

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inhalierendes Stickstoff-Monoxid als neue Behandlungsstrategie im
experimentell-induzierten akuten Myokardinfarkt

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nils Neye
aus Berlin

Datum der Promotion: 22. Juni 2014

Meinen Eltern.
Und für Oma Lite.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abstrakt..... | 3 |
| 2. Abstract..... | 6 |
| 3. Eidesstattliche Versicherung..... | 8 |
| 4. Auszug aus der Journal Summary List | 10 |
| 5. Publikation..... | 11 |
| 6. Lebenslauf | 22 |
| 7. Komplette Publikationsliste | 23 |
| 8. Danksagung..... | 25 |

1. Abstrakt

Myokardiale Ischämien können, abhängig von Lage, Dauer und Ausmaß, zu akuten ventrikulären Dysfunktionen führen, die schließlich irreversible Schädigungen des Herzgewebes hervorrufen. Im Ischämiefall liegt ein bestehendes Missverhältnis zwischen myokardialem Sauerstoffverbrauch und -angebot vor. Da Herzfrequenz, Kontraktilität und Koronardurchblutung die wesentlichen Determinanten dieses Missverhältnisses sind, erscheinen alle Substanzen, die eine oder mehrere dieser Variablen günstig beeinflussen können, prinzipiell für die Therapie der akuten myokardialen Ischämie geeignet.

Inhaliertes NO erscheint potentiell geeignet für die Therapie ischämischer Zustände, da die Freisetzung aus seinen bioaktiven Transportmolekülen, namentlich dem S-nitroso-Hämoglobin und dem Nitrit-Anion, eine Abhängigkeit vom Grad der Sauerstoffsättigung (SO₂) zeigt. Folglich wird es bevorzugt in Regionen mit einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck (pO₂) freigesetzt. Aufgrund dieser Tatsache könnte inhaliertes NO eine selektive Verbesserung der Perfusion des ischämischen Areals bewirken.

Ziel der hier vorliegenden Promotionsarbeit war es, mit inhalativem Stickstoffmonoxid (iNO) eine vasodilatatorisch wirksame Substanz im tierexperimentellen Modell eines akuten Myokardinfarkts auf seine protektiven Effekte zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene Therapieregime durchgeführt und iNO wahlweise begrenzt auf die Ischämie oder Reperfusion und über den gesamten Versuchszeitraum (Ischämie und Reperfusion) appliziert.

Nach 2 Std. Ischämie waren bei den NO_i-behandelten Versuchstieren alle gemessenen hämodynamischen Parameter signifikant höher als in den unbehandelten Kontrollen. In weiterführenden Versuchsreihen mit einem anschließenden Reperusionsintervall konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt des NO_i über den Reperusionszeitraum konserviert wird. Desweiteren konnte unter der Behandlung mit NO_i eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion erzielt werden, die sich in Form eines erhöhten Herz-Zeit-Volumens (HZV) und einer Reduktion der Infarktgröße und der Area-at-risk (AAR) manifestierte.

Alle protektiven Effekte der NO-Inhalation konnten in einer weiteren Versuchsreihe durch den selektiven, löslichen Guanylatcyclase-Blocker 1H-[2,3,5]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ) inhibiert, und durch eine kontinuierliche Nitrit-Infusion repliziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher protektiver Effekt des inhalativen NO auf die linksventrikuläre Herzfunktion im akuten Myokardinfarktsmodell gezeigt werden konnte. In allen untersuchten Versuchsgruppen konnte durch iNO eine signifikante Verbesserung der Hämodynamik (arterieller Druck, zentralvenöser Druck, linksventrikulärer Druck, systolische und diastolische Kontraktilität), eine Erhöhung des Herz-Zeit-Volumens sowie eine Reduzierung der sogenannten Area-at-risk und der Infarktgröße erzielt werden. Die NO-Applikation über den gesamten Versuchszeitraum, also sowohl während des ischämischen als auch dem Reperusionsintervall, zeigte keine weitere Verbesserung der Hämodynamik, jedoch einen additiven protektiven Effekt bzgl. der Area-at-risk und des Infarktvolumens.

Die Tatsache, dass diese benefiziellen Effekte durch ODQ inhibiert werden konnten, weist darauf hin, dass die protektiven Effekte und der daraus resultierende therapeutische Nutzen dem inhalativ applizierten NO zuzuordnen ist und dass diese Effekte über die Bildung von Nitrit vermittelt werden.

Somit könnte die Anwendung von inhalativem Stickstoffmonoxid, deren Vorteil u. a. in der leichten Applizierbarkeit zu sehen ist, ein neues, vielversprechendes Behandlungskonzept, insbesondere als Überbrückungsstrategie bis zur Anwendung konventioneller therapeutischer Maßnahmen in der Akuttherapie des Myokardinfarkts darstellen.

2. Abstract

Myocardial ischemia can – depending on level, length and degree – lead to acute ventricular dysfunction and irreversible damage of the myocardium.

Every beneficial change in specific parameters, for example, heart rate, contractility or coronary perfusion, that can help to solve the disparity between oxygen-supply and -consumption is considered to be suitable for the treatment of this ischemic condition. Inhaled NO (NO_i) could be an attractive early intervention strategy in acute myocardial infarction because of its demonstrated extra-pulmonary effects which are based on the formation of bioactive NO carriers in circulating blood. The release of NO from these carrier molecules occurs when haemoglobin desaturates and may thus allow for selective redistribution of blood flow to areas in need. This concept of redistribution has been adequately termed the “Robin Hood effect” and constitutes the inverse of the classical “steal effect” of conventional vasodilators in ischemic diseases, which dilate vessels unselectively and therefore “steal” blood away from ischemic tissues.

Here, we tested the hypothesis that inhalation of NO may improve left ventricular function and reduce infarct size in a model of acute myocardial infarction by left anterior descending artery (LAD) ligation. Following LAD occlusion, rats received 50 ppm of NO for 2h of ischemia, during a subsequent 3h period of reperfusion, or for 5h of ischemia and reperfusion.

At the end of the ischemic interval, all measured hemodynamic parameters, i.e. mean arterial blood pressure, leftventricular pressure, dp/dt max and dp/dt min were significantly higher in rats receiving NO_i as compared to untreated controls. In a set of experiments with additional 3 h of reperfusion, this beneficial effect of NO_i was preserved throughout the reperfusion phase. Furthermore, NO_i improved left ventricular function by significantly increasing cardiac index (CI) and reducing infarct size and area-at-risk (AAR). All protective effects of NO could be inhibited by administration of the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (1H-[2,3,5]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) and replicated by infusion of nitrite. These findings confirm that the observed effects are indeed downstream of NO and that the beneficial action is mediated by the formation of bioactive NO carriers in blood, specifically nitrite.

In summary, the present work shows a distinct protective effect of NO_i. During myocardial ischemia NO_i increased left ventricular systolic pressure, contractility, relaxation and cardiac output, and reduced myocardial infarction size and area-at-risk

as compared to untreated controls. NO inhalation during the reperfusion phase had a comparable protective effect. The combined inhalation during ischemia and additional reperfusion phase did not further improve left ventricular haemodynamics, but had an additive protective effect on the myocardial area-at-risk and infarct size.

Inhaled nitric oxide may therefore present a novel and promising clinical strategy to improve collateral blood flow and left ventricular function in myocardial ischemia. Inhaled NO may be particularly useful as an acute bridging strategy in first aid until successful reperfusion of the infarcted area has been re-established.

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nils Neye, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inhalierendes Stickstoff-Monoxid als neue Behandlungsstrategie im experimentell-induzierten akuten Myokardinfarkt“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 02. Oktober 2013, _____

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Neye N, Enigk F, Shiva S, Gladwin MT, Habazettl H, Kuppe H, Kuebler WM:

Inhalation of NO during myocardial ischemia reduces infarct size and improves cardiac function

Intensive Care Med (2012) 38: 1381-1391

Beitrag im Einzelnen:

- Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie
- Durchführung sämtlicher tierexperimenteller Versuche
- Optimierung des Versuchsaufbaus
- Anwendung der Evans Blue- und TTC-Methode zur Gewebeanfärbung
- Etablierung einer alternativen Methode der Bestimmung des Herz-Zeit-Volumens
- Quantitative Analyse und planimetrische Messung der Infarktgröße
- Analyse der Ergebnisse und Behebung evtl. Fehlerquellen
- Beteiligung an der Interpretation der Ergebnisse
- Beteiligung an der statistischen Auswertung
- Literaturrecherche
- Erstellen der Abbildungen
- Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts gemeinsam mit dem Betreuer bis zur endgültigen Fertigstellung nach Korrektur durch alle Co-Autoren

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Auszug aus der Journal Summary List

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME ? HELP

2012 JCR Science Edition

Journal Summary List [Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories** CRITICAL CARE MEDICINE [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 27) Page 1 of 2

Ranking is based on your journal and sort selections.

| Mark | Rank | Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i> | ISSN | JCR Data ⁱ | | | | | | Eigenfactor [®] Metrics ^j | |
|--------------------------|------|---|-----------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------|----------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | Total Cites | Impact Factor | 5-Year Impact Factor | Immediacy Index | Articles | Cited Half-life | Eigenfactor [®] Score | Article Influence [®] Score |
| <input type="checkbox"/> | 1 | AM J RESP CRIT CARE | 1073-449X | 49712 | 11.041 | 10.919 | 2.705 | 264 | 8.7 | 0.10229 | 3.883 |
| <input type="checkbox"/> | 2 | CRIT CARE MED | 0090-3493 | 32733 | 6.124 | 6.401 | 2.614 | 363 | 7.2 | 0.06902 | 2.037 |
| <input type="checkbox"/> | 3 | CHEST | 0012-3692 | 44596 | 5.854 | 6.420 | 3.394 | 307 | 8.6 | 0.08109 | 2.188 |
| <input type="checkbox"/> | 4 | INTENS CARE MED | 0342-4642 | 14780 | 5.258 | 5.036 | 1.074 | 215 | 7.0 | 0.03243 | 1.501 |
| <input type="checkbox"/> | 5 | CRIT CARE | 1466-609X | 10657 | 4.718 | 5.248 | 0.976 | 209 | 4.4 | 0.03978 | 1.706 |
| <input type="checkbox"/> | 6 | J NEUROTRAUM | 0897-7151 | 9059 | 4.295 | 4.771 | 0.875 | 264 | 6.0 | 0.02162 | 1.365 |
| <input type="checkbox"/> | 7 | RESUSCITATION | 0300-9572 | 7383 | 4.104 | 3.350 | 1.116 | 232 | 5.0 | 0.01964 | 0.910 |
| <input type="checkbox"/> | 8 | NEUROCRIT CARE | 1541-6933 | 2148 | 3.038 | 2.714 | 0.518 | 139 | 3.3 | 0.00921 | 0.874 |
| <input type="checkbox"/> | 9 | CURR OPIN CRIT CARE | 1070-5295 | 2426 | 2.967 | 2.976 | 0.554 | 92 | 5.4 | 0.00777 | 0.976 |
| <input type="checkbox"/> | 10 | MINERVA ANESTESIOLOGIA | 0375-9393 | 1715 | 2.818 | 2.117 | 0.613 | 137 | 3.0 | 0.00384 | 0.408 |
| <input type="checkbox"/> | 11 | SEMIN RESP CRIT CARE | 1069-3424 | 1358 | 2.752 | 2.611 | 0.159 | 69 | 4.8 | 0.00531 | 0.912 |
| <input type="checkbox"/> | 12 | SHOCK | 1073-2322 | 6161 | 2.612 | 2.777 | 0.989 | 184 | 6.4 | 0.01253 | 0.744 |
| <input type="checkbox"/> | 13 | J CRIT CARE | 0883-9441 | 2092 | 2.498 | 2.538 | 0.367 | 207 | 4.0 | 0.00716 | 0.806 |
| <input type="checkbox"/> | 14 | PEDIATR CRIT CARE ME | 1529-7535 | 2824 | 2.354 | 2.659 | 1.093 | 162 | 4.8 | 0.00842 | 0.830 |
| <input type="checkbox"/> | 15 | J TRAUMA | 0022-5282 | 23277 | 2.348 | 2.942 | | 0 | 8.5 | 0.04443 | 0.880 |
| <input type="checkbox"/> | 16 | RESP CARE | 0020-1324 | 2531 | 2.030 | 1.975 | 0.700 | 200 | 5.3 | 0.00557 | 0.505 |
| <input type="checkbox"/> | 17 | CRIT CARE CLIN | 0749-0704 | 1313 | 1.952 | 2.117 | 0.300 | 40 | 7.4 | 0.00318 | 0.731 |
| <input type="checkbox"/> | 18 | INJURY | 0020-1383 | 7389 | 1.931 | 2.348 | 0.332 | 367 | 6.7 | 0.01637 | 0.676 |

5. Publikation:

Intensive Care Med. 2012 Aug;38(8):1381-91.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-012-2605-1>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Komplette Publikationsliste

Publikationen

N. Neye, F. Enigk, S. Shiva, H. Habazettl, N. Plesnila, H. Kuppe, M.T. Gladwin, W.M. Kuebler

Inhalation of NO during myocardial ischemia reduces infarct size and improves cardiac function. *Intensive Care Medicine*, 2012

Impact Factor: 5,258

J. Yin, J. Hoffmann, S.M. Kaestle, **N. Neye**, L Wang, S. Bauerle, W. Liedtke, S. Wu, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler

Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circulation Research*, 2008

Impact Factor: 11,861

E.A. Solymosi, S.M. Kaestle-Gembardt, I. Vadasz, L. Wang, **N. Neye**, C.J. Chupin, S. Rozowsky, R. Ruehl, A. Tabuchi, H. Schulz, A. Kapus, R.E. Morty, W.M. Kuebler

Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013

Impact Factor: 9,737

Abstracts

N. Neye, H. Habazettl, N. Plesnila, W.M. Kuebler

Inhaled nitric oxide improves left ventricular function and reduces infarct size during myocardial ischemia by the Robin Hood effect. Jahrestreffen der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, Heidelberg, 2007.

J. Yin, **N. Neye**, W.M. Kuebler

cGMP regulates mechanosensitive TRPV4 channels in lung endothelial cells. *Experimental Biology*, San Diego 2008. *The FASEB Journal* 2008; 22:1213.8

N. Neye, H. Habazettl, N. Plesnila, W.M. Kuebler

Inhaled nitric oxide improves left ventricular function during myocardial ischemia.
Experimental Biology, New Orleans 2009. The FASEB Journal 2009; 23:1032.5

N. Neye, H. Habazettl, N. Plesnila, W.M. Kuebler

Inhaled nitric oxide improves left ventricular function and reduces infarct size during myocardial ischemia by the Robin Hood Effect.

The 88th Meeting of the German Physiological Society, Giessen 2009.

Acta Physiologica 2009; Volume 195, Supplement 669

8. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Physiologie der Charité Berlin angefertigt, betreut wurde sie von Herrn Prof. Wolfgang M. Kübler.

Mein Dank gilt zu allererst Herrn Prof. Kübler für die Überlassung des Themas, der exzellenten Betreuung sowie für das in mich und meine Arbeit entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Pries danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Physiologie.

Herrn Prof. Habazettl danke ich für die stete Hilfe bei allen technischen Problemen des Versuchsaufbaus und allen weiteren Fragen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kübler danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung in Belangen aller Art. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem guten Freund Fabian Enigk für seine Hilfsbereitschaft und die Einarbeitung in die angewandte Operationstechnik.

Mein Dank gilt weiter meinen Geschwistern und Freunden für ihre tatkräftige und motivierende Unterstützung, besonders in schwierigen Phasen.

Ferner möchte ich meinen Eltern danken. Ohne ihre stete und großzügige Unterstützung, sowohl während des Studiums als auch der Promotion, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich meinen Söhnen Jacob und Jonah und meiner Frau Alexandra Neye meinen tiefen Dank aussprechen. Ohne ihre Geduld und liebevolle Motivation während der Fertigstellung dieser Arbeit wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ihnen widme ich diese Arbeit.