaltene vasodilatative Aktivität nach Aerosolierung des Vasoaktiven Intestinalen Peptids (VIP) nachgewiesen werden^{227;228}. In klinischen Studien wurde zudem an kleinen Kollektiven die bronchodilatatorische Potenz von ANP nach Applikation als Aerosol nachgewiesen^{229;230}.

Angus und Mitarbeiter konnten außerdem den Nachweis erhöhter cGMP-Serumspiegel nach ANP-Aerosolierung erbringen²²⁹.

Die erhaltene Bioaktivität von Peptiden nach Applikation über die Luftwege ist dabei keineswegs selbstverständlich. Dagegen spricht die hohe proteolytische Aktivität auf der Oberfläche trachealer und pulmonaler Epithelzellen lokalisierter Enzyme^{184;231-233}. Johnson et al konnten hohe Konzentrationen der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP) in humanen oberen Luftwegen und in den Alveolarepten nachweisen¹⁸⁴. Des Weiteren gibt es limitierende Faktoren im spezifischen Abbau der natriuretischen Peptide. So begünstigen wohl auch hohe Konzentrationen des Clearance-Rezeptors NPR-C die schnelle Elimination von BNP. Dieser wurde auf der Oberfläche trachealer Epithelzellen von Ratten als auch auf humanen pulmonalen Gefäßmuskelzellen nachgewiesen^{122;173;234}. Da es sich bei der Absorption von Peptiden über die alveolär-kapilläre Barriere um einen passiven parazellulären Prozess handelt, wird intrazellulären Peptidasen keine Bedeutung zugewiesen²³⁵.

Die genannten proteolytischen Faktoren könnten die hohe Dosis erklären, die in der vorliegenden Arbeit für eine signifikante Erhöhung des cGMP-Serumspiegels beziehungsweise Reduktion des mPAP notwendig war. Auch Hulks et al benötigten hohe Dosen ANP um eine bronchodilatative Aktivität via Aerosolierung zu erhalten. Sie erklärten dies mit dem Mechanismus einer dadurch erreichten Sättigung der für den Abbau zuständigen Enzyme²³⁰.

Unsere Studie weist eindeutige Limitierungen auf. Es konnten lediglich akute Effekte einer BNP-Applikation beschrieben werden. Somit bleiben die Auswirkungen einer chronischen Behandlung unklar. Weiterhin unsicher bleibt auch, ob eine zusätzliche Erhöhung der BNP-Plasmaspiegel einen positiven Effekt im chronisch pulmonal-hypertensiven Stadium hat, da zu diesem Zeitpunkt das NP-System ohnehin hochreguliert ist⁶⁹. Jedoch zeigten die Ergebnisse eines pulmonalen Hypertonie-Modells durch chronische Hypoxie, dass die dauerhafte

Behandlung mit BNP positive Effekte auf die chronische pulmonale Hypertension haben kann²³⁶. Des Weiteren ist Sildenafil, welches intrazelluläre cGMP-Spiegel durch Hemmung der cGMP-abbauenden Enzyms PDE-5 induziert, bereits eine etablierte Therapieoption bei Patienten mit chronischer PAH^{71;72;76}. In einer klinischen Studie konnten zudem positive Effekte einer Kombinationstherapie, bestehend aus Sildenafil und BNP, nachgewiesen werden. Die PAP-Reduktion war dabei stärker ausgeprägt als bei der Monotherapie der beiden Substanzen²³⁷. Zhao et al beobachteten eine verminderte Wirkung von Sildenafil bei NPR-A-Knock-Out-Mäusen. Sie schlussfolgerten, dass ein intaktes NPR-A-System für die Wirkung von Sildenafil entscheidend sei⁷⁶. Ein intaktes NPR-A-System beinhaltet neben dem Rezeptor eine adäquate Stimulation durch BNP und ANP.

Außerdem limitierend ist, dass keine Untersuchungen bezüglich des Ventilations-/Perfusions-Verhältnisses durchgeführt wurden. Es kann daher nur mittels vorangegangener Studien mit inhalativen Vasodilatoren spekuliert werden, dass die BNP-Aerosolierung zusätzlich intrapulmonalselektive und somit positive Effekte auf den Gasaustausch hat.

Im Rahmen unserer Studien wurden keine Untersuchungen zur Co-Applikation exogenen BNPs und Inhibitoren der PDE-5 durchgeführt, womit wir einen möglichen additiven Effekt durch beispielsweise Sildenafil nicht beweisen können. Jedoch konnten bereits experimentelle und klinische Studien den Nutzen einer Kombination aus Nucleotid-generierenden Substanzen und Inhibition ihrer Abbauenzyme nachweisen^{71;78;217}.

Die vorliegende Arbeit konnte keine endgültige Aussage über die Signaltransduktion des beobachteten vasodilatierenden Effekts treffen. Die NPR-A vermittelte Wirkung von BNP wurde vielfach beschrieben^{90;106}. Zudem gelang uns der Nachweis einer cGMP-Erhöhung sowohl nach intravasaler als auch inhalativer Verabreichung, die in engem zeitlichem Verhältnis zur Vasodilatation stand. Somit kann der NPR-A-cGMP-Signalweg für die Vermittlung der beobachteten vasoaktiven Effekte für beide Applikationswege als wahrscheinlich gelten.

Trotz der beschriebenen limitierenden Faktoren gelingt mit der vorliegenden Arbeit der Nachweis der vasodilatierenden Potenz exogenen BNPs an einem nicht-hypoxischen Modell der akuten pulmonal-arteriellen Hypertonie. Erstmals wurde der Beweis einer erhaltenen pulmonalen Vasoaktivität von BNP nach seiner Vernebelung in die Lunge erbracht. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass die beobachteten vasodilatierenden Effekte sowohl nach intravasaler als auch inhalativer Applikation cGMP vermittelt sind.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte bei akuter pulmonaler nicht-hypoxischer Vasokonstriktion die drucksenkende Wirkung von BNP durch intravasale und inhalative Applikation nachgewiesen werden. Der Nachweis der begleitend gesteigerten cGMP-Konzentration ließ Rückschlüsse auf die Signaltransduktion des vasodilatierenden Effekts zu.

Diese Ergebnisse geben Anreiz zur Überprüfung eines eventuell synergistischen und additiven Effekts durch Ko-Applikation eines PDE5-Inhibitors (z.B. Sildenafil) am Modell der akuten pulmonalen Hypertonie. Sowohl die systemische als auch die inhalative Verabreichung wären Gegenstand weiterer Untersuchungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen. Die hier verwendeten Modelle der U46619- und ET-1-induzierten PH an der isolierten Kaninchenlunge wären diesbezüglich adäquate Versuchsaufbauten.

Von besonderem Interesse wäre hier eine hohe, auf das Zielorgan beschränkte, lokale cGMP-Generierung durch die Aerosolierung von BNP. Durch zusätzliche Hemmung der vor allem in der Lunge exprimierten PDE-5^{70;139} könnte eine hohe pulmonale und intrapulmonale Selektivität erreicht werden. Klinger et al konnten bereits an PAH-Patienten die vasodilatierende Wirkung einer BNP-Sildenafil-Kombinationstherapie nachweisen. Die Reduktion des mPAP war dabei stärker ausgeprägt als bei der Monotherapie der beiden Substanzen²³⁷.

Die Aerosolierung von BNP könnte weiter an Bedeutung gewinnen, weil auch eine bronchodilatative Potenz von intravenösem BNP bei Asthmapatienten nachgewiesen wurde²³⁸. Zudem hat die Aerosolierung von ANP in klinischen Studien bereits bronchodilatierende Effekte bei Asthmapatienten gezeigt²³⁰.

Bei der BNP-Aerosolierung wäre zudem die Ko-Applikation eines Endopeptidase-Inhibitors (NEP-Inhibitor) mit eventuell potenzierender Wirkung denkbar. Klinische Studien im Rahmen der Asthmatherapie zeigten eine verlängerte Wirkungszeit von aerosolisiertem ANP nach Ko-Applikation des NEP-Inhibitors Thiorphan²²⁹.

Darüber hinaus wäre der Einfluss von BNP auf die pulmonale Hämodynamik in einem Modell der chronischen pulmonalen Hypertonie von großem Interesse. Modelle zur Erzeugung einer experimentellen chronischen PH sind beispielsweise durch die Verabreichung von Monocrotalin oder durch chronische Hypoxie an der Ratte beschrieben.

Hier könnte zunächst eine Akuttestung ähnlich unserem Versuchsaufbau jedoch mit vorbestehender chronischer PH Auskunft über eine möglicherweise veränderte Vasoreagibilität im Verlauf einer sich entwickelnden oder manifesten PH geben. Eventuell würde zudem eine Zellkultur von Endothel- oder glatten Muskelzellen Aufschluss geben über Rezeptor- oder Mediatorveränderungen, die die mangelnde gegenregulatorische Potenz trotz hoher BNP-Spiegel bei PAH erklären könnten. Mit Hilfe chronischer BNP-Applikationen wäre dessen Einflussnahme auf fortschreitende Umbauvorgänge (Remodelling) im Rahmen einer chronischen PH beurteilbar. Neben histologischen Präparaten könnten Zellkulturtestungen Rückschlüsse auf den Einfluss von BNP auf die PAH zulassen. Daraus ergäben sich Möglichkeiten zur Untersuchung unterschiedlicher Synthesemuster auf Protein- oder mRNA-Ebene mittels ELISA bzw. PCR (Polymerase-Kettenreaktion). So könnte der Einfluss auf die Expression wichtiger Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF und PDGF sowie ET-1 beurteilt werden.

Auch im chronischen PH-Modell wäre der Vergleich von systemischer und inhalativer BNP-Gabe notwendig. Ebenso könnte die Ko-Applikation von PDE5- oder NEP-Inhibitoren in Betracht gezogen werden, um höhere Wirkstoffkonzentrationen und längere Wirkungsdauer zu erzielen.

Zu einem späteren Zeitpunkt würde eine klinische Testung mit BNP-Aerosolierung wichtige Einblicke in ein mögliches therapeutisches Anwendungsgebiet liefern. Als erster Schritt könnte hierzu im Rechtsherzkatheter mit einschleichenden BNP-Dosen die hämodynamischen Auswirkungen untersucht werden.

7. Zusammenfassung

Die pulmonal-arterielle Hypertonie stellt eine schwere Erkrankung mit einer stark eingeschränkten Prognose dar. Bedeutende pathophysiologische Mechanismen sind die Vasokonstriktion sowie der fortschreitende Umbau des pulmonalen Gefäßbetts. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu ansteigenden Plasmaspiegeln des B-Type Natriuretic Peptides (BNP). Diese korrelieren mit der Schwere der Erkrankung und gelten als prognostische Indikatoren. BNP bewirkt über den Natriuretischen Peptid Rezeptor Typ-A (NPR-A) die Generierung von zyklischem GMP. Die vasodilatierende und antiproliferative Wirkung zyklischer Nukleotide hat zur therapeutischen Anwendung cGMP und cAMP-generierender Substanzen wie NO, Sildenafil und Iloprost im Rahmen der PAH geführt. Zudem kann über die inhalative Verabreichung eine pulmonale Selektivität mit Vermeidung systemischer Nebenwirkungen erzielt werden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die hämodynamischen Auswirkungen von BNP auf die Lungenzirkulation zu untersuchen. Es galt zu prüfen, ob die Beeinflussung des pulmonal-arteriellen Drucks durch sowohl intravasale als auch inhalative Applikation möglich ist. Der Klärung bedurfte es, ob die beobachteten Effekte über cGMP vermittelt werden.

Die Studien wurden an einer experimentell erzeugten akuten pulmonalen Hypertonie am etablierten Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge durchgeführt. Untersucht wurden der pulmonal-arterielle Druck, das relative Lungengewicht als Maß der Ödementwicklung sowie die zirkulierende cGMP-Konzentration, die mittels eines kommerziellen Radioimmunoessays bestimmt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die pulmonal-arteriell drucksenkende Wirkung von BNP gezeigt. Der Effekt wurde sowohl unmittelbar nach intravasaler als auch – etwas geringer ausgeprägt - inhalativer Applikation beobachtet. Damit gelang erstmalig der Nachweis einer erhaltenen Vasoaktivität von BNP nach Aerosolierung und inhalativer Applikation. Die Drucksenkung wurde jeweils von einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden cGMP-Konzentration begleitet. Die beobachteten Effekte und Konzentrationverläufe von cGMP legen nahe, dass die vasodilatierende Wirkung von BNP unabhängig vom Applikationsmodus, über den NPR-A-cGMP-Signalweg vermittelt wird.

Ansätze nachfolgender Untersuchungen liegen in der Erforschung einer Beeinflussung chronischer pulmonal-hypertensiver Zustände. Diese könnten Aufschluss über eine möglicherweise veränderte Vasoreagibilität gegenüber BNP im Krankheitsverlauf geben. Die Erprobung einer kombinierten Applikation aus BNP-Aerosol und PDE5-Inhibitoren

hinsichtlich Hämodynamik und Umbauvorgänge der Lungenstrombahn wären von therapeutischer Bedeutung. Auch die Kombination aus aerosolisiertem BNP und NEP-Inhibitoren wären hinsichtlich wirkungsverstärkender Ansätze von Interesse. Dies bliebe sowohl in experimentellen als auch klinischen Studien zu prüfen. Entsprechende experimentelle und mögliche klinische Studien werden derzeit konzipiert.

8. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Jain, S., H. Ventura, and B. deBoisblanc. 2007. Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 11:104-109.
2. West, J. B. 1992. Gravity and pulmonary blood flow distribution. *J Appl Physiol* 73:2201-2202.
3. Olschewski, H., W. Seeger, and F. Grimminger. 1999. [Physiology and physiopathology of the pulmonary circulation]. *Internist (Berlin)* 40:696-709.
4. Barer, G. R., P. Howard, and J. W. Shaw. 1970. Stimulus response curves for the pulmonary vascular bed to hypoxia and hypercapnia. *The Journal of Physiology* 211:139-155.
5. Kovacs, G., A. Berghold, S. Scheidl, and H. Olschewski. 2009. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects A systematic review. *Eur Respir J* 09031936.
6. Badesch, D. B., H. C. Champion, M. A. Sanchez, M. M. Hoeper, J. E. Loyd, A. Manes, M. McGoon, R. Naeije, H. Olschewski, R. J. Oudiz, and A. Torbicki. 2009. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 54:S55-S66.
7. Simonneau, G., N. Galie, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebrec, R. Speich, M. Beghetti, S. Rich, and A. Fishman. 2004. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 43:5S-12S.
8. Simonneau, G., I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z. C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, and R. Souza. 2009. Updated clinical classification of pulmonary

hypertension

1. *J Am.Coll.Cardiol.* 54:S43-S54.
9. Barst, R. J., M. McGoon, A. Torbicki, O. Sitbon, M. J. Krowka, H. Olschewski, and S. Gaine. 2004. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 43:40S-47S.
10. McLaughlin, V. V. and M. D. McGoon. 2006. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 114:1417-1431.
11. Yuan, J. X. J. and L. J. Rubin. 2005. Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension: The Need for Multiple Hits. *Circulation* 111:534-538.
12. Machado, R. D., V. James, M. Southwood, R. E. Harrison, C. Atkinson, S. Stewart, N. W. Morrell, R. C. Trembath, and M. A. Aldred. 2005. Investigation of Second Genetic Hits at the BMPR2 Locus as a Modulator of Disease Progression in Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 111:607-613.
13. Loscalzo, J. 2001. Genetic Clues to the Cause of Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 345:367-371.
14. Deng, Z., J. H. Morse, S. L. Slager, N. Cuervo, K. J. Moore, G. Venetos, S. Kalachikov, E. Cayanis, S. G. Fischer, R. J. Barst, S. E. Hodge, and J. A. Knowles. 2000. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am.J Hum.Genet.* 67:737-744.
15. Atkinson, C., S. Stewart, P. D. Upton, R. Machado, J. R. Thomson, R. C. Trembath, and N. W. Morrell. 2002. Primary Pulmonary Hypertension Is Associated With Reduced Pulmonary Vascular Expression of Type II Bone Morphogenetic Protein Receptor. *Circulation* 105:1672-1678.

16. Du, L., C. C. Sullivan, D. Chu, A. J. Cho, M. Kido, P. L. Wolf, J. X. J. Yuan, R. Deutsch, S. W. Jamieson, and P. A. Thistlethwaite. 2003. Signaling Molecules in Nonfamilial Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 348:500-509.
17. Budhiraja, R., R. M. Tuder, and P. M. Hassoun. 2004. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 109:159-165.
18. Cool, C. D., S. D. Groshong, J. Oakey, and N. F. Voelkel. 2005. Pulmonary hypertension: cellular and molecular mechanisms. *Chest* 128:565S-571S.
19. Cool, C. D., P. R. Rai, M. E. Yeager, D. Hernandez-Saavedra, A. E. Serls, T. M. Bull, M. W. Geraci, K. K. Brown, J. M. Routes, R. M. Tuder, and N. F. Voelkel. 2003. Expression of Human Herpesvirus 8 in Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 349:1113-1122.
20. Humbert, M., N. W. Morrell, S. L. Archer, K. R. Stenmark, M. R. MacLean, I. M. Lang, B. W. Christman, E. K. Weir, O. Eickelberg, N. F. Voelkel, and M. Rabinovitch. 2004. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 43:13S-24S.
21. Chan, S. Y. and J. Loscalzo. 2008. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol.Cell Cardiol.* 44:14-30.
22. Loscalzo, J. 1992. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327:117-119.
23. Pak, O., A. Aldashev, D. Welsh, and A. Peacock. 2007. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* 30:364-372.

24. Christman, B. W., C. D. McPherson, J. H. Newman, G. A. King, G. R. Bernard, B. M. Groves, and J. E. Loyd. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327:70-75.
25. Giaid, A. and D. Saleh. 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333:214-221.
26. Pietra, G. G., W. D. Edwards, J. M. Kay, S. Rich, J. Kernis, B. Schloo, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, and . 1989. 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* 80:1198-1206.
27. Olschewski, H. and W. Seeger. 1994. [Pathophysiology of pulmonary hypertension]. *Z.Kardiol.* 83 Suppl 6:181-191.
28. Stenmark, K. R., E. Gerasimovskaya, R. A. Nemenoff, and M. Das. 2002. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122:326S-334S.
29. Jeffery, T. K. and N. W. Morrell. 2002. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension
1. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 45:173-202.
30. Archer, S. and S. Rich. 2000. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* 102:2781-2791.
31. Herve, P., M. Humbert, O. Sitbon, F. Parent, H. Nunes, C. Legal, G. Garcia, and G. Simonneau. 2001. Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin.Chest Med* 22:451-458.

32. Olschewski, H., F. Rose, E. Grunig, H. A. Ghofrani, D. Walmrath, R. Schulz, R. Schermuly, F. Grimminger, and W. Seeger. 2001. Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *J Lab Clin.Med* 138:367-377.
33. Farber, H. W. and J. Loscalzo. 1999. Prothrombotic mechanisms in primary pulmonary hypertension. *J Lab Clin.Med* 134:561-566.
34. Yuan, X. J., J. Wang, M. Juhaszova, S. P. Gaine, and L. J. Rubin. 1998. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 351:726-727.
35. Michelakis, E. D., M. S. McMurtry, X. C. Wu, J. R. Dyck, R. Moudgil, T. A. Hopkins, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, R. Waite, and S. L. Archer. 2002. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 105:244-250.
36. Weir, E. K., H. L. Reeve, D. A. Peterson, E. D. Michelakis, D. P. Nelson, and S. L. Archer. 1998. Pulmonary vasoconstriction, oxygen sensing, and the role of ion channels: Thomas A. Neff lecture. *Chest* 114:17S-22S.
37. Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, and T. Masaki. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.
38. Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, and D. J. Stewart. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328:1732-1739.
39. Chen, Y. F. and S. Oparil. 2000. Endothelin and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 35:S49-S53.

40. Rubens, C., R. Ewert, M. Halank, R. Wensel, H. D. Orzechowski, H. P. Schultheiss, and G. Hoeffken. 2001. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 120:1562-1569.
41. Stewart, D. J., R. D. Levy, P. Cernacek, and D. Langleben. 1991. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann.Intern.Med* 114:464-469.
42. Masaki, T. 1995. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:235-255.
43. Luscher, T. F. 1991. Endothelin. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 18 Suppl 10:S15-S22.
44. Li, H., S. J. Chen, Y. F. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, S. Oparil, and T. S. Elton. 1994. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 77:1451-1459.
45. Park, M. H. 2008. Advances in diagnosis and treatment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Catheter.Cardiovasc.Interv.* 71:205-213.
46. Rubin, L. J., D. B. Badesch, R. J. Barst, N. Galie, C. M. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg, and G. Simonneau. 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346:896-903.
47. Barst, R. J., D. Langleben, D. Badesch, A. Frost, E. C. Lawrence, S. Shapiro, R. Naeije, and N. Galie. 2006. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *J Am.Coll.Cardiol.* 47:2049-2056.
48. Galie, N., D. Badesch, R. Oudiz, G. Simonneau, M. D. McGoon, A. M. Keogh, A. E. Frost, D. Zwicke, R. Naeije, S. Shapiro, H. Olschewski, and L. J. Rubin. 2005.

- Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 46:529-535.
49. Luscher, T. F., C. M. Boulanger, Y. Dohi, and Z. H. Yang. 1992. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19:117-130.
50. Hinton, M., A. Gutsol, and S. Dakshinamurti. 2007. Thromboxane hypersensitivity in hypoxic pulmonary artery myocytes: altered TP receptor localization and kinetics. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 292:L654-L663.
51. Huang, J. S., S. K. Ramamurthy, X. Lin, and G. C. Le Breton. 2004. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal.* 16:521-533.
52. Janssen, L. J., H. Lu-Chao, and S. Netherton. 2001. Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 280:L666-L674.
53. Cogolludo, A., L. Moreno, L. Bosca, J. Tamargo, and F. Perez-Vizcaino. 2003. Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase Czeta. *Circ.Res.* 93:656-663.
54. Gaine, S. P. and L. J. Rubin. 1998. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 352:719-725.
55. Herve, P., J. M. Launay, M. L. Scrobohaci, F. Brenot, G. Simonneau, P. Petitpretz, P. Poubeau, J. Cerrina, P. Duroux, and L. Drouet. 1995. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am.J Med* 99:249-254.

56. Morecroft, I., R. P. Heeley, H. M. Prentice, A. Kirk, and M. R. MacLean. 1999. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br.J Pharmacol.* 128:730-734.
57. MacLean, M. R., P. Herve, S. Eddahibi, and S. Adnot. 2000. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br.J Pharmacol.* 131:161-168.
58. Tuder, R. M., Z. Radisavljevic, K. R. Shroyer, J. M. Polak, and N. F. Voelkel. 1998. Monoclonal endothelial cells in appetite suppressant-associated pulmonary hypertension. *Am.J Respir Crit Care Med* 158:1999-2001.
59. Hoeper, M. M., M. Schwarze, S. Ehlerding, A. dler-Schuermeyer, E. Spiekerkoetter, J. Niedermeyer, M. Hamm, and H. Fabel. 2000. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 342:1866-1870.
60. Olschewski, H., G. Simonneau, N. Galie, T. Higenbottam, R. Naeije, L. J. Rubin, S. Nikkho, R. Speich, M. M. Hoeper, J. Behr, J. Winkler, O. Sitbon, W. Popov, H. A. Ghofrani, A. Manes, D. G. Kiely, R. Ewert, A. Meyer, P. A. Corris, M. Delcroix, M. Gomez-Sanchez, H. Siedentop, and W. Seeger. 2002. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 347:322-329.
61. Leuchte, H. H. and J. Behr. 2005. Iloprost for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Expert.Rev.Cardiovasc.Ther.* 3:215-223.
62. Griffith, T. M., M. J. Lewis, A. C. Newby, and A. H. Henderson. 1988. Endothelium-derived relaxing factor. *J Am.Coll.Cardiol.* 12:797-806.

63. Zapol, W. M., S. Rimar, N. Gillis, M. Marletta, and C. H. Bosken. 1994. Nitric oxide and the lung. *Am.J Respir Crit Care Med* 149:1375-1380.
64. Ghofrani, H. A., J. Pepke-Zaba, J. A. Barbera, R. Channick, A. M. Keogh, M. A. Gomez-Sanchez, M. Kneussl, and F. Grimminger. 2004. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 43:68S-72S.
65. McQuillan, L. P., G. K. Leung, P. A. Marsden, S. K. Kostyk, and S. Kourembanas. 1994. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am.J Physiol* 267:H1921-H1927.
66. Kouyoumdjian, C., S. Adnot, M. Levame, S. Eddahibi, H. Bousbaa, and B. Raffestin. 1994. Continuous inhalation of nitric oxide protects against development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *J Clin.Invest* 94:578-584.
67. Pepke-Zaba, J., T. W. Higgenbottom, A. T. Hsu, D. Stone, and J. Wallwork. 1991. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338:1173-1174.
68. Brilli, R. J., B. Krafte-Jacobs, D. J. Smith, D. Passerini, L. Moore, and E. T. Ballard. 1998. Aerosolization of novel nitric oxide donors selectively reduce pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 26:1390-1396.
69. Nagaya, N., M. Uematsu, H. Oya, N. Sato, F. Sakamaki, S. Kyotani, K. Ueno, N. Nakanishi, M. Yamagishi, and K. Miyatake. 2001. Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am.J Respir Crit Care Med* 163:887-891.

70. Ahn, H. S., M. Foster, M. Cable, B. J. Pitts, and E. J. Sybertz. 1991. Ca/CaM-stimulated and cGMP-specific phosphodiesterases in vascular and non-vascular tissues. *Adv.Exp.Med Biol.* 308:191-197.
71. Ghofrani, H. A., F. Rose, R. T. Schermuly, H. Olschewski, R. Wiedemann, A. Kreckel, N. Weissmann, S. Ghofrani, B. Enke, W. Seeger, and F. Grimminger. 2003. Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 42:158-164.
72. Prasad, S., J. Wilkinson, and M. A. Gatzoulis. 2000. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 343:1342.
73. Supuran, C. T., A. Mastrolorenzo, G. Barbaro, and A. Scozzafava. 2006. Phosphodiesterase 5 inhibitors--drug design and differentiation based on selectivity, pharmacokinetic and efficacy profiles. *Curr.Pharm.Des* 12:3459-3465.
74. MacLean, M. R., E. D. Johnston, K. M. Mcculloch, L. Pooley, M. D. Houslay, and G. Sweeney. 1997. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 283:619-624.
75. Wharton, J., J. W. Strange, G. M. Moller, E. J. Growcott, X. Ren, A. P. Franklyn, S. C. Phillips, and M. R. Wilkins. 2005. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am.J Respir Crit Care Med* 172:105-113.
76. Zhao, L., N. A. Mason, N. W. Morrell, B. Kojonazarov, A. Sadykov, A. Maripov, M. M. Mirrakhimov, A. Aldashev, and M. R. Wilkins. 2001. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 104:424-428.
77. Schermuly, R. T., K. P. Kreisselmeier, H. A. Ghofrani, H. Yilmaz, G. Butrous, L. Ermert, M. Ermert, N. Weissmann, F. Rose, A. Guenther, D. Walmrath, W. Seeger, and

- F. Grimminger. 2004. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am.J Respir Crit Care Med* 169:39-45.
78. Schermuly, R. T., H. A. Ghofrani, B. Enke, N. Weissmann, F. Grimminger, W. Seeger, C. Schudt, and D. Walmrath. 1999. Low-dose systemic phosphodiesterase inhibitors amplify the pulmonary vasodilatory response to inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am.J Respir Crit Care Med* 160:1500-1506.
79. Schermuly, R. T., A. Roehl, N. Weissmann, H. A. Ghofrani, C. Schudt, H. Tenor, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 2000. Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 292:512-520.
80. Schermuly, R. T., E. Krupnik, H. Tenor, C. Schudt, N. Weissmann, F. Rose, F. Grimminger, W. Seeger, D. Walmrath, and H. A. Ghofrani. 2001. Coaerosolization of phosphodiesterase inhibitors markedly enhances the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension. Maintenance of lung selectivity. *Am.J Respir Crit Care Med* 164:1694-1700.
81. Schermuly, R. T., A. Roehl, N. Weissmann, H. A. Ghofrani, H. Leuchte, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 2001. Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281:L1361-L1368.
82. Wilkens, H., A. Guth, J. Konig, N. Forestier, B. Cremers, B. Hennen, M. Bohm, and G. W. Sybrecht. 2001. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 104:1218-1222.

83. Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter, and H. R. De Jonge. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem.Sci.* 22:307-312.
84. Cornwell, T. L., E. Arnold, N. J. Boerth, and T. M. Lincoln. 1994. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am.J Physiol* 267:C1405-C1413.
85. Kakishita, M., T. Nishikimi, Y. Okano, T. Satoh, S. Kyotani, N. Nagaya, K. Fukushima, N. Nakanishi, S. Takishita, A. Miyata, K. Kangawa, H. Matsuo, and T. Kunieda. 1999. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clin.Sci.(Lond)* 96:33-39.
86. Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto. 1993. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 192:553-560.
87. Morice, A. H., J. Pepke-Zaba, M. J. Brown, P. S. Thomas, and T. W. Higebottam. 1990. Atrial natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 3:910-913.
88. Nagaya, N., T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Kakishita, K. Fukushima, Y. Okano, N. Nakanishi, K. Miyatake, and K. Kangawa. 2000. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 102:865-870.
89. Leuchte, H. H., C. Neurohr, R. Baumgartner, M. Holzapfel, W. Giehl, M. Vogeser, and J. Behr. 2004. Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am.J Respir Crit Care Med* 170:360-365.

90. Potter, L. R., S. bbey-Hosch, and D. M. Dickey. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr.Rev.* 27:47-72.
91. Leuchte, H. H., M. Holzapfel, R. A. Baumgartner, I. Ding, C. Neurohr, M. Vogeser, T. Kolbe, M. Schwaiblmair, and J. Behr. 2004. Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am.Coll.Cardiol.* 43:764-770.
92. Leuchte, H. H., R. A. Baumgartner, M. E. Nounou, M. Vogeser, C. Neurohr, M. Trautnitz, and J. Behr. 2006. Brain natriuretic peptide is a prognostic parameter in chronic lung disease. *Am.J Respir Crit Care Med* 173:744-750.
93. Maisel, A. S., P. Krishnaswamy, R. M. Nowak, J. McCord, J. E. Hollander, P. Duc, T. Omland, A. B. Storrow, W. T. Abraham, A. H. Wu, P. Clopton, P. G. Steg, A. Westheim, C. W. Knudsen, A. Perez, R. Kazanegra, H. C. Herrmann, and P. A. McCullough. 2002. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 347:161-167.
94. Dao, Q., P. Krishnaswamy, R. Kazanegra, A. Harrison, R. Amirnovin, L. Lenert, P. Clopton, J. Alberto, P. Hlavin, and A. S. Maisel. 2001. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am.Coll.Cardiol.* 37:379-385.
95. Koglin, J., S. Pehlivanli, M. Schwaiblmair, M. Vogeser, P. Cremer, and W. vonScheidt. 2001. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am.Coll.Cardiol.* 38:1934-1941.

96. Morita, E., H. Yasue, M. Yoshimura, H. Ogawa, M. Jougasaki, T. Matsumura, M. Mukoyama, and K. Nakao. 1993. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 88:82-91.
97. Kucher, N., G. Printzen, and S. Z. Goldhaber. 2003. Prognostic role of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism. *Circulation* 107:2545-2547.
98. de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress, and H. Sonnenberg. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28:89-94.
99. Seidman, C. E., K. D. Bloch, K. A. Klein, J. A. Smith, and J. G. Seidman. 1984. Nucleotide sequences of the human and mouse atrial natriuretic factor genes. *Science* 226:1206-1209.
100. Sudoh, T., K. Kangawa, N. Minamino, and H. Matsuo. 1988. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78-81.
101. Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa, and H. Matsuo. 1990. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 168:863-870.
102. Schweitz, H., P. Vigne, D. Moinier, C. Frelin, and M. Lazdunski. 1992. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol.Chem.* 267:13928-13932.
103. Schulz-Knappe, P., K. Forssmann, F. Herbst, D. Hock, R. Pipkorn, and W. G. Forssmann. 1988. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin.Wochenschr.* 66:752-759.

104. Beltowski, J. 2001. Guanylin and related peptides. *J Physiol Pharmacol.* 52:351-375.
105. Woodard, G. E. and J. A. Rosado. 2007. Recent advances in natriuretic peptide research. *J Cell Mol.Med* 11:1263-1271.
106. Levin, E. R., D. G. Gardner, and W. K. Samson. 1998. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339:321-328.
107. Inagami, T., K. S. Misono, H. Fukumi, M. Maki, I. Tanaka, R. Takayanagi, T. Imada, R. T. Grammer, M. Naruse, K. Naruse, and . 1987. Structure and physiological actions of rat atrial natriuretic factor. *Hypertension* 10:I113-I117.
108. Misono, K. S., H. Fukumi, R. T. Grammer, and T. Inagami. 1984. Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 119:524-529.
109. Mukoyama, M., K. Nakao, Y. Saito, Y. Ogawa, K. Hosoda, S. Suga, G. Shirakami, M. Jougasaki, and H. Imura. 1990. Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 335:801-802.
110. Gerbes, A. L., L. Dagnino, T. Nguyen, and M. Nemer. 1994. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin.Endocrinol.Metab* 78:1307-1311.
111. Sawada, Y., M. Suda, H. Yokoyama, T. Kanda, T. Sakamaki, S. Tanaka, R. Nagai, S. Abe, and T. Takeuchi. 1997. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol.Chem.* 272:20545-20554.

112. LaPointe, M. C. 2005. Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* 26:944-956.
113. Hopkins, W. E., Z. Chen, N. K. Fukagawa, C. Hall, H. J. Knot, and M. M. LeWinter. 2004. Increased Atrial and Brain Natriuretic Peptides in Adults With Cyanotic Congenital Heart Disease: Enhanced Understanding of the Relationship Between Hypoxia and Natriuretic Peptide Secretion. *Circulation* 109:2872-2877.
114. Mukoyama, M., K. Nakao, Y. Saito, Y. Ogawa, K. Hosoda, S. Suga, G. Shirakami, M. Jougasaki, and H. Imura. 1990. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 323:757-758.
115. Ogawa, Y., H. Itoh, O. Nakagawa, G. Shirakami, N. Tamura, T. Yoshimasa, K. Nagata, N. Yoshida, and K. Nakao. 1995. Characterization of the 5'-flanking region and chromosomal assignment of the human brain natriuretic peptide gene. *J Mol.Med* 73:457-463.
116. Liang, F., J. Wu, M. Garami, and D. G. Gardner. 1997. Mechanical strain increases expression of the brain natriuretic peptide gene in rat cardiac myocytes. *J Biol.Chem.* 272:28050-28056.
117. Qian, J. Y., A. Leung, P. Harding, and M. C. LaPointe. 2006. PGE2 stimulates human brain natriuretic peptide expression via EP4 and p42/44 MAPK. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 290:H1740-H1746.
118. Pikkarainen, S., H. Tokola, R. Kerkela, T. Majalahti-Palviainen, O. Vuolteenaho, and H. Ruskoaho. 2003. Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors. *J Biol.Chem.* 278:3969-3975.

119. Liang, F., S. Lu, and D. G. Gardner. 2000. Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 35:188-192.
120. Majalahti, T., M. Suo-Palosaari, B. Sarman, N. Hautala, S. Pikkarainen, H. Tokola, O. Vuolteenaho, J. Wang, P. Paradis, M. Nemer, and H. Ruskoaho. 2007. Cardiac BNP gene activation by angiotensin II in vivo. *Mol. Cell Endocrinol.* 273:59-67.
121. Tremblay, J., R. Desjardins, D. Hum, J. Gutkowska, and P. Hamet. 2002. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell Biochem.* 230:31-47.
122. Nagase, M., K. Ando, T. Katafuchi, A. Kato, S. Hirose, and T. Fujita. 1997. Role of natriuretic peptide receptor type C in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 30:177-183.
123. Mukaddam-Daher, S., J. Tremblay, N. Fujio, C. Koch, M. Jankowski, E. W. Quillen, Jr., and J. Gutkowska. 1996. Alteration of lung atrial natriuretic peptide receptors in genetic cardiomyopathy. *Am. J Physiol* 271:L38-L45.
124. Suga, S., K. Nakao, K. Hosoda, M. Mukoyama, Y. Ogawa, G. Shirakami, H. Arai, Y. Saito, Y. Kambayashi, K. Inouye, and . 1992. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229-239.
125. Misono, K. S. 2002. Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Mol. Cell Biochem.* 230:49-60.

126. Chinkers, M., D. L. Garbers, M. S. Chang, D. G. Lowe, H. M. Chin, D. V. Goeddel, and S. Schulz. 1989. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338:78-83.
127. Potter, L. R. and T. Hunter. 2001. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol.Chem.* 276:6057-6060.
128. Song, D. L., K. P. Kohse, and F. Murad. 1988. Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding. *FEBS Lett.* 232:125-129.
129. Murad, F. 1986. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin.Invest* 78:1-5.
130. Hobbs, A. J. 1997. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol.Sci.* 18:484-491.
131. Waldman, S. A. and F. Murad. 1988. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 12 Suppl 5:S115-S118.
132. Hussain, M. B., R. J. MacAllister, and A. J. Hobbs. 2001. Reciprocal regulation of cGMP-mediated vasorelaxation by soluble and particulate guanylate cyclases. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 280:H1151-H1159.
133. Crawley, D. E., L. Zhao, M. A. Giembycz, S. Liu, P. J. Barnes, R. J. Winter, and T. W. Evans. 1992. Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am.J Physiol* 263:L325-L332.

134. Kaupp, U. B. and R. Seifert. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 82:769-824.
135. Thomas, M. K., S. H. Francis, and J. D. Corbin. 1990. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol.Chem.* 265:14971-14978.
136. Conti, M. and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu.Rev.Biochem.* 76:481-511.
137. Omori, K. and J. Kotera. 2007. Overview of PDEs and their regulation. *Circ.Res.* 100:309-327.
138. Beavo, J. A. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75:725-748.
139. Kass, D. A., H. C. Champion, and J. A. Beavo. 2007. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ.Res.* 101:1084-1095.
140. Zoraghi, R., E. P. Bessay, J. D. Corbin, and S. H. Francis. 2005. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol.Chem.* 280:12051-12063.
141. Rybalkin, S. D., I. G. Rybalkina, M. Shimizu-Albergine, X. B. Tang, and J. A. Beavo. 2003. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J* 22:469-478.
142. Rybalkin, S. D., C. Yan, K. E. Bornfeldt, and J. A. Beavo. 2003. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ.Res.* 93:280-291.

143. Corbin, J. D., I. V. Turko, A. Beasley, and S. H. Francis. 2000. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem.* 267:2760-2767.
144. Shimizu-Albergine, M., S. D. Rybalkin, I. G. Rybalkina, R. Feil, W. Wolfsgruber, F. Hofmann, and J. A. Beavo. 2003. Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci.* 23:6452-6459.
145. Francis, S. H. and J. D. Corbin. 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu.Rev.Physiol* 56:237-272.
146. Pilz, R. B. and D. E. Casteel. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ.Res.* 93:1034-1046.
147. Lincoln, T. M., N. Dey, and H. Sellak. 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 91:1421-1430.
148. Sugimoto, T., M. Haneda, M. Togawa, M. Isono, T. Shikano, S. Araki, T. Nakagawa, A. Kashiwagi, K. L. Guan, and R. Kikkawa. 1996. Atrial natriuretic peptide induces the expression of MKP-1, a mitogen-activated protein kinase phosphatase, in glomerular mesangial cells. *J Biol.Chem.* 271:544-547.
149. Kronemann, N., W. A. Nockher, R. Busse, and V. B. Schini-Kerth. 1999. Growth-inhibitory effect of cyclic GMP- and cyclic AMP-dependent vasodilators on rat vascular smooth muscle cells: effect on cell cycle and cyclin expression. *Br.J Pharmacol.* 126:349-357.

150. Fukumoto, S., H. Koyama, M. Hosoi, K. Yamakawa, S. Tanaka, H. Morii, and Y. Nishizawa. 1999. Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ.Res.* 85:985-991.
151. Gudi, T., D. E. Casteel, C. Vinson, G. R. Boss, and R. B. Pilz. 2000. NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* 19:6324-6333.
152. Filippov, G., D. B. Bloch, and K. D. Bloch. 1997. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin.Invest* 100:942-948.
153. Perez-Sala, D., E. Cernuda-Morollon, M. az-Cazorla, F. Rodriguez-Pascual, and S. Lamas. 2001. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am.J Physiol Renal Physiol* 280:F466-F473.
154. Boerth, N. J., N. B. Dey, T. L. Cornwell, and T. M. Lincoln. 1997. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *J Vasc.Res.* 34:245-259.
155. Sinnaeve, P., J. D. Chiche, H. Gillijns, P. N. Van, D. Wirthlin, W. F. Van De, D. Collen, K. D. Bloch, and S. Janssens. 2002. Overexpression of a constitutively active protein kinase G mutant reduces neointima formation and in-stent restenosis. *Circulation* 105:2911-2916.
156. Yu, S. M., L. M. Hung, and C. C. Lin. 1997. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 95:1269-1277.

157. Fujisaki, H., H. Ito, Y. Hirata, M. Tanaka, M. Hata, M. Lin, S. Adachi, H. Akimoto, F. Marumo, and M. Hiroe. 1995. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin. Invest* 96:1059-1065.
158. Zhang, R., L. Wang, L. Zhang, J. Chen, Z. Zhu, Z. Zhang, and M. Chopp. 2003. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ.Res.* 92:308-313.
159. Hood, J. and H. J. Granger. 1998. Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol.Chem.* 273:23504-23508.
160. Zhou, X. B., P. Ruth, J. Schlossmann, F. Hofmann, and M. Korth. 1996. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. *J Biol.Chem.* 271:19760-19767.
161. Tewari, K. and J. M. Simard. 1997. Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca²⁺ channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 433:304-311.
162. Yoshida, Y., H. T. Sun, J. Q. Cai, and S. Imai. 1991. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol.Chem.* 266:19819-19825.
163. Cornwell, T. L., K. B. Pryzwansky, T. A. Wyatt, and T. M. Lincoln. 1991. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* 40:923-931.

164. Komalavilas, P. and T. M. Lincoln. 1994. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol.Chem.* 269:8701-8707.
165. Komalavilas, P. and T. M. Lincoln. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol.Chem.* 271:21933-21938.
166. Baines, R. J., C. Brown, L. L. Ng, and M. R. Boarder. 1996. Angiotensin II-stimulated phospholipase C responses of two vascular smooth muscle-derived cell lines. Role of cyclic GMP. *Hypertension* 28:772-778.
167. Nishimura, J. and B. C. van. 1989. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 163:929-935.
168. Lee, M. R., L. Li, and T. Kitazawa. 1997. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol.Chem.* 272:5063-5068.
169. Wu, X., A. V. Somlyo, and A. P. Somlyo. 1996. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 220:658-663.
170. Charles, C. J., E. A. Espiner, M. G. Nicholls, A. M. Richards, T. G. Yandle, A. Protter, and T. Kosoglou. 1996. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am.J Physiol* 271:R373-R380.

171. Maack, T., M. Suzuki, F. A. Almeida, D. Nussenzveig, R. M. Scarborough, G. A. McEnroe, and J. A. Lewicki. 1987. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238:675-678.
172. Sun, J. Z., S. Oparil, P. Lucchesi, J. A. Thompson, and Y. F. Chen. 2001. Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281:L155-L163.
173. Porter, J. G., A. Arfsten, F. Fuller, J. A. Miller, L. C. Gregory, and J. A. Lewicki. 1990. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 171:796-803.
174. Fuller, F., J. G. Porter, A. E. Arfsten, J. Miller, J. W. Schilling, R. M. Scarborough, J. A. Lewicki, and D. B. Schenk. 1988. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol.Chem.* 263:9395-9401.
175. Rose, R. A., A. E. Lomax, C. S. Kondo, M. B. nand-Srivastava, and W. R. Giles. 2004. Effects of C-type natriuretic peptide on ionic currents in mouse sinoatrial node: a role for the NPR-C receptor. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1970-H1977.
176. nand-Srivastava, M. B. 2005. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26:1044-1059.
177. William, M., E. J. Hamilton, A. Garcia, H. Bundgaard, K. K. Chia, G. A. Figtree, and H. H. Rasmussen. 2008. Natriuretic peptides stimulate the cardiac sodium pump via NPR-C-coupled NOS activation. *Am.J Physiol Cell Physiol* 294:C1067-C1073.

178. Nussenzveig, D. R., J. A. Lewicki, and T. Maack. 1990. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol.Chem.* 265:20952-20958.
179. Matsukawa, N., W. J. Grzesik, N. Takahashi, K. N. Pandey, S. Pang, M. Yamauchi, and O. Smithies. 1999. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:7403-7408.
180. Kenny, A. J., A. Bourne, and J. Ingram. 1993. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem.J* 291 (Pt 1):83-88.
181. Smith, M. W., E. A. Espiner, T. G. Yandle, C. J. Charles, and A. M. Richards. 2000. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol.* 167:239-246.
182. Walther, T., H. Stepan, K. Pankow, M. Becker, H. P. Schultheiss, and W. E. Siems. 2004. Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide. *Biol.Chem.* 385:179-184.
183. Erdos, E. G. and R. A. Skidgel. 1989. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 3:145-151.
184. Johnson, A. R., J. Ashton, W. W. Schulz, and E. G. Erdos. 1985. Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am.Rev.Respir Dis.* 132:564-568.

185. Pankow, K., Y. Wang, F. Gembardt, E. Krause, X. Sun, G. Krause, H. P. Schultheiss, W. E. Siems, and T. Walther. 2007. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ.Res.* 101:875-882.
186. Yoshimura, M., H. Yasue, E. Morita, N. Sakaino, M. Jougasaki, M. Kurose, M. Mukoyama, Y. Saito, K. Nakao, and H. Imura. 1991. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 84:1581-1588.
187. Abraham, W. T., B. D. Lowes, D. A. Ferguson, J. Odom, J. K. Kim, A. D. Robertson, M. R. Bristow, and R. W. Schrier. 1998. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *J Card Fail.* 4:37-44.
188. Arjona, A. A., C. A. Hsu, D. S. Wrenn, and N. S. Hill. 1997. Effects of natriuretic peptides on vascular smooth-muscle cells derived from different vascular beds. *Gen.Pharmacol.* 28:387-392.
189. Cataliotti, A., G. Boerrigter, H. H. Chen, M. Jougasaki, L. C. Costello, T. Tsuruda, S. C. Lee, L. S. Malatino, and J. C. Burnett, Jr. 2002. Differential actions of vasopeptidase inhibition versus angiotensin-converting enzyme inhibition on diuretic therapy in experimental congestive heart failure. *Circulation* 105:639-644.
190. Tamura, N., Y. Ogawa, H. Chusho, K. Nakamura, K. Nakao, M. Suda, M. Kasahara, R. Hashimoto, G. Katsuura, M. Mukoyama, H. Itoh, Y. Saito, I. Tanaka, H. Otani, and M. Katsuki. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:4239-4244.

191. Schulz-Knappe, P., U. Honrath, W. G. Forssmann, and H. Sonnenberg. 1990. Endogenous natriuretic peptides: effect on collecting duct function in rat kidney. *Am.J Physiol* 259:F415-F418.
192. Schermuly, R. T., N. Weissmann, B. Enke, H. A. Ghofrani, W. G. Forssmann, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walrmath. 2001. Urodilatin, a natriuretic peptide stimulating particulate guanylate cyclase, and the phosphodiesterase 5 inhibitor dipyridamole attenuate experimental pulmonary hypertension: synergism upon coapplication. *Am.J Respir Cell Mol.Biol.* 25:219-225.
193. Hill, N. S., J. R. Klinger, R. R. Warburton, L. Pietras, and D. S. Wrenn. 1994. Brain natriuretic peptide: possible role in the modulation of hypoxic pulmonary hypertension. *Am.J Physiol* 266:L308-L315.
194. Piamsomboon, C., K. A. Tanaka, F. Szlam, T. Makita, C. Huraux, and J. H. Levy. 2007. Comparison of relaxation responses to multiple vasodilators in TxA(2)-analog and endothelin-1-precontracted pulmonary arteries. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 51:714-721.
195. Matsumoto, T., A. Wada, T. Tsutamoto, T. Omura, H. Yokohama, M. Ohnishi, I. Nakae, M. Takahashi, and M. Kinoshita. 1999. Vasorelaxing effects of atrial and brain natriuretic peptides on coronary circulation in heart failure. *Am.J Physiol* 276:H1935-H1942.
196. Cargill, R. I. and B. J. Lipworth. 1995. Acute effects of ANP and BNP on hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans. *Br.J Clin.Pharmacol.* 40:585-590.
197. Klinger, J. R., R. D. Petit, L. A. Curtin, R. R. Warburton, D. S. Wrenn, M. E. Steinhelper, L. J. Field, and N. S. Hill. 1993. Cardiopulmonary responses to chronic hypoxia in transgenic mice that overexpress ANP. *J Appl Physiol* 75:198-205.

198. Maisel, A. S. 2003. Nesiritide: a new therapy for the treatment of heart failure. *Cardiovasc.Toxicol.* 3:37-42.
199. Elkayam, U., M. W. Akhter, P. Tummala, S. Khan, and H. Singh. 2002. Nesiritide: a new drug for the treatment of decompensated heart failure. *J Cardiovasc.Pharmacol.Ther.* 7:181-194.
200. Colucci, W. S. 2001. Nesiritide for the treatment of decompensated heart failure. *J Card Fail.* 7:92-100.
201. Colucci, W. S., U. Elkayam, D. P. Horton, W. T. Abraham, R. C. Bourge, A. D. Johnson, L. E. Wagoner, M. M. Givertz, C. S. Liang, M. Neibaur, W. H. Haught, and T. H. LeJemtel. 2000. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 343:246-253.
202. Seeger, W., D. Walmrath, F. Grimminger, S. Rosseau, H. Schutte, H. J. Kramer, L. Ermert, and L. Kiss. 1994. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 233:549-584.
203. Seeger, W., M. Menger, D. Walmrath, G. Becker, F. Grimminger, and H. Neuhof. 1987. Arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs. *Am.Rev.Respir Dis.* 136:964-972.
204. Seeger, W., C. Ernst, D. Walmrath, H. Neuhof, and L. Roka. 1985. Influence of the thromboxane antagonist BM 13.177 on the arachidonic acid-induced increase in pulmonary vascular resistance and permeability in rabbit lungs. *Thromb.Res.* 40:793-805.

205. Seeger, W., H. R. Wolf, H. Neuhofer, and L. Roka. 1983. [Arachidonic acid metabolites as mediators of an increase in resistance and a barrier disorder in pulmonary microcirculation]. *Prax.Klin.Pneumol.* 37 Suppl 1:728-731.
206. Schermuly, R. T., A. Schulz, H. A. Ghofrani, C. S. Breitenbach, N. Weissmann, M. Hildebrand, J. Kurz, F. Grimminger, and W. Seeger. 2006. Comparison of pharmacokinetics and vasodilatory effect of nebulized and infused iloprost in experimental pulmonary hypertension: rapid tolerance development. *J Aerosol Med* 19:353-363.
207. Schermuly, R. T., S. S. Pullamsetti, S. C. Breitenbach, N. Weissmann, H. A. Ghofrani, F. Grimminger, S. M. Nilius, K. Schror, J. M. Kirchrath, W. Seeger, and F. Rose. 2007. Iloprost-induced desensitization of the prostacyclin receptor in isolated rabbit lungs. *Respir Res.* 8:4.
208. Schmehl, T., J. Gebhart, H. Schutte, A. Scharmann, and W. Seeger. 1996. On-line laser-photometric monitoring of aerosol deposition in ventilated rabbit lungs. *J Appl Physiol* 80:351-356.
209. Walmrath, D., T. Schneider, J. Pilch, F. Grimminger, and W. Seeger. 1993. Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 342:961-962.
210. Schmeck, J., H. Gluth, N. Mihaljevic, M. Born, M. Wendel-Wellner, and P. Krafft. 1999. ET-1-induced pulmonary vasoconstriction shifts from ET(A)- to ET(B)-receptor-mediated reaction after precontraction. *J Appl Physiol* 87:2284-2289.
211. Leuchte, H. H., T. Meis, M. El-Nounou, J. Michalek, and J. Behr. 2008. Inhalation of endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 294:L772-L777.

212. Jernigan, N. L. and T. C. Resta. 2002. Chronic hypoxia attenuates cGMP-dependent pulmonary vasodilation. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282:L1366-L1375.
213. McLaughlin, V. V., S. L. Archer, D. B. Badesch, R. J. Barst, H. W. Farber, J. R. Lindner, M. A. Mathier, M. D. McGoon, M. H. Park, R. S. Rosenson, L. J. Rubin, V. F. Tapson, J. Varga, R. A. Harrington, J. L. Anderson, E. R. Bates, C. R. Bridges, M. J. Eisenberg, V. A. Ferrari, C. L. Grines, M. A. Hlatky, A. K. Jacobs, S. Kaul, R. C. Lichtenberg, J. R. Lindner, D. J. Moliterno, D. Mukherjee, G. M. Pohost, R. S. Rosenson, R. S. Schofield, S. J. Shubrooks, J. H. Stein, C. M. Tracy, H. H. Weitz, and D. J. Wesley. 2009. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation* 119:2250-2294.
214. Wakerlin, G. E., Jr., G. V. Benson, and R. G. Pearl. 1991. A thromboxane analog increases pulmonary capillary pressure but not permeability in the perfused rabbit lung. *Anesthesiology* 75:475-480.
215. Walmrath, D., R. Schermuly, J. Pilch, F. Grimminger, and W. Seeger. 1997. Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 10:1084-1092.
216. Kleen, M., O. Habler, C. Hofstetter, R. Pusch, M. Mueller, M. Welte, and B. Zwissler. 1998. Efficacy of inhaled prostanoids in experimental pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 26:1103-1109.
217. Schermuly, R. T., H. Leuchte, H. A. Ghofrani, N. Weissmann, F. Rose, M. Kohstall, H. Olschewski, C. Schudt, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 2003.

- Zardaverine and aerosolised iloprost in a model of acute respiratory failure. *Eur Respir J* 22:342-347.
218. Klinger, J. R., R. R. Warburton, L. Pietras, and N. S. Hill. 1998. Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 84:1646-1652.
219. Koller, K. J. and D. V. Goeddel. 1992. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 86:1081-1088.
220. Weinberger, B., D. E. Heck, D. L. Laskin, and J. D. Laskin. 1999. Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacol.Ther.* 84:401-411.
221. Leuchte, H. H., M. Schwaiblmair, R. A. Baumgartner, C. F. Neurohr, T. Kolbe, and J. Behr. 2004. Hemodynamic response to sildenafil, nitric oxide, and iloprost in primary pulmonary hypertension. *Chest* 125:580-586.
222. Klinger, J. R. 2007. The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. *Clin.Chest Med* 28:143-67, ix.
223. Schermuly, R. T., K. P. Kreisselmeier, H. A. Ghofrani, A. Samidurai, S. Pullamsetti, N. Weissmann, C. Schudt, L. Ermert, W. Seeger, and F. Grimminger. 2004. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ.Res.* 94:1101-1108.
224. Aizawa, T., H. Wei, J. M. Miano, J. Abe, B. C. Berk, and C. Yan. 2003. Role of phosphodiesterase 3 in NO/cGMP-mediated antiinflammatory effects in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 93:406-413.

225. Holmes, S. J., E. A. Espiner, A. M. Richards, T. G. Yandle, and C. Frampton. 1993. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 76:91-96.
226. McGregor, A., M. Richards, E. Espiner, T. Yandle, and H. Ikram. 1990. Brain natriuretic peptide administered to man: actions and metabolism
2. *J Clin.Endocrinol.Metab* 70:1103-1107.
227. Petkov, V., W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebellehner, K. Vonbank, G. C. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian, and L. H. Block. 2003. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin.Invest* 111:1339-1346.
228. Leuchte, H. H., C. Baezner, R. A. Baumgartner, D. Bevec, G. Bacher, C. Neurohr, and J. Behr. 2008. Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 32:1289-1294.
229. Angus, R. M., E. A. Millar, G. W. Chalmers, and N. C. Thomson. 1996. Effect of inhaled thiorphan, a neutral endopeptidase inhibitor, on the bronchodilator response to inhaled atrial natriuretic peptide (ANP). *Thorax* 51:71-74.
230. Hulks, G. and N. C. Thomson. 1994. High dose inhaled atrial natriuretic peptide is a bronchodilator in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 7:1593-1597.
231. Barnes, P. J., J. N. Baraniuk, and M. G. Belvisi. 1991. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am.Rev.Respir Dis.* 144:1187-1198.
232. Barnes, P. J., J. N. Baraniuk, and M. G. Belvisi. 1991. Neuropeptides in the respiratory tract. Part II. *Am.Rev.Respir Dis.* 144:1391-1399.

233. Kobayashi, S., S. Kondo, and K. Juni. 1994. Study on pulmonary delivery of salmon calcitonin in rats: effects of protease inhibitors and absorption enhancers. *Pharm.Res.* 11:1239-1243.
234. James, S. and G. Burnstock. 1991. Atrial and brain natriuretic peptides share binding sites on cultured cells from the rat trachea. *Cell Tissue Res.* 265:555-565.
235. Forbes, B., C. G. Wilson, and M. Gumbleton. 1999. Temporal dependence of ectopeptidase expression in alveolar epithelial cell culture: implications for study of peptide absorption. *Int.J Pharm.* 180:225-234.
236. Klinger, J. R., R. R. Warburton, L. Pietras, and N. S. Hill. 1998. Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 84:1646-1652.
237. Klinger, J. R., S. Thaker, J. Houtchens, I. R. Preston, N. S. Hill, and H. W. Farber. 2006. Pulmonary hemodynamic responses to brain natriuretic peptide and sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 129:417-425.
238. Akerman, M. J., M. Yaegashi, Z. Khiangte, A. T. Murugan, O. Abe, and J. D. Marmur. 2006. Bronchodilator effect of infused B-type natriuretic peptide in asthma. *Chest* 130:66-72.

9. Materialien

9.1 Substanzen

Bacillol (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)
BNP = synthetisch hergestelltes BNP (Mondo Biotech, Basel, Schweiz)
CO₂
Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Endothelin-1 (Calbiochem (Merck))
Heparin-Natrium (Braun, Melsungen, Deutschland)
Ketamin (Inresa, Freiburg, Deutschland)
Krebs-Henseleit-Puffer (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland)
NaCl 0,9% (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (DeltaSelect, Dreieich, Deutschland)
U 46619 (9,11-Dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F_{2 α}) (Paesel-Lorei, Frankfurt, Deutschland)
Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland)
Xylocain (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland)

9.2 Geräte / Herstellerangaben

ABL 500 (Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland)
AD/DA – Wandlerkarte (Dicsion via Harvard Apparatus, Holliston, USA)
Druckaufnehmer „Single-Use-Pressure-Transducer“ (Braun, Melsungen, Deutschland)
Drucker „Epson Stylus C66“ (Epson, Meerbusch, Deutschland)
Einmalspritzen 2ml / 5ml / 10 ml „BD Discardit II“ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Farbmonitor
Filter “Iso-Gard Filter S” (Hudson RCI, High Wycombe, England))
Kanülen “BD Microlance” (Becton Dickinson)
Latexhandschuhe (Semperit, Gevelsberg, Deutschland)
Messverstärker „Scout 55“ (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Perfusorpumpe „871582/3“ (Braun)

Perfusorspritze „BD Plastipak“ (Becton Dickinson)
Personal Computer
Rasierer „Favorita II“ (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
Rollerpumpe „MCP Standard“ (Ismatec, Wertheim, Deutschland)
Harvard Kleintierbeatmungspumpe „UB 6025“ (Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland)
Vernebler „Optineb ®“ (Nebu-Tec, Elsenfeld, Deutschland)
Verstärker „ PLUGSYS-DBA“ (Hugo Sachs Elektronik)
Waage „Scout Pro“ (Ohaus, Gießen, Deutschland)
Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik)
Wärmepumpe „DC 5“ (Haake, Karlsruhe, Deutschland)

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Professor Dr. med. Jürgen Behr für das Vertrauen, die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Laborräume und Materialien und die konstruktive Unterstützung bedanken, die ganz wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hanno Leuchte für die beispiellose Betreuung bezüglich der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit. Durch seinen Einsatz, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die mentale Unterstützung hat er nicht nur in mir die Begeisterung für die Forschung entfacht sondern darüber hinaus durch beratende und freundschaftliche Gespräche meinen weiteren Werdegang maßgeblich geprägt. Es ist ein Anreiz aber auch eine Bürde, die von ihm gesetzten Maßstäbe in der Doktorandenbetreuung fortzusetzen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Schwerpunktes Pneumologie der Medizinischen Klinik I im Klinikum Großhadern für die jahrelange Unterstützung bedanken, insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Leuchte für das eizigartige Arbeitsklima. Persönlich danke ich Herrn Dr. med. Tobias Meis für das Vertrauen und die Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors. Ebenso gilt mein Dank dem medizinisch-technischen Assitenten Shani Haziraj und meinem Doktorandenkollegen Özcan Sönmez für die Hilfe und das freundschaftliche Klima im Labor. Außerdem möchte ich mich bei der medizinisch-technischen Assistentin Heidrun Villena-Hermoza für ihre Unterstützung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner neuen Arbeitsgruppenleiterin am Comprehensive Pneumology Center in München Frau Dr. Dr. Melanie Königshoff, die mir bei der Korrektur dieser Arbeit Hilfestellung leistete.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern Ursula Giesen-Michalek und Gerd Michalek und ihren neuen Partnern Andreas Giesen und Susanne Schreiber und meinen Großeltern Magdalene und Rudolf Michalek, ohne deren moralische und finanzielle Unterstützung sowohl Studium als auch die Doktorarbeit kaum zu absolvieren gewesen wären. Ein liebevoller Dank gilt meiner Frau Pia, die mich über viele Jahre in jeder Hinsicht unterstützt und gestärkt hat.

11. Lebenslauf

12. Anhang

Tabellen

U46-Versuche mit systemischer BNP-Applikation - mittlerer Pulmonalarteriendruck														
Intervention	Zeit	Kontrollversuch (n=4)		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + BNP 1nM (n=4)		U46 + BNP 5nM (n=4)		U46 + BNP 10 nM (n=4)		U46 + BNP 100 nM (n=4)		
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Baseline Start	-30 min	5,00	0,23	4,70	0,32	6,13	0,63	5,93	0,52	5,40	0,41	6,63	1,03	
U46 Start	0 min	4,80	0,38	4,76	0,40	5,98	0,41	5,88	0,52	5,88	0,37	6,35	1,03	
Plateau Start	15 min	5,30	0,36	25,50	0,26	25,98	0,45	24,90	0,23	25,50	0,31	25,60	0,38	
Intervention	30 min	5,35	0,55	25,40	0,19	25,98	0,23	24,83	0,40	25,65	0,43	26,30	0,15	
	5	35 min	5,18	0,60	25,51	0,30	24,38	0,18	21,95	0,62	22,65	0,64	18,70	0,80
	10	40 min	5,48	0,56	25,74	0,38	24,73	0,08	20,50	0,84	19,90	0,72	16,65	0,79
	15	45 min	5,30	0,41	25,94	0,38	25,63	0,51	19,53	1,12	18,13	0,95	16,85	0,76
	20	50 min	5,43	0,45	25,86	0,33	26,73	0,67	19,45	1,32	16,78	1,32	17,13	0,86
	25	55 min	5,88	0,53	26,11	0,46	27,20	0,94	19,23	1,56	16,95	1,35	17,28	0,60
	30	60 min	5,63	0,23	26,14	0,36	28,25	1,37	19,30	1,56	16,50	1,59	17,95	0,68
	35	65 min	5,60	0,45	26,30	0,45	29,10	1,23	19,25	1,52	16,75	1,69	18,73	0,53
	40	70 min	5,38	0,28	26,04	0,44	29,30	1,78	19,65	1,58	17,23	1,75	19,25	1,14
	45	75 min	5,93	0,28	26,11	0,48	30,03	1,86	19,35	1,58	17,35	1,88	19,83	1,09
	50	80 min	5,55	0,41	25,46	0,53	30,50	2,43	19,63	1,40	18,08	2,28	19,78	1,49
	55	85 min	5,88	0,43	25,71	0,53	30,90	2,42	19,70	1,45	17,75	2,19	20,20	1,30
	60	90 min	5,50	0,19	25,20	0,58	31,40	2,57	19,43	1,11	18,30	2,53	20,50	1,46
	65	95 min	5,83	0,46	25,26	0,63	30,88	2,37	20,33	0,88	18,25	2,69	20,85	1,51
	70	100 min	5,78	0,20	25,29	0,77	31,08	2,31	20,10	0,81	17,95	2,61	21,43	1,56
	75	105 min	5,85	0,30	25,00	0,75	30,90	2,51	20,00	0,97	17,93	2,55	21,13	1,61
	80	110 min	5,60	0,38	25,04	0,75	29,93	3,53	20,03	0,97	18,40	2,95	21,18	1,24
	85	115 min	5,53	0,15	24,71	0,80	29,10	3,48	20,03	0,99	18,63	3,06	21,08	1,54
	90	120 min	6,00	0,38	24,91	0,78	29,27	3,75	20,15	1,51	18,50	3,24	21,50	1,55
	95	125 min	5,75	0,39	24,96	0,80	28,67	3,89	20,20	1,46	18,65	3,34	21,45	1,41
	100	130 min	5,70	0,40	25,17	0,79	28,70	4,35	20,33	1,95	18,65	3,48	21,60	1,36
	105	135 min	5,55	0,34	25,26	0,81	29,17	4,72	20,83	1,81	18,55	3,45	22,03	1,81
	110	140 min	5,73	0,13	25,21	0,86	28,77	4,57	20,93	1,79	18,75	3,88	22,05	1,65
	115	145 min	5,93	0,23	25,44	0,90	28,60	4,95	21,03	2,15	18,30	3,76	21,85	1,08
	120	150 min	5,38	0,26	25,53	0,90	28,90	5,15	21,23	2,24	18,48	3,72	22,68	1,77

U46-Versuche mit systemischer BNP-Applikation - Ventilationsdruck														
Intervention	Zeit	Kontrollversuch (n=4)		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + BNP 1nM (n=4)		U46 + BNP 5nM (n=4)		U46 + BNP 10nM (n=4)		U46 + BNP 100nM (n=4)		
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Baseline Start	-30 min	3,45	0,63	3,73	0,64	3,38	1,18	5,03	0,97	3,35	0,91	4,05	0,83	
U46 Start	0 min	4,55	0,65	3,96	0,72	6,05	0,42	3,50	0,80	4,05	0,80	2,98	0,62	
Plateau Start	15 min	4,80	0,90	4,03	0,86	2,30	0,26	4,53	0,80	4,53	1,35	4,18	0,97	
Intervention	30 min	4,13	1,01	3,76	0,58	3,80	0,81	3,75	0,92	3,00	0,67	3,33	0,61	
	5	35 min	3,58	0,85	4,50	0,64	4,98	0,73	4,70	0,82	5,20	1,23	3,53	0,95
	10	40 min	5,33	1,18	2,89	0,70	5,13	1,12	4,25	1,14	5,38	1,31	2,80	0,82
	15	45 min	2,73	0,24	4,00	0,64	4,55	0,61	3,08	0,64	5,45	0,84	3,58	0,94
	20	50 min	4,18	1,21	4,27	0,47	4,13	1,25	6,25	0,39	4,23	1,40	3,40	1,06
	25	55 min	4,98	1,21	3,94	0,69	4,53	1,08	5,28	0,90	3,38	0,68	4,90	0,74
	30	60 min	5,80	1,21	5,46	0,62	4,08	0,94	4,00	1,10	3,85	0,71	4,08	0,99
	35	65 min	5,50	1,25	4,86	0,62	3,58	1,05	4,53	1,22	5,58	0,42	5,23	0,74
	40	70 min	3,25	0,56	4,01	0,78	5,60	0,77	5,48	0,77	5,80	0,58	3,28	0,51
	45	75 min	6,43	0,20	2,74	0,31	4,08	0,67	5,08	1,12	3,50	0,95	2,68	0,59
	50	80 min	4,70	0,86	4,91	0,68	5,35	1,13	3,08	0,55	5,15	1,06	4,65	1,04
	55	85 min	4,80	0,78	4,04	0,77	5,25	0,41	4,60	0,85	4,48	1,33	4,13	0,49
	60	90 min	3,73	0,72	5,29	0,62	4,13	1,24	3,65	0,75	4,80	0,64	4,08	1,05
	65	95 min	4,93	0,69	5,47	0,63	4,00	1,06	6,13	0,11	3,70	1,10	2,98	0,16
	70	100 min	4,65	1,38	3,84	0,70	2,25	0,27	5,35	1,16	5,40	0,88	3,15	0,84
	75	105 min	5,25	1,01	4,81	0,66	3,20	0,70	3,78	1,10	5,70	1,23	5,30	1,11
	80	110 min	4,73	0,87	4,44	0,60	2,17	0,37	4,33	1,15	3,85	1,11	3,83	0,72
	85	115 min	4,55	0,47	5,81	0,39	2,03	0,35	4,70	0,93	3,93	0,86	4,43	1,35
	90	120 min	4,85	0,78	3,99	0,74	3,67	0,35	3,73	0,49	5,65	1,07	5,78	0,50
	95	125 min	5,10	1,35	4,00	0,57	3,50	1,60	5,43	0,85	4,23	1,29	6,15	0,33
	100	130 min	5,13	1,06	5,00	0,82	4,60	1,31	3,94	0,68	5,13	0,76	4,66	0,72
	105	135 min	5,18	1,27	3,60	0,54	4,87	1,43	4,21	0,68	4,57	0,67	4,50	0,81
	110	140 min	4,65	0,90	4,19	0,78	4,13	1,22	5,21	0,63	3,53	0,57	3,80	0,71
	115	145 min	5,08	0,99	5,40	0,66	5,10	0,78	5,41	0,45	5,03	0,63	5,31	0,39
	120	150 min	3,88	1,04	4,89	0,48	5,23	1,59	5,26	0,63	5,36	0,81	4,27	0,85

U46-Versuche mit systemischer BNP-Applikation - relatives Lungengewicht													
		Kontrollversuch (n=4)		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + BNP 1nM (n=4)		U46 + BNP 5nM (n=4)		U46 + BNP 10nM (n=4)		U46 + BNP 100nM (n=4)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U46 Start	0 min	-0,13	0,13	-0,34	0,13	-0,25	0,14	-0,13	0,13	0,00	0,35	-0,38	0,13
Plateau Start	15 min	-0,13	0,13	-0,70	0,26	-0,25	0,14	-0,85	0,22	-0,98	0,33	-1,25	0,48
Intervention	30 min	0,00	0,20	-0,90	0,30	-0,38	0,13	-1,43	0,31	-1,20	0,30	-1,38	0,38
5	35 min	-0,13	0,24	-0,97	0,35	-0,38	0,13	-1,55	0,43	-1,08	0,40	-1,25	0,43
10	40 min	-0,38	0,24	-0,97	0,35	-0,25	0,14	-1,55	0,43	-1,08	0,40	-1,13	0,52
15	45 min	-0,38	0,24	-0,90	0,37	-0,50	0,20	-1,55	0,43	-1,20	0,45	-1,25	0,43
20	50 min	-0,50	0,00	-0,97	0,44	-0,63	0,43	-1,55	0,43	-1,20	0,45	-1,38	0,43
25	55 min	-0,63	0,13	-0,97	0,44	0,00	0,35	-1,68	0,55	-1,20	0,45	-1,50	0,50
30	60 min	-0,60	0,37	-0,97	0,47	0,10	0,45	-1,68	0,55	-1,20	0,45	-1,38	0,55
35	65 min	-0,35	0,22	-0,90	0,46	-0,15	0,53	-1,55	0,61	-1,20	0,45	-1,38	0,55
40	70 min	-0,35	0,36	-0,97	0,48	0,10	0,78	-1,68	0,73	-1,20	0,57	-1,38	0,55
45	75 min	-0,60	0,23	-0,97	0,48	0,48	0,82	-1,68	0,73	-0,95	0,68	-1,38	0,55
50	80 min	-0,48	0,34	-0,99	0,58	0,58	0,92	-1,68	0,73	-1,20	0,83	-1,38	0,55
55	85 min	-0,60	0,23	-0,84	0,53	0,83	1,16	-1,68	0,73	-0,85	0,78	-1,38	0,55
60	90 min	-0,60	0,23	-0,84	0,63	0,70	1,37	-1,68	0,73	-0,98	0,80	-1,25	0,63
65	95 min	-0,60	0,23	-0,84	0,58	1,18	1,51	-1,68	0,73	-0,98	0,80	-1,25	0,63
70	100 min	-0,60	0,23	-0,84	0,69	1,18	1,85	-1,55	0,81	-1,10	0,85	-1,25	0,63
75	105 min	-0,60	0,23	-0,84	0,69	1,28	1,95	-1,55	0,81	-1,23	0,90	-1,13	0,66
80	110 min	-0,60	0,23	-0,77	0,74	-1,00	0,29	-1,55	0,81	-1,23	0,90	-1,50	0,74
85	115 min	-0,73	0,30	-0,77	0,74	-0,67	0,17	-1,53	0,94	-0,98	0,82	-1,38	0,63
90	120 min	-0,60	0,23	-0,64	0,79	-0,67	0,17	-1,53	0,94	-0,98	0,82	-1,25	0,78
95	125 min	-0,60	0,23	-0,57	0,84	-0,50	0,29	-1,65	0,90	-0,98	0,82	-1,25	0,78
100	130 min	-0,60	0,23	-0,64	0,86	-0,50	0,29	-1,65	0,90	-0,98	0,82	-1,38	0,75
105	135 min	-0,85	0,30	-0,50	0,92	-0,50	0,29	-1,40	1,01	-0,98	0,82	-1,25	0,78
110	140 min	-0,73	0,24	-0,36	0,97	-0,50	0,29	-1,53	0,98	-0,88	0,81	-1,38	0,83
115	145 min	-0,48	0,77	-0,30	1,03	-0,50	0,29	-1,53	0,98	-0,88	0,81	-1,38	0,83
120	150 min	-0,35	0,67	-0,30	1,11	-0,50	0,29	-1,28	1,05	-0,50	0,94	-1,25	0,85

U46-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - PAP							
		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + NaCl-Inhalation (n=5)		U46 + BNP 200nM-Inhalation (n=5)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	4,70	0,32	5,92	0,90	5,20	0,38
U46 Start	0 min	4,76	0,40	5,76	0,89	5,30	0,14
Plateau Start	5min	25,50	0,26	26,50	0,56	24,96	0,55
Inhal. Start	10 min	25,40	0,19	26,72	0,85	24,84	0,49
Inhal.+5	15 min	25,51	0,30	26,60	0,94	24,08	0,40
Inhal.+10	20 min	25,74	0,38	26,72	0,98	24,20	0,61
Inhal. Stop	25 min	25,94	0,38	27,20	1,01	23,52	0,65
5	30 min	25,86	0,33	26,74	1,26	22,78	0,59
10	35 min	26,11	0,46	26,76	1,20	22,78	0,59
15	40 min	26,14	0,36	26,92	1,35	23,00	0,66
20	45 min	26,30	0,45	27,36	1,47	23,14	0,84
25	50 min	26,04	0,44	27,54	1,27	23,22	1,12
30	55 min	26,11	0,48	27,38	1,36	23,08	0,92
35	60 min	25,46	0,53	27,92	1,53	23,38	0,94
40	65 min	25,71	0,53	28,32	1,50	22,98	1,08
45	70 min	25,20	0,58	27,96	1,53	22,92	1,01
50	75 min	25,26	0,63	27,62	1,48	22,98	1,29
55	80 min	25,29	0,77	27,54	1,57	22,80	1,46
60	85 min	25,00	0,75	27,12	1,50	23,28	1,67
65	90 min	25,04	0,75	27,26	1,37	22,86	1,72
70	95 min	24,71	0,80	27,08	1,60	22,94	2,09
75	100 min	24,91	0,78	27,24	1,37	22,74	2,07
80	105 min	24,96	0,80	26,96	1,44	22,60	2,04
85	110 min	25,17	0,79	27,06	1,34	22,26	1,93
90	115 min	25,26	0,81	26,84	1,27	22,34	2,02
95	120 min	25,21	0,86	26,92	1,26	22,58	2,33
100	125 min	25,44	0,90	26,82	1,12	22,30	1,89
105	130 min	25,53	0,90	27,12	1,06	22,00	2,10

U46-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - VPr							
		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + NaCl-Inhalation (n=5)		U46 + BNP 200nM-Inhalation (n=5)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	3,84	0,26	3,86	0,93	3,73	0,64
U46 Start	0 min	4,22	0,69	4,60	0,74	3,96	0,72
Plateau Start	5min	2,56	0,75	3,80	0,75	4,03	0,86
Inhal. Start	10 min	2,56	0,55	3,84	0,89	3,76	0,58
Inhal.+5	15 min	4,40	0,88	5,42	0,83	4,50	0,64
Inhal.+10	20 min	3,02	0,91	5,34	0,44	2,89	0,70
Inhal. Stop	25 min	3,60	1,03	5,50	0,34	4,00	0,64
5	30 min	3,22	1,21	3,72	0,53	4,27	0,47
10	35 min	3,90	0,74	4,32	0,97	3,94	0,69
15	40 min	4,86	0,55	3,66	0,75	5,46	0,62
20	45 min	4,36	0,99	3,96	0,76	4,86	0,62
25	50 min	4,06	0,81	4,86	0,71	4,01	0,78
30	55 min	2,90	0,75	5,20	0,75	2,74	0,31
35	60 min	3,96	0,79	4,02	1,02	4,91	0,68
40	65 min	4,02	0,58	5,38	0,90	4,04	0,77
45	70 min	5,10	0,99	6,74	0,28	5,29	0,62
50	75 min	4,44	0,75	5,84	0,74	5,47	0,63
55	80 min	4,12	0,66	5,50	0,42	3,84	0,70
60	85 min	3,94	1,07	4,74	0,53	4,81	0,66
65	90 min	4,10	1,20	6,64	0,28	4,44	0,60
70	95 min	4,42	0,68	3,32	0,90	5,81	0,39
75	100 min	4,28	1,21	3,52	0,63	3,99	0,74
80	105 min	3,86	1,03	5,30	0,83	4,00	0,57
85	110 min	4,76	0,67	4,60	0,92	5,00	0,82
90	115 min	3,06	0,68	4,80	0,89	3,60	0,54
95	120 min	3,94	0,66	4,72	0,99	4,19	0,78
100	125 min	4,66	1,04	4,80	0,98	5,40	0,66
105	130 min	3,74	0,54	5,30	0,85	4,89	0,48

U46-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - relatives Lungengewicht							
		U46-Kontrolle (n=7)		U46 + NaCl-Inhalation (n=5)		U46 + BNP 200nM-Inhalation (n=5)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U46 Start	0 min	-0,34	0,13	-0,10	0,10	-0,50	0,22
Plateau Start	5min	-0,70	0,26	-0,20	0,34	-1,24	0,44
Inhal. Start	10 min	-0,90	0,30	-0,30	0,44	-1,14	0,44
Inhal.+5	15 min	-0,97	0,35	-0,10	0,48	-1,04	0,53
Inhal.+10	20 min	-0,97	0,35	0,20	0,44	-0,76	0,50
Inhal. Stop	25 min	-0,90	0,37	0,30	0,46	-0,38	0,50
5	30 min	-0,97	0,44	0,30	0,46	-0,18	0,65
10	35 min	-0,97	0,44	0,50	0,52	-0,38	0,54
15	40 min	-0,97	0,47	0,40	0,62	-0,46	0,59
20	45 min	-0,90	0,46	0,40	0,62	-0,46	0,59
25	50 min	-0,97	0,48	0,30	0,72	-0,46	0,72
30	55 min	-0,97	0,48	0,50	0,65	-0,46	0,72
35	60 min	-0,99	0,58	0,40	0,75	-0,46	0,72
40	65 min	-0,84	0,53	0,40	0,75	-0,56	0,73
45	70 min	-0,84	0,63	0,40	0,75	-0,66	0,68
50	75 min	-0,84	0,58	0,50	0,77	-0,66	0,68
55	80 min	-0,84	0,69	0,60	0,81	-0,66	0,68
60	85 min	-0,84	0,69	0,50	0,91	-0,66	0,68
65	90 min	-0,77	0,74	0,50	0,91	-0,66	0,68
70	95 min	-0,77	0,74	0,50	0,91	-0,76	0,77
75	100 min	-0,64	0,79	0,60	0,94	-0,66	0,68
80	105 min	-0,57	0,84	0,60	0,94	-0,66	0,68
85	110 min	-0,64	0,86	0,60	0,94	-0,66	0,68
90	115 min	-0,50	0,92	0,60	0,94	-0,46	0,53
95	120 min	-0,36	0,97	0,60	1,07	-0,66	0,68
100	125 min	-0,30	1,03	0,80	1,01	-0,56	0,60
105	130 min	-0,30	1,11	0,70	1,10	-0,46	0,53

Endothelin1-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - mittlerer Pulmonalarteriendruck							
		ET1-Kontrolle (n=4)		ET1 + NaCl-Inhalation (n=4)		ET1 + BNP 200nM-Inhalation (n=4)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	6,58	0,84	6,86	1,02	5,78	1,13
ET1 Start	0 min	6,58	0,56	6,96	0,91	5,65	1,11
Plateau Start	60 min	25,78	3,90	26,74	3,94	22,88	4,26
Inhal. Start	75 min	26,33	4,06	27,03	4,41	23,00	3,70
Inhal.+5	80 min	26,43	3,86	26,69	3,83	21,80	4,20
Inhal.+10	85 min	27,23	3,63	27,16	3,75	21,48	4,39
Inhal. Stop	90 min	27,63	4,74	27,31	4,41	21,28	3,55
5	95 min	28,53	4,98	27,70	4,41	20,88	4,39
10	100 min	27,90	4,30	27,56	4,30	19,73	4,37
15	105 min	28,10	4,66	27,68	4,60	19,65	3,57
20	110 min	28,63	4,97	27,99	4,90	18,68	4,28
25	115 min	27,90	4,55	27,99	3,90	19,13	4,45
30	120 min	27,18	5,76	27,64	4,85	19,90	5,03
35	125 min	27,28	5,50	27,41	4,66	19,40	4,54
40	130 min	27,98	5,12	27,65	4,24	18,73	4,25
45	135 min	27,55	5,56	27,66	4,58	18,78	4,62
50	140 min	27,73	6,21	27,58	4,79	18,80	4,00
55	145 min	27,38	5,16	27,33	4,07	18,40	4,00
60	150 min	27,53	5,33	27,43	4,34	18,05	4,58
65	155 min	27,35	6,12	27,18	4,62	18,43	3,69
70	160 min	26,95	6,24	26,97	5,08	19,08	4,28
75	165 min	26,85	6,89	26,87	5,39	17,10	4,94
80	170 min	26,70	6,87	26,74	5,34	17,15	5,05
85	175 min	27,18	6,26	26,90	4,95	17,55	3,72
90	180 min	26,63	6,14	26,29	4,68	18,37	4,62
95	185 min	25,83	6,33	25,86	4,80	17,37	2,54
100	190 min	25,98	6,52	25,42	5,25	18,07	3,58
105	195 min	22,83	3,00	23,62	2,61	16,83	5,08

Endothelin1-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - Ventilationsdruck							
		ET1-Kontrolle (n=4)		ET1 + NaCl-Inhalation (n=4)		ET1 + BNP 200nM-Inhalation (n=4)	
Intervention	Zeit	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	3,80	0,83	5,55	0,62	3,20	0,40
ET1 Start	0 min	5,25	0,54	2,78	0,81	4,95	0,90
Plateau Start	60 min	3,58	1,30	3,55	0,87	7,00	0,57
Inhal. Start	75 min	4,50	1,14	5,10	1,27	5,50	0,72
Inhal.+5	80 min	3,13	0,59	3,45	1,00	3,58	1,45
Inhal.+10	85 min	4,20	1,05	3,25	1,49	5,93	1,36
Inhal. Stop	90 min	6,38	0,34	5,65	1,27	5,45	1,11
5	95 min	3,38	0,84	1,95	0,10	5,58	1,20
10	100 min	5,55	1,13	2,70	0,74	3,38	1,01
15	105 min	3,28	1,13	3,95	1,28	5,20	1,27
20	110 min	3,28	0,81	3,78	0,88	3,40	1,07
25	115 min	3,98	0,92	4,95	0,99	2,10	0,17
30	120 min	4,20	1,08	5,58	0,87	3,05	0,68
35	125 min	4,15	1,28	2,15	0,45	4,60	1,51
40	130 min	4,03	1,61	5,95	0,57	3,75	1,01
45	135 min	6,03	0,63	4,33	1,67	2,85	0,72
50	140 min	5,70	0,29	4,83	1,58	5,90	1,08
55	145 min	4,63	1,69	4,15	0,84	3,05	1,07
60	150 min	3,73	0,43	5,23	1,21	2,40	0,12
65	155 min	3,35	1,46	4,43	1,56	6,08	0,50
70	160 min	3,05	1,15	5,80	1,20	6,63	0,69
75	165 min	5,28	0,93	6,23	0,61	2,73	0,23
80	170 min	3,78	1,18	4,27	1,11	3,50	0,50
85	175 min	2,83	1,04	5,80	0,70	4,18	0,67
90	180 min	4,10	1,34	2,00	0,26	3,48	0,94
95	185 min	4,68	1,02	2,80	0,46	5,00	1,54
100	190 min	4,95	1,01	3,30	0,50	6,98	0,84
105	195 min	4,97	1,74	2,65	1,25	4,65	0,94

Endothelin1-Versuche mit NaCl-/BNP-Inhalation - relatives Lungengewicht							
Intervention	Zeit	ET1-Kontrolle (n=4)		ET1 + NaCl-Inhalation (n=4)		ET1 + BNP 200nM-Inhalation (n=4)	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Baseline Start	-30 min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ET1 Start	0 min	0,00	0,00	0,13	0,13	-0,13	0,13
Plateau Start	60 min	-1,35	0,99	0,00	0,54	-3,50	0,20
Inhal. Start	75 min	-1,35	0,99	-0,13	0,24	-3,25	0,14
Inhal.+5	80 min	-1,23	1,10	-0,13	0,38	-3,00	0,00
Inhal.+10	85 min	-1,30	1,08	0,38	0,55	-2,75	0,14
Inhal. Stop	90 min	-1,18	1,02	0,63	0,43	-2,25	0,14
5	95 min	-1,05	1,13	0,25	0,32	-2,63	0,24
10	100 min	-1,05	1,13	0,13	0,43	-2,63	0,24
15	105 min	-1,13	1,13	0,00	0,46	-2,63	0,24
20	110 min	-1,00	1,24	0,00	0,46	-2,63	0,24
25	115 min	-0,88	1,20	0,13	0,52	-2,63	0,24
30	120 min	-0,88	1,20	0,13	0,52	-2,75	0,14
35	125 min	-0,88	1,36	0,25	0,60	-2,75	0,14
40	130 min	-0,75	1,31	0,38	0,55	-2,50	0,29
45	135 min	-0,63	1,43	0,50	0,65	-2,50	0,29
50	140 min	-0,30	1,32	0,63	0,63	-2,50	0,29
55	145 min	-0,30	1,51	0,75	0,72	-2,13	0,24
60	150 min	-0,18	1,44	1,25	0,72	-2,25	0,43
65	155 min	-0,18	1,44	1,38	0,72	-2,00	0,29
70	160 min	-0,05	1,41	1,00	0,76	-1,88	0,38
75	165 min	0,18	1,51	1,17	0,88	-1,88	0,38
80	170 min	0,33	1,44	1,50	1,15	-1,63	0,52
85	175 min	0,70	1,51	1,83	1,45	-1,63	0,52
90	180 min	0,70	1,51	2,33	1,74	-1,50	0,61
95	185 min	0,83	1,44	2,83	2,20	-1,25	0,75
100	190 min	0,95	1,43	2,93	2,30	-1,13	0,85
105	195 min	1,00	1,80	3,33	2,40	-1,00	0,96