

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

**Differenzieller Einfluss inhalativ versus systemisch applizierter  
Endothelinrezeptorantagonisten auf die experimentelle  
pulmonale Hypertonie, untersucht am  
Modell der isoliert ventilierten und  
perfundierten Kaninchenlunge**

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

**vorgelegt von  
Tobias Meis  
aus  
Borken  
2010**

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

**Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Behr**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. André Brändli  
Priv. Doz. Dr. med. Dominik Hartl**

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

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2010**

# **Inhaltsverzeichnis**

Seite

**Abkürzungen**

VI

## **1. Einleitung**

<b>1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation</b>	1
<b>1.2 Pulmonale Hypertonie</b>	
1.2.1 <b>Klassifikation und Definition der pulmonalen Hypertonie</b>	5
1.2.2 <b>Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie</b>	8
1.2.2.1 <b>Die pulmonale Vasokonstriktion</b>	8
1.2.2.2 <b>Umbauprozesse in der pulmonalen Strombahn (Remodeling)</b>	10
1.2.2.3 <b>In-Situ-Thrombosen</b>	11
1.2.3 <b>Endothelin</b>	12
<b>1.3 Etablierte Therapieoptionen und -strategien der pulmonalen Hypertonie</b>	14
1.3.1 <b>Allgemeine Maßnahmen bei pulmonaler Hypertonie</b>	14
1.3.2 <b>Kalziumantagonisten</b>	15
1.3.3 <b>Prostanoide</b>	15
1.3.4 <b>Phosphodiesteraseinhibitoren</b>	17
1.3.5 <b>Stickstoffmonoxid</b>	17
1.3.6 <b>Endothelinrezeptorantagonisten</b>	18
<b>1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit</b>	21

## **2. Methodik**

<b>2.1 Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge</b>	
2.1.1 Beschreibung des Organmodells	22
2.1.2 Präparation / Organentnahme	22
2.1.3 Beschreibung des Perfusionssystems	24
2.1.4 Beschreibung des Beatmungssystems	26
2.1.5 Aufbau des Aerosolisierungssystems	27
2.1.6 Registrierung physiologischer Messgrößen	27
<b>2.2. Modell der ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie</b>	28

## **3. Experimenteller Teil**

<b>3.1 Untersuchungen zur Beeinflussung der Hämodynamik, den Ventilationsdruck und die Ödementwicklung in der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie.</b>	30
<b>3.2 Standardisierte Versuchsabläufe</b>	33
<b>3.3 Auswertung und Datenanalyse</b>	33

## **4. Ergebnisse**

<b>4.1 Vergleichszeitpunkte</b>	34
<b>4.2 Ergebnisse der Kontrollgruppe</b>	35
<b>4.3 Einfluss von ET-1 im Modell der isolierten Kaninchenlunge</b>	36
<b>4.4 Dosis-Wirkungskurven intravaskulär verabreichter ETRA</b>	37
<b>4.5 Einfluss intravaskulär applizierter unterschiedlicher ETRA auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie</b>	
4.5.1 vaskuläre Applikation des selektiven ETRA BQ 123	38
4.5.2 vaskuläre Applikation des selektiven ETRA BQ 788	40
4.5.3 vaskuläre Applikation des dualen ETRA Tezosentan	42

<b>4.6 Einfluss aerosolierter ETRA auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie</b>	
4.6.1 Kontrollgruppe: isotonische Kochsalzlösung	44
4.6.2 Aerosolisierung des selektiven ETRA BQ 123	46
4.6.3 Aerosolisierung des selektiven ETRA BQ 788	48
4.6.4 Aerosolisierung des dualen ETRA Tezosentan	50
<b>4.7 Auswirkung unterschiedlicher ETRA auf das Modell der pulmonalen Hypertonie im direkten Vergleich</b>	
4.7.1 Versuchsreihe intravaskulär applizierter ETRA	52
4.7.2 Versuchsreihe aerosolierter ETRA	56
<b>4.8 Vergleich der intravasalen und der inhalativen Applikation von ETRA</b>	60
<b>5. Diskussion</b>	63
<b>6. Ausblick</b>	69
<b>7. Zusammenfassung</b>	70
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	72
<b>9. Materialien</b>	
9.1 Substanzen	92
9.2 Geräte / Herstellerangaben	93
<b>10. Danksagung</b>	94

## Abkürzungen

ALK 1	Activin receptor-like kinase
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BMPR 2	Bone-morphogenic-protein-Rezeptor 2
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTEPH	Chronisch Thromboembolische Pulmonale Hypertonie
ECE	Endothelin Converting Enzyme
ET-1	Endothelin-1
ETRA	Endothelinrezeptorantagonist
HHT	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HZV	Herzzeitvolumen
IP <sub>3</sub>	Inositol- <sub>3,4,5</sub> -Triphosphat
LVP	LVEDP; Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NYHA	New York Heart Association
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarteriendruck
PCWP	Pulmonaler kapillärer Verschlussdruck
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet derived growth factor
PEA	Pulmonale Endarteriektomie
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (Prostazyklin)
PH	Pulmonale Hypertonie
PVOD	Pulmonal venöse Verschlusskrankheit
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand

TXA<sub>2</sub>

Thromboxan A<sub>2</sub>

VP

Ventilationsdruck

VEGF

Vascular Endothelial Growth factor

WHO

World Health Organisation

# 1. Einleitung

## 1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation

Die Physiologie der pulmonalen Zirkulation unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der anderer Organe. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal findet sich im Bereich der Pulmonalarterien. Muskuläre Arterien, welche sich in den anatomischen Regulationseinheiten der Azini befinden, gehen über in teilmuskularisierte bis hin zu nicht-muskularisierten Arteriolen. Daraus resultierend ergibt sich ein niedriger Perfusionswiderstand.

Aus dem niedrigen Perfusionswiderstand resultiert, dass es selbst bei einer Steigerung des Herzzeitvolumens und damit der Lungendurchblutung um den Faktor 4 noch nicht einmal zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes um den Faktor 2 kommt. Dies bedeutet, dass der Strömungswiderstand mit zunehmender Durchblutung noch weiter reduziert wird.

Um den pulmonalarteriellen Druck bei steigendem Herzzeitvolumen annähernd konstant zu halten, werden zum einen in Ruhe nicht perfundierte Gefäßareale rekrutiert. Zum anderen ist eine aktive Dilatation über eine endotheliale Freisetzung von Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) in diesen Arealen möglich. Außerdem kommt es zu einer druckpassiven Distension bereits in Ruhe perfundierter Areale.

Die Minder- bzw. fehlende Perfusion bestimmter Areale ist unter anderem auf die autoregulatorische Funktion der Lunge zurück zu führen. So reagieren die lokalen Gefäße auf einen alveolären Sauerstoffpartialdruck von  $\leq 70$  mmHg mit einer Vasokonstriktion.

Diese hypoxieinduzierte Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus) stellt einen weiteren Unterschied im Vergleich zur hypoxieinduzierten systemischen Vasodilatation anderer Organsysteme als Reaktion auf einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck dar.

Eine wichtige Größe zur Bestimmung der pulmonalvaskulären Funktion ist der pulmonale Perfusionswiderstand (pulmonary vascular resistance, PVR). Dieser berechnet sich aus dem Druckabfall über die pulmonale Strombahn. Dieser Druckabfall wird bestimmt über den pulmonalarteriellen Mitteldruck (PAPm) und den linksatrialen Druck, der näherungsweise durch den mittleren pulmonalkapillären Verschlussdruck (PCWPm) angegeben wird (transpulmonaler Druckgradient = PAPm-PCWPm). Gemäß dem Ohmschen Gesetz stellt das Herzzeitvolumen (HZV) den Blutfluss über diesen Druckabfall dar, so dass sich in Analogie zum Ohmschen Gesetz der pulmonale vaskuläre Widerstand (PVR) wie folgt berechnet:

$$PVR = (PAPm - PCWP) / HZV$$

Während der Rechtsherzkatheteruntersuchung lässt sich der PCWP (pulmonal kapilläre Verschluss- oder Wedge Druck) bestimmen. Klinisch wird damit der Druck angegeben, der distal eines entfalteten Verschlussballons herrscht. Da zum Zeitpunkt der Entfaltung kein Fluss von proximal des Katheters stattfindet und damit die Bedingung stehender Wassersäulen vorherrscht, reflektiert der PCWP den Druck in den Pulmonalkapillaren und -venen und damit näherungsweise den linksatrialen Druck bzw. den linksventrikulären Füllungsdruck. Der Pulmonalarterielle Druck (PAP) ergibt sich aus der Summe des linksatrialen Drucks ( $p_{La}$ ) und dem Druckabfall ( $\Delta p$ ) über den in Reihe geschalteten Gefässwiderständen der arteriellen ( $\Delta p_1$ ), kapillären ( $\Delta p_2$ ) und venösen ( $\Delta p_3$ ) Strecke der pulmonalen Strombahn wie folgt:

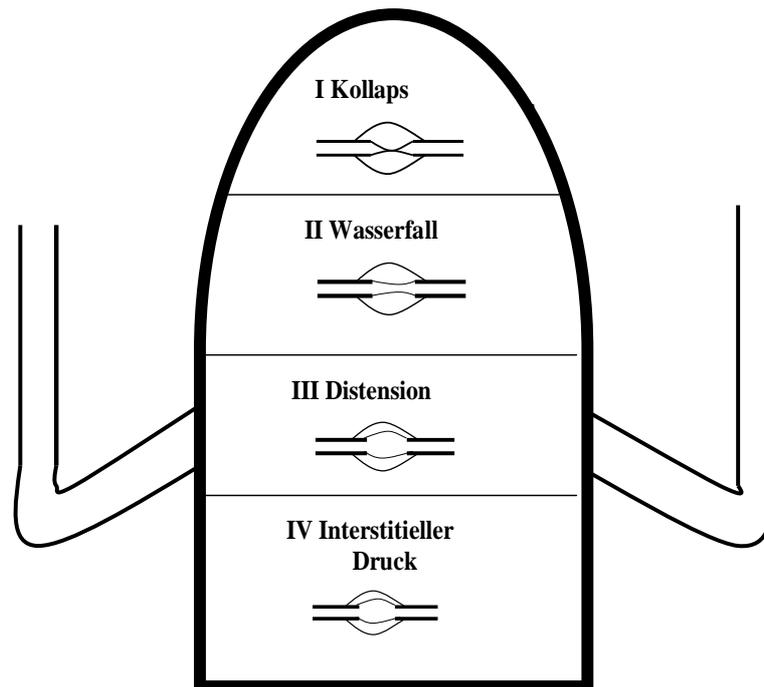
$$PAP = p_{La} + \Delta p_1 + \Delta p_2 + \Delta p_3$$

Da sich der PVR aus dem Druckabfall über die pulmonale Strombahn und dem HZV nach oben aufgeführter Formel ermitteln lässt, ergibt sich für den pulmonalarteriellen Mitteldruck:

$$\text{Mittlerer PAP} = PVR \cdot HZV + PCWP$$

Der Begriff des vaskulären Widerstandes bedarf im Bezug auf die pulmonale Zirkulation jedoch einer Erläuterung. Üblicherweise verhält sich die Lungenstrombahn wie ein Poiseuille-Resistor. Dieses ist jedoch unter physiologischen Bedingungen in aufrechter Körperhaltung nur in den mittleren und unteren Regionen der Lunge gegeben, nach dem West-Zonen Modell entsprechen diese den West-Zonen III und IV. Bei einer steigenden Perfusion der Lungengefäße sind es diese Zonen, die druckpassiv erweitert werden (Distension). In der West-Zone II herrscht vielmehr das Wasserfall-Prinzip (sog. Starling-Resistor): dabei ist ein Blutfluss dann vorhanden, wenn der intravasale Druck den transpulmonalen Druck (Gradient zwischen alveolärem Druck und Pleuradruck) überschreitet.

In der West-Zone I übersteigt der alveoläre Druck auch den pulmonalarteriellen Druck, so dass es in dieser Region nicht zu einem Blutfluss kommt (Kollaps). Diese Zone ist physiologisch nicht vorhanden und beschreibt einen Teil der alveolären Totraumventilation (s. Abb 1).



*Abb.1 Darstellung der West-Zonen I-IV beim stehenden Menschen, Erläuterungen im Text*

Der pulmonale Vasotonus wird durch ein Gleichgewicht von vasokonstriktiven und vasodilatativen Mechanismen bestimmt. Dabei ist eine wichtige Voraussetzung für die lokalen Regulationsmechanismen die enge räumliche Beziehung zwischen Endothel - und glatter Gefäßmuskelzelle. Die vom Endothel produzierten vasoaktiven Substanzen wie das vasokonstringierende ET-1 und Thromboxan A<sub>2</sub>, aber auch vasodilatierende Mediatoren wie NO und PGI<sub>2</sub> können somit auf die benachbarten Muskelzellen wirken.

Dabei ist die Kalziumkonzentration innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen, die wesentlich über das intrazelluläre cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und das cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) reguliert wird, als eine wichtige Stellgröße entscheidend. Denn Kalzium aktiviert die Aktin-Myosin-Interaktion und führt somit zu einer Kontraktion der Zelle. Dabei gelangt das Kalzium durch membranständige Kalziumkanäle einerseits und das endoplasmatische Retikulum andererseits in das Zytoplasma, entweder durch Depolarisation der Zellwand oder durch Aktivierung dieser Kanäle durch intrazelluläre Botenstoffe wie z. B. das Inositol-1,4,5, -Triphosphat (IP<sub>3</sub>).

Ein klassischer Mechanismus der Regulation der glatten Muskelzellkontraktion und damit des gesamten Vasotonus ist die direkte Wirkung membranständiger G-Proteine. Aktiviert werden

diese beispielsweise durch die Vasokonstriktiva Thromboxan  $A_2$ , über  $\alpha_1$ -Rezeptoren oder über den  $ET_A$ -Rezeptor<sup>1</sup>, aber auch durch die vasodilatierenden Prostaglandine. Eine aktive Senkung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration gelingt dabei über cAMP- und cGMP-aktivierte Kalziumpumpen. So fördert zum Beispiel die cAMP-aktivierte endoplasmatische Ca-Transport-ATPase das freie zytosolische Kalzium in das endoplasmatische Retikulum. Ein typischer Aktivator der intrazellulären Adenylatzyklase glatter Gefäßmuskelzellen ist der Arachidonsäuremetabolit  $PGI_2$ , der seine Wirkung im Wesentlichen über die Bindung an den  $IP$ -Rezeptor entfaltet, der über ein stimulatorisches G-Protein die Adenylatzyklase aktiviert. Über die Aktivierung der Adenylatzyklase kommt es zu einer intrazellulär vermehrten Produktion von cAMP und dadurch zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Erhöhte intrazelluläre Spiegel des cAMP sind dabei assoziiert mit der Öffnung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen. Der erhöhte Kaliumspiegel seinerseits führt zur Hyperpolarisation und Blockade der L-Kalziumkanäle – und somit letztendlich zur Vasodilatation<sup>2;3</sup>

In verschiedenen Modellen der pulmonalen Hypertonie (PH) konnte bereits der direkte Einfluss von  $PGI_2$  auf die Entstehung einer solchen PH untersucht werden. Zum Beispiel ließ sich experimentell ein gewisser Schutz vor chronisch-hypoxiebedingter pulmonaler Hypertonie<sup>4</sup> durch eine verstärkte Expression von  $PGI_2$  erzielen. Zudem konnten Hoshikawa, Voelkel et al. 2001<sup>5</sup> zeigen, dass Mäuse mit fehlerhaftem Prostazyklinrezeptor eine schwere PH unter dem Einfluss einer chronischen Hypoxie entwickelten. Dabei ist anzumerken, dass das  $PGI_2$ , ein Gewebshormon aus der Gruppe der Prostanoiden, nicht nur als potenter Vasodilatator gilt, sondern z. B. auch als Inhibitor der Thrombozytenaggregation<sup>6</sup>. Ein weiterer second messenger, der dem cAMP verwandt ist, ist das cGMP, das durch die partikuläre oder lösliche Guanylatzyklase im Zytoplasma der glatten Muskelzellen gebildet wird. Die Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase kann z. B. durch NO erfolgen, aber auch über natriuretische Peptide (z. B. das atriale natriuretische Peptid, ANP oder das brain natriuretic peptide, BNP). Die beiden second messenger cAMP und cGMP hemmen die Myosinkinase (Hemmung der Kalzium-aktivierten Interaktion von Aktin-Myosin-Filamenten) und können außerdem durch eine Hyperpolarisation über einen Kalzium-abhängigen Kaliumkanal eine nachfolgende Relaxation auslösen<sup>7</sup>. Beendet wird die Wirkung der zyklischen Nukleotide durch deren Degradation durch intrazelluläre Phosphodiesterasen (PDE). Die Familie der PDE besteht aus unterschiedlichen Isoenzymen, die je nach Isoenzym den Abbau von cAMP oder cGMP bewirken. In der Lunge wurden vor allem die Isoenzyme

3, 4 und 5 isoliert. Dabei bewirken die PDE 3 und 4 im Wesentlichen den Abbau des cAMP und die PDE 5 den Metabolismus des cGMP<sup>8;9</sup>

## **1.2 Pulmonale Hypertonie**

### **1.2.1 Definition und Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie**

Die pulmonale Hypertonie ist international definiert als eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks  $\geq 25$  mmHg in Ruhe<sup>10</sup>. Sie kann im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen auftreten oder auch als idiopathische bzw. hereditäre Form. Dies weist zwar auf eine heterogene Ätiologie der PH hin. Allerdings bestehen Gemeinsamkeiten unter den verschiedenen Entitäten.

In Bezug auf die Hämodynamik lassen sich unterschiedliche Schweregrade einteilen:

Die *latente pulmonale Hypertonie*: Hierbei liegt der Mitteldruck der A. pulmonalis in Ruhe im Normbereich, steigt jedoch unter Belastung auf pathologische Werte an. Allerdings handelt es sich hier zunächst um ein pathophysiologisches Erklärungsmodell. Da der Anstieg unter Belastung altersabhängig und die tatsächliche Bedeutung eines überschießenden Druckanstieges in der Pulmonalarterie noch unklar ist, wurde in der aktuellen Klassifikation der WHO auf die Definition einer belastungsinduzierten PH verzichtet<sup>11</sup>.

Bei der *manifesten pulmonalen Hypertonie* liegt der Mitteldruck der A. pulmonalis in Ruhe  $\geq 25$  mmHg. Zusätzlich kommt es bei körperlicher Belastung zu einem steileren Anstieg des PAP.

Die *manifeste schwere pulmonale Hypertonie* ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Druck in der A. pulmonalis und ein zusätzlich erniedrigtes Herzzeitvolumen.

Die Symptome dieser Erkrankung reichen von geringgradiger Dyspnoe und nur geringer Leistungseinschränkung bis hin zu stark eingeschränkten körperlichen Leistungsfähigkeit unter ausgeprägter Dyspnoe oder sogar Ruhedyspnoe. Synkopen, Angina Pectoris sowie Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz (Ödeme, gestaute Halsvenen, Leberkapselschmerz etc.) sind weitere Symptome, die meist im Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Erkrankung auftreten.

Nach der Klassifikation der WHO, erstellt auf der EVIAN-Konferenz 1998, modifiziert in Venedig 2003<sup>12</sup> und aktualisiert in Dana Point<sup>13</sup>, wird die Pulmonale Hypertonie in unterschiedliche Krankheitsbilder und assoziierte Erkrankungen aufgeteilt.

## Aktualisierte Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Dana, 2008)

### **1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)**

- 1.1 Idiopathische (IPAH)
- 1.2 erbliche PAH
  - 1.2.1 BMPR2
  - 1.2.2 ALK 1, Endoglin (mit oder ohne HHT)
- 1.3 Medikamenten-, Drogen- oder Toxin- induziert
- 1.4 Assoziiert mit
  - 1.4.1 Bindegewebserkrankungen
  - 1.4.2 HIV-Infektionen
  - 1.4.3 Portale Hypertension
  - 1.4.4 Angeborene Herzerkrankungen
  - 1.4.5 Schistosomiasis
  - 1.4.6 Chronisch hämolytische 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 Lungenerkrankung
- 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
- 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiver und obstruktiver Ventilationsstörung
- 3.4 Schlaf-assoziierte Atemstörungen
- 3.5 Alveoläre Hypoventilation
- 3.6 Chronische Höhenexposition
- 3.7 Entwicklungsstörungen

### **4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)**

### **5. Multifaktoriell ausgelöste pulmonale Hypertonie**

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferativ, Splenektomie
- 5.2 Systemerkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Histiozytose, Lymphangiomeiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
- 5.3 Stoffwechselerkrankungen: Glykogenspeichererkrankungen, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- 5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz unter Dialyse

Nach der aktuellen Klassifikation (WHO Meeting in Dana Point 2008) unterscheidet man in Gruppe 1 die idiopathisch sporadische und die hereditäre PAH, sowie die assoziierten Formen der PAH. Dabei umfasst die idiopathische PAH die Gruppe der Patienten, die vormals als „primär“ bezeichnet wurden. Die assoziierten Formen treten zum Beispiel im Rahmen von Kollagenosen oder kongenitalen systemisch-pulmonalen Shuntvitien auf. Bei den Kollagenosen ist hier vor allem die limitierte Sklerodermie (CREST-Syndrom: Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, Ösophagusmotilitätsstörungen, Sklerodaktylie und Teleangiektasie) zu nennen<sup>14</sup>. Hinzu kommen die Assoziationen mit der HIV- Infektion, oder aber mit der Einnahme von Appetitzüglern (i. e. Aminorex und Fenfluramin)<sup>15</sup>. Diese Medikamente gehören zu der Gruppe an Substanzen, die zumindest als Teil ihrer Wirkung die Serotoninwirkung verstärken.

In der zweiten Gruppe der überarbeiteten Klassifikation von Dana Point werden die pulmonalvenösen Formen (Pulmonale Hypertonien bei Linksherzerkrankungen) zusammengefasst, auf die im Folgenden nicht explizit eingegangen wird. In die dritte Gruppe fallen die Pulmonalen Hypertonien, die im Rahmen von chronischen Lungenerkrankungen und / oder einer alveolären Hypoxie auftreten. Hier ist aufgrund der Häufigkeit der Erkrankung allen voran die chronisch obstruktive Lungenerkrankung zu nennen. In dieser Gruppe scheint ein wesentlicher pathophysiologischer Teilaspekt die chronische alveoläre Hypoxie zu sein, die dann im Rahmen einer chronischen hypoxischen Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des pulmonalen Druckes führt. Allerdings muss man davon ausgehen, dass in dieser Gruppe zwar zur PH prädisponierende Krankheiten zusammengefasst werden, die entscheidende Gemeinsamkeiten haben; jedoch ist, gerade vor dem Hintergrund dass die pathophysiologischen Zusammenhänge bei den interstitiellen Lungenerkrankungen sehr komplex sind, auch offensichtlich, dass die Hypoxie nur ein Teilaspekt der zur Pathogenese der PH beitragenden Konstellation ist<sup>16</sup>. Hinzu kommen Erkrankungen wie pulmonale Entwicklungsstörungen, das Schlafapnoesyndrom sowie längere Aufenthalt in Gebieten mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck (z. B. in großer Höhe).

Eine weitere Gruppe (Gruppe IV) bilden die Pulmonalen Hypertonien aufgrund von chronischen Verläufen thromboembolischer Ereignisse (i. e. chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie, CTEPH). Die Diagnosestellung einer solchen CTEPH ist wichtig, da die operative Endarteriektomie von thrombotischem Material einen sehr effektiven Therapieansatz darstellen kann.

In der Gruppe (V) werden spezielle Erkrankungen zusammengefasst wie beispielsweise die Sarkoidose oder Pulmonale Hypertonien durch von außen obstruierende Massen, zum Beispiel Lymphknoten oder Tumoren.

### **1.2.2 Pathophysiologie der Pulmonalen Hypertonie**

Bei der pulmonalen Hypertonie kommt es definitionsgemäß (siehe oben) zu einem Anstieg des Druckes in der Lungenstrombahn.

In Abhängigkeit vom pulmonalkapillären Verschlussdruck (PCWP; Definition siehe oben), unterscheidet man die prä- und die postkapilläre Form. Liegt der PCWP im Normbereich ( $< 15$  mmHg), entsteht die Druckerhöhung im Wesentlichen vor bzw. auf der Ebene der Lungenkapillaren. Nach der Dana-Klassifikation gehören hierzu die Gruppen I sowie III bis V. Davon ist die postkapilläre pulmonale Hypertonie zu unterscheiden (PCWP  $\geq 15$  mmHg), bei der es meist über eine Druckerhöhung im linken Herzen zu einer „weitergeleiteten“ Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßbett kommt. Diese kann man dem zur Folge auch als pulmonalvenöse pulmonale Hypertonie bezeichnen. Raritäten sind Erkrankungen, die im Wesentlichen die Lungenkapillaren betreffen (Gruppe I' nach der überarbeiteten Klassifikation von Dana Point, z. B. die kapilläre Hämangiomatose).

Unabhängig jedoch von dieser Einteilung liegen der Entstehung der PH ähnliche Pathomechanismen zu Grunde. Dabei sind die größten Gemeinsamkeiten in der Gruppe der PAH zu finden. Aber auch in allen anderen Gruppen spielen die Pathomechanismen *pulmonale Vasokonstriktion*, Umbauvorgänge in der pulmonalen Strombahn (*Remodeling*) und die *In-Situ-Thrombose* eine signifikante Rolle.

#### **1.2.2.1 Die pulmonale Vasokonstriktion:**

Wird das oben beschriebene Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren gestört und liegt dann ein Ungleichgewicht zwischen Mediatoren, die eine pulmonale Vasodilatation bewirken können und solchen, die als pulmonale Vasokonstriktoren gelten, vor, kommt es zu einer anhaltenden aktiven und grundsätzlich antagonisierbaren Vasokonstriktion. Wesentliche Vasokonstriktoren sind hier neben anderen das Endothelin-1 (ET-1), Thromboxan A<sub>2</sub>, der plättchenaktivierende Faktor (PAF) Thrombin und Serotonin. Pulmonale Vasodilatoren, die entsprechend vermindert gebildet werden sind z. B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>). So konnte in Untersuchungen an Patienten mit chronischer

pulmonaler Hypertonie ein Ungleichgewicht zwischen erhöhter Expression von ET-1<sup>17</sup> und der reduzierten Expression der endothelialen NO-Synthase dargestellt werden<sup>18</sup>. Dabei gilt das ET-1 als einer der stärksten bekannten pulmonalen Vasokonstriktoren und wird aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit noch im Folgenden besprochen. Außerdem konnte ein solches Ungleichgewicht auch für das TxA<sub>2</sub> und das PGI<sub>2</sub> bei Patienten mit chronischer pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden<sup>19</sup>. Hinzu kommt die Beobachtung, dass die Konzentration der Prostazyklinsynthase bei der idiopathischen PAH, bei der portalen pulmonalen Hypertonie sowie bei der HIV-Assoziierten PH erniedrigt ist<sup>20</sup>.

Die Wirkung der genannten Mediatoren beschränkt sich nicht nur auf die Vermittlung einer pulmonalen Vasokonstriktion. Zum Beispiel sind für das Eicosanoid TxA<sub>2</sub> weitere Eigenschaften bekannt, die in der Pathophysiologie der PH eine Rolle spielen: es konnte eine Förderung der Thrombozytenaggregation und eine Induktion der Proliferation glatter Muskelzellen gezeigt werden. Darüber hinaus konnten Katugampola und Mitarbeiter<sup>21</sup> eine erhöhte Dichte an Thromboxanrezeptoren innerhalb des rechten Ventrikels feststellen. Dies ist allerdings zunächst rein deskriptiv zu bewerten, da der Stellenwert dieser Beobachtung nicht ganz klar ist. Es könnte sich um einen Adaptationsmechanismus des rechten Ventrikels auf die vermehrte Arbeitsbelastung handeln.

Die beschriebenen Substanzen mit einem primär vasodilatierenden Profil und darüber hinaus antiproliferativer Wirkung umfassen unter anderem das NO und das PGI<sub>2</sub>. NO ist erstmals als Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) beschrieben worden<sup>22</sup> und gilt auch als pulmonales Vasorelaxans<sup>23</sup>. Experimentell inhibiert der Einsatz von NO die hypoxiebedingte Vasokonstriktion<sup>24</sup> und inhibiert die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die Thrombozytenaggregation<sup>25</sup>. PGI<sub>2</sub>, ein Gewebshormon aus der Gruppe der Prostanoiden, gilt ebenfalls als potenter Vasodilatator und Inhibitor der Thrombozytenaggregation<sup>6</sup>

Experimentell ließ sich ein gewisser Schutz vor chronisch-hypoxiebedingter pulmonaler Hypertonie<sup>4</sup> durch eine verstärkte Expression von Prostazyklin erzielen. Hingegen konnte die Arbeitsgruppe um Hoshikawa, Voelkel et al. 2001<sup>5</sup> zeigen, dass Mäuse mit fehlerhaftem Prostazyklinrezeptor eine schwere pulmonale Hypertonie unter dem Einfluss einer chronischen Hypoxie entwickelten<sup>26</sup>. Diese Ergebnisse beruhen nicht nur auf den beschriebenen vasoaktiven Effekten der Prostazykline im Sinne einer Relaxation der glatten Muskelzelle in Gefäßen, des Weiteren konnten auch antimitotische Effekte sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Fibroblasten nachgewiesen werden<sup>27;28</sup>.

### 1.2.2.2 Umbauprozesse in der pulmonalen Strombahn (Remodeling):

Dieser Vorgang betrifft alle Wandschichten des pulmonalen Gefäßsystems. So werden die zentralen Gefäße durch die periphere Druckerhöhung gedehnt, während das Lumen der kleineren Gefäße durch Umbauvorgänge abnimmt.

Im Gesunden besitzen die pulmonalarteriellen Gefäße bis zu einer Weite von ca. 80 µm Lumen eine kontinuierliche Media. Distal davon sind die Gefäße nur noch teilweise muskularisiert.

Beim „positiven“ Remodeling erfolgt nun eine „de novo“- Muskularisation: die kleineren pulmonalarteriellen Gefäße weisen bis zu einer Größe von 15 µm eine Muscularis auf, da die glatten Muskelzellen longitudinal nach distal auswachsen<sup>29</sup>. Außerdem kommt es zu einer Proliferation (i. S. einer Hypertrophie) und Dysfunktion der vorhandenen glatten Muskelzellen und der Endothelzellen und darüber hinaus findet eine Fibrosierung der Intima statt. Diese ist charakterisiert durch die Proliferation von Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten können dabei sowohl von ortsständigen intermediären Zellen, von eingewanderten glattmuskulären Zellen als auch von eingewanderten Fibroblasten abstammen. Zusätzlich nimmt auch die Adventitia an den Umbauvorgängen teil. Unter anderem kommt es zu einer Vermehrung extrazellulärer Matrix unter Aktivierung unterschiedlicher Mediatoren (z. B. Metalloproteinasen). Histologisch erscheint das Vollbild des Remodelingprozesses als zwiebelschalenartig konzentrisch verengtes Pulmonalgefäß oder als sogenannte plexiforme Läsion<sup>30-32</sup>. Auf den ersten Blick hat es bei diesen den Anschein, als entstünden „Umgehungsgefäße“ um die nahezu obliterierten vorhandenen Gefäße. Dabei handelt es sich um multiple gewundene Kanäle, welche sich in den kleinen, relativ dünnwandigen Ästen der Pulmonalarterien endoluminal ausbilden und histologisch an Glomeruli der Niere erinnern. Diese Kanäle bestehen im Wesentlichen aus rasch proliferierenden Endothelzellen<sup>33;34</sup>. Wachstumsfaktoren, die an diesen Umbauprozessen beteiligt sind (ohne dass sie einen signifikanten Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik besitzen), aber durch ihre Möglichkeit zur Stimulation zum Umbau des Gefäßsystems eine wichtige Rolle einnehmen, sind unter anderem der PDGF (platelet derived growth factor), welcher als potenter Stimulator z. B. für die Proliferation der glatten Muskelzellen gilt<sup>35</sup>. Experimentell führt die Blockade des PDGF-Rezeptors zu einer Umkehr der chronischen Proliferationsvorgänge und damit zu einer Besserung einer chronischen pulmonalen Hypertonie<sup>36</sup>. Ein weiterer Wachstumsfaktor ist der VEGF (vascular endothelial growth factor), der von den Endothelzellen bei der PH selbst gebildet wird. Der Wirkungsort von VEGF ist ebenfalls die Endothelzelle. Die VEGF-Expression ist bei der pulmonalen Hypertonie erhöht<sup>30</sup>. Ob die erhöhte Expression nun ein

wider die fehlgeleitete und ungehemmte Proliferation gerichtete regulatorische Gegenmaßnahme ist, oder ein Indikator dieser Proliferationsvorgänge, ist allerdings unklar. Physiologisch führt das VEGF zu einem verlängerten Überleben der Endothelzelle (verminderte Apoptose)<sup>37</sup>. Die chronische Hypoxie führt zu einem Anstieg der VEGF-Expression innerhalb des Lungengewebes. Entsprechend gilt VEGF als Modulator für das durch chronische Hypoxie ausgelöste vaskuläre Remodeling<sup>38</sup> und entspräche so einem negativen Faktor in Bezug auf die PH. Im Gegensatz dazu steht eine Beobachtung im Modell der Monocrotalin-induzierten PH, in welchem die Expression von VEGF insgesamt sinkt<sup>39</sup>. Hinzu kommen die Beobachtungen, dass eine Überexpression von VEGF zum einen gegen Hypoxie schützt<sup>38</sup> und zum anderen die Entwicklung der Monocrotalin-induzierten PH abschwächt<sup>40</sup>.

#### 1.2.2.3 In-situ-Thrombosen:

Bei der Obduktion von Patienten mit ausgeprägter PH findet man regelmäßig in den kleinen Ästen der Pulmonalarterien Thrombusmaterial<sup>41</sup>. Nun ist bei Thrombosen in Gefäßen mit einem Durchmesser unter 200 µm in aller Regel von in-situ-Thrombosen und nicht von thrombembolischen Ereignissen auszugehen. Dabei verkleinern diese Thrombosen den Gefäßquerschnitt, erhöhen den Widerstand der Lungengefäße und können zusätzlich Umbauvorgänge aktivieren, welche wieder zu Lasten des Lumens gehen<sup>42</sup>. Inwieweit hier das Ungleichgewicht der o. g. Arachidonsäuremetabolite eine kausale oder zumindest unterstützende Funktion hat, ist nicht untersucht. Der pathophysiologische Zusammenhang eines zum Einen thrombozytenaggregationsfördernden Milieus und zum Anderen der hohe TxA<sub>2</sub> – Gehalt am Fluss behinderter Thrombozyten, der damit sowohl Vasokonstriktion und Proliferation der Gefäße unterstützt, ist allerdings naheliegend.

Das Resultat dieser drei Mechanismen Vasokonstriktion, Umbauvorgänge und Thrombosis in situ ist eine Minderung des Querschnittes des vorhandenen Gefäßbettes und konsekutiv (bei konstantem Fluss) eine pulmonale Druck- und Widerstandserhöhung.

In Folge des PAP Anstieges entsteht eine Belastung des rechten Herzens und es kommt zu einer rechtsventrikulären Dysfunktion, sowohl mit einer Hypertrophie als auch mit einer Dilatation des rechten Ventrikels. Einerseits kann dieser zwar zur Kompensation der vermehrten Nachlast hypertrophieren, andererseits ist dieser Adaptionsmechanismus nicht bei allen Patienten vorhanden und es kommt bereits frühzeitig zur Dilatation des rechten Ventrikels. Darüber hinaus kommt es bei den angesprochenen (De)kompensations-

mechanismen zu einer funktionellen Beeinträchtigung des linken Ventrikels, z. B. kann es durch Verdrängung zu einer verminderten Füllung des linken Ventrikels kommen. Zudem bestehen auch vor dieser Endstrecke interventrikuläre Interaktionen, die gegenwärtig allerdings nicht ausreichend geklärt erscheinen<sup>43</sup> und hier nicht weiter besprochen werden sollen. Die gemeinsame Endstrecke der rechtsventrikulären Dysfunktion ist jedoch eine Abnahme des HZV, welche letztendlich im Rechtsherzversagen mündet.

### **1.2.3 Endothelin**

Das Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, das erstmalig 1988 von Yanagisawa et al.<sup>44</sup> beschrieben wurde und zunächst aus Endothelzellen einer Schweineaorta isoliert wurde. Schnell wurde erkannt, dass es sich um einen sehr potenten Vasokonstriktor handelt, welcher gleichzeitig mitogene Eigenschaften besitzt. Derzeit sind mindestens vier Strukturisomere des Endothelins bekannt, Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2, Endothelin-3 und Endothelin-4. Die Isoformen Endothelin 2 bis 4 unterscheiden sich von der Struktur her vom ET-1 ausschließlich in zwei bzw. fünf Aminosäuren<sup>45;46</sup>. Das Hauptaugenmerk gebührt, zumindest bei der pathophysiologischen Betrachtung der PH, jedoch dem ET-1, da es die höchste vasoaktive Potenz besitzt und am intensivsten erforscht ist. Produziert wird Endothelin hauptsächlich von den Endothelzellen, jedoch wird es in kleinen Mengen auch von Leukozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten gebildet.

Die Synthese des Endothelins verläuft in mehreren Schritten, die nun am Beispiel des ET-1 kurz dargestellt werden. Zuerst erfolgt die Transkription des Präpro-ET-1-Gens. Dieser Vorgang wird durch unterschiedliche Stimuli wie Hypoxie<sup>47</sup>, Ischämie oder Scherkräfte im Bereich des Gefäßsystems forciert<sup>48;49</sup>. Hingegen wird dessen Transkription durch NO, PGI<sub>2</sub> und ANP inhibiert. Die Translation der mRNA ergibt das 212 Aminosäuren lange Präpro-ET-1. Eine basenspezifische Endopeptidase spaltet nun das Präpro-ET-1 zu einem aus 38 Aminosäuren bestehenden Big-ET-1<sup>45</sup>. Das Big-ET-1 wird nun durch das endothelin converting enzyme (ECE) gespalten und es entsteht das biologisch aktive ET-1<sup>50</sup>. Interessanterweise ist eine intrazelluläre Speicherform des ET-1 nicht bekannt, so dass durch die oben aufgeführten Stimuli die Synthese und Sekretion innerhalb kurzer Zeit erfolgen muss.

Durch exogene Zufuhr von radioaktiv markiertem ET-1 in Ratten konnte eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten nachgewiesen werden<sup>51</sup>. Ein Grund für die geringe Halbwertszeit

des ET-1 könnte in der hohen Clearancefunktion der pulmonalen Strombahn liegen, da ca. 50% des zirkulierenden Endothelins in der Lungen eliminiert werden<sup>52</sup>. Alle vier Isoformen des Endothelins binden an zwei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zum einen den Endothelinrezeptor A (ET<sub>A</sub>), und zum anderen den Endothelinrezeptor B (ET<sub>B</sub>). Im kardiovaskulären System ist der ET<sub>A</sub>-Rezeptor in den Kardiomyozyten und vor allem an der Oberfläche glatter Muskelzellen zu finden. Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor dagegen ist sowohl auf glatten Muskelzellen als auch auf den Endothelzellen zu finden. Somit ist im pulmonalen Gefäßsystem sowohl der ET<sub>A</sub>-Rezeptor als auch der ET<sub>B</sub>-Rezeptor vertreten, wobei der ET<sub>A</sub>-Rezeptor im Bereich größerer Gefäße ein leichtes Übergewicht besitzt. Im Bereich kleinerer Gefäße scheint dagegen der ET<sub>B</sub>-Rezeptor zu überwiegen<sup>53</sup>. Die Funktionsweise dieser beiden Rezeptoren ist äußerst komplex und spiegelt mitunter eine antagonistische Wirkung an unterschiedlichen Zielorganen wieder.

Durch eine unselektive Stimulation beider Rezeptoren auf der glatten Muskelzelle erfolgt eine G-Protein-vermittelte Kaskade mit dem Endeffekt der Vasokonstriktion<sup>54</sup>. Gleichzeitig wird über Stimulation der Proteinkinase C die proliferative Komponente des Endothelins aktiviert<sup>55</sup>. Zusätzlich stimuliert das Endothelin die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren<sup>56</sup> und unterstützt die Thrombozytenaggregation.

Im Gegensatz dazu steht die Stimulation des ET<sub>B</sub>-Rezeptors im Bereich der Endothelzelle. Diese führt zur Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub><sup>57</sup>. Hinzu kommt die Inhibition der ECE-Expression. Außerdem ist der ET<sub>B</sub>-Rezeptor hauptverantwortlich für die Clearance von zirkulierendem ET-1<sup>58</sup> und stimuliert zusätzlich die Produktion von Aldosteron<sup>59</sup>.

Aufgrund seiner funktionellen, umfangreichen Eigenschaften und dem starken Bezug zur Lunge liegt der Zusammenhang mit Lungenerkrankungen nah. Die Eigenschaften des Endothelins als einer der stärksten pulmonalen Vasokonstriktoren und Wachstumsmediatoren und die entsprechenden experimentellen Daten lassen sich beispielsweise zwanglos in das pathophysiologische Verständnis zur Genese der PH einbauen. So wurde festgestellt, dass der Plasmaendothelinspiegel bei verschiedenen Formen der PH erhöht ist. Dies gilt sowohl für die iPAH<sup>60-62</sup>, die Hypoxie assoziierte PH bei chronischen Lungenerkrankungen<sup>63</sup>, die PH im Rahmen angeborener Herzfehler<sup>62</sup> und die PH im Rahmen von Kollagenosen bzw. bei pulmonaler Thromboembolie und kongestiver Kardiomyopathie<sup>64</sup>. Bei der PAH ist zudem beobachtet worden, dass neben der vermehrten ET-1-Produktion gleichzeitig eine verminderte Clearance vorliegt<sup>63</sup>.

## **1.3 Etablierte Therapieoptionen und Therapiestrategien der pulmonalen Hypertonie**

Bei den hier genannten Therapieoptionen gewinnt der Begriff der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) eine besondere Bedeutung. Dieser umfasst die Gruppe I nach der überarbeiteten Dana Point Klassifikation und schließt pulmonale Hypertonieformen aus, welche z. B. im Rahmen von Linksherzerkrankungen oder Lungenerkrankungen bzw. hypoxischen Zuständen oder auf dem Boden von Lungenembolien entstanden sind.

Für die Gruppen II und III nach der Dana Point Klassifikation steht bisher die Behandlung der Grunderkrankung im Vordergrund. Dies reicht von der operativen Sanierung eines Klappenitiums bis hin zur optimierten medikamentösen Therapie einer Linksherzinsuffizienz oder einer chronischen hypoxischen Lungenerkrankung mit einer Sauerstofflangzeittherapie. Allerdings gibt es auch für diese Gruppen Therapieansätze, die gegenwärtig auf eine „überschießende (out of proportion)“ PH abzielen.

Diesem Konzept liegt die Hypothese zugrunde, dass es zum Beispiel bei fortgeschrittener COPD zu einer leichten pulmonalen Druckerhöhung kommt, die aber nicht therapierelevant ist. Bei einem Teil der Patienten ist aber eine weit stärkere Druckerhöhung festzustellen, selbst bei nur milder COPD, so dass hier die pulmonale Hypertonie eine führende Rolle im Krankheitsverlauf einnimmt und damit auch therapierelevant wird. Die Überprüfung dieses Ansatzes ist Gegenstand aktuell laufender Studien. Gleiche Konzepte werden auch für Erkrankungen der Gruppe V verfolgt.

Eine besondere Gruppe ist die der chronisch thromboembolischen PH (CTEPH). Klassischerweise entwickelt sich hier die PH auf dem Boden rezidivierender Lungenembolien. Allerdings kann sich auch aus einer einmaligen Lungenembolie eine persistierende Lungenhochdruckerkrankung entwickeln. Eine pulmonale Endarteriektomie (PEA), bei der organisiertes Thrombusmaterial der proximalen Lungenarterien bis zu Subsegmentebene entfernt wird, stellt hierbei einen potentiell kurativen Therapieansatz dar.

Im Folgenden werden die spezifischen Therapieansätze der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) dargestellt.

### **1.3.1 Allgemeine Maßnahmen bei pulmonaler Hypertonie**

Bei diesen Maßnahmen ist es von entscheidender Bedeutung, dass Patienten ausführlich über ihre Erkrankung und die Zusammenhänge sowie über die Auswirkung auf die

Leistungsfähigkeit und Luftnot aufgeklärt werden. Bei allen Formen der PH sind übermäßige körperliche Belastungen zu vermeiden, die zu einer ausgeprägten Luftnot oder drohendem Bewusstseinsverlust führen können. Ein balanzierter Flüssigkeitshaushalt soll eine Überwässerung vermeiden. Bei drohender oder manifester Überwässerung, die über tgl. Wiegen festgestellt werden kann, ist eine diuretische Therapie indiziert.

Eine Antikoagulation wird bei der PAH gemäß der aktuellen Leitlinien<sup>65</sup> allgemein empfohlen. Dieses gründet sich zum einen auf den o. g. Zusammenhang mit der in situ Thrombose und zum anderen auf die positiven (wenn auch retrospektiven) Studienergebnisse unter Antikoagulation der Patienten mit idiopathischer PAH<sup>2</sup>. Gemeinhin wird ein INR Wert von 1.5-2.5 empfohlen, solange in der Anamnese keine Thrombosen oder gar Lungenembolien vorliegen. In einem solchen Fall ist die Antikoagulation entsprechend anzugleichen.

### **1.3.2 Kalziumantagonisten**

Eine dauerhafte Therapie mit hoch dosierten Kalziumantagonisten kommt nur für eine kleine Gruppe (<10%) von Patienten mit iPAH in Frage. Nur wenn sich in einem akuten Vasodilatationstest mittels Rechtsherzkatheter ein ausgesprochen gutes (und genau definiertes) Ansprechen dokumentieren lässt, kann eine dauerhafte Kalziumantagonistentherapie initiiert und der Therapieerfolg nach 3 Monaten evaluiert werden<sup>66</sup>.

### **1.3.3 Prostanoid**

Der klassische Vertreter der therapeutisch eingesetzten Prostanoiden ist das PGI<sub>2</sub>, das die o. g. vasodilatierenden und antiproliferativen Effekte über die Aktivierung der Adenylatzyklase in glatten Muskelzellen induziert. Diese führt zur Bildung von zyklischem AMP, welches die Vasodilatation einleitet und ein Wachstum der glatten Muskelzellen inhibiert. Außerdem wirkt es einer Thrombozytenaggregation entgegen<sup>67;68</sup>.

Systemische Verabreichung der Prostanoiden:

Epoprostenol, ein synthetisches Analogon des natürlichen PGI<sub>2</sub>, ist als Dauerinfusion zur Behandlung der schweren pulmonalen Hypertonie in den USA und Kanada zur Therapie der PAH im NYHA-Stadium III und IV zugelassen. Allerdings ist die Therapie sehr teuer,

kompliziert in der Handhabung und kann für den Patienten aufgrund von Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, Kieferschmerzen, Kopfschmerzen oder Diarrhoe unangenehm sein<sup>69;70</sup>. Ein wesentlicher Nachteil der systemisch verabreichten Prostanoiden liegt in der komplexen Handhabung und der schwierigen Dosierung der Substanzen. Zur Applikation des Epoprostenol ist beispielsweise ein dauerhaft verbleibender zentraler Venenkatheter (z. B. Demars-Katheter oder PORT-System) erforderlich. Die hämodynamische Effizienz ist dem Einsatz von Katecholaminen durchaus vergleichbar. Dadurch ist leicht verständlich, warum in einer ohnehin angespannten hämodynamischen Situation wie der fortgeschrittenen PH auch eine kurzzeitige Unterbrechung einer solchen Infusion lebensbedrohlich sein kann. Hinzu kommt die Gefahr bedrohlicher Infektionen des Kathetersystems. Gewisse Vorteile gegenüber der Epoprostenol-Therapie hat der systemische Einsatz des stabileren Analogons Iloprost. Diese Stabilität umfasst zum einen die Lagerung und den Einsatz der Substanz, aber auch die deutlich längere Halbwertszeit *in vivo*<sup>71</sup>. Allerdings besteht für den systemischen Einsatz von Iloprost bisher keine Zulassung.

#### Subkutan angewandtes Treprostinil:

Aufgrund der teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen der systemisch via Infusion verabreichten Prostanoiden wurde das stabile Analogon Treprostinil subkutan als Dauerinfusion angewandt. Dosisabhängig zeigte sich in dieser Studie zwar eine verbesserte Leistungsfähigkeit, gemessen an der 6-Minuten-Gehstrecke. Allerdings führte die Infusion häufig zu schmerzhaften lokalen Reaktionen (85%), die dazu führten, dass die Maximaldosierung nur in ~ 25% der Patienten erreicht wurde und dass es bei 8% zu einem vorzeitigen Abbruch der Therapie kam<sup>72</sup>.

#### Orales Beraprost:

Beraprost, ein weiteres stabiles Prostanoid, wird oral appliziert. Der positive Nutzen einer initialen Studie<sup>73</sup> konnte in einer Folgestudie langfristig nicht belegt werden<sup>74</sup>.

#### Inhalatives Iloprost:

Iloprost ist ein stabiles Prostazyklinanalogon, welches inhalativ verabreicht werden kann. Durch die pulmonale selektive Applikation können systemische Nebenwirkungen der Substanz minimiert werden. Darüber hinaus erscheint eine intrapulmonal selektive Wirkung möglich, indem die Substanz als Aerosol vorzugsweise in die Lungenareale gelangt, welche auch ventiliert sind, so dass das Blut von wenig ventilierten in gut ventilierte Areale

umgeleitet wird. Die Überlegenheit einer inhalativen Verabreichung gegenüber der unselektiven systemischen Applikation konnte sowohl experimentell am Modell der isolierten Kaninchenlunge<sup>75</sup> als auch im klinischen Einsatz gezeigt werden<sup>76</sup>, indem über eine Reduktion des pulmonalarteriellen Druckes hinaus auch eine Verminderung des Shuntflusses durch Verbesserung des Missverhältnisses zwischen Ventilation und Perfusion nachgewiesen werden konnte<sup>76</sup>.

Durch die mehrmalige inhalative Verabreichung von Iloprost lässt sich klinisch eine Verbesserung der Belastbarkeit, Funktionsklasse und der Lebensqualität von Patienten mit fortgeschrittener PAH erzielen<sup>77:78</sup>. In Deutschland besteht eine Zulassung von inhalativem Iloprost für die idiopathische PAH im funktionellen WHO-Stadium III, die einen wichtigen Bestandteil der Behandlung dieser Patienten darstellt.

### **1.3.4 Phosphodiesteraseinhibitoren**

Die Phosphodiesterase 5 wird außer in den Genitalien besonders stark im Gefäßsystem der Lunge exprimiert. Durch diese Phosphodiesterase wird der intrazelluläre Botenstoff cGMP inaktiviert, welcher durch die Einwirkung von NO entsteht und vasodilatierend wirkt. Bei Inaktivierung dieses second messengers folgt dementsprechend die Aufhebung der vasodilatativen Wirkung des cGMP. Folglich kann durch Hemmung der Phosphodiesterase 5 ein höherer intrazellulärer cGMP Spiegel aufrecht erhalten und eine vermehrte Durchblutung aufgrund der Vasodilatation erzeugt werden<sup>79</sup>.

In Deutschland ist derzeit der PDE-5-Inhibitor Sildenafil für die Indikation PAH in den Funktionsklassen II und III zugelassen. Die Wirksamkeit der Substanz ist in der SUPER-1-Studie belegt worden<sup>80</sup>. Weitere PDE-5-Inhibitoren finden sich derzeit nach Vollendung entsprechender klinischer Studien im Zulassungsprozess für die Indikation PAH<sup>81:82</sup>.

### **1.3.5 Stickstoffmonoxid**

Im Gegensatz zu den bisherigen Therapien, ist die chronische Verabreichung von inhalativem Stickstoffmonoxid (NO) keine etablierte Therapiemethode. Da es sich aber um den Prototyp eines pulmonal selektiven Vasodilatators handelt, soll hier darauf eingegangen werden. Die inhalative Applikation von NO konnte sowohl in Fällen der akuten PH (wie zum Beispiel im Rahmen eines ARDS) als auch bei der chronischen PH eine auf das pulmonale Gefäßsystem beschränkte Vasodilatation erzielen<sup>83:84</sup>.

Die Wirkungsweise des NO beruht dabei auf einer Aktivierung der Guanylatzyklase, welche vermehrt cGMP produziert. Die dem cGMP nachgeschalteten, abhängigen Proteinkinasen phosphorylieren Ca-ATPasen von intrazellulären Kalziumspeichern. Die Folge ist die intrazelluläre Abnahme der Kalziumkonzentration mit dem Ergebnis der Relaxation. Durch die inhalative Applikationsform kommt es nicht nur zu einer direkten Abnahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes, sondern als Zeichen einer Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses auch zur Verminderung des Shuntflusses, weil selektiv ventilierte Areale bevorzugt das NO erhalten, wodurch die Vasodilatation erfolgt.

Trotz dieser Vorteile ist zu beachten, dass eine kontinuierliche Applikation dieses Gases nicht nur durch die damit verbundene äußerst kurze Halbwertszeit schwierig ist. Hinzu kommt die Gefahr eines Rebound-Phänomens<sup>85</sup>. Das bedeutet, dass nach Absetzen einer NO-Zufuhr der pulmonale Druck über das Ausgangsniveau ansteigen kann, schlimmsten Falls eine pulmonalhypertensive Krise ausgelöst wird.

### **1.3.6 Endothelinrezeptorantagonisten**

Wie oben beschrieben, wird der Effekt des ET-1 über die beiden Rezeptoren ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> vermittelt. Die Aktivierung der auf der glatten Muskelzelle gelegenen Rezeptoren bewirkt dabei eine Vasokonstriktion sowie deren Proliferation. Eine Aktivierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors auf den Endothelzellen dagegen führt über eine vermehrte Produktion von NO und Prostazyklin (und damit parakrin) zu einer Vasodilatation<sup>86;87</sup>. Hinzu kommt die Elimination / Clearance durch die ET<sub>B</sub>-Rezeptoren.

Die Effekte des Endothelinsystems wie oben beschrieben können entweder durch Blockade des Endothelin-Converting-Enzyms oder durch Blockade der ET-Rezeptoren antagonisiert werden. So konnte durch die Gabe eines ECE-Hemmers (Phosphoramidon) eine Reduktion des Endothelins nachgewiesen werden<sup>88</sup>.

Die Möglichkeit der Blockade der Endothelinrezeptoren durch ET<sub>A</sub>- oder durch ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten ist wesentlich besser untersucht und hat Eingang in die klinische Anwendung gefunden.

Klassifiziert werden die ETRA in selektive (ET<sub>A</sub>- oder ET<sub>B</sub>) Rezeptorenblocker und nichtselektive bzw. duale ET<sub>A</sub>-und ET<sub>B</sub>-Rezeptorenblocker. Derzeit befinden sich unterschiedliche, sowohl selektive als auch duale ETRA in der klinischen Anwendung bzw. Prüfung und werden in unterschiedlichen Tiermodellen evaluiert.

Bereits zwei Jahre nach Charakterisierung des Endothelins beschrieb Fabregat eine Substanz (Substanz P), welche unter anderem eine Vasodilatation durch Blockade der ET-Rezeptoren zeigte<sup>89</sup>. Ein großer Fortschritt wurde mit der Entwicklung des zyklischen Pentapeptids BQ-123 (cyclo[D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp-] erzielt<sup>90</sup>. BQ-123 (C<sub>31</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Na) hat ein Molekulargewicht von 633,7 und zeigt dabei die bisher höchste Selektivität für den ET<sub>A</sub>-Rezeptor. Für den Einsatz beim Menschen ist das Peptid BQ-123 nicht geeignet, weil es sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch im Gefäßsystem hydrolisiert wird. Für die Forschung dagegen (abseits von Peptidasen) ist diese Substanz von größtem Interesse und Nutzen.

Eine weitere Substanz, die vor allem im Bereich der Forschung auf Interesse stößt, ist das BQ-788 (N-cis-2,6-Dimethylpiperidinocarbonyl-L-γ-MeLeu-D-Trp(MeOCO)-D-Nle-OH), ein spezifischer ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist mit einem Molekulargewicht von 663,7<sup>91</sup>. Aus den oben erwähnten Zusammenhängen des Endothelinrezeptorsystems erscheint die Anwendung im Rahmen der PH wie auch bei anderen Indikationen nicht sinnvoll. Für wissenschaftliche Fragestellungen die Rolle der unterschiedlichen ET-Rezeptoren betreffend ist BQ-788 ebenfalls von großem Interesse.

Weitere Entwicklungen brachten sowohl selektive ETRA als auch duale ETRA hervor, welche zum Teil in der Therapie der PAH eingesetzt werden. Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Rezeptorspezifität klinisch relevant ist.

Bei der Diskussion über duale und selektive ETRA muss allerdings beachtet werden, dass die sogenannten dualen ETRA eine deutlich höhere Inhibitionsfähigkeit (ca. 100-fach) für den ET<sub>A</sub>-Rezeptor haben, als für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Diese Selektivität lässt sich unter anderem in vivo anhand des gemessenen ET-1-Spiegels im Blut bestimmen. So spricht ein ansteigender ET-1-Spiegel nach Gabe eines ETRA dafür, dass zumindest eine partielle Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors mit Reduktion der Endothelin-clearance vorliegt<sup>92</sup>.

Ein schon seit Juni 2002 in Deutschland zugelassenes Medikament für die Behandlung der PAH in den Funktionsklassen II und III ist das Bosentan. Bosentan ist ein oral zu applizierender, dualer (ET<sub>A</sub>-und ET<sub>B</sub>)-Rezeptorantagonist. Zur Zulassung führten unter anderem zwei randomisierte, doppelblind und placebokontrolliert durchgeführte Studien, im Patientenkollektiv der PAH (iPAH und Sklerodermie- assoziierte pulmonalen Hypertonie), die die Effizienz von oral appliziertem Bosentan belegten<sup>93</sup>. Dabei hat man eine signifikante Verbesserung der Belastbarkeit (Distanz in der 6-Minuten-Gehstrecke, Verbesserung der Dyspnoe und der NYHA-Klasse) sowie hämodynamischer Parameter feststellen können. Bosentan konkurriert mit Gallensalzen um die Exkretion aus der Leberzelle. Dieser Umstand ist zu erwähnen, da unter Bosentantherapie bis zu 10% des Patientenkollektivs eine Erhöhung

der Aminotransferasen aufwiesen und damit eine dosisabhängige Lebertoxizität beim klinischen Einsatz zu bedenken ist. Die Erhöhung der Transferasen ist meist reversibel. Nach Dosisreduktion bzw. Absetzen ist innerhalb von Tagen mit einer Normalisierung der Leberenzyme zu rechnen<sup>94</sup>. Eine Weiterführung der bestehenden Therapie dagegen kann zu einer akuten toxischen Hepatitis bis hin zum fulminanten Leberversagen führen. Dieser Umstand begründet die Notwendigkeit einer Überwachung der Leberfunktionswerte im Monatsrhythmus.

In Folge der Dosisreduktion oder es Absetzten müssen alternative Medikamente eingesetzt werden.

Andere Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit, Flush-Symptomatik, Kopfschmerzen, Ödembildung und Anämie treten ebenfalls in Abhängigkeit von der Dosis auf. Auch kann sich die gewollte Vasodilatation systemisch in Form einer Hypotonie mit Schwindel darstellen. Auch sind Interaktionen mit anderen Medikamenten bekannt, so ist unter Bosentan meist eine Erhöhung der Dosis für orale Antikoagulation mit Warfarin erforderlich<sup>95;96</sup>. Eine Therapie in der Schwangerschaft ist aufgrund der teratogenen Eigenschaft des Bosentans kontraindiziert<sup>97</sup>.

Das Tezosentan (5-Isopropyl-Pyridin-2-Sulfat-6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2-(2-1H-tetrazol-5-yl-Pyridin-4-yl)-Pyrimidin-4-ylamide Na) ist ebenso wie das Bosentan ein dualer ET<sub>A</sub>, allerdings befindet es sich noch in klinischer Erprobung für Formen der akuten Herzinsuffizienz. Das Molekulargewicht liegt bei 649,6. Im Gegensatz zum Bosentan ist das Tezosentan aufgrund seines pH-Wertes für die intravenöse Therapie geeignet (pKs 4,4/4,1). Tezosentan hat eine höhere Affinität zum ET<sub>A</sub> als zum ET<sub>B</sub>-Rezeptor<sup>98</sup>. Das Nebenwirkungsprofil ist ähnlich dem Bosentan, hepatotoxische Effekte sind auch für Tezosentan beschrieben und können zur Dosisreduktion oder Absetzten zwingen.

Ein Vorteil könnte ein geringeres Ausmaß an Interaktionen mit anderen Medikamenten sein<sup>99</sup>. Des Weiteren legt die intravenöse Applikation einen Einsatz in der Intensivmedizin nahe<sup>100</sup>.

Im Gegensatz zu Bosentan und Tezosentan handelt es sich bei Sitaxentan und bei Ambrisentan um zwei selektive ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten.

Die Wirksamkeit des hochselektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten Sitaxentan wurde im Rahmen von zulassungsrelevanten Studien (STRIDE-1 und 2) untersucht und aufgezeigt<sup>101</sup>.

Vorteilhaft ist die bei Sitaxentan seltener auftretende Erhöhung der Transaminasen im Vergleich zum Bosentan. Eine Wechselwirkung mit oralen Antikoagulantien führt meist zur Notwendigkeit der Dosisreduktion, was vor allem bei Therapiebeginn zu beachten ist.

Das zur Therapie der PAH in den Funktionsklassen II und III zugelassene Ambrisentan ist ein ebenfalls selektiver ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist und zeigte im Rahmen der Studien ARIES-1 und -2 eine gute therapeutische Wirksamkeit. Die Lebertoxizität ist gegenüber Bosentan und Sitaxentan deutlich geringer, was auf seine unterschiedliche chemische Struktur zurückgeführt wird<sup>102</sup>.

## **1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Trotz enormer Fortschritte in der Erforschung von Behandlungsoptionen für Patienten mit PH wurden bisher nur graduelle Verbesserungen der Belastbarkeit und Lebensqualität, wahrscheinlich auch der Überlebenszeit erzielt. Eine Heilung ist bei weitem nicht erreicht. Dies lässt Raum für die Erforschung alternativer Verfahren. Aufgrund der Tatsache, dass die oben beschriebenen ETRA ihre positiven Wirkungen in unterschiedlichen Tiermodellen und klinischen Untersuchungen unter Beweis gestellt haben, aber die teils starken Nebenwirkungen eine höhere Dosierung für den Patienten verbieten, ist eine alternative Applikationsform zur systemischen in unser Interesse gerückt. Zum anderen kann möglicherweise eine Dosisersparung durch die wirkortspezifische Deposition erreicht werden. Gerade auch vor dem Hintergrund, dass der inhalative Applikationsweg für Prostanoiden sich als vorteilhaft herausgestellt hat.

Da das Modell der akuten pulmonalen Hypertonie bei der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge bereits als etabliert gilt, jedoch noch keine uns bekannte Arbeit die Applikationsform der ETRA via Aerosolisierung untersucht hat, wurde dieses Thema in der hier vorliegenden Schrift bearbeitet.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen werden folgende Ziele verfolgt:

1. Charakterisierung der Effekte von ETRA mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität im Modell der ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie.
2. Nachweis der Machbarkeit der inhalativen Applikation von ETRA.
3. Vergleich der ETRA-Wirkcharakteristika bei systemischer versus inhalativer Applikation.
4. Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

## **2. Methodik**

### **2.1 Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten**

#### **Kaninchenlunge**

##### **2.1.1 Beschreibung des Organmodells**

Das Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge ist ein etabliertes Verfahren zur Erforschung von pathophysiologischen Vorgängen in der Lunge, welches schon zahlreich in der Literatur beschrieben wurde<sup>103;104</sup>. Dieses Versuchsmodell erlaubt die Durchführung von Untersuchungen am Modellsystem ohne störende oder beeinflussende metabolische, humorale oder zentrale Einflüsse.

Die in den Versuchsreihen beobachteten und registrierten Parameter waren zum einen der pulmonalarterielle Druck (PAP), der linksventrikuläre Druck (LVP) und der Ventilationsdruck (VP). Zudem erfolgte die Registrierung der relativen Gewichtsveränderung, als Zeichen einer Ödementwicklung.

Auch das angewandte Aerosolisierungssystem, welches in einem Teil der Versuchsreihe genutzt wurde, ist bereits beschrieben worden<sup>105</sup>.

##### **2.1.2 Präparation / Organentnahme**

Das Herz-Lungenpaket wurde von Kaninchen der Rasse New Zealand White Bastard entnommen. Das Gewicht der Kaninchen lag zwischen 2,3 kg-2,6 kg.

Zu Beginn des Versuchs wurde eine Ohrvene des Kaninchens mit einer Hohlnadel (Butterfly) punktiert. Der Butterfly-Zugang übernahm die Funktion einer Venenverweilkanüle und wurde am Ohr fixiert. Über diese Kanüle wurde die Narkose mit Ketamin (30-50 mg/kg KG) und Xylazin (6-10 mg/kg KG) eingeleitet. Die Sedierungstiefe wurde so gewählt, dass das Tier zwar ruhig atmete und keinerlei Aufregung zeigte, jedoch die Spontanatmung zunächst erhalten war. In diesem Zustand wurde das Tier auf dem Operationstisch fixiert. Es folgte eine Antikoagulation mittels 1000 I.E. Heparin-Natrium (Braun, Melsungen, Deutschland). Bei kontinuierlicher Vertiefung der Sedierung folgte eine Lokalanästhesie in einem vorher frei rasierten Bereich prätracheal mit 10 ml Xylocain (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland). Bei Sicherstellung einer ausreichenden Analgesie wurde nun im Bereich der Lokalanästhesie

das Gewebe prätracheal entfernt und der darunter liegende Bereich der Trachea freigelegt. Nun wurde eine Tracheotomie durchgeführt und ein Tubus (Innendurchmesser 3 mm) eingeführt. Es folgte die Beatmung des Tieres mittels eines Kleintierventilators (Harvard Kleintierbeatmungspumpe „UB 6025“, Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland) mit einer Atemfrequenz von 30 Atemzügen/min und einem Atemzugvolumen von 9-13 ml/kg. Nach Rasur im Bereich des Abdomens, des Thorax und der Halsregion erfolgte die Durchführung einer Laparotomie von kaudal. Die Gesamtdosis der Narkose belief sich auf ca. 150-200 mg Ketamin.

Es erfolgte zunächst die sorgfältige Präparation von Haut und Muskulatur und anschließend die Eröffnung des Abdomens im epigastrischen Winkel. Die weitere Schnittführung erfolgte entlang der Rippenbögen unterhalb des zuvor freigelegten Diaphragmas. Nun wurde die Fixierung des Diaphragmas am Processus Xyphoideus vorgenommen und das Diaphragma entlang der Rippenbögen abgetrennt. Danach wurde die Thoraxhöhle von kaudal eröffnet und eine mediane Sternotomie durchgeführt. Die beiden Thoraxhälften wurden fixiert.

Nach stumpfer Entfernung des Thymus und nachfolgender Eröffnung des Perikards wurde die Herzspitze mittels Pean-Klemme fixiert und unter leichten Zug gebracht. Somit waren A. pulmonalis und Aorta ascendens gut darstellbar. Anschließend wurde sowohl die A. pulmonalis als auch die Aorta ascendens mittels Pinzette vorsichtig unterfahren und mittels Zwirnsfaden umschlagen. Bei weiterhin schlagendem Herzen wurde nun die A. pulmonalis inzidiert und mit dem dafür vorgesehene Katheter kanüliert. Eine Ligatur der Aorta ascendens wurde ebenso wie die Entlastung des linken Herzens zur Vermeidung einer pulmonalen Stauung durch Entfernung der Herzspitze vorgenommen. Der Tod des Versuchstieres war ab diesem Zeitpunkt eingetreten. Ebenfalls ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Perfusion der A. pulmonalis und damit der Lunge mit Krebs-Henseleit-Puffer mit 4 Vol % Hydroxyethylstärke (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) mit einer durch ein Kühlsystem herbeigeführten Temperatur von 4 Grad Celsius. Die Perfusion wurde durch eine Rollerpumpe („MCP Standard“ Ismatec, Wertheim, Deutschland) mit einem pulsatilen Flow von 40 ml/min bewerkstelligt. Zusätzlich erhielt das Modell nun mit Beginn der artifiziellen Perfusion eine Zumischung von 4 % CO<sub>2</sub> zur ventilierten Raumluft zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH zwischen 7,32 und 7,36.

Anschließend wurde das gesamte Organpaket inklusive Herz, Lungen, Ösophagus und Aorta aus dem Thorax präpariert. Nach Einhängen des Organpaketes an einem Stativ wurde nun überschüssiges Bindegewebe, Fettgewebe, Ösophagus sowie die Aorta entfernt. Es erfolgte die Freilegung der Bifurkation der A. pulmonalis sowie Entfernung des rechten Ventrikels.

Nach Ligatur des linken Herzohrs und Entfernung der Mitralklappe erfolgte die Einlage eines Katheters in den linken Ventrikel und Fixierung desselben mittels Tabaksbeutelnaht. Das Perfusat floss nun ausschließlich über den eingenähten Katheter. Der Durchmesser des in die A. pulmonalis eingeführten Katheters betrug 3 mm, der eingeführte Katheter im linken Ventrikel besaß einen Durchmesser von 4 mm.

Das gesamte Herz-/Lungenorganpaket wurde nun in ein System eingebaut, welches sicherstellt, dass alle Schläuche und Messkatheter frei hängend die Dynamik des Systems nicht beeinflussen. Dabei wurde das Organ direkt an eine Kraftübertragung zur Registrierung des Gewichts angebracht und von einem gläsernen Thorax mit Doppelwand zur Erwärmung und Erhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit und zum Schutz des Organs umgeben. Der linksventrikuläre Katheter wurde nun mit dem Perfusionssystem in Verbindung gebracht, so dass eine kontinuierliche Rezirkulation des Perfusats gegeben war. Der LVP wurde dabei auf einen Wert zwischen 1,1 und 1,5 mmHg gesetzt (Referenzpunkt Lungenhilus), um Verhältnisse einer Westzone III in den endexpiratorischen Phasen zu simulieren. Es wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1-1,5 cmH<sub>2</sub>O eingestellt.

Es erfolgte nun die Steigerung der Flussrate vom Ausgangswert 40 ml/min bis zum Zielwert von 100 ml/min. Währenddessen wurde das Perfusat innerhalb des Systems durch die Apparatur der doppelwandigen Vorratsgefäße und den doppelwandigen Thorax mittels Wärmepumpe („DC 5“ ,Haake, Karlsruhe, Deutschland) bis auf eine Temperatur von 37 Grad Celsius erwärmt. Eine repetitive Bestimmung des pH wurde vorgenommen (Zielwert des pH 7,34-7,4).

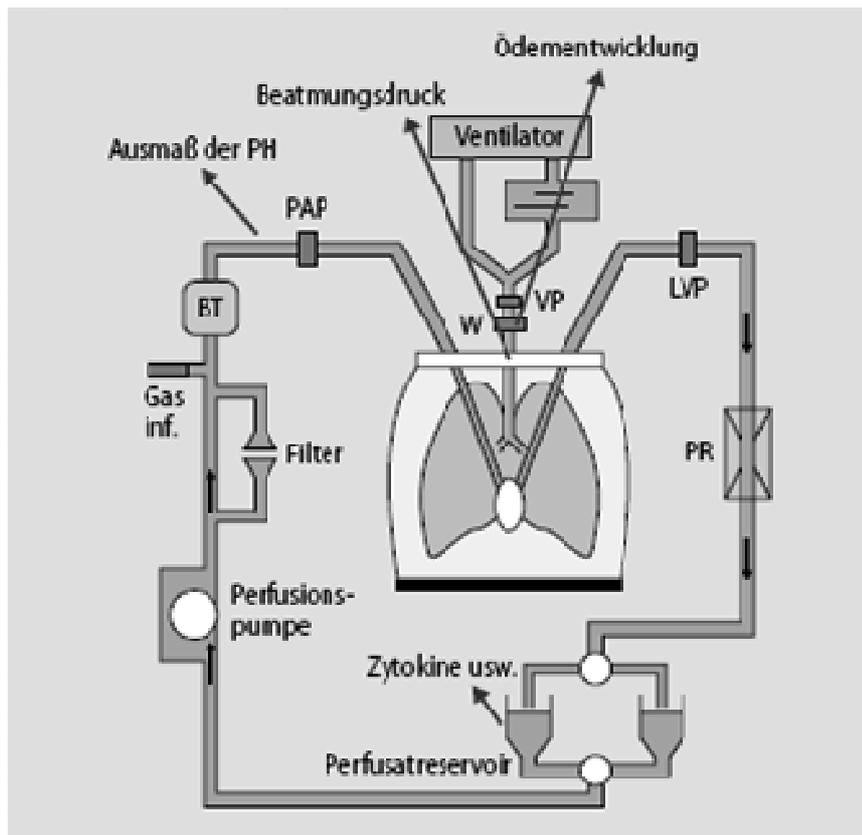
Einschlusskriterien für die Verwendung der Organe waren deren homogene weiße Oberfläche sowie kein Nachweis von Atelektasen oder Infiltraten. Vorher als krank erkannte Tiere wurden für unsere Studien nicht verwendet.

### **2.1.3 Beschreibung des Perfusionssystems (Abb.2.2.1.3)**

Die Perfusion während des Versuches wurde durch eine Rollerpumpe mit pulsatilem Flow von 100 ml/min gewährleistet (Rollerpumpe „MCP Standard“ (Ismatec, Wertheim, Deutschland). Das Perfusionssystem bestand aus folgenden Komponenten: Basis waren zwei doppelwandige Glasbehälter, welche untereinander zum einen mit dem System zur Erwärmung bzw. Kühlung des Perfusats, zum anderen mit dem Perfusionssystem selbst verbunden waren. Aus dem Zusammenschluss dieser beiden Gefäße führte ein Schlauch zur Rollerpumpe. Zwischengeschaltet war hier ein Filter („Iso-Gard Filter S“, Hudson RCI, High

Wycombe, England) zur Säuberung des zirkulierenden Perfusats. Die Auswaschphase bestand dabei aus der Spülung des Systems bzw. des Organs während der Erhöhung des Flows. Das Perfusat gelangte dabei aus dem ersten Gefäß in das Perfusionssystem und wurde über das zweite Gefäß nach Passage der Lunge verworfen.

Hinter der Rollerpumpe befand sich nachgeschaltet eine Blasenfalle, um etwaige Luftembolien zu vermeiden. Nun folgte das in die Pulmonalarterie kanülierte Schlauchsystem inklusive Messkatheter, welcher die Perfusion der Lunge leistete. Nach Passage der Lungenstrombahn gelangte das Perfusat über die Pulmonalvenen in den in das linke Herz eingelegten Katheter. Von hier aus folgte ein Schlauchsystem mit Überlauffunktion zur Regulierung des Widerstandes und dem Messkatheter zur Aufnahme des LVP. Dieses System mündete anschließend im zweiten Glasgefäß. Nach Beendigung der Auswaschphase erfolgte im zweiten Gefäß die Sammlung des zirkulierenden Perfusats bis zu einem Volumen von 300 ml, mit welchem dann die erste Rezirkulation (Dauer von 10 Minuten) betrieben wurde. In dieser Zeit wurde das erste Gefäß mit Perfusat gefüllt und nach Ablauf der ersten Rezirkulation wurde das Perfusionssystem aus dem ersten Gefäß mit frischem, sauberem Perfusat gespült. Diese zweite Rezirkulation dauerte ebenfalls wiederum zehn Minuten an. Nach diesem Zeitraum war dann ein stabiler steady state erreicht, was unserem Versuchsbeginn gleichgesetzt wurde. Das Volumen zur Auswaschung des Systems betrug ein Liter. Das Volumen, welches sich während einer Rezirkulation bzw. auch während des Versuches innerhalb des Perfusionssystems befand, betrug dabei 300 ml.



*Abb.2.1.3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus;  
 Erklärung: BT= Blasenfalle, PAP= Pulmonalarterieller Druck, W= Gewicht,  
 VP= Ventilationsdruck, LVP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck;*

### **2.1.4 Beschreibung des Beatmungssystems**

Die Beatmung des Tieres bzw. des Organs erfolgte mit einem Harvard-Kleintierventilator (Ventilator Typ UB 6025, Hugo Sachs Elektronik) volumenkontrolliert.

Die Atemfrequenz wurde dabei auf 30 Atemzüge pro Minute eingestellt. Dazu wurde ein Atemzugvolumen von 27-30 ml eingestellt. Das Verhältnis von Inspiration zu Expiration betrug 1:1. Zusätzlich wurde zu Beginn des Versuchs ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1-1,5 cmH<sub>2</sub>O vorgegeben. Nach Unterbrechung der normalen Hämodynamik des Tieres durch Start der künstlichen Perfusion wurden 4 % CO<sub>2</sub> zum Raumluftgemisch zugeführt, um den pH des Perfusats von 7,34 bis 7,4 aufrecht zu halten.

### **2.1.5 Aufbau des Aerosolisierungssystems**

Die inhalative Verabreichung von NaCl 0,9% und den unterschiedlichen ET-Rezeptorantagonisten erfolgte über einen Ultraschallvernebler (Schill Multisonic, Schill Medizintechnik, Probstzella, Deutschland), der für den Verabreichungszeitraum in den Inspirationsschenkel des Beatmungssystems eingebracht wurde. Der Vernebler produzierte ein Aerosol mit einer mittleren Teilchengröße von  $4\ \mu\text{m}$  bei einer geometrischen Standardabweichung von  $1,6\ \mu\text{m}$ . Die absolute Aerosoldeposition wurde von Schmehl und Mitarbeitern<sup>105</sup> in einem vergleichbaren Modell bestimmt und betrug ca.  $25\pm 0,02\%$ . In weiteren Experimenten in unserem Modell mit einer Filtertechnik produzierte dieser Vernebler eine konstante Aerosoldepositionsfraktion von ungefähr 0,22 (0,22 mg bei 1 mg vernebelter Substanz).

### **2.1.6 Registrierung physiologischer Messgrößen**

Das relative Gewicht des gesamten Organmodells wurde kontinuierlich mittels Kraftübertragung an eine elektronische Wägezelle erfasst (Hottinger Baldwin Messtechnik). Das registrierte Signal wurde mittels Messverstärker (Scout55, Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt) aufgezeichnet.

Die Druckmessung des PAP, des LVP und des VP erfolgte jeweils über Polyethylen-Innenkatheter, welche sich innerhalb des Perfusionssystems bzw. des Beatmungssystems befanden.

Im Falle des Perfusionssystems waren die Innenkatheter mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt. Die Innenkatheter waren jeweils mittels konventioneller Druckmessleitungen mit Stathamdruckwandlern („Single-Use-Pressure-Transducer“, Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden. Die Druckaufnehmer waren zu Beginn mit Aquadest gespült und so von störenden Luftblasen beseitigt worden.

Perfusatproben konnten jederzeit sowohl über den pulmonalarteriellen als auch über den pulmonalvenösen Innenkatheter entnommen werden. So wurde eine regelmäßige Perfusatprobe zur Bestimmung des pH sowie zur Bestimmung der Oxygenierungsverhältnisse vorgenommen. Die Perfusatproben wurden dabei durch ein Blutgasanalysegerät (ABL 500, Radiometer Copenhagen, Willich-Schiefbahn) durchgeführt. Die Gewichts- und Druckregistrierung wurde über einen PlugSys-Transducer („PLUGSYS-DBA“, Hugo Sachs

Elektronik) mit Anschluss an einen PC über eine AD-Wandlerkarte (Dicision via Harvard Apparatus, Holliston, USA) realisiert.

## **2.2 Modell der ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie**

### Modell der ET-1 induzierten PH und Einteilung der Versuchsgruppen:

- *Kontrollgruppe:*

In der Kontrollgruppe wurde nach einer Vorlaufzeit (steady state) von 30 Minuten ein Beobachtungszeitraum von weiteren drei Stunden ohne zusätzliche Intervention eingehalten.

- *ET-1 induzierte PH*

Nach einer stabilen Vorlaufphase von 30 Minuten wurde ET-1 in das Gefäßsystem der Lunge in Form einer Bolusgabe intravaskulär appliziert. Die ET-1 Konzentration innerhalb des Systems betrug nach Applikation 0,1  $\mu\text{M}$ . Dieser Zeitpunkt der Applikation wurde als  $t_0$  definiert. Der Beobachtungszeitraum nach Applikation betrug 120 Minuten ohne weitere Intervention.

- *Dosis-/Wirkungskurven*

Bei den Versuchen zur Dosis-/Wirkungskurve erfolgte die Gabe kumulativer Dosen der jeweiligen Substanz in der Plateauphase der ET-1 induzierten PH, ab dem Zeitpunkt  $t_{60}$  im Abstand von jeweils 30 Minuten. Dabei wurden ansteigende Dosierungen der entsprechenden ETRA von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  sowie 10  $\mu\text{M}$  verabreicht und der maximale Effekt jeweils nach 30 Minuten registriert.

- *Intravasale Applikation der ETRA bei ET-1-induzierter PH:*

Bei den Versuchsgruppen mit zusätzlicher Intervention in Form der intravasalen Applikation eines ETRA (BQ 788, BQ 123, Tezosentan) wurden diese zum Zeitpunkt  $t_{15}$ , also 15 Minuten nach ET-1-Gabe durchgeführt. Die Applikation erfolgte in Form einer Bolusgabe. Die Registrierung der genannten Parameter erfolgte für weitere 105 Minuten (bezogen auf die ET-1 Verabreichung) bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$ .

- *Aerosolisierung der ETRA bei ET-1-induzierter PH :*

Bei den Versuchsgruppen mit zusätzlicher Intervention in Form der Aerosolisierung eines ETRA (BQ 788, BQ 123, Tezosentan) erfolgte die Aerosolisierung zum Zeitpunkt  $t_{15}$  (analog zum Versuchsablauf der systemischen Applikation) für 15 Minuten (entsprechend dem Zeitraum  $t_{15}$  bis  $t_{30}$ ). Die übrige Aufzeichnung erfolgte analog zu den systemischen Interventionsversuchen.

### 3. Experimenteller Teil

#### **3.1 Untersuchungen zur Beeinflussung der Hämodynamik, den Ventilationsdruck und die Ödementwicklung in der Endothelin-1 induzierten pulmonalen Hypertonie.**

Zur Bearbeitung der unter Punkt 1.4 gestellten Fragestellungen nutzten wir das Modell der ET-1-induzierten pulmonalen Hypertonie in der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge.

Folgende Versuchsgruppen wurden definiert:

- *Kontrollgruppe, n=6*

In dieser Versuchsgruppe wurde keine Intervention unternommen.

- *ET-1 induzierte PH, n=6;*

In dieser Versuchsreihe wurde nach einer Beobachtungsphase von 30 Minuten (steady state) ET-1 (Fa. Calbiochem) dem System via Applikation mittels Pipette zugeführt (Konzentration 1µM). Ziel war in dieser Versuchsreihe ein pulmonalarterieller Druck von 24-26 mmHg, welcher sich über einen Zeitraum von zwei Stunden nach Applikation auf stabilem Plateau befindet. Innerhalb des Systems befand sich ein Volumen von 300 ml Krebs-Henseleit-Lösung. Zur Herstellung der verwendeten Lösung wurden 0,1 mg ET-1 in 12,5 µl 80 %-iger Essigsäure gelöst und mit 187,5 µl Aqua verdünnt.

- *Dosis-Wirkungskurven der unterschiedlichen ETRA im Modell der ET-1 induzierten PH, n=12 (jeweils n=4)*

Es wurden für BQ-788, BQ-123 und Tezosentan Dosis-Wirkungskurven erstellt (jeweils n=4). Nach Etablierung einer stabilen ET-1 induzierten PH (Plateauphase, 60 Minuten nach ET-1-Applikation) erfolgte die Gabe des entsprechenden ETRA in aufsteigender Dosis (0.1, 1, und 10 µM) in das Perfusat. Der maximale Effekt wurde jeweils nach 30 Minuten nach Applikation registriert.

- *ET-1 induzierte PH mit intravasaler Gabe von BQ 123, n=4*

In dieser Versuchsreihe wurde zunächst die steady state Phase über einen Zeitraum von 15 Minuten abgewartet. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde wie in den Baselineversuchen beschrieben die genannte ET-1- Dosis verabreicht. Nach weiteren 15 Minuten wurde dann die systemische Applikation des ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 123 via Pipette in das Reservoirbehältnis vorgenommen. Die applizierte Menge betrug dabei 250 µg BQ 123 gelöst in 250 µl NaCl 0,9% entsprechend 1µM. Die kontinuierlich registrierten Parameter wurden für weitere 90 Minuten aufgezeichnet.

- *ET-1 induzierte PH mit intravasaler Gabe von BQ 788, n=4*

Identisch zur oben beschriebenen Versuchsreihe wurde zunächst die steady state Phase über einen Zeitraum von 15 Minuten abgewartet. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde wie in den Baselineversuchen beschrieben die genannte ET-1 Dosis verabreicht. Nach weiteren 15 Minuten wurde dann die systemische Applikation des ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 788 via Pipette in das Reservoirbehältnis vorgenommen. Die applizierte Menge betrug dabei 200 µg BQ 788 gelöst in 200 µl NaCl 0,9% entsprechend 1µM. Die kontinuierlich registrierten Parameter wurden auch hier über weitere 90 Minuten registriert.

- *ET-1 induzierte PH mit intravasaler Gabe von Tezosentan, n=4*

In dieser Versuchsreihe wurde erneut die steady state Phase über einen Zeitraum von 15 Minuten abgewartet. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde folgte die ET-1-Applikation. Nach weiteren 15 Minuten wurde dann die systemische Applikation des dualen ET-Rezeptorantagonisten Tezosentan via Pipette in das Reservoirbehältnis vorgenommen mit der Konzentration von 1µM. Die kontinuierlich registrierten Parameter wurden über weitere 90 Minuten aufgenommen.

- *ET-1 induzierte PH mit Aerosolisierung von 0,9%iger NaCl-Lösung, n=6*

In dieser Versuchsreihe wurden die Versuche entsprechend den Baselineversuchen mit einem Beobachtungszeitraum von 15 Minuten begonnen. Nach Beobachtung eines stabilen Plateaus im genannten Zeitraum wurde mit der Aerosolisierung von NaCl 0,9% begonnen. Die Ausgangsmenge von aerosolisiertem NaCl betrug wiederum 2 ml. Das Aerosolisierungssystem wurde erneut vor und nach dem Versuch gewogen, um die inhalierte Substanzmenge zu errechnen. Die Aerosolisierung wurde für 15 Minuten durchgeführt und der Versuch für weitere zwei Stunden beobachtet.

- *ET-1 induzierte PH mit Aerosolisierung von BQ 123, n=6*

Die Aerosolisierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 123 wurde im gleichen Versuchsablauf wie die Aerosolisierung mit NaCl 0,9% durchgeführt. Auch hier wurde ein Zeitraum von 15 Minuten ohne jegliche Intervention gewählt, in welchem der PAP als stabil zu bezeichnen war. Nach 15 Minuten wurde dann die Aerosolisierung von 750 µg BQ 123 in 750 µl NaCl 0,9% begonnen. Diese Menge war mit 1250 µl NaCl 0,9% verdünnt worden (entsprechend 1,14µM), um eine gleichmäßige Aerosolisierung über einen Zeitraum von 15 Minuten gewährleisten zu können. Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Gewichtregistrierung des Aerosolisierungssystems vor und nach Aerosolisierung durchgeführt, um die aerosolierte Menge der Substanz errechnen zu können.

- *ET-1 induzierte PH mit Aerosolisierung von BQ 788, n=6*

Die Versuchsreihe betreffend der Aerosolisierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 788 wurde in gleichen Schritten wie der vorherige Versuch mit BQ 123 durchgeführt. Hier betrug die aerosolierte Menge an BQ 788 600 µg auf 600 µl NaCl 0,9% aufgelöst und zusätzlich 1400 µl NaCl 0,9% (entsprechend einer Konzentration von 1,14µM), um das Volumen von 2 ml zu erreichen. Die Berechnung der inhalierten Substanz erfolgte wiederum über die Registrierung des Gewichts vor und nach Inhalation.

- *ET-1 induzierte PH mit Aerosolisierung von Tezosentan, n=6*

Der Versuchsablauf ist den beiden vorher beschriebenen Versuchen identisch. Einzig die aerosolierte Substanz stellt hierbei den Unterschied. Hier wurden 585 µg (in 585 µl NaCl 0,9% gelöst) des dualen ETRA Tezosentan und zusätzlich 1415 µl NaCl 0,9% nach Ablauf der steady state-Phase über 15 Minuten aerosoliert (Konzentration von 1,16µM). Über Gewichtregistrierung des Aerosolisierungssystems erfolgte die Berechnung der aerosolierten Substanz.

### **3.2 Standardisierte Versuchsabläufe**

Grundsätzlich wurde bei allen Versuchen nach erfolgreicher Erhöhung des pulsatilen Flows auf 100 ml/min und Eichung der Messsysteme ein Wechsel des Perfusatmediums vorgenommen, um während der Präparation freigesetzte Zytokine und in der Folge ausgespülte korpuskuläre Bestandteile zu eliminieren.

In allen unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden die hämodynamisch relevanten Parameter PAP und LVP sowie der Beatmungsparameter VP kontinuierlich erfasst und aufgezeichnet. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Registrierung der relativen Gewichtsveränderung. Außerdem erfolgte in einem Abstand von maximal zehn Minuten eine Messung des aktuellen pH mit gleichzeitiger Kontrolle der Ventilationsparameter mittels Gasanalyse (ABL 500, Radiometer Kopenhagen).

### **3.3 Auswertung und Datenanalyse**

Die Messwerte wurden als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Für die primäre Datenanalyse erfolgte der Vergleich zwischen den ET-1- Kontrollversuchen und den Gruppen mit den intravaskulär verabreichten ETRA. Bei den Interventionsgruppen, bei denen die ETRA als Aerosol appliziert wurden, erfolgte der Vergleich mit der Gruppe der NaCl-Aerosol Reihe. Die weiteren Vergleichsgruppen sind im Text erwähnt. Für den Vergleich zwischen den Interventionsgruppen wurden die Zeitpunkte zum Ende der Aerosolgabe ( $t=45$ ) und zum Ende des Experiments verwendet. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse durchgeführt und mittels Bonferroni Prozedur korrigiert, sobald mehr als drei Vergleichsgruppen vorlagen. Beim Vergleich von weniger als drei Gruppen wurde die statistische Auswertung mittels gepaartem t-Test durchgeführt. Eine statistisch signifikante Beobachtung wurde bei einem  $p < 0.05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vergleichszeitpunkte (Abb. 4.1)

Beim Modell der ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie wurde das ET-1 nach Beendigung einer 15 minütigen Vorlaufphase appliziert ( $t_{15}$ ).

Bei den Versuchsgruppen mit zusätzlicher Intervention wurde diese zum Zeitpunkt  $t_{30}$ , also 15 Minuten nach ET-1-Gabe durchgeführt. Bei den Versuchsgruppen mit intravasaler Gabe eines ETRA wurden bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  kontinuierlich die Messwerte aufgezeichnet und im Folgenden im 15-Minuten-Takt ausgewertet. Bei Versuchsgruppen mit Intervention via Aerosolisierung dauerte diese weitere 15 Minuten bis zum Zeitpunkt  $t_{45}$  an, die Aufnahme der Messwerte erfolgte bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  mit Auswertung im 15-Minuten-Takt. Die kontinuierlich registrierte Gewichtsveränderung wurde im 15-Minuten-Intervall ausgewertet.

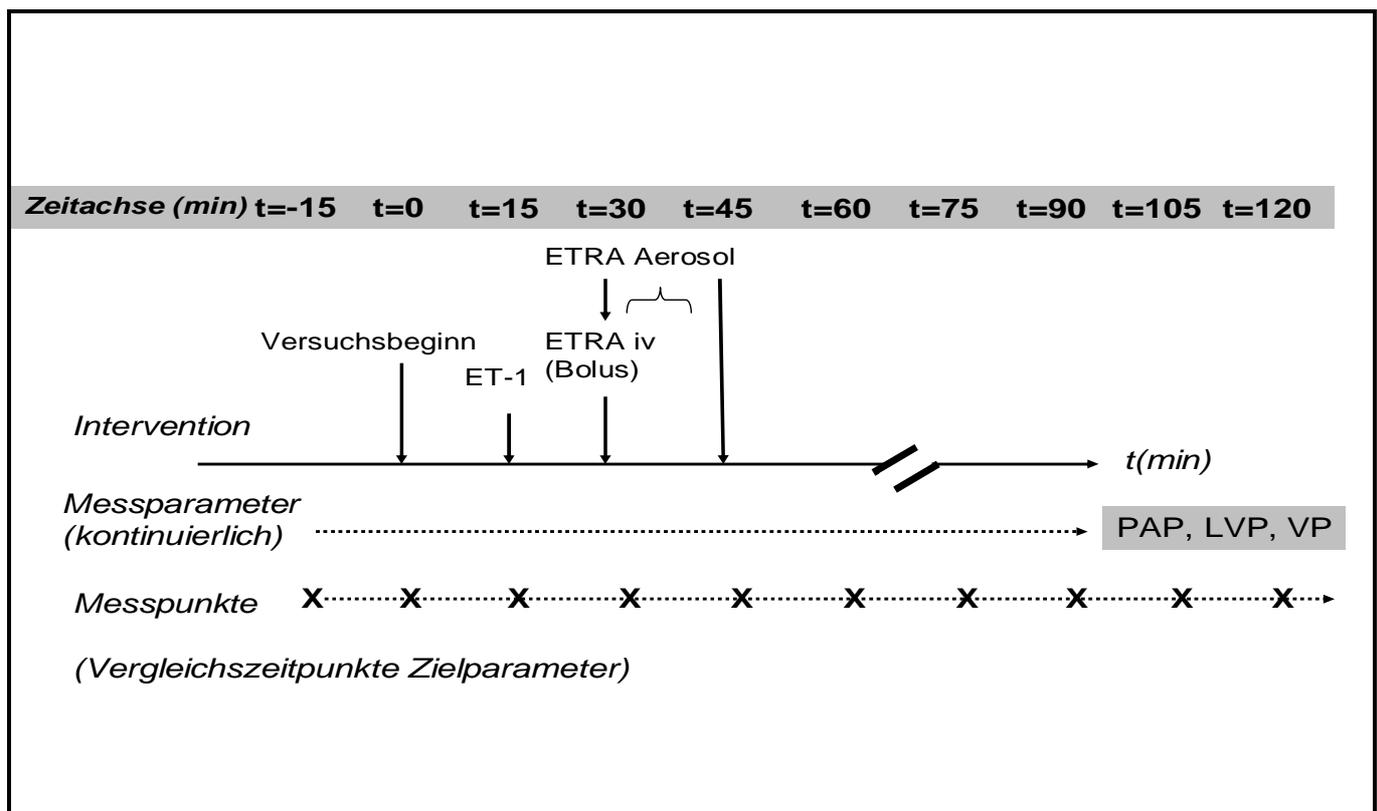


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Vergleichszeitpunkte;

$t=$  Zeit, PAP= Pulmonalarteriendruck, LVP= linksventrikulärer Druck, VP= Ventilationsdruck

## 4.2 Ergebnisse der Kontrollgruppe (Abb.4.2.)

In der Kontrollgruppe wurde nach einer Vorlaufzeit (steady state) von 15 Minuten ein Beobachtungszeitraum von weiteren drei Stunden ohne zusätzliche Intervention eingehalten. Während der gesamten Versuchsdauer wurden kontinuierlich die oben beschriebenen Parameter registriert und mindestens alle 30 Minuten eine Blutgasanalyse incl. pH-Messung durchgeführt. Innerhalb dieser Kontrollgruppe lagen die gemessenen PA-Drücke kontinuierlich zwischen 6 und 10 mmHg. Dabei zeigte sich ein stabiler Ventilationsdruck (mittlerer Ventilationsdruck zwischen 2 bis 6,5 mmHg). Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde allenfalls eine geringe Gewichtszunahme (0,2 g bis 0,8 g) registriert.

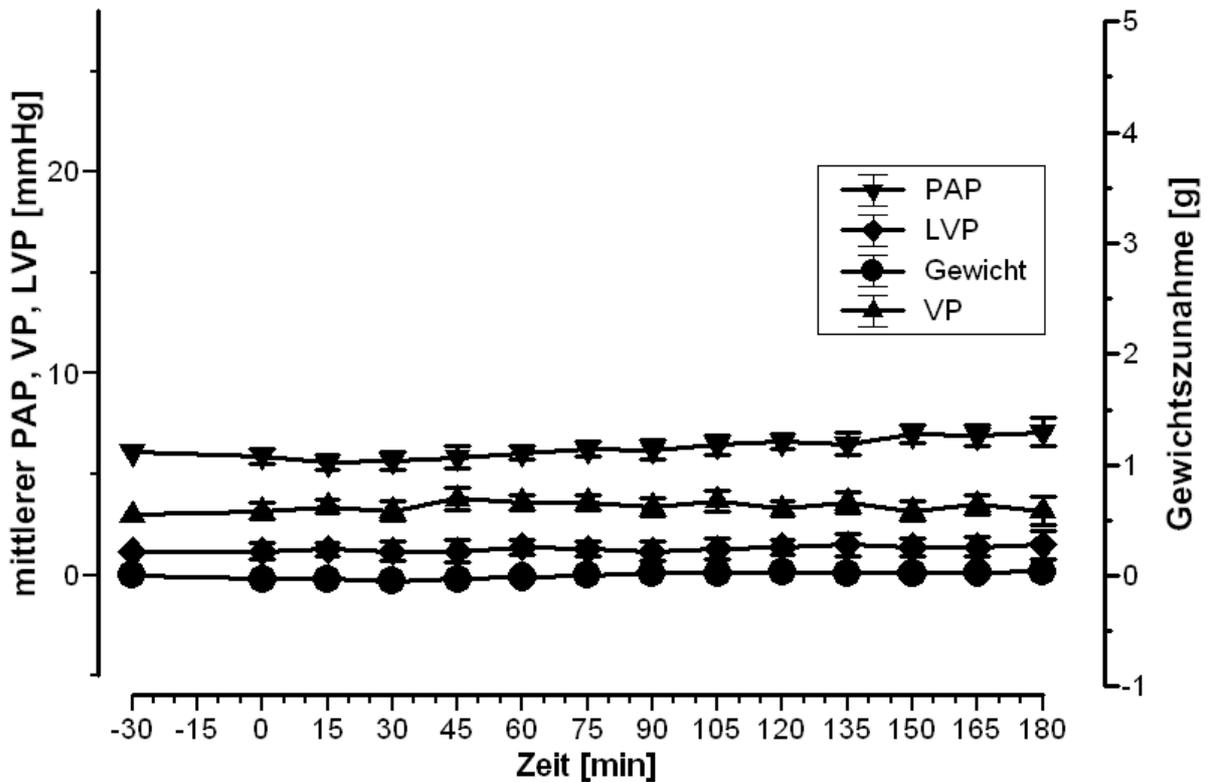


Abb.4.2 Graphische Darstellung von PAP, LVP, VP und Gewicht innerhalb der Kontrollversuche

### **4.3 Einfluss von ET-1 im Modell der isolierten Kaninchenlunge:**

- *Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) [Abb. 4.3]*

Nach 15-minütiger stabiler Vorlaufphase erfolgte die Applikation des ET-1 in das Perfusionssystem. Bei einem Ausgangswert von  $7,2 \pm 1,2$  mmHg stieg der PAP kontinuierlich an. Nach 15 Minuten erreichte dieser  $12,5 \pm 1,2$  mmHg, nach 30 Minuten  $15,7 \pm 2,5$  mmHg und nach 45 Minuten  $20 \pm 3$  mmHg und mündete nach 60 Minuten in einem Plateau ( $23 \pm 2$  mmHg). Dies blieb über weitere 60 Minuten stabil.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

Der Ventilationsdruck verhielt sich während der gesamten Versuchsdurchführung ohne signifikante Änderungen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Innerhalb dieser Versuchsreihe entwickelte sich über den gesamten Versuchszeitraum von 120 Minuten eine Zunahme des Gewichts von  $1,7 \pm 0,4$  g.

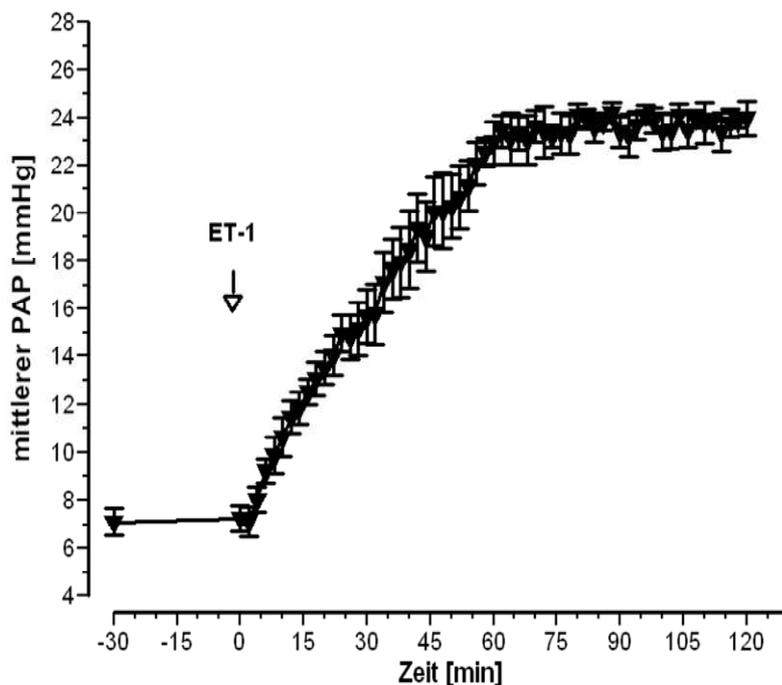


Abb.4.3 Modell einer ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie

#### 4.4 Dosis-Wirkungskurven intravaskulär verabreichter ETRA (Abb. 4.4)

Bei einer Konzentration von 0.1 $\mu$ M zeigte keiner der drei verschiedenen applizierten ETRA eine signifikante Wirkung auf die registrierten Parameter. Die Applikation von 1  $\mu$ M und von 10  $\mu$ M des BQ-788 führte zu einem dosisabhängigen Anstieg des mittleren PAP. Bei Applikation der 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M des BQ 123 und des Tezosentan zeigte sich eine signifikante Senkung des mittleren PAP.

Während dieser Dosis-Wirkungskurven zeigte sich in keinem der durchgeführten Versuche eine signifikante Veränderung des Ventilationsdruckes oder des Gewichts.

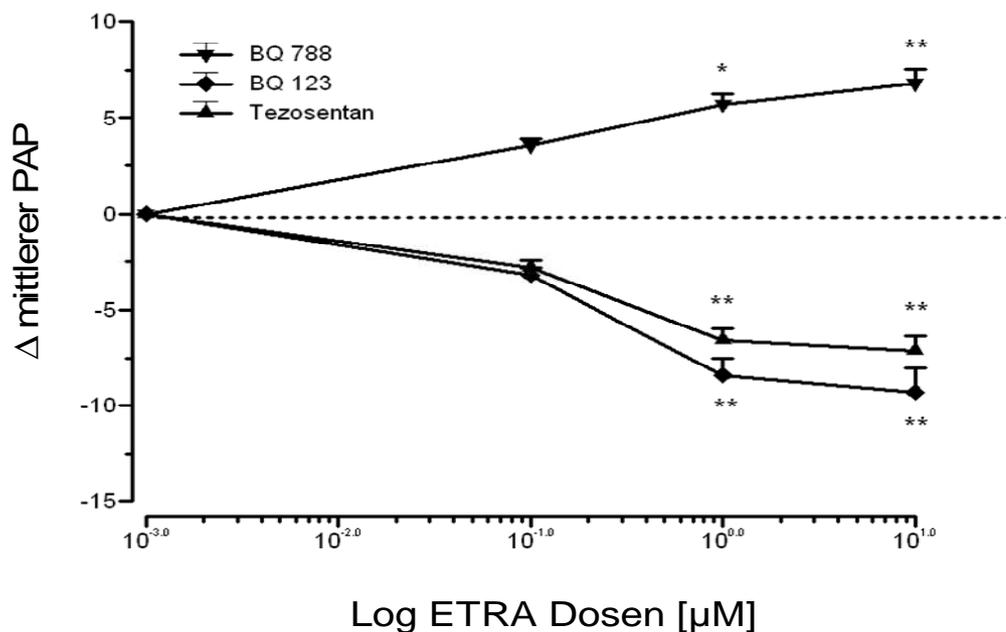


Abb.4.4 Dosis-Wirkungskurven kumulativer Dosen unterschiedlicher intravaskulär applizierter ETRA. (Logarithmische Darstellung der ETRA-Dosen [ $\mu$ M]).

\* $P < 0,05$

\*\* $P < 0,01$

## **4.5 Einfluss intravaskulär applizierter unterschiedlicher ETRA auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie**

### **4.5.1 vaskuläre Applikation des selektiven ETRA BQ 123**

- *Einfluss auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie (Abb. 4.5.1):*

15 Minuten nach Gabe des ET-1 ( $t_{15}$ ) wurde der selektive  $ET_A$ -Rezeptorantagonist BQ 123 intravasal in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  appliziert. Eine signifikante Veränderung in Form einer Senkung des registrierten PAP zeigte sich bereits zum Zeitpunkt  $t_{30}$  ( $p < 0,01$ ). Diese Drucksenkung war am Ende des Versuchs bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  nachweisbar.

Der maximale drucksenkende Effekt war zum Zeitpunkt  $t_{75}$  nachzuweisen und betrug  $13,3 \pm 0,7$  mmHg, das entspricht einer prozentualen Drucksenkung um ca. 58 Prozent gegenüber dem gemessenen PA-Druck im ET-1 Kontrollversuch.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck:*

Die Gabe des  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten BQ 123 bewirkte keine signifikanten Änderungen gegenüber den ET-1-Kontrollversuchen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung:*

Hinsichtlich der Zunahme des absoluten Gewichts von  $1,9 \pm 0,2$  Gramm über den gesamten Versuchszeitraum zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der Gewichtsentwicklung in den ET-1- Kontrollversuchen.

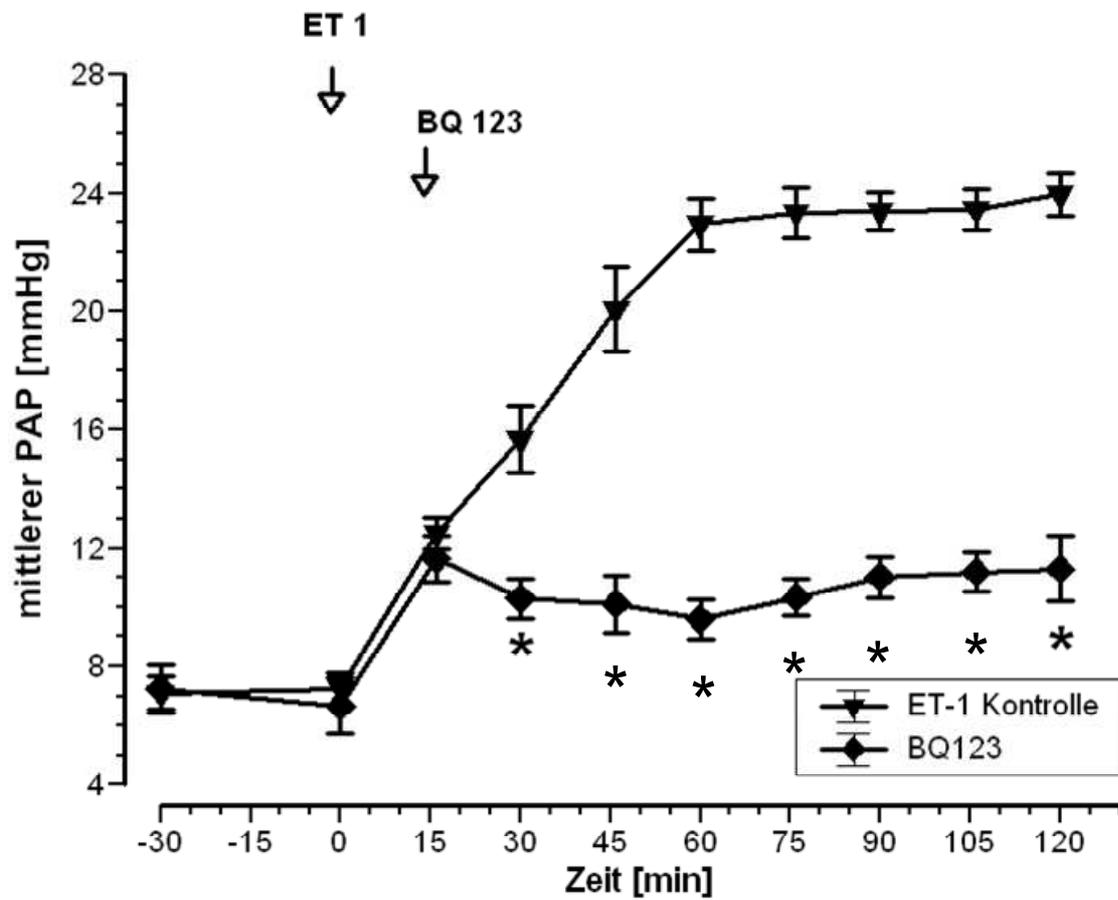


Abb. 4.5.1 Einfluss der intravasalen Applikation von BQ 123 auf den PAP im Vergleich zur Kontrolle.

\* $P < 0,01$  vom Messzeitpunkt  $t_{30}$  bis  $t_{120}$

#### **4.5.2 vaskuläre Applikation des selektiven ETRA BQ 788:**

- *Einfluss auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie ( Abb. 4.5.2)*

In Analogie erfolgte die Gabe von ET-1 nach 15-minütiger Vorlaufphase zum Zeitpunkt  $t_0$ . Der selektive  $ET_B$ -Rezeptorantagonist BQ 788 wurde zum Zeitpunkt  $t_{15}$  verabreicht. Eine signifikante Änderung des PA-Druckes in Form eines Anstiegs war zum Zeitpunkt  $t_{30}$  sowie zum Zeitpunkt  $t_{45}$  zu erkennen ( $p < 0,05$ ). Vom Zeitpunkt  $t_{75}$  bis zum Messzeitpunkt  $t_{105}$  zeigte sich weiterhin eine Steigerung des PA-Druckes, die zum Versuchsende ( $t_{120}$ ) noch signifikant war ( $p < 0,05$ ). Der maximale drucksteigernde Effekt zeigte sich zu den Zeitpunkten  $t_{90}$  mit einem absoluten Druckniveau bis 30 mmHg und einer Differenz zum maximalen Druck der ET-1-Kontrollversuche mit bis zu  $6,5 \pm 1,4$  mmHg. Das entspricht einer maximalen Drucksteigerung des PAP von 25 Prozent im Vergleich zu den ET-1-Kontrollversuchen.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

Die Gabe des  $ET_B$ -Rezeptorantagonisten BQ 788 erbrachte keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Ventilationsdruckes gegenüber den ET-1-Kontrollen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Über den Beobachtungszeitraum von 120 Minuten nahm das relative Gewicht der Lungen um  $2,0 \pm 0,1$  Gramm zu. Dies war nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den ET-1 Kontrollen.

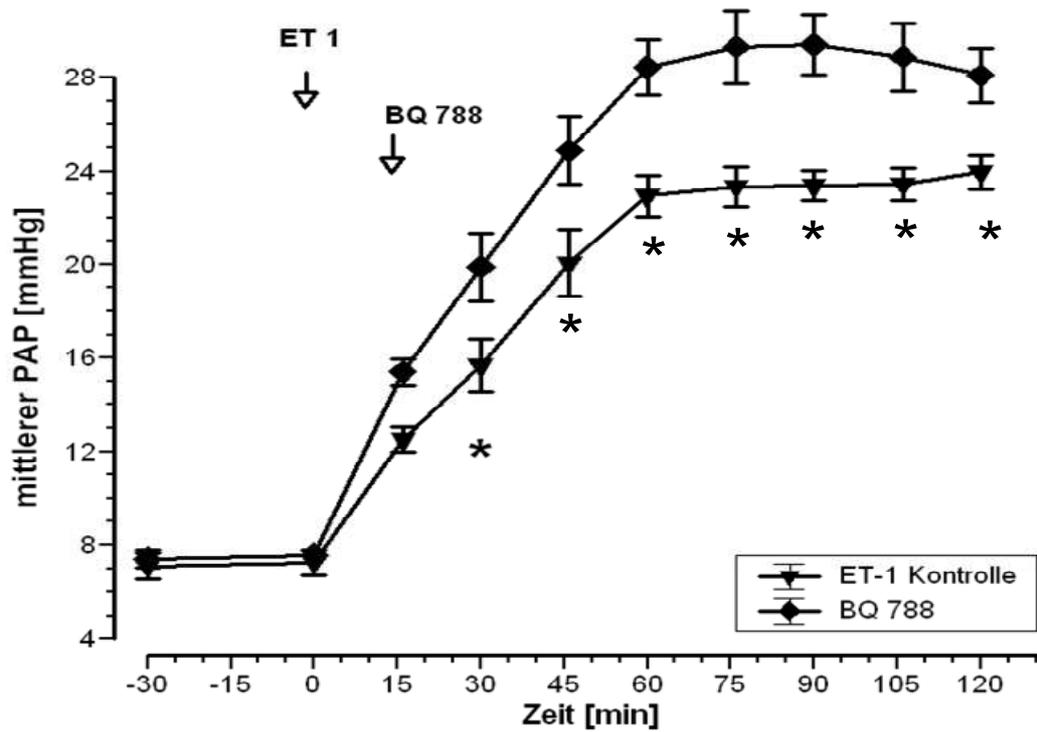


Abb. 4.5.2 Einfluss der systemischen Applikation von BQ 788 auf den PAP im Vergleich zur Kontrolle; \* $P < 0,05$  ab  $t_{30}$  bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$

### **4.5.3 vaskuläre Applikation des dualen ETRA Tezosentan**

- *Einfluss auf die ET-1-induzierte pulmonale Hypertonie ( Abb. 4.5.3):*

Nach 15-minütiger stabiler Vorlaufphase erfolgte die ET-1-Gabe wie in den ET-1-Kontrollversuchen zum Zeitpunkt  $t_0$ . Nach weiteren 15 Minuten erfolgte die systemische Gabe des Tezosentan ( $t_{15}$ ). Zum Zeitpunkt  $t_{30}$  war keine signifikante Veränderung zwischen den ET-1-Kontrollversuchen und den Tezosentanversuchen erkennbar. Ab dem Zeitpunkt  $t_{45}$  konnte eine deutliche Drucksenkung um  $7,1 \pm 1,5$  mmHg registriert werden, die bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  signifikant war ( $p < 0,01$ ). Der maximale Drucksenkungseffekt betrug  $12 \pm 1,9$  mmHg, entsprechend einer prozentualen Drucksenkung von ca. 50 Prozent.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

In dieser Interventionsgruppe zeigte sich nach Gabe des Tezosentan keine signifikant nachweisbare Veränderung auf den Ventilationsdruck gegenüber den ET-1-Kontrollversuchen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Die Zunahme des absoluten Gewichts von  $1,9 \pm 0,4$  Gramm zeigt keinen signifikanten Unterschied des Gewichts gegenüber den Ergebnissen der Gewichtsentwicklung innerhalb der ET-1-Kontrollversuchsreihe.

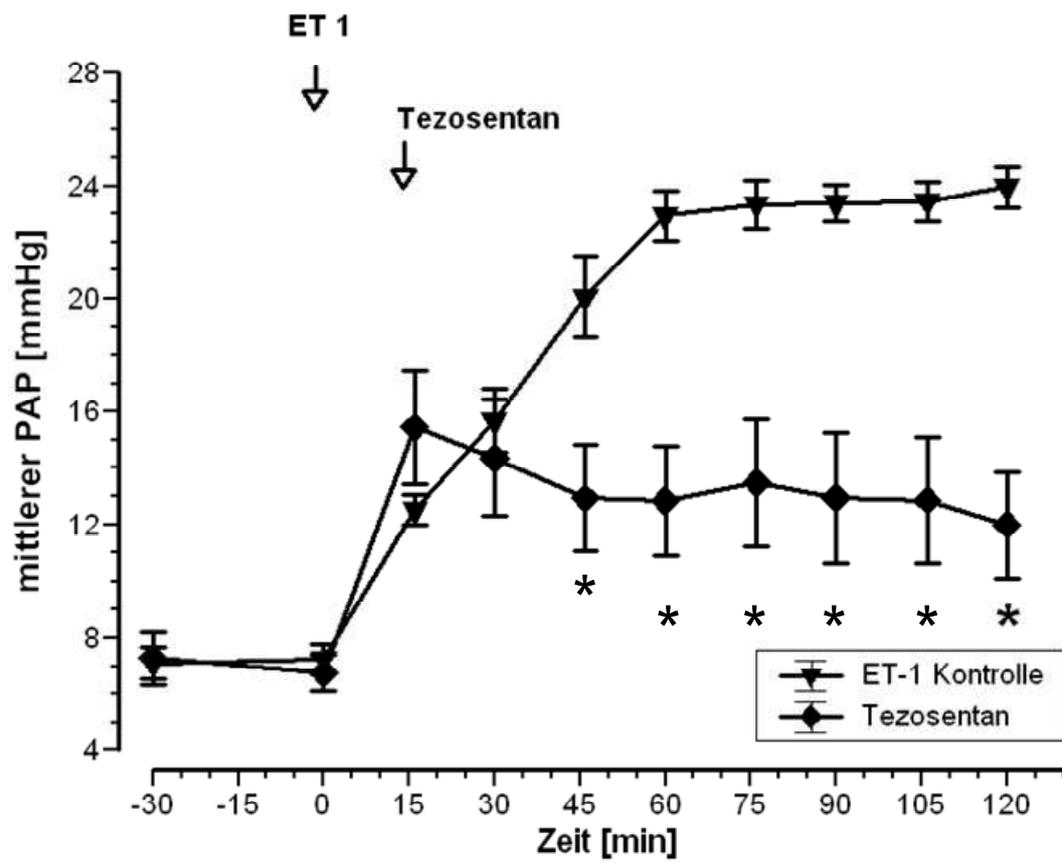


Abb. 4.5.3 Einfluss der systemischen Applikation von Tezosentan auf den PAP im Vergleich zur Kontrolle

\* $P < 0,01$  ab  $t_{45}$  bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$

## **4.6 Einfluss aerosolierter ETRA auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie**

Die Applikation der verschiedenen Substanzen als Aerosol erfolgte jeweils ab dem Zeitpunkt  $t_{30}$ . Die Gruppe der Versuche mit NaCl 0,9%-Aerosol wurde als Vergleichsgruppe für die Experimente mit den ETRA verwendet.

### **4.6.1 Kontrollgruppe: isotonische Kochsalzlösung (Abb.4.6.1)**

Analog zu der Versuchsreihe der intravasal applizierten Substanzen, erfolgte die Gabe von ET-1 zum Zeitpunkt  $t_0$ . Die Aerosolisierung von  $0,51 \text{ ml} \pm 0,02 \text{ ml}$  NaCl 0,9% erfolgte über 15 Minuten ab dem Zeitpunkt  $t_{15}$ . Weder während noch nach der Inhalation bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  zeigten sich signifikante Änderungen des PAP gegenüber der ET-1-Kontrollgruppe.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck im Modell der ET-1 induzierten pulmonalen Hypertonie*

Innerhalb dieser Versuchsreihe zeigte sich keine signifikante Änderung des Ventilationsdruckes im Vergleich zur ET-1-Kontrollgruppe.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Die Zunahme des Gewichts von  $1,8 \pm 0,2$  Gramm war nicht unterschiedlich im Vergleich zur Gewichtsentwicklung der ET-1-Kontrollen.

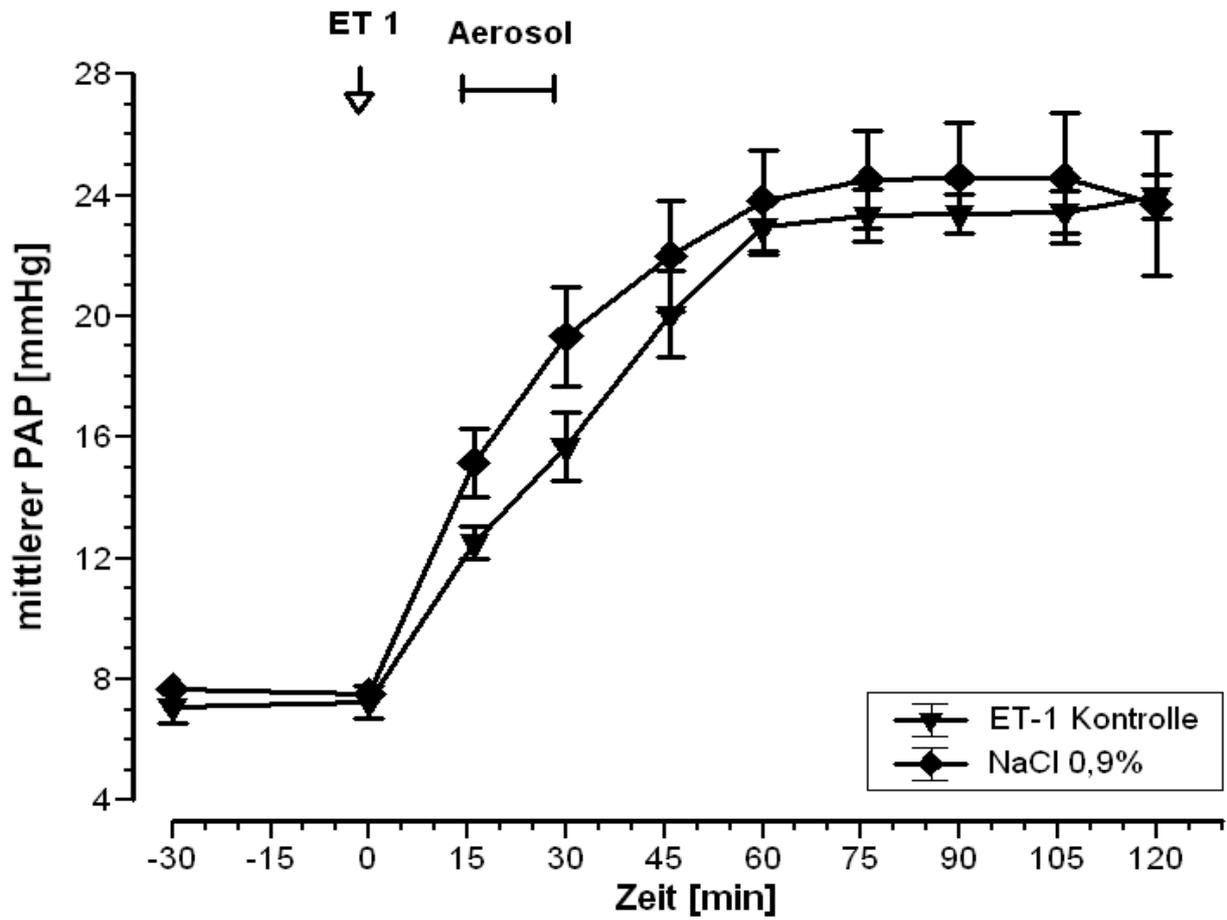


Abb. 4.6.1 Einfluss der Inhalation von NaCl 0,9% auf den PAP im Vergleich zur Kontrolle

#### **4.6.2 Aerosolisierung des selektiven ETRA BQ 123 (Abb. 4.6.2)**

- *Einfluss auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie*

Zum Zeitpunkt  $t_{15}$  erfolgte die Aerosolisierung des  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten BQ 123. Es wurden 750  $\mu\text{g}$  BQ 123 ad 1250  $\mu\text{l}$  isotoner Kochsalzlösung (entsprechend einer Konzentration von 1,14 $\mu\text{M}$ ) aerosolisiert. Im Vergleich zu den Versuchen mit NaCl 0,9%-Aerosol zeigte sich eine signifikante Senkung des pulmonalarteriellen Druckes zu den Zeitpunkten  $t_{30}$  ( $p < 0,05$ ),  $t_{45}$  ( $p < 0,01$ ),  $t_{60}$  und  $t_{75}$  ( $p < 0,05$ ). Zu den nachfolgenden Messzeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den pulmonalarteriellen Druck. Der maximale PAP-senkende Effekt ergab sich zum Messzeitpunkt  $t_{45}$  und betrug  $7,3 \pm 1,4$  mmHg entsprechend einer prozentualen Senkung von 33,2 %. Insgesamt konnte ein signifikanter PAP senkender Effekt über einen Zeitraum von 50 Minuten beobachtet werden.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

Innerhalb der Versuchsreihe zeigte sich keine signifikante Veränderung im Bereich des Ventilationsdruckes gegenüber den NaCl-Aerosolversuchen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Die Gewichtszunahme im Rahmen dieser Versuchsreihe betrug  $2,02 \pm 0,2$  Gramm über eine Versuchsdauer von 120 Minuten. Damit zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Gewichtsänderungen gegenüber den NaCl 0,9%-Aerosolversuchen.

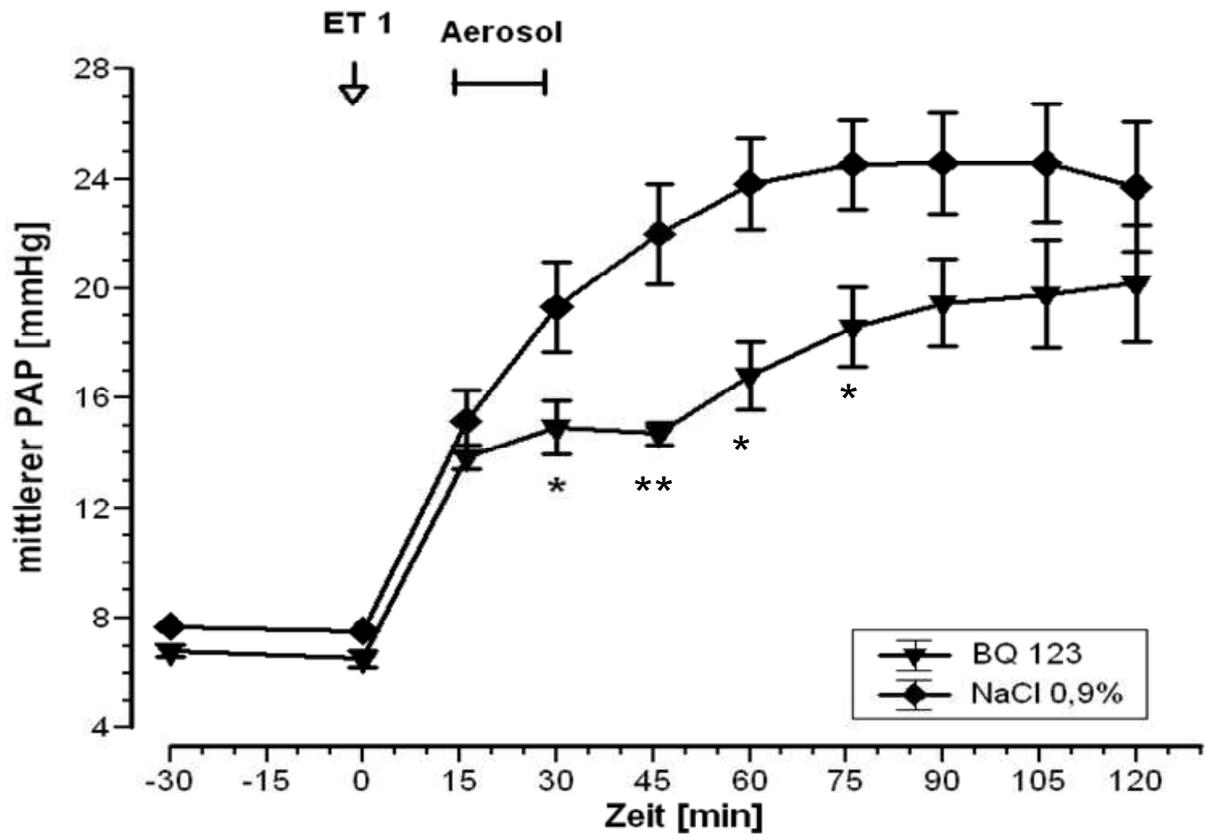


Abb. 4.6.2 Einfluss der Aerosolisierung von BQ 123 auf den PAP im Vergleich zur NaCl 0,9%-Kontrollgruppe

\* $P < 0,05$  zu den Messzeitpunkten  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ .

\*\* $P < 0,01$  zum Messzeitpunkt  $t_{45}$

### **4.6.3 Aerosolisierung des selektiven ETRA BQ 788 (Abb. 4.6.3)**

- *Einfluss auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie*

Zum Zeitpunkt  $t_{15}$  erfolgte die Aerosolisierung des  $ET_B$ -Rezeptorantagonisten BQ 788. Die verabreichte Dosis betrug 600  $\mu$ l BQ 788 ad 1400 $\mu$ l NaCl 0,9% (entsprechend einer Konzentration von 1,14 $\mu$ M). Im Vergleich zur Vergleichsgruppe NaCl-Aerosol zeigten sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen in Bezug auf den pulmonalarteriellen Druck (maximale PAP Differenz  $3,04 \pm 1,9$ mmHg,  $p > 0,05$ ).

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

Innerhalb dieser Versuchsreihe ergab sich keine signifikante Veränderung im Bereich des Ventilationsdruckes gegenüber den NaCl-Aerosolversuchen.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Die Gewichtszunahme im Rahmen dieser Versuchsreihe betrug  $1,96 \pm 0,3$  Gramm während der Versuchsdauer von 120 Minuten. Damit zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Gewichtsänderung gegenüber den entsprechenden Kontrollversuchen.

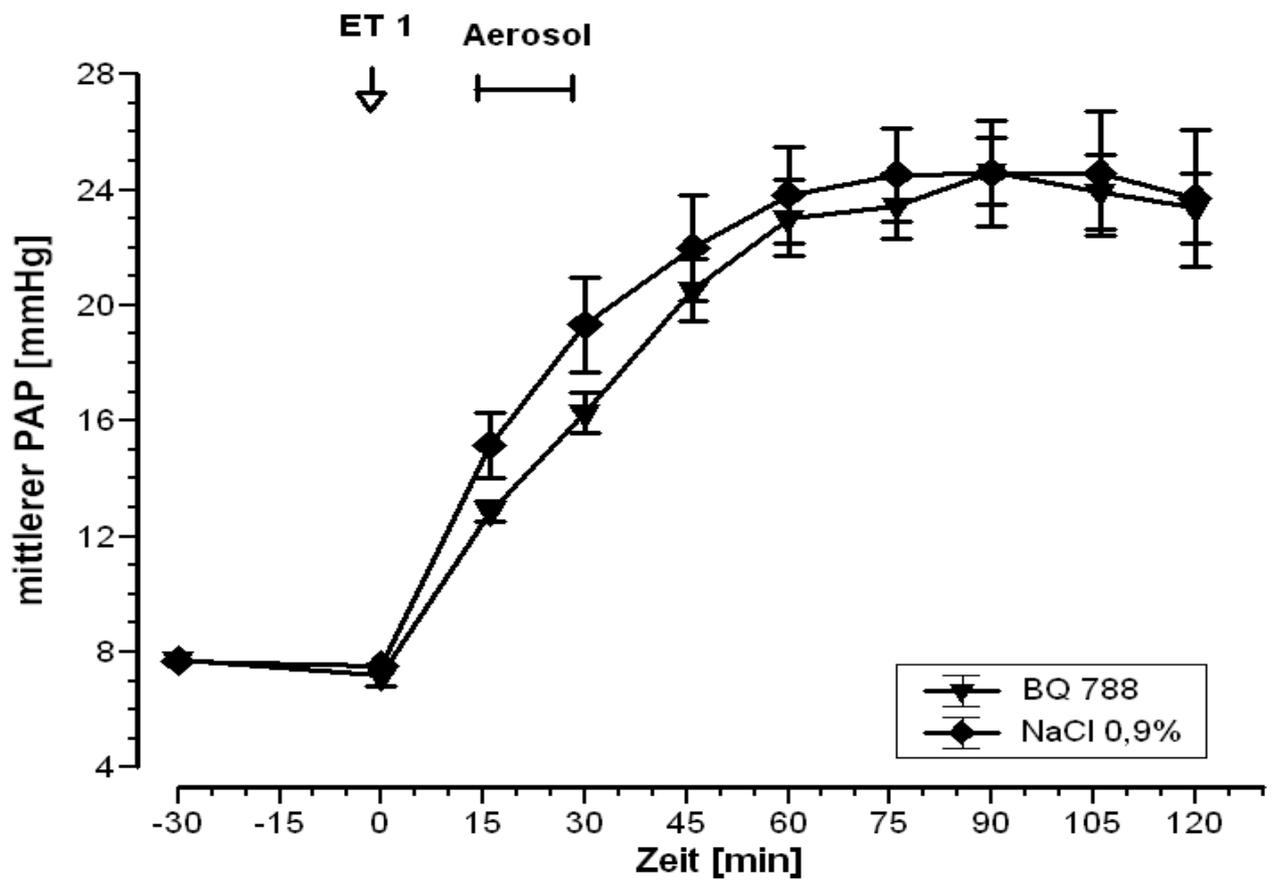


Abb. 4.6.3 Einfluss der Aerosolisierung von BQ 788 auf den PAP im Vergleich zur NaCl 0,9%-Kontrollgruppe

#### **4.6.4 Aerosolisierung des dualen ETRA Tezosentan (Abb. 4.6.4)**

- *Einfluss auf die ET-1 induzierte pulmonale Hypertonie*

Zum Zeitpunkt  $t_{15}$  erfolgte die Aerosolisierung des Tezosentan. Es wurde eine Dosis von 585  $\mu\text{g}$  Tezosentan ad 1415  $\mu\text{l}$  isotoner Kochsalzlösung (entsprechend einer Konzentration von 1,16 $\mu\text{M}$ ) bis zum Zeitpunkt  $t_{30}$  vernebelt. Ab dem Messzeitpunkt  $t_{45}$  bis zum letzten Messzeitpunkt  $t_{120}$  zeigte sich eine signifikante Senkung des pulmonalarteriellen Drucks (jeweils  $p < 0,01$ ). Der maximale drucksenkende Effekt wurde zum Zeitpunkt  $t_{90}$  gemessen und betrug  $11,4 \pm 3,0$  mmHg. Das entspricht einer relativen Senkung des pulmonalarteriellen Druckes um 46,3 %.

- *Einfluss auf den Ventilationsdruck*

Unter dem Einfluss von Tezosentan konnten im Bezug auf den Ventilationsdruck keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den genannten Kontrollversuchen beobachtet werden.

- *Einfluss auf die Lungenödementwicklung*

Die Gewichtszunahme im Rahmen dieser Versuchsreihe betrug  $1,9 \pm 0,2$  Gramm während der Versuchsdauer von 120 Minuten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Gewichtsänderungen gegenüber den genannten Kontrollversuchen.

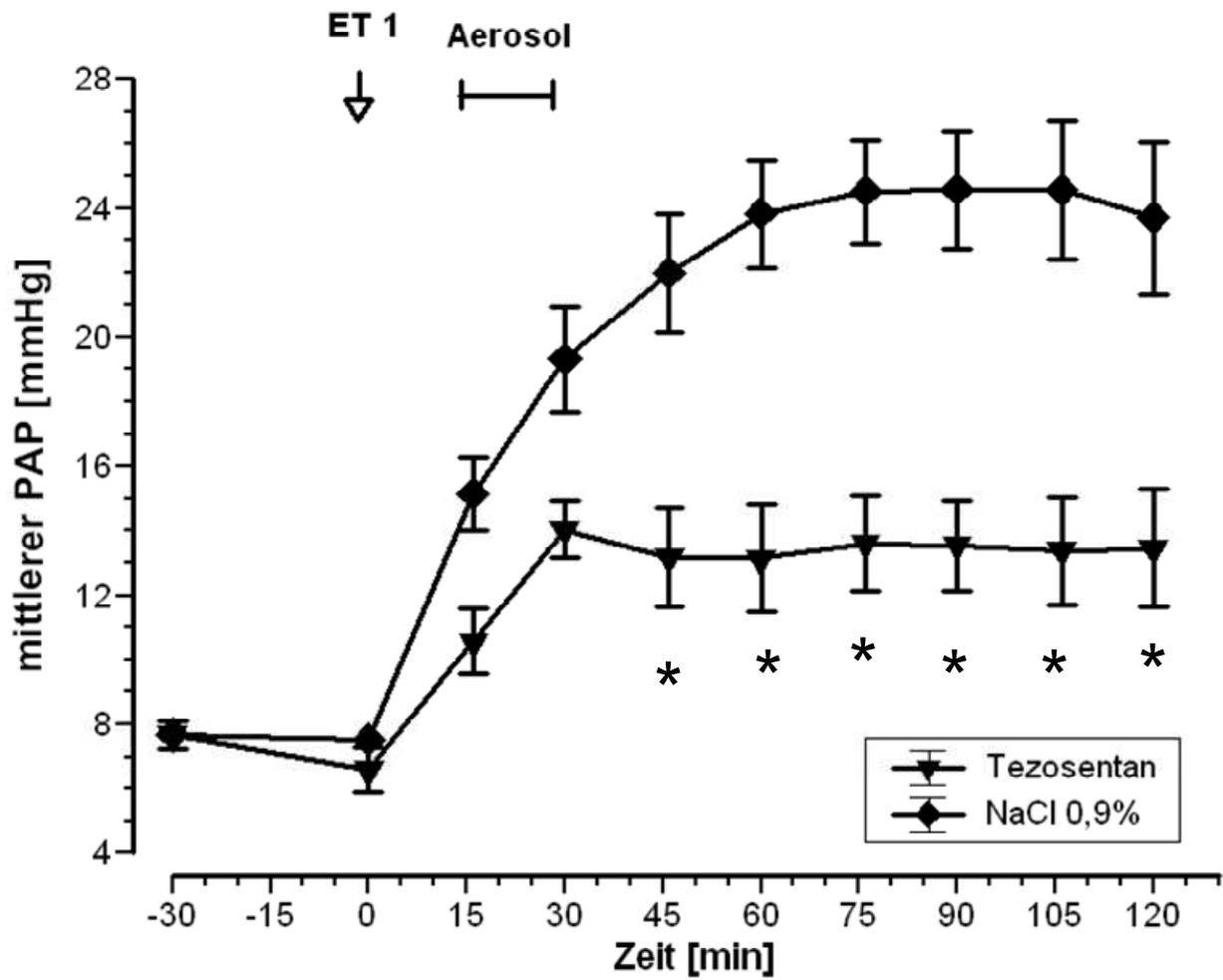


Abb. 4.6.4 Einfluss der Aerosolisierung von Tezosentan auf den PAP im Vergleich zur NaCl0,9%-Kontrollgruppe;

\* $P < 0,01$  ab  $t_{45}$  bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$

## **4.7 Auswirkung unterschiedlicher ETRA auf das Modell der pulmonalen Hypertonie im direkten Vergleich**

Innerhalb der Versuchsreihe der systemischen und der aerosolisierten Applikation der drei unterschiedlichen ETRA zeigten sich folgende auf PAP, VP und Ödementstehung bezogenen Veränderungen:

### **4.7.1. Versuchsreihe intravaskulär applizierter ETRA**

- *Vergleich BQ 123 und BQ 788 ( Abb. 4.7.1.1, Abb. 4.7.1.2 und Abb. 4.7.1.3)*

In der Versuchsreihe des intravasal applizierten BQ 123 zeigten sich im Vergleich zur systemischen Applikation des BQ 788 signifikante Unterschiede hinsichtlich der Entwicklung des PAP. Bereits direkt nach Applikation wurde ein signifikanter PAP-Unterschied ( $p < 0,001$ ) über den Zeitraum  $t_{30}$  bis  $t_{120}$  beobachtet. Wie schon erläutert führte das BQ 123 zu einer Drucksenkung, während das BQ 788 zu einer signifikanten Drucksteigerung führte. Die maximale PAP Differenz zwischen den beiden Gruppen war dabei zum Zeitpunkt  $t_{90}$  zu beobachten und betrug 19,55 mmHg.

Im Vergleich der Entwicklung der Ventilationsdrücke und der Lungenödementstehung zeigte sich zu den angegebenen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied.

- *Vergleich BQ 123 und Tezosentan ( Abb. 4.7.1.1, Abb. 4.7.1.2 und Abb. 4.7.1.3)*

Zwischen den beiden Versuchsreihen BQ 123 und Tezosentan waren bei systemischer Gabe keine signifikanten Unterschiede messbar. Dies gilt sowohl für PAP, als auch Ventilationsdruck und die Lungenödementwicklung.

- *Vergleich BQ 788 und Tezosentan ( Abb. 4.7.1.1, Abb. 4.7.1.2 und Abb. 4.7.1.3)*

Im Vergleich der beiden Versuchsreihen BQ 788 und Tezosentan zeigte sich bei der jeweiligen systemischen Applikation ein deutlicher Unterschied in der Entwicklung des pulmonalarteriellen Druckes. Im direkten Vergleich zeigt sich ein signifikant geringerer PAP in der Tezosentangruppe gegenüber der signifikanten drucksteigernden Wirkung des BQ 788. Signifikante Unterschiede ergeben sich zu den Zeitpunkten  $t_{45}$  bis  $t_{75}$  ( $p < 0,01$ ) und zu den Messpunkten  $t_{90}$  bis  $t_{120}$  ( $p < 0,001$ ). Dabei betrug die maximale Druckdifferenz 17,3 mmHg. Hinsichtlich des Wirkungseintrittes zeigte sich, dass die Wirkung des BQ 788 früher einsetzte

als die Wirkung des Tezosentans ( $t_{45}$ ), dabei jedoch ebenso bis zum letzten Messzeitpunkt nachweisbar blieb.

Bei Betrachtung der Messergebnisse bezogen auf den Ventilationsdruck und die Lungenödementwicklung ließ sich dagegen kein signifikanter Unterschied nachweisen.

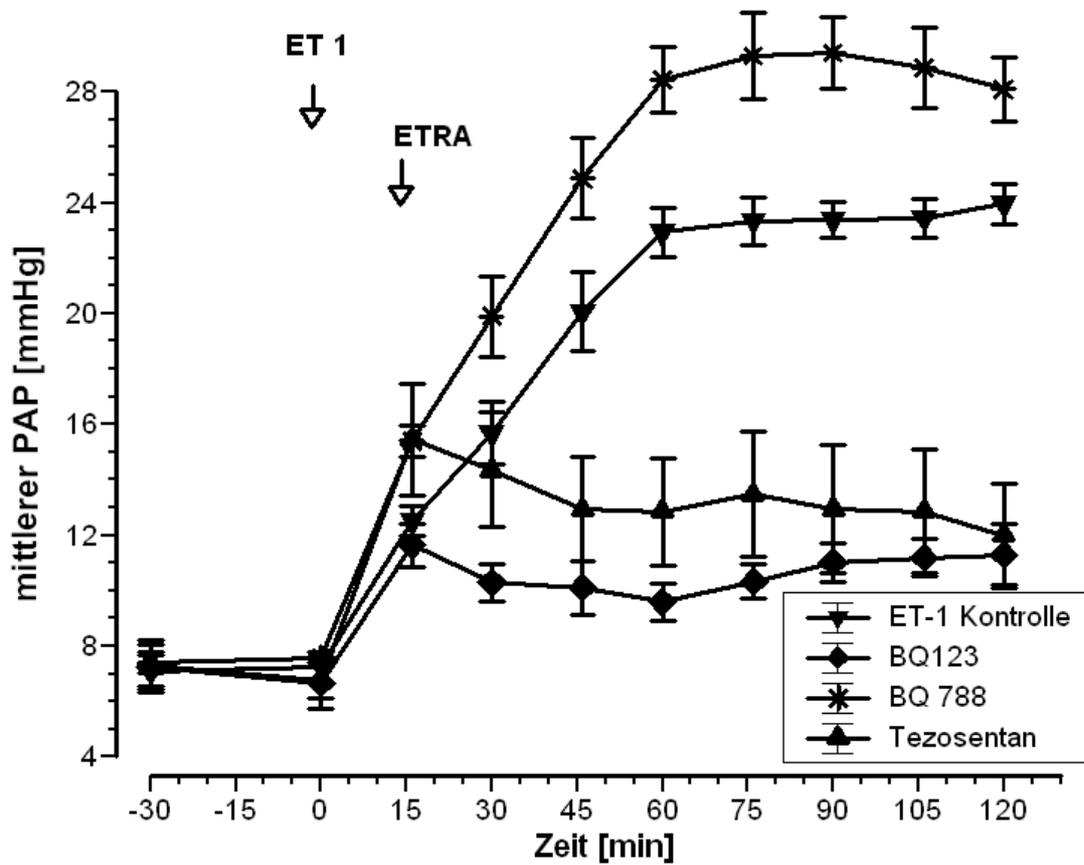


Abb. 4.7.1.1 Vergleich der ET-Rezeptorantagonisten im bei intravasaler Applikation. Weitere Erklärungen und statistische Signifikanzen siehe Text.

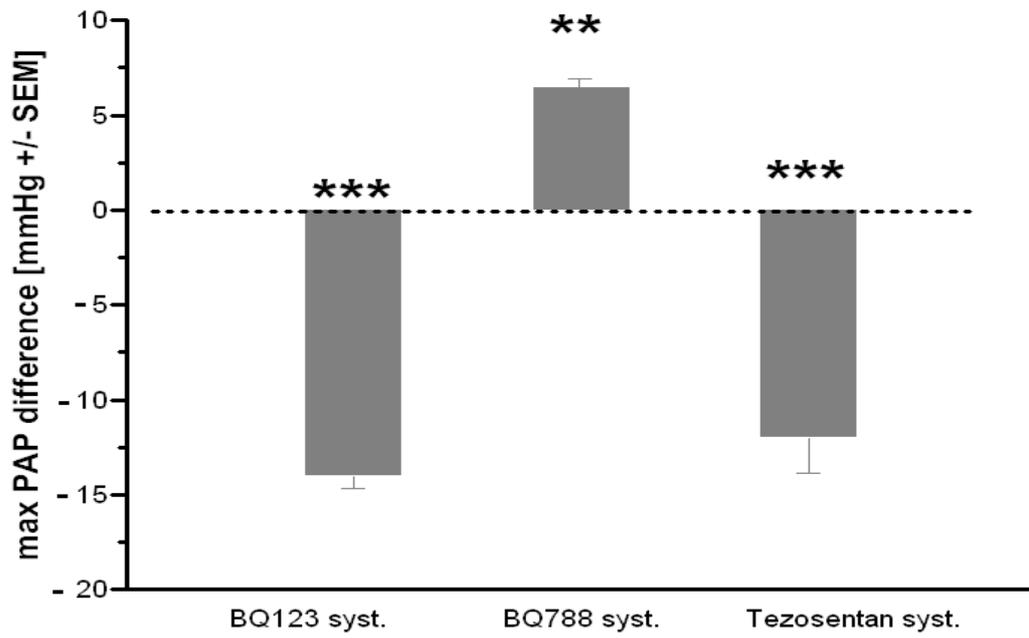


Abb. 4.7.1.2 maximale PAP-Differenz in mmHg der unterschiedlichen ET-Rezeptorantagonisten bei intravasaler Applikation; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

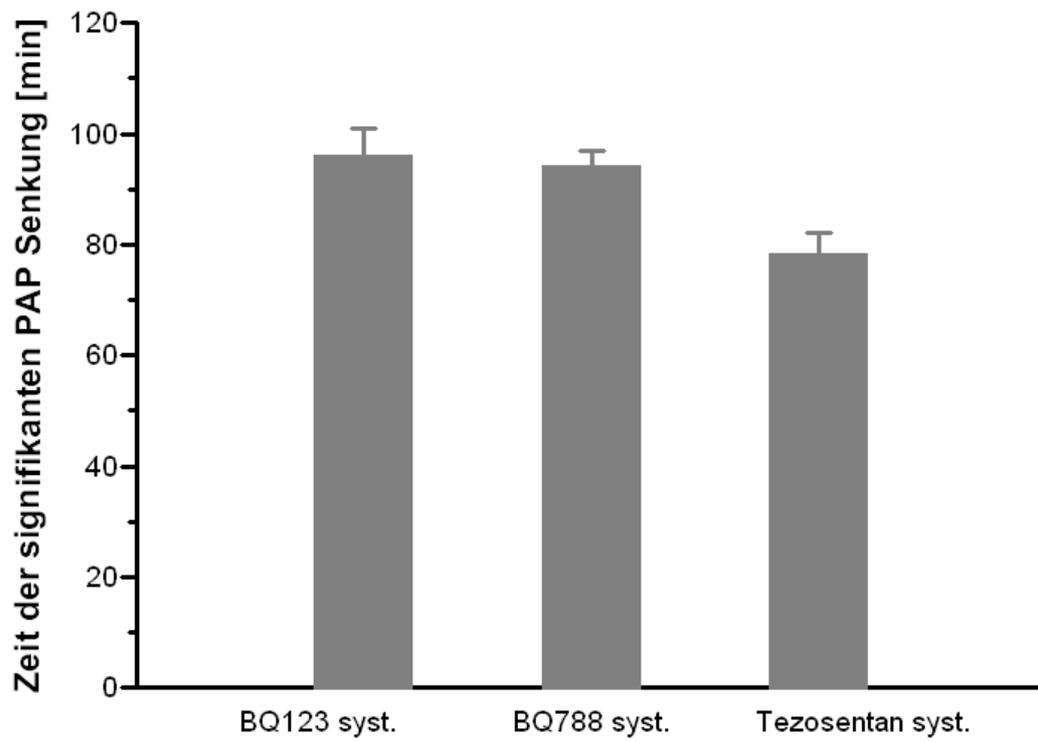


Abb. 4.7.1.3 Vergleich der signifikanten PAP-Drucksenkung bei intravasaler Applikation der ET-Rezeptorantagonisten in Minuten

#### **4.7.2 Versuchsreihe aerosolierter ETRA**

- *Vergleich BQ 123 und BQ 788 (Abb. 4.7.2.1, 4.7.2.2 und 4.7.2.3)*

Bei Betrachtung dieser beiden Versuchsreihen zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede im Verlauf des pulmonalarteriellen Druckes. So konnte im Vergleich der beiden Versuchsreihen untereinander ein signifikant PAP-senkender Effekt bei Aerosolisierung des BQ 123 gegenüber dem BQ 788 nachgewiesen werden. Dieser war signifikant zu den Zeitpunkten  $t_{45}$ ,  $t_{60}$  ( $p < 0,01$ ) und  $t_{75}$  bzw.  $t_{90}$  ( $p < 0,05$ ). Signifikante Unterschiede innerhalb der registrierten Ventilationsdrücke oder der Lungenödementwicklung wurden nicht beobachtet.

- *Vergleich BQ 123 und Tezosentan (Abb. 4.7.2.1, 4.7.2.2 und 4.7.2.3)*

Im Gegensatz zur systemischen Versuchsreihe konnte bei aerosolierter Applikation von BQ 123 und Tezosentan ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des pulmonalarteriellen Drucks gemessen werden. Nach Aerosolisierung des Tezosentan zeigte sich ab dem Messzeitpunkt  $t_{60}$  eine signifikant stärker ausgeprägte PAP-senkende Wirkung als bei der Verabreichung des BQ 123-Aerosols ( $p < 0,05$ ). Zudem war der drucksenkende Effekt signifikant länger nach Applikation des Tezosentanaerosols als nach Aerosolisierung des BQ 123 (100 Minuten vs. 55 Minuten) nachweisbar. Zudem war die maximale PAP-Senkung durch das Tezosentanaerosol signifikant stärker ausgeprägt als dies durch das BQ 123 Aerosol erreicht werden konnte (Reduktion des PAP von 11,7 mmHg entsprechend ~ 46 % vs. 7,3 mmHg, entsprechend ~ 33%).

Bei Betrachtung des Ventilationsdruckes dagegen war im Vergleich der beiden Versuchsgruppen untereinander kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Dies betraf ebenso die Gewichtsregistrierung, bei der sich keine signifikanten Unterschiede darstellen lassen konnten.

- *Vergleich BQ 788 und Tezosentan (Abb. 4.7.2.1 und 4.7.2.3)*

Beim Vergleich dieser beiden Versuchsreihen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Entwicklung des pulmonalarteriellen Druckes. Erstmals war diese zum Zeitpunkt  $t_{45}$  ( $p < 0,05$ ) und danach zu den Zeitpunkten  $t_{60}$  ( $p < 0,01$ ) und allen folgenden Messpunkten  $t_{75}$  bis  $t_{120}$  ( $p < 0,001$ ) zu beobachten. Dabei zeigte sich eine maximale PAP-Differenz zum Zeitpunkt  $t_{90}$  von ca. 11 mmHg.

Ein signifikanter Unterschied im Bereich des Ventilationsdruckes konnte im Vergleich der beiden Versuchsreihen nicht nachgewiesen werden.

Ebenso zeigte sich keine signifikante Veränderung im Bereich der Gewichtsveränderung.

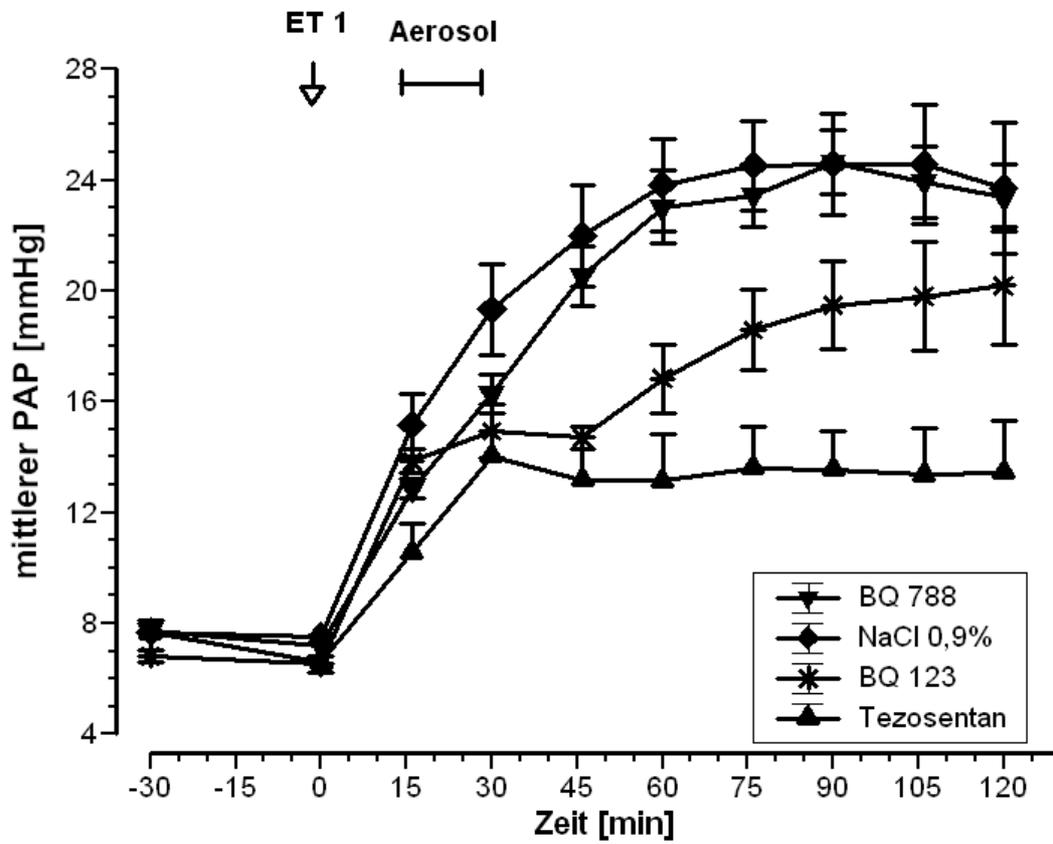


Abb. 4.7.2.1 Vergleich der ET-Rezeptorantagonisten im Vergleich bei aerosolierter Applikation.  
Nähere Erklärungen und statistische Signifikanzen im Text.

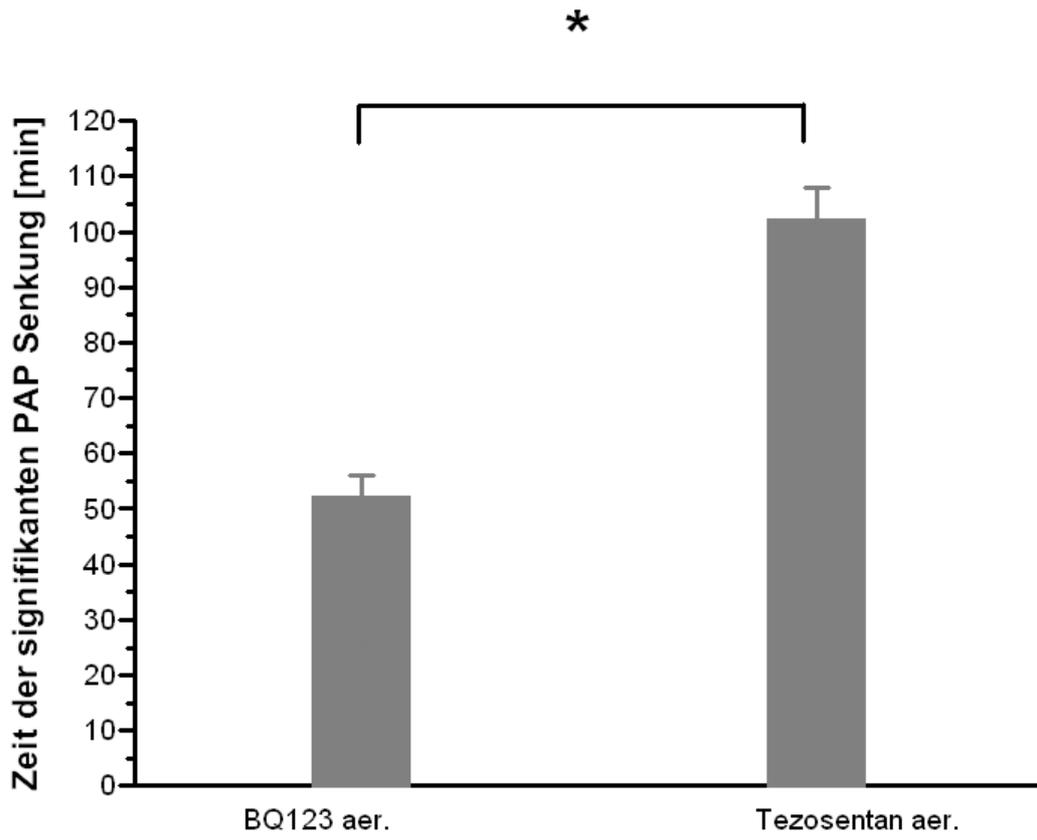


Abb. 4.7.2.2 Vergleich der signifikanten PAP-Drucksenkung bei aerosolierter Applikation der ET-Rezeptorantagonisten in Minuten; \* $P < 0,05$

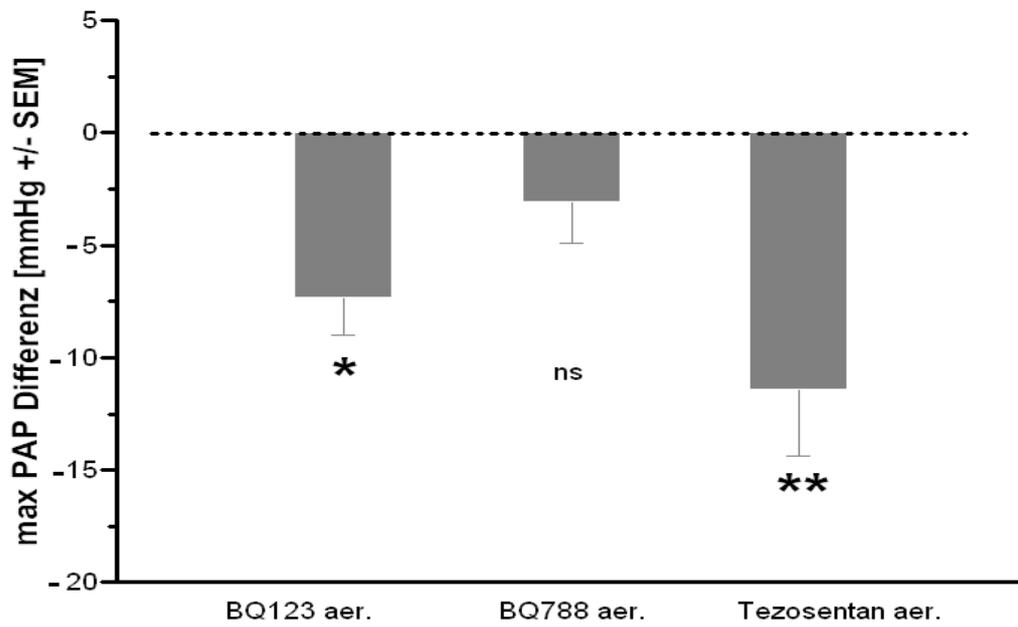


Abb. 4.7.2.3 maximale PAP-Differenz in mmHg der unterschiedlichen ET-Rezeptorantagonisten bei aerosolierter Applikation; ns: nicht signifikant; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

## 4.8 Vergleich der intravasalen und der inhalativen Applikation von ETRA

- *Vergleich BQ 123 intravasal und BQ 123 inhalativ (Abb. 4.8.1)*

Im Vergleich dieser beiden Versuchsreihen zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PAP-Entwicklung. Bereits kurz nach Verabreichung des BQ 123 zeigte sich ein betonter Effekt bei der intravasal applizierten Substanz ab dem Messzeitpunkt  $t_{30}$  bis  $t_{120}$  ( $p < 0,01$ ). Dabei betrug die maximale Druckdifferenz zwischen den unterschiedlichen Applikationsformen zum Zeitpunkt  $t_{75}$  9,4 mmHg. Die Wirkdauer des BQ 123 war im Falle der systemischen Applikation für 90 Minuten signifikant nachweisbar, dagegen war eine signifikante Wirkdauer im Falle der aerosolisierten Applikationsform für 45 Minuten nachweisbar.

Ein signifikanter Unterschied konnte im Bereich des Ventilationsdruckes nicht gemessen werden.

Ebenso waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Entwicklung eines Lungenödems zu beobachten.

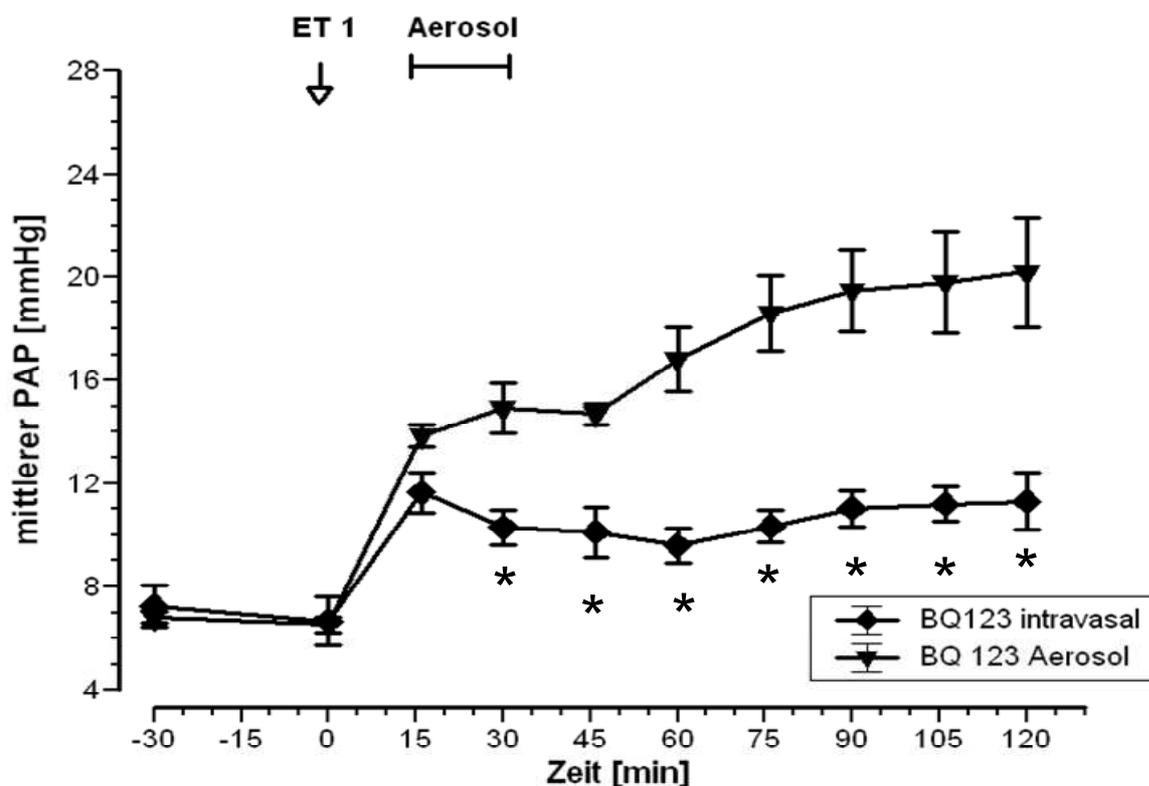


Abb. 4.8.1 Vergleich des PAPm BQ 123 intravasal vs. BQ 123 Aerosol;

\* $P < 0,01$

- *Vergleich BQ 788 intravasal und BQ 788 inhalativ (Abb.4.8.2)*

Im Vergleich der beiden BQ 788 Versuchsreihen zeigt sich ein signifikant höherer PAP in der Gruppe der intravasal verabreichten Substanz. Diese Zunahme des PAP war zu den Zeitpunkten  $t_{45}$  bis  $t_{120}$  signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ). Lediglich zum Zeitpunkt  $t_{105}$  fand sich ein nicht signifikanter Unterschied.

Eine maximale Druckdifferenz war zum Zeitpunkt  $t_{75}$  messbar und betrug 6,06 mmHg.

Signifikante Unterschiede im Bereich der Gewichtsregistrierung konnten im Vergleich dieser beiden Versuchsreihen nicht beobachtet werden.

Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei Betrachtung der Ventilationsdrücke der beiden Versuchsreihen.

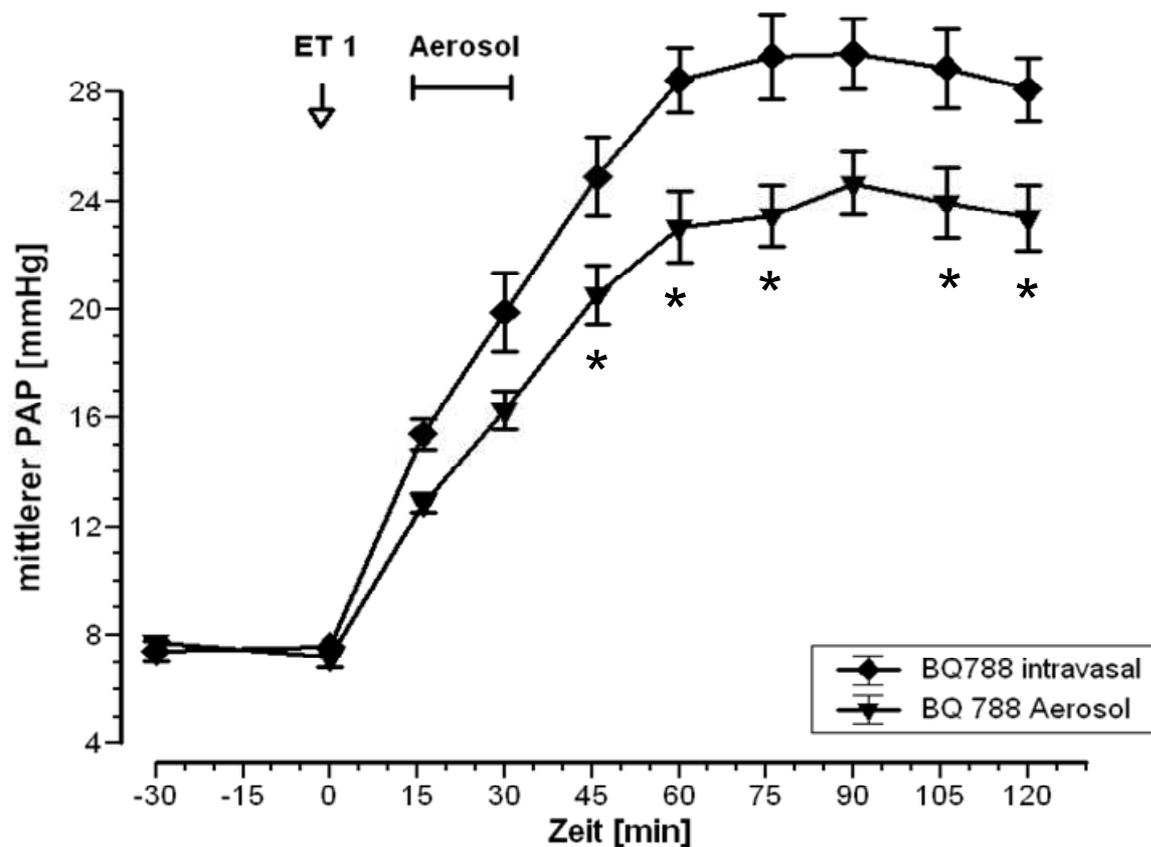


Abb. 4.8.2 Vergleich des PAPm BQ 788 intravasal vs. BQ 788 Aerosol;

\* $P < 0,05$

- Vergleich Tezosentan intravasal und Tezosentan inhalativ (Abb. 4.8.3)

Im Vergleich zwischen diesen beiden Versuchsreihen fand sich kein signifikanter Unterschied im Bereich des pulmonalarteriellen Druckes zwischen den beiden Applikationsformen.

Auch in Bezug auf eventuelle Ventilationsdruck- oder Gewichtsveränderungen ließen sich keine signifikanten Unterschiede darstellen.

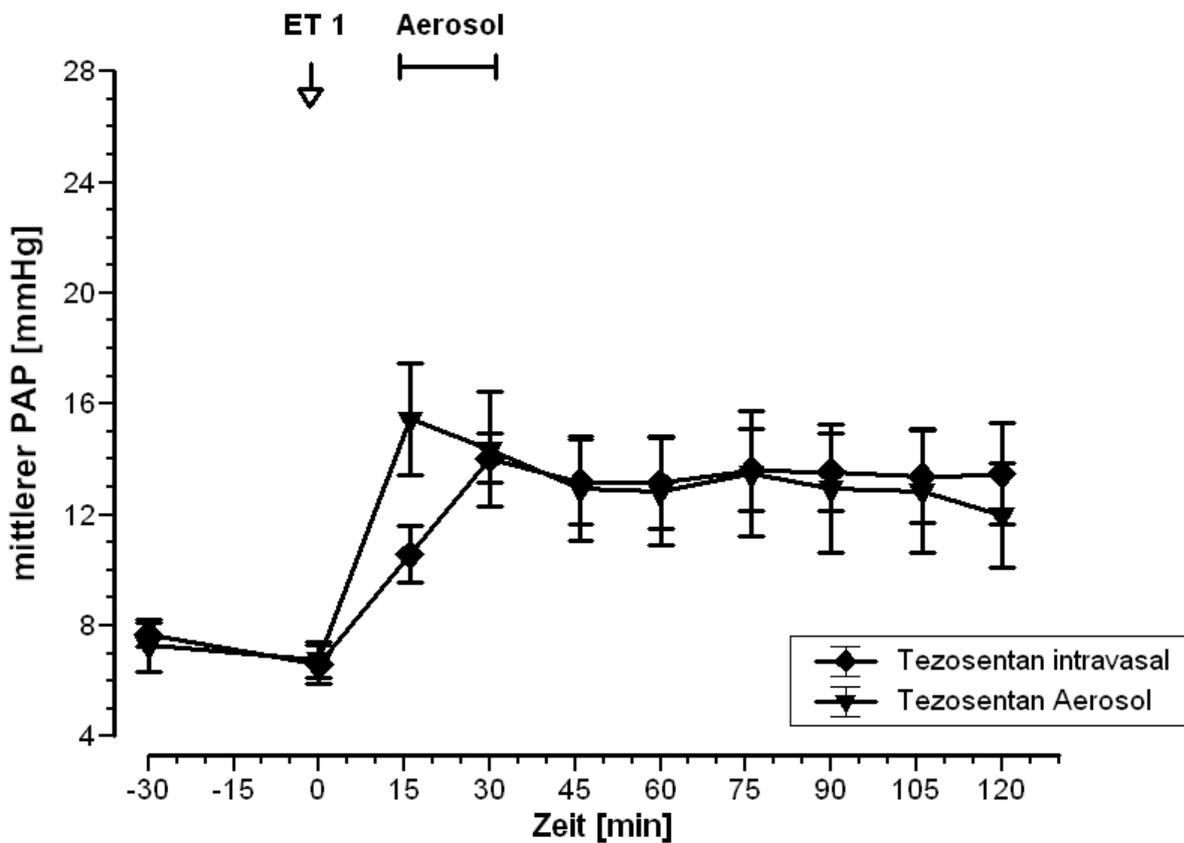


Abb. 4.8.3 Vergleich des PAPm Tezosentan intravasal vs. Tezosentan Aerosol

## 5. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zur ET-1 vermittelten pulmonalen Hypertonie am Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge, vertiefen die Kenntnis Endothelin-vermittelter pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen von Lungenerkrankungen und die Möglichkeit deren Antagonisierung.

Am Beispiel der pulmonalen Hypertonie ist belegt, dass das ET-1 als pulmonaler Vasokonstriktor einen akuten pathophysiologischen Vorgang vermittelt<sup>106-108</sup>. Zudem ist das ET-1 im Rahmen chronischer Umbauvorgänge der Gefäßwand (Remodeling) zu sehen, die an der langfristigen Entstehung einer chronischen pulmonalen Hypertonie, über das Maß der Vasokonstriktion hinaus, beteiligt sind<sup>109</sup>. Darüber hinaus ist das ET-1 aber auch Mediator in anderen Lungenerkrankungen<sup>110;111</sup> und so könnten die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse auch auf andere Felder der Lungenpathophysiologie übertragen werden. Betrachtet man das ET-1 als wesentlichen Mediator von akuten und chronischen Lungenerkrankungen, so erhält die Antagonisierung dieses Botenstoffes einen besonderen Stellenwert. Allerdings ist die Bedeutung der Antagonisierung der ET-1 vermittelten Effekte durch systemisch applizierbare Substanzen am Beispiel der pulmonalen Hypertonie bereits in experimentellen Arbeiten<sup>112;113</sup> unterstrichen und auch deren klinischer Nutzen ist nachgewiesen<sup>96;114-116</sup>.

Eine Verabreichung von ETRA als Aerosol wurde bisher noch nicht untersucht.

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit war, dass sich die ET-1-antagonisierenden Effekte von ETRA, die durch systemische (intravaskuläre) Applikation zu erzielen sind, auch nach inhalativer Verabreichung beobachtet werden können. Dies wäre gerade vor dem Hintergrund interessant, dass durch die intrapulmonale selektive Verabreichung ein besseres Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil von ETRA erzielt werden könnte. Dieser Ansatz wurde bereits für andere vasoaktive Substanzen erfolgreich nachgewiesen<sup>26</sup>. Da das ET-1 allerdings nicht nur vasomotorische Effekte, sondern z. B. auch eine fibroproliferative Wirkung hat, wäre der Einsatz der ETRA bei unterschiedlichen Erkrankungen denkbar. Möglicherweise stellen sich antiproliferative Effekte von ETRA auch erst in hoher Gewebskonzentration ein, die nur auf inhalativen Wege zu erzielen sind.

Um die hämodynamische Wirksamkeit unterschiedlicher ETRA nach deren Aerosolisierung zu überprüfen, scheint das isolierte Kaninchenlungenmodell besonders geeignet. Dieses Organmodell ermöglicht die Beobachtung biophysikalischer Größen, wie z. B. den Lungendruck, der durch das komplexe Zusammenspiel aller Lungenkompartimente (Epithel, Interstitium und Lungengefäße mit prä- und postkapillären Kompartimenten usw.) reguliert

wird. Damit sind die Vorteile eines intakten Organmodells gegenüber der Untersuchung der Einzelkompartimente (z. B. durch Untersuchungen an pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen oder –gefäßringen) ersichtlich. Translational besitzt der Parameter Lungendruck auch eine klinische Bedeutung, da die Verminderung desselben aufgrund der konstanten Flussrate immer mit einer Verminderung der pulmonal vaskulären Resistance verbunden sein muss. Diesen Widerstand positiv zu beeinflussen ist eines der vorherrschenden Therapieziele bei der akuten und chronischen pulmonalen Hypertonie.

Das erste Ziel der Arbeit war, zunächst eine anhaltende pulmonale Vasokonstriktion als Modellmechanismus einer ET-1 vermittelten Pathophysiologie im Modell der isolierten Kaninchenlunge zu etablieren. Dafür war zunächst die Charakterisierung der ET-1 vermittelten Vasokonstriktion nötig. In dieser Arbeit wird nun nach unserer Kenntnis erstmals die Kinetik dieser pulmonalen Vasokonstriktion über einen Zeitraum von 120 Minuten am Modell der isolierten Kaninchenlunge beschrieben. Nach intravaskulärer Bolusapplikation von ET-1 kam es zu einem streng reproduzierbaren und sofortigen pulmonalen Druckanstieg, der über 60 Minuten weiter anstieg, um dann in ein stabiles Druckplateau überzugehen. Die Dosis des ET-1 wurde so gewählt, dass eine Zunahme des Pulmonaldruckes um ca. 300% erreicht wurde, aber das Lungengewicht als Parameter der Entstehung eines Lungenödems nicht signifikant zunahm. Diese Konstellation erlaubte eine Untersuchung der pulmonalen Vasoreaktivität, ohne dass diese durch interstitielle oder gar alveoläre Flüssigkeitsansammlungen beeinflusst wurde. Zudem gilt das gleichbleibende Lungengewicht als übergreifender Parameter einer erhaltenen Lungenintegrität mit intakter endothelialer Barriere. Die gute Reproduzierbarkeit der ET-1 vermittelten pulmonalen Vasokonstriktion erlaubte die Intervention zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Zum einen zum Zeitpunkt des erreichten Plateaus: hier wurden die Dosis-Wirkungskurven der ETRA ermittelt, um zunächst grundsätzlich deren Pharmakokinetik und –dynamik zu beschreiben. Zum anderen diente der Zeitpunkt 15 Minuten nach Applikation des ET-1 als Interventionszeitpunkt, um die Zeitabhängigkeit der erzielten ETRA-Wirkungen besser beschreiben zu können.

Im Modell wurden zum einen die selektiven ETRA BQ 123 (ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist) und BQ 788 (ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist) angewandt. Zum anderen wurde der duale, nicht selektive ET-Rezeptorantagonist Tezosentan benutzt. Nach systemischer Gabe des BQ 123 zum Zeitpunkt des erreichten Druckplateaus wurde eine dosisabhängige Reduktion des Pulmonaldruckes beobachtet. Durch die Applikation im PA-Druckanstieg konnte zudem gezeigt werden, dass diese Wirkung von Dauer war. Eine vergleichbare Kinetik für BQ 123 wurde auch bei den Inhalationsversuchen beobachtet, bei denen eine signifikante *anti-*

*vasokonstriktive* Wirkung während und kurzzeitig nach der Inhalation nachgewiesen werden konnte. Allerdings war zum Versuchsende die Wirkung des BQ 123 nicht mehr nachweisbar. Somit ließ sich ein vergleichbarer Effekt des vaskulär und des inhalativ verabreichten ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockers nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte während der Applikation des ET<sub>B</sub>-Rezeptorblockers BQ 788 via Aerosolisierung kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, während bei systemischer Applikation des BQ 788 ein Effekt der gesteigerten Vasokonstriktion zu beobachten war.

Bei gleichzeitiger Blockade sowohl des ET<sub>A</sub>- als auch des ET<sub>B</sub>-Rezeptors durch den dualen Rezeptorantagonisten Tezosentan via Aerosolisierung konnte ein deutlicher Effekt der verminderten Vasokonstriktion beobachtet werden. Dieser war stärker ausgeprägt als der Effekt der Aerosolisierung mittels BQ 123. Der Vergleich der Inhalation des Tezosentans mit der vorher untersuchten systemischen Applikation des Tezosentans erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der Wirkung.

In dieser Arbeit wird somit gezeigt, dass eine pulmonale Vasokonstriktion (als ein Beispiel für eine ET-1vermittelte Lungenerkrankung) durch Aerosolisierung des beschriebenen ET<sub>A</sub>- (BQ 123) sowie des dualen ET-Rezeptorantagonisten Tezosentan vermindert wird. Die durch systemische Applikation erreichten vasokonstriktiven Effekte des BQ 788 wurden allerdings nach dessen Aerosolisierung nicht beobachtet.

Sowohl der ET<sub>A</sub>-Rezeptor als auch der ET<sub>B</sub>-Rezeptor ist der Familie der G-Proteinvermittelten Rezeptorengruppe zuzuordnen. Beide Rezeptoren sind in der Familie der Säugetiere äußerst häufig vertreten (80-90 %) <sup>117</sup>. Diese Rezeptoren sind auf den glatten Muskelzellen der pulmonalen Strombahn zu finden und vermitteln hier die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion und die Proliferation glatter Muskelzellen und Endothelzellen <sup>118;119</sup>. Des Weiteren befindet sich der ET<sub>B</sub>-Rezeptor zusätzlich auf Endothelzellen und vermittelt dort die Freisetzung von unterschiedlichen Mediatoren. Zu diesen genannten Substanzen gehören NO und Prostazyklin. Diese gelten als potente pulmonale Vasodilatoren <sup>119-121</sup>. Insgesamt ergibt sich jedoch in dieser Konstellation der Nettoeffekt einer akuten ET-1 Expression, der sich in einer anhaltenden Vasokonstriktion innerhalb der pulmonalen Strombahn äußert. Im Einklang mit diesen pathophysiologischen Vorstellungen kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Haupteffekt der pulmonalen Vasokonstriktion über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelt wird. Dieser Effekt kann sowohl über die intravaskuläre als auch über die inhalative Applikation eines ET<sub>A</sub>-Blockers vermindert werden. Ebenfalls steht dazu im Gegensatz die Reaktion nach Applikation des ET<sub>B</sub>-Rezeptorblockers BQ 788, bei dessen intravaskulärer

Applikation (nicht via Aerosolisierung) es zu einem verstärkten vasokonstriktiven Effekt mit Druckanstieg kommt.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende signifikante Reaktion auf Inhalation des BQ 788 könnte die Tatsache sein, dass der endothelial gelegene ET<sub>B</sub>-Rezeptor bei inhalativer Applikation nicht erreicht wird. So zeigten sich die Reaktionen nach Verabreichung des ET<sub>A</sub>- und des dualen ET-Blockers deutlicher als beim BQ 788. Dieser Umstand scheint die These zu stützen, dass die ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion eine untergeordnete Rolle spielt. Ein Dosis-Problem ist hierbei aufgrund der equimolar verabreichten Substanzen sowohl inhalativ als auch intravaskulär unwahrscheinlich.

Eine attraktive Spekulation wäre hierbei allerdings, dass das BQ 788-Aerosol im Gegensatz zum intravaskulär verabreichten BQ 788 die Endothelzelle nicht erreichte. Somit wäre erklärbar, warum der intravasal erreichte Effekt im Inhalationsversuch nicht nachweisbar war. Einen direkten Beweis für diese Interpretation können die vorliegenden Untersuchungen aber nicht erbringen.

Obwohl es problembehaftet ist, nicht-signifikante Ergebnisse zu diskutieren, soll kurz auf die Tendenz innerhalb der BQ 788-Versuchsreihen eingegangen werden. So zeigte sich nach Inhalation des BQ 788 tendenziell sogar eher eine Reduktion des PAP, obwohl, wie gesagt, ein Anstieg desselben zu erwarten gewesen wäre. Um den oben angestoßenen Gedanken weiterzuführen, könnte nun sogar spekuliert werden, dass das BQ 788 zwar nicht die Vasodilatation vermittelnden Zielrezeptoren auf dem Endothel antagonisierte, wohl aber den Vasokonstriktion vermittelnden ET<sub>B</sub>-Rezeptor auf der glatten Muskelzelle erreichte und somit einen eher drucksenkenden Effekt vermittelte.

Interessanterweise zeigte der duale Rezeptorantagonist Tezosentan den deutlichsten drucksenkenden Effekt in den Aerosolversuchen. Ein Erklärungsansatz wäre hier die Annahme, dass die Aerosole zwar die glatte Muskelzelle und damit die beiden ET-Rezeptoren an der glatten Muskelzelle, jedoch nicht die Rezeptoren im Bereich der Endothelzelle erreichen. Wiederholend ist zu sagen, dass diese Interpretationen durch die vorliegende Arbeit nicht zu beweisen sind. Jedoch ergeben die unterschiedlichen Beobachtungen bei genauer Betrachtung ein logisches Gesamtbild. Folglich könnte die inhalative Verabreichung eines spezifischen ET<sub>A</sub>- oder eines dualen ET-Rezeptorantagonisten einen alternativen Therapieweg bei ET-1 induzierten Lungenerkrankungen darstellen.

Wie bereits beschrieben führte die systemische Gabe des ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 788 zu einer Steigerung des vasokonstriktiven Endothelineffekts, wohingegen die systemische Gabe eines ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockers bzw. eines dualen Rezeptorblockers zu einem verminder-

ten Druckanstieg führte. Da der ET<sub>B</sub>-Rezeptor neben seinen schon oben aufgeführten Funktionen ebenfalls für die Clearance des ET-1 verantwortlich ist, könnte eine mögliche Erklärung dieses Umstandes hier ansetzen. Die alleinige Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors führt somit zu einer Drosselung bzw. zu einer Aufhebung der Elimination des Endothelins durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Folglich käme es nicht zu einer Senkung des Endothelinspiegels und gleichzeitig zu einer vermehrten Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und damit zu einer dementsprechenden vermittelten Vasokonstriktion. Zudem erfolgt durch die Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors in der Endothelzelle die verminderte Freisetzung vasodilatierender Substanzen wie NO und Prostazyklinen.

Dieses ist schon in zwei Studien beschrieben worden, welche sich ebenfalls mit isolierten Lungenmodellen beschäftigten. Diese Studien hatten zum Ergebnis, dass die Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors mit systemisch appliziertem BQ 788 zu einer verstärkten Vasokonstriktion führt<sup>122;123</sup>.

Es bleibt jedoch anzumerken, dass die Daten über die ET-1-induzierte pulmonale Hypertonie bzw. die Wirkung des ET-1 auf die pulmonale Zirkulation sehr limitiert sind und sich die signifikanten Studien innerhalb dieses Arbeitsbereiches entweder auf die systemische Zirkulation<sup>119</sup> oder auf isolierte pulmonale Gefäße beziehen<sup>124;125</sup>.

Die Aussagekraft der durchgeführten Arbeit ist durch die vielfältigen Wirkungen des Endothelins limitiert.

Neben den genannten vasokonstriktiven Eigenschaften des ET-1 spielt es innerhalb der Physiologie und Pathophysiologie weitere bedeutende Rollen.

So ist das ET-1 als Mediator für kardiales und vaskuläres Remodeling inklusive der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzelle bekannt. Dieses spielt vor allem in chronischen Krankheitsprozessen eine entscheidende Rolle. Die Betrachtung der chronischen Auswirkungen des Endothelins ist dabei Bestandteil mehrerer Arbeiten gewesen, welche die Auswirkung betreffend Proliferation und Remodeling untersucht haben. In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Prozess des Remodelings und der Proliferation mittels ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten bzw. mittels dualen ETRA inhibiert bzw. im Ergebnis vermindert werden kann<sup>126</sup>. In unserem Modell wird jedoch letztlich das Modell einer akuten pulmonalen Vasokonstriktion untersucht, so dass wir in Bezug auf chronische Aspekte der pulmonalen Hypertonie keine Aussagen treffen können. Zudem ist anzumerken, dass in unserer Arbeit keine näheren Untersuchungen in Bezug auf mikrozirkulatorische Prozesse vorgenommen wurden. Außerdem erfolgte keine Messung der unterschiedlichen Konzentrationen der ETRA bzw. des Endothelins während der Versuche. Diese Fragestellung

wäre im Hinblick auf Bioverfügbarkeit bzw. Wirkung auf die Clearance des Endothelins von Bedeutung.

Nichts desto trotz ergeben sich wichtige Erkenntnisse im beschriebenen Modell:

Das Modell der ET-1 vermittelten pulmonalen Vasokonstriktion eignet sich zur Untersuchung dieses in der Pathophysiologie von unterschiedlichen Lungenkrankheiten zentral eingebundenen Mediators. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Antagonisierung der vaskulären Effekte des ET-1 durch die Aerosolisierung eines selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockers und noch prominenter durch die Inhalation eines dualen ETRA möglich ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wäre nun abzuleiten, ob diese Resultate umgesetzt werden könnten, z. B. als Dosisersparung durch die geänderte (dann inhalative) Applikationsform. Über die Erhöhung der lokalen Wirkdosis hinaus wäre zudem zu diskutieren, ob sich durch die pulmonal selektive Applikation eine Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen zu erzielen ist.

Wie schon in unterschiedlichen Arbeiten untersucht wurde, kann die Verabreichung von vasoaktiven Substanzen mittels Inhalation im Vergleich zu systemischer Applikation Vorteile aufweisen<sup>75</sup>. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass in Zukunft eine inhalative Verabreichung des dualen ET-Rezeptorantagonisten Tezosentan eine Option in der Therapie einer ET-1 vermittelten Vasokonstriktion wie bei der pulmonalen Hypertonie darstellen könnte.

## 6. Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit werfen einige neue Fragen auf und geben Anlass zu neuen weitgreifenden Untersuchungen. Dabei sind unterschiedliche Ansätze von Interesse.

Das von uns genutzte Modell entspricht einem Modell der akuten pulmonalen Hypertonie.

Von Interesse wäre hier die Umsetzung in ein chronisches Modell der pulmonalen Hypertonie wie z. B. die Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie im Tiermodell (Ganztiermodell). Anhand dieses chronischen Modells könnten nicht nur akute vasoreaktive Effekte der applizierten Substanzen, sondern auch langfristige Auswirkungen auf Zellproliferation / Remodeling untersucht werden.

Unter diesem Aspekt könnte eine Auswirkung der Verabreichung von ETRA auf Mediatorebene und auf das vaskuläre Remodeling untersucht werden. Die Ergebnisse betreffend der ETRA auf unterschiedliche Mediatoren des vaskulären Remodelings wie VEGF oder PDGF könnten eine gewichtige Rolle in der Therapie der pulmonalen Hypertonie spielen.

Ein weiterer Ansatz zur Erhaltung wissenschaftlicher Ergebnisse wäre die Etablierung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung der Auswirkungen der unterschiedlichen Aerosole auf Zellebene. Hierbei wäre die Applikation auf epithelialer Seite von besonderem Interesse in einem Modell kombinierter Zellkulturen (Sandwichkulturen zwischen Muskelzellen und Endothelzellen).

Zum Erhalt klinischer Daten wäre die Applikation eines Aerosols während eines Rechtsherzkatheters als Akuttestung im Rahmen einer Studie vorstellbar. Hierbei könnten duale ETRA sowie spezifische  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten eingesetzt und deren akuten Effekte auf die pulmonale und die systemische Hämodynamik gemessen werden. Außerdem wären so pharmakokinetische Untersuchungen nach inhalativer Applikation möglich, die als Grundlagen für zukünftige klinische Studien dienen könnten.

## 7. Zusammenfassung

Die schwere pulmonale Hypertonie ist eine ernste und lebensbedrohende Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Unter den Bedingungen eines Mediatorungleichgewichtes mit folgender pulmonaler Vasokonstriktion, In-Situ-Thrombose usw. kommt es zu vaskulären Umbauprozessen und damit zur Entstehung bzw. Progredienz des Krankheitsbildes. Dieser Vorgang kann sich dabei über einen Zeitraum von Wochen oder Monaten bis hin zu Jahrzehnten erstrecken. Das Ausmaß klinischer Symptome kann dabei stark variieren. Je nach Ursache dieser pulmonalen Hypertonie unterscheidet man verschiedene Formen, wobei die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) beispielhaft aufgrund der pathophysiologischen Entstehung ist und damit in Bezug auf neue therapeutische Möglichkeiten eine Schlüsselstellung einnimmt.

Die derzeitigen Therapieoptionen sind im Vergleich zu den Möglichkeiten vor noch wenigen Jahren deutlich effektiver, eine Heilung ist jedoch weiterhin nicht möglich.

Derzeit werden hauptsächlich Prostazyklinderivate, Phosphodiesteraseinhibitoren sowie ETRA als Mono- bzw. Kombinationstherapie zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt.

Diese Arbeit untersuchte die Wirkung unterschiedlicher ETRA bei intravasaler versus inhalativer Applikation am etablierten Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge mit einer ET-1 induzierten experimentellen akuten pulmonalen Hypertonie. ET-1, ein potenter Vasokonstriktor der pulmonalen Gefäße und Mediator der Zellproliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, wirkt über die beiden zur Familie der G-Protein vermittelten Rezeptoren gehörenden Endothelinrezeptoren  $ET_A$  und  $ET_B$ .

Der  $ET_A$ -Rezeptor befindet sich wie der  $ET_B$ -Rezeptor im Bereich der glatten Gefäßmuskelzelle. Der  $ET_B$ -Rezeptor ist zudem noch im Bereich der Endothelzellen zu finden.

Für die vasokonstriktive Wirkung bei ET-1-Stimulation ist hauptsächlich der  $ET_A$ -Rezeptor verantwortlich. Eine deutlich geringere Vasokonstriktion zeigt die Stimulation des  $ET_B$ -Rezeptors an der glatten Muskelzelle. Vasodilatierend dagegen wirkt die Stimulation des  $ET_B$ -Rezeptors an den Endothelzellen. Zusätzlich übernimmt der  $ET_B$ -Rezeptor eine Clearance-Funktion des ET-1.

Die in dieser Arbeit genutzten Substanzen waren der  $ET_A$ -Rezeptorantagonist BQ 123, der  $ET_B$ -Rezeptorantagonist BQ 788 sowie der nicht-selektive, duale ETRA Tezosentan. Dabei wurde jede Substanz bei systemischer Applikationsform und bei Aerosolisierung untersucht.

Beobachtet werden konnte die zu erwartende drucksenkende Wirkung des ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 123 und des dualen ETRA Tezosentan bei systemischer Applikation. Auch die drucksteigernde Wirkung des ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten bestätigte die zu Grunde liegende Theorie zur Wirkung des endothelial gelegenen ET<sub>B</sub>-Rezeptors.

Es zeigte sich zudem eine signifikante Wirkung des BQ 123 bei Aerosolisierung in Form einer Drucksenkung. Diese war im Vergleich zur systemischen Drucksenkung des BQ 123 deutlich geringer ausprägt. Die drucksteigernde Wirkung von BQ 788 war dagegen bei inhalativer Gabe nicht nachweisbar. Der duale ETRA Tezosentan dagegen zeigte bei inhalativer Applikation den gleichen drucksenkenden Effekt wie die systemische Applikation, obwohl nur etwa 25% der intravaskulär applizierten Substanzmenge durch Inhalation in der Lunge deponiert wurde.

Mit dem Ergebnis dieser Arbeit lässt sich nachweisen, dass die biologische Aktivität der hier untersuchten ETRA auch nach deren Aerosolisierung erhalten ist. Gezeigt wurde dies an der isoliert ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge, die unter dem Einfluss einer Bolusapplikation von ET-1 eine anhaltende Vasokonstriktion entwickelte. Dieses Modell diente so als Bioassay für die zu prüfenden ETRA. Der nächste Schritt ist die Übertragung dieser Ergebnisse in der chronischen und akuten pulmonalen Hypertonie in Ganztiermodellen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Olschewski, H. Physiologie und Pathophysiologie der Pulmonalen Hypertonie.  
*Der Internist* 40, 696-709. 1-7-1999.
2. Rich, S., E. Kaufmann, and P. S. Levy. 1992. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension  
*N.Engl.J.Med.* 327:76-81.
3. Sitbon, O., M. Humbert, J. L. Jagot, Taravella O, M. Fartoukh, F. Parent, P. Herve, and G. Simonneau. 1998. Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension.  
*Eur. Respir. J.* 12:265-70.
4. Geraci, M. W., B. Gao, D. C. Shepherd, M. D. Moore, J. Y. Westcott, K. A. Fagan, L. A. Alger, R. M. Tuder, and N. F. Voelkel. 1999. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension.  
*J.Clin.Invest.* 103:1509-1515.
5. Hoshikawa, Y., N. F. Voelkel, T. L. Gesell, M. D. Moore, K. G. Morris, L. A. Alger, S. Narumiya, and M. W. Geraci. 2001. Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling.  
*Am.J.Respir.Crit. Care Med.* 164:314-318.
6. Vane, J. R., E. E. Anggard, and R. M. Botting. 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium.  
*N.Engl.J.Med.* 323:27-36.

7. Schubert, R., V. N. Serebryakov, H. Engel, and H. H. Hopp. 1996. Iloprost activates KCa channels of vascular smooth muscle cells: role of cAMP-dependent protein kinase.  
*Am. J. Physiol.* 271:C1203-C1211.
8. Beavo, J. A. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms.  
*Physiol. Rev.* 75:725-748.
9. Bender, A. T. and J. A. Beavo. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use.  
*Pharmacol.Rev.* 58:488-520.
10. 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.
11. 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.* 34:888-894.
12. Simonneau, G., N. Galie, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebrec, R. Speich, and M. Beghetti. 2004. Clinical classification of pulmonary hypertension.  
*J.Am.Coll.Cardiol.* 43:S5-S12.
13. 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.  
*J.Am.Coll.Cardiol.* 54:S43-S54.

14. Launay, D., E. Hachulla, P. Y. Hatron, L. Goullard, T. Onimus, S. Robin, A. L. Fauchais, V. Queyrel, U. Michon-Pasturel, M. Hebbar, F. Saulnier, and B. Devulder. 2001. Aerosolized iloprost in CREST syndrome related pulmonary hypertension. *J.Rheumatol.* 28:2252-2256.
15. Abenhaim, L., Y. Moride, F. Brenot, S. Rich, J. Benichou, X. Kurz, T. Higenbottam, C. Oakley, E. Wouters, M. Aubier, G. Simonneau, and B. Begaud. 1996. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group *N.Engl.J.Med.* 335:609-616.
16. Behr, J. 2008. Pulmonary hypertension in lung diseases. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 133 Suppl 6:S196-S198.
17. 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.
18. 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.
19. Christman, BW., CD. Mc Pherson, JH. Newman, GA. King, G. Bernard, B. Groves, and J. and Lloyd. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and Prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension *N. Engl. J. Med.* 327:70-75.
20. Tuder, R. M., C. D. Cool, M. W. Geraci, J. Wang, S. H. Abman, L. Wright, D. Badesch, and N. F. Voelkel. 1999. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:1925-1932.

21. Katugampola, S. D. and A. P. Davenport. 2001. Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT(1) receptor antagonist losartan.  
*Br.J.Pharmacol.* 134:1385-1392.
22. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.  
*Nature* 327:524-526.
23. Cooper, C. J., M. J. Landzberg, T. J. Anderson, F. Charbonneau, M. A. Creager, P. Ganz, and A. P. Selwyn. 1996. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans.  
*Circulation* 93:266-271.
24. Perrella, M. A., E. S. Edell, M. J. Krowka, D. A. Cortese, and J. C. Burnett, Jr. 1992. Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia.  
*Am.J.Physiol.* 263:R45-R50.
25. Dinh-Xuan, A. T., T. W. Higebottom, and J. Wallwork. 1992. Relationship between chronic hypoxia and in vitro pulmonary relaxation mediated by endothelium-derived relaxing factors in human chronic obstructive lung disease.  
*Angiology* 43:350-356.
26. Olschewski, H., F. Rose, R. Schermuly, H. A. Ghofrani, B. Enke, A. Olschewski, and W. Seeger. 2004. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension.  
*Pharmacology & Therapeutics* 102:139-153.
27. Schror, K. and A. A. Weber. 1997. Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells.  
*Agents Actions Suppl* 48:63-91.

28. Sinzinger, H., P. Fitscha, and H. Kritz. 1997. Antimitotic actions of vasodilatory prostaglandins--clinical aspects.  
*Agents Actions Suppl* 48:92-106.
29. Veyssier-Belot, C. and P. Cacoub. 1999. Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension.  
*Cardiovasc.Res.* 44:274-282.
30. Cool, C. D., J. S. Stewart, P. Werahera, G. J. Miller, R. L. Williams, N. F. Voelkel, and R. M. Tuder. 1999. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth.  
*Am.J.Pathol.* 155:411-419.
31. Tuder, R. M., B. Groves, D. B. Badesch, and N. F. Voelkel. 1994. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension.  
*Am. J. Pathol.* 144:275-285.
32. Tuder, R. M., M. Chacon, L. Alger, J. Wang, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, C. D. Cool, A. E. Bishop, M. Geraci, G. L. Semenza, M. Yacoub, J. M. Polak, and N. F. Voelkel. 2001. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis.  
*J. Pathol.* 195:367-374.
33. Lee, S. D., K. R. Shroyer, N. E. Markham, C. D. Cool, N. F. Voelkel, and R. M. Tuder. 1998. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension.  
*J. Clin.Invest.* 101:927-934.

34. Tuder, R. M., B. Groves, D. B. Badesch, and N. F. Voelkel. 1994. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension.  
*Am. J. Pathol.* 144:275-285.
35. Yu, Y., M. Sweeney, S. Zhang, O. Platoshyn, J. Landsberg, A. Rothman, and J. X. Yuan. 2003. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression.  
*Am.J.Physiol. Cell. Physiol.* 284:C316-C330.
36. Schermuly, R. T., E. Dony, H. A. Ghofrani, S. Pullamsetti, R. Savai, M. Roth, A. Sydykov, Y. J. Lai, N. Weissmann, W. Seeger, and F. Grimminger. 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition.  
*J.Clin.Invest.* 115:2811-2821.
37. 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.
38. Partovian, C., S. Adnot, B. Raffestin, V. Louzier, M. Levame, I. M. Mavier, P. Lemarchand, and S. Eddahibi. 2000. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats.  
*Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23:762-771.
39. Partovian, C., S. Adnot, S. Eddahibi, E. Teiger, M. Levame, P. Dreyfus, B. Raffestin, and C. Frelin. 1998. Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension.  
*Am.J.Physiol.* 275:H1948-H1956.

40. Campbell, A. I., Y. Zhao, R. Sandhu, and D. J. Stewart. 2001. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension.  
*Circulation* 104:2242-2248.
41. Fuster, V., P. M. Steele, W. D. Edwards, B. J. Gersh, M. D. McGoon, and R. L. Frye. 1984. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis.  
*Circulation* 70:580-587.
42. Wagenvoort, C. A. 1970. The pathology of primary pulmonary hypertension.  
*J.Pathol.* 101:i.
43. Filep, J. G., E. Foldes-Filep, A. Rousseau, P. Sirois, and A. Fournier. 1993. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat.  
*Br.J.Pharmacol.* 110:1213-1221.
44. 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.
45. Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, and T. Masaki. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2863-2867.
46. Filep, J. G., M. G. Sirois, E. Foldes-Filep, A. Rousseau, G. E. Plante, A. Fournier, M. Yano, and P. Sirois. 1993. Enhancement by endothelin-1 of microvascular permeability via the activation of ETA receptors.  
*Br.J.Pharmacol.* 109:880-886.

47. Brunner, F., H. Stessel, and W. F. Graier. 1995. The effects of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and hypoxia on basal endothelin-1 secretion by cultured porcine aortic endothelial cells.  
*Agents Actions Suppl* 45:269-273.
48. Newby, D. E. and D. J. Webb. 1997. The endothelin system in cardiovascular disease.  
*BMJ* 314:531-532.
49. Kuchan, M. J. and J. A. Frangos. 1993. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.  
*Am.J.Physiol.* 264:H150-H156.
50. Kimura, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinimi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto, and T. Masaki. 1989. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin.  
*J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13 Suppl 5:S5-S7.
51. Fukuroda, T., T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano, and M. Nishikibe. 1994. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats.  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199:1461-1465.
52. Dupuis, J., J. L. Rouleau, and P. Cernacek. 1998. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction.  
*Circulation* 98:1684-1687.
53. Buchan, K. W., H. Magnusson, K. F. Rabe, M. J. Sumner, and I. S. Watts. 1994. Characterisation of the endothelin receptor mediating contraction of human pulmonary artery using BQ123 and Ro 46-2005.  
*Eur.J.Pharmacol.* 260:221-226.

54. Pollock, D. M., T. L. Keith, and R. F. Highsmith. 1995. Endothelin receptors and calcium signaling.  
*FASEB J.* 9:1196-1204.
55. Ohlstein, E. H., A. Arleth, H. Bryan, J. D. Elliott, and C. P. Sung. 1992. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis.  
*Eur.J.Pharmacol.* 225:347-350.
56. Luscher, T. F. and M. Barton. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs.  
*Circulation* 102:2434-2440.
57. Hirata, Y., T. Emori, S. Eguchi, K. Kanno, T. Imai, K. Ohta, and F. Marumo. 1993. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells.  
*J.Clin.Invest.* 91:1367-1373.
58. Dupuis, J., C. A. Goresky, and A. Fournier. 1996. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors.  
*J. Appl. Physiol.* 81:1510-1515.
59. Belloni, A. S., G. P. Rossi, P. G. Andreis, G. Neri, G. Albertin, A. C. Pessina, and G. G. Nussdorfer. 1996. Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats.  
*Hypertension* 27:1153-1159.
60. Cacoub, P., R. Dorent, P. Nataf, and A. Carayon. 1993. Endothelin-1 in pulmonary hypertension.  
*N.Engl.J.Med.* 329:1967-1968.

61. Cacoub, P., R. Dorent, G. Maistre, P. Nataf, A. Carayon, C. Piette, P. Godeau, C. Cabrol, and I. Gandjbakhch. 1993. Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome.  
*Am.J.Cardiol.* 71:448-450.
62. Cacoub, P., R. Dorent, P. Nataf, A. Carayon, M. Riquet, E. Noe, J. C. Piette, P. Godeau, and I. Gandjbakhch. 1997. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension.  
*Cardiovasc.Res.* 33:196-200.
63. 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.
64. Cody, R. J. 1992. The potential role of endothelin as a vasoconstrictor substance in congestive heart failure.  
*Eur.Heart J.* 13:1573-1578.
65. Barst, R. J., J. S. Gibbs, H. A. Ghofrani, M. M. Hoeper, V. V. McLaughlin, L. J. Rubin, O. Sitbon, V. F. Tapson, and N. Galie. 2009. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension.  
*J.Am.Coll.Cardiol.* 54:S78-S84.
66. Sitbon, O., M. Humbert, X. Jais, V. Ioos, A. M. Hamid, S. Provencher, G. Garcia, F. Parent, P. Herve, and G. Simonneau. 2005. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension.  
*Circulation* 111:3105-3111.
67. Moncada, S., R. Gryglewski, S. Bunting, and J. R. Vane. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.  
*Nature* 263:663-665.

68. Rubin, L. J., J. Mendoza, M. Hood, M. McGoon, R. Barst, W. B. Williams, J. H. Diehl, J. Crow, and W. Long. 1990. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial.  
*Ann.Intern.Med.* 112:485-491.
69. McLaughlin, V. V. 2002. Medical management of primary pulmonary hypertension.  
*Expert.Opin.Pharmacother.* 3:159-165.
70. Sitbon, O., V. V. McLaughlin, D. B. Badesch, R. J. Barst, C. Black, N. Galie, M. Humbert, M. Rainisio, L. J. Rubin, and G. Simonneau. 2005. Survival in patients with class III idiopathic pulmonary arterial hypertension treated with first line oral bosentan compared with an historical cohort of patients started on intravenous epoprostenol.  
*Thorax* 60:1025-1030.
71. Leuchte, H. H. and J. Behr. 2005. Iloprost for idiopathic pulmonary arterial hypertension.  
*Expert Review of Cardiovascular Therapy* 3:215-223.
72. Simonneau, G., R. J. Barst, N. Galie, R. Naeije, S. Rich, R. C. Bourge, A. Keogh, R. Oudiz, A. Frost, S. D. Blackburn, J. W. Crow, and L. J. Rubin. 2002. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.  
*Am.J.Respir.Crit. Care Med.* 165:800-804.
73. Galie, N., M. Humbert, J. Vachiery, C. Vizza, M. Kneussl, A. Manes, O. Sitbon, A. Torbicki, M. Delcroix, R. Naeije, M. Hoeper, A. Chaouat, S. Morand, B. Besse, and G. Simonneau. 2002. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary artery hypertension: a randomized, double-blind, placebo controlled trial.  
*J.Am.Coll.Cardiol.* 39:1496-502.

74. Barst, R. J., M. McGoon, V. McLaughlin, V. Tapson, S. Rich, L. Rubin, K. Wasserman, R. Oudiz, S. Shapiro, I. M. Robbins, R. Channick, D. Badesch, B. K. Rayburn, R. Flinchbaugh, J. Sigman, C. Arneson, and R. Jeffs. 2003. Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 41:2119-2125.
75. 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.
76. Olschewski, H., H. A. Ghofrani, D. Walmrath, R. Schermuly, B. Temmesfeld-Wollbruck, F. Grimminger, and W. Seeger. 1999. Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.* 160:600-607.
77. Olschewski, H., G. Simonneau, N. Galie, T. Higebottam, 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.
78. Hoeper, M. M., M. Schwarze, S. Ehlerding, A. Adler-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.
79. Ghofrani, H. A., R. Wiedemann, F. Rose, R. T. Schermuly, H. Olschewski, N. Weissmann, A. Gunther, D. Walmrath, W. Seeger, and F. Grimminger. 2002. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial.

- Lancet* 360:895-900.
80. Galie, N., H. A. Ghofrani, A. Torbicki, R. J. Barst, L. J. Rubin, D. Badesch, T. Fleming, T. Parpia, G. Burgess, A. Branzi, F. Grimminger, M. Kurzyna, and G. Simonneau. 2005. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* 353:2148-2157.
81. Ghofrani, H. A., R. Voswinckel, F. Reichenberger, H. Olschewski, P. Haredza, B. Karadas, R. T. Schermuly, N. Weissmann, W. Seeger, and F. Grimminger. 2004. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 44:1488-1496.
82. Galie, N., B. H. Brundage, H. A. Ghofrani, R. J. Oudiz, G. Simonneau, Z. Safdar, S. Shapiro, R. J. White, M. Chan, A. Beardsworth, L. Frumkin, and R. J. Barst. 2009. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2894-2903.
83. Pepke-Zaba, J., T. W. Higebottom, A. T. nh-Xuan, D. Stone, and J. Wallwork. 1991. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338:1173-1174.
84. Rossaint, R., U. Pison, H. Gerlach, and K. J. Falke. 1993. Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *Eur.Heart J.* 14 Suppl I:133-140.
85. Miller, O. I., S. F. Tang, A. Keech, and D. S. Celermajer. 1995. Rebound pulmonary hypertension on withdrawal from inhaled nitric oxide. *Lancet* 346:51-52.

86. Benigni, A., N. Perico, and G. Remuzzi. 2004. The potential of endothelin antagonism as a therapeutic approach.  
*Expert.Opin.Investig.Drugs* 13:1419-1435.
87. Benigni, A. and G. Remuzzi. 1999. Endothelin antagonists.  
*Lancet* 353:133-138.
88. Takahashi, T., T. Kanda, M. Inoue, H. Sumino, I. Kobayashi, A. Iwamoto, and R. Nagai. 1998. Endothelin converting enzyme inhibitor protects development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension.  
*Life Sci.* 63:L137-L143.
89. Fabregat, I. and E. Rozengurt. 1990. [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, a neuropeptide antagonist, blocks binding, Ca<sup>2</sup>(+)-mobilizing, and mitogenic effects of endothelin and vasoactive intestinal contractor in mouse 3T3 cells.  
*J.Cell Physiol.* 145:88-94.
90. Ihara, M., K. Ishikawa, T. Fukuroda, T. Saeki, K. Funabashi, T. Fukami, H. Suda, and M. Yano. 1992. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor.  
*J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20 Suppl 12:S11-S14.
91. Ishikawa, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fukami, S. Ozaki, T. Nagase, and . 1994. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:4892-4896.
92. Holm, P. and A. Franco-Cereceda. 1999. Haemodynamic influence and endothelin-1 plasma concentrations by selective or non-selective endothelin receptor antagonists in the pig in vivo.  
*Acta. Physiol. Scand.* 165:163-168.

93. 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.
94. Mylona, P. and J. G. Cleland. 1999. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. Cardio.net Editorial Team.  
*Eur.J.Heart Fail.* 1:197-200.
95. Weber, C., L. Banken, H. Birnboeck, and R. Schulz. 1999. Effect of the endothelin-receptor antagonist bosentan on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin.  
*J.Clin.Pharmacol.* 39:847-854.
96. Channick, R. N., G. Simonneau, O. Sitbon, I. M. Robbins, A. Frost, V. F. Tapson, D. B. Badesch, S. Roux, M. Rainisio, F. Bodin, and L. J. Rubin. 2001. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study.  
*Lancet* 358:1119-1123.
97. Treinen, K. A., C. Loudon, M. J. Dennis, and P. J. Wier. 1999. Developmental toxicity and toxicokinetics of two endothelin receptor antagonists in rats and rabbits.  
*Teratology* 59:51-59.
98. Clozel, M., H. Ramuz, J. P. Clozel, V. Breu, P. Hess, B. M. Loffler, P. Coassolo, and S. Roux. 1999. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use.  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290:840-846.
99. Treiber, A., P. L. Van Giersbergen, and J. Dingemans. 2003. In vivo and in vitro disposition profile of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, in humans.

*Xenobiotica* 33:399-414.

100. Dingemans, J., M. Clozel, and P. L. Van Giersbergen. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, following chronic infusion in healthy subjects.

*Br.J.Clin.Pharmacol.* 53:355-362.

101. 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.

102. Galie, N., H. Olschewski, R. J. Oudiz, F. Torres, A. Frost, H. A. Ghofrani, D. B. Badesch, M. D. McGoon, V. V. McLaughlin, E. B. Roecker, M. J. Gerber, C. Dufton, B. L. Wiens, and L. J. Rubin. 2008. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2.

*Circulation* 117:3010-3019.

103. Gama de, A. M., M. Heintz, A. Heller, R. Szechenyi, D. M. Albrecht, and T. Koch. 2003. One-lung ventilation with high tidal volumes and zero positive end-expiratory pressure is injurious in the isolated rabbit lung model.

*Anesth.Analg.* 96:220-8, table.

104. 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.

105. Schermuly, R., T. Schmehl, A. Gunther, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walrath. 1997. Ultrasonic Nebulization for Efficient Delivery of Surfactant in a Model of Acute Lung Injury . Impact on Gas Exchange.

- Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 156:445-453.
106. Ovadia, B., J. M. Bekker, R. K. Fitzgerald, A. Kon, S. Thelitz, M. J. Johengen, K. Hendricks-Munoz, R. Gerrets, S. M. Black, and J. R. Fineman. 2002. Nitric oxide-endothelin-1 interactions after acute ductal constriction in fetal lambs.  
*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282:H862-H871.
107. Lee, J. H., Y. G. Chun, I. C. Lee, R. M. Tuder, S. B. Hong, T. S. Shim, C. M. Lim, Y. Koh, W. S. Kim, D. S. Kim, W. D. Kim, and S. D. Lee. 2001. Pathogenic role of endothelin 1 in hemodynamic dysfunction in experimental acute pulmonary thromboembolism.  
*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1282-1287.
108. Geiger R, Neu N, Kleinsasser A, Pajk W, Fratz S, Navarro-Psiha S, Fischer V, Tremel B, and Loeckinger A. Tezosentan decreases pulmonary artery pressure and improves survival rate in an animal model of meconium aspiration.  
*Pediatr Res* 59[1], 147-150. 2006.
109. Galie, N., A. Manes, and A. Branzi. 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension.  
*Cardiovasc.Res.* 61:227-237.
110. Saleh, D., K. Furukawa, M. S. Tsao, A. Maghazachi, B. Corrin, M. Yanagisawa, P. J. Barnes, and A. Giaid. 1997. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines.  
*Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 16:187-193.
111. Jain, R., P. W. Shaul, Z. Borok, and B. C. Willis. 2007. Endothelin-1 Induces Alveolar Epithelial-Mesenchymal Transition through Endothelin Type A Receptor-Mediated Production of TGF-beta1.  
*Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 37:38-47.

112. Holm, P., J. Liska, M. Clozel, and A. Franco-Cereceda. 1996. The endothelin antagonist bosentan: hemodynamic effects during normoxia and hypoxic pulmonary hypertension in pigs.  
*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 112:890-897.
113. Vatter, H. and V. Seifert. 2006. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist.  
*Cardiovasc.Drug Rev.* 24:63-76.
114. 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, G. Simonneau, and the Bosentan Randomized Trial of Endothelin Antagonist Therapy Study Group. 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension.  
*N. Engl. J. Med.* 346:896-903.
115. Barst, R. J., S. Rich, A. Widlitz, E. M. Horn, V. McLaughlin, and J. McFarlin. 2002. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study  
*Chest* 121:1860-1868.
116. Galie, N., D. Badesch, R. Oudiz, G. Simonneau, M. D. McGoon, A. M. Keogh, A. E. Frost, D. Zwicke, R. Naeije, and S. Shapiro. 2005. Ambrisentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension.  
*J.Am.Coll.Cardiol.* 46:529-535.
117. Levin, E. R. 1995. Endothelins.  
*N. Engl. J. Med.* 333:356-363.
118. Nazario, B., R. M. Hu, A. Pedram, B. Prins, and E. R. Levin. 1995. Atrial and brain natriuretic peptides stimulate the production and secretion of C-type natriuretic peptide from bovine aortic endothelial cells.  
*J. Clin.Invest* 95:1151-1157.

119. Clozel, M., G. A. Gray, V. Breu, B. M. Loffler, and R. Osterwalder. 1992. The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186:867-873.
120. Nucci, G. D., R. Thomas, P. Orleans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T. D. Warner, and J. R. Vane. 1988. Pressor Effects of Circulating Endothelin are Limited by its Removal in the Pulmonary Circulation and by the Release of Prostacyclin and Endothelium-Derived Relaxing Factor. *PNAS* 85:9797-9800.
121. Hirata, Y., T. Emori, S. Eguchi, K. Kanno, T. Imai, K. Ohta, and F. Marumo. 1993. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 91:1367-1373.
122. 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.
123. Sato, K., M. Oka, K. Hasunuma, M. Ohnishi, K. Sato, and S. Kira. 1995. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 269:L668-L672.
124. Ladouceur, D. M., M. A. Flynn, J. A. Keiser, E. Reynolds, and S. J. Haleen. 1993. ETA and ETB Receptors Coexist on Rabbit Pulmonary Artery Vascular Smooth Muscle Mediating Contraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196:209-215.
125. MacLean, M. R., K. M. McCulloch, and M. Baird. 1994. Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles.

*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:838-845.

126. Motte, S., K. McEntee, and R. Naeije. 2006. Endothelin receptor antagonists.

*Pharmacol. Ther.* 110:386-414.

## **9. Materialien**

### **9.1 Substanzen**

Aquadest

Bacillol (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

BQ 123 ( Axxora Deutschland, Lörrach, Deutschland)

( Alexis,Grünberg, Deutschland)

BQ 788 (Clinalfa AG, Läuelfingen, Schweiz)

CO<sub>2</sub> (Linde AG, Pullach, Deutschland)

Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland)

ET-1 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland)

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)

Tezosentan (Actelion, Allschwill, Schweiz)

Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

Xylocain (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland)

## **9.2 Geräte / Herstellerangaben**

ABL Radiometer (Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland)

AD/DA – Wandlerkarte (Dicision via Harvard Apparatus, Holliston, USA)

Druckaufnehmer „Single-Use-Pressure-Transducer“ (Braun, Melsungen, Deutschland)

Drucker „Epson Stylus C66“ (Epson, Meerbusch, Deutschland)

Einkanalschreiber

Einmalspritzen 2ml / 5ml / 10 ml „BD Discardit II“ (Becton Dickinson, USA)

Farbmonitor

Filter “Iso-Gard Filter S” (Hudson RCI, High Wycombe, England)

Lichtquelle

Kanülen “BD Microlance” (Becton Dickinson, USA)

Latexhandschuhe (Semperit, Gevelsberg, Deutschland)

Messverstärker „Scout 55“ (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Perfusorpumpe „871582/3“ (Braun, Melsungen, Deutschland)

Perfusorspritze „BD Plastipak“ (Becton Dickinson, USA)

Personal Computer

Rasierer (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)

Rollerpumpe „MCP Standard“ (Ismatec, Wertheim, Deutschland)

Harvard Kleintierbeatmungspumpe „UB 6025“ (Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland)

Vernebler „Schill multisonic“ (Schill, Medizintechnik, Probstzella, 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**

Ich möchte Herrn Professor Dr. med. Jürgen Behr sehr herzlich für die Aufnahme in seinem Team, die Überlassung des Themas und für die wertvolle und konstruktive Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. med. Hanno Leuchte möchte ich für die außerordentlich gute Betreuung bei der Planung, Durchführung und Erstellung der Arbeit danken.

Mit seinem persönlichen Einsatz, der ständigen Diskussionsbereitschaft und seiner Fähigkeit zur Motivation auch in schwierigen Phasen war er eine wichtige Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit. Ferner zeigte er mir in vielen persönlichen Gesprächen Möglichkeiten und Wege auf, welche mir ohne seine Unterstützung wahrscheinlich verschlossen geblieben wären.

Ferner möchte ich allen Ärzten, Schwestern und Sekretärinnen des Schwerpunktes Pneumologie, Medizinische Klinik und Poliklinik I, meinen Dank für die Unterstützung und Aufnahme in das Team danken.

Ebenso dankbar bin ich Herrn Dr. med. Michal El-Nounou, den Technischen Assistentinnen und Assistenten Frau Arzu Pospisil, Frau Heidrun Villena-Hermoza sowie Herrn Shani Haziraj für die Unterstützung bei der Präparation und beim Versuchsaufbau.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Alois und Maria Meis sowie meinem Bruder Frank Meis. Ohne die langjährige moralische und finanzielle Unterstützung meiner Eltern sowie meines Bruder wären das Studium mit erfolgreichem Abschluss und die Dissertation nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich meiner Freundin Ann-Kathrin Pape für die Geduld und die moralische Unterstützung in den letzten Jahren sowie für die Mithilfe bei der Korrektur der Arbeit danken.

### **Originalarbeiten:**

1. Leuchte, H. H., J. Michalek, O. Soenmez, T. Meis, S. Haziraj, V. Cavalli, D. Bevec, and J. Behr.

Preserved pulmonary vasodilative properties of aerosolized brain natriuretic peptide.

*Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2009; 22:548-553.

2. Leuchte HH, Meis T, El-Nounou M, Michalek J, Behr J.

Inhalation of endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension.

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Apr; 294(4):L772-7.

### **Abstracts und Posterpräsentationen:**

1. Leuchte HH, Meis T, El-Nounou M, Behr J. Inhaled endothelin-receptor-blockers in acute pulmonary hypertension in an isolated ventilated and buffer perfused rabbit lung model.

*Eur Respir J* 2006; 28 (Suppl 50): 427s.

2. El-Nounou M, Meis T, Leuchte H, Behr J.

Einfluß selektiver Endothelinrezeptorantagonisten auf die experimentelle pulmonale Hypertonie im Modell der isolierten Kaninchenlunge.

*Pneumologie* 2007; 61: 1, A19.

3. H. Leuchte, T. Meis, J. Michalek, J. Behr

Inhalation of endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension

*Eur Respir J* 2008;

4. Leuchte HH, Meis T, Michalek J, Behr J. \*

Inhalation of Endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension

*Pneumouupdate, Innsbruck Österreich 2008*

\* Ausgezeichnet mit dem Posterpreis des Pneumouupdate 2. Platz.

5. Meis T, Michalek J, Behr J, Leuchte H. Inhalation mit Endothelinrezeptor-Blockern bei artifizieller Pulmonaler Hypertonie – Untersuchungen am Modell der isolierten Kaninchenlunge.

*Pneumologie 2009; 63: S84, P333.*

6. HH Leuchte, O Soenmez, J Michalek, T Meis, and J Behr

Differential Distribution of Inhaled Liposomal Cyclosporin as Compared to Its Systemic Administration in the Isolated Ventilated and Buffer Perfused Rabbit Lung Model.

*Am. J. Respir. Crit. Care Med., Apr 2009; 179: A2879.*

7. T Meis, J Michalek, J Behr, and HH Leuchte

Inhalation of Mono and Dual Selective Endothelinreceptorantagonists in Sustained Pulmonary Vasoconstriction.

*Am. J. Respir. Crit. Care Med., Apr 2009; 179: A6258.*