

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN II  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. RIEGGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE DES ENDOTHELINEINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF  
DIE PULMONALE HYPERTONIE UND DIE NEUROHUMORALE  
REGULATION VON PROSTAZYKLIN IM MODELL DER BLEOMYCIN-  
INDUZIERTEN LUNGENFIBROSE

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Gutschalk

2010



AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN II  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. RIEGGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE DES ENDOTHELINEINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF  
DIE PULMONALE HYPERTONIE UND DIE NEUROHUMORALE  
REGULATION VON PROSTAZYKLIN IM MODELL DER BLEOMYCIN-  
INDUZIERTEN LUNGENFIBROSE

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Gutschalk

2010

Dekan: Prof. Dr. B. Weber  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Pfeifer  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Hamer  
Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2011

Meinem Vater  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Pulmonale Hypertonie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Lungenfibrose.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.</b>	<b>Pulmonal- vaskuläre Regulationsmechanismen .....</b>	<b>5</b>
1.3.1.	Endothelinsystem .....	5
1.3.2.	Prostazyklin .....	7
<b>1.4.</b>	<b>Therapiemöglichkeiten der PAH .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.</b>	<b>Tierexperimentelle Modelle zu Lungenfibrose und PAH.....</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.</b>	<b>Tierexperimentelle Versuchsphase.....</b>	<b>15</b>
3.1.1.	Versuchsaufbau.....	15
3.1.2.	Induktion der Lungenfibrose und Behandlung .....	15
3.1.3.	Hämodynamische Messungen .....	16
3.1.3.1	Systemischer Blutdruck .....	16
3.1.3.2.	Rechtsventrikulärer systolischer Druck.....	16
3.1.4.	Organ- und Blutentnahme und Verarbeitung .....	17
3.1.4.1.	Blutentnahme und Plasmagewinnung .....	17
3.1.4.2.	Organentnahme und Bestimmung der rechtsventrikulären Hypertrophie .....	17
<b>3.2.</b>	<b>Histologische Untersuchung.....</b>	<b>18</b>
3.2.1.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung .....	18
3.2.2.	Hämatoxylin- Eosin- Färbung .....	18
3.2.2.1.	Durchführung.....	18
3.2.2.2.	Mikroskopische Auswertung .....	19
3.2.3.	Sirius-Red-Färbung .....	19
3.2.3.1.	Durchführung.....	19
3.2.3.2.	Mikroskopische Auswertung .....	20
<b>3.3.</b>	<b>Immunhistologie .....</b>	<b>21</b>
3.3.1.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung .....	21
3.3.2.	RECA 1.....	21
3.3.2.1.	Durchführung.....	21
3.3.3.	PGI- Synthase- Färbung.....	22
3.3.3.1.	Durchführung.....	22
3.3.4.	PGI- Rezeptor- Färbung .....	23
3.3.4.1.	Durchführung.....	23
3.3.5.	Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie mittels Remmele-Score .....	23
<b>3.4.</b>	<b>Genexpressionsanalyse.....</b>	<b>25</b>
3.4.1.	RNA- Isolation .....	25
3.4.2.	RNA- Konzentrationsbestimmung .....	26
3.4.3.	RNA- Qualitätskontrolle .....	27
3.4.4.	Reverse Transkriptase- Reaktion .....	29

3.4.5.	Genexpression .....	30
3.4.5.1.	Quantitative Real- Time- PCR .....	30
3.4.5.2.	Primerdesign .....	30
3.4.5.3.	Durchführung .....	32
3.4.5.4.	Auswertung .....	34
3.4.6.	Verifizierung des PCR- Produkts (Gelelektrophorese) .....	35
<b>3.5.</b>	<b>Gewebebestimmungen .....</b>	<b>36</b>
3.5.1.	Probenvorbereitung und Lagerung .....	36
3.5.2.	Hydroxyprolin .....	36
3.5.2.1.	Durchführung .....	36
3.5.2.2.	Auswertung .....	37
3.5.3.	Myeloperoxidase .....	37
3.5.3.1.	Durchführung .....	38
3.5.3.2.	Auswertung .....	39
<b>3.6.</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.</b>	<b>Pulmonale Hypertonie .....</b>	<b>40</b>
4.1.1.	Systolischer Blutdruck .....	40
4.1.2.	Rechtsventriluärer systolischer Druck .....	40
4.1.3.	Rechtsventrikuläre Hypertrophie .....	41
<b>4.2.</b>	<b>Fibrose .....</b>	<b>42</b>
4.2.1.	Lungengewicht .....	42
4.2.2.	Hämatoxylin- Eosin- Färbung .....	42
4.2.3.	Sirius- Red- Färbung .....	44
4.2.4.	Hydroxyprolingehalt .....	46
4.2.5.	Myeloperoxidasegehalt .....	47
<b>4.3.</b>	<b>Neurohumorale Regulation .....</b>	<b>47</b>
4.3.1.	PGI- Synthase .....	47
4.3.2.	PGI- Rezeptor .....	49
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.</b>	<b>Pulmonale Hypertonie .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3.</b>	<b>Fibrose .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4.</b>	<b>Neurohumorale Regulation .....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>72</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Pulmonale Hypertonie

Die Pulmonale Hypertonie (PH) stellt eine schwere Erkrankung dar, bei der es zu einer Zunahme des pulmonalvaskulären Widerstandes kommt. Definitionsgemäß besteht eine Pulmonale Hypertonie bei einer persistierenden Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks von >25 mmHg in Ruhe bzw. >30 mmHg unter Belastung.

Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie führen, können unter dem Begriff „vaskuläres Remodelling“ zusammengefasst werden.

Darunter versteht man den Umbauprozess der kleinen Widerstandgefäß, der durch eine Hypertrophie der Media, vermehrte Kollagendeposition insbesondere im Bereich der Adventitia sowie eine Endothelproliferation gekennzeichnet ist (Erdmann et al. 2008). Dies führt zu einer endothelialen Zellschädigung und -dysfunktion, gefolgt von einer Dysbalance zwischen vasokonstriktorischen und -dilatatorischen Mediatoren. So wird Endothelin als potenter Vasokonstriktor in der Lunge von Patienten mit Pulmonaler Hypertonie deutlich überexprimiert, was als Ansatzpunkt für die Therapie der Erkrankung diente (Uguzzoni et al. 1995). Folge der Pulmonalen Hypertonie ist eine exzessive Drucksteigerung im Lungenkreislauf mit zunehmender Obliteration der kleinen und mittleren Pulmonalarterien, bis es schließlich zur Entwicklung eines Cor pulmonale bis hin zum Rechtsherzversagen kommt.

Die Einteilung der Pulmonalen Hypertonie erfolgt anhand folgender heute gebräuchlichen WHO- Klassifikation:

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

##### 1.1 Idiopathisch (IPAH)

##### 1.2 Familiär (FPAH)

##### 1.3 Assoziiert mit (APAH)

###### 1.3.1 Kollagenosen

###### 1.3.2 Kongenitalen systemisch-pulmonalen Shuntvitien

###### 1.3.3 Portale Hypertension

###### 1.3.4 HIV-Infektion

- 1.3.5 Drogen/Medikamente
- 1.3.6 Andere (Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, hereditäre Teleangiektasie, Hämoglobinopathien, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie)
- 1.4 Assoziiert mit signifikanter venöser/kapillärer Beteiligung
  - 1.4.1 Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
  - 1.4.2 Pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)
- 1.5 Persistierende Pulmonale Hypertonie der Neugeborenen (PPHN)
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung
  - 2.1 Linksatriale oder linksventrikuläre Erkrankungen
  - 2.2 Linksseitige Klappenerkrankungen
- 3. Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Lungenerkrankungen und/ oder Hypoxämie
  - 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD)
  - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
  - 3.3 Schlafbezogene Atemstörungen (v.a. obstruktives Schlafapnoesyndrom)
  - 3.4 Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation
  - 3.5 Chronische Höhenkrankheit
  - 3.6 Anlagebedingte Fehlbildungen
- 4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer thrombotischer und/ oder embolischer Erkrankungen (CTEPH)
  - 4.1 Thromboembolischer Verschluss proximaler Pulmonalarterien
  - 4.2 Thrombembolischer Verschluss distaler Pulmonalarterien
  - 4.3 Nicht-thrombotische Lungenembolien (Tumore, Parasiten, Fremdkörper)
- 5. Sonstiges
  - Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangioleiomyomatose, Kompression von Pulmonalgefäßen (Lymphknoten, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

**Abb. 1:** WHO- Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Weltkongress Dana Point 2008)

In dem im Jahre 2003 stattgefundenen 3. Weltsymposium für Pulmonale Hypertonie in Venedig war die bis dahin gültige Pulmonale Hypertonie-Klassifikation (WHO- Konferenz in Evian 1998) überarbeitet und ergänzt worden. In der sog. „Venedig- Klassifikation“ wurde der bis dahin gebräuchliche Terminus „primäre Pulmonale Hypertonie“ (PPH) verlassen. Das darunter verstandene Krankheitsbild war noch weiter differenziert worden in eine

idiopathische und eine familiäre Hypertonie und in die Gruppe der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) eingeordnet worden (Haoula et al. 2006). Im Februar 2008 fand in Dana Point, Kalifornien, das 4. Weltsymposium für Pulmonale Hypertonie statt. Hierbei entschloss man sich, die grundsätzliche Architektur und Philosophie der vorherigen Klassifikationen beizubehalten. Die während des Treffens beschlossenen Modifikationen betrafen vor allem die Gruppe 1, die der pulmonal- arteriellen Hypertonie (PAH). Diese Untergruppe beinhaltet Patienten mit familiär bedingter PAH oder idiopathischer PAH mit Keimbahnmutationen. In der neuen Klassifikation erscheinen Schistosomiasis und chronisch hämolytische Anämie als separate Entitäten in der Subgruppe der mit bestimmten Erkrankungen assoziierten PAH (APAH). Außerdem wurde beschlossen, für die pulmonale veno- okklusive Erkrankung (PVOD) und die pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH) eine eigene Gruppe zu schaffen. Durch diese Veränderungen konnte eine homogenere Gestaltung der Gruppe PAH erreicht werden (Simonneau et al. 2009).

Klinische Symptome der Pulmonalen Hypertonie sind zunehmende Belastungsdyspnoe, rasche Ermüdbarkeit sowie in fortgeschrittenen Stadien Synkopen und Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz (Haoula et al. 2006). In den Anfangsstadien liegt jedoch meist ein recht unspezifisches Beschwerdebild vor, weshalb die Diagnose häufig erst spät gestellt wird. Für die Beurteilung des funktionellen Schweregrades der Pulmonalen Hypertonie gilt die folgende modifizierte NYHA- Klassifikation aus der Evian- Konferenz 1998, welche in Venedig bestätigt wurde (Olschewski et al. 2007):

- |          |   |
|----------|---|
| Klasse 1 | Patienten mit Pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.                                 |
| Klasse 2 | Patienten mit Pulmonaler Hypertonie mit einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen. |
| Klasse 3 | Patienten mit Pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung  |

	der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
Klasse 4	Patienten mit Pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, irgendwelche körperlichen Belastungen ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/ oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt.

*Nach Evian- Konferenz 1998, bestätigt durch Venedig-Konferenz 2003 (Olschewski H. et al. 2007)*

**Abb.2:** Funktioneller Schweregrad der Pulmonalen Hypertonie

Die sekundären Pulmonalen Hypertonien, die z.B. Folge einer Lungenembolie, Lungenfibrose oder einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sein können, sind weitaus häufiger als die sporadisch oder hereditär auftretenden primären Formen (Weitzenblum et al. 1981). Auch ist die Prognose der Patienten mit sekundärer Pulmonaler Hypertonie in der Regel noch schlechter als bei primärer Pulmonaler Hypertonie. Bei Patienten mit einer Lungenfibrose führt das Auftreten einer Pulmonalen Hypertonie zu einem Anstieg der Mortalität (King et al. 2001). Die Möglichkeiten der Behandlung einer Pulmonalen Hypertonie sind sehr begrenzt; in der Literatur finden sich hauptsächlich Studien über primäre Pulmonale Hypertonie, zur sekundären Hypertonie aufgrund einer Lungenfibrose gibt es hingegen nur wenige Studien mit kleinen Fallzahlen (Olschewski, Ghofrani et al. 1999, Ghofrani et al. 2002).

## 1.2. Lungenfibrose

Die Ursachen für die Entstehung einer Lungenfibrose sind vielfältig; neben Noxen und Kollagenosen als Auslöser unterscheidet man auch idiopathische Formen. Die Lungenfibrose stellt meist den Endzustand einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) dar. Unter ILD versteht man nicht- infektiöse, chronische Lungenparenchymerkrankungen, die zu einer vermehrten Gewebebildung im interstitiellen und/ oder alveolären Kompartiment der Lunge führen (Classen et al. 2004). Besteht eine Lungenfibrose, wird das

Lungenparenchym in Bindegewebe umgebaut, was eine Gasaustauschstörung und Hypoxämie nach sich zieht. Man nimmt an, dass für die Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie bei der Lungenfibrose auch der sog. Euler- Liljestrand-Effekt verantwortlich ist. Dabei kommt es hypoxiebedingt zu einer Vasokonstriktion der Lungengefäße (Sommer et al. 2008). Außerdem wurden bei Patienten mit Lungenfibrose im Rahmen der Umbauvorgänge bei Fibrosierung erhöhte Endothelin-1- (ET-1) Spiegel nachgewiesen; die ET-1-vermittelte Vaskonstriktion könnte damit als ein Faktor für die Ausbildung einer Pulmonalen Hypertonie gesehen werden (Ugugioni et al. 1995). Die wesentliche Ursache für die Entstehung der Pulmonalen Hypertonie bei der Lungenfibrose ist jedoch sicherlich die Verringerung des Gefäßquerschnitts durch die Bindegewebsvermehrung.

Die Inzidenz der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) wird in der Literatur mit ca. 10/100000 Einwohner angegeben. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen, meist zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr. Die Therapiemöglichkeiten der Lungenfibrose sind begrenzt, sodass die Lebenserwartung derzeit etwa 3 bis 5 Jahre nach Diagnosestellung beträgt. (American Thoracic Society 2000). Eine Todesursache ist das Rechtsherzversagen im Rahmen einer sich entwickelnden Pulmonalen Hypertonie (Talmadge et al. 2001).

### **1.3. Pulmonal- vaskuläre Regulationsmechanismen**

Der Muskeltonus der Gefäße des Lungenkreislaufs wird im Gegensatz zu denen des Körperkreislaufs vorwiegend lokal durch vasoaktive Substanzen reguliert. Zwei wesentliche Regulationsmechanismen stellen hierbei das Endothelin- sowie das Prostazyklinsystem dar.

#### **1.3.1. Endothelinsystem**

Endotheline sind vasoaktive Mediatoren, von denen folgende drei Isoformen unterschieden werden können: Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3. Diese werden in unterschiedlichen Zelltypen produziert und nehmen Einfluss

auf den Tonus der Gefäßmuskulatur, die Zellproliferation sowie die Hormonproduktion im Gefäßsystem (Krämer et al. 1992, Levin et al. 1995).

Die Sekretion von Endothelin-1 in den Endothelzellen sowie den glatten Muskelzellen der Gefäße kann durch Hypoxie oder einwirkende Scherkräfte binnen weniger Minuten induziert werden. Dies ermöglicht eine rasche Anpassung der Endothelinproduktion an die jeweiligen Erfordernisse der Gefäßregulation. Endothelin-2 wird unter anderem in der Niere sowie im Intestinum gebildet, Endothelin-3 vor allem im ZNS. Über die Funktion dieser beiden Isoformen ist noch wenig bekannt.

Endotheline vermitteln ihre Wirkung über G- Protein- gekoppelte Rezeptoren, die Endothelinrezeptoren. Derzeit sind 2 Subtypen bekannt, der Endothelin-A- und -B- Rezeptor. Bei Bindung von Endothelin am Endothelin-A (ET-A)-Rezeptor, der vor allem in glatter Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden kann, kommt es zu einer Vasokonstriktion. Die Wirkung am Endothelin-B (ET-B)-Rezeptor ist von dessen Lokalisation abhängig: An Endothelzellen vermittelt die Stimulation des ET-B- Rezeptors eine Vasodilatation über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Stimulation desselben Rezeptors an glatter Gefäßmuskulatur hingegen fördert die Vasokonstriktion. In der Lunge sind sowohl ET-A als auch ET- B- Rezeptor nachweisbar (Galié, Manes et al. 2004, Michael et al. 1996).

Es ist bekannt, dass Endothelin eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Pulmonalen Hypertonie spielt (Michel et al. 2003); da erhöhte ET-1- Plasmaspiegel nicht nur bei Pulmonaler Hypertonie, sondern auch bei Lungenfibrose gefunden wurden, geht man davon aus, dass die endotheliale Dysfunktion und das Endothelinsystem auch zur Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie bei Lungenfibrose beitragen (Trakada et al. 2003). Außerdem gibt es zunehmend Beweise, dass das Endothelinsystem auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der Lungenfibrose spielt. So hat man beispielsweise erhöhte ET-1- Spiegel im Plasma und in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Lungenfibrosepatienten gemessen (Trakada et al. 2003, Uguccioni et al. 1995). Auch korrelieren immunhistologische Färbungen von ET-1 und die Höhe des ET-1- Konverting- Enzyms mit der Krankheitsaktivität

bei Lungenfibrose und gehen sogar deren Entwicklung voraus (Giaid et al. 1993, Saleh et al. 1997, Mutsaers et al. 1998).

### **1.3.2. Prostazyklin**

Prostazyklin (PGI) gehört zur Gruppe der Prostaglandine, welche im Körper durch die Cyclooxygenasen und nachfolgend verschiedene Prostaglandinsynthasen aus Arachidonsäure gewonnen werden (Simmons et al. 2004). Der entscheidende Schritt in der Biosynthese von PGI wird durch die membrangebundene Prostazyklinsynthase (PGIS) katalysiert, die konstitutiv in vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (Pereira et al. 1993). Prostazyklin ist ein potenter endogener Inhibitor der Thrombozytenaggregation, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Vasokonstriktion (Holzmann et al. 1980). Neben Endothelin und Stickstoffmonoxid spielt Prostazyklin als weiterer neurohumoraler Faktor eine entscheidende Rolle bei der Regulation des pulmonalen Gefäßwiderstandes und der Entwicklung des pulmonalvaskulären Remodelings.

Während einerseits Endothelin-1 durch seine vasokonstriktorischen und proliferativen Eigenschaften die Entstehung einer Pulmonalen Hypertonie begünstigt, wirken Prostazyklin, NO und evtl. auch Endothelin-1 über den ET-B-Rezeptor einer Pulmonalen Hypertonie und evtl. sogar einer Lungenfibrose entgegen.

Der positive therapeutische Effekt von Prostazyklin auf die Hämodynamik und Belastbarkeit sowie eine Verbesserung der Mortalität bei Patienten mit idiopathischer Pulmonaler Hypertonie ist gesichert (Olschewski, Simonneau et al. 2002, Wensel et al. 2000). Ebenso wird bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie und Lungenfibrose eine Senkung des pulmonalerteriellen Druckes durch inhalative und intravenöse Gabe von Prostanoiden beschrieben (Olschewski, Ghofrani et al. 1999).

Die endogene Prostazyklinproduktion bei Pulmonaler Hypertonie wurde nur in wenigen Studien untersucht (Tuder et al. 1999, Christman et al. 1992); zur neurohumoralen Regulation der Pulmonalen Hypertonie bei Lungenfibrose lagen zu Beginn dieser Studie noch keinerlei Daten vor.

#### **1.4. Therapiemöglichkeiten der PH**

Eine Heilung der Pulmonalen Hypertonie ist trotz aller Fortschritte in Diagnostik und Therapie bis heute nicht möglich. Jedoch hat die Entwicklung gezielter Therapieverfahren beachtenswerte Verbesserungen bezüglich Lebenserwartung, körperlicher Belastbarkeit sowie Lebensqualität der Patienten erbracht. Dies wurde erst durch die intensiven Forschungen auf dem Gebiet der Pulmonalen Hypertonie in den letzten Jahren ermöglicht (Stähler et al. 2008).

Grundsätzlich stehen heutzutage zwei unterschiedliche Ansatzpunkte der therapeutischen Intervention zur Verfügung, mit deren Hilfe der Widerstand im Pulmonalkreislauf gesenkt werden soll: einerseits Förderung der Vasodilatation durch Prostazyklin bzw. seine Analoga sowie Phosphodiesteraseinhibitoren (PDE-5-Inhibitoren), auf der anderen Seite Hemmung der Vasokonstriktion durch Endothelinrezeptorantagonisten und Calciumantagonisten.

Prostazyklin steht in verschiedenen Applikationsformen zur Verfügung (intravenös, inhalativ, oral, subkutan); in Deutschland wird hauptsächlich inhalatives sowie intravenöses Iloprost verwendet. Intravenöses Prostazyklin, oral applizierbares Beraprost sowie subkutan bzw. intravenös infundierbares Treprostinil spielen bei uns aufgrund hoher Therapiekosten, fehlender Studienlage bzw. ausgeprägtem Nebenwirkungsprofil derzeit praktisch keine Rolle.

Mit den Phosphodiesteraseinhibitoren hat sich in den letzten Jahren eine neue Therapieform aufgetan, deren bekanntester Vertreter Sildenafil in randomisierten kontrollierten Doppelblindstudien einen hochsignifikanten Effekt auf die Belastbarkeit und Lebensqualität gezeigt hat und seit Ende 2005 in Europa für die Indikation PAH zugelassen ist.

Hochdosierte Calciumantagonisten wie z.B. Nifedipin kommen nur bei sogenannten „Respondern“ zum Einsatz; dies sind Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie (IPAH) oder familiärer pulmonalarterieller Hypertonie (FPAH), bei denen durch einen pharmakologischen Test eine starke pulmonale Vasoreagibilität nachgewiesen werden konnte.

Der Endothelinrezeptorantagonist Bosentan blockiert sowohl ET-A- wie auch ET-B- Rezeptor und wird deshalb als unselektiv bzw. dual bezeichnet

(Olschewski et al. 2007). Nachdem Bosentan bereits seit 2002 in Europa für PAH ab dem NYHA- Stadium III zugelassen worden war, konnten vor kurzem in der sog. EARLY- Studie (Galiè et al. 2008) signifikante Verbesserungen bezüglich des pulmonalvaskulären Widerstands als auch der funktionellen Belastbarkeit bereits bei Patienten mit PAH der NYHA- Klasse II nachgewiesen werden. Seit August 2008 besitzt das Medikament nun auch die Zulassung für die Anwendung bei milder symptomatischer Pulmonaler Hypertonie (PAH II). Bosentan steht seit vielen Jahren an erster Stelle im internationalen Behandlungsalgorithmus der PAH; seit seiner Zulassung wurden mehr als 50000 Menschen mit Bosentan behandelt, das als einziges oral verfügbares Medikament zur Behandlung der PAH in Deutschland mit dem Evidenzgrad A bewertet wurde (Galiè et al. 2004).

In den letzten Jahren wurde in großen klinischen Studien die Wirksamkeit von ET-A- selektiven Endothelinantagonisten (Sitaxentan, Ambrisentan) geprüft. Man ging davon aus, dass ihr Vorteil gegenüber Bosentan darin bestünde, dass sie durch ihre selektive Bindung am ET-A- Rezeptor gezielt die unerwünschten Endothelin- vermittelten Wirkungen unterdrücken; die über ET-B vermittelten Effekte des Endothelins, nämlich Vasodilatation über Freisetzung von NO und Prostazyklin, bleiben somit unbeeinflusst und könnten zusätzlich dem Krankheitsprozess entgegenwirken. Diese Theorie hat sich in den jüngsten Studien zwar nicht bestätigt, denn ein spezifischer Vorteil bezüglich der Wirksamkeit aus der höheren Affinität zum ET-A- Rezeptor konnte nicht nachgewiesen werden, aber es traten unter Ambrisentan keinerlei klinisch relevante Medikamenteninteraktionen mit Warfarin oder Sildenafil auf, welche bei PAH- Patienten häufig zur Anwendung kommen. Somit besitzt Ambrisentan, das seit Juni 2008 in Deutschland zur Therapie der WHO- Funktionsklassen II und III zugelassen ist, einen signifikanten Vorteil gegenüber unselektiven Endothelinantagonisten (Hrometz et al. 2008).

Die Problematik besteht jedoch darin, dass die zuvor genannten Medikamente zur Verbesserung der Hämodynamik und der Symptome nur für eine kleine Untergruppe der Pulmonalen Hypertonie, nämlich der „Pulmonal arteriellen Hypertonie“ (PAH), zugelassen sind. Die Wirksamkeit wurde in mehreren

kontrollierten, meist doppelblinden Studien nachgewiesen, fehlt jedoch auch noch für viele Subgruppen der PAH. Für die anderen Formen der Pulmonalen Hypertonie, die den weitaus größeren Anteil des Patientenguts ausmachen, existieren bis heute noch keine zugelassenen Therapien. Mit wenigen Ausnahmen gibt es keinerlei Beleg dafür, dass die gezielte medikamentöse Therapie der PAH auch bei diesen Erkrankungsformen wirksam ist (Olschewski et al. 2007).

### **1.5. Tierexperimentelle Modelle zu Lungenfibrose und PAH**

Die pathophysiologischen Vorgänge, die zur Lungenfibrose bzw. Pulmonalen Hypertonie führen, sind weitgehend unbekannt. Um diese aufzudecken, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene tierexperimentelle Modelle der Pulmonalen Hypertonie entwickelt. So wurde beispielsweise chronische Hypoxie, toxisch induzierte Vaskulitis des pulmonalen Gefäßsystems oder chronische Lungenembolisation dazu benutzt, eine Pulmonale Hypertonie zu erzeugen (Herget et al. 1993).

Eine andere Möglichkeit stellt das bereits seit vielen Jahren anerkannte Bleomycinmodell dar. Bleomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum, das normalerweise in der Onkologie zur Therapie von Hodentumoren, Hodgkin- und Non- Hodgkin- Tumoren eingesetzt wird. Es wird renal eliminiert, besitzt eine Halbwertszeit von ca. 3 Stunden und beeinflusst als Zytostatikum verschiedene Phasen des Teilungszyklus (Lazo et al. 1994). Sein antineoplastischen Effekt beruht auf einer oxidativ schädigenden Wirkung auf DNA (Hay et al. 1991).

In der klinischen Anwendung tritt relativ häufig eine akute Pneumonitis, gefolgt von einer Fibrosierung des Organs, als Nebenwirkung auf. Das Lungengewebe ist gegenüber Bleomycin in besonderer Weise gefährdet, da hier sog. Zysteinhydrolasen, welche in anderen Geweben zu einer Inaktivierung von Bleomycin führen, nur in geringer Anzahl vorhanden sind. In der Forschung macht man sich dieses Phänomen zunutze, indem man bei Versuchstieren durch Bleomycinverabreichung experimentell ein acute respiratory distress syndrome (ARDS) mit anschliessender Entwicklung einer Lungenfibrose auslöst. Verschiedenste Tiermodelle kamen dabei bislang zur Anwendung, z.B.

Modelle mit Ratten (Wild et al. 1994), Mäusen, Hamstern (Iyer et al. 1995), Kaninchen (Timothy et al. 1985, Jones et al. 1998) und Affen. Die Verabreichung des Bleomycins erfolgte dabei meist durch intratracheale Instillation (Wild et al 1994, Iyer et al. 1995, Timothy et al. 1985), daneben kamen aber auch intravenöse (Piguet et al. 1994) oder intrapleurale bzw. intraperitoneale (Matuse et al. 1995) Injektionen des Medikaments zur Anwendung.

Das Bleomycinmodell ist somit eine anerkannte und häufig verwendete Methode zur Verursachung einer Lungenschädigung durch oxidationsbedingtes Setzen von entzündlichen und fibrotischen Läsionen im Lungeninterstitium diverser Tierarten (Hay et al. 1991). Die hierbei induzierte Lungenfibrose ähnelt derjenigen beim Menschen (Giri et al. 1990) und kann damit als repräsentativ für alle inflammatorisch getriggerten Formen der Lungenfibrose (z.B. exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose, post- ARDS- Fibrose) angesehen werden (Lübke et al. 2005). Ebenso weist die Pathologie Ähnlichkeiten mit der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose beim Menschen (IPF) auf, einer meist lebenslimitierenden Erkrankung, deren Entstehung und Ablauf bisher nur bruchstückhaft bekannt sind und die daher bereits seit vielen Jahren im Mittelpunkt medizinischer Forschung steht (Chaudhary et al. 2006, American Thoracic Society 2000). Das Bleomycinmodell eignet sich daher nicht nur zur Aufklärung der pathophysiologischen Vorgänge der Entstehung der Lungenfibrose und der Pulmonalen Hypertonie, sondern wird auch benutzt zum Erforschen neuer Therapieansätze in der Behandlung der beiden Erkrankungen.

Das Bleomycinmodell ist jedoch auch kritisch zu beurteilen; so wird bemängelt, dass die Lungenfibrose hierbei nicht natürlich entsteht, sondern extern erzeugt wird durch die Gabe des Zytostatikums. Überdies kommt es zu einer toxischen Schädigung der Lunge, wodurch ein völlig anderer Weg der Pathogenese als bei der natürlich entstandenen Lungenfibrose beschritten wird (Adamson IY 1984). Auch haben Studien gezeigt, dass die Bleomycin- induzierte Lungenfibrose nur einer bestimmten Untergruppe der menschlichen interstitiellen Lungenerkrankungen ähnelt und keineswegs repräsentativ für die

idiopathische Lungenfibrose beim Menschen zu sehen ist (Borzone G et al 2001). Auch wird der Einsatz des Bleomycinmodells zur Erforschung der Lungenfibrose unter Fachleuten immer wieder kritisiert, da sich mehrere Therapieansätze nur wirksam im tierexperimentellen Modell, nicht jedoch in der Klinik erwiesen (Chaudhary et al. 2006, Moeller et al 2008).

## 2. Fragestellung

Die vorliegende Studie soll zur Aufklärung des oben dargelegten Sachverhalts beitragen, indem sie die pathophysiologischen Effekte des unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan auf die durch Lungenfibrose induzierte Pulmonale Hypertonie erforscht. Dadurch erhofft man sich Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit des Medikaments auch bei sekundären Formen der Pulmonalen Hypertonie beim Menschen, z.B. der durch interstitielle Lungenerkrankungen ausgelösten Pulmonalen Hypertonie, für die bis heute noch keine gezielte Therapie etabliert ist.

In der vorliegenden Arbeit soll im Hinblick auf die oben beschriebene Thematik im Modell der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose der Frage nachgegangen werden, welchen pathophysiologischen Effekt der Endothelinantagonist Bosentan auf die Entwicklung der Lungenfibrose, die Pulmonale Hypertonie und die neurohumorale Regulation hat. Dabei ist von Interesse, ob eine mögliche Verbesserung der Pulmonalen Hypertonie auf eine Abnahme der Fibrose oder auf Veränderungen in der neurohumoralen Regulation zurückzuführen ist.

Auf die Bedeutung des Endothelinsystems, das eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Lungenfibrose wie auch der Pulmonalen Hypertonie spielt, wird in der vorliegenden Arbeit eingegangen, indem die Auswirkungen der durch Bosentan bewirkten Hemmung des Endothelinsystems auf die Pulmonale Hypertonie als auch die Lungenfibrose erforscht werden. Hierbei sollen insbesondere die Umbauprozesse und fibrosespezifischen Veränderungen, mit der die Lungenfibrose im Bleomycinmodell einhergeht, erforscht werden.

Ziel der Arbeit ist es, Verständnis für die pathophysiologischen Vorgänge der oben genannten Prozesse zu erlangen.

Hierzu wurde zur Analyse der Lungenfibrose der Kollagengehalt semiquantitativ in der Sirius- Red- Färbung sowie quantitativ über die Hydroxyprolinkonzentration bestimmt. Anhand des Myeloperoxidasegehalts ermittelten wir den Entzündungsgrad. Der rechtsventrikuläre systolische Druck sowie die rechtsventrikuläre Hypertrophie dienten zur Bestimmung des Schweregrades der Pulmonalen Hypertonie. Bezuglich der neurohumoralen Regulation stellten wir Prostazyklin in den Mittelpunkt unserer Forschungen; es

wurde auf der Stufe seiner Produktion und seines Wirkortes untersucht. Da PGI aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit schwer nachzuweisen ist, wiesen wir den Mediator indirekt über die PGI- Synthase und den PGI- Rezeptor nach. Der PGI- Rezeptor wurde durch immunhistologische Methoden im Gefäßendothel bestimmt. Der Nachweis der PGIS erfolgte sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene.

Aus den obigen Ausführungen ergibt sich folgende Fragestellung: Hat der unselektive Rezeptorantagonist Bosentan Einfluss auf die Lungenfibrose und die Pulmonale Hypertonie, und wenn ja, welcher Art? Ist eine mögliche Verbesserung der Pulmonalen Hypertonie eher auf den Einfluss von Bosentan auf die Fibrose oder auf Veränderungen in der neurohumoralen Regulation, insbesondere der des Prostazyklins, zurückzuführen?

### **3. Methoden**

#### **3.1. Tierexperimentelle Versuchsphase**

##### **3.1.1. Versuchsaufbau**

Als Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit diente die Untersuchung der Wirkungsweise von Bosentan, eines unselektiven Endothelin- Rezeptor-Antagonisten, auf die Bleomycin- induzierte Lungenfibrose am Tiermodell. Der Versuch wurde nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 genehmigt. Für das Experiment wurden 30 vier Wochen alte männliche Wistar-Ratten (Charles- River- Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Anfangsgewicht von 286 g ( $\sigma = 12,8$ ) in folgende Gruppen unterteilt:

1. gesunde Kontrollgruppe (n=10)
2. Bleomycin- Gruppe (n=10)
3. Bleomycin + Bosentan- Gruppe (n=10)

Alle Tiere wurden in Einzelkäfigen bei normaler Kost und Wasser ad libitum in einem 12 Stunden- Tag-/ Nachtrhythmus gehalten. Am Tag 0 wurde den Gruppen 2 und 3 Bleomycin verabreicht; die Gabe von Bosentan an die Tiere der Gruppe 3 begann am Tag 1. Am Tag 28 erfolgte die RVSP (rechtsventrikulärer systolischer Druck)- Messung und Organentnahme.

##### **3.1.2. Induktion der Lungenfibrose und Behandlung**

Das Zytostatikum Bleomycin (cell- pharm- GmbH, Hannover, Deutschland), welches normalerweise zur Tumortherapie von Seminomen, Nichtseminomen, Hodgkin- und Non- Hodgkin- Lymphomen angewendet wird, verursacht als schwere Nebenwirkung unter anderem eine Lungenfibrose, da die Lunge nur wenig Hydrolasen und niedermolekulare Eiweißfraktionen besitzt, welche Bleomycin in anderen Geweben teilweise inaktivieren und somit dort eine niedrigere Organtoxizität vorliegt.

Im Vorversuch wurde eine Injektionsdosis von 2,5 U/ kg Körpergewicht (1 Unit = 1 mg) ermittelt, wobei ein immer gleich bleibendes Gesamtvolumen von 0,25 ml appliziert wurde. Das Bleomycin wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien zum Arbeiten mit Zytostatika in 0,9%igem NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und am Tag 0 den Tieren der Bleomycin-

Gruppe und der Bleomycin + Bosentan- Gruppe intratracheal verabreicht. Dazu wurden die Ratten in eine leichte Inhalationsnarkose mit Isofluran (Florene „R“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) versetzt, senkrecht gelagert und ein G16- Katheter (Johnson & Johnson, Haan, Deutschland) mit Hilfe eines Führungsdrähtes in die Trachea eingeführt. Über diesen wurde die entsprechende Menge an Bleomycin mit einer Insulinspritze (BD Plastikpak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) appliziert und anschließend jeweils mit 0,5 ml Luft nachgespült, um eine adäquate Verteilung des Medikaments in der Lunge zu gewährleisten und um sicherzustellen, dass die gesamte Dosis injiziert wurde.

Bosentan (Actelion Pharma Schweiz AG, Baden, Schweiz), ein unselektiver Endothelinrezeptorantagonist, der bisher zur Therapie bestimmter Formen der Pulmonalen Hypertonie Anwendung findet, wurde täglich, beginnend ab Tag 1, mittels Magensonde (G18, Scanbur, Karlslunde, Dänemark) gewichtsadaptiert in einer Dosis von 100mg/kg Körpergewicht, in Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und den Tieren der Bleomycin + Bosentan- Gruppe verabreicht. Zur individuellen Dosisanpassung wurden die Tiere zweimal pro Woche gewogen.

### **3.1.3. Hämodynamische Messungen**

#### **3.1.3.1. Systemischer Blutdruck**

Am Ende der vierwöchigen Behandlungsphase fand zum Ausschluss einer systemischen Hypertonie vor der hämodynamischen Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) an zwei aufeinander folgenden Tagen die Blutdruckmessung mittels der Tail- cuff- Methode mit dem BP- Recorder 8005 (W&W Electronics, Hofheim, Deutschland) statt.

#### **3.1.3.2. Rechtventrikulärer systolischer Druck**

Der RVSP (= rechtsventrikulärer systolischer Druck) wurde als Maß für eine vorhandene Pulmonale Hypertonie bestimmt.

Die Messung erfolgte am Ende der vierwöchigen Versuchszeit. Dazu wurden die Ratten in eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran versetzt, bevor die

eigentliche Narkose durch i.p.- Injektion von Trapanal (0,1ml/kg Körpergewicht; Altana Pharma, Konstanz, Deutschland) erfolgte. Nach Freilegung der V. jugularis externa wurde das Gefäß mittels einer feinen Schere angeschnitten und ein mit Heparin (500IU/ml; Liquemin N 25000, Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespülter Kinder- ZVK (1mm\*80mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Dort wurde anschließend mit einem Druckabnehmer (Programm 19, Hellige, Freiburg im Breisgau, Deutschland) der RVSP gemessen.

### **3.1.4.       Organ- und Blutentnahme und Verarbeitung**

#### **3.1.4.1.       Blutentnahme und Plasmagewinnung**

Nach erfolgter RVSP- Messung wurde über den sich im rechten Ventrikel befindenden Katheter jeweils ein EDTA- Röhrchen Blut abgenommen. Dieses wurde sofort bei 3000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand (Plasma) abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **3.1.4.2.       Organentnahme und Bestimmung der rechtsventrikulären Hypertrophie**

Nach der Eröffnung des Thorax über die Abdomen- Thorax- Medianlinie wurden die Gefäße oberhalb der Herzbasis durchtrennt und es erfolgte die Entnahme von Herz und Lunge en bloc.

Zunächst wurde das Herz mit kardiopleger Lösung (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) gespült, um die Myozyten in einen relaxierten Zustand zu überführen, was für die weiteren morphometrischen Untersuchungen am Herzen nötig war. Danach wurden die beiden Ventrikel und das Septum voneinander getrennt und einzeln gewogen. Das Verhältnis des rechtsventrikulären Gewichtes zur Summe aus linksventrikulärem und septalem Gewicht (RV/ [LV+S]) diente als Maß für die rechtsventrikuläre Hypertrophie. Jeder Ventrikel wurde in zwei gleich große Teile geteilt, in flüssigem Stickstoff durchgefroren und bis zu den weiteren Untersuchungen, die Bestandteil einer anderen Dissertation waren, bei -80°C gelagert.

Die gesamte Lunge wurde gewogen und anschließend in rechten und linken Lungenflügel getrennt. Die linke Lungenhälfte wurde ohne vorheriges Durchspülen ebenfalls auf flüssigem Stickstoff durchgefroren und bis zur Homogenisation bei -80°C gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt: Der rechte Oberlappen wurde mit 4%ig- PBS-gepuffertem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter konstantem Druck mittels Infusionssystem gespült und eine Paraffineinbettung angeschlossen. Die restliche Lungenfraktion wurde mit 0,9%igem NaCl gespült, auf Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA- Isolation bei -80°C gelagert.

### **3.2. Histologische Untersuchung**

#### **3.2.1. Paraffineinbettung und Schnittherstellung**

Nach der Organentnahme haben wir das zu untersuchende Lungengewebe für 48 Stunden in 4%ig PBS- gepuffertem Formalin in Einbettkassetten inkubiert und anschließend eine Paraffineinbettung am Gerät Histocentre 2 (Shandon, Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Von den gegossenen Paraffinblöcken wurden mit dem Microm HM 400 (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt; diese haben wir kurz in einem 50°C warmen Wasserbad gestreckt, um Faltenbildung zu vermeiden. Danach wurden sie auf Superfrost-Objektträger (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen und über mehrere Stunden bei 37°C getrocknet.

#### **3.2.2. Hämatoxylin- Eosin- Färbung**

##### **3.2.2.1. Durchführung**

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die dem Betrachter Hinweise auf pathologisch veränderte Strukturen gibt. So kann man z. B. eine Fibrose an vermehrtem Bindegewebsgehalt (rötlich- orange Farbe) erkennen.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln, muss er zu Hämalaun (basischer Hämateinlack) aufbereitet werden. Hämalaun färbt als basischer Farbstoff saure Komponenten blau an; der saure Farbstoff Eosin hingegen färbt basische

Komponenten rot. Kerne erscheinen dadurch in der HE-Färbung blau, Zytoplasma, Bindegewebe und Muskulatur rötlich-orange.

Die 4 µm dünnen Schnitte wurden in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Dann fand die Färbung mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) über 3 min und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser über 5 min statt. Die dreiminütige Gegenfärbung mit Eosin, das zuvor mit Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) angesäuert worden war, erfolgte über 3 min mit anschließender Differenzierung in 70%igem Alkohol, woran sich die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe, eine fünfminütige Xyloinkubation sowie das Eindeckeln mit Roti- Histokitt II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) anschloss.

### **3.2.2.2. Mikroskopische Auswertung**

Die Präparate wurden geblendet von zwei unabhängigen Betrachtern nach ihrem Fibosegrad bewertet.

Die Betrachtung erfolgte am Durchlichtmikroskop (Leitz DM, RBE, Wetzlar, Deutschland) bei 20facher Vergrößerung. Dazu wurde der Schnitt meanderförmig durchgemustert und nach folgenden Kriterien beurteilt:  
0 = keine Fibrose (d.h.: keinerlei Fibroseherde im gesamten Schnitt sichtbar bzw. Fibrose < 25 % vom Gesamtgewebe)

1 = leichte Fibrose (d.h.: 1- 2 Fibroseherde sichtbar bzw. 25-50 % vom Gesamtgewebe betroffen)

2 = mittlere Fibrose (d.h.: 3- 4 Fibroseherde sichtbar bzw. 50-75 % betroffen )

3 = starke Fibrose (d.h.: > 4 Fibroseherde sichtbar bzw. >75 % betroffen)

### **3.2.3. Sirius-Red-Färbung**

#### **3.2.3.1. Durchführung**

Um den Fibosegrad beurteilen zu können, haben wir zusätzlich eine Bindegewebefärbung mit Sirius Red durchgeführt. Diese Färbemethode kann dem Untersucher Informationen über den Fibosegrad liefern, da sie Bindegewebe spezifisch rot färbt. In der vorliegenden Färbetechnik erscheint Bindegewebe rot, alle anderen Gewebsarten grün.

Zunächst wurde die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und deren Wässerung in absteigender Alkoholreihe durchgeführt. Daraufhin habe ich die Schnitte zweimal hintereinander für je ca. 5 min in 1%ige Tween- PBS- Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelegt, welche die Oberflächenspannung herabsetzt und somit ein besseres Binden des Farbstoffs ermöglicht. Nach weiteren zwei mal 5 min in destilliertem Wasser erfolgte die Inkubation mit den Farbstoffen über 30 min. Das Reagenz hierfür wurde aus 100 mg Sirius Red Reagent (Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 mg Fast Green FCF Certified (Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) und 100 ml Picrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Es ist dabei wichtig, darauf zu achten, dass mit Handschuhen gearbeitet wird, da Picrinsäure giftig ist; außerdem handelt es sich bei den Farbstoffen um lichtempfindliche Substanzen, weswegen das Zubereiten des Reagenzes und die Inkubation der Schnitte lichtgeschützt erfolgen sollte. Nach der Inkubationszeit schließt sich ein zweimal fünfminütiges Waschen in destilliertem Wasser, die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, sowie das Eindeckeln mit Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland) an.

### **3.2.3.2. Mikroskopische Auswertung**

Die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde geblendet von zwei unabhängigen Betrachtern durch computergestützte Morphometrie am Durchlichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung mit dem Programm Meta- Vue (Universal Imaging, Pennsylvania, USA) durchgeführt. Pro Schnitt haben wir 5 repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt, welche keine Randbereiche, Schneide- oder Farbartefakte, jedoch mindestens ein Gefäß beinhalteten. Zu Beginn der Auswertung muss im Programm ein Range für alle Präparate festgelegt werden, der alle roten, also mit Sirius Red spezifisch als Bindegewebe gefärbten Areale, erfasst, nicht aber das mit Fast Green gegengefärbte Restgewebe. Das Gesichtsfeld wird von Meta- Vue anhand seiner Pixelgröße in Gesamtfläche umgerechnet, welche 100% entspricht. Die mit dem range erfassten rot gefärbten Bindegewebsareale werden dann ebenso pixelbezogen erfasst und als Prozentsatz der Gesamtfläche angegeben. Um auch Schnitte

beurteilen zu können, welche verhältnismäßig viel „Luft“, z.B. in Form von Zysten, Bullae, etc. enthalten, haben wir zusätzlich einen zweiten Range gesetzt, der alles „weiße“, d.h. Luft, in den Präparaten erfasst. Die entsprechenden Flächenangaben der einzelnen Blickfelder wurden dann nach folgender Formel miteinander verrechnet:

Fibrosegrad (Blickfeld) = A (Bindegewebe) / A (Gewebe)\*

\* A(Gewebe) = A (Gesamtblickfeld) - A(Luft)

Der Mittelwert der 5 Blickfelder ergibt dann den Fibrosegrad des entsprechenden Schnittes.

### **3.3. Immunhistologie**

Die Immunhistologie diente der Lokalisierung und dem semiquantitativen Nachweis von Prostazyklin. Da das Gewebshormon PGI jedoch selbst nicht direkt nachweisbar ist, führten wir einen indirekten Nachweis über das PGI-synthetisierende Hormon (PGI- Synthase) sowie den PGI- bindenden Rezeptor (PGI- Rezeptor) durch.

Da sich ein deutlicher Unterschied im Verhalten großer und kleiner Gefäße zeigt, wurden diese getrennt voneinander untersucht.

#### **3.3.1. Paraffineinbettung und Schnittherstellung**

Durchführung siehe 2.2.1

Sämtliche Verdünnungen für die Immunhistologie wurden, sofern nicht anders angegeben, mit PBS (= phosphate buffer solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) vorgenommen.

#### **3.3.2. RECA 1**

##### **3.3.2.1. Durchführung**

Bei RECA 1 (= rat endothelial cell antibody) handelt es sich um einen spezifischen Marker für Rattenedothelien. RECA 1- positive Areale, also das Endothel, färben sich graubraun, der Hintergrund erscheint hell, Zellkerne grün. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe gewässert. Die endogene Peroxidase, die zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führen kann, wurde von uns in einem 10%igen PBS/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(= Wasserstoffperoxid)- Bad für 20 min blockiert, woraufhin eine zusätzliche fünfzehnminütige Blockierung des endogenen Biotins und Avidins mit dem Vector Blocking Kit (Linaris Wertheim, Deutschland) bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer stattfand. Das Antigen- Retrieval erfolgte während 30 min bei 37°C auf enzymatischem Wege mittels 0,1%iger Protease XIV (Sigma-Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland). Dies ist notwendig, weil es durch die Formalinfixierung zu einer Maskierung des Antigens kommt, welche durch diesen Arbeitsschritt wieder rückgängig gemacht werden und der Antikörper das Antigen somit wieder detektieren kann.

Eine zusätzliche Blockierung mit 50 µl Superblock (ID- Labs, Ontario, Canada) wurde angewandt, um durch Proteinladungen entstehende unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. Anschließend trugen wir je 50 µl des 1:10-verdünnten mouse -anti- RECA 1- Primärantikörpers (Acris, Hiddenhausen, Deutschland) auf jeden Schnitt auf, die Negativkontrolle erhielt stattdessen 50 µl PBS. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl des Sekundärantikörpers (Jackson Immuno Research; Baltimore Pike, USA), ein goat- anti- mouse- biotinkonjugierter Antikörper in einer 1:500- Verdünnung, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf alle Präparate aufgetragen.

Vor der Visualisierung mit DAB (= 3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Sigma, Deutschland) erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit dem Vectastain- ABC- Kit (Avidin- Biotin- Complex, Linaris, Wertheim, Deutschland). Das DAB- Substrat wurde folgendermaßen angesetzt: 2 Tabletten à 10 mg DAB wurden in 40 ml PBS gelöst und unmittelbar vor dem Aufpipettieren auf die Schnitte mit 1600 µl 10%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 1 ml NaCl versetzt. Auf die dreiminütige Gegenfärbung mit Methylgrün schloss sich wiederum die aufsteigende Alkoholreihe, eine Inkubation in Xylol sowie das Eideckeln an.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit PBS gewaschen.

### **3.3.3. PGI- Synthase- Färbung**

#### **3.3.3.1. Durchführung**

Der spezifische Nachweis der PGI- Synthase erfolgte in Grundzügen analog der RECA 1- Färbung mit dem Unterschied, dass die Blockade der endogenen

Peroxidase mit einem 6%igen Methanol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bad (Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte und kein Antigen-Retrieval durchgeführt wurde.

Mit Ausnahme der Negativkontrolle wurden alle Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem 1:100- verdünnten Primärantikörper inkubiert. Dabei handelte es sich um den monoklonalen mouse- anti- rat- PGI- Synthase- Antikörper der Fa. Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Als Sekundärantikörper verwendeten wir den 1:200- verdünnten biotinkonjugierten goat- anti- mouse- IgG- Antikörper (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA).

### **3.3.4. PGI- Rezeptor- Färbung**

#### **3.3.4.1. Durchführung**

Um den PGI- Rezeptor nachzuweisen, wurde grundsätzlich wie bei der RECA 1- Färbung vorgegangen. Als Antigen- Retrieval verwendeten wir jedoch Proteinase K (Dako Corporation, Carpinteria, USA) in einer Konzentration von 250 µg/ml. Die Inkubation mit dem 1:200- verdünnten Primärantikörper (rabbit- anti- rat- PGI- receptor, Acris GmbH, Germany) dauerte hierbei nur eine Stunde, woraufhin der biotinkonjugierte Sekundärantikörper (goat- anti- rabbit- IgG, mouse- absorbed, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) in einer 1:200- Verdünnung für eine weitere Stunde aufgetragen wurde.

### **3.3.5. Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie mittels Remmele- Score**

Der PGI- Rezeptor- und -Synthase- Nachweis wurde durchgeführt, um auf Proteinebene vorhandene PGI- Rezeptoren bzw. -Synthase zu lokalisieren und z.T. mit Genexpressionsdaten zu korrelieren (siehe 2.4). Zudem schloss sich eine semiquantitative Analyse von PGI- Synthase und PGI- Rezeptor an, wobei der sog. Remmele- Score Anwendung fand. Dazu wird eine Referenzfärbung benötigt, in unserem Fall der Endothelmarker RECA 1, da beide Stoffe v.a. am Gefäßendothel gefunden werden. Anhand der Referenzfärbung haben wir folgendes Scoring entwickelt:

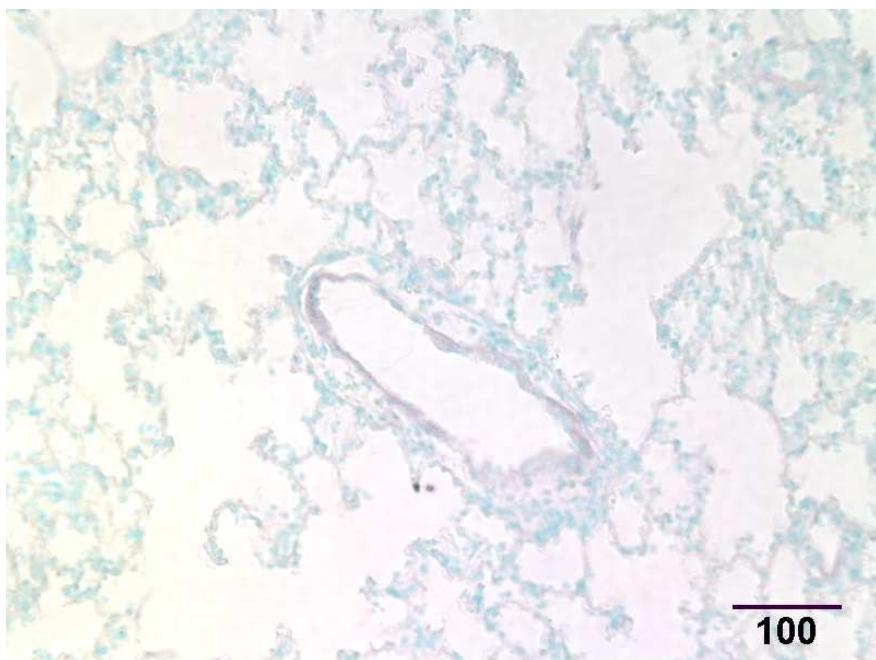
0 = keine Färbung

1 = schwache Färbung, gerade noch erkennbar

2 = Färbung vorhanden, aber schwächer als bei RECA 1

3 = Färbung genauso stark wie bei RECA 1

Von jedem Präparat haben wir Schnitte in Serie angefertigt, von denen wir dann jeweils Endothel (mit RECA 1), PGI- Synthase und PGI- Rezeptor färbten. Es wurden pro Schnitt je 5 horizontal angeschnittene Gefäße mit einem Durchmesser von 30- 100 µm bzw. > 100 µm ausgewählt und anschließend deren genauer Durchmesser und Färbeintensität im Vergleich zu der Intensität der Anfärbung von RECA 1 notiert. Zudem wurde der Prozentsatz der angefärbten Zellen im Endothel abgeschätzt; dazu wurde die Querschnittsfläche des Gefäßes in vier Quadranten eingeteilt und die Anfärbung eines Quadranten mit 25% gleichgesetzt. Aus der Summe der beteiligten Quadranten ergab sich der Gesamtprozentsatz. Ein Gefäß, das beispielsweise durchgehend genauso stark wie RECA 1 angefärbt war, erhielt demnach folgende Beurteilung:



**Abb. 3:** Beispiel Beurteilung Remmele- Score: Gefäß mit Färbeintensität 3, Anteil der angefärbten Zellen 100%

Der eigentliche Remmele- Score setzt sich dann aus dem Produkt von Färbeintensität und Prozentsatz des angefärbten Gefäßquerschnitts zusammen.

Formel: Remmele- Score = Färbeintensität \* Prozentsatz

Im obigen Beispiel ergäbe sich also ein Wert von  $3 * 1,0 = 3$ . Die Remmele-Scores der fünf einzelnen Gefäße werden anschließend gemittelt und ergeben so einen repräsentativen Wert für den entsprechenden Schnitt.

### **3.4. Genexpressionsanalyse**

Der quantitative Nachweis von Prostazyklin erfolgte indirekt über die Untersuchung der Genexpression seines synthetisierenden Enzyms PGI-Synthase.

#### **3.4.1. RNA- Isolation**

Um die Genexpression der PGI- Synthase molekularbiologisch darstellen zu können, ist es zunächst notwendig, die RNA aus den bei -80 °C gelagerten Lungenproben zu isolieren, was von uns mit Hilfe der Single- Step- Methode durchgeführt wurde. Um eine Degradierung des Untersuchungsmaterials durch die ubiquitär vorhandenen RNAsen zu vermeiden, ist ein sorgfältiges RNase-freies Arbeiten sowie ständiges Kühlen der Proben auf Eis unbedingt erforderlich.

Soweit möglich, wurden ausschließlich sterile Einweg- Materialien verwendet. Lösungen und Puffer wurden einer 1%igen Diethylprocarbonat (= DEPC)- Behandlung unterzogen.

Bei der oben genannten Methode wird jedes Lungenpräparat in einem Falkontube mit 15 ml Trizollösung (Invitrogen, Deutschland) versetzt und mit einem Mixer (Ultra Turrax T25, KIKA Labortechnik, Deutschland) homogenisiert. Das in Trizol enthaltene GTC, ein chaotropes Salz, denaturiert alle Proteine, also auch evtl. vorhandene RNAsen, während das saure Phenol DNA bindet.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 3 ml Phenol-bindendes Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben, worauf eine milchige Lösung entsteht.

Nach kurzem Schütteln und weiteren 3 min werden die Proben 15 min lang bei 4 °C und 4000 Umdrehungen zentrifugiert.

Folgende 3 Phasen sollen sich bilden: Eine obere farblose Schicht, welche die RNA enthält, eine milchige Phase in der Mitte mit großen DNA- Stücken sowie Phenol und kleine DNA- Stücke als unterste Schicht.

Die RNA aus der obersten Phase wird nun vorsichtig in RNase- freie Röhrchen pipettiert, wiederum mit 3 ml Chloroform versetzt, geschüttelt und für weitere 10 min zentrifugiert (4 °C , 4000 Umdrehungen).

Von den sich nun gebildeten 2 farblosen Phasen (unten Phenolreste und Chloroform, oben RNA) wird der Überstand in neue Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert, 7,5 ml Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur RNA-Fällung zugegeben und das Ganze 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach 15minütiger Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Varifuge 20 RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland; Rotor 20.16) bei 4 °C und 10000 Umdrehungen hat sich ein RNA- Pellet gebildet. Die sich darüber befindende wässrige Phase nimmt man mit der Wasserstrahlpumpe ab; das übriggebliebene Pellet kann nun mit 5 ml 70%igem Ethanol (-20 °C) resuspendiert werden, was zu einer erneuten Fällung der RNA führt.

Nach Vortexen und weiteren 5 min in der Ultrazentrifuge (4 °C, 7500 Umdrehungen) wird wiederum der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgenommen und der Pellet nach fünfminütigem Trocknen in 500 µl Aqua dest. gelöst.

Die nun isolierte RNA kann in Eppendorfcups bei -80 °C bis zur Vermessung am Photometer gelagert werden.

### **3.4.2. RNA- Konzentrationsbestimmung**

In diesem Arbeitsschritt wird die bereits isolierte RNA am Photometer (Gene Quant Pro- Photometer, Bio Chrom Ltd., Cambridge, England) vermessen, um die in den jeweiligen Proben vorliegende Konzentration zu ermitteln.

Dazu stellten wir eine 1:50- Verdünnung der Proben mit Aqua dest. her; der Nullabgleich am Gerät erfolgte ebenfalls mit Aqua dest.

Die Konzentration jeder Probe wurde am Photometer über die optische Dichte, die die Proben bei unterschiedlicher Wellenlänge aufweisen, ermittelt und

jeweils doppelt bestimmt. Dabei absorbiert RNA spezifisch bei 260 nm, Proteine dagegen bei 280 nm. Aus dem Dichtequotienten  $Q = 260\text{nm} / 280\text{nm}$ , der idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte, kann man auf den Reinheitsgrad der RNA- Proben schließen. Durch die Dichtemessung bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm leitet die Photometersoftware nach folgender Formel die absolute RNA- Konzentration ab:

$$c = \text{optische Dichte} * \text{Verdünnung} * \text{Multiplikationsfaktor} \text{ (für RNA = 40)}$$

Aus den gemittelten Doppelbestimmungswerten kann man nun das für die sich anschließende Reverse- Transkriptase- Reaktion einzusetzende Volumen, das 1  $\mu\text{g}$  RNA enthält, berechnen.

### **3.4.3. RNA-Qualitätskontrolle**

Nach einer erfolgten RNA- Isolation sollte immer eine RNA- Integritätskontrolle mittels Chipverfahren durchgeführt werden, um Proben zu erfassen, die durch RNAsen z.B. bei unsauberem Arbeiten verunreinigt und bereits degradiert sind. Dafür haben wir einen RNA- Nano- Lab- Chip (RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technologies, Deutschland) mit Mikrokanälen verwendet, bei dem die einzelnen Probenwells alle mit einem Separationskanal verbunden sind.

Die aufgetragenen Proben verbinden sich mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff und werden nach Anlegung eines Spannungsfeldes nach ihrer Größe kapillarelektrophoretisch über Laserdetektion aufgetrennt. Anhand dessen erstellt die Computersoftware ein Elektropherogramm sowie ein Gel-like- picture, das die RNA- Fragmente in Form von Bändern darstellt.

Im Elektropherogramm einer intakten RNA kann man zwei ribosomale Peaks (18s- RNA u. 28s- RNA) und einen zusätzlichen Markerpeak erkennen; deren Muster lässt Rückschlüsse auf die Integrität der RNA zu. Jede einzelne Probe wurde makroskopisch anhand der spezifischen Peaks beurteilt.

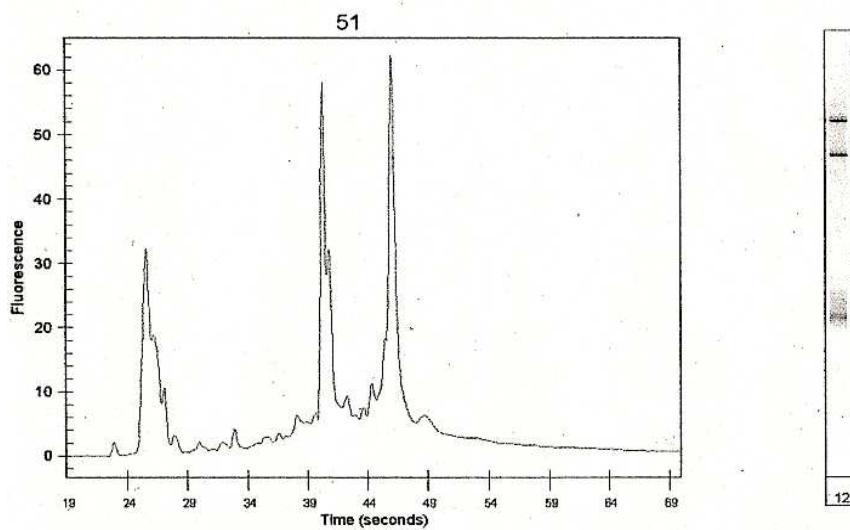


Abb. 4: Elektropherogramm und Gel-like-picture einer Probe von guter Qualität

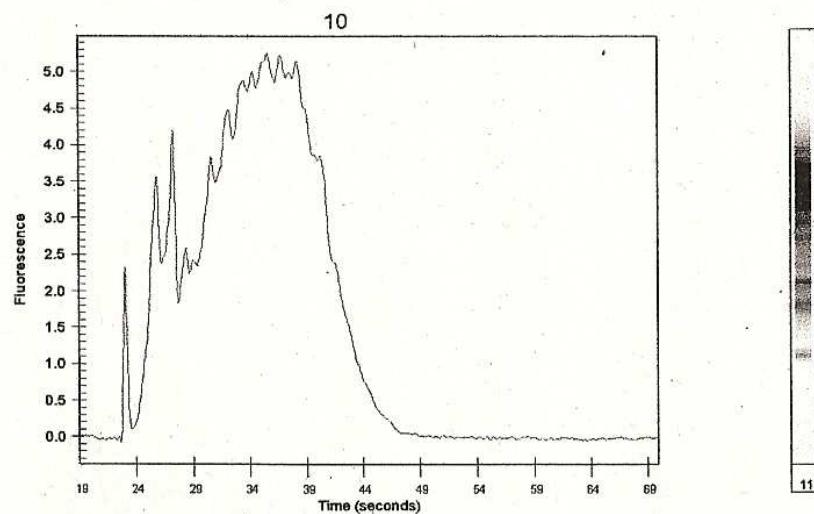


Abb. 5: Elektropherogramm und Gel-like-picture einer Probe von schlechter Qualität

Gemäß dem Herstellerprotokoll pipettierten wir in die 12 Fächer des mit Gelmatrix beladenen Chips eine RNA- Standard- Leiter (RNA 6000 ladder, Ambion, Austin, USA) und 12 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Proben. Man verwendet grundsätzlich nur solche Proben für die Reverse-Transkriptase- Reaktion und die darauf folgende Real- Time- PCR, die sich sowohl bei der RNA- Chip- Qualitätskontrolle als einwandfrei erwiesen als auch eine ausreichende RNA- Konzentration besitzen.

### 3.4.4. Reverse Transkriptase- Reaktion

Da die bereits isolierte RNA nicht unmittelbar für das sich anschließende PCR-Verfahren genutzt werden kann, muss sie vorher noch mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in eine sog. cDNA (= complementary DNA), ein einzelsträngiges DNA- Molekül, welches das eigentliche Template der PCR-Reaktion darstellt, überführt werden.

Dazu versetzt man in jedem Reaktionsansatz 1 µg RNA mit 1 µl Random-Primer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), einem unspezifischen Hexaprimerprimer, der an alle Abschnitte der RNA binden kann, so dass die gesamte RNA sicher umgewandelt wird. Diese dienen auch als Startmolekül für die Reverse Transkriptase.

Nach Auffüllen mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 10 µl, kurzem Vortexen und Herunterzentrifugieren findet eine dreiminütige Inkubation im Heizblock (70 °C) statt, was eine Lösung der RNA- Sekundärstruktur bewirkt.

Während des Abkühlens können die Primer an die RNA binden. Alle weiteren Arbeitsschritte müssen aufgrund der Thermolabilität der Enzyme RNAsin und Reverse Transkriptase auf Eis ausgeführt werden. Als Enzym diente die MLV- RT, eine aus dem Moloney- Maus- Leukämie- Virus isolierte, RNA spezifische DNA- Polymerase.

Nun wird auf jeden Cup 10 µl des RT- Mixes zugegeben, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

- 1 µl (~ 200 U) RT
- 1 µl RNAsin (= RNase- Inhibitor) (Promega Corporation, Madison, USA)
- 4 µl dNTP (2.2 mM; enthält dATP, dGTP, dCTP, dUTP) (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom.)
- 4 µl 5 \* RT- Puffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Nach erneutem kurzen Vortexen und Herunterzentrifugieren erfolgt die Inkubation bei 37 °C, dem Temperaturoptimum für die RT. Dabei bindet sie zwischen den Primern an die RNA und kann nun die entsprechend komplementären Nukleotide anheften.

Dieser Vorgang wird nach einer Stunde durch ein zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Das erkaltete Volumen von 20 µl füllt man dann mit Aqua dest.

auf ein Endvolumen von 150 µl auf und gibt die Proben in den Gefrierschrank (-80 °C), wo sie bis zur weiteren Verarbeitung verbleiben.

### **3.4.5. Genexpression**

#### **3.4.5.1. Quantitative Real- Time- PCR**

Die molekularbiologische Untersuchung der Expression der PGI- Synthase erfolgte nach den Prinzipien der von Kary Mullis (Mullis et al. 1986) etablierten Polymerase- chain- reaction (= PCR), einer Methode zur effizienten Amplifizierung spezifischer DNA- Zielsequenzen.

In unserem Falle fand die auf diesem Wirkmechanismus basierende quantitative Real- Time- PCR (= qRT- PCR) Anwendung, eine Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR- Methodik.

Wir haben die isolierten und in cDNA umgeschriebenen RNA- Proben mittels Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) untersucht. In dieser Real- Time (= "Echtzeit") - PCR kann man die Menge des Amplifikationsproduktes zu jedem Zeitpunkt während der PCR quantifizieren, was durch Messung eines Fluoreszenzsignals ermöglicht wird. Dieses wird ausgesendet, sobald sich SYBR Green (Qiagen, Hilden, Deutschland), ein an doppelsträngige DNA bindender Farbstoff, in die minor groove der synthetisierten ds- DNA eingelagert hat. Da das Fluorimeter im LightCycler den ungebundenen Farbstoff lediglich als schwaches Signal detektiert, ist sichergestellt, dass die Fluoreszenzstärke direkt proportional zur Ampliconzunahme ist. Sie wird nach jedem Zyklus neu berechnet und aufgezeichnet. Der sogenannte Crossing point bezeichnet denjenigen Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell ansteigt.

#### **3.4.5.2. Primerdesign**

Um einen bestimmten DNS- Abschnitt erfolgreich vermehren zu können, benötigt man sogenannte Primer. Dies sind Nukleotidsequenzen, die denen der gesuchte Region flankierenden komplementär sind. Sie hybridisieren an die Template- DNA und dienen so der DNA- Polymerase als Startpunkt für die Synthese eines neuen DNA- Strangs.

Als Template diente in unserem Falle die in der reversen Transkriptase-Reaktion gewonnene cDNA aus den Rattenlungen.

Die spezifischen Oligonukleotidsequenzen der benötigten Primer konnten mittels der Genbank des National Center of Biotechnology (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) im Internet ermittelt werden. Mit Hilfe des Blast Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurden die Intron- Exon-Grenzen bestimmt und die Primer im Anschluss durch das Primer 3- Programm ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) derartig generiert, dass Fehler wie Haarnadelbildung, Primerdimere oder unspezifische Primerbindungen ausgeschlossen werden können. Sie wurden von der Firma MWG- Biotech (Ebersberg, Deutschland) in lyophilisierter Form geliefert.

Um cDNA verlässlich von genomischer DNA unterscheiden zu können, wurden Intron- überspannende Primer eingesetzt. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurde das Primerlyophilisat in sterilem Aqua dest. gelöst (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland und eine 1:10- Verdünnung nach folgendem Schema hergestellt:

Primer- Mix (1:10- Verdünnung):

- 10 µl sense- Primer
- 10 µl anti- sense- Primer
- 80 µl Aqua dest.

Zielgen	Primertyp	Sequenz	Endkonzentration	Produktlänge
PGI	sense- Primer	5'- GAT GGG GGT ATC AGA GGA CA -3'	100 pmol/µl	90 bp
	anti- sense- Primer	5`- AAG AGG AGG AGC CAG AAA GC -3`	100 pmol/µl	90 bp
β-Actin	sense- Primer	5`- CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG - 3`	100 pmol/µl	80 bp
	anti- sense- Primer	5`- AAC ACA GCC TGG ATG GCT AC -3`	100 pmol/µl	80 bp

Abb. 6: Primersequenzen für Quantitative Real- Time- PCR

Die optimale Annealing- Temperatur der Primer wurde durch einen Gradienten ermittelt. Dabei wurden identische PCR- Ansätze unter verschiedenen Annealingtemperaturen laufen gelassen. Die Schmelztemperatur des Primers, die von seiner Länge und Sequenz abhängig ist, erhält man durch folgende Formel:

$$T_m = 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times (A+T) + 4 \text{ } ^\circ\text{C} \times (G+C)$$

[ $T_m$ = Schmelztemperatur, A= Adenosin, T= Tyrosin, G= Guanidin, C= Cytosin]

Sie liefert einen groben Anhaltspunkt für die gesuchte Annealingtemperatur.

### 3.4.5.3. Durchführung

Aus den Reagenzien, die unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gut gemischt und kurz zentrifugiert wurden, stellten wir folgenden Reaktionsansatz her (jeweils pro Probe): 5  $\mu\text{l}$  cDNA (6,7 ng/ $\mu\text{l}$ ) wurde in eine Glaskapillare vorgelegt und mit 15  $\mu\text{l}$  Primer – SYBR Green® - Mix ergänzt, der sich wie folgt zusammen setzte:

- 4  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- 10  $\mu\text{l}$  SYBR Green® Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; enthält Sybrgreen- Fluoreszenzfarbstoff, HotStarTaq DNA- Polymerase, dNTP- Mix und Puffer)
- 1  $\mu\text{l}$  Primer-Mix (s.o.)

Nach Verschluss der Kapillaren mittels Deckel wurde kurz abzentrifugiert (30 s, 3000 rpm), das Probenkarussel in den LightCycler® eingesetzt und das Programm gestartet.

Der thermozyklische Prozess, dessen Temperaturprofil den Primern entsprechend gewählt wurde, gliedert sich in folgende drei Phasen:

#### 1. Denaturierung:

Vorgang: thermische Auftrennung der doppelsträngigen (ds- DNA) template-DNA in die jeweiligen Einzelstränge (ss- DNA)

Bedingungen: 95  $^\circ\text{C}$ ; Initiale Denaturierung: 15 min, folgende Zyklen: 15 Sek.

#### 2. Annealing:

Vorgang: Bindung der sequenzspezifischen Primer

Bedingungen: 20 Sek., 56 °C

### 3. Elongation:

Vorgang: DNA- Polymerase- Reaktion; Synthese des komplementären DNA- Strangs durch Anheften der entsprechenden Nukleotide an das 3`OH- Ende des jeweiligen Primers

Bedingungen: 25 Sek., 72 °C

Die Zyklen können beliebig oft wiederholt werden; nach ca. 45 Zyklen ist die Menge an PCR- Produkt jedoch üblicherweise groß genug, um gemessen werden zu können.

Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich die Zahl der gebildeten Amplicons pro Zyklus nach folgender Formel:

$$P = T \times (1 + E)^n$$

P = Amplifikationsprodukt nach n Zyklen

T = Anfangskonzentration der eingesetzten template- DNA

n = Zyklanzahl

E = wirkliche Effizienz der Amplifikation (von 0 bis 1; wobei 0 keine Amplifikation und 1, im Idealfall, eine Verdoppelung darstellt) (Souazé et al. 1996; Tichopad et al. 2003)

Zusätzlich wurde neben dem zu untersuchenden Zielgen für PGI auch ein interner endogener Standard bestimmt. Dies ist notwendig, da bei der cDNA- Synthese verschiedener RNA- Proben nie von einer äquivalenten Effizienz ausgegangen werden kann. Um also eine relative Quantifizierung im Anschluss an den LightCycler- Lauf durchführen zu können, muss man die zu vergleichenden Proben zuvor normalisieren. Dazu wurde für jede Probe neben dem Zielgen zusätzlich  $\beta$ - Actin als Referenzgen (Housekeeper) amplifiziert. Sogenannte Housekeepergene dienen der Aufrechterhaltung diverser Grundfunktionen der Zelle und werden annähernd konstant exprimiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die mRNA- Expression des Referenzgens in allen Proben gleich ist. Da man für die Synthese von Kontroll- und Ziel- DNA innerhalb einer Probe dieselbe Effizienz annimmt, kann man etwaige Differenzen in der Effizienz der cDNA- Synthese zwischen verschiedenen RNA- Proben durch Division der Messwerte von Zielgen und endogener Kontrolle ausgleichen.

### 3.4.5.4. Auswertung

Die erhobenen LightCycler- Daten dienen nicht der absoluten Messung der RNA- Konzentration, sondern einer relativen Quantifizierung mittels Standardkurve und somit der Möglichkeit einer vergleichenden Darstellung der verschiedenen Probenansätze.

Als Richtwert für die Fluoreszenzmessungen wird der sogenannte Crossing Point gebraucht, womit man diejenige Zykluszahl bezeichnet, bei der das Fluoreszenzsignal der Proben erstmals exponentiell ansteigt.

Für die Bestimmung der relativen RNA- Mengen wurde jedem LightCycler- Lauf eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:5, 1:10, 1:100), sowohl für den als endogene Kontrolle fungierenden Housekeeper  $\beta$ -Aktin, als auch für das Zielgen PGI- Synthase, beigefügt. Die Analysesoftware (Roche Light Cycler Run 5.32) des Light Cyclers erstellt eine Standardgerade, indem die logarithmischen Verdünnungswerte linear gegen die entsprechenden crossing points aufgetragen wurden. Die crossing points der unbekannten Proben wurden auf die Eichgerade gefällt und die dazugehörigen relativen Konzentrationswerte, auch als calculated values bezeichnet, automatisch berechnet.

Die Effizienz des jeweiligen Primers konnte anhand der Steigung (engl. slope) der logarithmischen Verdünnungsgeraden ermittelt werden.

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Schwankungen bei der Reversen Transkriptase- Reaktion wurden nach Ermitteln der Werte rechnerisch korrigiert. Dazu wurde der calculated value von  $\beta$ - Aktin eines Kontrolltiers als Kalibrator gleich 1 gesetzt. Alle anderen Proben wurden auf diesen Wert normiert, indem sie mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multipliziert wurden. Auf diese Weise erhält man die korrigierte PGI- cDNA- Konzentration (= korrigierter calculated value), die der tatsächlich vorhandenen PGI- mRNA- Konzentration entspricht und damit einen Hinweis auf die Quantität der PGI- Expression in der entsprechenden Probe beschreibt.

### **3.4.6. Verifizierung des PCR- Produktes (Gelelektrophorese)**

Um zu beweisen, dass es sich bei dem PCR- Produkt der LightCycler- Untersuchung wirklich um PGI- Synthase bzw. Aktin handelt, wurden die Amplicons anhand ihrer Größe gelelektrophoretisch identifiziert.

Zur Herstellung des 1,5%igen Agarosegels muss man 100 ml TBE- Puffer (Herstellung: 270 g TRIS- Puffer, 137,5 g Borsäure und 18,6 g EDTA zusammenmischen und auf 2,5 l mit Aqua dest. auffüllen) mit 1,5 g Agarosepulver (Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) in einem Kolben mischen und in der Mikrowelle ca. 5 min bei 360 Watt erhitzen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht. Dieser werden anschließend 2 µl Ethidiumbromid (Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) hinzugefügt. Dabei handelt es sich um eine extrem toxische Substanz, die sich am Ende des Basenstranges einbaut und durch ihr Leuchten unter UV- Licht das Ablesen des Gelbildes ermöglicht. Um die Größe der zu untersuchenden DNA- Fragmente zu bestimmen, muss zusätzlich ein Gemisch aus DNA- Fragmenten unterschiedlicher Größe als eine Art „Leiter“ mitgeführt werden. In unserem Beispiel nahmen wir eine Standardlösung von 100 bp (= Basenpaaren) (Fermentas GmbH, St. Leon- Rot, Deutschland) und 1000 bp.

Sobald die Gelflüssigkeit in eine vorgefertigte Gelkammer gegossen und fest geworden ist, wird das Gel in eine Pufferkammer überführt und die Geltaschen können mit den Proben bestückt werden. Diese müssen allerdings, ebenso wie die beiden Standardlösungen, zuvor mit je 5 µl „6 \* Loading Buffer“ versetzt werden. Dieser Farbstoff teilt sich in zwei Komponenten, zwischen denen die Probe verläuft, und ermöglicht so dem Betrachter, zu erkennen, wie weit die Probe bereits durchgelaufen ist. Nachdem in jede Tasche je 5 µl Standard bzw. 20 µl Probe pipettiert wurden, legt man an die Pufferkammer eine Spannung von 100 Volt an, wobei auf die richtige Polung (positiver Pol muss sich an der den Taschen gegenüberliegenden Seite befinden) zu achten ist.

Nach ca. einer Stunde sind die einzelnen Proben weit genug gelaufen, um sie mit Hilfe des Standards anhand ihrer Größe unter UV- Licht eindeutig erkennen zu können.

### **3.5. Gewebebestimmungen**

#### **3.5.1. Probenvorbereitung und Lagerung**

Sowohl für die Bestimmung von Hydroxyprolin als auch von Myeloperoxidase wird homogenisiertes Gewebe benötigt. Dafür zerkleinerten wir die zuvor aufgetauten mit 5 ml NaCl versetzten linken Lungenflügel der Versuchstiere im Homogenisator und lagerten sie danach bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -80°C im Gefrierschrank.

#### **3.5.2. Hydroxyprolin**

Hydroxyprolin, das im menschlichen als auch tierischem Organismus ausschließlich in Kollagen vorkommt (Raab et al. 1966), gibt spezifisch das Ausmaß der Fibrose wieder.

##### **3.5.2.1. Durchführung**

Für die Hydroxyprolinbestimmung muss zunächst eine Standard- Verdünnungsreihe hergestellt werden. Es ist wichtig, dass diese für jeden Versuch neu angesetzt wird, da die Substanzen instabil sind und deshalb nicht gelagert werden können. Hierfür wird aus einer Stammlösung, welche 1 mg Standard- Hydroxyprolin (cis- 4- Hydroxy- L- Prolin, Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) und 1 ml NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) enthält, 1, 2, 5, 15 sowie 20 µg in je einen Eppendorfcup gegeben und auf ein Endvolumen von 40 µl mit NaCl aufgefüllt. Zudem stellt man einen Leerwert aus 40 µl NaCl her.

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Die Lungenhomogenisate haben wir bei 4000 Umdrehungen 10 min lang zentrifugiert, wodurch sich 3 Phasen bildeten: In der oberen Schicht befand sich Fett, in der mittleren Wasser und die hydrophile Aminosäure Hydroxyprolin und in der unteren Zelldetritus. Für diesen Versuch entnahmen wir dann 40 µl aus der mittleren Phase in einen Eppendorfcup; der Rest wurde wieder bei -80 °C bis zur Myeloperoxidasebestimmung weggefroren.

Proben, Standard und Leerwert wurden nun mit je 10 µl 10M NaOH versetzt und nach kurzem Vortexen 25 min lang autoklaviert (121 °C, 1bar).

Während in der Autoklave die Hydrolysereaktion durch NaOH stattfindet, kann bereits die Chloramin T- Lösung für den nächsten Schritt vorbereitet werden. Dazu wird 1,27 g Chloramin T- Pulver (Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) mit 20 ml 50%igen n- Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst und mit Citratpuffer (pH 6,5) auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Davon gibt man dann 450 µl in jeden Cup; nach kurzem Vortexen schließt sich eine 25- minütige Inkubation bei Raumtemperatur an, während der Chloramin an Hydroxyprolin binden kann.

Fünf Minuten vor Ablauf der Wartezeit wird das Ehrlichsreagenz, welches wiederum an Chloramin bindet und durch seine Farbeigenschaften eine photometrische Bestimmung erst ermöglicht, frisch angesetzt. Dazu gibt man 3 g DMAP (Dimethylaminophenol) in ein Becherglas, löst es in 13,3 ml 100%igem n- Propanol und fügt noch 6,7 ml Perchlorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) dazu.

Nachdem zu jedem Cup 500 µl Ehrlichsreagenz gegeben wurden, mischt man kurz und inkubiert das Ganze 20 min lang im Heizblock bei 65 °C.

Zum Schluss überträgt man von jedem Cup 200 µl in die entsprechenden Vertiefungen einer 96 Well- Photometerplatte (Sarstedt, Newton, USA) und misst die Extinktion bei 540 nm.

### **3.5.2.2. Auswertung**

Der am Photometer (precision microplate reader, Molecular Devices, MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) gemessene Hydroxyprolingehalt wird zunächst in optischer Dichte (= OD) angegeben. Anhand der Standardreihe erstellt die Computersoftware (Softmax PRO software, Sunnyvale, CA, USA) dann eine Eichkurve, auf die die OD- Werte der einzelnen Proben in linearer Skala gefällt werden. So erhält man die Hydroxyprolinkonzentration pro eingesetzten 40 µl Homogenisat.

### **3.5.3. Myeloperoxidase**

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und diversen Gewebsmakrophagen vorkommt. Es ist an der

Regulation und Terminierung von Entzündungsreaktionen wesentlich beteiligt, indem es die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid katalysiert. Die hierbei gebildeten Hypochloridionen oxidieren verschiedene Biomoleküle und tragen somit zur Erkennung und Aufnahme apoptotischen Materials durch Phagozyten bei. Somit kann der Myeloperoxidasegehalt als Anhaltspunkt für den Entzündungsgrad eines Gewebes dienen.

### 3.5.3.1. Durchführung

Bevor mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden kann, müssen zunächst die benötigten Reagenzien hergestellt werden:

- Phosphatpuffer:

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1\text{M} = 136,09 \text{ g/mol}$  in 1l Millipore Wasser (Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland)

$\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1\text{M} = 228,23 \text{ g/mol}$  in 1l Millipore Wasser => auf pH 6 einstellen:

$\text{K}_2\text{HPO}_4 13,2 \text{ ml} + \text{KH}_2\text{PO}_4 86,8 \text{ ml} = 1 \text{ M} \Rightarrow 1:2$  verdünnen (mit Millipore) = 0,05 M = 50 mM

- Puffer A:

0,5 g Hexadecyltrimethylammoniumbromid (H- 5882, Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland), 100 ml Phosphatpuffer (50 mM ) dazugeben

- Puffer B:

60 ml Phosphatpuffer (50 mM ; pH 6,0) in Falcontube geben; 0,01 g Dianisidine (D- 3252, Sigma- Aldrich- Chemie- GmbH, München, Deutschland) abwiegen, in Eppendorf-Cup, dazu 1 ml des angesetzten Puffers aus dem Falcontube geben => mischen, in Falkontube, 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,0005%) dazugeben.

Auch für die Myeloperoxidasebestimmung verwendet man die bereits hergestellten Lungenhomogenisate. Von den aufgetauten Proben entnimmt man je 1 ml in einen Eppendorfcup, gibt 1 ml Puffer A- Lösung dazu und unterzieht das Ganze danach drei Einfrier- Auftau- Zyklen. Hierfür werden die Cups mit einer Zange vorsichtig ca. 30 Sek. lang in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin in ein 40 °C warmes Wasserbad gegeben, bis sie wieder vollständig aufgetaut sind. Danach werden die Proben 2 min lang bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Aus dem Überstand, der sich hierbei

gebildet hat, gibt man je 20 µl als Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Nach Zugeben von 280 µl Puffer- B- Lösung wird vorsichtig gemischt und für genau 20 min bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort inkubiert. Nach erfolgter Farbreaktion kann man die optische Dichte am Photometer bei 460 nm messen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **3.5.3.2. Auswertung**

Die Photometersoftware liefert für jede doppelt bestimmte Probe nach Mittelung der beiden Einzelwerte die optische Dichte. Da es sich hierbei um eine relative Verhältnisbestimmung handelt, wird eine Probe als Kalibrator gleich 1 gesetzt und die übrigen MPO- Proben in prozentualen Verhältnis dazu angegeben; so erhält man den relativen MPO- Gehalt der jeweiligen Proben.

## **3.6. Statistische Auswertung**

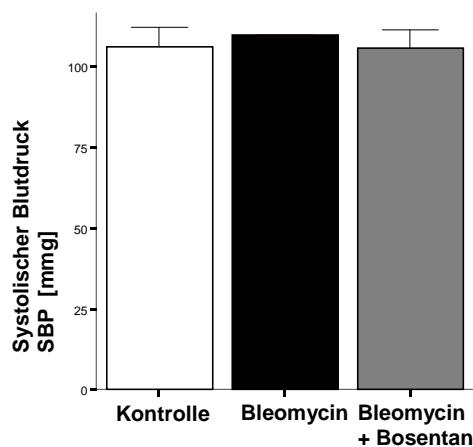
Alle statistischen Auswertungen wurden mit SPSS (Version 16.0 für Windows) durchgeführt. Die Werte wurden als Mittelwert +/- SD (Standardabweichung) dargestellt. Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- 1,0 Standardabweichungen; Balken zeigen Mittelwerte. Die in den Versuchen ermittelten Variablen wurden mittels des Mann- Whitney- U- Tests analysiert. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  gesetzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Pulmonale Hypertonie

#### 4.1.1. Systolischer Blutdruck

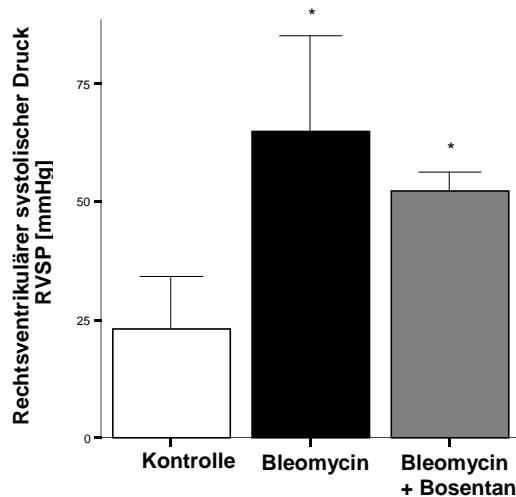
Mittels Tail-cuff-Methode wurden bei allen drei Gruppen annähernd gleich hohe Blutdruckwerte gemessen (Kontrollgruppe im Mittel 106 mmHg, Bleomycingruppe 110 mmHg, Bleomycin + Bosentan- Gruppe 106 mmHg; siehe Abb. 7). Es fanden sich keine signifikanten Blutdruckunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Eine systemische Hypertonie konnte somit bei allen Tieren ausgeschlossen werden.



**Abb. 7:** Systemischer Blutdruck von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen

#### 4.1.2. Rechtsventrikulärer systolischer Druck

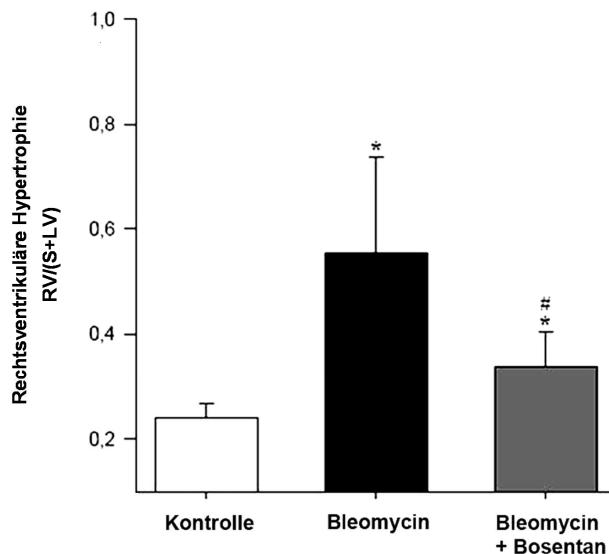
In der Bleomycingruppe fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (23mmHg) ein hoch signifikant erhöhter RVSP von 65 mmHg. In der Bleomycin + Bosentan- Gruppe ließen sich deutlich niedrigere RVSP- Werte messen (52 mmHg), welche im Vergleich zur Kontrolle jedoch immer noch signifikant erhöht waren (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** Rechtsventrikulärer systolischer Druck von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen. \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolle

#### 4.1.3. Rechtsventrikuläre Hypertrophie

Verglichen mit den Kontrollen war die rechtsventrikuläre Hypertrophie in der Bleomycingruppe signifikant erhöht, was sich in einer höheren  $RV/(S+LV)$ -Ratio zeigt. In der Bleomycin + Bosentan- Gruppe war die rechtsventrikuläre Hypertrophie im Vergleich zur unbehandelten Bleomycingruppe signifikant niedriger, im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen war sie signifikant erhöht (siehe Abb. 9).



**Abb. 9:** Rechtsventrikuläre Hypertrophie [ $RV/(S+LV)$ ] von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen. \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolle, #  $p<0,05$  im Vergleich zu Bleomycin

## 4.2. Fibrose

### 4.2.1. Lungengewicht

In der Bleomycingruppe wogen die Lungen im Mittel 1 g, also annähernd doppelt so viel wie die Lungen der Kontrolltiere (0,52 g). Dieser Unterschied ist hochsignifikant. In der Bleomycin + Bosentan- Gruppe zeigte sich ein hoch signifikant geringeres Lungengewicht, wobei beinahe die Ausgangswerte der Kontrollen erreicht wurden (0,59 g; siehe Abb. 10).

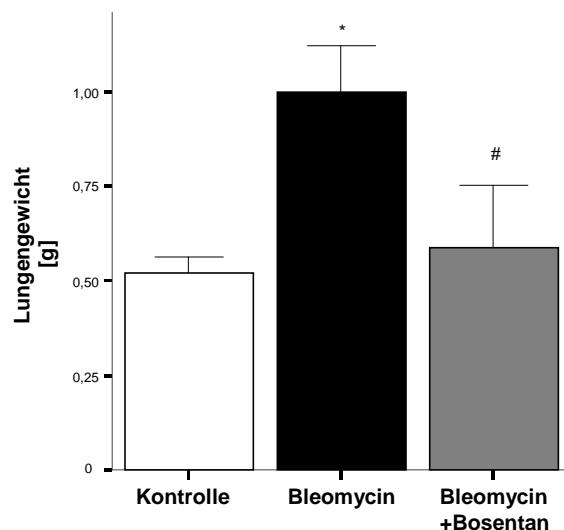


Abb. 10: Lungengewicht von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen.  
\* p<0,05 im Vergleich zu Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu Bleomycin

### 4.2.2. Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Bei der mikroskopischen Untersuchung der mit der Hämatoxylin- Eosin gefärbten Lungenpräparate konnte man in der Kontrollgruppe ein normales Lungengrundgerüst mit schmalen Alveolarsepten erkennen (siehe Abb. 11). In der Bleomycingruppe hingegen trat eine starke Bindegewebsvermehrung auf, erkennbar an der deutlichen orange- rot gefärbten Verbreiterung der Alveolarsepten (siehe Abb. 12).

Die mikroskopische Auswertung zeigte hoch signifikante Unterschiede bezüglich des Fibrosegrades zwischen den einzelnen Gruppen auf: Während sich bei den Kontrollen keinerlei Fibrose feststellen ließ, wurde bei den anderen beiden Gruppen hingegen eine deutliche Bindegewebsvermehrung gefunden. Die Bleomycintiere wurden bei der Auswertung im Mittel in die Gruppe „mittlerer

„Fibrosegrad“ eingeteilt, während sich bei den Bleomycin + Bosentan- Tieren nur noch eine leichte Fibrose erkennen ließ (siehe Abb. 13).

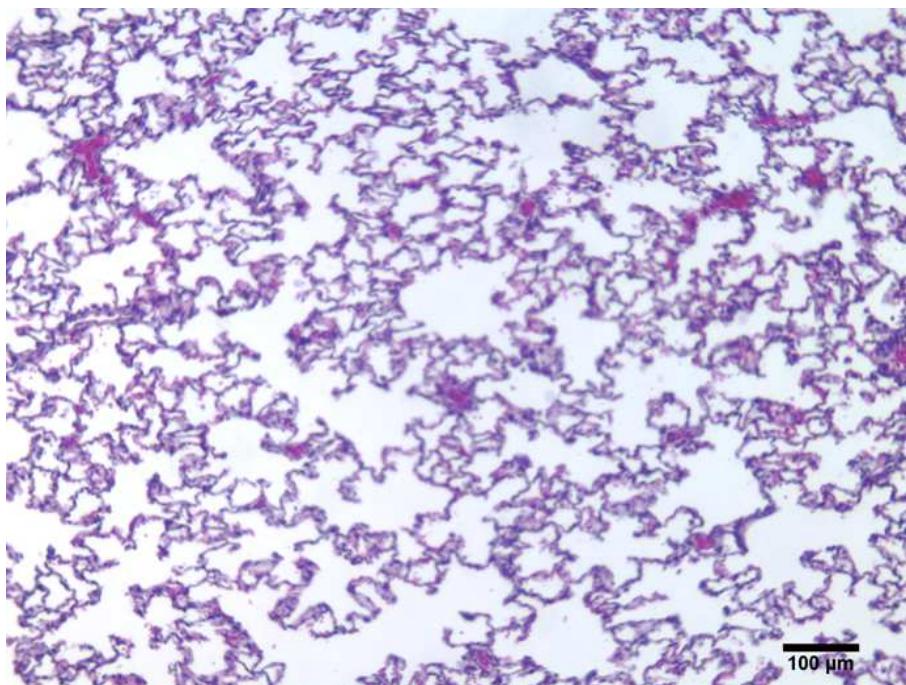


Abb. 11: Alveolarsepten Kontrollgruppe (Hämatoxylin- Eosin- Färbung)

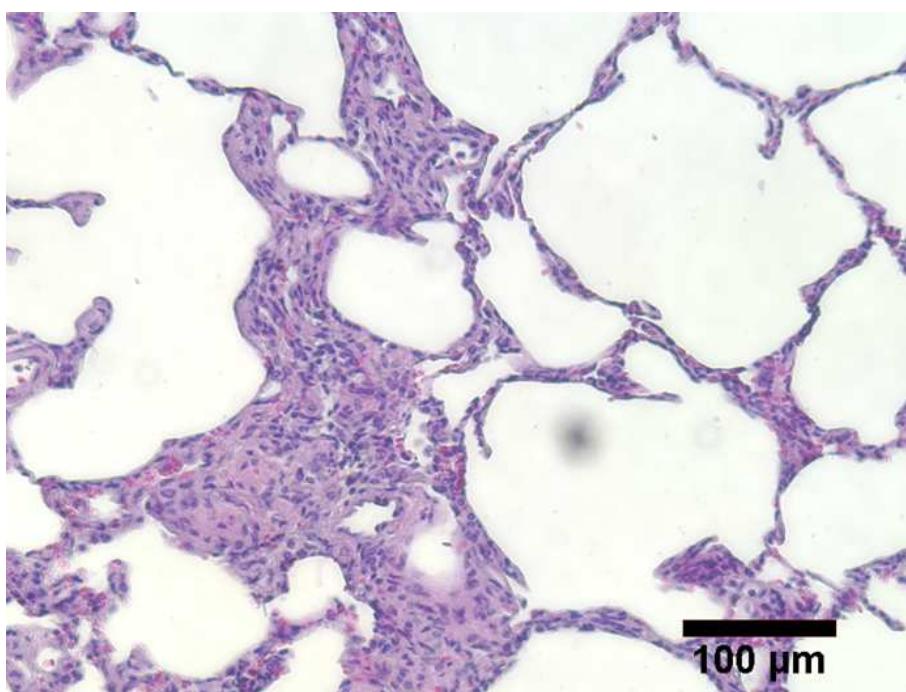
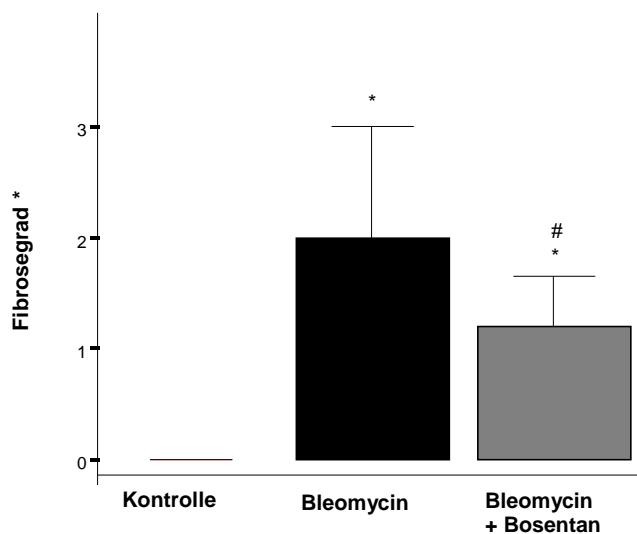


Abb. 12: Alveolarsepten Bleomycin-Gruppe (Hämatoxylin- Eosin- Färbung)



**Abb. 13:** Fibrosegrad (H&E-Färbung) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan-behandelten Tieren. \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolle, #  $p<0,05$  im Vergleich zu Bleomycin

\* Einteilung Fibrosegrad: 0 = keine Fibrose, 1 = leichte Fibrose, 2 = mittlere Fibrose, 3 = schwere Fibrose

#### 4.2.3. Sirius-Red-Färbung

Die Sirius- Red- Färbung zeigte in der Bleomycingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine noch deutlichere Bindegewebsvermehrung auf als die zuvor durchgeführte Hämalaun- Eosin- Färbung (siehe Abb. 14, 15). Unter dem Mikroskop konnte eine sehr starke Verdickung der Alveolarsepten beobachtet werden. Die Ermittlung des Fibrosegrades als Anteil des Bindegewebes am Gesamtgewebe des jeweiligen Schnittes mit Hilfe der oben näher erläuterten Formel führte zu folgenden Ergebnissen: Die Lungenpräparate der Kontrolltiere enthielten im Schnitt 28,48% Bindegewebe. Unter Bleomycingabe nahm der Bindegewebsgehalt deutlich zu auf 47,96%, wohingegen unter Bosentan eine weniger starke Vermehrung des Bindegewebsanteils (36,46%) verzeichnet werden konnte (siehe Abb. 16).

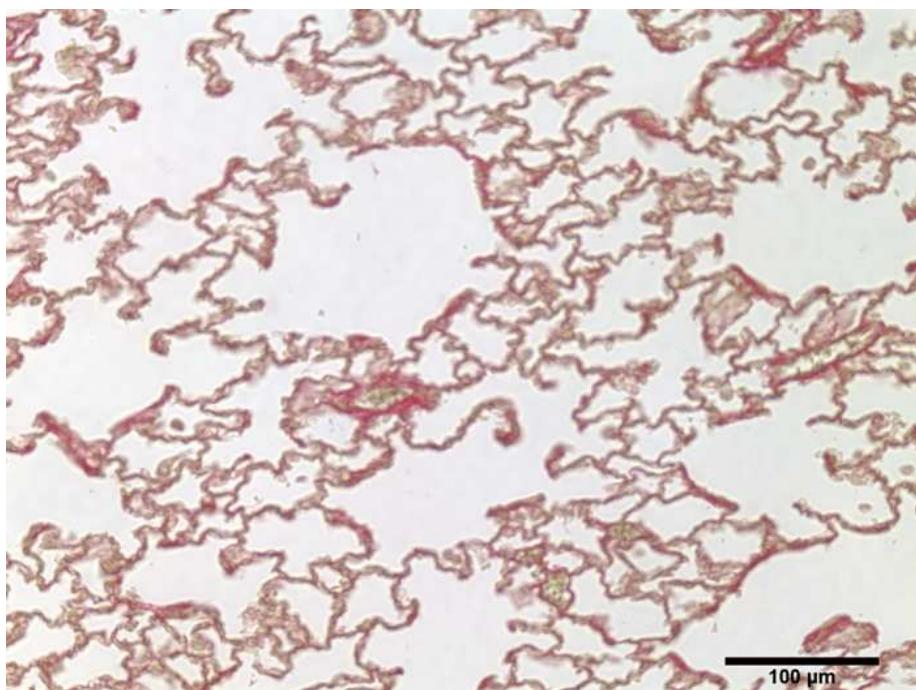


Abb. 14: Alveolarsepten Kontrollgruppe (Sirius- Red- Färbung)

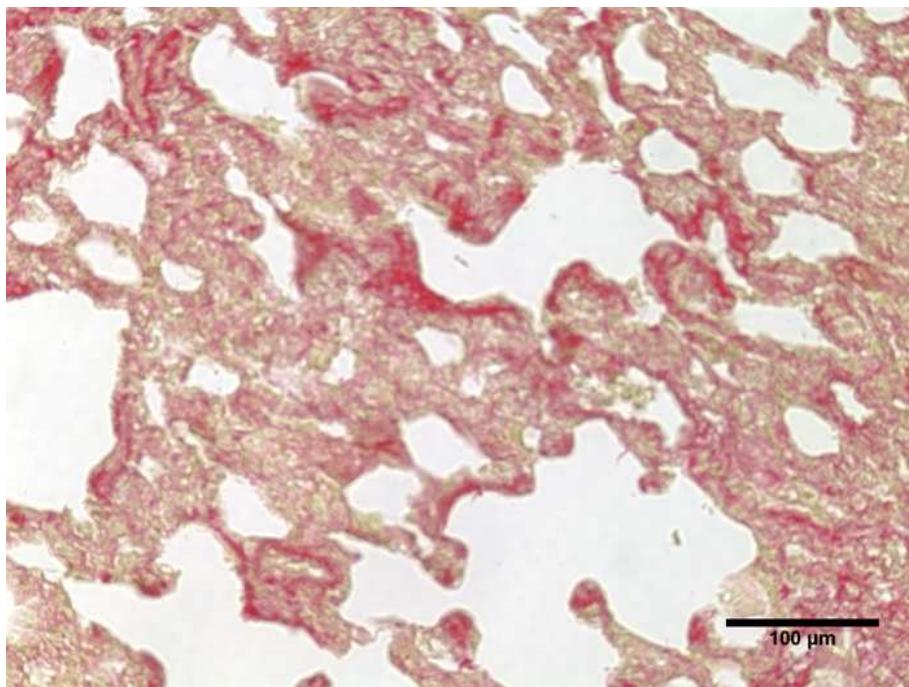


Abb.15: Alveolarsepten Bleomycingruppe (Sirius- Red- Färbung)

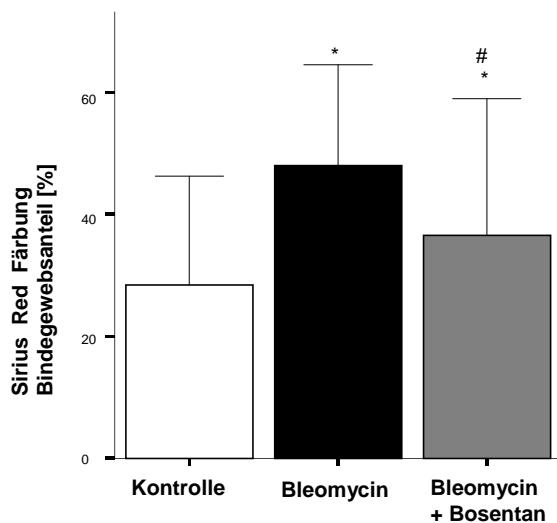


Abb. 16: Bindegewebsanteil (Sirius- Red- Färbung) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. \* p<0,05 im Vergleich zu Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu Bleomycin

#### 4.2.4. Hydroxyprolingehalt

Die Lungen der Kontrolltiere enthielten im Mittel 0,38 µg/µl Hydroxyprolin. Die Gabe von Bleomycin führte zu einem hoch signifikanten Anstieg auf das Vierfache (1,55 µg/µl). Bei gleichzeitiger Gabe von Bosentan kam es nur zu einer minimalen Zunahme des Hydroxyprolingehalts; es blieb nahezu der Ausgangswert der Kontrolltiere erhalten (0,39 µg/µl). Dieser Unterschied ist ebenfalls hoch signifikant (siehe Abb. 17).

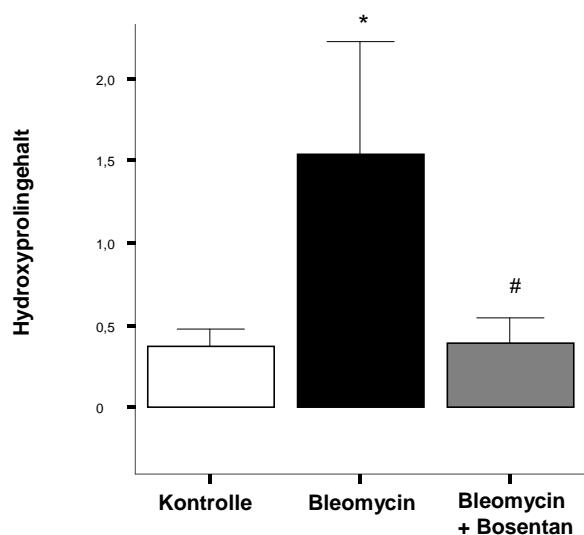
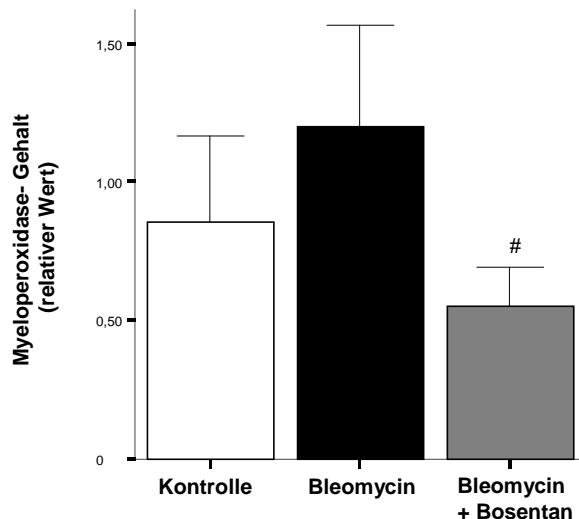


Abb. 17: Hydroxyprolingehalt von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. \* p<0,05 im Vergleich zu Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu Bleomycin

#### 4.2.5. Myeloperoxidasegehalt

Der relative Gehalt an Myeloperoxidase betrug in der Kontrollgruppe 0,86, in der Bleomycingruppe konnten deutlich erhöhte Werte gemessen werden (1,2). Durch die Gabe von Bosentan wurde ein signifikant niedrigerer Myeloperoxidasegehalt als der der Kontrolltiere erreicht (0,55; siehe Abb. 18).



**Abb. 18:** Myeloperoxidasegehalt (relativer Wert) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. # p<0,05 im Vergleich zu Bleomycin

### 4.3. Neurohumorale Regulation

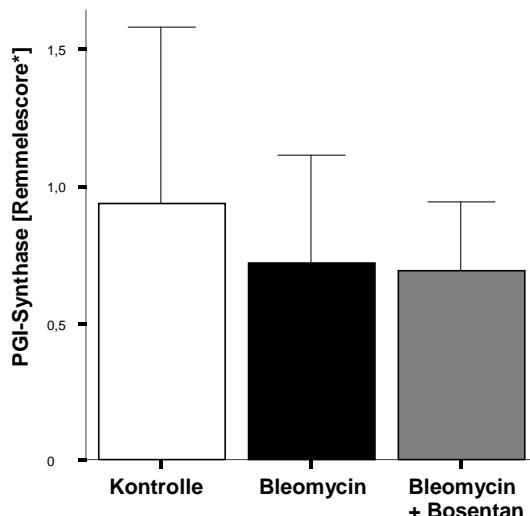
#### 4.3.1. PGI- Synthase

Der immunhistologische Nachweis von Prostazyklinsynthase in den Gefäßen über 100 µm zeigte bei den kranken Tieren einen deutlich niedrigeren Anteil an Prostazyklinsynthase am Gefäßendothel auf als bei der Kontrollgruppe (Remmelescore von 0,72 bei Bleomycin + Bosentan- Gruppe gegenüber einem Remmelescore von 0,94 bei der Kontrollgruppe). In der mit Bosentan behandelten Gruppe veränderten sich die Werte kaum gegenüber denjenigen der Bleomycin + Bosentan- Gruppe (Remmelescore = 0,69). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 19).

Bei den Gefäßen mit einer Größe von < 100 µm trat der Rückgang der Prostazyklinsynthase noch deutlicher zutage: Unter Bleomycingabe hatten die Versuchstiere nur noch einen Remmelescore von 0,44 gegenüber 0,95 bei den

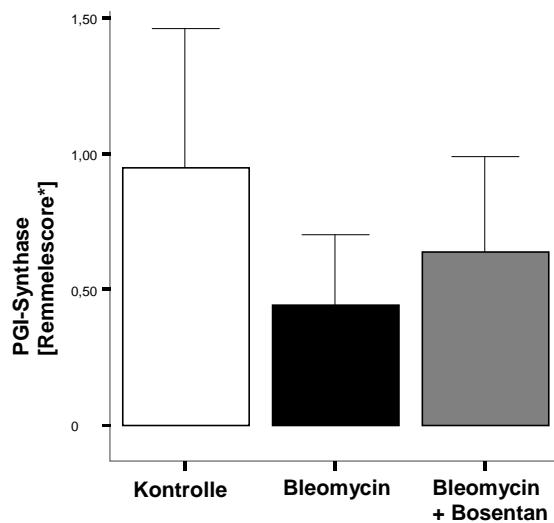
Kontrollen. Im Gegensatz zu den größeren Gefäßen führte die gleichzeitige Verabreichung von Bosentan hier zu einem weniger starken Abfall der Prostazyklinsynthase (Remmelescore von 0,64). Signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden (siehe Abb. 20).

Die Analyse der PGIS- Genexpression lieferte folgende Ergebnisse: Die Kontrolltiere wiesen im Mittel einen calculated value von 2,0 auf. In der Bleomycingruppe hat sich die Expression des PGI- Synthase- Gens beinahe verdoppelt auf 3,94. In der mit Bosentan behandelten Versuchsgruppe kam es zu keiner Zunahme der Genexpression; der calculated value nahm sogar auf einen Wert unterhalb dem der Kontrollgruppe ab (1,81). Diese Unterschiede sind signifikant (siehe Abb. 21).



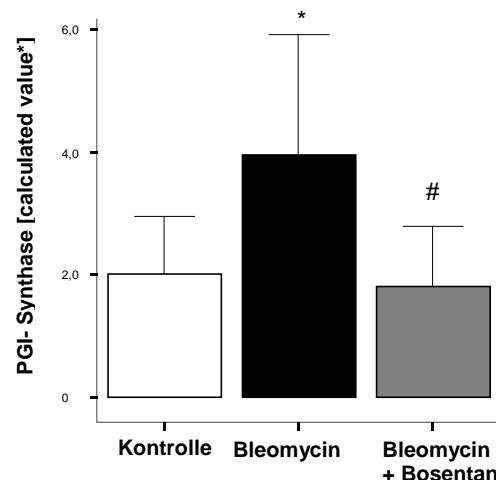
**Abb. 19:** Semiquantitative Analyse von PGI- Synthase im Endothel der Gefäße >100  $\mu$ m von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren.

\* Ermittlung Remmelescore: siehe 2.3.5



**Abb. 20:** Semiquantitative Analyse von PGI- Synthase im Endothel der Gefäße <100 µm von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren.

\* Ermittlung Remmelescore: siehe 2.3.5



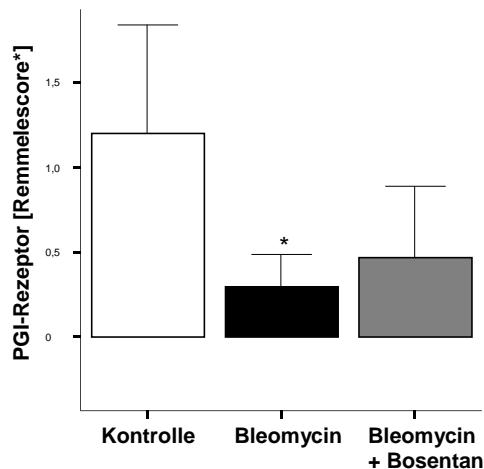
**Abb. 21:** Quantitative Real- Time- PCR der PGI- Synthase- Genexpression in der Lunge von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. \* p<0,05 im Vergleich zu Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zu Bleomycin

\* siehe 2.4.5.4

#### 4.3.2. PGI- Rezeptor

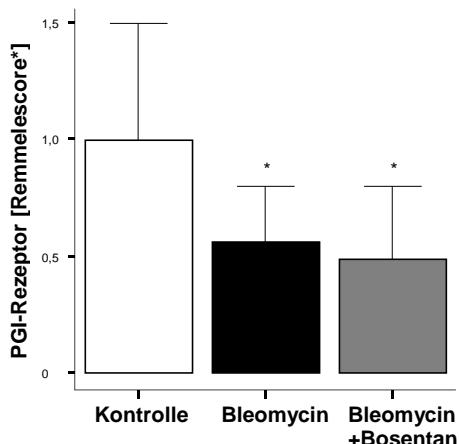
In dieser immunhistologischen Untersuchung der Gefäße über 100 µm stellten wir signifikant erniedrigte PGI- Rezeptor- Werte in der Bleomycingruppe fest (Remmelescore von 0,29 gegenüber 1,19 in der Kontrollgruppe). Die mit Bosentan behandelten Tiere ließen einen Trend zu etwas höheren Werten erkennen (Remmelescore 0,46, siehe Abb. 22).

In der kleineren Gefäßklasse reduzierte sich der Gehalt an Prostazyklinrezeptor in der Bleomycingruppe signifikant von 0,99 in der Kontrollgruppe auf 0,59. Unter Bosentan fanden sich sogar noch leicht niedrigere Rezeptorgehaltswerte (0,49) als in der Bleomycingruppe (siehe Abb. 23).



**Abb. 22:** Semiquantitative Analyse von PGI- Rezeptor im Endothel der Gefäße >100  $\mu\text{m}$  von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolle

\* Ermittlung Remmelescore: siehe 2.3.5



**Abb. 23:** Semiquantitative Analyse von PGI- Rezeptor im Endothel der Gefäße <100  $\mu\text{m}$  von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin + Bosentan- behandelten Tieren. \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Kontrolle

\* Ermittlung Remmelescore: siehe 2.3.5

## 5. Diskussion

### 5.1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des Endothelinsystems durch Bosentan den rechtsventrikulären Druck, die rechtsventrikuläre Hypertrophie und die Fibrosierung abschwächt.

Der Myeloperoxidasegehalt war unter Bosentan geringer; PGI- Synthase und PGI- Rezeptor nahmen in den immunhistologischen Untersuchungen weniger stark ab; in der PGI- Genexpressionsanalyse wurden unter Bosentan jedoch signifikant niedrigere PGI- Synthase- Werte gefunden.

### 5.2. Pulmonale Hypertonie

In zwei früheren Studien war bereits der Effekt von Bosentan auf die Lungenfibrose im Bleomycinmodell untersucht worden (Mutsaers et al. 1998, Park et al. 1997); die Auswirkungen auf die Pulmonale Hypertonie wurden dabei jedoch nicht beurteilt. Wie schon zuvor beschrieben (Sato et al. 1993, Williams et al. 1992), geht die durch intratracheale Instillation von Bleomycin ausgelöste Lungenfibrose mit der Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie und einer rechtsventrikulären Hypertrophie einher.

Die vorliegende Studie liefert Anhaltspunkte dafür, dass Bleomycin zur Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie führt und der Endothelinantagonist Bosentan diese verbessern kann. Dies zeigte sich in einem signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Druckes und einer signifikanten Zunahme der rechtsventrikulären Hypertrophie. Diese beiden Parameter gehen einher mit der Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie und werden auch im Klinikalltag zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung der Pulmonalen Hypertonie herangezogen (Olschewski et al. 2007). Der Hinweis auf eine mögliche therapeutische Wirksamkeit von Bosentan in der Pulmonalen Hypertonie wird erbracht durch die Tatsache, dass es bei den Bosentan- behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren zu einer signifikant geringeren Zunahme der rechtsventrikulären Hypertrophie und einem Trend zu niedrigerem RVSP kommt. Die systematische Fehlerquelle einer systemischen Hypertonie

konnte ausgeschlossen werden, da sich keine signifikanten Blutdruckunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellen ließen. Allerdings ist kritisch anzumerken, dass es sich hierbei um ein rein tierexperimentelles Modell handelt. Studien haben gezeigt, dass sich beim Menschen eine Pulmonale Hypertonie nicht in einem solch kurzen Zeitraum entwickelt.

### 5.3. Fibrose

Wie bereits oben erwähnt, ist der Effekt von Endothelinrezeptorantagonisten auf die Lungenfibrose im Bleomycinmodell bereits von Park et al. sowie Mutsaers et al. erforscht worden. Sie fanden heraus, dass Bosentan zu einer signifikant geringeren Lungenfibrose führt; dieses Ergebnis stützte sich jedoch hauptsächlich auf morphometrische Untersuchungen (Park et al. 1997), die Hydroxyprolinkonzentration als Maß für den Grad der Fibrose ist bisher noch nicht für derartige Untersuchungen herangezogen worden. In unserer Studie analysierten wir das Ausmaß der Lungenfibrose einerseits über das Messen des Lungengewichtes, der Hydroxyprolinkonzentration und des Myeloperoxidasegehaltes als auch über quantitative histologische Untersuchungen. Da mit zunehmender Fibrose auch das Lungengewicht zunimmt, kann es als Anhaltspunkt für den relativen Fibrosegrad genutzt werden. Allerdings sollten immer auch andere Gründe für einen Anstieg des Lungengewichts erwogen werden, wie z.B. Wassereinlagerungen bei Lungenödem, was ebenfalls ein erhöhtes Lungengewicht zur Folge hat (Schumann et al. 2010). Wir gingen jedoch davon aus, dass derartige Ursachen hier keine Rolle gespielt haben und zogen aus unseren Untersuchungen folgende Schlüsse: der signifikante Anstieg des Lungengewichts unter Bleomycingabe ist Ausdruck der starken Fibrosierung des Lungengewebes (McCullough et al. 1978). Das signifikant niedrigere Lungengewicht unter Bosentan kann als Hinweis auf den therapeutischen Einfluss von Bosentan auf die Lungenfibrose gedeutet werden.

Auch die histologischen Untersuchungen unterstreichen dieses Ergebnis: sowohl in der Hämatoxylin- Eosin- Färbung als auch in der für Bindegewebe

noch spezifischeren Sirius- Red- Färbung führte Bleomycin zu einer starken Zunahme der Fibrose, Bosentan hingegen konnte diese Entwicklung signifikant hemmen. Dies ist ein Indiz dafür, dass Bosentan nicht nur gegen Pulmonale Hypertonie, sondern auch gegen Lungenfibrose wirksam sein könnte. Auch die durchgeführten Hydroxyprolin- und Myeloperoxidaseanalysen bestätigen unsere Hypothese: Hydroxyprolin kommt ausschließlich in menschlichem und tierischem Kollagen vor (Raab et al. 1966) und gibt somit spezifisch das Ausmaß der Fibrose wieder. Sein Konzentrationsanstieg unter Bleomycingabe veranschaulicht die Zunahme des Kollagengehalts und damit der Fibrose, was bereits McCullough und Mitarbeiter feststellen konnten (McCullough et al. 1978). Analog dazu steigt auch der Gehalt an Myeloperoxidase an, ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und diversen Gewebsmakrophagen vorkommt. Es ist an der Regulation und Terminierung von Entzündungsreaktionen wesentlich beteiligt, indem es die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid katalysiert. Die hierbei gebildeten Hypochloridionen oxidieren verschiedene Biomoleküle und tragen somit zur Erkennung und Aufnahme apoptotischen Materials durch Phagozyten bei. Dieser Anstieg der Myeloperoxidasekonzentration kann somit als Zeichen einer starken Entzündungsreaktion im Gewebe gesehen werden (Pattie et al. 2004). McCullough et al. konnten zeigen, dass es im Rahmen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu einer Infiltration der Alveolarsepten mit mononukleären Entzündungszellen kommt; ebenso konnte histologisch ein leichter Anstieg des Kollagengehalts nachgewiesen werden (McCullough et al. 1978).

Die unter Bosentan signifikant geringeren Hydroxyprolin- bzw. Myeloperoxidasekonzentrationen, welche im Falle der Myeloperoxidase sogar niedrigere Werte als die der Kontrollgruppe erreichten, sind ein Hinweis darauf, dass Bosentan nicht nur der Kollagenproduktion entgegenwirkt, sondern dass seine antifibrotische Wirkung offensichtlich schon früher ansetzt im Sinne einer Hemmung des Entzündungsvorgangs. Es gibt Beweise, dass Endotheline als profibrotische Zytokine fungieren können, indem sie Chemotaxis und Proliferation von Fibroblasten und die Produktion von Prokollagen stimulieren

(Dawes et al. 1996, Kahaleh et al. 1991). Dies erklärt die Hemmung der Kollagenproduktion bei Applikation des Endothelinantagonisten Bosentan.

Alle oben dargelegten Untersuchungen zeigten eine signifikante Inhibition der Lungenfibrose unter Bosentangabe auf, was eine Erweiterung der Indikationen der Bosentantherapie über die Pulmonale Hypertonie hinaus auch auf die primäre Lungenfibrose offenbart. Dies ließe auf eine Wirksamkeit des Medikaments auch beim Menschen schließen, da die durch Bleomycin verursachten Lungenschäden denen bei idiopathischer Lungenfibrose ähneln (McCullough et al. 1978). Ob die in dieser Studie erzielten Ergebnisse sich jedoch tatsächlich auch auf die Therapie der Lungenfibrose beim Menschen übertragen lassen, muss sich erst noch in klinischen Studien zeigen. Das Bleomycinmodell ist das am häufigsten verwendete Modell, um die Pathogenese der Lungenfibrose zu studieren; sein Einsatz wird allerdings unter Fachleuten immer wieder kritisiert, da sich mehrere Therapieansätze nur wirksam im tierexperimentellen Modell, nicht jedoch in der Klinik erwiesen. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die Differenz in der Pathogenese dar: Bleomycin verursacht die Fibrose durch Förderung einer Entzündungsreaktion (McCullough et al. 1978); die Lungenfibrose des Menschen scheint hingegen zumindest nicht allein durch eine Entzündung zu entstehen, da Therapieversuche mit Cortison häufig scheitern im Gegensatz zur Bleomycin-induzierten Fibrose, die auf Cortisongabe hervorragend anspricht (Chaudhary et al. 2006). Es existieren diverse Fibrosearten, deren Entstehung in keiner Weise an inflammatorische Vorgänge geknüpft ist. Außerdem muss kritisiert werden, dass der durch Myeloperoxidase katalysierte Schritt nur einen kleinen Anteil am komplexen Entzündungsgeschehen darstellt. Die Tatsache, dass Bosentan zu einem niedrigeren Myeloperoxidasegehalt führt, kann alleine noch nicht als Beweis für eine antiinflammatorische Wirkung von Bosentan angeführt werden, da an der Entzündungskaskade eine Vielzahl an weiteren Faktoren, wie z.B. Interleukin-1beta, Interleukin-6 und ähnliche proinflammatorische Zytokine, beteiligt sind, deren Veränderung in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden (Kakizaki et al. 2009). Allerdings konnten Gamze und Mitarbeiter zeigen, dass Bosentan die Entzündungsantwort des Körpers

abschwächt, indem es die Anzahl der Entzündungszellen und der proinflammatorischen Zytokine deutlich reduziert (Gamze et al. 2007). Die Studie von Anthoni und Mitarbeiter brachte ans Licht, dass Bosentan im Tierversuch sogar entzündungshemmend bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wirkt, indem es die Leukozytenadhäsion in submucösen Venolen des Colons hemmt (Anthoni et al. 2006). Diese Ergebnisse hingegen sprechen wiederum für die oben angeführte Theorie, dass Bosentan auch bei der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose einen antiinflammatorischen Effekt hat.

#### **5.4. Neurohumorale Regulation**

In der vorliegenden Studie erbrachten wir den Beweis für die Reduktion der Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie durch die Verabreichung des Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan bei Bleomycin- behandelten Ratten über eine signifikant niedrigere rechtsventrikuläre Hypertrophie und einen Trend zu niedrigerem RVSP. Dies indiziert, dass Endotheline eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Pulmonalen Hypertonie bei Lungenfibrose spielen, wofür auch die deutlich erhöhten ET-1- Plasmaspiegel sprechen, die bei Lungenfibrosepatienten mit Pulmonaler Hypertonie gefunden wurden (Trakada et al. 2003). Überdies fanden Giaid et al. 1993, Li et al. 1994 und Uguccioni et al. 1995 heraus, dass auch die pulmonale ET-1- Genexpression bei Patienten und Versuchstieren mit Pulmonaler Hypertonie und Lungenfibrose erhöht sind. In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Auswirkung des Endothelinantagonisten Bosentan auf die neurohumorale Regulation von Prostazyklin bei Lungenfibrose erforscht. Die immunhistologische Untersuchung der PGI- Synthase ergab deutlich niedrigere PGI- Synthasewerte im Endothel der an Lungenfibrose erkrankten Tiere. Dies erklärt sich durch die pathogenen Prozesse im Rahmen der Entwicklung der Pulmonalen Hypertonie, welche sich auf der Ebene der neurohumorale Regulation widerspiegeln: Wie bereits Christman und Mitarbeiter (Christman et al. 1992) herausfanden, besteht bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie ein Ungleichgewicht zwischen der Freisetzung von Thromboxan A2 und Prostazyklin. Sowohl bei der primären als

auch der sekundären Form der Pulmonalen Hypertonie kommt es zu einem Anstieg der Thromboxansekretion, während die Freisetzung von Prostazyklin unterdrückt wird. Ob dieses gestörte Gleichgewicht bezüglich der Mediatorfreisetzung nun Ursache oder Folge der Pulmonalen Hypertonie darstellt, ist unbekannt, aber es spielt wohl eine Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung beider Erkrankungsformen (Christman et al. 1992). Unsere Ergebnisse stimmen auch überein mit der Studie von Tuder und Mitarbeitern (Tuder et al. 1999), die Prostazyklin ebenfalls auf der Ebene seiner Produktion untersuchten. Sie deuteten den deutlichen Abfall der PGI- Synthase- Freisetzung als eine wichtige Manifestation der pulmonalen Endotheldysfunktion bei schwerer Pulmonaler Hypertonie.

Die Unterdrückung der PGI- Synthase- Produktion trat bei uns besonders deutlich am Endothel der kleinen Gefäße ( $< 100 \mu\text{m}$ ) zutage. Dieses Phänomen wurde auch von Tuder und Mitarbeitern beschrieben, die daraus den Schluss zogen, dass die verschiedenen Größenklassen der Pulmonalarterien das Enzym unterschiedlich stark exprimieren und dass der Verlust der PGI- Synthase- Expression eine der phänotypischen Alterationen in den Endothelzellen der Lunge bei schwerer Pulmonaler Hypertonie darstellt (Tuder et al. 1999).

Analog zur PGI- Synthase ließ sich bei der immunhistologischen Färbung des PGI- Rezeptors am Endothel der Tiere mit Bleomycin- induzierter Lungenfibrose eine signifikant niedrigere PGI- Rezeptordichte im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen. Auffällig war, dass sich an den kleinen Gefäßen jedoch ein Trend zu höheren Werten im Vergleich zu den Gefäßen  $> 100\mu\text{m}$  zeigte. Man könnte darüber spekulieren, dass entsprechend dem Mechanismus der Downregulation der Rezeptoren bei einem Ligandenüberangebot es hier infolge der Verringerung des Liganden Prostazyklin kompensatorisch zu einer Hochregulation der Rezeptorzahl kommt. Wie Schroll und Mitarbeiter (Schroll et al. 2008) kürzlich herausfanden, spielt sich die PGI- Synthase- Expression primär in den sehr kleinen Gefäßen ab. Dies legt den Schluss nahe, dass auch von einer möglichen Hochregulation des PGI- Rezeptors in erster Linie Gefäße unter  $100 \mu\text{m}$  betroffen sind. Es ist zu vermuten, dass zu einem späteren

Zeitpunkt auch in der größeren Gefäßklasse eine höhere Rezeptorzahl gemessen werden hätte können.

Die Verabreichung von Bosentan ließ einen Trend zu ansteigenden PGI-Synthasewerten erkennen, auch hier wieder besonders in der kleineren Gefäßklasse. Bei der Analyse des PGI- Rezeptors verhielt sich die Rezeptorzahl in der mit Bosentan therapierten Gruppe genau gegenläufig zu der der untherapierten Bleomycingruppe. Diese Ergebnisse stellen wiederum einen Hinweis auf die Wirksamkeit des Medikaments dar: Bosentan als Endothelinantagonist verschiebt die endotheliale Mediatorfreisetzung zugunsten von Prostazyklin (Olschewski et al. 2007); man könnte schlussfolgern, dass mit steigenden Prostazyklinwerten die kompensatorische Rezeptorhochregulation ihren Nutzen verliert und wieder sinkt, falls die oben dargestellte Hypothese stimmt.

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse scheint auf den ersten Blick konträr zu den immunhistologischen Resultaten zu sein, denn hier konnte ein signifikanter Anstieg der PGI- Synthase- Expression bei Bleomycin- induzierter Lungenfibrose verzeichnet werden, während sich in der Immunhistologie ein Abfall der PGI- Synthase fand. Dieser scheinbare Gegensatz begründet sich jedoch in der Methodik der Versuchsdurchführung. Wie oben beschrieben, erforderte die RNA- Isolierung für die Real- Time- PCR eine Homogenisierung des gesamten Lungenpräparates. Somit gingen in die Analyse der PGI- Synthase- Genexpression nicht nur das Gefäßendothel, sondern das gesamte Lungengewebe ein, während in der Immunhistologie spezifisch nur die Endothelien untersucht wurden. Wie bereits oben dargestellt, konnten wir veranschaulichen, dass Bleomycin eine Entzündungsreaktion bewirkt. Da Prostazyklin (PGI) zusammen mit PGE den wichtigsten am inflammatorischen Geschehen beteiligten Mediator repräsentiert (Simmons et al. 2004), liegt die Vermutung nahe, dass das gemessene Prostazyklin nicht aus den Endothelzellen, sondern aus der Vielzahl verschiedener inflammatorischer Zellen stammt, welche im Zuge des durch Bleomycin hervorgerufenen Entzündungsgeschehens in das Lungengewebe eingewandert sind (McCullough et al. 1978). Der Anstieg der PGI- Synthase- Genexpression unter

Bleomycin steht hier demnach nicht in Verbindung mit Veränderungen der neurohumoralen Regulation der pulmonalen Gefäße, sondern mit dem zunehmenden Entzündungsgeschehen unter Bleomycin. Dafür spricht auch, dass diese Ergebnisse hervorragend mit dem Gehalt an Myeloperoxidase korrelieren. Bekanntermaßen ist das Enzym Myeloperoxidase vorwiegend in Granulozyten enthalten, welche bei inflammatorischen Prozessen in großer Zahl in das betroffene Gewebe einwandern (McCullough et al. 1978).

Die Tatsache, dass die Applikation von Bosentan zu einem signifikanten Abfall der PGI- Synthase- Genexpression führt, verkörpert ein weiteres Indiz für die mögliche antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung des Endothelinantagonisten (Gamze et al. 2007). Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen einen deutlichen Abfall der Prostazyklinproduktion im Endothel bei Bleomycin- induzierter Lungenfibrose erkennen, während die Verabreichung von Bosentan über eine Steigerung der Prostazyklinsynthese dem Prozeß der Entwicklung von Pulmonaler Hypertonie und Lungenfibrose entgegenwirkt.

Unsere Studienergebnisse deuten darauf hin, dass die Verbesserung der Pulmonalen Hypertonie unter Bosentanapplikation eher auf eine Reduktion der Lungenfibrose zurückzuführen ist als auf Veränderungen in der neurohumoralen Regulation. Bei dieser Schlussfolgerung sollte allerdings berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich ein einziger Mediator der neurohumoralen Regulation analysiert wurde. Neben dem untersuchten Prostazyklin existieren eine Vielzahl weiterer neurohumoraler Faktoren wie z.B. Stickstoffmonoxid oder die verschiedenen Endotheline, deren Analyse für unsere Fragestellung ebenfalls von besonderem Interesse ist. Derzeit werden einige Studien zur Untersuchung weiterer neurohumoraler Faktoren durchgeführt, deren Ergebnisse mit Spannung erwartet werden.

Ziel der Arbeit ist es, Verständnis für die pathophysiologischen Vorgänge der oben genannten Prozesse zu erlangen; da jedoch Bosentan nahezu zeitgleich mit Bleomycin verabreicht wurde, kann man nicht von einem therapeutischen Ansatz sprechen. Wie Moeller und Mitarbeiter herausfanden, hemmt Bosentan in dem Modell der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose bereits von Anfang an

das Entstehen einer Entzündung und damit einhergehender fibogener Prozesse. Dies entspricht jedoch nicht der Realität in der Klinik, in der man einem bereits an Lungenfibrose erkrankten Patienten ein Medikament verabreicht. Es wird daher gefordert, das Bleomycinmodell zu verlassen und nach anderen Medikamenten zu suchen bzw. mit anderen Modellen eine Substanz zu finden, die bei einer bereits bestehenden Fibrose wirkt, anstatt lediglich die frühe Periode der Bleomycin- induzierten Fibrose aufzuhalten (Moeller et al. 2008). Dies ist einer der Gründe, warum der Einsatz des Bleomycinmodells zur Erforschung der Lungenfibrose unter Fachleuten immer wieder kritisiert wird, da sich mehrere Therapieansätze nur wirksam im tierexperimentellen Modell, nicht jedoch in der Klinik erwiesen (Chaudhary et al. 2006, Moeller et al 2008). Somit lässt die vorliegende Studie keinerlei Rückschlüsse, sondern allenfalls Hinweise auf die klinische Anwendung von Bosentan in der Therapie der Pulmonalen Hypertonie zu.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnten wir anhand der Abnahme von rechtsventrikulärem systolischen Druck und rechtsventrikulärer Hypertrophie demonstrieren, dass der Endothelinantagonist Bosentan im Modell der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose der Ratte zu einer deutlichen Verbesserung der Pulmonalen Hypertonie führt. Überdies fanden wir heraus, dass es unter Bosentan zu signifikant niedrigeren Hydroxyprolin- und Myeloperoxidasekonzentrationen kommt und dass somit die Inhibition der Lungenfibrose durch das Medikament möglicherweise auch auf antiinflammatorischen Effekten beruht. Bezuglich der neurohumoralen Regulation der Gefäße entdeckten wir unter Bleomycingabe eine deutliche Abnahme der Prostazyklinproduktion, insbesondere in den kleinen Gefäßen, während unter Bosentan eine Steigerung der Prostazyklinproduktion zu verzeichnen war.

Unsere Studienergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Verbesserung der Pulmonalen Hypertonie unter Applikation des Endothelinantagonisten Bosentan eher auf die Fibrosereduktion als auf Veränderungen in der neurohumoralen Regulation zurückzuführen ist. Die signifikante Hemmung der Lungenfibrose unter Bosentangabe ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Medikament nicht nur bei Pulmonaler Hypertonie, sondern auch bei Lungenfibrose an sich wirksam ist.

Ob sich die hier am Modell der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose gefundenen Ergebnisse tatsächlich auch auf den Menschen übertragen lassen, wird sich in klinischen Studien zeigen. Sollte auch beim Menschen eine Inhibition der Lungenfibrose nachweisbar sein, ist eine Erweiterung des Indikationsspektrums von Bosentan über die primäre Pulmonale Hypertonie hinaus auch auf sekundäre Formen der Erkrankung denkbar, was einen immensen Fortschritt für die Therapieoptionen der Pulmonalen Hypertonie bedeuten würde.

## 7. Literaturverzeichnis

Adamson IY

Drug-induced pulmonary fibrosis

Environ Health Perspect. 1984 Apr;55:25-36

American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS)  
Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus  
statement

Am J Respir Crit Care Med. 2000 Feb;161(2 Pt 1):646-64

Anthoni C, Mennigen RB, Rijcken EJ, Laukötter MG, Spiegel HU, Senninger N,  
Schürmann G, Krieglstein CF

Bosentan, an endothelin receptor antagonist, reduces leucocyte adhesion and  
inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease

Int J Colorectal Dis. 2006 Jul;21(5):409-18. Epub 2005 Aug 9

Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzún M, Lisboa C

Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic  
pulmonary fibrosis

Am J Respir Crit Care Med. 2001 Jun;163(7):1648-53.

Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE

Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin  
model

Am J Respir Crit Care Med. 2006 Apr 1;173(7):769-76

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves  
BM, Loyd JE.

An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin  
metabolites in pulmonary hypertension

N Engl J Med. 1992 Jul 9;327(2):70-5

Classen M, Diehl V, Kochsiek K

Innere Medizin

Urban&Fischer Verlag 2004, 5. Auflage, ISBN: 3-437-42830-6

Dawes KE, Cambrey AD, Campa JS, Bishop JE, McAnulty RJ, Peacock AJ,

Laurent GJ

Changes in collagen metabolism in response to endothelin-1: evidence for fibroblast heterogeneity

Int J Biochem Cell Biol. 1996 Feb;28(2):229-38

Erdmann E

Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße

Springerverlag 2008, Edition 7, ISBN 3540790101, 9783540790105

Galié N, Manes A, Branzi A

The endothelin system in pulmonary arterial hypertension

Cardiovasc Res. 2004 Feb 1;61(2):227-37

Galié N, Rubin LJ, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, Chirossi E,

Kusic-Pajic A, Simonneau G

Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial

Lancet. 2008 Jun 21;371(9630):2093-100

Galié N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ

Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension

J Am Coll Cardiol. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):81S-88S

Gamze K, Mehmet HM, Deveci F, Turgut T, Ilhan F, Ozercan I  
Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model  
of emphysema  
Exp Mol Med. 2007 Oct 31;39(5):614-20

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H,  
Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F  
Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a  
randomised controlled trial  
Lancet. 2002 Sep 21;360(9337):895-900

Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q  
Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing  
alveolitis  
Lancet. 1993 Jun 19;341(8860):1550-4

Giri SN  
Pharmacologic perspective in pulmonary fibrosis research  
Focus on pulmonary pharmacology and toxicology, ed. Hollinger, M.A.pp.19-  
55.Boca Raton, FL:CRC Press

Haoula D, Hief Ch, Wessely E, Geppert A, Huber K  
Pulmonale Hypertonie 2006 - eine kurze Übersicht  
Journal für Kardiologie (2006); 13 (7-8): 253-256

Hay J, Shahzeidi S, Laurent G  
Mechanisms of Bleomycin- induced lung damage  
Arch. Toxicol. 1991, 65: 81-94

Herget J  
Animal models of pulmonary hypertension  
Eur Respir Rev. 16:559-563, 1993

Holzmann S, Kukovetz WR, Schmidt K  
Mode of action of coronary arterial relaxation by prostacyclin  
J Cyclic Nucleotide Res. 1980;6(6):451-60

Hrometz SL, Shields KM  
Role of ambrisentan in the management of pulmonary hypertension  
Ann Pharmacother. 2008 Nov;42(11):1653-9. Epub 2008 Oct 28

Ichida F, Uese K, Hamamichi Y, Hashimoto I, Tsubata S, Fukahara K, Murakami A, Miyawaki T  
Chronic effects of oral prostacyclin analogue on thromboxane A2 and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension  
Acta Paediatr Jpn. 1998 Feb; 40(1):14-9

Iyer SN, Wild JS, Schiedt MJ, Hyde DM, Margolin SB, Giri SN  
Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters  
J Lab Clin Med. 1995 Jun;125(6):779-85

Jones, H, Schonfield, J, Krausz, T, Boobis, A, Haslett, C  
Pulmonary fibrosis correlates with duration of tissue neutrophil activation  
Am.J.Repir.Crit.Care.Med. 1998 158(2):620-628

Kahaleh MB  
Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action  
Arthritis Rheum. 1991 Aug;34(8):978-83

Kakizaki T, Kohno M, Watanabe M, Tajima A, Izumi Y, Miyasho T, Tasaka S, Fukunaga K, Maruyama I, Ishizaka A, Kobayashi K  
Exacerbation of bleomycin-induced injury and fibrosis by pneumonectomy in the residual lung of mice  
J Surg Res. 2009 Jun 15;154(2):336-44. Epub 2008 Jul 15

King Talmadge E Jr., Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM  
Predicting Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164: 1171-1181

Krämer BK, Nishida M, Kelly RA, Smith TW.  
Endothelins. Myocardial actions of a new class of cytokines  
Circulation. 1992 Jan;85(1):350-6

Lazo JS, Sebti SM  
Bleomycin  
Cancer Chemother Biol Response Modif. 1994;15:44-50

Levin ER  
Endothelins  
N Engl J Med. 1995 Aug 10;333(6):356-63.

Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS  
Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia  
J Appl Physiol. 1994 Sep;77(3):1451-9

Lübke N  
Prävention der Bleomycin induzierten Lungenfibrose durch inhalative Applikation von Heparin oder Urokinase  
Justus- Liebig- Universität Giessen, Dissertation 2004

Matuse Y, Fukuchi Y, Eto Y, Matsui H, Hosoi T, Oka T, Ohaga E, Nagase T, Orimo H

Expression of immunoreactive and bioactive activin A protein in adult murine lung after Bleomycin treatment

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995 Vol. 13: 17-24

McCullough B, Collins JF, Johanson WG Jr, Grover FL.

Bleomycin-induced diffuse interstitial pulmonary fibrosis in baboons

J Clin Invest. 1978 Jan;61(1):79-88

Michael JR, Markewitz BA

Endothelins and the lung

Am J Respir Crit Care Med. 1996 Sep;154(3 Pt 1):555-81

Michel RP, Langleben D, Dupuis J

The endothelin system in pulmonary hypertension

Can J Physiol Pharmacol. 2003 Jun;81(6):542-54

Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M

The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis

Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(3):362-82

Mullis K, Falloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73

Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ

Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats

Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 May;18(5):611-9

Olschewski H, Ghofrani HA, Walmrath D, Schermuly R, Temmesfeld-Wollbruck B, Grimminger F, Seeger W

Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis

Am J Respir Crit Care Med. 1999 Aug;160(2):600-7

Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber F.-X, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H

Diagnostik und Therapie der chronischen Pulmonalen Hypertonie (Leitlinie)

Clin Res Cardiol, (2007); 96: 301–330

Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoeper MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W

Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension

N Engl J Med. 2002 Aug 1;347(5):322-9

Park SH, Saleh D, Giaid A

Increased Endothelin-1 in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis and the Effect of an Endothelin Receptor Antagonist

Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:600–608

Pattie S. Green, Armando J. Mendez, Jason S. Jacob, Jan R. Crowley, Whit Growdon, Bradley T. Hyman and Jay W. Heinecke

Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease

Journal of Neurochemistry 2004; 90(3): 724 - 733

Pereira B, Wu KK, Wang LH

Bovine prostacyclin synthase: purification and isolation of partial cDNA

Biochem Biophys Res Commun. 1993 Dec 30;197(3):1041-8

Piguet PF, Vesin C

Pulmonary platelet trapping induced by bleomycin: correlation with fibrosis and involvement of the beta 2 integrins

Int J Exp Pathol. 1994 Oct;75(5):321-8

Raab, W

Hydroxyprolin-Ausscheidung im Rattenharn nach Injektion von Schlangengift

Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 1966 Okt; 22(10):695

Saleh D, Furukawa K, Tsao MS, Maghazachi A, Corrin B, Yanagisawa M, Barnes PJ, Giard A

Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines

Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 Feb;16(2):187-93

Sato S, Kato S, Arisaka Y, Takahashi H, Takahashi K, Tomoike H

Changes in pulmonary hemodynamics during normoxia and hypoxia in awake rats treated with intratracheal bleomycin

Tohoku J Exp Med. 1993 Mar;169(3):233-44

Schumann S, Kirschbaum A, Schliessmann SJ, Wagner G, Goebel U, Priebe HJ, Guttmann J

Low pulmonary artery flush perfusion pressure combined with high positive end-expiratory pressure reduces oedema formation in isolated porcine lungs

Physiol Meas. 2010 Feb;31(2):261-72. Epub 2010 Jan 20.

Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R

Updated clinical classification of pulmonary hypertension

J Am Coll Cardiol. 2009 Jun 30;54(1):43-54

Schroll S, Arzt M, Sebah D, Stoelcker B, Luchner A, Budweiser S, Blumberg FC, Pfeifer M

Effects of selective and unselective endothelin-receptor antagonists on prostacyclin synthase gene expression in experimental pulmonary hypertension  
Scand J Clin Lab Invest. 2008;68(4):270-6

Simmons D, Botting R

Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition

Pharmacol Rev 56:387-437, 2004

Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger

W, Grimminger F, Weissmann N

Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms

Eur Respir J. 2008 Dec;32(6):1639-51

Souazé F, Ntodou-Thomé A, Tran CY, Rostène W, Forgez P

Quantitative RT-PCR: limits and accuracy

Biotechniques. 1996 Aug;21(2):280-5

Stähler G

Specific drugs for the treatment of pulmonary arterial hypertension - current status

Dtsch Med Wochenschr. 2008 Oct;133 Suppl 6:S183-6

Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW

Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up

Nucleic Acids Res. 2003 Oct 15;31(20):e122. Erratum in: Nucleic Acids Res. 2003; Nov 15;31(22):6688

Timothy DB, Darrel A, Leslie CG, Henson PM, Cherniack RM

Bleomycin-induced lung injury in the rabbit

Am. Rev. Respir. Dis. 1985 132: 590-595

Trakada G, Nikolaou E, Pouli A, Tsiamita M, Spiropoulos K

Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep

Sleep Breath. 2003 Sep;7(3):111-8

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF

Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension

Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jun;159(6):1925-32

Uguzzoni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C, Fabbri M, Gasbarrini G, Meliconi R

Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis

J Clin Pathol. 1995 Apr;48(4):330-4

Walter N, Collard HR, King TE Jr

Current perspectives on the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis

Proc Am Thorac Soc. 2006 Jun;3(4):330-8

Weitzenblum E, Hirth C, Ducolone A, Mirhom R, Rasaholmjanahary J,

Ehrhart M

Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease

Thorax. 1981 Oct;36(10):752-8

Wensel R, Opitz CF, Ewert R, Bruch L, Kleber FX

Effects of iloprost inhalation on exercise capacity and ventilatory efficiency in patients with primary pulmonary hypertension

Circulation. 2000 May 23;101(20):2388-92

Wild, J. S., Dallas M. Hyde and S. N. Giri

Dose and Regimen Effects of Poly ICLC, an Interferon Inducer, in a Multidose Bleomycin Model of Interstitial Pulmonary Fibrosis. Pharmacology and Toxicology 75: 42-48, 1994

Williams JH Jr, Bodell P, Hosseini S, Tran H, Baldwin KM

Haemodynamic sequelae of pulmonary fibrosis following intratracheal bleomycin in rats. Cardiovasc Res. 1992 Apr;26(4):401-8

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: WHO- Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Weltkongress Dana Point 2008)
- Abb. 2: Funktioneller Schweregrad der Pulmonalen Hypertonie
- Abb. 3: Beispiel Beurteilung Remmele- Score: Gefäß mit Färbeintensität 3, Anteil der angefärbten Zellen 100%
- Abb. 4: Elektropherogramm und Gel-like-picture einer Probe von guter Qualität
- Abb. 5: Elektropherogramm und Gel-like-picture einer Probe von schlechter Qualität
- Abb. 6: Primersequenzen für Quantitative Real- Time- PCR
- Abb. 7: Systemischer Blutdruck von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen
- Abb. 8: Rechtsventrikulärer systolischer Druck von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen
- Abb. 9: Rechtsventrikuläre Hypertrophie [RV/(S+LV)] von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen
- Abb. 10: Lungengewicht von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren nach vier Wochen
- Abb. 11: Alveolarsepten Kontrollgruppe (Hämatoxylin- Eosin- Färbung)
- Abb. 12: Alveolarsepten Bleomycin-Gruppe (Hämatoxylin- Eosin- Färbung)
- Abb. 13: Fibrosegrad (Hämatoxylin- Eosin- Färbung) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 14: Alveolarsepten Kontrollgruppe (Sirius- Red- Färbung)
- Abb. 15: Alveolarsepten Bleomycingruppe (Sirius- Red- Färbung)
- Abb. 16: Bindegewebsanteil (Sirius- Red- Färbung) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 17: Hydroxyprolingehalt von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 18: Myeloperoxidasegehalt (relativer Wert) von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 19: Semiquantitative Analyse von PGI- Synthase im Endothel der Gefäße >100 µm von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 20: Semiquantitative Analyse von PGI- Synthase im Endothel der Gefäße <100 µm von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 21: Quantitative Real- Time- PCR der PGI- Synthase- Genexpression in der Lunge von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren
- Abb. 22: Semiquantitative Analyse von PGI- Rezeptor im Endothel der Gefäße >100 µm von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren

Abb. 23: Semiquantitative Analyse von PGI- Rezeptor im Endothel der Gefäße <100 µm von Kontrollen, Bleomycin- und Bleomycin plus Bosentan- behandelten Tieren

## **Danksagung**

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Pfeifer für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, sowie bei Herrn Prof. Dr. G. Rieger für die Möglichkeit, diese Untersuchung an seinem Lehrstuhl durchführen zu können.

Herrn Dr. Stephan Schroll möchte ich für die freundschaftliche Betreuung und die vielen hilfreichen Tips während der Anfangszeit der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit danken. Besonderer Dank gilt auch Frau Daniela Sebah, die mir während des experimentellen Teils der Doktorarbeit bei Planung, Datenerhebung, Durchführung und Auswertung mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden, insbesondere Frau Katharina Schmid; die gute Zusammenarbeit mit ihr hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei den vielen Menschen bedanken, die mich auf meinem Lebensweg geprägt, begleitet und unterstützt haben: ganz herzlicher Dank gilt meinem Ehemann Stefan, meiner Familie, aber auch meinen Freunden für die große Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ferner meiner guten Freundin, Frau Dr. Simone Schmid, für ihre Unterstützung bei der graphischen Gestaltung der Arbeit.

# Curriculum vitae

## Persönliche Daten

---

Name Julia Gutschalk, geb. Schlick  
Adresse Herrnstr. 10  
92224 Amberg  
Geburtsdatum 27.12.1981  
Geburtsort München  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand verheiratet

## Schulbildung

---

1988-1991 Grundschule Train, Lkr. Kelheim  
1991-1993 Albertus- Magnus- Gymnasium Regensburg  
1993-2000 Johann- Michael- Fischer- Gymnasium Burglengenfeld  
06/2000 Allgemeine Hochschulreife

## Studium

---

10/2002 Beginn des Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg  
09/2004 Ärztliche Vorprüfung  
11/2008 Staatsexamen Medizin

## Famulaturen

---

03/2005 Innere Medizin (Schwerpunkt: Gastroenterologie, Kardiologie, Notaufnahme)  
Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg  
08/2005 Anästhesiologie (Schwerpunkt: Narkoseführung)  
Missionsärztliche Klinik, Würzburg  
09/2005 Innere Medizin (Schwerpunkt: Infektiologie, Tropenmedizin)  
Missionsärztliche Klinik, Würzburg  
04/2006 Chirurgie (Schwerpunkt: ambulante operative Eingriffe, Unfallchirurgie, Sportmedizin)  
Praxis Prof. Dr. Bäumer/ Dr. Bertsch, Regensburg  
09/2006 Pädiatrie (Schwerpunkt: Neonatologie, Infektiologie, Fehlbildungssyndrome, Neurologie)  
Hospital Antonio Lorena, Cusco, Peru  
02/2007 Chirurgie (Schwerpunkt: Orthopädie, Traumatologie)  
Praxis Dr. Jaeger, Markt Schwaben

## Praktisches Jahr

---

08/2007- 12/2007 Innere Medizin  
Klinikum St. Marien, Amberg  
12/2007- 04/2008 Anästhesiologie  
Klinikum St. Marien, Amberg  
04/2008- 07/2008 Gefäßchirurgie  
Klinikum St. Marien, Amberg

## **Berufliche Tätigkeit**

---

Seit 4/2009

Assistenzärztin der Medizinischen Klinik,  
Klinikum St. Marien Amberg

