

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik V
Klinikum München
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J.Behr**

**Hämodynamische Effekte von VIP (Vasoaktives
Intestinales Peptid, Aviptadil) im Modell der isoliert
ventilierten und blutfrei perfundierten
Kaninchenlunge**

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

**vorgelegt von
Christoph Prechtl
aus
München
2014**

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Behr

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Oliver Eickelberg
Prof. Dr. Thomas Gudermann**

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Pulmonale Zirkulation.....	8
1.1.1 Physiologie der Lungenstrombahn	8
1.1.2 Regulationsmechanismen	8
1.1.2.1 von Euler - Liljestrand – Reflex	9
1.1.2.2 Senkung des PVR.....	9
1.1.3 Einfluss von Neuropeptiden auf die pulmonale Zirkulation	10
1.2 Pathophysiologische Veränderungen bei der PAH	11
1.3 Therapie.....	13
1.3.1 Etablierte Therapieansätze.....	13
1.3.1.1 Allgemeine Maßnahmen und medikamentöse Therapie.....	13
1.3.1.2 Calcium-Kanal-Blocker.....	13
1.3.1.3 Prostanoiden.....	14
1.3.1.4 Endothelin-1-Antagonisten.....	14
1.3.1.5 Phosphodiesteraseinhibitoren.....	14
1.3.2 Einschränkungen der aktuellen Therapie	15
1.3.3 VIP als potenter Kandidat.....	15
1.3.3.1 Rolle als Regulator.....	15
1.3.3.2 Vorteile der VIP – Substitution via Aerosol.....	16
1.3.3.3 Molekularer Wirkmechanismus	17
1.3.3.4 Besonderheiten der VIP-Substitution via Aerosol	17
1.3.3.5 Möglichkeit der Modulation der VIP–Substitution durch NEP 24.11.– Inhibition	18
1.4 Ziele dieser Arbeit	18
2. Methodik.....	19
2.1 Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge	19
2.1.1 Beschreibung des Organmodells.....	19
2.1.2 Präparation	19
2.1.3 Das Perfusionssystem.....	21

2.1.4 Das Beatmungssystem.....	22
2.1.5 Das Aerosolierungssystem.....	22
2.1.6 Registrierung der Parameter	23
2.2 Das Modell der U46619-induzierten pulmonalen Hypertonie an der isoliert perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge	23
2.3. Vergleichene Parameter und Zeitpunkte.....	24
2.4. Statistische Auswertung.....	25
3. Versuchsreihen.....	25
3.1 Standardisierter Versuchsablauf	25
3.1.1 U46619-induzierte pulmonale Hypertonie	25
3.1.2 Die intravasale VIP-Applikation	25
3.1.3 Die VIP-Applikation via Aerosol.....	27
3.1.4 Thiorphan-Applikation.....	28
3.2 Versuchsgruppen	29
4. Ergebnisse.....	30
4.1 Kontrollversuche	30
4.2 VIP i.v.....	34
4.3 VIP–Aerosol	35
4.4 Modulation der Wirkung von intravasal appliziertem VIP durch Thiorphan	37
4.5 Modulation der Wirkung des VIP-Aerosols durch Thiorphan.....	40
5. Diskussion	42
5.1 Die drucksenkende Wirkung von VIP im Lungenkreislauf.....	42
5.2 Modulation der pulmonal–drucksenkenden Wirkung von intravasal appliziertem VIP durch Thiorphan	42
5.3 Modulation der pulmonal–drucksenkenden Wirkung des VIP–Aerosols durch Thiorphan.....	44
5.4 Einsatz von NEP 24.11.–Inhibitoren in der Therapie der PAH.....	45
6. Ausblick	46
7. Zusammenfassung	47
8. Materialien	49
8.1. Substanzen	49
8.2. Geräte / Herstellerangaben.....	49
9. Literaturverzeichnis.....	51

10. Danksagung	57
11.Eidesstattliche Versicherung	59

Abkürzungen

ANOVA	Varianzanalyse
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ARDS	akutes Lungenversagen
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
BNP	cephales natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CKB	Calcium-Kanal-Blocker
CNP	kardiales natriuretisches Peptid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DW	Dosis-Wirkung
ET-1	Endothelin-1
G _s -Protein	stimulierendes G-Protein
HES	Hydroxyethylenstärke
HZV	Herzzeitvolumen
INR	international normalized Ratio (früher: Quick-Wert)
KG	Körpergewicht
mPAP	mittlerer pulmonal-arterieller Druck
NEP 24.11.	neutrale Endopeptidase 24.11.
NO	Stickstoffmonoxid
P _A	Druck der Alveole
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
P _c	pulmonal-kapillärer Druck
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PGI ₂	Prostacyclin
PK _A	Proteinkinase A
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Ppa	Druck der Arteriole

Ppv	Druck der Venole
PVR	peripherer vaskulärer Widerstand
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SVR	systemischer peripherer Widerstand
U46619	Thromboxan A-Mimetikum
VIP	vasoaktives intestinales Peptid, Aviptadil
VPAC-Rezeptor	VIP-vermittelnder Rezeptor

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Zirkulation

1.1.1 Physiologie der Lungenstrombahn

Die pulmonale Zirkulation zeichnet sich im Gegensatz zum Körperkreislauf durch ein geringes Druckniveau und eine geringe Druckdifferenz zwischen arteriellem und venösem System aus. So liegt der mPAP bei ca. 12mmHg und der Kapillardruck mit etwa 7-8mmHg ungefähr in der Mitte zwischen arteriellem Zustrom mit 13mmHg und venösem Abstrom bzw. dem Druck im linken Vorhof (P_c) mit 5mmHg. Während der Systole des rechten Ventrikels werden Werte von ca. 20 mmHg und in seiner Diastole ca 7mmHg in der Pulmonalarterie erreicht.¹ Dieses Druckniveau wird gemäß dem Ohm'schen Gesetz durch das Zusammenspiel der Pumpleistung des Herzens, welches durch das HZV widergespiegelt wird, und der PVR im Gefäßbett der Lunge erreicht:

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

Woraus folgt:

$$mPAP = PVR \cdot HZV + P_c \quad ^2$$

1.1.2 Regulationsmechanismen

Da weder das HZV noch der PVR konstante statische Werte darstellen, sondern sich gemäß den Anforderungen an die pulmonale Zirkulation verändern, bestehen mehrere Regulationsechanismen, um den mPAP im physiologischen Bereich zu halten. Im Vordergrund steht hierbei die Veränderung des PVR bei erhöhtem pulmonalem Perfusionsdruck bzw. erhöhtem HZV und bei Abfall des alveolären pO_2 .

1.1.2.1 von Euler - Liljestrand – Reflex

Bei alveolärer Hypoxie mit einem pO_2 unter 70 mmHg durch verminderten pO_2 in der Atemluft oder durch Hypoventilation der gesamten Alveole wie z.B. bei Atelektasen, schließen sich O_2 -sensitive K^+ -Kanäle in der glatten Muskelzelle. Die folgende Depolarisierung bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom, der die Kontraktion der glatten Muskelzelle und somit die Konstriktion der Arteriole auslöst. Dadurch werden nur ausreichend oxygenierte Alveolen in den Gasaustausch einbezogen und die Gasaustauschleistung der Lunge optimiert.

1.1.2.2 Senkung des PVR

Ein weiterer Regulationsmechanismus der pulmonalen Zirkulation ist die Vasodilatation bei steigendem HZV, z.B. bei Belastung. Dabei wird der PVR durch eine druckpassive Erweiterung der Gefäße erniedrigt (Distension). Zudem werden Gefäßabschnitte der Zone I nach John West, die in Ruhe vom Blutkreislauf ausgeschlossen waren, nun mit in die Zirkulation einbezogen (Rekrutierung). Dies ist möglich, da in Ruhe bei aufrechter Körperhaltung die Lunge inhomogen perfundiert wird. John West teilte deswegen die Lunge in drei unterschiedlich perfundierte Zonen ein. Verantwortlich dafür sind unterschiedliche Druckverhältnisse im Kapillarnetz. Diese Druckverhältnisse werden in der Lunge nicht nur wie im Körperkreislauf durch die Druckdifferenz zwischen Arteriole (P_{pa}) und Venole (P_{pv}) sondern auch durch den die Kapillare umgebenden Alveolardruck (P_A) beeinflusst. In der basal gelegenen Zone III (Zone III und IV in Abb. 1.1) werden die Kapillaren ständig perfundiert, da sowohl der P_{pa} als auch der P_{pv} höher sind als der P_A und somit die Perfusion nur von der Druckdifferenz zwischen Arteriole und Venole abhängt. In der davon cranial gelegenen Zone II ist der P_A zwar niedriger als der P_{pa} , allerdings höher als der P_{pv} . Dadurch wird die Kapillare zwar perfundiert, aber durch den Druck in der Alveole partiell komprimiert. Bestimmend für das Ausmaß der Perfusion ist hier die Differenz zwischen P_{pa} und P_A . In den apikal gelegenen Bereichen der Lunge, der Zone I, werden die Kapillaren vollständig durch den alles überwiegenden P_A komprimiert. Wenn bei Belastung nach Erhöhung des HZV in Zone I und II zunächst der P_{pa} und

später der P_{pv} den P_A übersteigen, werden die Kapillaren dekomprimiert und die Perfusion kann hier gesteigert werden bzw. überhaupt stattfinden. In dieser Situation wird die Lunge komplett homogen perfundiert. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

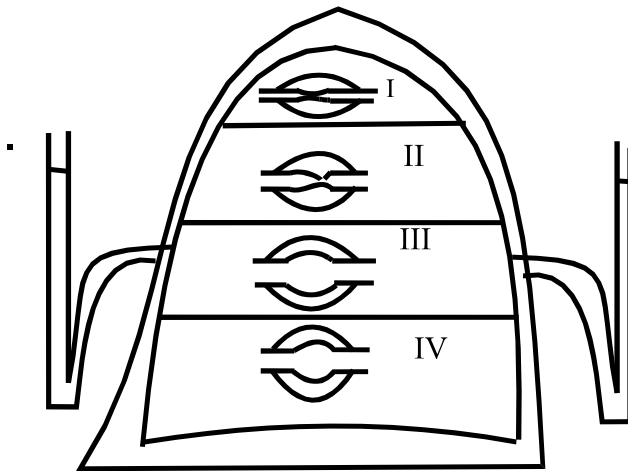


Abb. 1.1 Einteilung der Lunge in aufrechter Position in 4 Zonen nach John West³

1.1.3 Einfluss von Neuropeptiden auf die pulmonale Zirkulation

Der Einfluss von vasoaktiven neuroendokrinen Peptiden auf die pulmonale Zirkulation ist zwar belegt, jedoch wird deren Beitrag als Regulatoren noch viel diskutiert. Im allgemeinen Konsens steht, dass es unter diesen Peptiden eine Reihe von Dilatatoren und Konstriktoren gibt, die jeweils auf verschiedene Arten ihre vasoaktive Wirkung erzielen. Manche wirken direkt auf die glatte Gefäßmuskulatur und somit mit geringer zeitlicher Verzögerung. Andere regulieren über ihre diuretische Eigenschaft den mPAP. Auch der Gefäßumbau mit Mediahypertrophie (Remodelling), der eine Verengung des Gefäßlumens bzw. des Gefäßinnenradius r und somit laut dem Hagen–Poiseuille–Gesetz

$$Q = \Delta P \times \pi/8 \times 1/\nu \times r^4/l \quad 4$$

also

$$\Delta P = Q \times 8/\pi \times \nu \times l/r^4$$

eine Erhöhung des intravasalen Drucks erzeugt, wird durch Neuropeptide beeinflusst. Diurese und Remodelling haben hingegen eher Langzeiteffekte auf die pulmonale Zirkulation. Der jeweilige Regulationsmechanismus wird über die Steigerung bzw. Abschwächung der Synthese dieser Peptide und über deren enzymatischen Abbau durch Peptidasen, die wiederum verstärkt oder vermindert synthetisiert werden können, moduliert.⁵

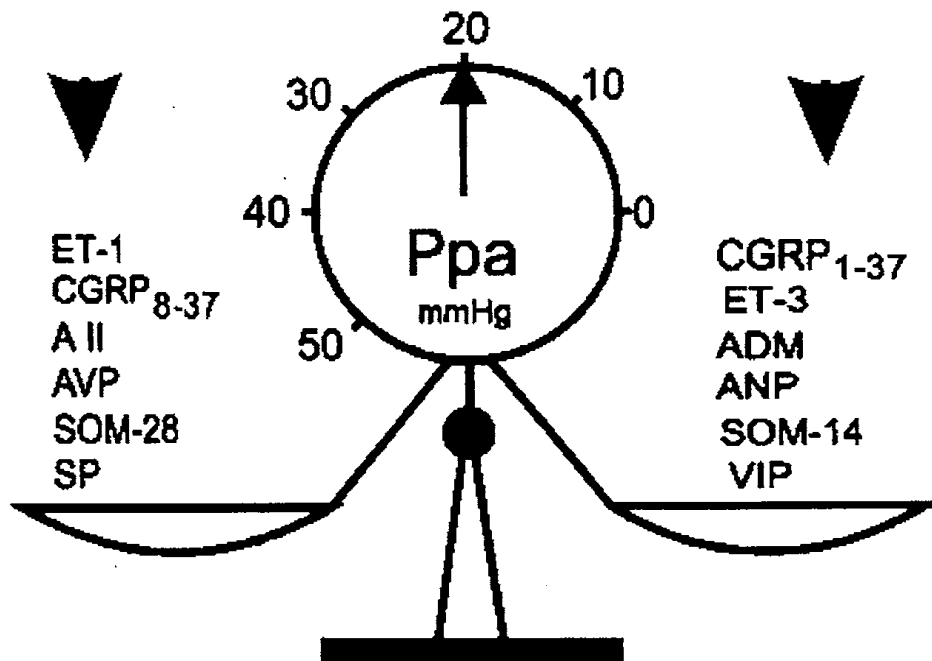


Abb.1.2 Anschauliche Darstellung des Einflusses von Neuropeptiden auf den mittleren pulmonal-arteriellen Druck. So lange drucksteigernde und drucksenkende Substanzen im Gleichgewicht stehen, bleibt der mPAP im physiologischen Bereich. Eine Überexpression von Substanzen auf der linken Seite führt zum Anstieg des mPAPs. (ET-1=Endothelin1, CGRP₈₋₃₇=calcitonin gene related peptide 8-37, A II=Angiotensin II, AVP=Arginin-Vasopressin, SOM-28=Somatostatin28, SP=Substanz P). Gleiches gilt für eine verminderte Expression der Substanzen der rechten Seite. (CGRP₁₋₃₇=calcitonin gene related peptide 1-37, ET-3=Endothelin3, ADM=Adrenomedullin, ANP=Atriales Natriuretisches Peptid, SOM-14=Somatostatin14, VIP=Vasoaktives Intestinales Peptid)⁵

1.2 Pathophysiologische Veränderungen bei der PAH

In der PAH sind der pulmonal-arterielle Druck und der pulmonal-arterielle Widerstand ohne Beteiligung einer beeinträchtigten Linksherzfunktion erhöht. Deswegen wird die PAH nicht nur durch einen mittleren pulmonalarteriellen Druck von über 25mmHg

definiert. Ein pulmonalkapillärer Druck (P_c) von unter 15mmHg ist das zweite obligate Kriterium in der Diagnostik einer PAH.⁶ Der P_c entspricht dabei näherungsweise dem linksatrialen Druck und damit dem linksventrikulären Füllungsdruck. Ein niedriger bzw. normaler P_c wird daher als Ausdruck einer normalen Linksherzfunktion gewertet. Die Ursachen eines erhöhten Drucks bei der PAH sind Vasokonstriktion, vaskuläres „Remodelling“, d.h. Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Arterien und Arteriolen, und Inflammation und Thrombose in situ. Dies führt bei Patienten mit PAH zu Dyspnoe, einem verringerten Allgemeinzustand und reduzierter Belastbarkeit, Rechtsherzhypertrophie und schließlich über ein Rechtsherzversagen im Mittel 3 Jahre nach Diagnosestellung zum Tod.⁷ Die PAH kann sekundär als Folge von Lungenerkrankungen wie einer Lungenfibrose oder einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) auftreten, die mit einer Hypoxie in den Lungenarterien einhergehen. Umweltfaktoren wie die Einnahme von Appetitzüglern können das Risiko, eine PAH zu entwickeln, erhöhen. Auch sind bereits genetische Mutationen, z.B. das „Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2“ (BMP2) im TGF- β -Rezeptor-Pathway in der PAH beschrieben.⁸ Oft bleibt die Ätiologie jedoch unklar. Unabhängig von der Ätiologie wird angenommen, dass der PAH ein Ungleichgewicht in der Expression oder Aktivität von Substanzen, die modulierend auf die pulmonale Zirkulation wirken, vorausgeht.⁹ So führt entweder ein Überschuss an Vasokonstriktoren, z.B. Thromboxan A_2 oder ein vermindertes Auftreten von Vasodilatoren, wie Prostacyclin, letztendlich zur pulmonalen Vasokonstriktion und somit zur PAH.¹⁰ Gleiches gilt für das vaskuläre Remodelling, die Inflammation¹¹ und die Thrombose in situ¹². Diese finden ebenfalls, auf Grund eines Missverhältnisses von den jeweiligen Prozess stimulierenden und inhibierenden Substanzen, vermehrt statt (vgl.Abb.1.2).

1.3 Therapie

1.3.1 Etablierte Therapieansätze

1.3.1.1 Allgemeine Maßnahmen und medikamentöse Therapie

Zunächst wird Patienten mit PAH zu einem aktiven Lebensstil, jedoch mit nur moderater körperlicher Betätigung geraten. So soll einerseits eine Verschlechterung des psychischen wie physischen Zustands des Patienten verhindert werden, andererseits einer Überlastung des rechten Ventrikels und Verschlechterung der Hämodynamik bei zu hoher körperlicher Belastung vorgebeugt werden. Aus dem selben Grund wird empfohlen, sich nicht über 1500m über Meeresspiegel aufzuhalten und bei chronischer Hypoxie eine Sauerstofflangzeittherapie durchzuführen. Eine Schwangerschaft kann zu einem rapiden Fortschreiten der PAH führen und sollte deswegen durch eine entsprechende Kontrazeption vermieden werden. Zur Prävention der Thrombose in situ wird ein INR von 2.0 durch eine moderate Anti-Koagulation angestrebt.¹³ Diuretika wirken entlastend für den rechten Ventrikel über eine verminderte Vorlast und beugen somit peripheren Ödemen und einem Rechtsherzversagen vor.^{14,15} Im weiteren Fokus der PAH-Therapie steht die Beeinflussung des Gefäßtonus. Mehrere Medikamente stehen hierfür zur Verfügung, die im Folgenden einzeln abgehandelt werden sollen.

1.3.1.2 Calcium-Kanal-Blocker

Die CKBs sind für eine kleine Gruppe von PAH-Patienten die effektivsten Vasodilatoren. Nur bei ca. 10% aller PAH-Patienten zeigen CKBs einen durchschlagenden Effekt, in dem sie die pulmonale Hämodynamik nahezu normalisieren.¹⁶ Diese 10 % zeichnen sich durch eine hervorragende Prognose aus.¹⁷

1.3.1.3 Prostanoid

Prostacyclin (PGI_2) wird von den vaskulären Endothelzellen produziert und ist vermutlich bei PAH-Patienten vermindert exprimiert.^{10,18} PGI_2 erreicht die glatte Muskelzelle per Diffusion, bewirkt über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Vasodilatation und hemmt zudem die Proliferation der glatten Muskelzelle und die Thrombozytenaggregation.¹⁵

1.3.1.4 Endothelin-1-Antagonisten

ET-1 ist ein sehr potenter Vasokonstriktor und wirkt proliferativ auf glatte Muskelzellen. Zudem wurden erhöhte Konzentrationen im Plasma und Lungengewebe von PAH-Patienten gefunden. Im Kontext der PAH entfaltet ET-1 seine Haupteffekte über 2 Rezeptoren, die ET_A - und ET_B -Rezeptoren. Die ET_A -vermittelte Reaktion bewirkt die oben genannte Vasokonstriktion und Proliferation. Die Aktivierung des ET_B -Rezeptors auf Endothelzellen hingegen bewirkt eine PGI_2 -vermittelte Vasodilatation, während ET_B -Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen auch eine Clearance-Funktion für ET-1 erfüllen. Zur Zeit werden in der Therapie der PAH Substanzen eingesetzt, die eine Blockade des ET_A -Rezeptors bzw. beider ET-Rezeptoren (ET_A und ET_B) bewirken. Dem theoretisch anzunehmenden besseren Effekt einer selektiven ET_A -Blockade gegenüber einer dualen Hemmung konnte klinisch noch keine Signifikanz zugewiesen werden.¹⁶

1.3.1.5 Phosphodiesteraseinhibitoren

Ein zentraler Stimulus für Gefäßdilataion in der Lunge ist NO. Es wird durch Endothelzellen gebildet und aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Die dadurch resultierende cGMP-Produktion wirkt vasodilatatorisch. Den gegenteiligen Effekt erzielt die Phosphodiesterase-5 (PDE-5), die durch cGMP-Abbau den Gefäßtonus erhöht. Da die PDE-5 mehr in der pulmonalen Zirkulation als im Körperkreislauf exprimiert wird, begrenzen sich die vasodilatatorischen Effekte einer PDE-5-Inhibition

auch größtenteils auf die Lunge, wodurch systemische Nebeneffekte trotz oraler Gabe weitgehend vermieden werden können.¹³

1.3.2 Einschränkungen der aktuellen Therapie

Alle diese Therapien haben ihre klinische Signifikanz z.B. durch eine Verbesserung im 6-Minuten-Geh-Test unter Beweis gestellt. Dennoch sind Patienten trotz Ansprechen der Therapie immer noch im täglichen Leben körperlich eingeschränkt und auch eine Heilung konnte bisher nicht erzielt werden. Deswegen werden seit kurzem in klinischen Studien Kombinationen mehrerer Medikamente getestet. Eine Rationale für die Kombinationstherapie sind die unterschiedlichen an der PAH beteiligten pathogenetischen Mechanismen, die folglich auch durch unterschiedliche Wirkmechanismen angesprochen werden. Man verspricht sich davon synergistische oder zumindest additive Effekte. Heutzutage ist die Kombinationstherapie die Therapieform mit den klinisch anerkannten besten Ergebnissen. Trotzdem bleiben die Patienten hinsichtlich ihrer Belastbarkeit und Lebenserwartung eingeschränkt.^{9,16}

1.3.3 VIP als potenter Kandidat

1.3.3.1 Rolle als Regulator

Ein potenter Kandidat für eine neue Therapie in der PAH stellt das VIP (vasoaktives intestinales Peptid, Aviptadil) dar. VIP ist ein körpereigenes Peptid, das sowohl vasodilatierende Eigenschaften im Lungen¹⁹- und Körperkreislauf²⁰, als auch antiproliferative²¹ und möglicherweise auch eine antithrombotische²² Eigenschaften besitzt. Seine vasodilatierende Wirkung wird sogar auf 50fach so stark wie die von Prostacyclin eingeschätzt.²³ Zudem weisen Patienten mit PAH erniedrigte Serumkonzentrationen an VIP auf, wohingegen die Expression von VIP-vermittelnden VPAC-Rezeptoren (vgl.1.3.3.3) bei diesen Patienten erhöht ist.²⁴ Diese Patienten sollten somit von einer chronischen externen VIP-Substitution profitieren.

1.3.3.2 Vorteile der VIP – Substitution via Aerosol

Immer öfter wird der systemischen Applikation das Aerosol vorgezogen. Die Lunge bietet eine enorme Absorptionsfläche und die Möglichkeit, den First-Pass-Effekt, den vorzeitigen Abbau des Medikaments in der Leber²⁵, wie z.B. nach intravenöser Gabe von VIP, zu umgehen.²⁶

Speziell beim Einsatz von Vasodilatoren wie VIP in der Therapie der PAH hat die systemische Applikationsform zwei entscheidende Nachteile: Nämlich den Abfall des systemischen Gefäßwiderstands (SVR) und die Verschlechterung des Ventilations–Perfusions–Verhältnisses und somit des Gasaustausches. Wie in 1.1.2 beschrieben, reagiert das pulmonale Gefäßbett auf eine alveoläre Hypoxie, z.B. durch eine Atelektase, mit einer Vasokonstriktion. Dadurch wird der pulmonale Blutfluss auf die gut belüfteten Alveolen konzentriert und folglich eine gute Oxygenierung erreicht. Der systemische Einsatz von Vasodilatoren bewirkt dagegen eine generelle Dilatation der Pulmonalarteriolen, also unabhängig von der Belüftung der zugehörigen Alveole. Somit gelangt nicht oxygeniertes Blut über die Pulmonalvenen in den systemisch arteriellen Kreislauf. Der systemische Einsatz von Vasodilatoren hat also eine Verschlechterung des arteriellen pO_2 und pCO_2 zur Folge und konterkariert damit den Therapieerfolg. Darüberhinaus sinken neben dem PVR unerwünschterweise auch Widerstand und Blutdruck im Körperkreislauf^{27,28,29}. Auch für VIP ist eindrucksvoll belegt, dass seiner Substitution als Aerosol durch dessen erhöhte pulmonale Selektivität weniger systemische Nebenwirkungen, wie Blutdruckabfall im Körperkreislauf, folgen. Zudem bleibt der Lunge ein Regulationsmechanismus zur Optimierung des Gasaustausches trotz gesunkener PVR erhalten.^{25,30}

Der positive Effekt einer chronischen externen VIP–Substitution via Aerosol wurde auch schon aufgezeigt.²⁴ Allerdings zeigten Leuchte und Kollegen, dass die akuten hämodynamischen Effekte einer VIP–Substitution via Aerosol eher schwach und kurz ausfallen. Trotzdem erreichte die Senkung des PVR statistische Signifikanz.³⁰

1.3.3.3 Molekularer Wirkmechanismus

Somit stellt sich die Frage, in welchem Umfang VIP nach Vernebelung überhaupt noch in biologisch aktiver Form am gewünschten Wirkort ankommt. Der molekulare Wirkmechanismus von VIP auf zellulärer Ebene ist sehr vielseitig. Diskutiert werden mehrere verschiedene Transduktionskaskaden mit Beteiligung von NO^{31} , Ca^{2+} , cAMP und sogar CO^{32} . Hier soll die Darstellung auf den für die PAH wahrscheinlich wichtigsten Mechanismus fokussiert werden. VIP wirkt in der Lunge hauptsächlich über die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2.³² Die Dilatation der pulmonalen Blutgefäße kommt vor allem durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zustande. Dabei wird ein stimulierendes G-Protein über die VPAC-Rezeptoren aktiviert. Dieses G_s -Protein aktiviert die Adenylatcyclase, die ihrerseits cAMP produziert. Die resultierende gestiegene intrazelluläre cAMP-Konzentration führt zur Relaxation der glatten Muskelzelle und somit zur Gefäßdilataion. Seit kurzem wird diskutiert, ob die erhöhte cAMP-Konzentration über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PK_A) die Ryanodin-Rezeptor-Kanäle modifiziert und es dadurch paradoxerweise zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Allerdings soll hieraus nicht eine Kontraktion der Muskelzelle resultieren. Vielmehr öffnen sich Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle. Die folgende Hyperpolarisation bewirkt schließlich die Vasodilatation.³³

1.3.3.4 Besonderheiten der VIP-Substitution via Aerosol

Bei der VIP-Substitution via Aerosol sind andere pharmakokinetische und pharmakodynamische Einflussfaktoren zu beachten als z.B. bei einer intravenösen Injektion. Am Anfang steht der Vernebelungsprozess, indem aus einer Lösung ein Aerosol generiert wird. Während dieses Prozesses ist das gelöste VIP im Vernebler unter anderem starken Scherkräften ausgesetzt, wodurch es als Peptid schon hier der Gefahr ausgesetzt ist, vorzeitig degradiert zu werden.²⁵ Desweiteren spielt für deren spätere biologische Aktivität die Größe und Ladung der entstandenen VIP-Teilchen eine große Rolle.^{34,35} Von diesen beiden Eigenschaften hängt schließlich ab, wo im Respirationstrakt sich die VIP-Teilchen nach Inhalation anlagern und wie effektiv sie vom Epithel absorbiert werden. Außerdem wird die biologische Aktivität

des VIP-Aerosols durch mehrere Faktoren des speziellen Milieus des Respirationstrakts moduliert. Hierbei sind die Luftfeuchtigkeit, die mukoziliäre Clearance³⁶, die Phagozytose durch Makrophagen³⁷ und der enzymatische Abbau durch Peptidasen^{36,43} von Bedeutung.

1.3.3.5 Möglichkeit der Modulation der VIP–Substitution durch NEP 24.11.–Inhibition

Dieser letzte Aspekt bietet einen hypothetischen Angriffspunkt für die Frage, ob und wie eine chronische VIP–Substitution unterstützt werden könnte. VIP wird im Serum vorwiegend durch die NEP 24.11. abgebaut, wodurch es eine sehr kurze Halbwertszeit im menschlichen Organismus besitzt.³⁸ Es wird aber nicht nur im Serum, sondern auch an der Alveolaroberfläche durch die NEP 24.11.^{39,40} gespalten. Somit müsste sich durch eine Inhibition der NEP 24.11., z.B. durch einen selektiven NEP 24.11.–Inhibitor wie Thiorphan, sowohl die Verweildauer des VIPs im Plasma verlängern als auch sein Abbau an der Alveolaroberfläche nach Inhalation verringern. Dadurch würde sich die biologische Aktivität und die vasoaktiven Effekte von VIP vergrößern.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Deswegen wurde in dieser Arbeit zwei Hypothesen nachgegangen: Die erste Hypothese verfolgt den Gedanken, dass VIP–Aerosol in der Lunge noch ausreichend biologisch aktiv ist, um eine signifikante Drucksenkung im Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zu erzeugen. Die zweite vertritt den Standpunkt, dass Thiorphan die vasodilatative Wirkung von VIP verlängert und verstärkt, indem dieses die Endopeptidase NEP 24.11. inhibiert,⁴¹ die hauptsächlich für den VIP-Abbau im Serum und auf der Alveolaroberfläche verantwortlich ist.^{42,43}

2. Methodik

2.1 Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge

2.1.1 Beschreibung des Organmodells

In der Literatur finden sich bereits mehrfach Beschreibungen des Modells der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge.^{44,45} Durch Präparation wird das intakte Herz–Lungen–Paket entnommen, damit eine dem Experiment frei zugängliche Situation geschaffen wird. Zentrale, humorale und metabolische Komponenten haben somit keinen Einfluss auf den Versuchsablauf sowie auf die registrierten Parameter. Folgende Parameter wurden in den Versuchen der nachfolgend beschriebenen Untersuchung kontinuierlich gemessen und registriert: pulmonalarterieller, linksatrialer und Beatmungsdruck sowie das relative Lungengewicht.

2.1.2 Präparation

Für die Präparation wurden Kaninchen der Rasse New Zealand White Bastard und 2,2-2,5kg Gewicht verwendet. Zunächst erfolgte die Einleitung der Narkose mit Ketamin (Ketamin Inresa®, Inresa, Freiburg, Germany) (30–50mg / kg KG) und Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) sowie die Antikoagulation mit Heparin (1000IU / kg KG) über die Ohrvene. An Ohr und Pfoten fixiert folgte die Rasur des Thorax und Abdomen und die Desinfektion der Haut mit Cutasept. Danach setzte man prätracheal eine Quaddel mit Xylocain (10ml; 1%-ig) und vertiefte die Narkose nochmal. Erst nachdem mittels Schmerzreiz die Schmerzfreiheit des Tiers kontrolliert und sichergestellt war, durfte mit der Präparation fortgefahren werden. Unter erhaltener Spontanatmung wurde die Trachea freipräpariert, mit einer Pinzette unterfahren und mit Zwirn umschlungen, der nach der Intubation den Tubus fixierte.

Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Beatmung des Tieres über einen Harvard-Kleintierventilator (Ventilator Typ UB 6025, Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland) mit einem Atemzugvolumen von 8-12ml Raumluft pro kg KG und 30 Atemzügen in der Minute.

Für die Laparotomie war es nötig, unter ständiger Vertiefung der Narkose die Haut über Brustbein und Rippenbogen zu entfernen. Ein kleiner Schnitt im epigastrischen Winkel ermöglichte die Fixierung des Xyphoids und das Öffnen der Bauchhöhle entlang des Rippenbogens. Um von abdominaler Seite Zugang zur Thoraxhöhle zu erhalten, musste man das Zwerchfell vom Xyphoid abpräparieren und in Expirationsstellung der Lunge beidseitig nach dorsal durchtrennen. Damit die Pulmonalarterie und die Aorta frei zugänglich waren, wurden nach Sternotomie die Rippen auseinandergespreizt, der Thymus entfernt und der Herzbeutel eröffnet. Nach vorheriger Fixierung der Herzspitze mit einer Klemme konnte man die beiden großen Gefäße mit Zwirn umschlingen. Am Übergang von rechtem Ventrikel und Pulmonalarterie wurde am schlagenden Herzen durch Inzision und Fixierung mit Hilfe des Zwirns ein dafür vorgesehener Katheter mit 3mm Innendurchmesser in der Pulmonalarterie platziert. Darüber erfolgte die Perfusion der Lunge des Versuchstiers mit 4°C kaltem Krebs-Henseleit-Puffer (120 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.4 mM CaCl₂, 1.3 mM MgPO₄, 2.4 g/L Glucose) und 2.5% Hydroxyethylamylopectine (Molekulargewicht 200,000) (Serag Wiessner, Naila, Deutschland) als onkotisches Agens. Mit Eröffnung der Herzspitze und dem Abbinden der Aorta trat der Tod des Tieres ein. 4%iges CO₂ der Beatmung beizumischen, ermöglichte es ab diesem Zeitpunkt, einen physiologischen pH-Wert von 7,34-7,38 im Perfusat einzustellen. Das Perfusat verdrängte dann vollständig das Blut in Herz und Lunge. Nun wurde das Herz-Lungen-Paket vorsichtig vom restlichen Mediastinum abgetrennt, aus dem Thorax entnommen und von Fett- und Bindegewebe befreit. Für einen freien Blick auf die Bifurkation wurde der rechte Ventrikel an der Vorderwand von der abgeschnittenen Herzspitze bis zum Abgang der Pulmonalarterie, also zum Katheter, eröffnet. Dadurch liess sich nun die Pulmonalarterie endgültig vom Herzmuskel abtrennen, was etwaige Verkrümmungen der Pulmonalarterie vermied, welche zu Indifferenzen im Perfusatfluss und bei der Messung des PAPs geführt hätten. Ein Pflasterstreifen, der Tubus und Katheter verband, beugte im weiteren Verlauf der Präparation der Gefahr der Torsion und

folgender Kompression der Pulmonalarterie durch Verdrehen der Bifurkation vor. Nach dem Zufluss des Perfusats musste nun auch der geregelte Abfluss vorbereitet werden. Dazu wurden die Segel der Mitralklappe samt Papillarmuskel und Sehnenfäden herauspräpariert und eine Tabaksbeutelnaht in den linken Ventrikel angebracht. Diese Naht dichtete dann nach Einbringen eines Katheters mit 4mm Innendurchmesser den Ventrikel ab, wodurch das Perfusat ausschließlich über diesen Katheter abfloss. Eine Ligatur schloss abschließend das linke Herzohr vom Perfusatsystem aus.

Durch das Anschließen des linksventrikulären Katheters an das Perfusatsystem schloss sich der Kreislauf. Der anschließend auf 1,2 bis 1,5mmHg, Referenzpunkt Lungenhilum, festgelegte Druck im linksventrikulären Ausflusstrakt erzielte Westzone-III-Bedingungen (siehe 1.1.2.2) in den endexpiratorischen Phasen. Darüberhinaus wurde ein positiv endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1,2–1,5 cm Wassersäule eingestellt. Eine Thermopumpe (DC 5 Thermopumpe, Haake, Karlsruhe, Deutschland) und doppelwandige Glasgefäße erwärmten das gesamte System auf 37 Grad Celsius, während man schrittweise die Perfusionsgeschwindigkeit auf 100 ml/min steigerte.

Lungen, die während der künstlichen Perfusion keine homogene weiße Oberfläche und während der Versuchsvorlaufphase Hinweise auf Hämostase oder Lungenödembildung (Gewichtszunahme) aufwiesen sowie kranke Tiere, wurden aus den Studien ausgeschlossen.

2.1.3 Das Perfusionssystem

Eine Rollerpumpe mit pulsatilem Flow (MCP Standard, Ismatec, Deutschland) hielt eine konstante Perfusion von 100ml/min aufrecht. In den Kreislauf war eine Blasenfalle eingebaut, die eine blasenfreie Perfusion garantierte und pulmonalarterielle Luftembolien vermeiden ließ. Vor Versuchsbeginn war der Rollerpumpe ein Filter (Iso-Gard Filter S Hudson RCI, High Wycombe, England) vorgeschaltet. Das Perfusat floss aus dem linken Atrium über ein Kaskadensystem ab, das eine Widerstandsregelung ermöglichte.

2.1.4 Das Beatmungssystem

Die Beatmung der Lunge erfolgte über einen Harvard-Kleintierventilator (Ventilator Typ UB 6025, Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland) mit einer Atemfrequenz von 30/Minute und einem Atemzugvolumen von 27–30ml. Nach dem Start der artifiziiellen Perfusion der Lunge begann die Beimischung von etwa 4%igem CO₂ zur inspirierten Raumlufte. Die Expiration wurde über ein PEEP-System abgeleitet. Der damit eingestellte positive endexpiratorische Druck betrug 1,2 bis 1,5cm Wassersäule.

2.1.5 Das Aerosolierungssystem

In die Inspiration konnte ein Vernebler eingeschaltet werden, über den sowohl 0,9%iges NaCl, VIP, als auch Thiorphan inhalativ verabreicht wurden. Der dabei verwendete Ultraschallvernebler (Optineb®, Nebu-Tec, Elsenfeld, Deutschland) war nur für den Verabreichungszeitraum in den Inspirationsschenkel eingebracht.

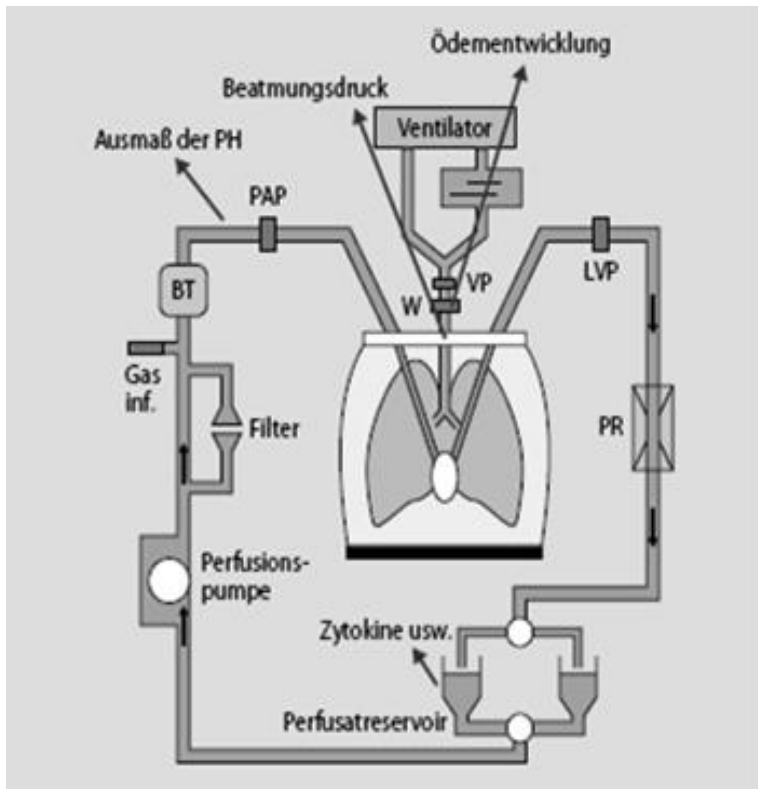


Abb.2.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; BT= Blasenfalle, PAP= Pulmonal-arterieller Druck, W= Gewicht, VP= Ventilationsdruck, LVP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck,⁴⁶

Die Größe der im Aerosol enthaltenen Teilchen beträgt bei diesem Inhalator im Mittel $4\mu\text{m}$ bei einer geometrischen Standardabweichung von $1,6\mu\text{m}$. Zudem ermittelten Schmehl und Mitarbeiter in einem vergleichbaren Modell eine absolute Aerosoldeposition von $25\pm 0.02\%$.⁴⁷

2.1.6 Registrierung der Parameter

Die Drücke in der Pulmonalarterie, im linken Vorhof und in der Trachea, sowie das relative Gewicht wurden kontinuierlich gemessen und registriert. Die Messung dieser Drücke erfolgte in der Pulmonalarterie wie auch im linken Vorhof über einen dünnen Katheter im Perfusionskatheter und in der Trachea über einen dünnen Katheter im Beatmungstubus. Diese dünnen Katheter waren parallel an einen Druckaufnehmer angeschlossen (Single-Use-Pressure-Transducer, Fa. Braun, Deutschland), der mit einem PlugSys DBA Verstärker (Hugo Sachs, Deutschland) in Verbindung stand. Darüber hinaus ermöglichten die Perfusionskatheter die Abnahme von Perfusatproben aus der Pulmonalarterie bzw. dem linken Vorhof, mit denen jederzeit die Messgrößen $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$ und pH kontrolliert werden konnten.

Eine Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland), die an einen Messverstärker („Scout 55“, Hottinger Baldwin Messtechnik) angeschlossen war, nahm mittels Kraftübertragung das relative Gewicht auf.

Letztendlich erfolgte die Registrierung der Drücke und des relativen Gewichts über einen Personal Computer, an dem die Verstärker über eine AD/DA-Wandlerkarte (Fa. Decision) angeschlossen waren.

2.2 Das Modell der U46619-induzierten pulmonalen Hypertonie an der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge

Das Modell der U46619-induzierten pulmonalen Hypertonie wurde bereits mehrfach beschrieben.^{48,49} Durch individuelle Titration des Thromboxanmimetikums U46619 (9,11-Dideoxy-11,9-Epoxy-Methano-Prostaglandin-F₂) (Paesel&Lorei, Frankfurt/

Main, Deutschland) in die zirkulierende Pufferlösung kommt es zu einer überwiegend präkapillär lokalisierten stabilen pulmonalen Hypertonie.⁴⁸

Dieses Modell diente bereits in mehreren Studien zur Untersuchung des akuten Lungenversagens (acute respiratory distress syndrome, ARDS). Dabei kam es gewollt zu einer Lungenödementwicklung mit einer relativen Gewichtseinlagerung von über 10g und einer massiven Störung des Gasaustauschs auf Grund der induzierten Hypertonie mit hohem Druckniveau von ca. 34mmHg in der Pulmonalarterie.

Da diese Phänomene die Vasoreaktivität beeinflussen, titrierte man in den vorliegenden Versuchen U46619 soweit, bis das Druckniveau in der Pulmonalarterie etwa 25mmHg erreicht hatte und mischte der Pufferlösung ein onkotisches Agens (HES) bei. Dadurch kam es bis zum Versuchsende unter diesem Druck nicht zu einem relevanten Lungenödem in den isolierten Organen.

2.3. Vergleichene Parameter und Zeitpunkte

In die Auswertung gingen der pulmonalarterielle Druck (mPAP), der Ventilationsdruck sowie das relative Lungengewicht mit ein. Die Erhebung der Messparameter fand nach Etablierung eines konstanten Druckniveaus, sowohl im Abstand von 15min über die gesamte Versuchsdauer von 120min, als auch zum Zeitpunkt der maximalen Drucksenkung nach Applikation der untersuchten Substanzen, statt. Somit ergaben sich folgende Messzeitpunkte: $t=0$, $t=15$, $t=30$, ..., $t=120$, wobei $t=0$ den Zeitpunkt der Intervention durch VIP darstellte. Zunächst wurden die Versuche ohne jegliche Intervention mit den U46619 solo-Versuchen statistisch verglichen, um eine signifikante pulmonale Hypertonie in unserem Modell zu sichern. Danach folgte der Vergleich der U46619 solo-Gruppe mit den Versuchen mit alleiniger intravasaler Applikation von VIP, sowie mit intravasaler Applikation von VIP und Thiorphan, als auch mit intravasaler Applikation von VIP und Applikation von Thiorphan als Aerosol. Im zweiten Schritt wurden die Versuche mit Applikation von NaCl via Aerosol verglichen mit der alleinigen Applikation von VIP-Aerosol, sowie mit Applikation von VIP-Aerosol und intravasaler Applikation von Thiorphan als auch mit Versuchen mit Aerosol-Applikation von VIP und Thiorphan.

2.4. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Zum statistischen Vergleich diente entweder der ungepaarte t-Test oder die einfaktorielle ANOVA (Analysis of Variance) mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Als statistisch signifikant galten p-Werte $<0,05$.

3. Versuchsreihen

3.1 Standardisierter Versuchsablauf

3.1.1 U46619-induzierte pulmonale Hypertonie

Nach 20minütiger Steady-State-Phase begann die Titration des Thromboxan-mimetikums U46619 in das Perfusionssystem. Dabei wurde so lange auftitriert, bis sich ein kontinuierliches Druckniveau von 25mmHg eingestellt hatte. Diese eingestellte Dosis durfte dann über den kompletten Versuchszeitraum nicht mehr verändert werden.

3.1.2 Die intravasale VIP-Applikation

Die intravasale Applikation von $0,043\mu\text{mol}$ VIP erfolgte bei $t=0$ nach 15min stabilem Druckplateau bei 25mmHg. Die Versuchsreihe mit intravasaler Applikation von VIP wurde nach folgender Dosis-Wirkungskurve ($n=3$) zunächst mit $0,1\mu\text{mol}$ begonnen. Es war davon auszugehen, dass mit dieser Dosis deutliche und reproduzierbare drucksenkende Effekte erzielt hätten werden können. $0,1\mu\text{mol}$ VIP senkten den mPAP um $10,83\pm 1,03$ mmHg. Nach mehreren Versuchen mit $0,1\mu\text{mol}$ intravasal appliziertem VIP (Abb.3.1.2b, $n=4$) sahen wir den drucksenkende Effekt als zu stark

an, um eine mögliche verstärkende Modulation durch Thiorphan darzustellen. Deswegen wurde die Dosis auf $0,043\mu\text{mol}$ reduziert.

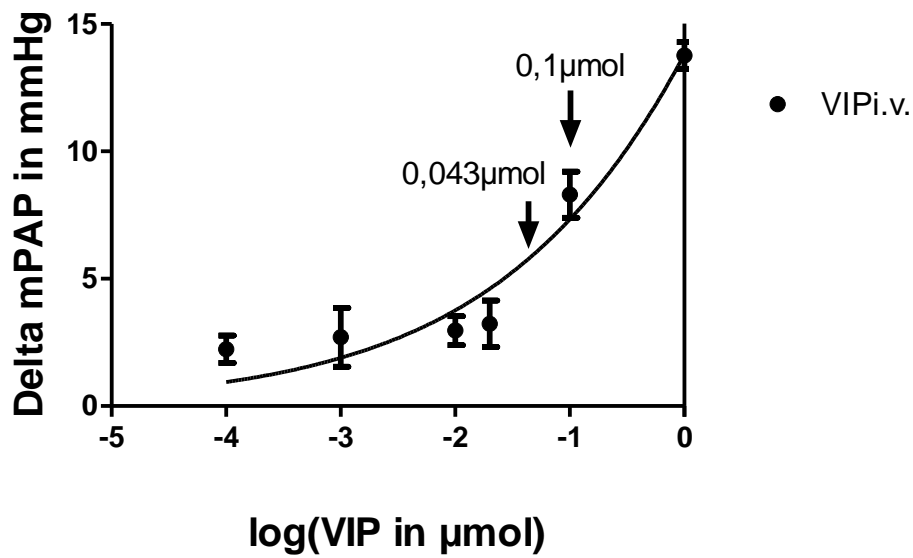


Abb. 3.1.2a Dosiswirkungskurve ($n=3$) von intravasal appliziertem VIP.

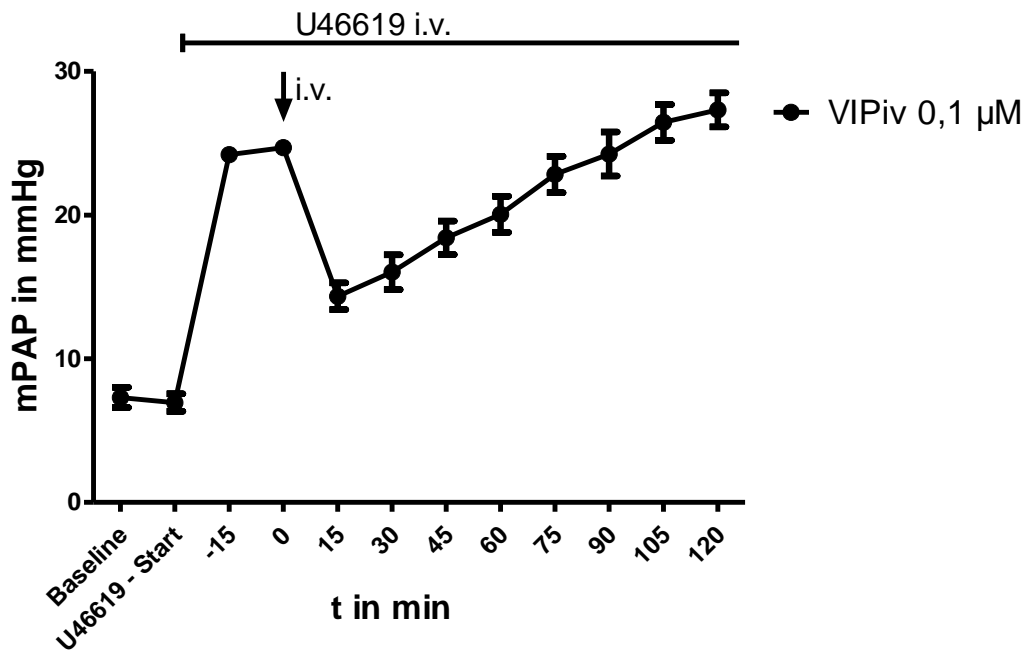


Abb.3.1.2b Intravasale Applikation von $0,1\mu\text{mol}$ VIP ($n=4$) nach Induktion einer konstanten pulmonalen Hypertonie durch U46619.

3.1.3 Die VIP-Applikation via Aerosol

Die Applikation via Aerosol startete ebenfalls bei $t=0$ nach 15min stabilem Druckplateau bei 25mmHg und dauerte 15min an. Dabei wurde wiederum versucht eine Dosis zu wählen, die einerseits in diesem Modell sichtbare und reproduzierbare Effekte zeigt, aber von deren Wirkung andererseits auch anzunehmen war, dass eine mögliche Modulation durch Thiorphan darzustellen ist. Nach intensiver Analyse der folgenden DW-Kurve wurde die VIP-Dosis auf $1,12\mu\text{mol}$ festgelegt. Diese VIP-Dosis entspricht der errechneten Menge, die tatsächlich in die Lunge eingebracht wird. Grundlage für diese Berechnung bietet wie in 2.1.5 dargestellt die Arbeit von Schmehl und Mitarbeitern, die von einer absoluten Aerosoldeposition von $25\pm 0.02\%$ der ursprünglich in den von uns verwendeten Vernebler eingebrachten Menge des Agens ausgehen.⁴⁷ Die dabei 26fach größere Dosis als bei der intravasalen Applikation von VIP liegt im Konsens mit anderen Arbeiten am selben Modell, die bei der Vernebelung eines Peptids auch eine weitaus höhere Dosis für sichtbare Effekte benötigt hatten.⁴⁶

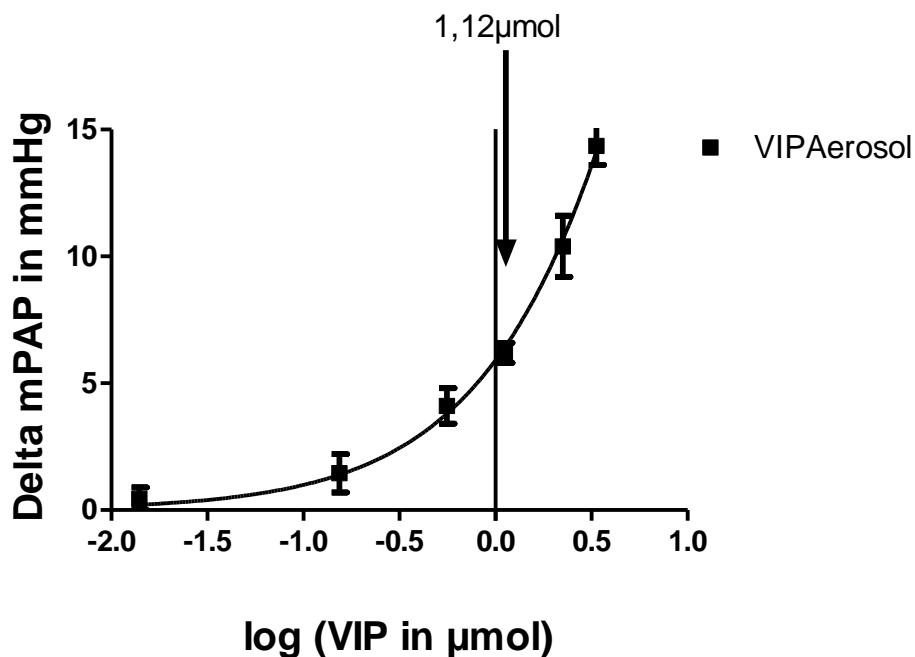


Abb.3.1.3 Dosiswirkungskurve von VIP-Aerosol ($n=2$)

3.1.4 Thiorphan-Applikation

Die intravasale Applikation von 10µmol Thiorphan erfolgte nach 2min Steady-State-Phase. Die Applikation von 1µmol Thiorphan als Aerosol begann nach 2min Steady-State-Phase und dauerte 15min lang. Die zur Applikation des VIPs zeitversetzte Thiorphan-Applikation wurde so gewählt, da bereits beschrieben wurde, dass die Inhibition der NEP 24.11. mit zeitlicher Verzögerung erfolgt.⁵⁰ Wie aus den Abb. 4.1b und 4.1c hervorgeht, zeigt Thiorphan in unserem Modell der isolierten Kaninchen-Lunge keine eigene pulmonal vasoaktive Wirkung. Zur Dosisfindung konnte eine Dosis-Wirkungskurve also nicht dienen. Auch wurde in diesem Modell Thiorphan noch nicht eingesetzt, weswegen nicht auf Referenzen in bisherigen Publikationen zurückgegriffen werden konnte. Allerdings wurde Thiorphan am humanen Organismus an lungenkranken Individuen inhalativ erprobt⁵¹. Unter Berücksichtigung des Gewichts- und Volumenunterschieds zwischen Mensch und Kaninchen wurden an Hand der in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen die Thiorphan-Dosis für das Aerosol ermittelt. Da auf Grund unserer Versuchsergebnisse eine vorwiegend auf alveolärer Seite lokalisierte NEP anzunehmen war, wurde mit der Erhöhung dieser Dosis für die intravasale Applikation lediglich eine ausreichende Inhibition der NEP durch Thiorphan sichergestellt. Somit lassen sich interferierende Faktoren wie eine mögliche unterschiedliche Diffusionsstrecke zwischen intravasal und via Aerosol verabreichtem Thiorphan zur NEP ausschließen.

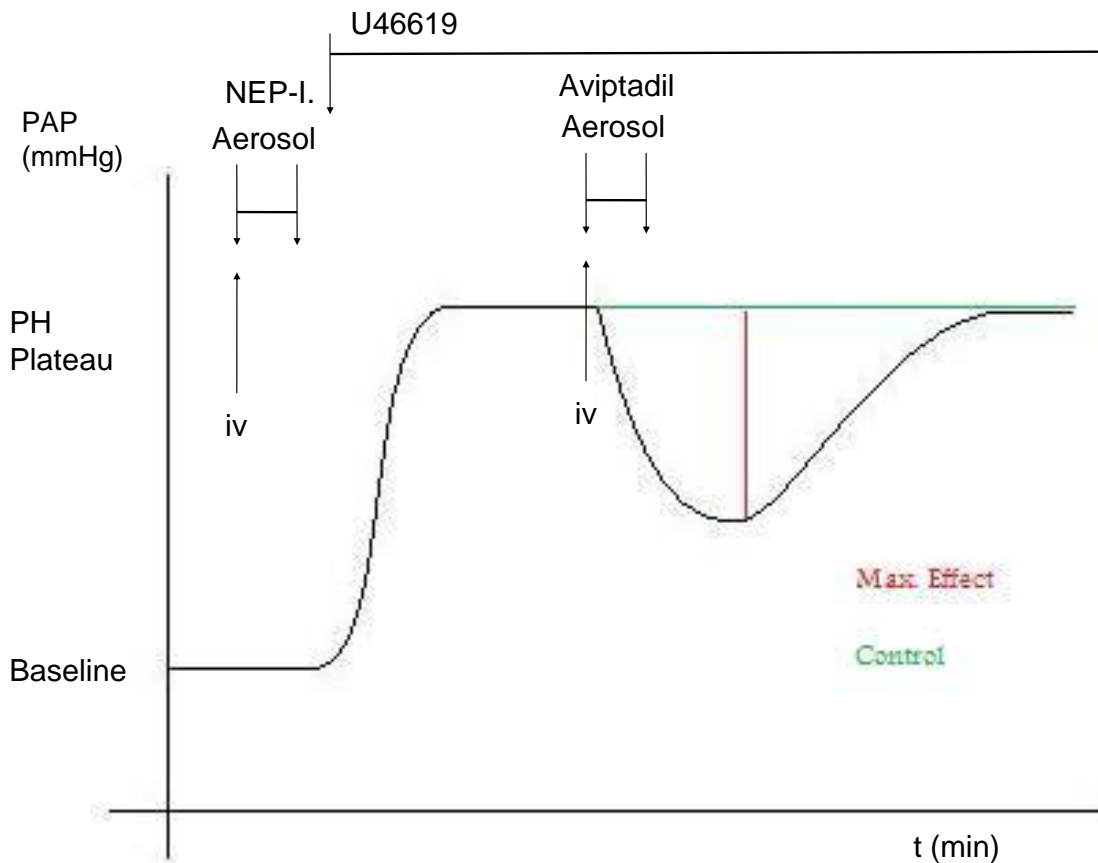


Abb.3.1 Darstellung des standardisierten Versuchsablaufs

3.2 Versuchsgruppen

Folgende Versuchsgruppen wurden definiert:

1. Kontrollversuche
2. Keine Intervention (n=4)
3. U46619 solo (n=4)
4. Dosis – Wirkungskurve von intravasal appliziertem Thiorphan nach Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 (n=4)
5. Applikation von Thiorphan via Aerosol nach 2 min Steady–State–Phase mit folgender Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 nach Standardprotokoll (n=4)
6. NaCl–Aerosol–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit NaCl–Aerosol–Applikation (n=4)

7. VIP i.v.–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit intravasaler Applikation von 0.043 μmol VIP (n=4)
8. VIP i.v. / Thiorphan i.v.–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit intravasaler Applikation von 0,043 μmol VIP und 10 μmol Thiorphan (n=4)
9. VIP i.v. / Thiorphan-Aerosol–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit intravasaler Applikation von 0,043 μmol VIP und Applikation von 1 μmol Thiorphan via Aerosol (n=4)
10. VIP–Aerosol–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit 1,12 μmol VIP – Aerosol – Applikation (n=5)
11. VIP–Aerosol / Thiorphan i.v.–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit 1,12 μmol VIP–Aerosol–Applikation und intravasaler Applikation von 10 μmol Thiorphan (n=4)
12. VIP–Aerosol / Thiorphan Aerosol–Gruppe: Induktion der pulmonalen Hypertonie mittels U46619 mit 1,12 μmol VIP–Aerosol- und 1 μmol Thiorphan–Aerosol–Applikation (n=6)

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollversuche

- a) *Keine Intervention:* Nach dem Versuchsvorlauf betrug der mPAP $6,85 \pm 0,34 \text{ mmHg}$ und änderte sich ohne Intervention über den gesamten Versuchszeitraum von 120min nicht mehr signifikant. In unseren Vorversuchen blieb dieses Druckniveau sogar über 24h konstant, wobei es weder zu einer signifikanten Gewichtseinlagerung noch zu einer Änderung des Ventilationsdrucks kam, weshalb die Entstehung eines Lungenödems durch Flüssigkeitseinlagerung in die Lunge auszuschließen ist (Abb.4.1a).

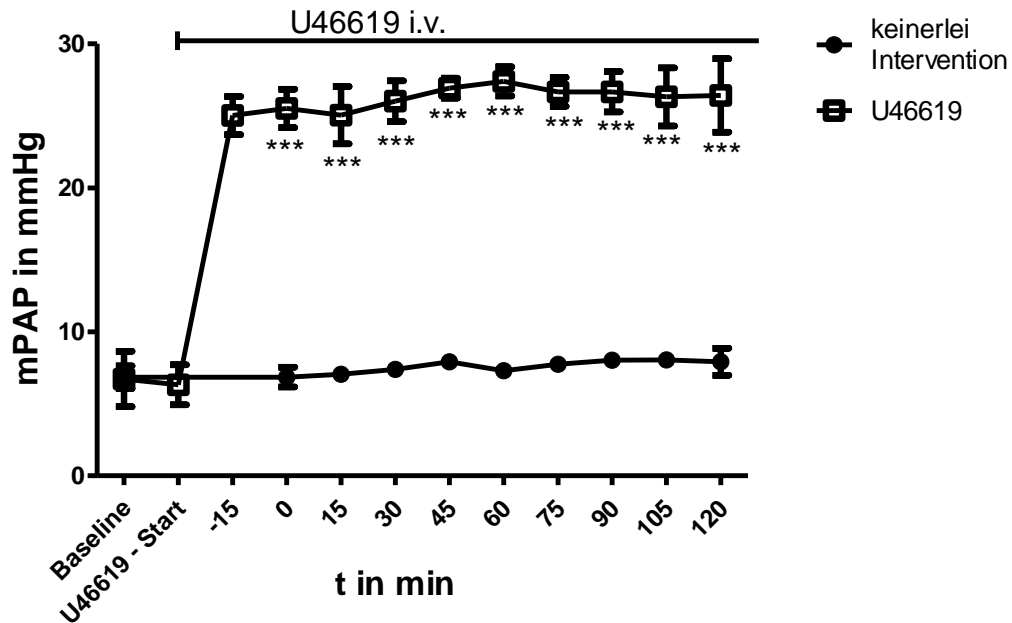


Abb.4.1a Einfluss der U46619-Titration auf den mPAP.

Verglichen wurde der mPAP an den jeweiligen Zeitpunkten. (***)= $p < 0,0005$; $n=4$ je Gruppe)

b) *U46619 solo*: Nach 20 min Steady–State–Phase wurde mit der U46619–Titration begonnen, wodurch eine pulmonale Hypertonie bei $25,53 \pm 0,67$ mmHg induziert wurde. Dabei änderte sich der mPAP über den gesamten Zeitraum von 120min nicht mehr signifikant und wiederum kam es weder zu einer signifikanten Gewichtseinlagerung noch zu einer Änderung des Ventilationsdrucks. Der mPAP der Kontrollversuche unterschied sich erst nach Beginn der U46619–Titration signifikant von dem der U46619 solo–Gruppe (Abb.4.1a).

c) *Dosis–Wirkungskurve von intravasal appliziertem Thiorphan*: Der mPAP der Dosis–Wirkungskurve von intravasal appliziertem Thiorphan auf die U46619–erzeugte pulmonale Hypertonie unterschied sich nicht signifikant von der U46619 solo–Gruppe. Auch nach der Applikation von $100 \mu\text{mol}$ Thiorphan, also der 10fachen Konzentration, die später in den Versuchsreihen mit VIP appliziert wurde, konnte keine signifikante Änderung des mPAP beobachtet werden. Auf die Fortsetzung der Versuchsbeobachtung über die ganze Versuchsdauer von 180 Minuten wurde auf Grund der fehlenden vasoaktiven

Wirkung von Thiorphan verzichtet. Das relative Lungengewicht und der Ventilationsdruck änderten sich nicht signifikant (Abb.4.1c).

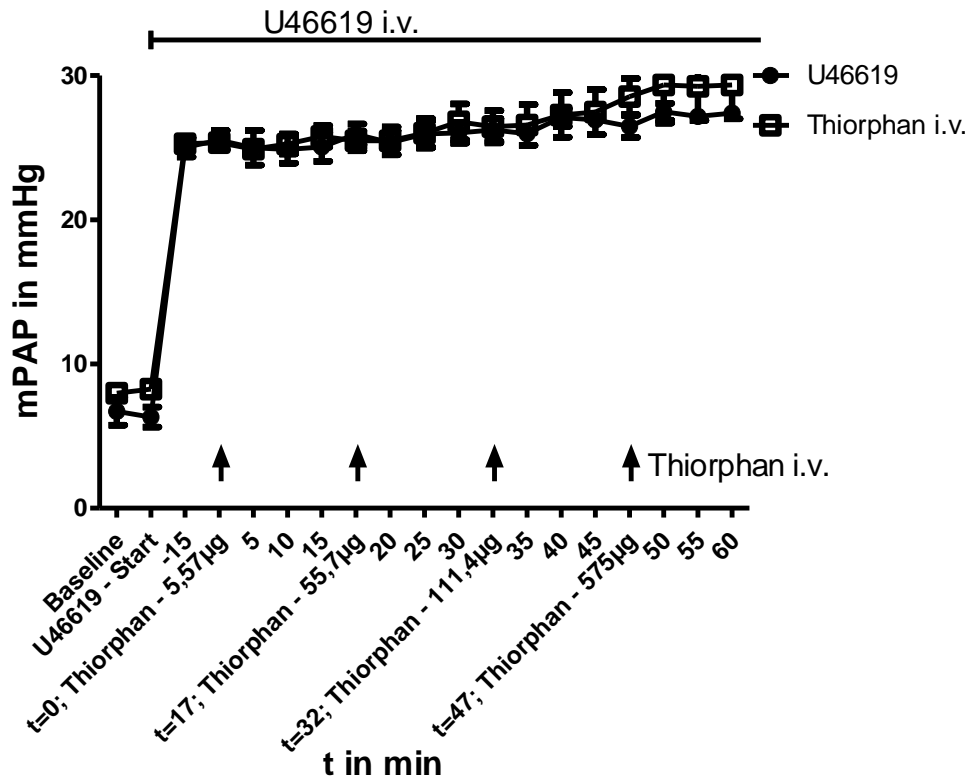


Abb.4.1c Vergleich des mPAPs der U46619-Gruppe und der Thiorphan-Dosis-Wirkungskurven (n=4 je Gruppe). Im beobachteten Zeitraum ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

d) Applikation von Thiorphan via Aerosol: Die Applikation von Thiorphan via Aerosol mit darauf folgender U46619-Titration nach dem Standardprotokoll zeigte keine signifikante Abweichung in mPAP, relativem Lungengewicht noch im Ventilationsdruck gegenüber den U46619 solo-Versuchen (Abb.4.1d).

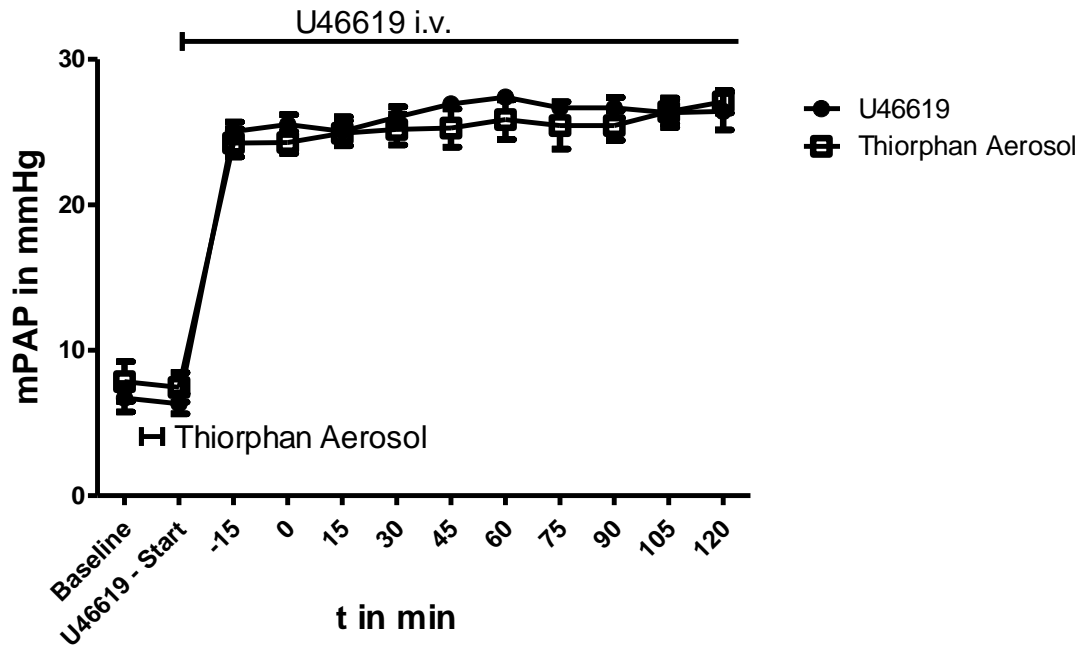


Abb.4.1d Einfluss der Applikation von Thiorphan via Aerosol nach Induktion der pulmonalen Hypertonie durch U46619. Das Thiorphan-Aerosol wurde vor dem Start der U46619-Titration über eine Zeitspanne von 15 min appliziert. Wiederum ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen.

e) *NaCl-Aerosol*: Die Applikation des NaCl-Aerosol als Placebo auf die U46619-induzierte pulmonale Hypertonie zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den mPAP. Auch hier kam es nicht zu einer signifikanten Änderung des relativen Lungengewichts und des Ventilationsdrucks (Abb.4.1e).

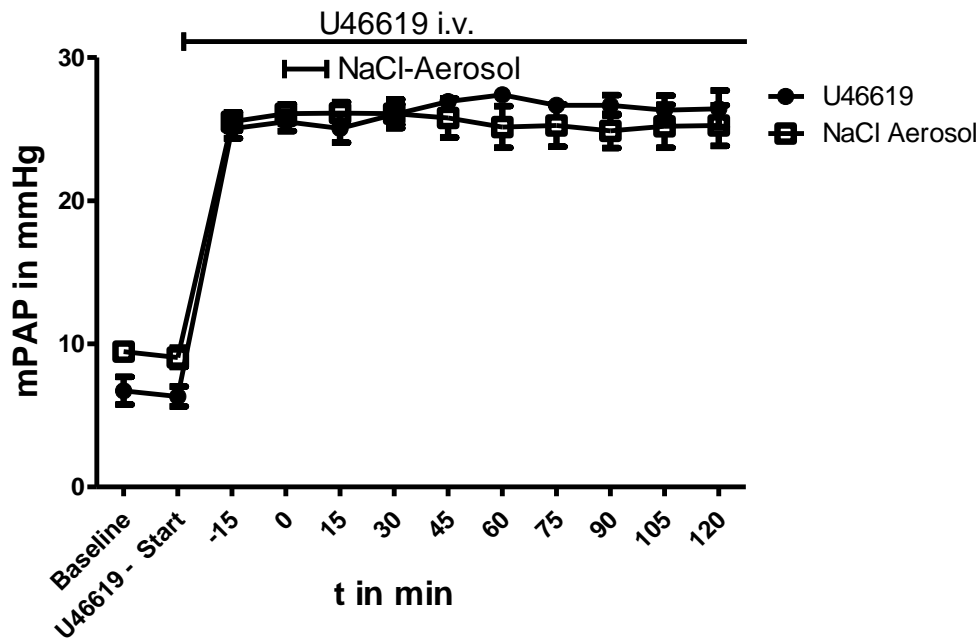


Abb.4.1e Einfluss der Applikation von NaCl via Aerosol als Placebo. Das NaCl-Aerosol wurde nach dem selben Protokoll wie das VIP-Aerosol appliziert. Zu keinem Messzeitpunkt erzielte das NaCl-Aerosol eine signifikante Wirkung auf den mPAP.

4.2 VIP i.v.

Nach intravasaler Applikation von VIP 15 min nach Erreichen eines konstanten Druckplateaus erfolgte eine signifikante Drucksenkung des mPAP bei t=15, t=30, t=45 und t=60. Die maximale Drucksenkung betrug dabei im Mittel $7,50 \pm 0,96$ mmHg. Danach kehrte der mPAP zum Ausgangsniveau zurück und änderte sich bis zum Ende der Versuchsbeobachtung bei t=120 nicht mehr signifikant (Abb.4.2).

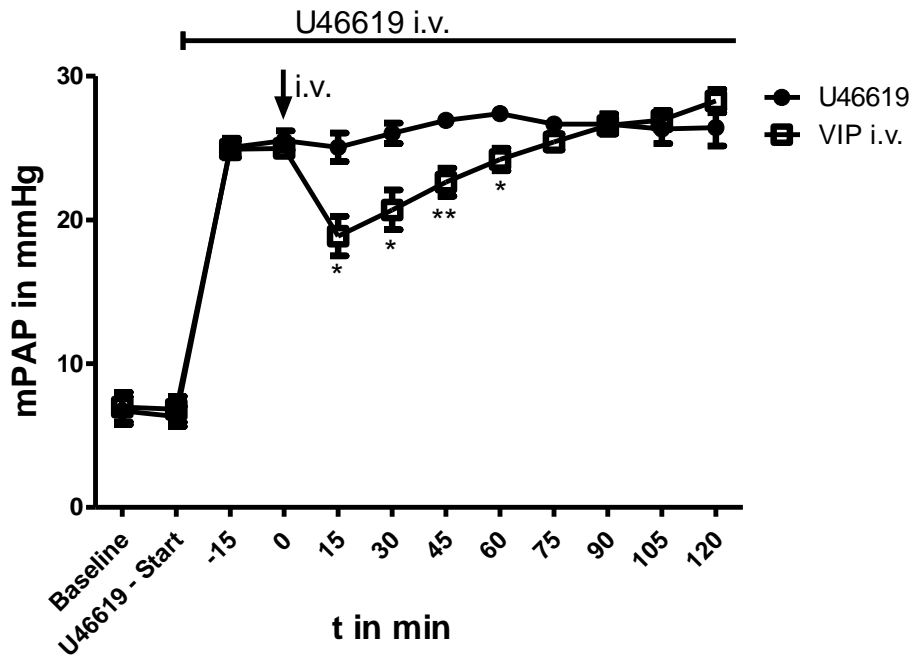


Abb.4.2 Darstellung der signifikanten Drucksenkung von intravasal appliziertem VIP an den Messzeitpunkten $t=15$, $t=30$, $t=45$ und $t=60$. (*= $p<0,05$; **= $p<0,005$)

4.3 VIP–Aerosol

Das VIP–Aerosol senkte verglichen mit den NaCl-Aerosol-Versuchen den mPAP um $5,94 \pm 0,22$ mmHg im Maximum und erreichte an den Messpunkten $t=15$, $t=30$ Signifikanz. Auch hier stieg der mPAP wieder auf das Niveau des Ursprungsplateaus an und erreichte für die restliche Versuchsdauer keine statistische Signifikanz mehr (Abb.4.3a).

Verglichen mit den Effekten von intravasal appliziertem VIP zeigte das VIP-Aerosol eine leicht schwächere drucksenkende Wirkung. Jedoch erreichten die Unterschiede weder an den vorgegebenen Messpunkten noch in der maximalen Drucksenkung statistische Signifikanz. Um also eine ähnliche Wirkung wie nach intravasaler Applikation von VIP zu erreichen, war eine 26fach höhere Dosis nötig (Abb.4.3b,c).

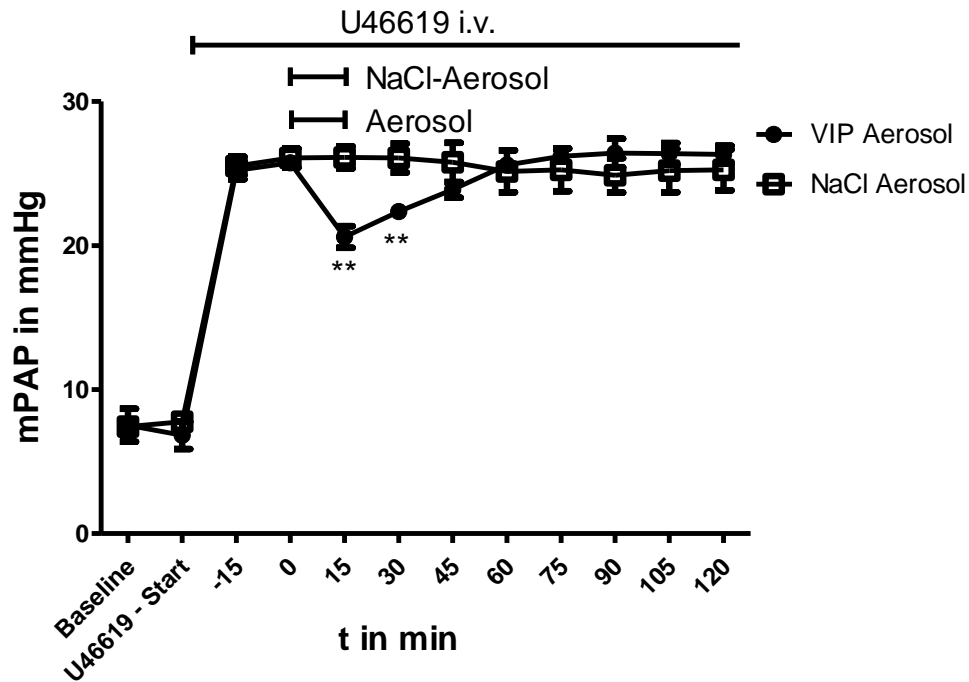


Abb.4.3a Vergleich der VIP-Aerosol- (n=5) und der NaCl-Aerosol-Gruppe (n=4).

Eine signifikante Drucksenkung erreichte das VIP-Aerosol an den Messzeitpunkten t=15 und t=30 (**=p<0,005).

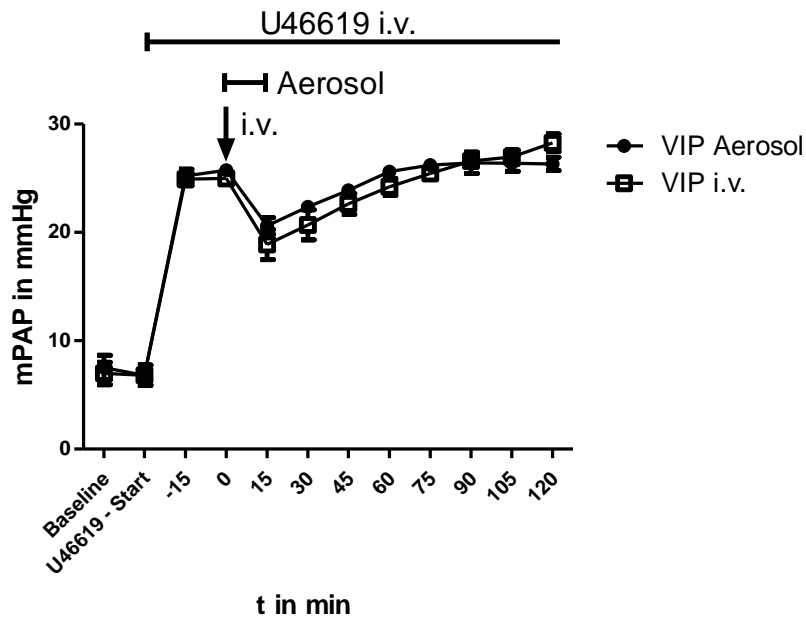


Abb.4.3b Vergleich der drucksenkenden Effekte von VIP als Aerosol (n=5) appliziert und von intravasal appliziertem VIP (n=4). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Versuchszeitraum.

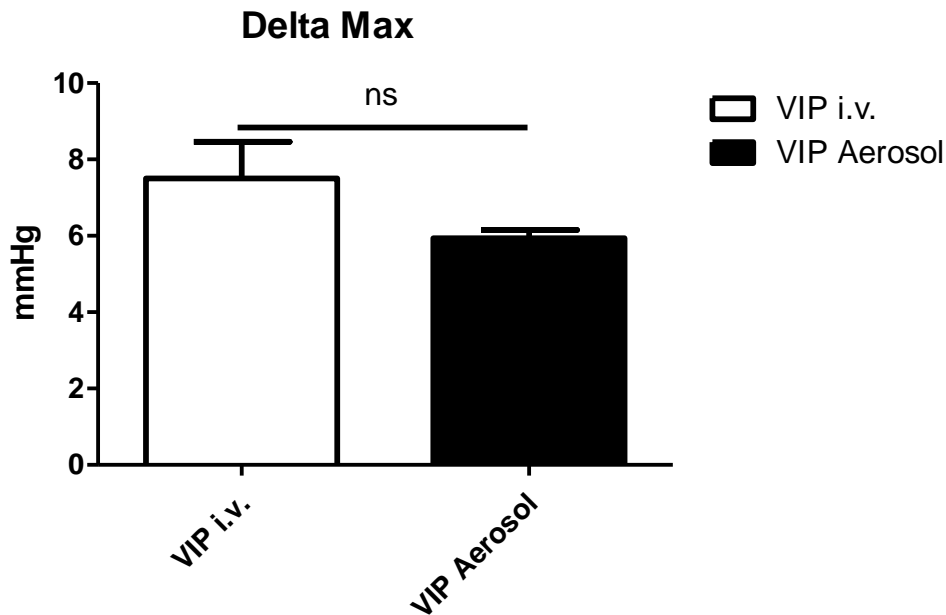


Abb.4.3c Vergleich der maximal erzielten Drucksenkung von VIP als Aerosol ($n=5$) appliziert und von intravasal appliziertem VIP ($n=4$). Die im Maximum tendenziell höhere Drucksenkung von intravasal appliziertem VIP erzielte keine Signifikanz.

4.4 Modulation der Wirkung von intravasal appliziertem VIP durch Thiorphan

Thiorphan und die damit verbundene Hemmung der NEP 24.11. schwächte die drucksenkende Wirkung von intravasal appliziertem VIP ab. Dabei erreichte die maximale Drucksenkung $5,95 \pm 0,59$ mmHg, wenn Thiorphan intravasal appliziert wurde. Wenn Thiorphan als Aerosol appliziert wurde, sank der mPAP im Maximum mit $4,45 \pm 0,55$ mmHg signifikant weniger als ohne vorangegangene Thiorphanapplikation. Im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte unterschieden sich die Versuche der VIP i.v.-Gruppe weder signifikant von der VIP i.v.-Thiorphan i.v.-Gruppe noch von der VIP i.v.-Thiorphan Aerosol-Gruppe. Die signifikanten Unterschiede im mPAP verglichen mit der U46619-Gruppe blieben trotz Hemmung der NEP 24.11. mit den Messzeitpunkten $t=15$, $t=30$, $t=45$ und $t=60$ unverändert zur VIP i.v.-Gruppe (Abb.4.4a,b,c).

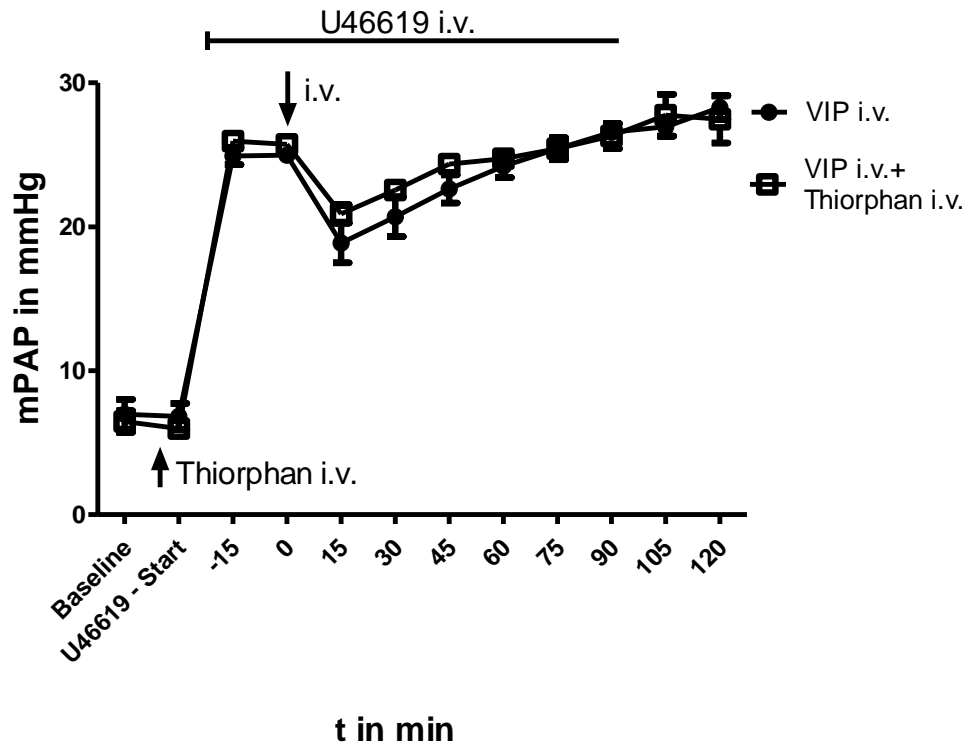


Abb.4.4a Modulation der drucksenkenden Effekte von intravasal appliziertem VIP durch intravasal appliziertes Thiorphan (n=4 je Gruppe). Es wurde ein nicht signifikant geringeres Ausmaß der Drucksenkung erzielt.

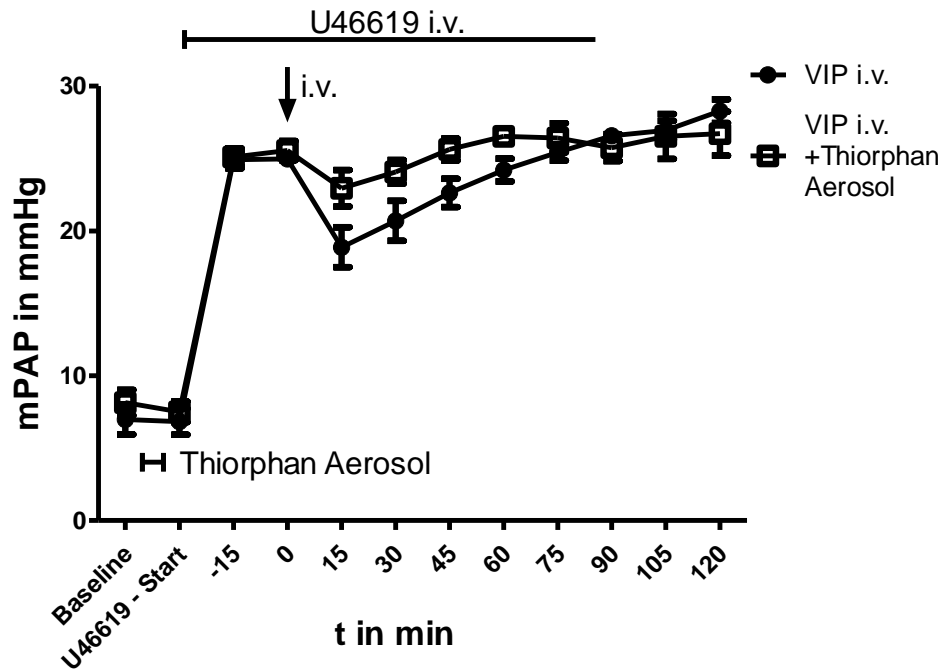


Abb 4.4b Modulation der drucksenkenden Effekte von intravasal appliziertem VIP plus Thiorphan via Aerosol appliziert ($n=4$ je Gruppe). Es wurde ein geringeres und nicht signifikant abweichendes Ausmaß der Drucksenkung erzielt.

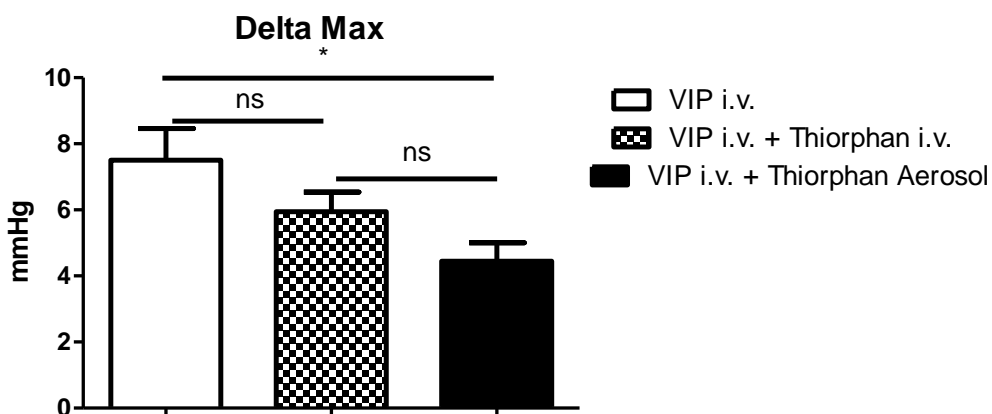


Abb.4.4c Darstellung der maximal erzielten Drucksenkung von intravasal appliziertem VIP und deren Modulation durch intravasal und via Aerosol appliziertes Thiorphan ($n=4$ je Gruppe). Dabei verringerte Thiorphan die maximale Drucksenkung, was bei via Aerosol appliziertem Thiorphan Signifikanz erreichte ($*=p<0,05$).

4.5 Modulation der Wirkung des VIP-Aerosols durch Thiorphan

Im Vergleich zu intravasal appliziertem VIP zeigte beim VIP-Aerosol die Hemmung der NEP 24.11. einen komplett gegensätzlichen Effekt hinsichtlich der drucksenkenden Wirkung. Hier verstärkte das intravasal applizierte Thiorphan die maximal drucksenkende Wirkung des VIPs signifikant auf $11,00 \pm 1,13 \text{ mmHg}$ und das aerosolisierte Thiorphan signifikant auf $13,43 \pm 1,49 \text{ mmHg}$. Zudem verlängerte sich die Dauer der signifikanten Drucksenkung auf die Messzeitpunkte $t=15, t=30, \dots, t=120$. Der mPAP kehrte somit während des Beobachtungszeitraums nicht mehr auf das Niveau des Plateaus zurück, sondern erreichte erst nach 180-240min wieder das Niveau des Plateaus, was aber nicht in die statistische Berechnung einging. Dabei zeigte das Thiorphan-Aerosol die Tendenz, die Wirkung des VIP-Aerosols mehr zu verstärken als das intravasal applizierte Thiorphan. Im direkten Vergleich der VIP Aerosol / Thiorphan i.v.- und der VIP Aerosol / Thiorphan Aerosol-Gruppen ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede (Abb.4.5a,b,c).

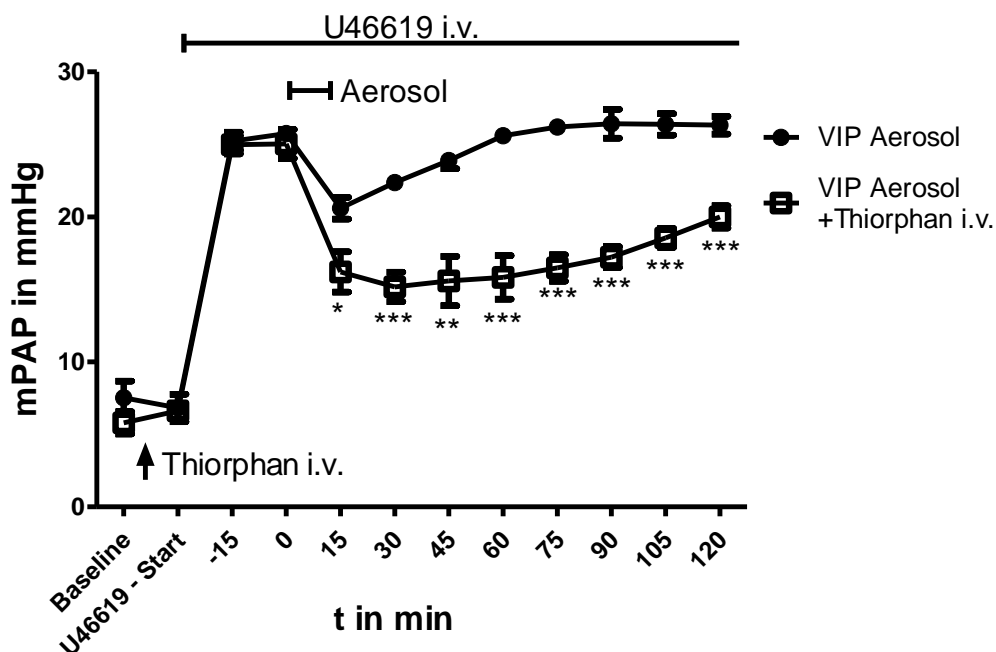


Abb.4.5a Modulation der drucksenkenden Effekte von VIP-Aerosol ($n=5$) durch intravasal appliziertes Thiorphan ($n=4$). Die drucksenkende Wirkung wurde signifikant gesteigert und verlängert (*= $p<0,05$; **= $p<0,005$; ***= $p<0,0005$).

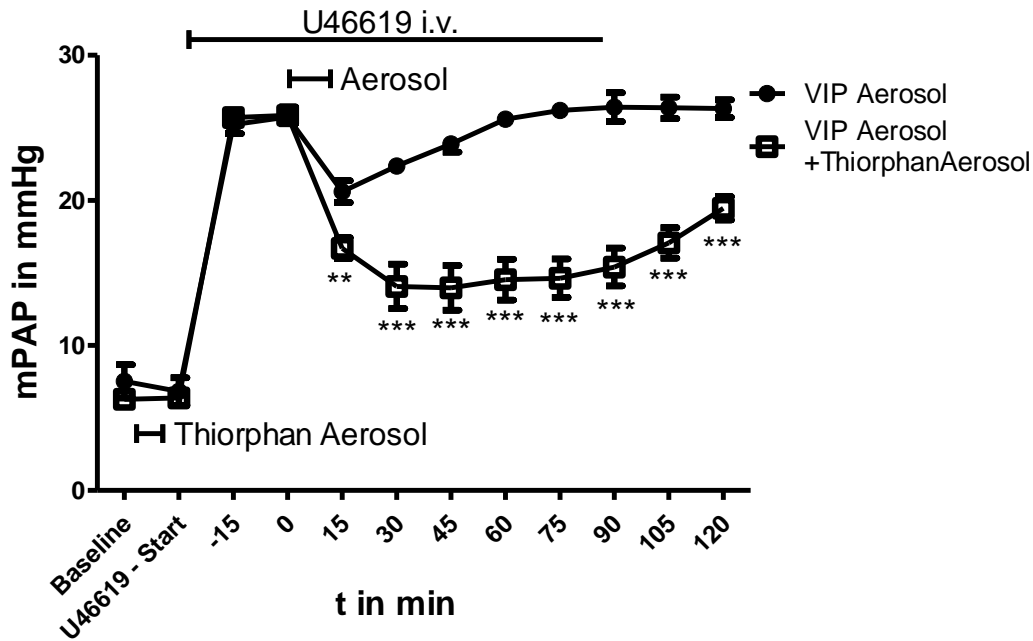


Abb.4.5b Modulation der drucksenkenden Effekte von VIP-Aerosol (n=5) durch via Aerosol appliziertes Thiorphan (n=6). Die drucksenkende Wirkung wurde signifikant gesteigert und verlängert (**=p<0,005; ***=p<0,0005).

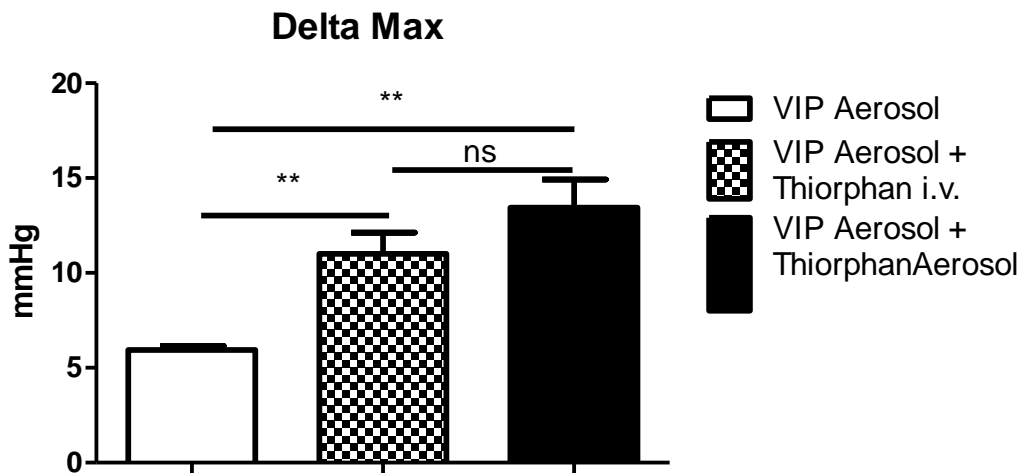


Abb.4.5c Darstellung der maximal erzielten Drucksenkung von VIP-Aerosol (n=5) und deren Modulation durch intravasal (n=4) und via Aerosol (n=6) appliziertes Thiorphan. Dabei verstärkte Thiorphan signifikant die maximale Drucksenkung (**=p<0,005). Die stärkste maximale Drucksenkung unserer Versuchsreihen wurde in der VIP Aerosol / Thiorphan Aerosol-Gruppe erreicht.

5. Diskussion

Durch die vorliegende Arbeit konnten wir die pulmonal vasodilatierende Wirkung von intravasal appliziertem VIP mit der des VIP–Aerosols vergleichen. Zudem ließ sich der Einfluss der Hemmung der NEP 24.11. auf die vasodilatatorischen Effekte des VIPs darstellen.

5.1 Die drucksenkende Wirkung von VIP im Lungenkreislauf

Das intravasal applizierte VIP erbrachte die erwartete pulmonale Drucksenkung.²³ Zudem zeigen unsere Daten, dass das VIP–Aerosol auch noch nach dem Vernebelungsprozess ausreichend biologische Aktivität besitzt, um eine signifikante Drucksenkung zu erzielen. Allerdings ist dafür eine deutlich höhere Dosis nötig. Der Grund dafür könnte sein, dass VIP schneller bzw. effizienter in den Atemwegen abgebaut wird als in den Blutgefäßen. Die NEP 24.11. wurde bereits als das Enzym identifiziert, das hauptverantwortlich für den VIP–Abbau ist.³⁸ Außerdem wurde die NEP bereits in den Atemwegen und in den Blutgefäßen lokalisiert.^{39,40,42} Allerdings wurde noch nicht untersucht, ob die Umsatzrate, mit der sie das VIP im pulmonalen Kompartiment abbaut, von der im intravasalen Kompartiment abweicht. Dies würde erklären, wieso bei uns, aber auch in anderen Arbeiten⁴⁶ für eine annähernd gleiche Drucksenkung durch das Aerosol eine 26fach höhere Dosis nötig ist als bei der intravasalen Applikation des Agens.

5.2 Modulation der pulmonal–drucksenkenden Wirkung von intravasal appliziertem VIP durch Thiorphan

Wie oben beschrieben, baut die NEP 24.11. das VIP zu einem großen Umfang in den Blutgefäßen ab, wodurch VIP im intakten Organismus nur eine sehr kurze Halbwertszeit im Serum besitzt.⁵² Somit wäre anzunehmen, dass auch in unserem Modell der isolierten Kaninchenlunge eine Hemmung der NEP 24.11. durch

Thiorphan die drucksenkende Wirkung von intravasal appliziertem VIP verstärkt bzw. verlängert. Unsere Daten zeigen, dass das Gegenteil der Fall ist, unabhängig davon, ob die Inhibition durch intravasal oder via Aerosol appliziertem Thiorphan vollzogen wurde. Dies steht im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen von Studien, die den Einfluss von Peptidaseinhibitoren im Krankheitsbild der systemischen Hypertension untersuchten. Hierbei erhoffte man sich, durch Inhibition von Endopeptidasen die Konzentration von vasodilatierenden Peptiden zu erhöhen. Doch selbst wenn quantifiziert werden konnte, dass eine NEP-Inhibition die Konzentration von antihypertensiven Substanzen wie ANP erhöht, war keine signifikante Drucksenkung nachweisbar.⁵³ Zurückgeführt wird diese Tatsache auf die mit der NEP-Inhibition einhergehende Verminderung des Abbaus vasokonstriktorischer Substanzen wie Angiotensin II.^{54,55} Eine weitere Arbeit untersuchte in vivo genauer den Einfluss einer intravasalen NEP-Inhibition auf die Konzentration von exogen zugeführtem CNP und dessen Metabolismus. Die NEP-Inhibition verminderte zwar die systemische CNP-Clearance und steigerte somit die systemische CNP Konzentration.⁵⁶ Auf pulmonaler Ebene wurde jedoch ein zwar statistisch unsignifikanter, aber dennoch erhöhter CNP-Abbau gemessen.⁵⁶ Da VIP zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich von der NEP abgebaut wird, übernimmt möglicherweise eine andere Peptidase den Abbau des VIPs. In der Lunge muss eine NEP-Inhibition also nicht zwangsläufig zu einem erniedrigten Abbau von intravasal appliziertem VIP führen. Auch in unserem Modell lässt sich keine Erklärung für dieses Phänomen finden. In unseren Kontroll- und Vorversuchen zeigte Thiorphan sowohl in einer Dosiswirkungskurve auf das durch U46619-erzeugte Druckplateau intravasal appliziert, als auch als Aerosol vor dem Start der U46619-Titration appliziert, keinen Einfluss auf den mPAP. Somit lässt sich auch eine vasokonstriktorische Wirkung von alleinig appliziertem Thiorphan ausschließen. An der isolierten Rattenlunge wurde bereits gezeigt, dass durch Applikation eines neuroendokrinen Peptides, wie ET-1 eine Gegenregulation durch NO-Freisetzung erfolgte.⁵ Wenn in unseren Versuchen der mPAP durch die Applikation von VIP gesenkt wird, wäre eine gegenregulatorische Freisetzung von vasokonstriktorisches neuroendokrinen Peptiden aus subepithelialen Nervenfasern denkbar.^{57,58} Diese freigesetzten Vasokonstriktoren werden, wie das VIP, zum großen Teil von der NEP 24.11. gespalten. Nur ist nicht bekannt in welchem Ausmaß die NEP 24.11. Vasodilatoren und Vasokonstriktoren abbaut.⁵⁹ Eine höhere Affinität

der NEP 24.11. zu VIP würde vorrangig zu einem vermehrten Abbau des VIPs und weniger von Vasokonstriktoren führen. Folglich würden diese Vasokonstriktoren die vasodilatatorischen Effekte des VIPs in stärkerem Umfang mindern, als wenn VIP ohne Thiorphan appliziert wurde. Darüberhinaus könnten andere Endopeptidasen die verminderte Umsatzrate der inhibierten NEP ausgleichen. Eine letztendliche Aufklärung dieser Problemstellung würde eine genaue Identifizierung, Lokalisierung und Quantifizierung der biologischen Aktivität aller an der Regulation der pulmonalen Zirkulation beteiligten Peptide und Endopeptidasen erfordern.

5.3 Modulation der pulmonal-drucksenkenden Wirkung des VIP-Aerosols durch Thiorphan

Im Gegensatz zur intravasalen VIP-Gabe konnten die drucksenkenden Effekte des VIP-Aerosols durch die vorherige Thiorphan-Applikation über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant gesteigert werden. Zudem konnte durch intravasal appliziertes Thiorphan die maximale absolute Drucksenkung von $5,94 \pm 0,22$ auf $11,00 \pm 1,13$, und durch aerosolisiertes Thiorphan sogar auf $13,43 \pm 1,49$ erhöht werden. Trotz der tendenziell stärkeren modulatorischen Wirkung des aerosolisierten Thiorphans erbrachte der direkte statistische Vergleich der VIP-Aerosol/Thiorphan-Aerosol – Gruppe mit der VIP-Aerosol/Thiorphan-iv – Gruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb.4.5a-c). Auch beim VIP-Aerosol ist eine gegenregulatorische Freisetzung von Vasokonstriktoren auf den Stimulus der von VIP induzierten Drucksenkung denkbar. In diesem Fall aber ist anzunehmen, dass durch die Hemmung der NEP 24.11. in den Atemwegen^{42,43} es zu einer drastischen Verminderung des Abbaus an aerosolisiertem VIP in der Trachea und den Bronchien, also bevor es seinen Wirkungsort an der glatten Lungengefäßmuskulatur erreicht, kommt. Der so entstandene Überschuss an biologisch aktivem VIP an den VPAC-Rezeptoren und die darauf folgende Vasodilatation könnte die drucksteigernde Wirkung der freigesetzten Vasokonstriktoren übertreffen und so in der Summe die Vasodilatation und Drucksenkung im Lungenkreislauf auslösen.

5.4 Einsatz von NEP 24.11.–Inhibitoren in der Therapie der PAH

Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit könnten dafür sprechen auch weiterhin eine chronische Substitution von VIP bei PAH–Patienten via Aerosol anzustreben. Unsere Daten geben Anlass zu der Hypothese, dass bei den bisherigen Studien³⁰ die unzureichenden Effekte des VIP-Aerosol auf seine unzureichende biologische Aktivität nach dem Vernebelungsprozess und der Inaktivierung durch die NEP 24.11. zurückzuführen sind. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten, in Zukunft eine effiziente VIP–Substitution via Aerosol zu gestalten. Erstens lässt sich, wie von uns dargestellt, durch die Inhibition der NEP 24.11. die biologische Aktivität des VIP–Aerosol erheblich erhöhen. Die Auswirkungen dieser Inhibition in einem intakten tierischen oder humanen Organismus werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber noch kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite gibt es Anzeichen dafür, dass eine NEP 24.11.–Inhibition positive Effekte für PAH–Patienten haben könnte, die über die Verstärkung der VIP–Wirkung hinausgehen. Beispielsweise baut die NEP 24.11. nicht nur VIP, sondern auch andere vasodilatierende Substanzen wie die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, sowie Substanz P und Bradykinin ab. Auf der anderen Seite spaltet die NEP 24.11. aber auch Vasokonstriktoren wie Endothelin–1 und Angiotensin–II. Die Wirkung einer selektiven NEP-Hemmung durch z.B. Thiorphan hinge also davon ab, in welchem Verhältnis die NEP 24.11. Vasodilatoren und Vasokonstriktoren abbaut.⁵⁹ Die zweite Möglichkeit eine VIP–Aerosol–Applikation positiv zu modulieren ist der Einsatz eines Peptidase–resistenten VIP–Analogons. Hierzu gibt es neue pharmakologische Entwicklungen wie das liposomale VIP oder das VIP– α .^{38,52,60} Der Vorteil bestünde darin, dass die Effekte der Therapie mit viel höherer Wahrscheinlichkeit kalkulierbar wären als bei der Hemmung der NEP 24.11. und der damit verbundene, sehr weit up-stream gelegene Eingriff in den Metabolismus von vasoaktiven und diuretischen Substanzen.

Ein weiterer Nachteil im Einsatz von NEP 24.11.–Inhibitoren in der PAH könnte sich im Hinblick auf eine längerfristige Therapie ergeben. In unserem Modell der akuten PAH fanden wir keine Hinweise auf pulmonal drucksteigernde Effekte im Einsatz von Thiorphan. Allerdings zeigten Dempsey und Kollegen, dass Nephilysin–Knock–Out–Mäuse ein vermehrtes Remodelling der Gefäße aufweisen.³⁹ Ähnliche Ergebnisse

zeigte eine Untersuchung an COPD-Patienten.⁶¹ Offensichtlich wären diese proliferativen Effekte einer NEP 24.11.-Inhibition ein bedeutendes Argument gegen den Einsatz von NEP 24.11.-Inhibitoren bei PAH-Patienten.

6. Ausblick

Unsere Ergebnisse liefern die Basis für weitere Studien zur chronischen VIP-Substitution via Aerosol. Naheliegender wären Studien mit einem Peptidase-resistenten VIP-Analogon. Somit ließe sich die biologische Aktivität des VIP steigern und untersuchen, ohne die unkalkulierbaren Effekte einer Hemmung der NEP 24.11. in Kauf nehmen zu müssen.

Darüberhinaus lässt sich die Suche nach einer Therapie in der PAH inzwischen nicht mehr nur auf die Erforschung von vasoaktiven Substanzen beschränken. Das Therapeutikum der Zukunft sollte auch die beiden anderen pathophysiologischen Mechanismen der PAH, das vaskuläre Remodelling und die Inflammation, positiv beeinflussen. Da die anti-proliferativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von VIP^{21,62,63} bereits bekannt sind, sind experimentelle Studien, z.B. im Monocrotalin-Modell, angezeigt. In diesem Modell spielen Remodelling und Inflammation eine bedeutende pathogenetische Rolle, weshalb es sich zur Untersuchung der Wirkung von VIP auf diese beiden Mechanismen der PAH-Entstehung optimal eignet.⁶⁴

Der Einsatz von NEP 24.11.-Inhibitoren in der PAH ist aus unserer Sicht, wie oben dargelegt, problematisch. Trotzdem lohnt sich die weitere Untersuchung des Metabolismus von vasoaktiven Substanzen in der pulmonalen Strombahn, an dem die NEP 24.11. beteiligt ist. Zur Zeit sind eine Reihe von Substraten der NEP 24.11. in der experimentellen Erforschung, die als zukünftiges Therapeutikum in der PAH zum Einsatz kommen könnten. Darunter fallen nicht nur das VIP, sondern auch die natriuretischen Peptide ANP und BNP, die auch von der NEP 24.11. abgebaut werden. Eine genauere Kenntnis des Metabolismus dieser Peptide könnte nicht nur Perspektiven eröffnen, wie eine Therapie gegebenenfalls moduliert werden kann, um sie in ihrer Effizienz zu steigern. Vielmehr könnte auch die Rolle dieser Peptide als Regulatoren in der Physiologie des Lungenkreislaufs und deren mögliche Beteiligung an der Entstehung der PAH geklärt werden.

7. Zusammenfassung

Die Therapie der pulmonalen Hypertonie liefert nach wie vor keine zufriedenstellenden Ergebnisse.⁹ Deswegen ist es nötig, weitere Substanzen in experimentellen und klinischen Studien zu testen. Einen vielversprechenden Kandidaten für eine zukünftige Therapie stellt das VIP dar. Es besitzt nicht nur ausgeprägte vasodilatatorische Eigenschaften²¹, sondern auch anti-proliferative und anti-inflammatorische Wirkungen. Zudem ist bei Patienten mit PAH ein VIP-Defizit und eine Hochregulation der VPAC-Rezeptoren bereits belegt.²⁴ Um systemischen Nebenwirkungen^{27,28,29} und einer Verschlechterung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses vorzubeugen^{25,30}, wäre eine VIP-Substitution via Aerosol optimal. Darüberhinaus wirkt sich eine einmalige VIP-Aerosol-Applikation zwar akut positiv auf die Hämodynamik von PAH-Patienten aus, allerdings in zu geringem und zu kurzem Ausmaß um bereits eine zukünftige Therapie für PAH-Patienten darzustellen.³⁰ Deswegen galt es experimentell zu untersuchen, ob VIP nach Vernebelung noch ausreichend biologische Aktivität besitzt und ob sich die akuten vasodilatatorischen Effekte durch Inhibition der NEP 24.11. verstärken und verlängern lassen. Unseren Ergebnissen zur Folge besitzt das VIP-Aerosol genügend biologische Aktivität, um es als Therapie einzusetzen. Allerdings muss dafür eine 26-fach höhere Dosis tatsächlich in die Lunge eingebracht werden, um annähernd die gleiche vasodilatatorische Wirkung zu erhalten als nach intravasaler Applikation. Gründe dafür könnten sein, dass Peptidasen im Respirationstrakt durch Spaltung des VIP-Moleküls seine Bioverfügbarkeit verringern und somit eine Vasodilatation verhindern. Dies erscheint noch mehr plausibel, betrachtet man die in Dauer und Maximalwirkung durch eine vorangehende Hemmung der NEP 24.11. enorm gesteigerten Effekte des VIP-Aerosols. Paradoxerweise moduliert die Hemmung der NEP 24.11. die Effekte von intravasal appliziertem VIP in gegensätzlicher Weise und verringerte die Senkung des mPAPs durch VIP in Dauer und maximalem Effekt. Die Ursache für diese diskrepanten Befunde ist bisher unbekannt. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass intravasal auch Vasokonstriktoren vermindert abgebaut werden, die dann zum Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf führen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die chronische VIP–Substitution via Aerosol immer noch Potential als Therapeutikum für die PAH besitzt. Unsere Daten liefern eine Basis für die Annahme, dass bei ausreichender biologischer Aktivität therapierrelevante Effekte hinsichtlich einer effektiven Vasodilatation mit VIP-Aerosol erzielt werden können. Die zusätzlich bekannten antiproliferativen, antiinflammatorischen und antithrombotischen Wirkungen von VIP verstärken die Erfolgsaussichten einer solchen Therapie der PAH, müssen jedoch in entsprechenden tierexperimentellen und klinischen Studien noch weiter untersucht werden.

8. Materialien

8.1. Substanzen

Bacillol (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

CO₂

Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, 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)

Thiorphan (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland)

U 46619 (9,11-Dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F_{2 α}) (Paesel-Lorei, Frankfurt, Deutschland)

VIP (Aviptadil, Vasoaktives Intestinales Peptid) (mondoGEN AG, Stans, Schweiz)

Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

Xylocain (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland)

8.2. Geräte / Herstellerangaben

ABL 500 (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)

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

Farbmonitor

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

Kanülen “BD Microlance” (Becton Dickinson)

Latexhandschuhe (Semperit, Gevelsberg, Deutschland)
Messverstärker „Scout 55“ (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Perfusorpumpe „871582/3“ (Braun)
Perfusorspritze „BD Plastipak“ (Becton Dickinson)
Personal Computer
Rasierer „Favorita II“ (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
Rollerpumpe „MCP Standard“ (Ismatec, Wertheim, Deutschland)
Harvard Kleintierbeatmungspumpe „UB 6025“ (Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland)
Vernebler „Optineb ®“ (Nebu-Tec, Elsenfeld, Deutschland)
Verstärker „PLUGSYS-DBA“ (Hugo Sachs Elektronik)
Waage „Scout Pro“ (Ohaus, Gießen, Deutschland)
Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik)
Wärmepumpe „DC 5“ (Haake, Karlsruhe, Deutschland)

9. Literaturverzeichnis

1. Klinker R., Pape H-C., Kurtz A. et al. Physiologie. Georg – Thieme – Verlag (2010); 6.Auflage: 216-217
2. Kovacs G., Berghold A., Scheidl S. et al. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Resp J* (2009); 34: 888-894
3. West J.B. Pulmonary Pathophysiology: The Essentials, 4th edition. Williams & Wilkins (1992).
4. Klinker R., Pape H-C., Kurtz A. et al. Physiologie. Georg – Thieme – Verlag (2010); 6.Auflage: 186
5. Keith I.M. The Role of Endogenous Lung Neuropeptides in Regulation of the Pulmonary Circulation. *Physiol. Res.* (2000); 49: 519-537
6. Rubin L.J. Introduction: Diagnosis and Management of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* (2004); 126: 7S-10S
7. Mehta S. Drug Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* (2003); 124: 2045-2049
8. Farber H.W., Loscalzo J. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* (2004); 351: 1655-1665
9. O'Callaghan D.S., Savale L., Jais X. et al. Evidence for the use of combination targeted therapeutic approaches for the management of pulmonary arterial hypertension. *Resp Med* (2010); 104: S74-S80
10. Christman B.W., McPherson C.D., Newman J.H., et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* (1992); 327: 70-75
11. Hassoun P.M., Mouthon L., Barbera J.A. et al. Inflammation, Growth Factors, and Vascular Remodelling. *J Am Coll Cardiol* (2009); 54: S10-S19
12. Chaouat A., Weitzenblum E., Higenbottam T. The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* (1996); 9:356-363

13. Ghofrani H. A., Voswinckel R., Reichenberger F., et al. Hypoxia- and non-hypoxia-related pulmonary hypertension – Established and new therapies. *Cardiovasc Res* (2006); 72: 30-40
14. Humbert M., Sitbon O., Simonneau G. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* (2004); 351: 1425-1436
15. Jais X., Bonnet D. Traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. *La Presse Medicale* (2010); 39: 1S22-1S32
16. Benedict N., Seybert A., Mathier M. A. Evidence-Based Pharmacologic Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinical Therapeutics* (2007); 29: 2134-2153
17. Sitbon O., Humbert M., Jais X., et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* (2005); 111: 3105-3111
18. Tuder R. M., Cool C. D., Geraci M. W., et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* (1999); 159: 1925-1932
19. Greenberg B., Rhoden K., Barnes P.J. Relaxant effects of vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine in human and bovine pulmonary arteries. *Blood Vessels* (1987); 24: 45-50
20. Eriksson L.S., Hagenfeldt L., Mutt V. et al. Influence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on splanchnic and central hemodynamics in healthy subjects. *Peptides* (1989); 10:481-4
21. Said S. The Vasoactive Intestinal Peptide Gene Is a Key Modulator of Pulmonary Vascular Remodelling and Inflammation. *Ann N.Y. Acad Sci* (2008); 1144: 148–153
22. Cox C. P., Linden J., Said S. I. VIP Elevates Platelet Cyclic AMP (cAMP) Levels and Inhibits In Vitro Platelet Activation Induced by Platelet - Activating Factor (PAF). *Peptides* (1984); 5: 325-328
23. Said S. I. Vasoactive Intestinal Peptide in the Lung. *Annals New York Academy of Sciences* (1988); 527: 450-464
24. Petkov V., Mosgoeller W., Ziesche R. et al. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* (2003); 111: 1339-1346

25. Byron P. R. Determinants of drug and polypeptide bioavailability from aerosols delivered to the lung. *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990); 5:107-132
26. Barrowcliffe M. P., Morice A., Jones J. G. et al., Pulmonary clearance of vasoactive intestinal peptide. *Thorax* (1986); 41: 88-93
27. Marshall B.E., Hanson C.W., Frasch F. et al Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. *Intensive Care Med* (1994); 20:379-389
28. Pepke-Zaba J., Higenbottam T. W., Dinh-Xuan A. T. et al. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. *The Lancet* (1991); 338:1173-1174
29. Söderman C., Eriksson L.S., Juhlin-Dannfelt A. et al. Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on pulmonary ventilation-perfusion relationships and central haemodynamics in healthy subjects. *Clin. Physiol.* (1993); 13:677-685
30. Leuchte H.H., Baezner C., Baumgartner R.A. et al. Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* (2008); 32:1289-1294
31. Groneberg D.A., Rabe K.F., Fischer A. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: Vasoactive intestinal peptide and its receptors. *European Journal of Pharmacology* (2006); 533:182-194
32. Dickson L., Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology and Therapeutics* (2009); 121:294-316
33. Hagen B.M., Bayguinov O., Sanders K. M. VIP and PACAP regulate localized Ca²⁺ transients via cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006); 291: 375-385
34. Niven R. W., Rypacek F., Byron P. R. Solute Absorption from the Airways of the Isolated Rat Lung. III. Absorption of Several Peptidase – Resistant, Synthetic Polypeptides: Poly – (2- Hydroxyethyl) – Aspartamides. *Pharmaceutical Research* (1990); 7: 990-994
35. Hofmann W., Morawska L., Winkler-Heil R. et al. Deposition of combustion aerosols in the human respiratory tract: Comparison of theoretical predictions with experimental data considering nonspherical shape. *Inhalation Toxicology* (2009); 21:1154-1164

36. Patton J. S., Brain J. D., Davies L. A. et al. The Particle has Landed – Characterizing the Fate of Inhaled Pharmaceuticals. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* (2010); 23 (S2): S71-S87
37. Adjei A., Garren J. Pulmonary Delivery of Peptide Drugs: Effect of Particle Size on Bioavailability of Leuprolide Acetate in Healthy Male Volunteers. *Pharmaceutical Research* (1990); 7: 565-569
38. Onoue S., Yamada S., Yajima T. Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD. *Peptides* (2007); 28:1640-1650
39. Dempsey E.C., Wick M.J., Karoor V. et al. Nprilysin Null Mice Develop Exaggerated Pulmonary Vascular Remodeling in Response to Chronic Hypoxia. *Am J Path* (2009); 174: 782-796
40. Llorens-Cortes C., Huang H., Vicart P. et al. Identification and Characterization of Neutral Endopeptidase in Endothelial Cells from Venous or Arterial Origins. *J Biol Chem* (1992); 267: 14012-14018
41. Miners J.S., Verbeek M.M., Rikkert M.O. et al. Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroscience Methods* (2008); 167: 229-236
42. Cohen A.J., Bunn P.A., Franklin W. et al. Neutral Endopeptidase: Variable Expression in Human Lung, Inactivation in Lung Cancer, and Modulation of Peptide-induced Calcium Flux. *Cancer Research* (1996); 56: 831-839
43. Patton J.S., Trincherro P., Platz R.M. Bioavailability of pulmonary delivered peptides and proteins: α -interferon, calcitonins and parathyroid hormones. *Journal of Controlled Release* (1994); 28:79-85
44. Schermuly R. T., Schulz A., Ghofrani H.A. et al. Comparison of pharmacokinetics and vasodilatory effect of nebulized and infused iloprost in experimental pulmonary hypertension: rapid tolerance development. *J Aerosol Med* (2006);19:353-363.
45. Seeger W., Walmrath D., Grimminger F. et al. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol* (1994); 233:549-584

46. Callegari J. Vasoaktive Effekte von Brain Natriuretic Peptide auf den Lungenkreislauf im Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge. Univ. Diss., Med. Fak., Ludwig-Maximilians-Universität München 2010
47. Schmehl T., Gebhart J., Schutte H. et al. On-line laser-photometric monitoring of aerosol deposition in ventilated rabbit lungs. *J Appl Physiol* (1996); 80:351-356.
48. Walmrath D., Schneider T., Pilch J. et al. Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. *Lancet* (1993); 342:961-962
49. Schermuly R. T., Roehl A., Weissmann N. et al. Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (2000); 292:512-520.
50. Yoshida K., Kanazawa M., Casley D.J. et al. Inhibition of Kidney Neutral Endopeptidase After Administration of the Neutral Endopeptidase Inhibitor Candoxatril: Quantitation by Autoradiography. *J Cardiovasc Pharmacol* (1998); 32:702-708
51. Angus R.M., Millar E.A., Chalmers G.W. et al. Effect of inhaled thiorphan, a neutral endopeptidase inhibitor, on the bronchodilator response to inhaled atrial natriuretic peptide (ANP). *Thorax* (1996); 51: 71-74
52. Onoue S., Misaka S., Yamada S. Structure – activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn – Schmiedberg's Arch Pharmacol* (2008); 377: 579-590
53. Bevan E.G., Connell J.M.C., Doyle J. et al. Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *Journal of Hypertension* (1992); 10:607-613
54. Richards A.M., Wittert G.A., Crozier I.G. et al. Chronic inhibition of endopeptidase 24.11. in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *J Hypertension* (1993); 11:407-416
55. Ando S., Rahman M.A., Butler G.C. et al. Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men. Effects on hemodynamics, sympathetic activity, heart rate variability and endothelin. *Hypertension* (1995); 26:1160-1166

56. Brandt R.R., Mattingly M.T., Clavell A.L., et al. Neutral Endopeptidase Regulates C-Type Natriuretic Peptide Metabolism But Does Not Potentiate Its Bioactivity In Vivo. *Hypertension* (1997); 30:184-190
57. Van Lommel A., Bollé T., Fannes W. et al. The Pulmonary Neuroendocrine System: The Past Decade. *Arch. Histol. Cytol.* (1999); 62:1-16
58. Hoyt R.F. Jr., Feldman H., Sorokin S.P. Neuroepithelial bodies (NEB) and solitary endocrine cells in hamster lung. *Exp Lung Res* (1982); 3:299-311
59. Worthley M.I., Corti R. and Worthley S.G. Vasopeptidase Inhibitors: will they have a role in clinical practice? *British Journal of Clinical Pharmacology* (2003); 57: 27-36
60. Önyüksel H., Séjourné F., Suzuki H. et al. Human alpha-VIP: a long-acting, biocompatible and biodegradable peptide nanomedicine for essential hypertension. *Peptides* (2006); 27:2271-2275
61. Wick M.J., Buesing E.J., Wehling C.A. et al. Decreased Neprilysin and Pulmonary Vascular Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* (2011); 183: 330-340
62. Hamidi S.A., Prabhakar S., Said S.I. Enhancement of pulmonary vascular remodelling and inflammatory genes with VIP gene deletion. *Eur Respir J* (2008); 31: 135-139
63. Said S.I., Hamidi S.A., Bosc G. Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis? *Eur Respir J* (2010); 35:730-734
64. Stenmark K.R., Meyrick B., Galie N. et al. Animal Models in pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2009); 297:L1013-L1032

10. Danksagung

Als allererstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Behr dafür bedanken mich mit der Aufgabe dieses wissenschaftlichen Projekts betraut zu haben. Vielen Dank für das Vertrauen, das Bereitstellen der Laborräume und Materialien und die durchwegs konstruktive Kritik, insbesondere bei der Korrektur der schriftlichen Ausfertigung der Dissertation.

Herrn PD Dr. Hanno Leuchte möchte ich für die beispiellose Betreuung danken. Die ständige Möglichkeit zum wissenschaftlichen Diskurs und die zahlreichen Anregungen für Verbesserungen haben wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen. Viel wichtiger allerdings erscheint mir, dass in vielen professionellen aber auch freundschaftlichen Gesprächen meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten geweckt wurde und ich mir Vieles von seiner Arbeitseinstellung und Arbeitsmethodik anschauen konnte.

Als nächstes würde ich mich gerne bei Herrn Shani Haziraj bedanken, der mir bei der praktischen Durchführung der Versuche pausenlos zur Seite stand. Mit seiner Erfahrung und Kenntnis der praktischen wissenschaftlichen Arbeitsweise konnten zahlreiche Schwierigkeiten beseitigt und Probleme gelöst, sowie die praktische Untersuchung der wissenschaftlichen Hypothese ermöglicht werden.

Weiterer Dank gilt meinen Vorgängern als Doktoranden der Arbeitsgruppe „Pulmonale Hypertonie“ der medizinischen Klinik V des Klinikums München der Ludwig-Maximilians-Universität, Herrn Dr. Tobias Meis und Herrn Dr. Jens Calligari, die mir jederzeit mit Ratschlägen und Antworten auf aufgetretene Fragen zur Verfügung standen.

Auch möchte ich allen bisher nicht genannten Mitarbeitern der medizinischen Klinik V des Klinikums München der Ludwig-Maximilians-Universität für den außerordentlich freundlichen und kollegialen Umgang danken.

Zuletzt möchte ich einen ganz besonderen Dank an meine Familie, meine Mutter Susanne Prechtl, in Stillemeinem Vater Peter Prechtl und meinen Großeltern Gerda und Günther Konietzko richten. Ohne ihre finanzielle und emotionale Unterstützung wäre weder das Absolvieren des Hochschulstudiums der Humanmedizin noch das Anfertigen dieser Dissertation möglich gewesen.

11.Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, **Christoph PrechtI**, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „**Hämodynamische Effekte von VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid, Aviptadil) im Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge**“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 05.11.13

Christoph PrechtI