

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PNEUMOLOGIE

Professor Dr. med. Michael Pfeifer

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE EINER THERAPIE MIT DEM NICHTSELEKTIVEN
ENDOTHELINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF RECHTS- UND
LINKSVENTRIKULÄRES REMODELLING UND GENEXPRESSION BEI DER
BLEOMYCININDUZIERTEN LUNGENFIBROSE MIT PULMONALER
HYPERTONIE DER RATTE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Johanna Schmid

2012

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PNEUMOLOGIE

PROF. DR. MED. MICHAEL PFEIFER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE EINER THERAPIE MIT DEM NICHTSELEKTIVEN
ENDOTHELINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF RECHTS- UND
LINKSVENTRIKULÄRES REMODELLING UND GENEXPRESSION BEI DER
BLEOMYCININDUZIERTEN LUNGENFIBROSE MIT PULMONALER
HYPERTONIE DER RATTE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Johanna Schmid

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Pfeifer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	73
1. Einleitung	7
1.1. Pulmonale Hypertonie	7
1.2. Idiopathische Lungenfibrose	7
1.3. Das Endothelinsystem	9
<i>Endothelin und pulmonale Hypertonie</i>	9
<i>Endothelin und IPF</i>	10
<i>Endothelin und Herz</i>	10
1.4. Kardiales Remodelling	11
1.5. Die natriuretischen Peptide ANP und BNP	12
<i>Natriuretische Peptide und der rechte Ventrikel</i>	13
1.6. Das Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose in der Ratte	14
1.7. Ziel der Arbeit	15
2. Methoden und Materialien	17
2.1. Die tierexperimentelle Versuchsphase	17
2.1.1 Laufbandbelastungstest	17
<i>Haltung und Gruppeneinteilung</i>	17
<i>Laufbandbelastungstest und -aufbau</i>	17
<i>Training</i>	17
<i>Ermittlung der Ausgangskondition und Abbruchkriterien</i>	18
<i>Belastungstest</i>	19
2.1.2 Verabreichung von Bleomycin und Bosentan an die Versuchstiere	19
<i>Induktion von pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie mit Bleomycin in Gruppe 2 und 3</i>	19
<i>Verabreichung von Bosentan an Gruppe 3</i>	20
2.1.3. Hämodynamische Messungen	20
<i>Blutdruckmessung mit der Tail-Cuff-Methode</i>	20
<i>Rechtsventrikuläre systolische Druckmessung</i>	20
2.1.4. Organentnahme	21

Inhaltsverzeichnis

<i>Blutentnahme und Plasmagewinnung</i>	21
<i>Organentnahme und –konservierung</i>	21
2.2. Quantitative Bestimmung von ET-1 im Plasma	22
<i>Prinzip ELISA</i>	22
<i>Durchführung ET-1-ELISA</i>	22
<i>Auswertung</i>	23
2.3. Immunhistologie	23
<i>Anfertigen der Gefrierschnitte</i>	23
<i>Prinzip der DAB-Immunhistologie</i>	24
<i>Durchführung</i>	24
2.4. Morphometrische Analyse der Kardiomyozyten	25
<i>Morphometrische Bestimmung der Laminindicke</i>	26
<i>Morphometrische Bestimmung des Myozytenvolumens</i>	26
2.5. RNA-Isolation	27
<i>RNA-Konzentrationsbestimmung</i>	28
<i>RNA-Integritätsbestimmung</i>	29
2.6. Real-Time Quantitive PCR zur relativen Quantifizierung sowohl der ANP- und BNP-Genexpression als auch der ETA und ETB-Rezeptorgenexpression	30
<i>Die Reverse-Transkriptase-Reaktion</i>	30
<i>Prinzip der Real-Time Quantitative PCR</i>	31
<i>Durchführung</i>	33
<i>Berechnung nach der $\Delta\Delta$-CT-Methode</i>	33
2.7. Agarose-Gelelektrophorese	34
<i>Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese</i>	35
<i>Durchführung</i>	35
2.8. Statistische Auswertung	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Hämodynamische Messungen	37
3.2. Rechtsventrikuläre Hypertrophie	37
3.3. Laminin im Herzmuskelpräparat	38
3.4. Morphometrie der Kardiomyozyten	39

Inhaltsverzeichnis

3.5.	ANP-mRNA-Expression	42
3.6.	BNP-mRNA-Expression	43
3.7.	ETA-Rezeptorgenexpression	44
3.8.	ETB-Rezeptorgenexpression	45
3.9.	ET-1 im Plasma am Tag 29	46
4.	Diskussion	47
4.1.	Rechtsherzhypertrophie und kardiales Remodelling	47
4.2.	Ventrikuläre Genexpressionsanalyse <i>ETA- und ETB-Rezeptorgenexpression</i>	51
	<i>Die natriuretischen Peptide ANP und BNP</i>	53
	<i>Endothelin-1 im Plasma</i>	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturnachweis	60
7.	Abkürzungen	73
8.	Danksagung	75

1. Einleitung

1.1. Pulmonale Hypertonie

Pulmonale Hypertonie (PH) ist definiert als eine Gruppe von Erkrankungen, die durch eine chronische Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes charakterisiert sind und zu Rechtsherzversagen und frühzeitigem Tode führen. Allen Formen der PH liegt als Pathomechanismus eine unkontrollierte Proliferation aller drei Gefäßschichten der pulmonalen Widerstandsarterien zugrunde. Dieses sogenannte pulmonalvaskuläre Remodelling ist gekennzeichnet durch eine Endotheldysfunktion mit veränderter NO-, Thromboxan A2-, Prostazyklin- und Endothelin-Synthese, pathologisch veränderten Kalziumkanälen und Expression von Serotonin-Transportern auf glatten Muskelzellen sowie vermehrter Matrixproduktion der Adventitia [1]. Nach der Dana Point Klassifikation von 2008 werden sechs Krankheitsgruppen unterschieden. Diese bestehen aus der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH), die entweder idiopathisch, familiär oder assoziiert mit anderen Erkrankungen, wie etwa Kollagenosen, auftritt. Zudem unterscheidet man PH bei Linksherzerkrankungen, PH aufgrund Thromboembolien und einiger seltener Ätiologien, sowie die große Gruppe der PH bei Lungenerkrankungen oder Hypoxie wie zum Beispiel die idiopathische Lungenfibrose.

1.2. Idiopathische Lungenfibrose

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine progressive Erkrankung des Lungenparenchyms unbekannter Ätiologie. Man geht heute davon aus, dass pathogenetisch weniger eine Entzündungsreaktion als eine abnormale Fibroblastenproliferation für die Entstehung der IPF verantwortlich ist [2]. Nach Schädigung des Alveoloarepithels führt ein gestörter Wundheilungsprozess in progressiver Weise zu fibrotischen Läsionen und Zerstörung der alveolokapillaren Einheiten. Als Mediatoren der Fibrosebildung gelten Zytokine und Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF β , TNF α und Endothelin [3, 4].

Die Prävalenz der idiopathischen Lungenfibrose wird auf 42/ 100000 Einwohner geschätzt [5]. Es gibt bis heute keine befriedigende Therapie und die Prognose ist schlecht mit einer mittleren Überlebensdauer von weniger als 3 Jahren nach Diagnosestellung [6-8].

Einleitung

Das Auftreten einer PH bei IPF ist mit einer erhöhten Mortalität verbunden [8, 9]. Lungenfunktionstest bei IPF korrelieren meist weniger gut mit dem Überleben der Patienten als eine Einschränkung der Belastbarkeit und Leistung gemessen durch den 6-Minuten-Gehtest (6MWT) [10-13].

Man schätzt die Prävalenz einer mit IPF assoziierten PH auf 32 – 85% [14]. Es ist entscheidend, Patienten mit PH zu identifizieren, da aufgrund der signifikant schlechteren Prognose eine Lungentransplantation früher in Betracht gezogen werden sollte.



Abbildung 1

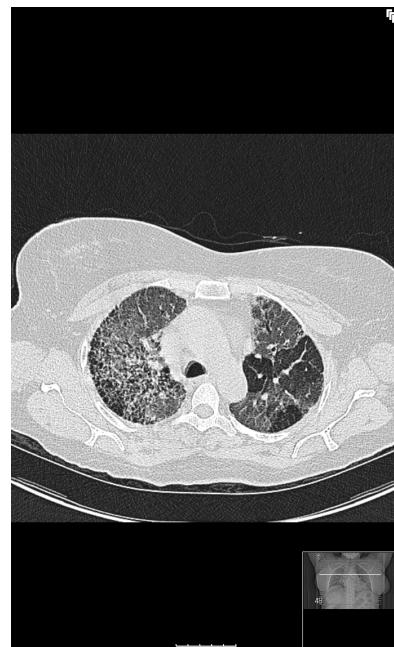


Abbildung 2

1: Röntgenthorax bei IPF: Grob retikuläres Netzmuster, unscharfe Herzkontur, multiple Ringfiguren von einigen mm Größe

2: Computertomographie der Lunge (der gleichen Patientin): Ausgeprägtes „Honigwabenmuster“ als Zeichen der Lungenfibrose

1.3. Das Endothelinsystem

Endothelin wurde als potenter Vasokonstriktor Mitte der 1980er Jahre entdeckt [15]. Kurz darauf gelang es, das neu entdeckte Gewebshormon als ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid zu identifizieren und aus Endothelzellen zu isolieren [16]. Heute sind vier Isoformen bekannt, ET-1 – ET-4.

Einleitung

Im kardiovaskulären System dominiert ET-1. ET-1 wird von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten synthetisiert und wirkt in auto- und parakriner Weise [16-18]. Mediatoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche je nach Rezeptorsubtyp unterschiedlich oder sogar gegensätzlich agieren. ETA-Rezeptoren werden auf glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten exprimiert. Stimulation dieser Rezeptoren vermittelt Vasokonstriktion, Mitogenese und positive Inotropie [19-22]. ETB-Rezeptoren befinden sich ebenfalls auf glatten Muskelzellen und zusätzlich auf Endothelzellen. Endotheliale ETB-Rezeptoren (ETB1) vermitteln Vasodilatation durch Freisetzung von NO und Prostazyklin. Auf glatten Muskelzellen wirkt der ETB-Rezeptor (ETB2) direkt vasokonstriktorisch. Der ETB-Rezeptor ist zudem für die Entfernung des Endothelin-1 aus dem Plasma verantwortlich, vermutlich durch Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes [23].

Endothelin und pulmonale Hypertonie

Das ET-System spielt eine tragende Rolle bei der Regulation des pulmonalen Gefäßtonus [24]. Im Krankheitsbild der PAH wird ET-1 als ein Hauptmediator angesehen und bewirkt Proliferation, Gefäßwandhypertrophie, Entzündung, Fibrose und Vasokonstriktion der Lungenstrombahn. In Lungen von Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie wird ET-1 überexprimiert, seine Plasmakonzentration in Patienten mit PAH ist erhöht [25] und korreliert mit einer schlechteren Prognose. Behandlung von Patienten mit dem oral anwendbaren, nichtselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan zeigte in Studien positive Wirkung auf Symptomatik, Hämodynamik und Mortalität bei PAH [26-28]. Bosentan wird seit 2002 neben einer Basistherapie mit Antikoagulantien und Sauerstoff zur Behandlung der PAH als eigenständige oder als Kombinationstherapie mit Prostazyklinanalogen, Kalziumantagonisten und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren angewandt. Im Jahre 2006 folgte schließlich die Zulassung des ETA-selektiven Rezeptorblocker Sitaxsentan. Den ersten oralen ETA-Antagonist stellt Ambrisentan dar, welches seit 2008 zur Behandlung einer PAH Anwendung findet. Ein Review der Cochrane Collaboration im Jahre 2006 schloss, dass sowohl nichtselektive als auch selektive Endothelinrezeptorantagonisten vasodilatierend auf präkapilläre Lungenarteriolen wirken, Symptome mildern und das Leistungsvermögen steigern [29].

Einleitung

Endothelin und IPF

Das ET-System ist bei idiopathischer Lungenfibrose aktiviert. Patienten mit pulmonaler Fibrose wiesen erhöhtes ET-1 in der bronchoalveolären Lavage [30-32]. Versuche mit ET1-transgenen Mäusen mit pulmonaler Überexpression von ET1 zeigten eine fibrotische Umwandlung deren Lungengewebes [33]. ET-Rezeptorantagonisten konnten die Fibroblastenproliferation in der Lunge hemmen [34] und ET1-Converting-Enzyme sowie ET-1 der Lunge scheinen mit der Aktivität der IPF zu korrelieren [35, 36]. Die American Thoracic Society, European Respiratory Society und das American College of Chest Physicians empfehlen in ihrem 2000 gemeinsam herausgegeben Consensus eine Kombinationstherapie von Kortikosteroiden und Zytotoxica (Azathioprin oder Cyclophosphamid), basierend auf der Annahme, dass eine abnormale Entzündungsreaktion zur Entstehung der Lungenfibrose führt [6]. Obwohl immer noch als Initialtherapie angewandt, bleiben diese Medikamente umstritten. Zu einem neuen Therapieansatz gehört der nichtselektive Endothelinrezeptorantagonist Bosentan. Studien zur antifibrotischen Wirkung von Bosentan waren vielversprechend [37-39]. Es gibt bis dato zwei klinische Studien zu Bosentan bei IPF, die leider keine signifikante Verbesserung der Lungenfunktionstests, Gasaustausch, funktionellem Leistungsvermögen oder rechtsventrikulärer Hämodynamik nachweisen konnten [40, 41]. Eine dieser Studien (BUILD-1) zeigte jedoch einen Trend zur Verlängerung der Zeit bis zum sekundären Endpunkt (Tod oder Fortschreiten der Erkrankung) auf. Dieses positive Ergebnis war signifikant in der Untergruppe der durch Biopsie nachgewiesenen IPF [41] weshalb eine weitere Studie erfolgte, die den Effekt einer Bosentantherapie bei durch Biopsie nachgewiesener IPF prüft (BUILD-3 Studie).

Endothelin und Herz

Das ET-System ist auch bei Myokardhypertrophie sowie Herzinsuffizienz aktiviert und die myokardiale ET-1-Genexpression erhöht. Chronische Stimulation durch ET-1 führt zu kardialer Fibrose, Hypertrophie und Proliferation der extrazellulären Matrix [42]. Die Plasma-ET1-Konzentration bei Linksherzinsuffizienz korreliert mit dem Schweregrad der Symptomatik und zeigte sich als unabhängiger Prognoseprädiktor [43].

Auch am Herzen finden sich beide Rezeptortypen ETA und ETB. In isolierten Kardiomyozyten stellt der ETA-Rezeptor mehr als 90% der ET-Rezeptoren [44]. Der

Einleitung

ETA-Rezeptor dominiert außerdem in der Media intramyokardialer Gefäße [45, 46]. Bei Linksherzversagen sind beide ET-Rezeptoren entweder upreguliert [47], unverändert (ETA) oder downreguliert (ETB) [48, 49]. Insgesamt gibt es weit mehr Studien zum ET-System bei Linksherzinsuffizienz, während die Rolle des Endothelin und seiner Rezeptoren bei Belastungen des rechten Ventrikels, etwa im Rahmen einer pulmonaler Hypertonie, weit weniger untersucht ist. Die PH führt über eine vermehrte Druckbelastung des rechten Ventrikels zu Adaptationsvorgängen im rechten Herzen. Es gibt nur wenige Studien zum rechtsventrikulären Remodelling und insbesondere nur vereinzelt Arbeiten, die die myokardiale Genexpression von ET-Rezeptoren bei Rechtsherzbelastung und –hypertrophie untersuchen. Es gibt noch keine Studie, die sich mit den Auswirkungen des unselektiven ET-Rezeptor-Antagonisten Bosentan auf rechts- und linksventrikuläres Remodelling und ET-Rezeptorgenexpression bei bleomycinduzierter PH bei PF der Ratte befasst.

1.4. Kardiales Remodelling

Bei Druckbelastung des Herzens, etwa bei arterieller oder pulmonaler Hypertonie, reagiert das Myokard mit kompensatorischem Wachstum, welches primär und im Gegensatz zum embryonalen Herzwachstum durch Hypertrophie und weniger Hyperplasie der Kardiomyozyten bedingt ist [50]. Initial entwickelt sich eine konzentrische Hypertrophie, welche dem Herzen zuerst noch ermöglicht, seine Auswurfleistung aufrechtzuerhalten. Bei chronischer Druckbelastung geht diese über in eine exzentrische Hypertrophie, es kommt zu einer Dilatation des Ventrikels und Pumpleistung nimmt ab.

Gerdes et al. zeigten am linken Ventrikel, dass in der Phase der konzentrischen Hypertrophie die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten zunimmt, während eine Zunahme der Zelllänge der Myozyten, ohne Zunahme des Querschnittes, den Übergang in die exzentrische Hypertrophie und letztendlich zum Herzversagen markiert [51]. Chronische Druckbelastung des Herzens führt aber auch zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM), welche nicht nur eine Stützfunktion für Myozyten und Kapillaren erfüllt, sondern auch maßgeblich an Form, Funktion, Wachstum und Differenzierung der Zellen beteiligt ist. Es ist bekannt, dass die Druckbelastung des Ventrikels zu einer Steigerung der Kollagensynthese durch Myofibroblasten führt, die

Einleitung

sich durch mechanische und parakrine Stimulation aus Fibroblasten differenzieren [52]. Durch die Fibroseentwicklung sinkt die myokardiale Elastizität und die Herzfunktion verschlechtert sich. ET-1 wirkt auch am Herzen profibrotisch [53].

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus zwei Hauptkomponenten, den Fasern und der sogenannten Grundsubstanz. Die Fasern sind Kollagenfibrillen und elastische Fasern, die Grundsubstanz setzt sich aus Glykosaminoglykanen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und extrazellulärer Flüssigkeit zusammen. Glykoproteine fungieren als Adhäsionsproteine, und zu ihnen gehört neben anderen Proteinfamilien die der Laminine. Laminine sind heterotrimere Proteine, die jeweils aus einer α -, β - und γ -Kette bestehen und die Hauptkomponenten der Basalmembran, einer spezialisierten Form der EZM, darstellen. Bis heute sind 15 Isoformen bekannt [54, 55].

Pfeifer et al. zeigten eine Zunahme der extrazellulären Matrix-Proteine bei Rechtsherzhypertrophie im Rahmen chronischer Hypoxie. Interventionen mit NO und einem selektiven ETA-Endothelinrezeptorantagonisten führten zu einer Verminderung der EZM-Synthese [56]. Versuche mit ET-1-transgenen Mäusen zeigten eine deutlich vermehrte kardiale Lamininexpression [57]. Laminin soll deshalb hier repräsentativ für die EZM des Herzens bestimmt, und unter chronischer dualer ET-Blockade analysiert werden.

1.5. Die natriuretischen Peptide ANP und BNP

Im Jahre 1981 wurde erstmals über eine Substanz aus dem Atrium von Ratten berichtet, die starke diuretische und natriuretische Wirkung habe [58]. Kawanga et al. identifizierten als erstes Mitglied dieser neuen Stoffgruppe das Polypeptid ANP (atrial natriuretic peptide) [59]. Später wurden BNP (B-type natriuretic peptide) und CNP (C-type natriuretic peptide), sowie noch andere strukturell verwandte Peptide gefunden [60, 61].

Die physiologischen Effekte der natriuretischen Peptide schützen das kardiovaskuläre System vor den Folgen einer Volumen- oder Druckbelastung. Sie wirken über Natriurese, Diurese, Vasodilatation, Lusitropie sowie Zytoprotektion und besitzen antifibrotische und antihypertrophische Wirkung. Sie wirken zudem antiinflammatorisch und hemmen das RAAS, das sympathische System und Endothelin [62]. ANP wird im gesunden Herzen vornehmlich in den Atria synthetisiert und in

Einleitung

Granula gespeichert, während BNP auch in den Ventrikeln gebildet wird (A:V 40:1 für ANP und 3:1 für BNP) [63]. ANP und BNP sind zudem Teil des fetalen Genprogrammes des Herzen, welches bei pathologischer Myokardhypertrophie reaktiviert wird [64]. So kommt es bei chronischer Druck- oder Volumenbelastung des Herzens zu konzentrischer bzw. exzentrischer Hypertrophie und die ventrikuläre Synthese von ANP und BNP steigt dramatisch an [63]. Wanddehnung entweder der Atria oder der Ventrikel stellt dabei den Haupttrigger der Freisetzung der natriuretischen Peptide dar, was vermutlich von Zelloberflächenintegrinen sowie mitogenaktivierten Proteinkinasen gesteuert wird [65]. Ihre Genexpression wird zudem von ET-1, Angiotensin II und Glukokortikoiden induziert und ist bei Hypoxie, sowie durch neurohumorale Stimulation durch Vasopressin und Katecholaminen erhöht [66]. Es sind drei Rezeptortypen bekannt, wobei ANP und BNP den Natriuretic-peptide-receptor-A (NPR-A-Rezeptor) bevorzugen, während CNP hauptsächlich an den NPR-B-Rezeptor bindet. Der NPR-C-Rezeptor scheint eine Rolle als Clearance-Rezeptor zu spielen [67]. Die neutrale Endopeptidase, ein Zelloberflächenenzym, dient, unabhängig von NPR-C, ebenfalls zur Entfernung der natriuretischen Peptide aus dem Plasma.

Natriuretische Peptide und der rechte Ventrikel

Das diagnostische und therapeutische Potential von ANP und BNP bei ischämischer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz ist mittlerweile gut untersucht [68-70]. Eine Erhöhung des Plasma-BNP korreliert mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Events und Todesfälle [71] sowie mit der Schwere einer Linkserzinsuffizienz und deren Prognose [72].

Auch bei PAH ist BNP im Plasma aufgrund rechtsventrikulärer Belastung erhöht und prognoseweisend [73-75]. Leuchte et al. zeigten zudem, dass BNP nicht nur mit einer Sensitivität von 85% und einer Spezifität von 88% in der Lage war, pulmonale Hypertonie bei Patienten mit chronischer Lungenerkrankung vorauszusagen, sie wiesen auch nach, dass pulmonale Hypertonie und BNP-Spiegel stärker mit der Mortalität in ihrer Studiengruppe korrelierte als Lungenparameter wie Lungenvolumen und Hypoxie [76]. In einer Studie zur Bedeutung BNPs bei der Detektion relevanter pulmonaler Hypertonie erwies sich BNP im Plasma als zuverlässiger Marker signifikanter Lungenhochdruckes unabhängig der Lungenfunktion bei pulmonaler Fibrose [76] und

Einleitung

konnte auch bei der idiopathischen Lungenfibrose seine Bedeutung als Prognosemarker unter Beweis stellen [77].

Eine wichtige Bedeutung der natriuretischen Peptide liegt aber möglicherweise nicht nur in ihrer diagnostischen Relevanz bei Links- und Rechtsherzdysfunktion als Marker kardialer Hypertrophie, sondern in ihrer Rolle bei der Modulation kardialen Remodellings.

In vitro blockierte ANP die Kollagensynthese in menschlichen kardialen Fibroblasten [78] und BNP-knockout-Mäuse waren anfällig für kardiale Fibrose und Hypertrophie [79]. NPR-A-Knockout-Mäuse zeigten vergößerte Herzen sogar unter effektiver Hypertoniebehandlung [80] und Mäuse mit reduzierter NPR-A-Expression auf Kardiomyozyten wiesen moderate kardiale Hypertrophie bei milder Hypotonie auf [81, 82]. Mäuse mit ANP-Defizit hatten größere Herzen als Mäuse, die ANP überexprimierten [83, 84]. Im Gegensatz dazu waren Mäuse mit BNP-Mangel normotensiv und hatten eine normale Herzgröße, zeigten jedoch ventrikuläre Fibrose. In einem Versuch an Mäusen nach Aortenligatur kam es bei Tieren mit BNP-Defizienz zu multifokalen fibrotischen Läsionen in den Ventrikeln. Diese fibrotischen Läsionen wurden beim Wildtyp nicht nachgewiesen, obwohl beide Gruppen eine ähnliche Ventrikelprominenz aufwiesen [67]. Diese und noch weitere Studien belegen die antihypertrophische und antifibrotische Wirkung der natriuretischen Peptide [85]. Das Ausmaß rechtsventrikulären Remodellings und Rechtsherzadaptation ist prognosebestimmend im Krankheitsverlauf pulmonaler Hypertonie jeder Genese. Es gibt jedoch nur wenige Studien zur kardialen Genexpression der natriuretischen Peptide und insbesondere gibt es nur vereinzelt Studien zu ihrer Genexpression bei pulmonaler Hypertonie. Die Interaktion zwischen Endothelin- und NP-System ist noch immer unzureichend untersucht. In der vorliegenden Studie soll die kardiale Genexpression der natriuretischen Peptide ANP- und BNP-Expression bei bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie sowie Behandlung mit Bosentan analysiert werden.

1.6. Das Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose in der Ratte

Zur Induktion pulmonaler Fibrose im Tierversuch stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Pulmonale Fibrose kann durch Behandlung mit Fluoreszin-Isothiozyanat,

Einleitung

Bestrahlung, Silikat oder viralen Vektoren erzeugt werden. Eine weitere Variante stellt die Verwendung von transgenen Tieren dar [86]. Eines der bestbeschriebenen Modelle ist jedoch die Induktion pulmonaler Fibrose durch Bleomycin.

Bleomycin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Glyopeptidantibiotika und wurde ursprünglich aus dem Aktinomyceten *Streptomyces verticillus* isoliert. In hohen Dosierungen besitzt Bleomycin Endonukleaseaktivität und spaltet DNA. Seit seiner Entdeckung 1966 durch Umezawa [87] findet es Anwendung in der Therapie von Lymphomen, Hodenkarzinom sowie Plattenepithelkarzinom von Zervix, und Kopf-, Halsbereich. Eine gefürchtete Nebenwirkung ist eine dosisabhängige Lungentoxizität, welche in Ausbildung einer Fibrose resultiert [88]. Diese gefährliche Nebenwirkung wird beim Tiermodell zur experimentellen Induktion einer pulmonalen Fibrose ausgenutzt. Die intratracheale Applikation hat sich aufgrund der viel geringeren notwendigen Dosis, der schnelleren Wirksamkeit und der so gut wie fehlenden systemischen Nebenwirkungen gegen die I.V.-, S.C.- oder I.P.- Injektion durchgesetzt. Einmalige Verabreichung führt dabei zu direkter Schädigung initial der Alveolarepithelzellen, danach folgt innerhalb der ersten Woche die Entwicklung einer neutrophilen und lymphozytischen Panalveolitis. Das Endstadium ist durch das Abklingen der alveolaren Entzündungsreaktion, Fibroblastenproliferation und Produktion extrazellulärer Matrix gekennzeichnet [86]. Chaudhary et al. beschrieben als Dosis, die zwar eine deutliche, reproduzierbare Lungenfibrose induzierte, aber keinen Einfluss auf Überleben oder Körpermengen hatte, eine Bleomycinmenge von 2,2 IU/kg [89].

1.7. Ziel der Arbeit

In Anbetracht der antiproliferativen und antifibrotischen Wirkung Bosentans und seiner nachgewiesenen Effektivität bei PAH liegt die Annahme nahe, dass Anwendung einer dualen Endothelinrezeptorblockade auch bei der Behandlung der idiopathischen Lungenfibrose von Nutzen sein könnte, insbesondere wenn diese mit PH assoziiert ist. Diese Studie hat sich zum Ziel gesetzt, die Auswirkungen des nichtselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan auf das rechts- und linksventrikuläre Remodelling bei pulmonaler Fibrose mit pulmonaler Hypertonie zu untersuchen. Als Marker kardialer Hypertrophie und ventrikulären Remodellings werden

Einleitung

Kardiomyozytengröße, Laminin und die myokardiale Genexpression der Hypertrophiemarker ANP und BNP untersucht. Über das Verhalten der ET-Rezeptoren spezifisch des Myokards ist noch wenig bekannt. Ihre Genexpression soll deshalb in dieser Studie analysiert und der ET-1-Plasmaspiegel bestimmt werden. Um unsere Analysen durchzuführen bedienten wir uns des Modells der bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose mit pulmonaler Hypertonie der Ratte.

2. Methoden und Materialien

2.1. Die tierexperimentelle Versuchsphase

2.1.1. Laufbandbelastungstest

Haltung und Gruppeneinteilung

30 männliche Wistaratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Ausgangsgewicht von durchschnittlich 286,2 ($\pm 3,4$) g wurden während der fünfwochigen Versuchsphase in Einzelkäfigen bei normaler Kost und Wasser ad libitum und einem zwölfstündigem Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Studie wurde gemäß § 8 I des Tierschutzgesetzes genehmigt.

Jeweils 10 Tiere wurden auf drei Gruppen verteilt (Kontrolle, Bleomycin, Bleomycin + Bosentan). Während des gesamten Versuches wurde jeden zweiten Tag das Gewicht der Tiere bestimmt und zur Ermittlung der gewichtsadaptierten Bosentandosis verwendet.

Laufbandbelastungstest und -aufbau

Um die Leistungsfähigkeit der einzelnen Gruppen im Verlauf des Versuchs zu messen, wurden Leistungsparameter definiert, die in vier Wochen regelmäßig bestimmt und dokumentiert wurden.

Das Laufband (One Lane Modular Treadmill for Rats, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) bestand im Wesentlichen aus einem winkelverstellbaren Laufband in einem verschließbaren Plexiglaskasten. Im hinteren Bereich befand sich eine Stromquelle (Abb. 3).

Training

Alle Ratten wurden zuerst einem siebentägigen Training auf dem Laufband mit Stromquelle (1,5 mA) gemäß des Schemas in Tabelle 1 unterworfen. Konnte eine Ratte ihr Soll nicht erfüllen, wurde am nächsten Tag trotzdem weiter nach Plan vorgegangen. Erfüllte eine Ratte am Tag 7 nicht ihr Soll, so war diese von ihr erbrachte Leistung als ihr individueller Maximalwert anzusehen.

Methodik

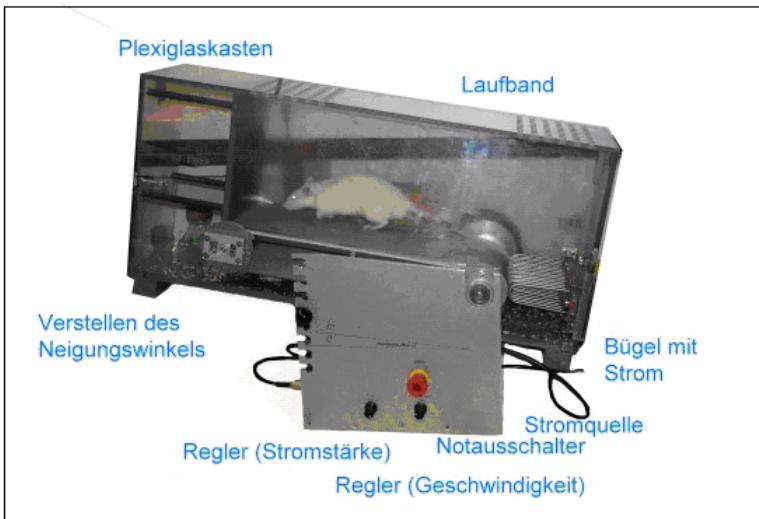


Abbildung 3 Laufband mit Beschreibung der einzelnen Komponenten

Tag	Laufdauer [min]	Laufbandgeschwindigkeit [m/ min]	Laufbandneigungswinkel [°]
1	5	10	0
2	7,5	10	0
3	10	10	6
4	7,5	20	6
5	7,5	20	12
6	10	20	12
7	15	25	12

Tabelle 1 Trainingsplan

Ermittlung der Ausgangskondition und Abbruchkriterien

Im Anschluss an das siebentägige Training wurde nun auf zwei aufeinander folgenden Tagen die jeweilige maximale Laufdauer eines jeden Tieres bei 25 m/min und einem Neigungswinkel von 12° ermittelt und daraus der Mittelwert bestimmt. Dieser Wert stellte die individuelle Ausgangskondition t_0 der Tiere dar. Dabei galten als Abbruchkriterien entweder ein Kontakt von mehr als zwei Sekunden stehend auf der Stromquelle oder eine Verweildauer von mehr als drei Sekunden mit den Hinterbeinen auf der Stromquelle bei Vorderbeinen auf dem Laufband. War ein Kriterium erfüllt, wurde das Laufband gestoppt und die Ratte wieder auf das Band gesetzt. Kam es zur dreimaligen Erfüllung eines der oben genannten Kriterien, war dies die maximale Laufdauer und somit die individuelle Ausgangskondition der jeweiligen Ratte.

Methodik

Entsprechend der Ausgangskonditionen wurden nun gute und schlechte Läufer gleichermaßen auf drei Gruppen verteilt.

Nach dem Training und Ermittlung der Ausgangskondition schloss sich nun die eigentliche vierwöchige Versuchsphase an (Abb. 4). An Tag 0 wurde den Gruppen 2 und 3 Bleomycin verabreicht. An Tag 1 begann die Behandlung der Gruppe 3 mit Bosentan sowie die tägliche Leistungsabnahme.

Belastungstest

Für eine Dauer von 28 Tagen liefen alle Ratten täglich maximal bis zu ihrer vorher ermittelten Ausgangskondition t_0 . Wurden vorher die Abbruchkriterien erfüllt, galt dieser Wert als die jeweilige Tagesleistung.

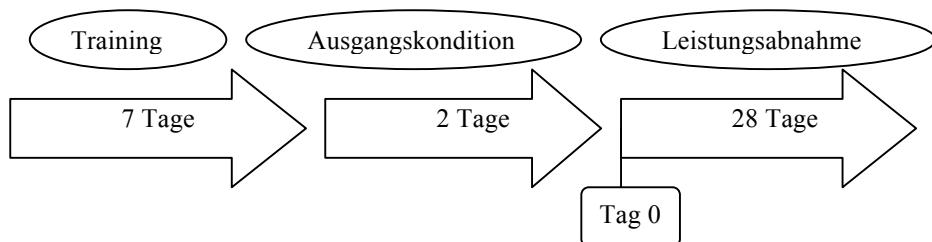


Abbildung 4 Versuchsablauf

2.1.2 Verabreichung von Bleomycin und Bosentan an die Versuchstiere

Induktion von pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie mit Bleomycin in Gruppe 2 und 3

Zur Verabreichung Bleomycins (BLEO-cell®, cell pharm GmbH, Hannover, Deutschland) am Tag 0 der vierwöchigen Versuchsphase an Gruppe 2 und 3 wurden die Ratten mittels Isofluran-getränktem Wattebausch (Florene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in Inhalationsnarkose gehalten und senkrecht gelagert. Durch eine 16G-Braunüle (Braun, Melsungen, Deutschland) wurde 2,5IU/kgKG in 0,9% NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) gelöstes Bleomycin in einem Gesamtvolumen von 0,25ml den Ratten intratracheal zugeführt und mit 0,50ml Luft zur gleichmäßigen Verteilung nachgespült. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass im

Methodik

Umgang mit Bleomycin die Richtlinien zum Umgang mit Zytostatika eingehalten wurden. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung mit Bleomycin.

Verabreichung von Bosentan an Gruppe 3

Ab Tag 1 wurden alle Ratten der Gruppe 3 täglich mit dem unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan (Tracleer®, Actelion, Allschwil, Schweiz) behandelt. Dazu erhielten die Tiere täglich 100mg/kgKG in 1ml Aqua dest. (Braun, Melsungen, Deutschland) gelöstes Bosentan via Edelstahl-Schlundsonde (Scanbur BK AB, Sollentuna, Schweden) für die gesamte Dauer des Versuches.

2.1.3. Hämodynamische Messungen

Blutdruckmessung mit der Tail-Cuff-Methode

Vor Ende des Trainings wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen der systemische Blutdruck zum Ausschluss einer systemischen Hypertonie gemessen. Dazu wurden die Ratten auf einer Heizdecke vorgewärmt und der Blutdruck mittels der Tail-Cuff-Methode ermittelt. Diese analog zur beim Menschen durchgeführten Methode nach Riva-Rocci stellt bei Ratten eine gute Alternative zur invasiven Blutdruckmessung dar. Über eine Druckmanschette und einen Pulsaufnehmer wird computergestützt vom BP-Recorder (BP-Recorder 8005, W&W Electronics, Hofheim, Deutschland) eine Pulsationskurve der Schwanzarterie aufgezeichnet und daraus der systolische Blutdruck abgelesen. Die an diesen zwei Tagen gemessenen Werte wurden gemittelt und der so bestimmte SBD-Wert einer jeden Ratte dokumentiert.

Rechtsventrikuläre systolische Druckmessung

Nach der vierwöchigen Versuchsphase wurde der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) jeder Ratte bestimmt. Da RVSP als Maß für Nachlasterhöhung und pulmonale Hypertonie hoch korrelieren, gibt dessen Bestimmung Aufschluss über den Grad des Lungenhochdrucks.

Die Ratten wurden dazu erst mit einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Florene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) im Exsikator (Roth, Karlsruhe, Deutschland) prämediziert und schließlich mit einer intraperitonealen Injektion von 100µl/gKG Thiopental (Trapanal®, Altana, Konstanz, Deutschland) mit bedarfsadaptierter

Methodik

Supplementierung in eine tiefe Narkose gebracht. Die Ratten wurden dann über der Brust rasiert und in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Die Vena jugularis interna wurde freipräpariert und mit einem Skalpell eröffnet. Nach einer distal des Schnittes angebrachten Ligatur wurde ein mit 500IU/ml Heparin (Liquemin N 25000®, Roche Pharma, Grenzach-Whylen, Deutschland) gespülter Baby-ZVK (1 x 80mm, Braun, Melsungen, Deutschland) bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Nach Stabilisierung der hämodynamischen Bedingungen erfolgte die Messung des RSVP mit dem an den Herzkatheter durch eine ebenfalls heparinisierten Original-Perfusor®-Leitung (Braun, Melsungen, Deutschland) angeschlossenen Druckabnehmer (Hellige, Programm 19, Freiburg im Breisgau, Deutschland).

2.1.4. Organentnahme

Blutentnahme und Plasmagewinnung

Über den Katheter wurde nach Abschluss der RVSP-Messung außerdem EDTA-Blut gewonnen. Dieses wurde bei 4° C und 3000g 10min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das so gewonnene Plasma bis zur Weiterverwendung für den ELISA bei –80° C aufbewahrt.

Organentnahme und -konservierung

Um jetzt die Organentnahme vornehmen zu können, wurde der Thorax in der Abdomen-Thorax-Medianlinie eröffnet. Herz und Lunge wurden gemeinsam nach Durchtrennung der herzbasal fixierenden Strukturen en bloc entnommen. Da später Messungen an Myozyten durchgeführt werden sollen, war es wichtig, dass sich alle Herzmuskelzellen in relaxiertem Zustand befinden. Um dies zu gewährleisten wurde, wurde sofort nach der Entnahme kardioplege Lösung (Custodiol®, HTK-Lösung nach Brettschneider, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) in den rechten Vorhof injiziert bis das Herz zum Stillstand kam. Lunge und Herz wurden voneinander getrennt und die Lunge in einer anderen Studie analysiert. Die Herzohren, die Vorhöfe und die Herzkappen wurden entfernt. Das restliche Herz wurde in rechten und linken Ventrikel sowie das Septum getrennt und ihr jeweiliges Gewicht bestimmt um dies später zur Beurteilung der PAH-bedingten rechtsventrikulären Hypertrophie heranziehen zu können. Dann wurde das Septum verworfen. Die Ventrikel wurden noch

Methodik

einmal jeweils in zwei Hälften geteilt, je eine sollte für die Histologie sowie die RNA-Gewinnung verwendet werden. Die Gewebestückchen wurden in einzelnen beschrifteten Organbehältern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis auf Weiteres bei -80°C aufbewahrt.

2.2. Quantitative Bestimmung von Endothelin-1 im Plasma

Prinzip ELISA

Aus dem aus dem Herzkatheter gewonnenen, bei -80°C zwischengelagerten Plasma wurde nun der Gehalt an Endothelin-1 anhand eines kompetitiven Enzymimmunoassay bestimmt. Prinzip des kompetitiven Immunoassays ist, dass eine zum Analysat zugegebene definierte Antikörpermenge sowohl an das freie, also das nachzuweisende Antigen bindet, als auch an das an die Festphase gebundene Antigen. Die Affinität des zugefügten Antikörpers ist dabei zum freien Antigen höher als zum gebundenen. Werden schließlich die freien Antigen-Antikörper-Komplexe in einem Waschschritt entfernt und die gebundenen Komplexe mittels Farbreaktion nachgewiesen, so ist deren bei 450nm am Photometer gemessene Extinktion umgekehrt proportional zur gesuchten Antigenkonzentration in der Probe.

Durchführung ET-1-ELISA

Es wurde der ET-1-ELISA-Kit von Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Deutschland, verwendet. Zur Herstellung einer Standardreihe wurde die Standardstocklösung mit Puffer auf die Konzentrationen 25ng/ml, 5ng/ml, 1ng/ml, 0,2ng/ml und 0,04ng/ml verdünnt. In den 96well Mikrotiterstreifen wurde in jede Vertiefung je 50 μl der Standardverdünnungsreihe und 50 μl der Proben pipettiert. Für den Leerwert wurden je 50 μl Puffer eingesetzt. In alle Vertiefungen mit Ausnahme des Leerwertes wurden 25 μl des Anti-Endothelin-Antikörpers und 25 μl des biotinmarkierten Peptides zugegeben. Die Platte wurde versiegelt und bei Raumtemperatur 3 Stunden lang auf dem Horizontalschüttler (Ika Hs 260 Basic, Staufen, Deutschland) inkubiert. Als nächster Schritt folgte das Auswaschen der Mikrotiterplatte, dazu wurde die Platte erst ausgeschüttelt, dann mit ca. 250 μl Waschpuffer (mit Wasser auf 500ml aufgefüllt) gefüllt, gemischt und wieder entleert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte umgedreht auf einer Saugpapierunterlage ausgeklopft. Es sollten alle Flüssigkeitsreste

Methodik

entfernt werden. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Dann wurden jeweils 100µl SA-HRP-Lösung in alle Vertiefungen pipettiert und 60min auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Es folgte erneut ein Waschvorgang wie oben beschrieben um die nicht enzymmarkierten Komplexe zu entfernen. Dann wurden jeweils 100µl Substrat (Tetramethylbenzidin-Lösung, TMB) in alle Vertiefungen gegeben und 60min bei Raumtemperatur und lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Um die Farbreaktion zu stoppen wurden pro Vertiefung 100µl Stopplösung eingesetzt und dabei auf die gleiche Reihenfolge und zeitliche Abfolge geachtet wie bei der Gabe der Substratlösung. Die Mikrotiterplatte wurde im Photometer (Gene Quant pro, Bio Chrom Ltd., Cambridge, England) bei 450nm vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Auswertung

Mit Hilfe des Computerprogrammes Softmax wurde eine 4-parametrisch aufgetragene Eichreihe aus den optischen Dichten der Standardreihe erstellt. Die gemittelten optischen Dichten der einzelnen Proben wurden auf die Standardkurve gefällt und die ET-1-Konzentration extrapoliert.

2.3. Immunhistologie

Am Herzgewebe sollte sowohl die Breite des die Myozyten umgebenden Lamininsaumes als auch das Volumen der Myozyten bestimmt werden. Um eine Darstellung von Laminin im Präparat zu ermöglichen, musste das Gewebe entsprechend aufbereitet und angefärbt werden. Der immunhistologische Nachweis für Laminin brachte einerseits den genannten Lamininsaum in Erscheinung, und ließ andererseits auch eine Beurteilung der Myozytentgröße durch die Sichtbarmachung der Basalmembran zu.

Anfertigen der Gefrierschnitte

Zuerst musste das tiefgefrorene Herzgewebe geschnitten und auf Objektträger fixiert werden. Jeweils die für die Immunhistologie bestimmte Hälfte der rechten und linken Ventrikel wurde auf die Schneideplatte des Kältemikrotoms (CM 3050 S, Leica, Bensheim, Deutschland) gegeben, mit flüssigem Tissue Tek® (Sakkura Finetek

Methodik

Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland) umgossen und unter einer Glocke gekühlt. Sobald das Tissue Tek® fest geworden war, wurde die Platte in das Schneidegerät eingespannt, das Gewebe angeschnitten und schließlich Schnitte von 7µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden vorsichtig auf SuperFrost-Objektträger (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen. Zur Fixierung des noch unbehandelten Gewebes wurden die Schnitte 10min in -20°C kaltes Aceton (Sigma, München, Deutschland) getaucht. Die so gewonnenen Schnitte konnten bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

Das Prinzip der DAB-Immunhistologie

Nach einer Wässerung der Schnitte und einer irreversiblen Blockade der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ bindet ein erster Antikörper spezifisch an Laminin. Ein zweiter Antikörper, der mit HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert ist, bindet an den ersten Antikörper. Um die gebundenen Antikörper, also letztlich das Laminin, sichtbar machen zu können, müssen diese zu einem wasserunlöslichen Komplex umgesetzt werden. Dies geschieht mit Hilfe von DAB (Diaminobenzidin), das mit HRP am zweiten Antikörper reagiert. Da die endogene Peroxidase vorher inaktiviert wurde, kann sie in dieser Reaktion nicht konkurrieren und das Ergebnis verfälschen. Nach einer Gegenfärbung mit Mayers-Hämalaun und einer anschließenden Entwässerung können die Schnitte mit Xylol fixiert und eingedeckelt werden.

Durchführung

Die Objektträger wurden mit Bleistift beschriftet und der Schnitt mit Fettstift umrandet. Der Lamininnachweis wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Schnitte wurden 2 x 5min im Waschpuffer PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewässert. Danach wurde je 50µl 1%iges H₂O₂ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf die Schnitte pipettiert und die Objektträger 10min in die Feuchte Kammer gestellt. Danach wurde wieder 2 x 5min in PBS gewaschen. Dann wurden je 50µl 10%iges NSS-TweenPBS (DAKO A/S, Kopenhagen, Dänemark) aufgetragen und 1h bei Raumtemperatur in der Feuchten Kammer inkubiert. Durch diesen Schritt werden unerwünschte unspezifische Hintergrundverfärbungen vermieden, die durch Proteinladungen entstehen können. Auf jede Probe wurden dann 2 Tropfen des Laminin-Primärantikörpers rtu (= ready to use, rabbit-anti-rat, Sigma, München,

Methodik

Deutschland) aufgetragen und 1h bei Raumtemperatur in die Feuchte Kammer gestellt. Als Negativkontrolle wurde auf einen Schnitt 50µl TweenPBS (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen und ebenfalls mit inkubiert. So kann geprüft werden ob der 2. AK eventuell unspezifisch bindet und sich so auch die Negativkontrolle später anfärbt wird. Danach wurde wieder 2 x 5min in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Auf die Schnitte wurden dann 2 Tropfen des Sekundärantikörpers (anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA) 1:100 in TweenPBS verdünnt aufgetragen und 1h bei Raumtemperatur in der Feuchten Kammer belassen. Wiederum wurde 2 x 5min in PBS gewaschen. Zur Visualisierung bedienten wir uns des Substrates DAB (Sigma, München, Deutschland), das durch die am zweiten Antikörper konjugierte HRP (Meerrettichperoxidase) unter Zugabe von H₂O₂ zu einem wasserunlöslichen Komplex umgesetzt wird.

Die DAB-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 2 DAB-Tabletten á 10mg wurden in 40ml PBS gelöst und filtriert. Separat in einem Becherglas wurden 10ml PBS + 100µl 30%iges H₂O₂ gemischt. Unmittelbar vor der Verwendung erfolgte zur Aktivierung die Zugabe von 1600µl der PBS-H₂O₂-Lösung zur DAB-Lösung. 50µl der aktivierten DAB-Lösung wurden nun sofort auf alle Schnitte aufgetragen und 5min darauf belassen. Dann wurde 5min mit Leitungswasser fließend gewässert und eine Gegenfärbung mit Mayers-Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 3min angeschlossen. Es wurde 5min in fließendem Leitungswasser gebläut, was die primär violette Farbe durch den pH-Abfall in blau verwandelt. Dann wurde kurz in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96% - 100%) entwässert und anschließend 5min in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert.

Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit DePeX® (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt. Die Lamininfasern wurden so spezifisch braun, die Zellkerne und das Restgewebe blau dargestellt.

2.4. Morphometrische Analyse der Kardiomyozyten

Nun wurde die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop untersucht und dabei die Breite des Lamininsaumes um die Myozyten, sowie deren Längs- und Querdurchmesser ermittelt werden. Dazu wurden die Schnitte am Durchlichtmikroskop (Leica, Solms, Deutschland) bei 40facher Vergrößerung und unter Verwendung des

Methodik

Computerprogrammes Meta-Vue (Meta Imaging Series Version 4.5 MetaVue, Universal Imaging, Pennsylvania, USA) betrachtet und geblendet durch zwei unabhängige Personen morphometrisch ausgewertet.

Morphometrische Bestimmung der Laminindicke

Einschluskkriterien für die Vermessung der Laminindicke am Myozyten waren dessen runder Anschnitt, ein sichtbarer Kern und keine Einrisse und Färbeartefakte. Die Laminindicke wurde pro Präparat an 10 zufällig ausgewählten, oben genannten Kriterien entsprechenden Myozyten vermessen. Das Computerprogramm wurde auf die eingesetzte Vergrößerung (40fach) automatisch kalibriert. Dann wurde der verschiebbare Messbalken im rechten Winkel auf den Lamininsaum des ersten zufällig ausgewählten Myozyten justiert und die Länge des Lotes abgelesen. Zwei Betrachter führten, jeweils unabhängig voneinander, 10 Messungen pro Präparat aus, woraus der Mittelwert pro Tier, und schließlich aus allen Messdaten der Mittelwert pro Gruppe errechnet wurde.

Morphometrische Bestimmung des Myozytenvolumens

Für die Ermittlung des Myozytenvolumens wurden pro Präparat jeweils 5 x der Längsdurchmesser von längsangeschnittenen Herzmuskelzellen sowie 5 x der Querdurchmesser von zufällig ausgewählten, querangeschnittenen Herzmuskelzellen gemessen. Es galten dieselben Einschluskkriterien wie für die Vermessung des Lamininsaumes. Der Längs- bzw der Querdurchmesser wurde definiert als der Bereich innerhalb des Myozyten exklusiv des Lamininsaums. Die Kalibrierung erfolgte analog zur Lamininmessung. Der Messbalken wurde durch den sichtbaren Zellkern gefällt. Wiederum wurde der Mittelwert für das einzelne Tier, sowie für die Gruppen bestimmt. Das Myozytenvolumen wurde mit zwei Formeln (Tab. 2) berechnet und anschließend der Mittelwert bestimmt.

Zylinderformel	$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$ wobei $r = \frac{1}{2}$ Myozytenquerdurchmesser und $h =$ Myozytenlängsdurchmesser
Quaderformel	$V = l \cdot b \cdot h$ wobei $l =$ Myozytenlängsdurchmesser, $b =$ Myozytenquerdurchmesser und $h =$ Myozytenquerdurchmesser

Tabelle 2 Berechnung des Myozytenvolumens

2.5. RNA-Isolation

Um mit der quantitativen Real-Time-PCR die Genexpression von ANP und BNP, sowie der Endothelinrezeptoren ETA und ETB bestimmen zu können, musste RNA aus dem Gewebe isoliert werden, diese auf Reinheit überprüft, ihre Konzentration bestimmt und schließlich in cDNA umgeschrieben werden.

Die Isolation der RNA aus den tiefgefrorenen Herzventrikeln wurde nach der Single-Step-Methode mit Hilfe der Trizol-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. In jeweils ein Falcontube (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde 5ml Trizol und das jeweilige Ventrikalgewebe gegeben und beides im Homogenisator (Ultra Turrax T25, Kika Labortechnik, Staufen, Deutschland) gut zerkleinert. Das lysierte Gewebe-Trizol-Gemisch wurde dann für 5 min ruhen gelassen. Das im Trizol enthaltene chaotrophe Salz GTC (Guanidinithiocyanat) denaturiert Proteine, wobei insbesondere auch die Denaturierung der RNAsen von Bedeutung ist. Die Zellen werden aufgeschlossen und in Komponenten zerlegt, ohne dass jedoch die RNA gespalten wird. Das ebenfalls in der Lösung vorhandene saure Phenol bindet kleinere DNA-Fragmente.

Je Falcontube wurde dann 3ml Chloroform (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Chloroform bindet das Phenol und die Lösung sollte danach ein milchiges Aussehen annehmen. Die Tubes wurden geschüttelt, 3min bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich 15min bei 4°C und 4000 Umdrehungen zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es bildeten sich drei Phasen, wobei die obere farblose, wässrige Schicht die RNA enthält, die weiße Interphase große DNA-Stücke beinhaltet und die untere rosa Phase aus kleineren DNA-Stücken und Phenol besteht.

Die oberste RNA-Schicht wurde mit einer 1000er-Pipette und RNase-freien Pipettenspitzen in RNase-freie Röhrchen pipettiert und der Rest verworfen. RNase-Freiheit muss dabei garantiert sein, da die RNA durch das ubiquitär in Luft und Umwelt vorkommende Enzym sonst degradiert würde.

RNAse-Freiheit lässt sich durch Behandlung der Materialien mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) erzielen. Man gibt dazu 1l Wasser, 1ml DEPC und die zu reinigenden Utensilien in einen Behälter, inkubiert diesen über Nacht und autoklaviert die Lösung.

Methodik

Zum abgenommenen Überstand wurde nochmals 3ml Chloroform gegeben um das restliche Phenol zu binden. Die Lösung wurde geschüttelt und dann 10min bei 4°C und 4000 Umdrehungen zentrifugiert. Es bildeten sich zwei farblose Phasen, wobei die untere Chloroform und Phenolreste darstellte, die obere die RNA. Der neugewonnene Überstand wurde wieder in RNase-freie Röhrchen pipettiert und der Rest verworfen. Um die RNA auszufällen, wurde pro Tube 2,5ml Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und diese 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde 15min bei 4°C und 10000 Umdrehungen in der Ultrazentrifuge (Heraeus, Sepatech, Osterode/Harz, Deutschland) unter Verwendung des Rotors 20.16 zentrifugiert, wobei sich ein RNA-Pellet in einer wässrigen Phase bildete. Der wässrige Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in -20°C kaltem 75%igem Ethanol (Sigma, München, Deutschland) gelöst und so die RNA nochmals gewaschen und gefällt. Die so gewonnene Lösung wurde gevortext (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), 5min bei 4°C und 7500 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand schließlich abgenommen. Die Pellets wurden ca. 5min bei Raumtemperatur trocknen gelassen, sie sollten dabei jedoch nicht zu sehr austrocknen, da sie sonst nicht mehr von der Röhrchenwand lösbar sind. Die Pellets wurden dann in 500µl Aqua dest. (Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst, erneut gevortext, in Eppendorfcups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und eingefroren. Sie können bei -20°C für kurze Zeit bzw. bei -80°C für lange Zeit gelagert werden.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Um jetzt sowohl die Reinheit der isolierten RNA zu untersuchen, als auch gleichzeitig ihre Konzentration zu bestimmen, wurde eine Vermessung der Proben am Photometer (Gene Quant pro, Bio Chrom Ltd., Cambridge, England) durchgeführt.

Dazu wurden die RNA-Proben mit Aqua dest. (Braun, Melsungen, Deutschland) auf 1:50 verdünnt. Zum Nullabgleich wurde ebenfalls Aqua dest. verwendet. Die anschließende photometrische Vermessung der Absorption bei Wellenlänge 260nm gab Aufschluss über den Gehalt an RNA und bei 280nm über den Proteingehalt der untersuchten Probe. Aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260nm bzw. 280nm ergab sich ein Hinweis auf die Reinheit der Probe. Er beträgt idealerweise 1,6 – 2,0.

Methodik

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die ermittelte Absorption bei 320nm sollte idealerweise gegen null gehen und wiese sonst auf Trübungen hin.

Die absolute RNA-Konzentration der Proben bei 260nm berechnet das Photometer nach folgender Formel: $c = \text{optische Dichte} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor}$ (für RNA = 40). Die jeweils zwei gemessenen Konzentrationen pro Tier wurden gemittelt um die für die Transkription in cDNA benötigte Menge von genau 1 μ g RNA berechnen zu können.

RNA-Integritätsbestimmung

Eine RNA-Qualitätsanalyse wurde mittels eines RNA-Chip (RNA 6000 Nano assay chip, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Mikroelektrophorese, bei dem eine RNA-Standardleiter und ein Fluoreszenzmarker Aufschluss über etwaige RNA-Degradierungen geben. Gemäß Herstellerprotokoll wurden in die 12 Fächer des mit Gelmatrix beladenen Chips die RNA-Standardleiter sowie die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben pipettiert. Nach Anlegen eines Spannungsfeldes trennen sich die RNA-Fragmente ihrer Größe nach auf. Ist die RNA intakt und in genügender Menge vorhanden, bildet sich im von der Software erstellten Elektropherogramm zwei ribosomale Peaks (18sRNA und 28sRNA) sowie ein Marker-Peak (Abb. 5).

Die RNA-Fragmente wurden zudem als Gel-like Picture abgebildet. Dieses gibt eine Darstellung der Peaks als Banden wieder (Abb. 6).

Die Integrität der RNA sowie deren ausreichende Konzentration in den Proben ist Voraussetzung für die Transkription in cDNA und die nachfolgende PCR-Quantifizierung. Es wurden im Folgenden nur Proben verwendet die diesen Kriterien entsprachen.

Methodik

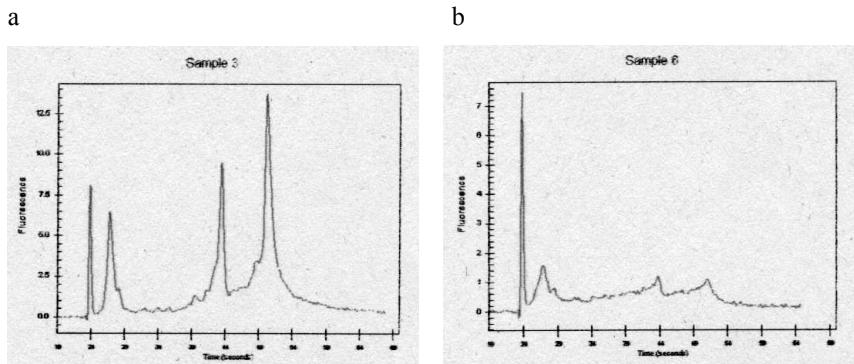


Abbildung 5

a: intake RNA: der Marker-Peak sowie die zwei ribosomalen Peaks sind gut erkennbar

b: degradierte RNA: der Marker-Peak ist vorhanden, jedoch fehlen die ribosomalen Peaks. Die RNA ist degradiert und die Probe wurde von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

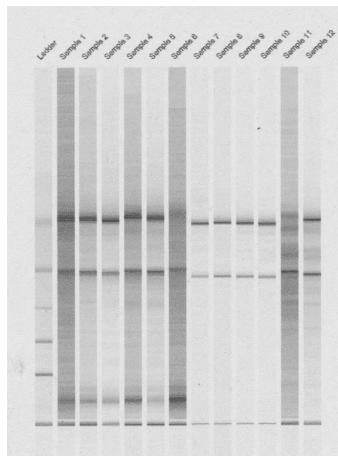


Abbildung 6 Gel-like picture der RNA-Fragmente

2.6. Real-Time Quantitative PCR zur relativen Quantifizierung sowohl der ANP- und BNP-Genexpression als auch der ETA und ETB-Rezeptorgenexpression

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion

Die PCR setzt das Einsetzen von cDNA voraus. Um cDNA zu gewinnen, wurde die RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) umgeschrieben und dabei folgendermaßen vorgegangen:

Methodik

Die photometrisch ermittelte Konzentration erlaubte die Berechnung des benötigten Probenvolumens, um genau 1 μ g RNA in ein Eppendorfcup zu überführen. Dazu gab man pro Cup 1 μ l Random Hexamer Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und füllte auf ein Endvolumen von 10 μ l mit Aqua dest. (Braun, Melsungen, Deutschland) auf. Random Primer sind Oligonukleotide (hier Hexanukleotid) und besitzen jede mögliche Kombination der Basen, was es ihnen möglich macht an alle Sequenzen eines RNA- oder DNA-Einzelstranges zu binden. So kann auch bei unbekannter Basenfolge cDNA synthetisiert werden. Die Proben wurden gevortext (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) und kurz zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren inkubierte man 3min im Heizblock (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 70°C. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt um so dem Primer die Bindung zu ermöglichen.

Entsprechend der Anzahl der Proben wurden jeweils pro Probe 4 μ l dNTP 2,5mM (Desoxynukleotidtriphosphat, enthält dATP, dGTP, dCTP, dUTP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 4 μ l fünffach RT-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 μ l RNAsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und 1 μ l Reverse Transkriptase in ein Gefäß pipettiert.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die thermolabile Reverse Transkriptase und das ebenso empfindliche RNAsin erst zum Schluss aus dem Kühlschrank entnommen und zugefügt wurden. Je 10 μ l des RT-Gemisches wurde nun zu den Proben gegeben und diese dann gevortext und kurz zentrifugiert. Dann wurde 1h bei 37°C, dem Arbeitsoptimum der Reversen Transkriptase, inkubiert und diese schließlich durch 2min bei 95°C gestoppt. Das erkaltete Endvolumen von 20 μ l wurde mit Aqua dest. auf 150 μ l aufgefüllt und die Cups mit der synthetisierten cDNA bei –80°C gelagert.

Prinzip der Real-Time Quantitive PCR

Um jetzt die Genexpression von ANP und BNP sowie ETA und ETB- Rezeptoren quantitativ zu analysieren, wird eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Hierfür wird die durch das Umschreiben aus der RNA gewonnene cDNA verwendet. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis bestimmter bekannter DNA-Sequenzen. Anfang und Ende dieser Abschnitte werden von spezifischen Primern erkannt und gebunden und durch eine DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert.

Methodik

Durch zyklische Temperaturerhöhung und -erniedrigung werden die neusynthetisierten Doppelstränge wieder voneinander getrennt und bieten so erneut Bindungsstellen für die Primer und Polymerase. Die dabei verwendete sogenannte taq-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert) besitzt ihr Aktivitätsoptimum bei ~ 94°C und hat dabei den Vorzug, nicht selbst beim Hitzedenaturierungsprozess der PCR zu zerfallen. Die Real-Time Quantitative PCR nun erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse des Amplifikationsproduktes und nutzt dafür die 5' → 3' Endonuklease-Aktivität der taq-Polymerase. Das Taqman-Prinzip ist eine der neueren und wohl bekanntesten Nachweismethoden [90]. Zusätzlich zum PCR-Ansatz wird eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugefügt. Diese besteht aus einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 3'-Ende und einem fluoreszierenden Quencherfarbstoff am 5'-Ende. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes durch den sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zum Quencher unterdrückt. Bindet nun die Sonde an die Zielsequenz, das heißt an das beobachtete Amplifikationsprodukt, greift die taq-Polymerase an und zerschneidet die Sonde durch ihre 5' → 3' Endonuklease-Aktivität. Dadurch entfernt sich der Reporterfarbstoff vom Quencher, der FRET wird unterbrochen und die Fluoreszenz des Reporters wird erhöht. Kennzeichnend für das Taqman-Prinzip ist, dass sich Reporter und Quencher auf dem selben Oligonukleotid befinden.

Entsprechend der Amplifikation des spezifischen DNA-Fragments steigt nun das Fluoreszenzsignal exponentiell an. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten C_T -Wert (threshold cycle) oder Crossing Point. Dieser gibt die Zyklenzahl an, bei der zum ersten Mal ein statistisch signifikantes Reportersignal über dem Grundrauschen detektiert wird. Je höher die Zahl der Kopien bereits zu Anfang, desto niedriger der C_T -Wert. Der C_T -Wert der gleichzeitigen Amplifikation und Detektion eines konstitutiv exprimierten Genes (weder vom Zellzyklus noch von Medikamenten wesentlich beeinflusst), eines sogenannten Housekeepers, gilt als Referenzwert (= endogene Kontrolle). Die Menge des Zielamplifikationsproduktes in Abhängigkeit zur endogenen Kontrolle dargestellt, was als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet wird.

Methodik

Durchführung

Die quantitative Real-Time-PCR der ANP-, BNP-Gene sowie ETA- und ETB-Rezeptorgene wurde unter Verwendung von Assay-on-demand premade Primern am TaqMan® (7900 HAT Sequence Detection System, Applied Biosystems, California, USA) durchgeführt, wobei 18SrRNA als Housekeeper diente. Der Reaktionsansatz bestand gemäß Protokoll aus 9 μ l cDNA, 10 μ l Qiagen Taq PCR Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie 1 μ l TaqMan® Gene Expression Assay (Primer: ETA 00561137_m1, ETB 00569139_m1, ANP 00561661_m1, BNP 00580641_m1, 18sRNA 4352656-0507004, Applied Biosystems, California, USA). Der PCR Master Mix enthält die taq-DNA-Polymerase und Basen im Überschuss. Der TaqMan® Gene Expression Assay enthält Vorwärts- und Rückwärts-Primer und die Fluoreszenzsonde. Die Proben wurden mittels Multipipette auf die MicroAmp® Optical 384-well (Applied Biosystems, California, USA) Reaktionsplatte aufgetragen. Jede Probe wurde dabei doppelbestimmt. Die Platte wurde zentrifugiert, mit einer ThermoFolie (Applied Biosystems, California, USA) verschlossen und in den TaqMan® eingelegt.

Das Programm Relative Quantification $\Delta\Delta C_T$ verlief gemäß Herstellerprotokoll (Tab. 3). Zur Auswertung wurde das Computerprogramm GeneAmp SDS 2.1. verwendet (Applied Biosystems, California, USA).

Berechnung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode stellt eine Möglichkeit der Auswertung der PCR-Amplifikation dar und basiert auf den Änderungen der C_T -Werte von endogener Kontrolle und Zielgen zueinander. Sie setzt voraus, dass die Effizienz beider Primer, also des Zielgens und der endogenen Kontrolle, ähnlich ist. Applied Biosystems garantiert in seinem Assay-on-Demand eine Effizienz seiner Primer von 100%, sodass diese Näherungsmethode angewandt werden konnte und keine Standard-Kurve mitgeführt werden musste.

Schritt 1

Der ΔC_T -Wert gibt die Expression des Zielgenes im Vergleich zum Referenzwert (hier 18srRNA) an; er ist ein relativer Wert:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{endogene Kontrolle})$$

Methodik

Schritt 2

Der $\Delta\Delta C_T$ - Wert ergibt sich schließlich aus der Subtraktion des ΔC_T -Wertes einer jeden experimentell behandelten Probe vom ΔC_T - Wert einer Probe aus der gesunden Kontrollgruppe, dem sogenannten Kalibrator:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Kalibrator}) - \Delta C_T (\text{Zielgen})$$

Schritt 3

Um nun die relative Menge des Ziel-cDNA (Calculated Value) ermitteln zu können, setzt man die Genmenge der Kalibratorprobe gleich 1. Die Amplifikationsprodukte werden so als x-fache Menge des Kalibrators ausgedrückt. Da nun die Primer, garantiert von Applied Biosystems, mit einer Effizienz von nahezu 100% funktionieren, das heißt das eine Verdopplung des Amplifikationsproduktes pro Zyklus bewirken, kann die cDNA-Menge einer jeden Probe folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Calculated Value} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Initiale Denaturierung (10min)	95° C
Amplifikation (40 Zyklen):	
Denaturierungsphase (15sec)	95° C
Primerbindungsphase (1min)	60° C
Elongationsphase (2min)	70° C

Tabelle 3 Protokoll Polymerasekettenreaktion

2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Um nun die PCR-Produkte sichtbar zu machen und um eine Abschätzung erlauben zu können, ob die Amplifikation gelungen, die Produkte die richtige Größe haben, und ob eventuell andere Sequenzen ebenfalls vervielfältigt worden sind, wurde im Anschluß an den TaqMan®-Lauf eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Methodik

Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Die durch die Gelporen aufgrund der angelegten Spannung wandernden Nukleinsäuren werden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Eine DNA-Leiter, ein Gemisch verschiedener DNA-Stränge bekannter Basenlänge, dient dabei zum Vergleich. Sichtbar gemacht durch fluoreszierendes Ethidiumbromid kann das Ergebnis unter der UV-Lampe beurteilt und fotografisch dokumentiert werden.

Durchführung

Das Agarose-Gel wurde aus 1,5g Agarose (Sigma, München, Deutschland), 2 μ l Ethidiumbromid und 100ml TBE-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Die Agaroselösung wurde 2-3min in der Mikrowelle gekocht bis die Flüssigkeit klar und durchsichtig war, danach wurde 2ml Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid ist ein hochmutagener Farbstoff, der Doppelstrang-DNA zwischen den Basenpaaren interkaliert und dort unter UV-Licht fluoresziert. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen. Nachdem das Gel fest geworden war, wurden die Proben in die Taschen aufgetragen. In die erste Tasche wurde die DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pipettiert. Zum PCR-Produkt wurden 5 μ l Loading buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und jeweils 15 μ l dieses Gemisches in die restlichen Taschen pipettiert. Dieser diente dazu, die Proben sichtbar zu machen und so den Fortschritt der Elektrophorese beurteilen zu können. Die Gelkammer wurde nun mit den Elektroden verbunden und bei 100mA für einige Zeit belassen (Abb. 7)

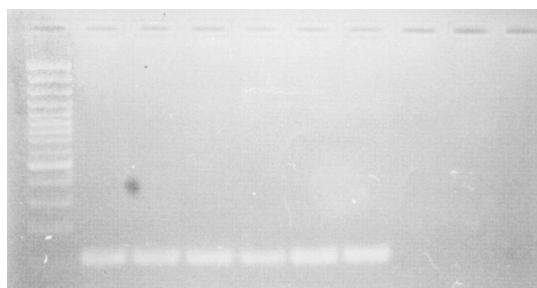


Abbildung 7 Agarose-Gelelektrophorese ANP. Die DNA-Fragmente besitzen eine Größe von 85bp

Methodik

2.8. Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Zur Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 bzw. 16.0 verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test (2-seitig) diente zur Feststellung von Unterschieden zwischen den Gruppen. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamische Messungen

Die Messung des systemischen Blutdruckes an zwei Tagen vor Trainingsende (Tag 27 und 28) zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen und lag bei durchschnittlich 108mmHg. Der RVSP am Ende der Studie war in der Bleomycingruppe signifikant höher als bei den Kontrolltieren (65mmHg bzw. 23mmHg, $p = 0,001$). Zwischen der Bleomycin- und der Bleomycin-Bosentangruppe zeigte sich ein deutlicher Trend zu niedrigeren RVSP-Werten in der Bleomycin-Bosentangruppe ab (52mmHg bzw. 65mmHg, $p = 0,095$). Der RVSP der mit Bosentan behandelten Bleomycintiere war aber ebenfalls noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe (52mmHg bzw. 23mmHg, $p = 0,01$)

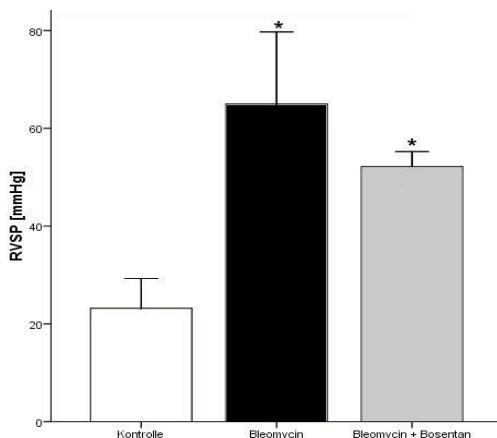


Abbildung 8 Rechtsventrikulärer systolischer Druck als Mittel \pm SD. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle

3.2. Rechtsventrikuläre Hypertrophie

Das Verhältnis des Gewichtes des rechten Ventrikels/ Gewicht Septum + linker Ventrikel als Zeichen einer rechtsventrikulären Hypertrophie war in der Bleomycingruppe signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (0,61 bzw. 0,24, $p < 0,001$). Therapie mit Bosentan von Bleomycintieren führte zu einer signifikanten Verbesserung der rechtsventrikulären Hypertrophie (0,32 bzw. 0,61, $p = 0,001$), unterschied sich jedoch noch immer signifikant von der Kontrollgruppe (0,32 bzw. 0,24, $p < 0,001$). Das Verhältnis linksventrikuläres Gewicht/ Körnergewicht zeigte

Ergebnisse

keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kontrolle: 0,014, Bleomycin: 0,013, Bleomycin-Bosentan: 0,014).

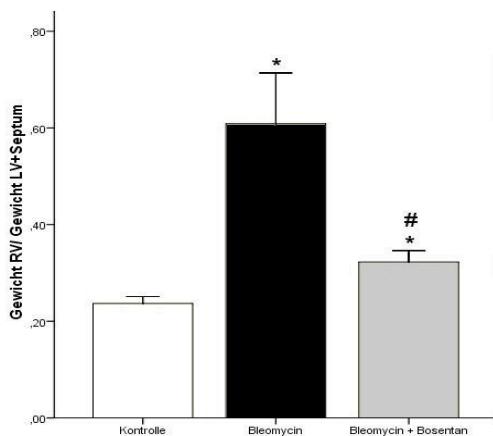


Abbildung 9 Rechtsventrikuläre Hypertrophie (Verhältnis rechtsventrikuläres Gewicht/linksventrikuläres Gewicht + Gewicht des Septums). *P < 0,05 vs. Kontrolle, #P < 0,05 vs. Bleomycin

3.3. Laminin im Herzmuskelpräparat

Das die Kardiomyozyten umgebende, immunhistochemisch angefärbte und mikroskopisch analysierte Laminin unterschied sich weder im rechten noch im linken Ventrikel in den drei Versuchsgruppen (Tab. 4).

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Bosentan
Laminindicke [µm] RV	2,52 ± 0,06	2,65 ± 0,28	2,64, ± 0,32
Laminindicke [µm] LV	2,68 ± 0,23	2,66 ± 0,36	2,75 ± 0,35

Tabelle 4 Lamininsaum RV und LV. Werte sind Mittelwerte ± SD

Ergebnisse

3.4. Die Morphometrie der Kardiomyozyten

Rechter Ventrikel

Die Bleomycingruppe wies ein signifikant höheres Kardiomyozytenvolumen auf als die Kontrollgruppe ($67632\mu\text{m}^3$ bzw. $37252\mu\text{m}^3$, $p = 0,03$) (Abb. 10). Behandlung mit Bosentan von Bleomycintieren führte zu einem Trend der Verringerung des Zellvolumens verglichen mit der Bleomycingruppe ($67632\mu\text{m}^3$ bzw. $55531\mu\text{m}^3$, $p = 0,421$). Für das größere Zellvolumen in der Bleomycingruppe war ein signifikanter Anstieg der Myozytenquerdurchmesser gegenüber der Kontrollgruppe verantwortlich ($28\mu\text{m}$ bzw. $21\mu\text{m}$, $p = 0,019$) (Abb. 11), bei unverändertem Längsdurchmesser ($91\mu\text{m}$ bzw. $88\mu\text{m}$, $p = 0,852$) (Abb. 12). Bosentangabe bei mit Bleomycin behandelten Tieren führte zu einem Trend zu kleineren rechtsventrikulären Kardiomyozytenquerdurchmesser ($p = 0,095$ vs. Bleomycingruppe) (Abb. 11). Zwischen dem Längsdurchmesser der Kardiomyozyten im RV der Kontroll- und Bleomycingruppe zeigte sich kein Unterschied ($88\mu\text{m}$ bzw. $92\mu\text{m}$, $p = 0,329$), jedoch zeigte sich ein Trend zu größeren Längsdurchmessern in der Bleomycin-Bosentangruppe ($105\mu\text{m}$ bzw. $88\mu\text{m}$, $p = 0,093$ vs Kontrolle) (Abb. 12).

Linker Ventrikel

Bleomycin führte am LV zu einem statistisch nicht signifikanten Trend zur Verkleinerung des Zellvolumens gegenüber der Kontrollgruppe ($34533\mu\text{m}^3$ bzw. $44801\mu\text{m}^3$, $p = 0,368$). In der Bleomycin-Bosentangruppe stieg die Zellgröße wieder auf etwa Ausgangsniveau ($42492\mu\text{m}^3$, $p = 0,965$ vs. Kontrolle) (Abb. 13). Längs- und Querdurchmesser zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine Zusammenfassung aller morphometrischen Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.

Ergebnisse

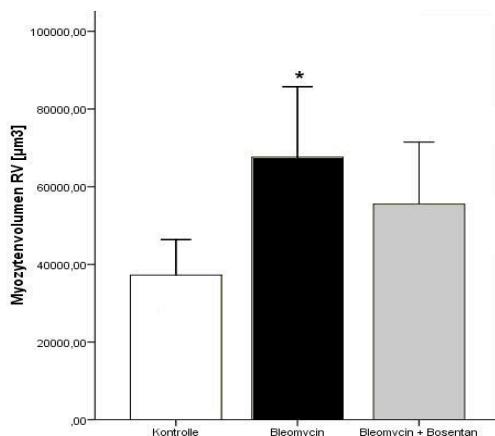


Abbildung 10 Rechtsventrikuläres Kardiomyozytenvolumen. *P < 0,05 vs. Kontrolle

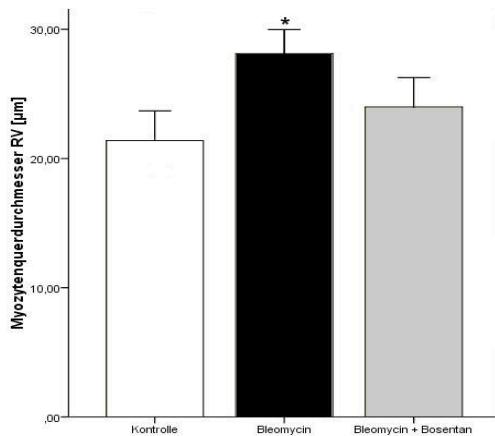


Abbildung 11 Querdurchmesser der rechtsventrikulären Kardiomyozyten. *P < 0,05 vs. Kontrolle

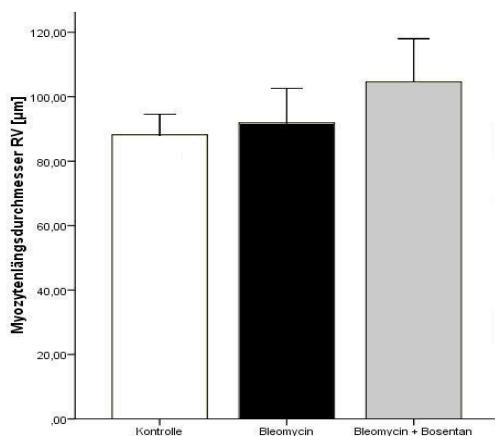


Abbildung 12 Längsdurchmesser der rechtsventrikulären Kardiomyozyten

Ergebnisse

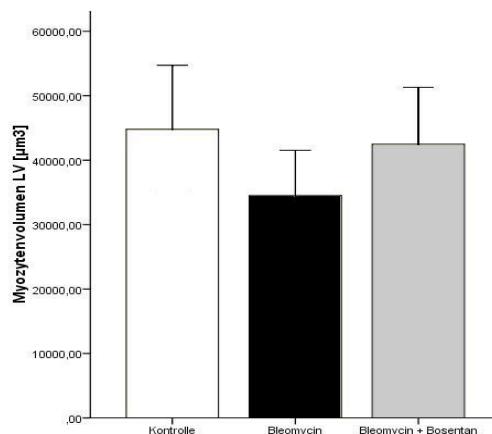


Abbildung 13 Kardiomyozytenvolumen des linken Ventrikels

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin+Bosentan
RV Myozytenquerdurchmesser [μm]	$21 \pm 3,94$	$28 \pm 2,53^*$	$24 \pm 3,07$
RV Myozytenlängsdurchmesser [μm]	$88 \pm 10,9$	$92 \pm 15,94$	$105 \pm 18,25$
RV Myozytenvolumen [μm^3]	$37252 \pm 15730,98$	$67632 \pm 24639,16^*$	$55531 \pm 21700,11$
LV Myozytenquerdurchmesser [μm]	$21 \pm 3,81$	$21 \pm 2,67$	$22 \pm 2,96$
LV Myozytenlängsdurchmesser [μm]	$107 \pm 17,4$	$93 \pm 13,82$	$103 \pm 10,99$
LV Myozytenvolumen [μm^3]	$44801 \pm 19091,13$	$34534 \pm 10413,74$	$42492 \pm 15144,33$

Tabelle 4 Kardiomyozytenmorphologie RV und LV. Werte sind Mittelwerte \pm SD
* $P < 0,05$ vs. Kontrolle

Ergebnisse

3.5. ANP-mRNA-Expression

Rechter Ventrikel

Die ANP-Genexpression war in der Bleomycingruppe 1,8-fach höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0,24$). Die Bleomycin-Bosentangruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede der ANP-Genexpression auf ($p = 0,234$ vs. Kontrolle) (Abb. 14).

Linker Ventrikel

Im Gegensatz dazu fand sich im im LV der unbehandelten Bleomycingruppe eine signifikant höhere ANP-Genexpression als in der Kontrollgruppe ($p = 0,045$). Die Bleomycin-Bosentan-Gruppe wies ebenfalls einen signifikant höheren Anstieg auf ($p = 0,019$ vs. Kontrolle bzw. $p = 0,421$ vs. Bleomycin) (Abb. 15).

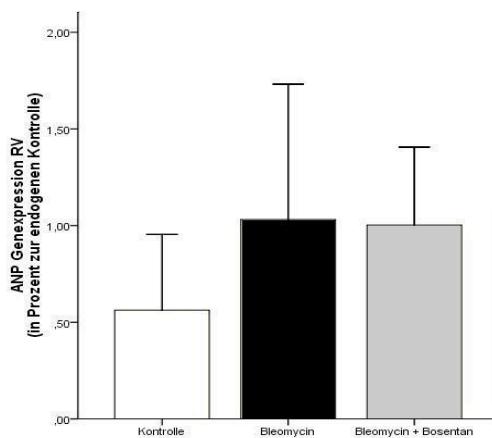


Abbildung 14 ANP Genexpression im rechten Ventrikel

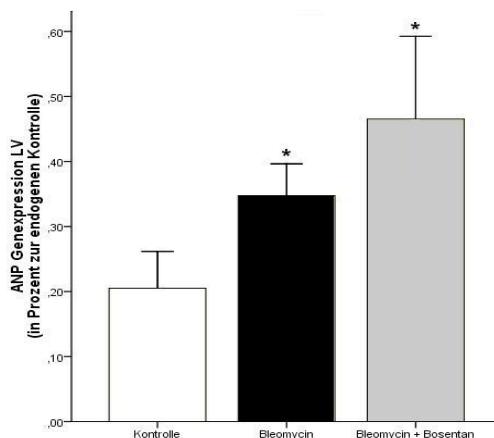


Abbildung 15 ANP Genexpression im linken Ventrikel. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle

Ergebnisse

3.6. BNP-mRNA-Expression

Rechter Ventrikel

Die Bleomycingruppe ließ einen Trend zu höherer BNP-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen (1,8-facher Anstieg, $p=0,126$), welche durch Behandlung mit Bosentan nicht signifikant abfiel ($p = 0,343$ vs. Bleomycin) (Abb. 16).

Linker Ventrikel

Die Analyse ergab einen leichten Abfall der BNP-Genexpression in der Bleomycingruppe gegenüber der Kontrolle ($p = 0,272$). Die Bleomycin-Bosentangruppe zeigte allerdings eine 1,8-fach höhere BNP-Genexpression im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ($p = 0,026$ vs. Bleomycin), welche auch gegenüber der Kontrollgruppe noch erhöht war (1,3fach, $p = 0,088$) (Abb. 17)

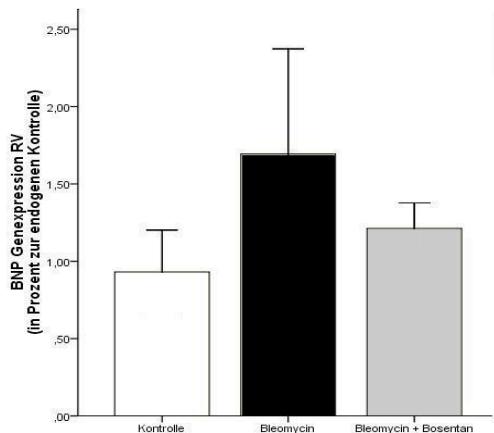


Abbildung 16 BNP Genexpression im rechten Ventrikel

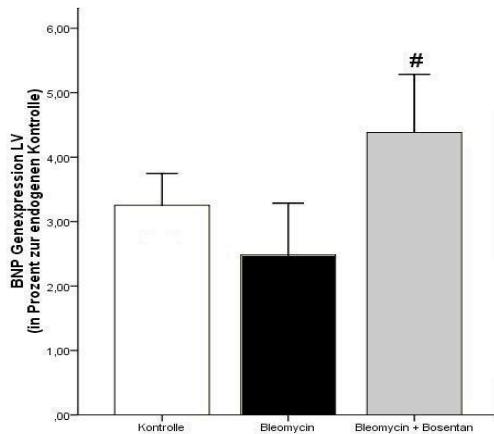


Abbildung 17 BNP Genexpression im linken Ventrikel. # $P < 0,05$ vs Bleomycin

Ergebnisse

3.7. ETA-Rezeptorgenexpression

Rechter Ventrikel

Die Bleomycingruppe wies eine gegenüber der Kontrollgruppe verminderte ETA-Rezeptorgenexpression auf. Behandlung mit Bosentan führte zu einem 1,5-fach höheren Wert der ETA-Expression im Vergleich zur Bleomycingruppe. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant ($p = 0,429$ Bleomycin vs. Kontrolle bzw. $p = 0,202$ Bleomycin+Bosentan vs. Bleomycin) (Abb. 18).

Linker Ventrikel

Hier fanden sich die niedrigsten Werte der ETA-Rezeptorgenexpression in der Bleomycin-Bosentangruppe. Auch hier waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen (Abb. 19).

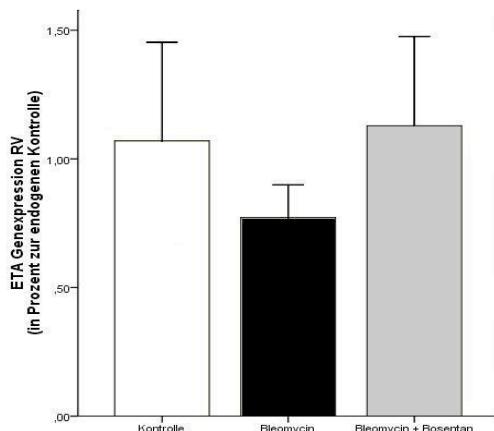


Abbildung 18 ETA Genexpression rechter Ventrikel

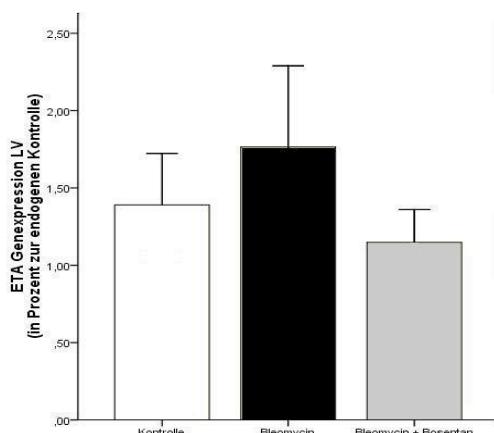


Abbildung 19 ETA Genexpression linker Ventrikel

Ergebnisse

3.8. ETB-Rezeptorgenexpression

Rechter Ventrikel

Die ETB-Rezeptorgenexpression im rechten Ventrikel von Ratten mit bleomycininduzierter PH war signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (1,6-facher Anstieg, $p = 0,009$). Behandlung der Bleomycintiere mit Bosentan führte zwar zu einem nicht signifikanten Abfall verglichen mit der Bleomycingruppe, insgesamt blieb jedoch die ETB-Rezeptorgenexpression auch nach Behandlung mit Bosentan signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p = 0,041$) (Abb. 20).

Linker Ventrikel

Es bestand kein Unterschied in der ETB-Rezeptorgenexpression zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 21).

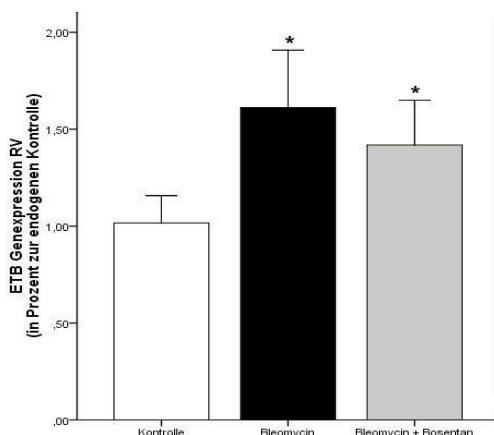


Abbildung 20 ETB Genexpression rechter Ventrikel * $P < 0,05$ vs. Kontrolle

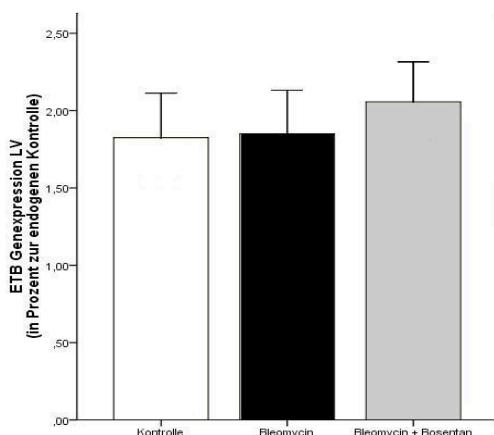


Abbildung 21 ETB Genexpression linker Ventrikel

Ergebnisse

3.9. ET-1 im Plasma am Tag 29

Die ET-1 im Plasma war mit 0,166ng/ml in der Bleomycingruppe am niedrigsten ($p = 0,01$ vs. Kontrolle, $p = 0,04$ vs. Bleomycin). Zwischen ET-1 im Plasma der Bleomycin-Bosentan-Tiere (0,317ng/ml) und der Kontrollgruppe (0,274ng/ml) zeigte sich kein Unterschied (Abb. 22).

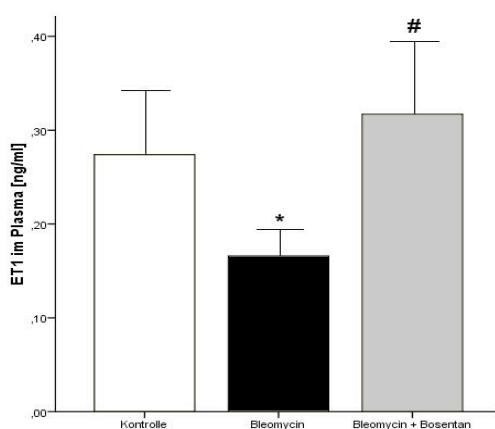


Abbildung 22 ET-1 im Plasma. Die Bleomycingruppe weist signifikant erniedrigte Plasmaspiegel auf, in der Bosentangruppe hingegen ist dieser signifikant gegenüber der Bleomycingruppe erhöht. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle, # $P < 0,05$ vs. Bleomycin

Diskussion

4. Diskussion

4.1. Rechtsherzhypertrophie und kardiales Remodelling

Nach intratrachealer Bleomycinanwendung kam es nach vier Wochen zu einer signifikanten Rechtsherzhypertrophie, gemessen am Verhältnis des Gewichtes des RV zum Gewicht des LV plus Septum, und zu einer signifikanten Erhöhung des RSVP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Behandlung von Bleomycintieren mit dem oralen, nichtselektiven Endothelinantagonisten Bosentan führte zu einer signifikanten Reduktion rechtsventrikulärer Hypertrophie ($p < 0,005$) und zu einem Trend im Abfall des RVSP.

Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die an anderen PH-Modellen eine Abschwächung einer schweren PH durch Endothelinrezeptorblockade zeigten [91-106]. Die vorliegende Studie ist die erste, die eine positive Wirkung nichtselektiver Endothelinblockade auf Rechtsherzhypertrophie im Modell der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose und pulmonaler Hypertonie nachweist.

Die rechtsventrikuläre Hypertrophie bei den Bleomycintieren war gekennzeichnet durch eine signifikante Erhöhung des Myozytenvolumens, bedingt durch eine signifikante Zunahme des Querdurchmessers bei unverändertem Längsdurchmesser. Dies wurde bereits in anderen Tiermodellen beobachtet. Eine Studie zu rechtsventrikulärem Kardiomyozytenremodelling bei Ratten mit chronischer rechtsventrikulärer Druckbelastung durch Ligatur der Pulmonalarterie fand, wie die vorliegende Arbeit, einen erhöhten Querdurchmesser bei unverändertem Längsdurchmesser der Kardiomyozyten [107]. Auch eine Studie an Katzen mit rechtsventrikulärer Druckbelastung zeigte ein erhöhtes Myozytenvolumen durch erhöhten Myozytenquerdurchmesser [108]. Irlbeck et al. fanden in einer Studie an Ratten mit hypoxieinduzierter pulmonaler Hypertonie ebenfalls ein erhöhtes rechtsventrikuläres Myozytenvolumen, sowie eine vergrößerte Zellquerschnittsfläche bei unveränderter Zelllänge [109]. Eine neuere Studie zum rechtsventrikulären Remodelling bei chronischer Rechtsherzbelastung mit Übergang zu Rechtsherzinsuffizienz bediente sich des Modells der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Während Messungen in Woche 2 keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben, waren in Woche 5 das Myozytenzellvolumen und die Querschnittsfläche signifikant gegenüber

Diskussion

der Kontrollgruppe erhöht. In Woche 7 schließlich war zusätzlich der Längsdurchmesser erhöht. Diese Beobachtung trat zeitgleich mit klinischen Zeichen des Rechtsherzversagens wie systemische Ödeme und Aszites auf, welche nach 7 Wochen erstmals festgestellt wurden [110].

Gerdes et al. untersuchten Myozyten des linken Ventrikels spontan hypertensiver Ratten bei linksventrikulärer Hypertrophie und Übergang zu Herzinsuffizienz. Sie demonstrierten dabei eine erhöhte Querschnittsfläche der linksventrikulären Myozyten in der hypertrophischen Phase. Das klinische Stadium der Linksherzinsuffizienz war durch die Erhöhung des Längsdurchmessers und Myozytenvolumens bei gleichbleibender Querschnittsfläche gekennzeichnet [51].

Diese Beobachtungen decken sich mit denen der vorliegenden Studie. Konzentrische Hypertrophie führt zu einer Erhöhung der Wanddicke des Ventrikels und gewährleistet, gemäß des Gesetzes von Laplace, eine Aufrechterhaltung der Auswurfleistung bei chronischer Druckbelastung, bis sich die Zellen irreversibel verlängern und so zu exzentrischer Hypertrophie und Ventrikeldilatation führen. Bis zum Erreichen dieses irreversiblen Stadiums ist bei Verbesserungen der Hämodynamik umgekehrtes Remodelling und Verbesserung der Pumpleistung möglich. So kam es beispielsweise in einer Studie von 17 Patienten nach Lungentransplantation zu einer signifikant besseren RV-Funktion [111]. Es ist somit anzunehmen, dass der rechte Ventrikel der pulmonalhypertensiven Ratten in der vorliegenden Studie eine kompensatorische Rechtsherzhypertrophie ohne Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz aufwies.

Behandlung mit Bosentan führte zu einer signifikanten Abnahme des rechtsventrikulären Gewichts bei verbesserten rechtsventrikulären Druckverhältnissen, gemessen an einem Trend zu niedrigeren RVSP-Werten. Der rechtsventrikuläre Myozytenquerdurchmesser nahm nach Bosentangabe ebenfalls ab, blieb dabei jedoch knapp unter statistischem Signifikanzniveau ($p = 0,095$). Das Zellvolumen und der Längsdurchmesser blieben unbeeinflusst.

Die Wirkung Bosentans auf die Kardiomyozytenmorphologie im rechten Ventrikel bei PF mit PH ist bisher noch nicht erforscht. In einer Studie an Hunden mit Linksherzinsuffizienz führte Bosentan zu signifikant reduziertem endsystolischen und enddiastolischem Volumen sowie einem Trend zu erhöhter Ejektionsfraktion.

Diskussion

Histomorphometrisch fand diese Studie eine vergrößerte Myozytenquerschnittsfläche im insuffizienten LV, die durch Bosentan signifikant verkleinert wurde [112]. Dieses signifikante Ergebnis war nach dreimonatiger Versuchsdauer erzielt worden. Die Messungen der vorliegenden Studie wurden nach vier Wochen Bosentangabe durchgeführt. Eventuell hätte eine längere Versuchsdauer möglicherweise ebenfalls zu signifikant verkleinertem Myozytenvolumen und -durchmesser geführt.

Im linken Ventrikel war ein umgekehrter Trend zu beobachten. So führte Bleomycingabe und somit pulmonale Hypertonie tendenziell zu kürzeren Längsdurchmessern der Herzmuskelzellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Bosentangabe hatte keine Auswirkung auf den Längsdurchmesser. Es war auch keine Beeinflussung des Myozytenvolumens oder der Zellquerdurchmesser weder durch Induktion einer pulmonalen Hypertonie mit Bleomycin noch durch Bosentanbehandlung nachzuweisen. Eine Studie aus dem Jahr 2006 von Lourenço et al., die Untersuchungen sowohl rechtem als auch linkem Ventrikel bei MCT-induzierter PH der Ratte vornahmen, führte zu Beobachtungen am rechten Ventrikel, die sich mit den Ergebnissen dieser Studie decken. Auch sie fanden erhöhten RVSP, erhöhtes Verhältnis RV Gewicht/ Körperegewicht sowie größere Myozytenquerdurchmesser im RV. Neben diesen Befunden entdeckten sie jedoch auch signifikant abnormale LV Kontraktilitäts- und Relaxationindices bei nicht hypertrophiertem LV und unverändertem Zellquerdurchmesser der Myozyten [113]. Diese und noch andere Studien zeigen eine Mitbeteiligung des LV bei PH [114]. Auch die vorliegenden Studie liefert durch die Beobachtung der Abnahme der linksventrikulären Zelllängsdurchmesser bei Reduktion des rechtsventrikulären Druckes Hinweise auf eine solche Mitbeteiligung des LV bei PH, auch wenn darauf hingewiesen werden muss, dass nur ein statistisch nicht signifikanter Trend gefunden wurde. Da wir keine Funktionsanalyse des LV vornahmen, ist nicht bekannt in wieweit der Trend zu kürzeren Myozytenlängsdurchmessern Auswirkung auf Kontraktilität, Relaxationszeit und andere Funktionsparameter hatte.

Kardiales Remodelling ist, neben Kardiomyoztenhypertrophie, gekennzeichnet durch Fibroblastenaktivierung, Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine und inadequates vaskuläres Wachstum [115, 116, 117], welches irreversibel sein kann. Die Veränderung

Diskussion

der Myozytenmasse und die progressive fibrotische Umwandlung gesunden Herzmuskelgewebes führt letztlich zur Einschränkung der Kontraktilität [118]. Die signifikante Reduktion der RV-Hypertrophie durch Bosentan bei Verbesserung der pulmonalen Hypertonie die hier und in zahlreichen anderen Modellen experimenteller PH gefunden wurde, liegt demnach in der vorliegenden Studie, bei gleichbleibendem Zellvolumen, möglicherweise eher in einer Massenreduktion der extrazellulären Matrix begründet als in einer Reversion der Kardiomyozytenhypertrophie. Dieses ließe sich durch die Blockierung der profibrotischen Eigenschaften des Endothelins am Herzen erklären.

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus zwei strukturell unterschiedlichen Entitäten zusammen, der Basalmembran und dem Netzwerk aus Kollagen und elastischen Fasern. Laminin stellt dabei einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran dar. Um das Verhalten der kardialen extrazellulären Matrix bei bleomycininduzierter pulmonaler Hypertonie zu untersuchen, bestimmten wir die Breite des Lamininsaumes um die Kardiomyozyten. Der Lamininsaum zeigte jedoch in unserer Studie sowohl keine Unterschiede in der Dicke zwischen den einzelnen Gruppen, als auch keine Unterschiede zwischen den Ventrikeln. In früheren Studien konnte eine Zunahme extrazellulärer Matrixproteine sowohl bei Linksherzhypertrophie [119] als auch Rechtsherzhypertrophie bei hypoxieinduzierter pulmonaler Hypertonie [56] nachgewiesen werden. Im Rahmen kardialen Remodellings findet durch Fibroblastenaktivierung eine Erhöhung der Kollagensynthese statt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Lamininsynthese, weder im hypertrophierten rechten noch im linken Ventrikel. Dies widerspricht früheren Studien, die Hinweise auf erhöhte Lamininsynthese im Rahmen kardialer Fibrose lieferten. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch weder die Laminingenexpression, noch der totale Anteil Laminins im Herzmuskelgewebe gemessen, sondern nur der immunhistochemisch angefärbte, die Myozyten direkt umgebende Saum. Laminin wurde jedoch im fibrotischen Herzen bei dilatativer Kardiomyopathie nicht nur im Endomysium und als Saum um Myozyten gemessen, sondern auch als Bestandteil von fibrotischen Foci [120]. Es ist somit nicht auszuschließen, dass Laminin sehr wohl vermehrt synthetisiert wurde, dies jedoch durch die Messmethodik nicht erfasst wurde.

Diskussion

Die Gruppe mit bleomycininduzierter pulmonaler Hypertonie wies signifikante rechtsventrikuläre Hypertrophie durch signifikant größeres Myozytenvolumen auf. Dies spricht für eine Aktivierung des hypertrophen Genprogrammes und würde auch eine erhöhte EZM-Synthese vermuten lassen, welche in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte. Der Grund hierfür könnte in einer gesteigerten Kollagensynthese liegen, welche in dieser Studie, die nur Laminin analysierte, nicht erfasst wurde.

Wahrscheinlich trägt sowohl die Blockierung der profibrotischen ET-1-Wirkung, als auch die Verbesserung der rechtsventrikulären Belastung zur Reduktion interstitieller Fibrose bei. Sowohl selektiver ETA- als auch dualer ET-Rezeptorantagonismus ist dabei in der Lage, rechtsventrikuläre Hypertrophie zu reduzieren.

4.2. Ventrikuläre Genexpressionsanalyse

ETA- und ETB-Rezeptorgenexpression

In der vorliegenden Studie führte chronische Rechtsherzbelastung durch pulmonale Hypertonie bei bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose zu einer signifikant erhöhten Expression von ETB-Rezeptoren im rechten Ventrikel ($p < 0,005$ vs. Kontrolle). Diese signifikant erhöhte Expression blieb unbeeinflusst durch duale Endothelinrezeptorblockade mit Bosentan. Im linken Ventrikel zeigten sich keine Unterschiede der ETB-Rezeptorgenexpression zwischen den Behandlungsgruppen. Die ETA-Rezeptorgenexpression hingegen wurde weder im rechten Ventrikel noch im linken Ventrikel durch Bleomycin- oder Bosentanbehandlung beeinflusst und blieb gegenüber der Kontrolle unverändert.

Die profibrotische Wirkung des Endothelinsystems bei Linksherzinsuffizienz wurde bereits untersucht [121]. Dies ist die erste Studie, die das Verhalten kardialer ET-Rezeptoren am Modell der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose und pulmonaler Hypertonie analysiert. Li et al. maßen im rechten Ventrikel von Ratten mit hypoxieinduzierter pulmonaler Hypertonie sowohl erhöhte ETA- als auch ETB-Genexpression [122]. Im Monocrotalin-Modell der PH wurde eine erhöhte Dichte von ETB-Rezeptoren im hypertrophierten rechten Ventrikel, jedoch nicht im linken Ventrikel beobachtet, bei gänzlich unbeeinflussten ETA-Rezeptoren. Die Gabe eines selektiven ETA-Rezeptorinhibitors führte im Trend zur Abnahme der ETB-Rezeptorendichte am rechten Ventrikel [99]. Die beiden Studien miteinander zu

Diskussion

vergleichen, ist jedoch aufgrund des Unterschiedes im Modell des Versuches und der pharmakologischen Intervention nicht unproblematisch. ET-Rezeptorgenexpression und ET-Rezeptorproteinlevel müssen außerdem nicht unbedingt korrelieren, da Induktion der Genexpression durch das Mitwirken posttranskriptionaler Regulationsmechanismen nicht immer auch zur Synthese des Endproteins führt.

In einem weiteren Versuch führte MCT-induzierte pulmonale Hypertonie ebenfalls zu signifikant höherer Genexpression sowohl des ETB-Rezeptors, aber auch des ETA-Rezeptors im rechten Ventrikel verglichen mit Kontrolle und linkem Ventrikel [123]. Nagendran et al. wiederum fanden eine erhöhte rechtsventrikuläre Genexpression für ETA-Rezeptoren sowohl bei Ratten mit monocrotalininduzierter rechtsventrikulärer Hypertrophie als auch Patienten mit Rechtsherzhypertrophie, jedoch keine Beeinflussung der myokardialen ETB-Rezeptoren [124].

Das Endothelinsystem ist bei Myokardhypertrophie verschiedenster Genese aktiviert. Die veränderte Expression der ET-Rezeptoren scheint sich dabei den belasteten rechten Ventrikel zu beschränken. Auch in oben genannten Studien zu Rechtsherzbelastung blieben die ET-Rezeptoren des linken Ventrikels gänzlich unbeeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit dieser Beobachtung in Übereinstimmung.

Auf Kardiomyozyten und intramyokardialen Gefäßen dominiert unter physiologischen Umständen der ETA-Rezeptor [44, 45]. Die erhöhte ETB-Rezeptorgenexpression im belasteten rechten Ventrikel in der vorliegenden Studie könnte somit als Kompensationsmechanismus des aktivierten ET-Systems zu verstehen sein und eventuell von protektiver Bedeutung sein. Ob die Erhöhung der rechtsventrikulären ETB-Genexpression ein spezifischer Befund des Bleomycinmodells ist, bleibt noch zu evaluieren.

Das Trainingsprogramm der Ratten darf zudem auch hier nicht außer Acht gelassen werden. Physiologische Myokardhypertrophie durch Schwimmtraining bei Ratten führte zu veränderter ET-1-Expression am Herzen verglichen mit untrainierten Ratten [125], eine Beobachtung, die vermuten lässt, dass auch in der vorliegenden Arbeit das kardiale ET-System durch das Leistungstraining zumindest partiell beeinflusst worden ist. Um ein besseres Verständnis für das Verhalten der myokardialen ET-Rezeptoren im

Diskussion

Bleomycinmodell zu gewinnen, müsste das Experiment ohne Leistungstraining durchgeführt werden.

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP

Im rechten Ventrikel stieg die ANP-Genexpression nach Induktion pulmonaler Hypertonie an, erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz ($p = 0,240$). Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik und signifikante Reduktion rechtsventrikulärer Hypertrophie durch den dualen ETA/ETB-Rezeptorantagonist Bosentan hatte keinen Einfluss auf die ANP-Genexpression. Die BNP-Genexpression des rechten Ventrikels stieg wie die ANP-Genexpression in der Bleomycingruppe auch nur in nicht signifikanter Weise an, und Bosentanbehandlung führte ebenfalls nicht zu einer Senkung der BNP-Expression.

Die natriuretischen Peptide sind Teil des fetalnen Genprogrammes des Herzens, das in pathologischen Belastungszuständen reaktiviert wird [64]. Es gibt zahlreiche Studien zum Verhalten der Genexpression der natriuretischen Peptide im linken Ventrikel und ihrer Plasmakonzentration. Die rechtsventrikuläre Genexpression ist weniger gut untersucht, jedoch weiß man, dass auch Rechtsherzbelastung zu erhöhten NP-Plasmaspiegeln führt [66].

Studien zur Genexpression bei Rechtsherzbelastung zeigten eine Steigerung der ANP-Genexpression bei sowohl akuter Rechtsherzbelastung als auch Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie nach drei Wochen normobarischer Hypoxie [56].

Versuche mit hypobarischer Hypoxie führten zu sowohl rechts- als auch linksventrikulär gesteigerter ANP-Expression und BNP-Expression [126-129]. Versuche zu experimenteller pulmonaler Hypertonie mit Monocrotalin zeigten einen Anstieg rechtsventrikulärer ANP-Genexpression [101]. In einer anderen Studie war sowohl die rechtsventrikuläre ANP- als auch BNP-Genexpression höher als in der Kontrollgruppe. Die rechtsventrikuläre Expression von ANP war dabei größer als die linksventrikuläre ANP-Expression, während sich die BNP-Genexpression nicht zwischen den Ventrikeln unterschied [123]. Lourenço et al. wiesen wiederum nur erhöhte BNP-Genexpression im rechten, nicht jedoch im linken Ventrikel bei MCT-induzierter pulmonaler Hypertonie nach [113].

Die Datenlage bleibt insgesamt spärlich und es gibt nach bestem Wissen des Autors keine Arbeit über das Verhalten der ventrikulären ANP- und BNP-Expression bei

Diskussion

bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie. In der vorliegenden Studie wurde weder signifikant erhöhte ANP- noch BNP-Genexpression im belasteten rechten Ventrikel nachgewiesen. Trotz signifikanter Rechtsherzbelastung, gemessen an erhöhtem RVSP und signifikanter Rechtsherzhypertrophie, stieg die Genexpression nicht wie erwartet an und widerspricht so früheren Studienergebnissen zu Rechtsherzbelastung. Der fehlende Anstieg der ANP- und BNP-Genexpression im druckbelasteten rechten Ventrikel könnte ein Hinweis auf nicht ausreichend lange Versuchsdauer sein. Der Schweregrad der pulmonalen Hypertonie in der vorliegenden Studie war hoch und vergleichbar mit Studien mit MCT-induzierter PH [96, 98].

Ein Einfluss des körperlichen Trainingsprogrammes der Ratten kann ebenfalls wieder nicht ausgeschlossen werden. Eine frühere Studie wies einen Abfall zirkulierenden ANPs bei körperlicher Betätigung bei unveränderter ventrikulärer Genexpression nach [130]. In einer anderen Studie an spontanhypertensiven Ratten führte körperliches Training zu verminderter Expression von BNP und anderen hypertrophieassoziierten Genen am linken Ventrikel [131]. Es ist bekannt, dass neurohumorale Mechanismen auch auf den nicht betroffenen Ventrikel wirken können [113]. Auch wenn in den Trainingsepisoden vor Allem der linke Ventrikel physiologisch belastet wurde, kann deshalb ein Einfluss auf das rechte Herz nicht vollkommen ausgeschlossen werden, sei es durch signifikante Ruhebradykardie in den Trainingspausen oder genannte neurohumorale Einflüsse. Der nicht signifikante Anstieg der ANP- und BNP-Genexpression im rechten Ventrikel könnte somit zumindest partiell durch das Trainingsprogramm begründet sein. Der Nettoeinfluss des Trainings ist jedoch nur schwer quantifizierbar, da alle drei Gruppen dem Trainingsprogramm unterworfen waren und somit komparative Tests nicht möglich sind. Es wäre wünschenswert, den Versuch zu bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose und pulmonale Hypertonie mit längerer Versuchsdauer und ohne den wahrscheinlich verfälschenden Einfluss körperlichen Trainings zu wiederholen, und die rechtsventrikuläre ANP- und BNP-Genexpressionsanalyse unter neuen Bedingungen durchzuführen.

Da es zu keiner signifikant erhöhten rechtsventrikulären NP-Genexpression kam, blieb auch die Behandlung mit Bosentan ohne Senkung der ANP- sowie BNP-Expression. In einer anderen Studie war ein selektiver ETA-Antagonist in vitro in der Lage, die ANP- und BNP-Expression zu unterdrücken [132]. In vivo konnte jedoch konnte auch im

Diskussion

MCT-Modell nichtselektive ET-Blockade mit Bosentan trotz verbesserten RVSP die erhöhte rechtsventrikuläre ANP- und BNP-Genexpression nicht senken [113]. Bosentan war ebenfalls nicht in der Lage, die erhöhte ANP und BNP-Genexpression im rechten und linken Ventrikel von herzinsuffizienten Ratten zu senken [133]. Dies spricht dafür, dass ET-Blockade *in vivo* nur einen geringen Einfluss auf die Genexpression der natriuretischen Peptide spielen dürfte.

Im linken Ventrikel stieg die ANP-Genexpression bei pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie jedoch interessanterweise signifikant an. Bosentangabe in Gruppe 3 erhöhte die ANP-Genexpression in nicht signifikanter Weise weiter.

Die linksventrikuläre BNP-Genexpression fiel in der Bleomycingruppe leicht und nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab. Bosentanbehandlung bewirkte jedoch einen signifikanten Anstieg verglichen mit der Bleomycingruppe ($p = 0,026$ vs. Bleomycin). Gegenüber der Kontrollgruppe erreichte dieser Anstieg nicht ganz statistische Signifikanz ($p = 0,088$ vs. Kontrolle). Bereits frühere Studien zu experimenteller pulmonaler Hypertonie fanden ebenfalls eine gesteigerte BNP-Expression am nichtbeteiligten linken Ventrikel [123]. Das Verhalten der gesteigerten NP-Synthese im linken Ventrikel unter nichtselektiver ET-Blockade ist jedoch nicht leicht zu erklären. Es fand sich kein erhöhtes linksventrikuläres Gewicht in Gruppe 2 oder 3, im Gegensatz zur signifikanten Rechtsherzhypertrophie. Zahlreiche frühere Studien identifizierten ET-1 als Aktivator myokardialer NP-Expression [65]. Der ETA-Rezeptor scheint bei der Stimulation der NP-Genexpression eine Rolle zu spielen und seine Blockade senkte nicht nur die rechtsventrikuläre ANP-Genexpression [101], sondern führte *in vitro* führte auch zu verminderter ANP sowie BNP-Sekretion [132]. In der vorliegenden Studie wies die Bosentangruppe zwar signifikant höhere ET-1-Plasmakonzentrationen auf die Bleomycingruppe, dieses dürfte jedoch durch die komplett ET-Blockade ohne Einfluss geblieben sein, und der Anstieg der NP-Expression kann nicht mit der erhöhten ET-1-Konzentration begründet werden. Warum die ANP-Expression im linken Ventrikel in der Bleomycingruppe signifikant anstieg, kann ebenfalls nicht befriedigend durch das Endothelinsystem erklärt werden, da hier zwar keine ET-Blockade vorlag, die ET-1-Plasmakonzentration jedoch signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe.

Diskussion

Es wird allgemein angenommen, dass das fetale Genprogramm des Herzens und somit auch die ventrikuläre NP-Synthese nur bei pathologischer und nicht physiologischer Belastung reaktiviert wird [64]. Der Einfluss des vierwöchigen Trainingsprogrammes mit intermittierender linksventrikulärer Belastung der Ratten aller drei Gruppen darf jedoch auch hier diskutiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass körperliche Belastung bei vorliegender rechtsventrikulärer Dysfunktion, eventuell durch neurohumorale Regulationsmechanismen, in der Lage ist im linken Ventrikel pathologisch gesteigerte NP-Synthese zu induzieren. Bereits Lourenço et al. postulierten eine wahrscheinlich neurohumoral induzierte Mitbeteiligung des linken Ventrikels bei PH [113]. Es ist vorstellbar, dass das körperliche Training und das dadurch aktivierte sympathoadrenerge System [134] zur Beeinflussung der Genexpression im linken Ventrikel führten. Da sich jedoch die LV ANP- und BNP-Genexpression in der Bleomycingruppe gegensätzlich verhielten, müssen noch andere Mechanismen beteiligt sein. Weitere Studien müssen folgen, die den Einfluss selektiver oder nichtselektiver ET-Blockade auf das NP-System, sowie den Einfluss körperlichen Trainings unter ET-1-Blockade zu untersuchen. Bisher spricht die Datenlage für einen geringen Einfluss einer kompletten Endothelinblockade auf die kardiale NP-Genexpression. Dies ist zudem die einzige Studie, die die Genexpression der natriuretischen Peptide am Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose mit pulmonaler Hypertonie untersucht und weitere Studien, die sich des selben Modells bedienten, wären wünschenswert.

Endothelin-1 im Plasma

In der vorliegenden Arbeit führte die Induktion pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie zu einer signifikanten Abnahme der ET-1-Konzentration im Plasma an Tag 29 verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,01$). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Studien zur ET-1-Plasmakonzentration bei pulmonaler Hypertonie und auch pulmonaler Fibrose. Patienten mit primärer oder sekundärer pulmonaler Hypertonie wiesen erhöhte Plasma Endothelin-1- Level auf [135, 136]. Ein Anstieg von zirkulierendem und ET-1 konnte auch bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose nachgewiesen werden [32]. Studien zu experimenteller pulmonaler Hypertonie am Tiermodell zeigten ähnlich erhöhte Plasmakonzentrationen [93, 137-140].

Diskussion

Mehrfache Messungen des der ET-1-Plasmakonzentration anstelle der nur einmaligen Bestimmung an Tag 29 hätten eventuell Belege für diese Hypothese geliefert und eventuell nur initial erhöhte und später abfallende, oder undulierende, Plasmaspiegel gezeigt.

Es ist unwahrscheinlich, dass die signifikant höhere ETB-Rezeptorgenexpression des rechten Ventrikels in der Bleomycingruppe zur Senkung des ET-1-Plasmaspiegels beigetragen haben könnte. Der ETB-Rezeptor gilt zwar neben seiner vasodilatierenden Funktion als Endothelin-Clearance-Rezeptor. Der größte Anteil des Clearanceprozesses durch ETB-Rezeptoren scheint allerdings in der Lungenstrombahn stattzufinden [141], die kardialen ETB-Rezeptoren dürften hierbei nur eine marginale Rolle spielen. Eine einmalige Passage durch die Lungenstrombahn entfernt bereits ungefähr 50% des zirkulierenden ET-1 [141].

Die Behandlung der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose mit Bosentan führte im Gegensatz dazu zu einem Anstieg des ET-1 im Plasma. Es ist bekannt, dass die Blockade von ETB-Rezeptoren die Clearance von ET-1 in der Lunge verzögert und somit zu erhöhten ET-1-Plasmaspiegeln führt [141-143]. Die Beobachtung, dass Plasma ET-1 nach Bosentangabe ansteigt, deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie durch Hill et al im MCT-Modell [96] und Hiramoto et al. an einer Gruppe von 7 PAH Patienten [144], was mit der Blockade des Clearancerezeptors ETB zu begründen sein dürfte. Selektive ETA-Blockade führt dagegen nicht zu erhöhten ET-1-Plasmaspiegeln [103].

Nach bestem Wissen des Authors liegt außer der vorliegenden keine weitere Studie zum Verhalten von Plasma-ET-1 im Bleomycinmodell der Ratte und deren Behandlung mit Bosentan vor. Sie zeigt als erste erniedrigte Endothelinplasmaspiegel bei pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie durch Bleomycin. Nichtselektive Endothelinrezeptorblockade führte zu signifikant erhöhten ET-1-Plasmakonzentrationen, vermutlich durch Blockade der ETB-Rezeptoren.

5. Zusammenfassung

Die idiopathische Lungenfibrose ist eine fortschreitende Erkrankung, für die es derzeit keine wirksame Therapie gibt und die nach durchschnittlich drei bis vier Jahren nach Diagnosestellung tödlich endet. Endothelin-1 übernimmt eine Schlüsselrolle nicht nur im Pathomechanismus der Fibrose als auch Ausbildung pulmonaler Hypertonie durch seine proliferativen, hypertrofischen und vasokonstriktiven Eigenschaften [145]. Bosentan, ein oral anwendbarer, nichtselektiver Endothelinantagonist, der bereits bei PAH erfolgreich eingesetzt wird, stellt aufgrund seiner Blockadewirkung auf das Endothelinsystem auch bei IPF einen potentiellen Therapieansatz dar. Besondere Relevanz könnte dieses Medikament bei der Behandlung von IPF mit PH gewinnen. Zahlreiche präklinische Studien bewiesen das antfibrotische Potential der Endothelinantagonisten [38, 146], und klinische Studien untersuchen bereits Bosentan bei IPF am Menschen. Es gibt jedoch noch keine Studien, die sich mit den Auswirkungen des nichtselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan bei pulmonaler Fibrose mit sekundärer pulmonaler Hypertonie auseinandersetzen.

Wir bedienten uns des Modelles der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose mit pulmonaler Hypertonie der Ratte, um die Auswirkungen einer Therapie mit Bosentan auf kardiales Remodelling, ANP- und BNP-Rezeptorgenexpression sowie ET-Rezeptorgenexpression zu analysieren.

Pulmonale Fibrose durch Bleomycin führte zu signifikanter pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie. Behandlung mit Bosentan verbesserte die pulmonale Hypertonie und war außerdem in der Lage, die rechtsventrikuläre Hypertrophie signifikant zu reduzieren. Rechtsherzbelastung durch pulmonale Hypertonie führte zu signifikanter Myozytenhypertrophie am rechten Ventrikel in einer Weise, die mit den Ergebnissen anderer Studien zu Myokardhypertrophie übereinstimmt. Bosentanbehandlung führte nicht zur Verkleinerung der hypertrophierten Myozyten trotz reduzierter Rechtsherzbelastung.

Unerwarteterweise führte pulmonale Hypertonie im Bleomycinmodell nicht zur Induktion der Genexpression der natriuretischen Peptide am hypertrophierten rechten Ventrikel. Diesem könnte eine zu kurze Versuchsdauer zu Grunde liegen. Die Genexpression des ETB-Rezeptors im rechten Ventrikel in der unbehandelten

Zusammenfassung

Bleomycingruppe war signifikant erhöht, was auf eine Aktivierung des rechtsventrikulären Endothelinsystems bei bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose mit pulmonaler Hypertonie hinweist. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine kompensatorisch erhöhte Expression, was entweder mit der Funktion des ETB-Rezeptors als Clearancerezeptor zu begründen oder als ein weiterer Beleg für eine anderweitig protektive Funktion zu verstehen sein könnte.

Bosentan stellt einen vielversprechenden Therapieansatz der idiopathischen pulmonalen Fibrose dar, deren Behandlung bis heute mehr als unbefriedigend ist. Die vorliegende Studie liefert erste Hinweise auf einen günstigen Einfluss Bosentans auf den belasteten rechten Ventrikel bei bleomycininduzierter pulmonaler Fibrose und pulmonaler Hypertonie der Ratte. Die klinische Relevanz der gefundenen Ergebnisse muss mit weiteren präklinischen Studien sowie Studien an Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose mit pulmonaler Hypertonie weiter evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Reeves, J.T., B.M. Groves, and D. Turkevich, *The case for treatment of selected patients with primary pulmonary hypertension*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(2): p. 342-6.
2. Selman, M., T.E. King Jr, and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-151.
3. Du Bois, R.M., *Blocking endothelin: Breaking new ground*. Eur Respir Rev, 2007. **16**(102): p. 24-29.
4. Winkler, M.K. and J.L. Fowlkes, *Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(1): p. L1-11.
5. Raghu, G., et al., *Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(7): p. 810-6.
6. American Thoracic Society. *Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 646-64.
7. Bjoraker, J.A., et al., *Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 199-203.
8. King Jr, T.E., et al., *Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(1): p. 1171-81.
9. D'Alonzo, G.E., et al., *Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry*. Ann Intern Med, 1991. **115**(5): p. 343-9.
10. Eaton, T., et al., *Six-minute walk, maximal exercise tests: reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(10): p. 1150-7.
11. Hallstrand, T.S., et al., *The timed walk test as a measure of severity and survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2005. **25**(1): p. 96-103.

Literaturverzeichnis

12. Lama, V.N., et al., *Prognostic value of desaturation during a 6-minute walk test in idiopathic interstitial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(9): p. 1084-90.
13. Miyamoto, S., et al., *Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 487-92.
14. Nathan, S.D., P.W. Noble, and R.M. Tuder, *Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: connecting the dots*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(9): p. 875-80.
15. Hickey, K.A., et al., *Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells*. Am J Physiol, 1985. **148**(5 Pt 1): p. C550-6.
16. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
17. Levin, E., *Endothelins*. New Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 356-363.
18. Wagner, O.F., et al., *Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16066-16068.
19. Ishikawa, T., et al., *Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes*. Circ Res, 1991. **69**(4): p. 918-926.
20. Kelso, E.J., et al., *EndothelinA Receptor Subtype Mediates Endothelin-Induced Contractility in Left Ventricular Cardiomyocytes Isolated from Rabbit Myocardium*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(3): p. 1047-1052.
21. Marsault, R., E. Feolde, and C. Frelin, *Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta*. Am J Physiol, 1993. **264**(3 Pt 1): p. C687-93.
22. Ohlstein, E.H., et al., *The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis*. Eur J Pharmacol, 1992. **225**(4): p. 347-350.
23. Ozaki, S., et al., *ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(2): p. 483-489.

Literaturverzeichnis

24. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. New Engl J Med, 1993. **328**(24): p. 1732-9.
25. Michel, R.P., D. Langleben, and J. Dupuis, *The endothelin system in pulmonary hypertension*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(6): p. 542-54.
26. Channick, R.N., et al., *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1119-23.
27. Galiè, N., et al., *Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **371**(9630): p. 2093-100.
28. Rubin, L., et al., *Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension*. New Engl J Med, 2002. **346**(12): p. 896-903.
29. Liu, C. and J. Chen, *Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension*. 2006, The Cochrane Collaboration. p. CD004434.
30. Ryu, Y.J., et al., *Bronchoalveolar lavage in fibrotic idiopathic interstitial pneumonias*. Respir Med, 2007. **101**(3): p. 655-60.
31. Trakada, G., et al., *Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep*. Sleep breath, 2003. **7**(3): p. 111-8.
32. Uguccioni, M., et al., *Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Pathol, 1995. **48**(4): p. 330-4.
33. Hocher, B., et al., *Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(1): p. 19-26.
34. Cambrey, A.D., et al., *Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(4): p. 439-45.
35. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis*. Lancet, 1993. **342**(8860): p. 1550-4.
36. Saleh, D., et al., *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. **16**(2): p. 187-93.
37. Mutsaers, S.E., et al., *Increased Endothelin-1 and Its Localization during the Development of Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(5): p. 611-9.

Literaturverzeichnis

38. Park, S.H., et al., *Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 600-8.
39. Wendel, M., et al., *Localization of endothelin receptors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(5): p. 507-517.
40. Gunther, A., et al., *Safety and tolerability of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis: an open label study*. Eur Respir J, 2007. **29**(4): p. 713-9.
41. King Jr, T.E., et al., *BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **117**(1): p. 75-81.
42. Shubeita, H.E., et al., *Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy*. J Biol Chem, 1990. **165**(33): p. 20555-62.
43. Wei, C.M., et al., *Endothelin in human congestive heart failure*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1580-6.
44. Molenaar, P., et al., *Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium*. Circ Res, 1993. **72**(3): p. 526-38.
45. Davenport, A.P., G. O'Reilly, and R.E. Kuc, *Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type*. Br J Pharmacol, 1995. **114**(6): p. 1110-6.
46. Davenport, A.P., et al., *Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridisation, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle*. J Cardiovasc Pharmacol, 1993. **22**: p. S22-5.
47. Kobayashi, T., et al., *Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. H1197-206.
48. Morawietz, H., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy prevents upregulation of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(5): p. 1057-61.

Literaturverzeichnis

49. Zolk, O., et al., *Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2118-23.
50. Pasumarthi, K.B. and L.J. Field, *Cardiomyocyte cell cycle regulation*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1044-54.
51. Gerdes, A., et al., *Myocyte remodeling during the progression to failure in rats with hypertension*. Hypertension, 1996. **28**(4): p. 609-14.
52. Wakatsuki, T., J. Schlessinger, and E.L. Elson, *The biochemical response of the heart to hypertension and exercise*. Trends Biochem Sci., 2004. **29**(11): p. 609-17.
53. Takuwa, N., et al., *A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7856-61.
54. Colognato, H. and P.D. Yurchenco, *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 213-34.
55. Libby, R.T., et al., *Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins*. J Neurosci, 2000. **20**(17): p. 6517-28.
56. Pfeifer, M., et al., *ANP gene expression in rat hearts during hypoxia*. Pflugers Arch, 1997. **434**(1): p. 63-9.
57. Schwarz, A., et al., *Tissue-dependent expression of matrix proteins in human endothelin-1 transgenic mice*. Clin Sci (Lond), 2002. **103 Suppl 48**: p. 39S-43S.
58. de Bold, A.J., et al., *A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats*. Life Sci, 1981. **28**(1): p. 89-94.
59. Kawanga, K. and H. Matsuo, *Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP)*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **118**(1): p. 131-9.
60. Schweitz, H., et al., *A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (Dendroaspis angusticeps)*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 13928-32.
61. Sudoh, T., et al., *A new natriuretic peptide in porcine brain*. Nature, 1988. **332**(6159): p. 78-81.
62. Munagala, V.K., J.C. Burnett, Jr., and M.M. Redfield, *The natriuretic peptides in cardiovascular medicine*. Curr Probl Cardiol, 2004. **29**(12): p. 707-69.

Literaturverzeichnis

63. Gardner, D.G., *Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy?* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(9): p. 411-6.
64. Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend, *Molecular regulation of cardiac hypertrophy.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2023-39.
65. Yap, L., *B-type natriuretic Peptide and the right heart.* Heart Fail Rev, 2004. **9**(2): p. 99-105.
66. Yap, L.B., et al., *The natriuretic peptides and their role in disorders of right heart dysfunction and pulmonary hypertension.* Clin Biochem, 2004. **37**(10): p. 847-56.
67. Nishikimi, T., N. Maeda, and H. Matsuoka, *The role of natriuretic peptides in cardioprotection.* Cardiovasc Res, 2006. **69**(2): p. 318-28.
68. de Lemos, J.A., D.K. McGuire, and M.H. Drazner, *B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease.* Lancet, 2003. **362**(9380): p. 316-22.
69. Maisel, A.S., et al., *Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure.* New Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 161-7.
70. Stein, B.C. and R.I. Levin, *Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease.* Am Heart J, 1998. **135**(5 Pt 1): p. 914-23.
71. Wang, T.J., et al., *Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death.* New Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 655-63.
72. Richards, A.M., et al., *B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction.* Circulation, 2003. **107**(22): p. 2786-92.
73. Leuchte, H.H., et al., *Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension.* J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(5): p. 764-70.
74. Nagaya, N., et al., *Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension.* Circulation, 2000. **102**(8): p. 865-70.
75. Wiedemann, R., et al., *Atrial natriuretic peptide in severe primary and nonprimary pulmonary hypertension: response to iloprost inhalation.* J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(4): p. 1130-6.
76. Leuchte, H.H., et al., *Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(4): p. 360-5.

Literaturverzeichnis

77. Song, J.W., J.K. Song, and D.S. Kim, *Echocardiography and brain natriuretic peptide as prognostic indicators in idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Med, 2009. **103**(2): p. 180-6.
78. Redondo, J., J.E. Bishop, and M.R. Wilkins, *Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(7): p. 1455-62.
79. Tamura, N., et al., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4239-44.
80. Knowles, J.W., et al., *Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(8): p. 975-84.
81. Holtwick, R., et al., *Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1399-407.
82. Patel, J.B., et al., *Cardiac-specific attenuation of natriuretic peptide A receptor activity accentuates adverse cardiac remodeling and mortality in response to pressure overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(2): p. H777-84.
83. Barbee, R.W., et al., *Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor*. Circ Res, 1994. **74**(4): p. 747-51.
84. Steinhelper, M.E., K.L. Cochrane, and L.J. Field, *Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes*. Hypertension, 1990. **16**(3): p. 301-7.
85. Potter, L.R., et al., *Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 341-66.
86. Moore, B.B. and C.M. Hogaboam, *Murine models of pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(2): p. L152-60.
87. Umezawa, H., et al., *New antibiotics, bleomycin A and B*. J Antibiot (Tokyo), 1966. **19**(5): p. 200-9.
88. Blum, R.H., S.K. Carter, and K. Agre, *A clinical review of bleomycin--a new antineoplastic agent*. Cancer, 1973. **31**(4): p. 903-14.

Literaturverzeichnis

89. Chaudhary, N.I., A. Schnapp, and J.E. Park, *Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(7): p. 769-76.
90. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
91. Chen, S.J., et al., *Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats*. J Appl Physiol, 1995. **79**(6): p. 2122-31.
92. Chen, S.J., et al., *The orally active nonpeptide endothelin A-receptor antagonist A-127722 prevents and reverses hypoxia-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in Sprague-Dawley rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1997. **29**(6): p. 713-25.
93. DiCarlo, V.S., et al., *ETA-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 1): p. L690-697.
94. Eddahibi, S., et al., *Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats*. Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 2): p. H828-35.
95. Haleen, S., et al., *Efficacy of CI-1020, an endothelin-A receptor antagonist, in hypoxic pulmonary hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31 Suppl 1**: p. S331-5.
96. Hill, N.S., et al., *Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. J Appl Physiol, 1997. **83**(4): p. 1209-15.
97. Ichikawa, K.I., et al., *Endogenous endothelin-1 mediates cardiac hypertrophy and switching of myosin heavy chain gene expression in rat ventricular myocardium*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1286-91.
98. Jasmin, J.F., et al., *Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2001. **103**(2): p. 314-8.
99. Jasmin, J.-F., P. Cernacek, and J. Dupuis, *Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension*:

Literaturverzeichnis

- response to chronic ETA receptor blockade.* Clin Sci (Lond), 2003. **105**(6): p. 647-653.
100. Lucas, M., J.F. Jasmin, and J. Dupuis, *Effect of ET(A) receptor antagonist on pulmonary hypertension and vascular reactivity in rats with congestive heart failure.* Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(4): p. 307-14.
101. Miyauchi, T., et al., *Endothelin-1 and right-sided heart failure in rats: effects of an endothelin receptor antagonist on the failing right ventricle.* J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **36**(5 Suppl 1): p. S327-30.
102. Nishida, M., et al., *Roles of endothelin ETA and ETB receptors in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension.* J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **44**(2): p. 187-91.
103. Prie, S., et al., *The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats.* J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(3): p. 1312-8.
104. Tilton, R.G., et al., *Attenuation of pulmonary vascular hypertension and cardiac hypertrophy with sitaxsentan sodium, an orally active ET(A) receptor antagonist.* Pulm Pharmacol Ther, 2000. **13**(2): p. 87-97.
105. Ueno, M., et al., *Endothelin-A-receptor antagonist and oral prostacyclin analog are comparably effective in ameliorating pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats.* J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **36**(5 Suppl 1): p. S305-10.
106. Underwood, D.C., et al., *Effect of SB 217242 on hypoxia-induced cardiopulmonary changes in the high altitude-sensitive rat.* Pulm Pharmacol Ther, 1999. **12**(1): p. 13-26.
107. Olivetti, G., et al., *Cellular basis of wall remodeling in long-term pressure overload-induced right ventricular hypertrophy in rats.* Circ Res, 1988. **63**(3): p. 648-57.
108. Tritthart, H., et al., *Right ventricular hypertrophy in the cat--an electrophysiological and anatomical study.* J Mol Cell Cardiol, 1975. **7**(3): p. 163-74.

Literaturverzeichnis

109. Irlbeck, M., et al., *Effects of angiotensin II receptor blockade on hypoxia-induced right ventricular hypertrophy in rats*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(11): p. 2931-9.
110. Minami, S., et al., *Myocyte morphological characteristics differ between the phases of pulmonary hypertension-induced ventricular hypertrophy and failure*. Int Heart J, 2006. **47**(4): p. 629-37.
111. Rensing, B., et al., *Right and left ventricular remodeling after orthotopic single lung transplantation for end-stage emphysema*. J Heart Lung Transplant, 1997. **16**(9): p. 926-33.
112. Mishima, T., et al., *Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 222-9.
113. Lourenço, A.P., et al., *Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1587-94.
114. Xie, G., et al., *Assessment of left ventricular diastolic function after single lung transplantation in patients with severe pulmonary hypertension*. Chest, 1998. **114**(2): p. 477-81.
115. Catalucci, D., et al., *Physiological myocardial hypertrophy: how and why?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 312-24.
116. Barbone, A., et al., *Comparison of right and left ventricular responses to left ventricular assist device support in patients with severe heart failure: a primary role of mechanical unloading underlying reverse remodeling*. Circulation, 2001. **104**(6): p. 670-5.
117. Kucuker, S.A., et al., *Evidence of improved right ventricular structure after LVAD support in patients with end-stage cardiomyopathy*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(1): p. 28-35.
118. Jalil, J., et al., *Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle*. Circ Res, 1989. **64**(6): p. 1041-1050.
119. Kim, S., et al., *Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **273**(1): p. 509-15.

Literaturverzeichnis

120. Nogami, K., et al., *Extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. Immunohistochemical study of endomyocardial biopsy specimens*. Jpn Heart J, 1996. **37**(4): p. 483-94.
121. Rothermund, L., et al., *Endothelin-A receptor blockade prevents left ventricular hypertrophy and dysfunction in salt-sensitive experimental hypertension*. Circulation, 2002. **106**(18): p. 2305-8
122. Li, H., et al., *Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung*. Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 1): p. L553-60.
123. Ueno, M., et al., *Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. R1321-30.
124. Nagendran, J., et al., *Endothelin receptor inhibitors decrease contractility in the hypertrophied right ventricle: direct clinical implications for patients with pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2008. **118**: p. S_446-S_447.
125. Miyauchi, T., et al., *Expression of endothelin-1 mRNA in the heart of pathological hypertrophy or physiological hypertrophy (abstract)*. Jpn Circ J, 1997. **61**: p. 579.
126. Hill, N.S., et al., *Brain natriuretic peptide: possible role in the modulation of hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. L308-15.
127. McKenzie, J.C., et al., *Alterations in atrial and plasma atrial natriuretic factor (ANF) content during development of hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat*. Proc Soc Exp Biol Med, 1986. **181**(3): p. 459-63.
128. Nakanishi, K., et al., *Changes in atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide associated with hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 808-17.
129. Stockmann, P.T., et al., *Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia*. Circ Res, 1988. **63**(1): p. 207-13.
130. Azizi, C., et al., *Alterations in atrial natriuretic peptide gene expression during endurance training in rats*. Eur J Endocrinol, 1995. **133**(3): p. 361-5.
131. Lee, Y.I., et al., *Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis*. Eur J Appl Physiol, 2006. **97**(2): p. 216-24.

Literaturverzeichnis

132. Harada, M., et al., *Interaction of myocytes and nonmyocytes is necessary for mechanical stretch to induce ANP/BNP production in cardiocyte culture*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31 Suppl 1**: p. S357-9.
133. Oie, E., et al., *ET-receptor antagonism, myocardial gene expression, and ventricular remodeling during CHF in rats*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 2): p. H868-77.
134. Christensen, N.J. and H. Galbo, *Sympathetic nervous activity during exercise*. Annu Rev Physiol, 1983. **45**: p. 139-53.
135. Dupuis, J., et al., *Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension*. Am Heart J, 1998. **135**(4): p. 614-620.
136. Stewart, D., et al., *Increased plasma endothelin in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?* Ann Intern Med, 1991. **114**(6): p. 464-9.
137. Blumberg, F.C., et al., *Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(1): p. 171-7.
138. Lee, J.H., et al., *Pathogenic role of endothelin 1 in hemodynamic dysfunction in experimental acute pulmonary thromboembolism*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(7): p. 1282-7.
139. Takahashi, T., et al., *Endothelin converting enzyme inhibitor protects development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Life Sci, 1998. **63**(10): p. PL137-43.
140. Zamora, M.R., et al., *Overexpression of endothelin-1 and enhanced growth of pulmonary artery smooth muscle cells from fawn-hooded rats*. Am J Physiol, 1996. **270**(1 Pt 1): p. L101-9.
141. Dupuis, J., C.A. Goresky, and A. Fournier, *Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors*. J Appl Physiol, 1996. **81**(4): p. 1510-5.
142. Goddard, J., et al., *Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade*. Circulation, 2004. **109**(9): p. 1186-93.

Literaturverzeichnis

143. Reinhart, G.A., et al., *Hypertension induced by blockade of ET(B) receptors in conscious nonhuman primates: role of ET(A) receptors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1555-61.
144. Hiramoto, Y., et al., *Effect of bosentan on plasma endothelin-1 concentration in patients with pulmonary arterial hypertension*. Circ J, 2007. **71**(3): p. 367-369.
145. King, T.E., Jr., *Bosentan for idiopathic pulmonary fibrosis*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(11): p. 1171-9.
146. Shi-Wen, X., et al., *Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2707-19.

Abkürzungsverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANP	Atrial natriuretic peptide
Aqua dest.	Aqua destillata
BNP	B-type natriuretic peptide
BUILD	Bosentan Use in Interstitial Lung Disease (Studie)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNP	C-type natriuretic peptide
C _T	Threshold Cycle
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejection fraction
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ET	Endothelin
ET-1 – 4	Endothelin 1 – 4
ETA	Endothelin A
ETB	Endothelin B
EZM	Extrazelluläre Matrix
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GTC	Guanidinisothiocyanat
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
I.P.	Intraperitoneal
IPF	Idiopathische Lungenfibrose

Abkürzungsverzeichnis

I.V.	Intravenös
LV	Linker Ventrikel
MCT	Monocrotalin
NO	Stickoxid
NP	Natriuretische Peptide
NPR-A	Natriuretic peptide receptor-A
NPR-B	Natriuretic peptide receptor-B
NPR-C	Natriuretic peptide receptor-C
NSS	Normal swine serum
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF	Pulmonale Fibrose
PH	Pulmonale Hypertonie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAsin	RNAse-Inhibitor
RT	Reverse Transkriptase
rtu	Ready to use
RV	Rechter Ventrikel
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck
SA-HRP	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase
SBD	Systolischer Blutdruck
S.C.	Subkutan
6MWT	6-Minuten-Gehtest
TGF β	Tumorwachstumsfaktor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UIP	Usual interstitial pneumonia
UV	Ultraviolett

Danksagung

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Pfeifer für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor ganz herzlich danken. Ich möchte mich vor Allem für die äußerst kompetente, reibungslose und durchwegs angenehme Betreuung meiner Arbeit sehr bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Stephan Schroll für seine fachliche und praktische Betreuung während der gesamten Dauer des Projektes. Ohne seinen kompetenten Beistand in allen Phasen der Arbeit und vor Allem die konstruktive Kritik und Diskussion der Resultate gen Ende der Arbeit wäre ihre Fertigstellung nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an die formidable Daniela Sebah, für die Einführung in die Geheimnisse experimenteller Forschung und ihre unentbehrliche (auch seelische) Unterstützung bei der Durchführung sämtlicher Versuche. Ihre Kompetenz war beeindruckend, ihr Wille und Disziplin eisern, ihre Energie ansteckend. War auch die Bezeichnung "Lieblingsdoktorandin" nicht ganz exklusiv mir zugeteilt, ihr Humor und ihr Witz waren stets treibende Kraft. Zusammen mit dem restlichen Team der Forschungsgruppe Pulmonale Hypertonie machte sie meine Zeit im Labor unvergesslich. Danke Euch allen.

Danke meiner Schwester Anne dafür, dass sie Knurps ist. Möge sie ausserdem die unerforschte Welt der Kupfergemälde bald in ganz neues Licht tauchen!

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Oma für ihr liebes, nie müde werdendes, wahrhaftiges Interesse an meinem Leben.

Last but not least, vielen lieben Dank an meine Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglichten, immer für mich da sind, mich immer in all meinen Plänen und Vorhaben unterstützten, und ihren unermüdlichen Finger in der "Wunde" bis an den lang ersehnten Tag des Abschlusses dieser Arbeit.