

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN
PROF. DR. L. MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

THERAPIE MIT DEM HMG-CoA-REDUCTASE-HEMMER SIMVASTATIN
BEI LUNGENFIBROSE UND PULMONALER HYPERTONIE
IM BLEOMYCIN-TIERMODELL DER RATTE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Heinz Lehmann

2014

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Pfeifer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2014

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung
 - 1.1 Definition Pulmonale Hypertonie bei idiopathischer Lungenfibrose
 - 1.2 Pathogenese PH bei IPF
 - 1.3 Statine - eine neue medikamentöse Option zur Behandlung einer PH bei IPF
 - 1.3.1 Statine und IPF
 - 1.3.2 Statine und PH
 - 1.4 Ziel der Arbeit

2. Methodik
 - 2.1 Tierexperimentelle Versuchsphase
 - 2.1.1 Tierhaltung und Gruppeneinteilung
 - 2.1.2 Induktion der Lungenfibrose
 - 2.1.3 Medikamentöse Behandlung
 - 2.1.4 Laufbandbelastungstest
 - 2.1.4.1 Versuchsaufbau
 - 2.1.4.2 Laufbandaufbau
 - 2.1.4.3 Trainingsprogramm
 - 2.1.4.4 Abbruchkriterien
 - 2.1.4.5 Ermittlung der Ausgangsleistung und Leistungsabnahme
 - 2.1.4.6 Berechnung
 - 2.1.5 Hämodynamische Messung
 - 2.1.5.1 Blutdruckmessung
 - 2.1.5.2 Rechtsventrikulärer Druck
 - 2.1.6 Blutentnahme
 - 2.1.7 Organentnahme
 - 2.1.7.1 Durchführung
 - 2.2 Plasmabestimmung BNP
 - 2.2.1 Plasmagewinnung
 - 2.2.2 Prinzip
 - 2.2.3 Durchführung
 - 2.2.4 Berechnung
 - 2.3 Genexpressionsanalyse
 - 2.3.1 RNA-Isolation
 - 2.3.2 RNA Konzentrationsbestimmung
 - 2.3.3 cDNA-Synthese
 - 2.3.4 Taqman
 - 2.4 Quantifizierung der Fibrose
 - 2.4.1 Hydroxyprolinbestimmung
 - 2.5 Statistische Auswertung

- 3. Ergebnisse
 - 3.1 Belastungstest
 - 3.2 Endgewicht
 - 3.3 Hämodynamische Messungen
 - 3.3.1 Arterieller systolischer Blutdruck
 - 3.3.2 Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck
 - 3.4. Herzquotientbestimmung
 - 3.4.1 Verhältnis des rechten Ventrikels zum Gesamtkörpergewicht
 - 3.4.2 Verhältnis des linken Ventrikels zum Gesamtkörpergewicht
 - 3.5 BNP-Plasmabestimmung
 - 3.6 BNP-Genexpressions-Analyse Pulmonale Hypertonie
 - 3.6.1 Quantifizierung der BNP Genexpression des Herzens mittels Taqman-Technologie
 - 3.7 Quantifizierung der Lungenfibrose mittels ctgf-Expression
 - 3.7.1 ctgf-Expression Herz
 - 3.7.2 ctgf-Expression Lunge
 - 3.8 Quantifizierung der Fibrose anhand des Hydroxyprolinegehaltes
 - 3.8.1 Hydroxyprolinegehalt Lunge
 - 3.8.2 Hydroxyprolinegehalt Herz
 - 3.8.2.1 Hydroxyprolinegehalt linker Ventrikel
 - 3.8.2.2 Hydroxyprolinegehalt rechter Ventrikel
- 4. Diskussion
- 5. Abkürzungsverzeichnis
- 6. Literaturverzeichnis
- 7. Abbildungsverzeichnis
- 8. Publikation
- 9. Danksagung
- 10. Lebenslauf

1. Definition

1.1 Idiopathische Lungenfibrose und Pulmonale Hypertonie

Die Gruppe der interstitiellen Lungenkrankheiten gliedert sich auf in eine Gruppe von Lungenerkrankungen mit variablen Ausprägungen von Lungengewebsentzündungen unbekannter Ätiologie, die über einen Verlauf von Monaten bis Jahren zu einer Fibrosierung des Lungengewebes führen. Die idiopathische Lungenfibrose stellt die häufigste Form der interstitiellen Lungenerkrankungen dar und gleichzeitig diejenige mit der schlechtesten Prognose. Auch bekannt als kryptogen fibrosierende Alveolitis ist sie definiert als eine spezifische Form der chronisch-fibrosierenden Pneumonie, deren histologisches Bild in der Lungenbiopsie dem der gewöhnlichen interstitiellen Pneumonie entspricht. Die Bezeichnung „idiopathisch“ beschreibt zwar, dass der Auslöser und die Ursache der Erkrankung letztendlich nicht bekannt sind, dennoch handelt es sich dabei um eine fest umschriebene Krankheitsentität, deren Diagnose durch charakteristische klinische, histopathologische, radiologische und funktionsanalytische Befunde sichergestellt werden kann. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass eine Pulmonale Hypertonie häufig im Rahmen einer IPF auftritt. In einer Studie wurden bei Rechtsherzkatheteruntersuchungen an einer Kohorte von an unterschiedlichen ILE erkrankten Patienten bei 31,8 % der Untersuchten ein signifikant erhöhter pulmonalarterieller Mitteldruck (>35 mmHg) gefunden (1). Nach neuester Definition gilt bei einer IPF ein pulmonalarterieller Mitteldruck von >25 mmHg in Ruhe bei gleichzeitig normwertigem pulmonalkapillärem Verschlussdruck (PCWP <15 mmHg) als manifeste PH (2). Das Vorliegen einer PH bei IPF verschlechtert die Prognose und ist mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (4, 5, 6). Es zeigte sich zudem eine Korrelation des pulmonalarteriellen Mitteldruckes mit dem Mortalitätsrisiko der untersuchten Patienten (7, 8).

1.2 Pathogenese PAH bei IPF

Obwohl die Pathogenese der IPF noch nicht geklärt werden konnte, wird angenommen, dass eine verstärkte Ausschüttung verschiedenartiger Wachstumsfaktoren wie keratinozyte-growth-factor, transforming-growth-factor α , transforming-growth-factor β , insulin-like growth-factor-1, platelet-derived growth-factors, fibroblast growth-factor und hepatocyt growth-factor zugrunde liegt. Dies führt zu einer Proliferation von Fibroblasten, die sich zu Myofibroblasten entwickeln und dadurch eine erhöhte Kollagenanlagerung verursachen. Dieser Prozess scheint die Entstehung einer idiopathischen Lungenfibrose massgeblich zu bedingen (9, 10, 11). Der transforming growth factor beta (tgf- β) ist dabei ein pluripotenter Wachstumsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Entstehung einer IPF spielt. Experimentell konnte durch eine Antagonisierung dieses Wachstumsfaktors die Entwicklung einer Gewebsfibrose erheblich eingedämmt werden (12).

Obwohl die komplette Blockierung von $\text{tgf-}\beta$ in einer weiteren Studie bei Mäusen zum Tode durch eine progrediente Entzündung führt (13), zeigten sich in einer weiteren Langzeit-Studie keine signifikanten Störungen des Immunsystems (14). Eine experimentell herbeigeführte Überexpression von $\text{tgf-}\beta 1$ führte zu einer progressiven Fibrose (15). $\text{tgf-}\beta$ scheint einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung der Myofibroblasten zu haben:

Es induziert die Expression von α -smooth-muscle-Aktin durch Fibroblasten im normalen Lungengewebe und steigert deren Kontraktilität (16). Gleichzeitig verhindert es die durch Interleukin-1 stimulierte Apoptose von Myofibroblasten (17). Viele seiner Effekte werden vermittelt durch ein Zusammenwirken mit connective tissue growth factor (ctgf), einem weiteren profibrotischen Wachstumsfaktor (18). ctgf führt zu einer massiven Fibroblastenproliferation, einer Differenzierung von Fibroblasten in profibrogene Myofibroblasten und zu einer erhöhten Ansammlung extrazellulärer Matrix (19, 20).

ctgf ist hochreguliert bei Patienten mit IPF und in Bleomycin-behandelten Versuchstieren (21, 22, 23). Zahlreiche der beschriebenen Zytokine (pdgf, ctgf, $\text{tgf-}\beta 1$) werden sowohl bei der Entstehung der IPF, als auch bei der PH ausgeschüttet und sind entscheidend für verschiedenartige Mechanismen der Proliferation von Fibroblasten und der glatten Gefäßmuskelzellen, sowie für die Anhäufung extrazellulärer Matrix an den pulmonalen Gefäßen.

$\text{tgf-}\beta$ ist ein bei der Entstehung beider Pathologien vorkommender Signalgeber. Das vaskuläre Remodeling bei der Entstehung einer PH scheint daher auch einer eingeschränkten Funktion des $\text{tgf-}\beta$ als Signalgeber geschuldet zu sein (24). pdgf ist ein weiteres Zytokin mit profibrotischen Eigenschaften, das sowohl bei der Entstehung der IPF als auch der PH vermehrt ausgeschüttet wird (25, 26, 27). Ferner kommt es nach einer Aktivierung der 5-Lipoxygenase zu einer vermehrten Produktion profibrotischer Leukotriene durch inflammatorische Zellen. Diese Leukotriene sind die Ursache für eine gesteigerte Expression bestimmter Mediatoren wie $\text{tnf-}\alpha$, pdgf und Fibroblast-growth-factor, deren Zusammenwirken zu einer Fibrosierung der Lunge und einem vaskulären Remodeling an den pulmonalen Gefäßen führt (28).

Darüber hinaus ist Endothelin-1 (ET1) ein Schlüsselmolekül in der Pathogenese einer PH bei IPF. Es steigert die pulmonalarterielle Vasokonstriktion und induziert das Wachstum pulmonaler arterieller smooth-muscle cells (29). Es zeigte sich eine gesteigerte ET1- und ET-converting-enzyme-Expression bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose im Vergleich zu gesunden Patienten (30, 31). Die ET1-Level bei Patienten mit IPF korrelieren zudem direkt mit dem jeweils festgestellten pulmonalarteriellen Druck und reziprok mit dem gemessenen arteriellen Sauerstoffgehalt (32). ET1 scheint außerdem profibrotische Eigenschaften zu haben, die es zu einem wertvollen Ziel einer therapeutischen Intervention machen (33).

1.3 Statine - eine neue medikamentöse Option zur Behandlung einer PAH bei IPF

1.3.1 Statine und IPF:

Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, auch Statine genannt, sind aufgrund ihrer pleiotropen Effekte auf das kardiovaskuläre System, die wie bekannt über eine bloße Cholesterinsenkung hinausgehen, seit längerem ein beliebtes Forschungstool. Frühere Studien mit Fibroblasten-Zellkulturen zeigten einen antiproliferativen Effekt von HMG-CoA-Reductase-Inhibitoren, begleitet von einer Herunterregulierung von ctgf (34, 35, 36). Sie konnten eine Regression der kardialen Hypertrophie und Fibrose in transgenetischen Kaninchen mit menschlicher hypertropher Kardiomyopathie induzieren (37). Darüber hinaus vermindern Statine die Expression von entscheidenden profibrogenen Schlüsselenzymen wie dem tgf- β -1 in den Glomeruli und in mesangialen Zellen von diabetischen Ratten (38, 39). Ein großer Teil der positiven Effekte der Statine besteht in einer Hemmung der Expression von ctgf, einem autokrinen Wachstumsfaktor. Dessen Expression korreliert nachweislich mit Grad und Ausprägung von fibrosierenden Erkrankungen von Lunge (40), Niere (41) und Leber (42). ctgf bewirkt nach Induktion durch tgf- β -1 eine gesteigerte Zell-Proliferation, Kollagen-Deposition, Angiogenese und eine Fibroblasten-Differenzierung zu einem profibrogenen Myofibroblasten-Phänotyp. Diese Effekte sind überwiegend verantwortlich für das übersteigerte vaskuläre Remodeling und die Krankheitsentstehung einer IPF (43). Es ist bekannt, dass der Rho-Signalweg durch eine Behandlung mit Simvastatin unterbrochen wird und gewisse Rho-Signalmechanismen die ctgf-tgf- β -1-Interaktion modulieren können, was wichtige Schlussfolgerungen in der Therapie einer IPF zulässt (44). Die Fähigkeit, diese engen Interaktionen zu modulieren und selektiv daraus resultierende profibrogene Determinanten zu unterbinden, ist ein weiteres therapeutisches Ziel bei fibrotischen Lungenerkrankungen. An der Niere konnte die Simvastatin-induzierte Blockade ctgf-abhängiger Zellaktivität (45) und das antifibrotische Potential in der Behandlung verschiedener Nierenerkrankungen (46) erwiesen werden. Simvastatin kann die Proliferation von menschlichen Vorhof-Myofibroblasten in Kultur (47) und von vascular smooth-muscle cells (VSMCs) (48) verhindern. Ferner wurde nachgewiesen, dass Simvastatin die Differenzierung von hepatischen Sternzellen in Myofibroblasten, und deren Umwandlung zu einem Myofibroblasten-Phänotyp verhindert, der mit Zirrhose und Karzinogenese verbunden ist (49). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Lovastatin eine Apoptose der Fibroblasten induziert (50). Auch Simvastatin bewirkte in einer Studie in hoher Konzentration eine Steigerung der Apoptose der Fibroblasten und gleichzeitig eine verminderte Kollagenablagerung (51).

1.3.2 Statine und PAH

Entsprechend zeigten sich positive Effekte bei der Behandlung einer PH (52, 53). Eine Therapie mit Statinen hat, wie in zahlreichen Studien am Tiermodell nachgewiesen, positive Auswirkungen auf eine PH (54 - 57). Die Statine inhibieren Gene, die an entzündlichen Prozessen und an der Proliferation von Gefäßwandzellen beteiligt sind, und verbessern die endotheliale Funktionsfähigkeit der pulmonalen Gefäße durch Steigerung der endothelialen Nitratoxid-Synthase und der Reduzierung der Endothelin-Expression (58 - 67), und sie reduzieren das pulmonale vaskuläre Remodeling vermutlich durch ihre proapoptotischen Begleitwirkungen. Sie bewirken eine Verbesserung und Wiederherstellung der endothelialen Funktion, verhindern die Migration und Proliferation von vascular smooth-muscle cells und vermindern die vaskuläre Entzündung, sowie den oxidativen Stress (68 - 70). Die therapeutische Wirkung von Simvastatin bei der PH beruht hauptsächlich auf der Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase und der Unterdrückung der Mevalonat-Synthese (71). Diese Effekte basieren laut einer Studie auf der Mevalonat-abhängigen Inhibierung des Rho-ROCK-Entwicklungspfad (72).

Die Reduzierung des Serum-Cholesterins darf dabei nicht als ursächlich für die Wirkungen der Statinbehandlung auf eine PH angenommen werden. Normale Ratten sind immun gegen die cholesterinsenkende Komponente der Medikamente (73). Das Serum-Cholesterin bei Simvastatin-Therapie im Monocrotalin/Pneumektomie-Modell veränderte sich nicht (74). Dennoch besitzen Statine einige von einer Senkung des Cholesterins abhängigen Eigenschaften, die auf die Gefäßwand und damit auf die Ausbildung einer PH Auswirkungen haben: Am auffälligsten ist die Mevalonat-sensible Inhibierung der VSMC-Proliferation, die von einer großen Bandbreite an Stimuli ausgelöst werden kann (75). So konnte in der PCNA-Färbung mittels des Antigens Cyclin eine Reduktion dieser Proliferation in der Gefäßwand durch Simvastatin bereits am dritten Tag der Exposition chronischer Hypoxie nachgewiesen werden (76). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine verminderte Anfärbung der Gefäßwand im Pneumektomie/Monocrotalin-Modell. Die Retardierung der Progression der Erkrankung wird vermutlich durch eine Induktion der Apoptose in den Zellen der Gefäßwand bewirkt (65, 67).

Darüber hinaus sind die pleiotropen Effekte nicht allein auf die Gefäße beschränkt. Neuere Studien belegen eine bessernde Wirkung auf das Myokard (77, 78, 79). Zudem reduzieren sie das Myokardgewicht und die Myokardfibrose, verbessern die Kapillardichte und schränken die elektrische Instabilität des hypertrophierten Herzens ein (78). Die pleiotropen Effekte von Simvastatin bestehen in erster Linie in einer Inhibierung der Synthese der Isoprenoid-Zwischenprodukte Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, die für die posttranslationale Isoprenylierung, für die Lokalisation der Membran und die Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Protein-Gruppen Ras und Rho unabdingbar sind. Diese GTP-asen

regulieren zahlreiche Zellfunktionen und verbinden membranöse Wachstumsfaktorenrezeptoren an intrazelluläre Pfade, die eine Zellproliferation bewirken (77, 78, 79).

Rho-A und sein Abkömmling Rho-Kinase sind inzwischen ebenfalls beliebte Ziele in der Behandlung der PH (80, 81). Rho-Kinase-Inhibitoren wie Fasudil verhindern die Entwicklung einer PH in verschiedenen experimentellen Studien (81).

Ferner mildern Statine die Entwicklung einer PH in zahlreichen experimentellen Tiermodellen (82 - 86). Darüber hinaus können sie eine bereits entstandene PH sowie das damit verbundene vaskuläre Remodeling sowohl bei Pneumektomie und Monocrotalin-Behandlung (87), als auch bei chronischer Hypoxie (88) rückgängig machen. Dies scheint bedingt zu sein durch eine gesteigerte Apoptose, sowie eine verminderte Proliferation von smooth-muscle cells in den durch die Obstruktion geschädigten Gefäß-Arealen (89, 90). Ein Effekt auf die Mobilisierung und das „Homing“ sogenannter bone-marrow-derived Progenitor-Zellen wurde ebenso vermutet (91). Als Ergebnis aus allen genannten Forschungsprojekten lässt sich trotz nicht vollständiger Klärung der exakten Wirkmechanismen ableiten, dass Statine in naher Zukunft Eingang in die Therapie einer PH finden können.

1.4 Ziel der Arbeit:

In unserer Studie untersuchten wir die Wirkung einer regelmäßigen Simvastatin-Applikation an Bleomycin-behandelten Ratten über einen Zeitraum von vier Wochen. Die intratracheale Instillation von Bleomycin ist dabei ein etabliertes Modell, um sowohl eine IPF (92), als auch eine PH (93, 94) in Ratten zu erzeugen. Dabei wurde der Cholesterinsynthesehemmer bei zwei ausgesuchten Kontrollgruppen ab Tag 1 bzw. ab Tag 13 verabreicht, um so den Unterschied zwischen prophylaktischer und therapeutischer Gabe des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers zu ermitteln.

Unsere Studie untersuchte dabei folgende Annahmen:

Sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Gabe hemmt die Entstehung einer ausgeprägten PH im Rahmen der durch intratracheale Bleomycinverabreichung zu erwartenden Lungenfibrose. Ein Schwerpunkt unserer Studie war dabei, den Effekt von Simvastatin auf die abnehmende Belastbarkeit der Tiere im Rahmen der Entstehung einer Pulmonalen Hypertonie zu untersuchen. Hierzu kam ein Stufenbelastungstest mittels Laufband zum Einsatz, der mit dem 6-Minute-Walk vergleichbar ist, der in der Klinikroutine für die Verlaufskontrolle eingesetzt wird. Zudem wurde das Endgewicht als Maß für die jeweilige Leistungsfähigkeit des einzelnen Tiers bestimmt. Um den Grad der PH mit und ohne Simvastatin zu untersuchen, wurde mittels Rechtsherzkatheter untersucht, welchen Einfluss die medikamentöse Intervention auf die Hämodynamik und in unserem speziellen Fall auf den rechtsventrikulären Druck hat.

Außerdem entnahmen wir den Tieren die Herzen und vermaßen das Gewicht der rechten und linken Ventrikel und des Septums, um daraus eine beginnende Rechtsherzhypertrophie und einen positiven therapeutischen Effekt auf das sogenannte vaskuläre Remodeling durch Simvastatin nachzuweisen. Auf molekularer Ebene wurde die Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie anhand der Bestimmung des rechtsventrikulären brain natriuretic peptide (BNP) als auch anhand des zirkulierenden BNP-Levels ermittelt.

Darüber hinaus wurde untersucht, welchen positiven Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer auf die Entstehung der Lungenfibrose hat. Dabei erfolgte die Untersuchung des Fibrosierungsgrades auf RNA-Ebene mittels der Genexpressionsanalyse des Bindegewebswachstumsfaktors ctgf. Des Weiteren wurde zur Quantifizierung der Fibrosierung auf Proteinebene der Hydroxyprolin-Spiegel des entnommenen Lungengewebes bestimmt.

2.Methoden

2.1 Tierexperimentelle Versuchsphase

2.1.1 Tierhaltung und Gruppeneinteilung

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden in den Räumlichkeiten des Forschungsbaues H1 der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, unter der Leitung von Herrn. Prof. Dr. med. Pfeifer und Dr. med. Schroll unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung ausgeführt. Im Vorfeld war das Vorhaben von der Tierethik-Kommission der Universität genehmigt worden. Für die tierexperimentelle Versuchsreihe wurden vier Wochen alte, männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Anfangsgewicht von $250\text{g} \pm 3\text{g}$ verwendet, und dazu in folgende Gruppen eingeteilt:

Tab 1: Gruppeneinteilung

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Kontrolltiere	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin ab Tag 1	Bleomycin + Simvastatin ab Tag 13
(n = 15)	(n = 17)	(n = 16)	(n = 17)

Die Studie war auf fünf Wochen angesetzt, wobei die Ratten im Tierstall des H1-Baus bei einem konstanten zwölfstündigem Tag-Nacht-Zyklus in Einzelkäfigen untergebracht waren. Sie erhielten Wasser und normale Kost (Futterpellets, Ssniff Haltungsfutter für Ratten und Mäuse, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum.

2.1.2 Induktion der Lungenfibrose

Am Tag 0 der Versuchsreihe wurde mit Hilfe des Zytostatikums Bleomycin (cell-pharm-GmbH, Hannover, Deutschland) eine Lungenfibrose bei den Tieren der Gruppen 2, 3 und 4 induziert. In Vorversuchen wurde die eingesetzte Bleomycin-Dosis von $2,5\text{ U/kg}$ Körpergewicht ($1\text{Unit}=1\text{mg}$) ermittelt. Das Bleomycin wurde intratracheal verabreicht. Dazu wurden die Ratten mit Isofluran (Florene „R“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), einem Inhalationsnarkotikum in eine flachen Narkose versetzt, senkrecht gelagert und ihnen unter Sichtkontrolle der Stimmritzen ein G16- Katheter (Johnson & Johnson, Haan, Deutschland) in die Trachea eingeführt. Das Bleomycin wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien zum Arbeiten mit Zytostatika in 0,9%igen NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst. Die individuelle Dosis wurde in einem für jedes Tier gleich bleibenden Volumen von $0,25\text{ ml}$ mittels Insulinspritze (BD Plastikpak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) verabreicht und danach mit 1ml Luft nachgespült, um eine nahezu gleichmäßige Verteilung des Bleomycins in der gesamten Lunge zu erreichen.

2.1.3 Medikamentöse Behandlung

Den Tieren der Gruppen 3 und 4 wurde ab dem festgesetzten Zeitpunkt täglich gewichtsadaptiert Simvastatin (Zhejiang Hengdian Imp. & Exp. Co., Ltd., China) in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht (KG) zugeführt. Die Ratten wurden hierfür zweimal die Woche gewogen (B11500s, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und die nach dem Körpergewicht erforderliche Menge Simvastatin ,in 1 ml Olivenöl gelöst, mit Hilfe einer Schlundsonde (1,2 x 80 mm, Scanbur BK, Schweden) per os verabreicht. Die Ratten der Gruppe 3 erhielten das Statin bereits ab dem ersten Tag der Bleomycingabe im Sinne einer Prophylaxe. Bei den Tieren der Gruppe 4 erfolgte die Simvastatin-Gabe erst ab Tag 13 nach Bleomycingabe. Hier war bereits eine durch das Zytostatikum induzierte Lungenfibrose zu erwarten und dabei sollte der therapeutische Effekt von Simvastatin beobachtet werden.

Tabelle 2: Versuchsprotokoll

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
5-tägiges Trainingsprogramm am Laufband und Bestimmung der Ausgangskondition				
Tag 0		intratracheale Bleomycin- Verabreichung	intratracheale Bleomycin- Verabreichung	intratracheale Bleomycin- Verabreichung
Tag 1			Simvastatin- Verabreichung p.o.	
Tag 4	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 7	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 10	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Tag 13	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Simvastatin- Verabreichung p.o + Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 16	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 19	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 22	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband
Tag 25	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband	Leistungs- abnahme Laufband

2.1.4 Laufbandbelastungstest

2.1.4.1 Versuchsaufbau

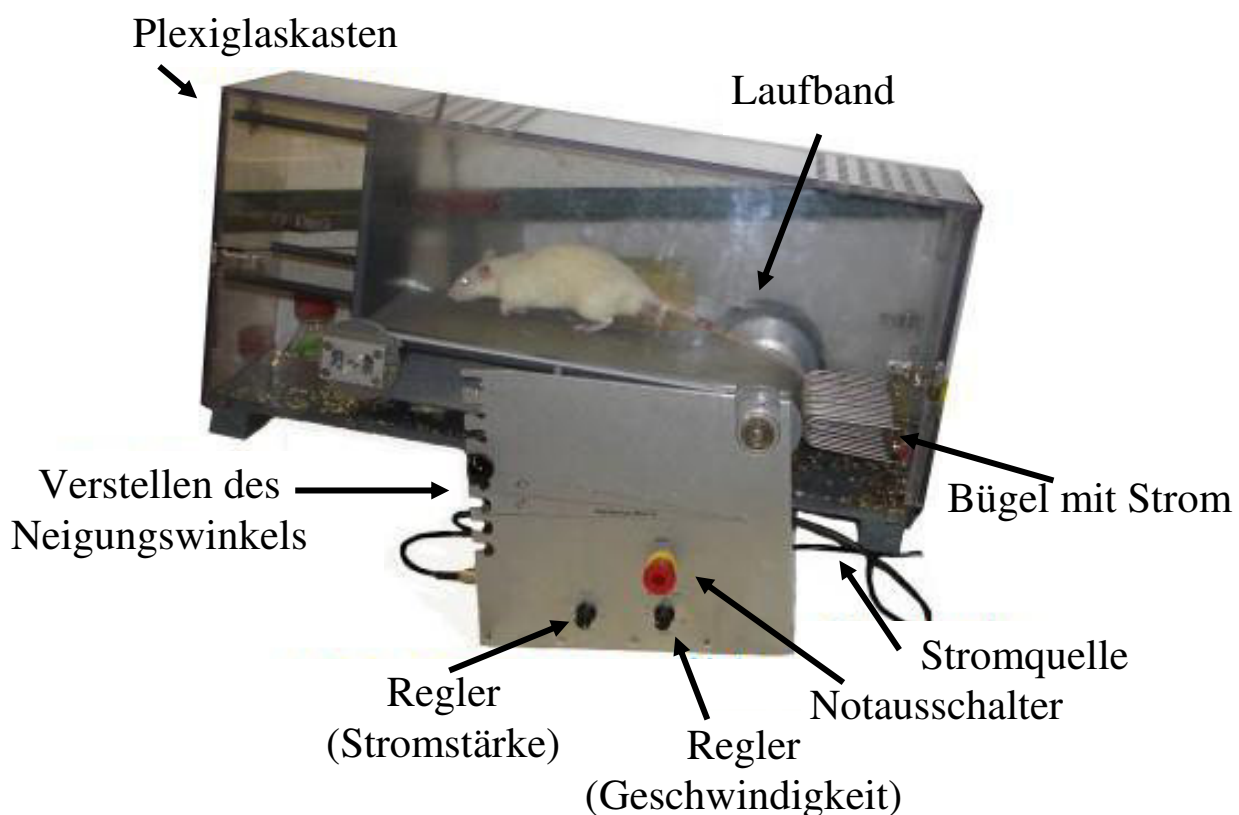
Alle Ratten wurden zunächst einem 5-tägigen Trainingsprogramm am Laufband unterzogen. Im Anschluß wurde an zwei Tagen die Ausgangskondition bestimmt. Die Tiere der Gruppen 2, 3 und 4 erhielten am Tag 0 Bleomycin, wobei die Gruppen 3 und 4 zusätzlich einer Behandlung mit Simvastatin unterzogen wurden. Es folgte die 28-tägige Haupt-Versuchsphase. An den Versuchstagen 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 sowie 25 wurde mit Hilfe des unten beschriebenen Laufbandes die Laufleistung der Tiere bestimmt.

2.1.4.2 Laufbandaufbau

Bei dem Laufband handelte es sich um eine Anfertigung der Biowerkstatt, die dieses speziell für Leistungsmessungen bei Versuchen mit Ratten konstruierten. Das motorbetriebene Laufband besitzt am hinteren Ende einen Einsatz mit 15 Bügeln. Durch diese Bügel wird ein von einer Stromquelle im Inneren des Laufbands erzeugter Impuls weitergeleitet, der bei Kontakt zu einem milden

Stromschlag führt. Die Stromstärke kann mittels eines Drehschalters in 0,5mA Schritten zwischen 0,5 und 1,5 mA, die Geschwindigkeit zwischen 0 und 30m/min reguliert werden. Die Steigung des Laufbandes kann zwischen 0, 6 und 12 Grad variiert werden. Das Laufband befindet sich in einem abschließbaren Plexiglaskasten. Mit Einrasten des Deckels, wird der Stromkreis im Plexiglaskasten geschlossen, so dass es bei offenem System nicht zu einem akzidentiellen Stromschlag kommen kann. An der Außenseite des Laufbandes ist ein Notausschalter angebracht, der sowohl das Laufband stoppt als auch den Stromfluss unterbricht.

Abb. 1: Aufbau Laufband



2.1.4.3 Trainingsprogramm

Die Tiere durchliefen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn ein 5-tägiges Trainingsprogramm, um an das Laufband gewöhnt zu werden. Am Ende dieser Trainingsphase wurde die individuelle Ausgangsleistung bestimmt. Zwischen dem Ende der Lauffläche und den Bügeln, die den Stromschlag auslösen, ist eine für die Tiere deutlich wahrnehmbare Absenkung eingebaut, die es ermöglicht, die Tiere nicht direkt auf den Stromschlag zu konditionieren, sondern auf die Absenkung. In Vorversuchen wurde ein Laufschema zur Erfassung der maximalen Auslastung entwickelt. Jede Ratte muss in den 5 Stufen 10, 15 ,20, 25 und 30m/min je 5 Minuten bei einem Winkel von 12 Grad laufen, um das Trainingsprogramm erfolgreich absolviert zu haben. Dabei erreichten, wie zu erwarten, nicht alle Versuchstiere dieses Ziel.

Tab.3: Schema des Trainingsprogramms

Tag	Zeit [min]	Winkel [°]
1	1	12
2	2	12
3	3	12
4	4	12
5	5	12

2.1.4.4 Abbruchkriterien

Die Abbruchkriterien wurden festgelegt um die Erschöpfung der Tiere zu objektivieren. Als Abbruchkriterien galten:

- Kontakt für länger als zwei Sekunden mit der Stromquelle ohne dass das Laufband berührt wurde
- Kontakt für länger als drei Sekunden mit den Hinterbeinen auf der Stromquelle während die Vorderbeine noch auf dem Band weiterlaufen

Wenn ein Kriterium erfüllt war wurde die Zeit angehalten, das Laufband gestoppt und dieses anschließend erneut gestartet. Dies wurde dreimal wiederholt, erst dann wurde die Leistungsabnahme endgültig abgebrochen.

2.1.4.5 Ermittlung der Ausgangsleistung und Leistungsabnahme

Idealerweise liefen die Tiere nach Abschluss des Trainings je 5 Minuten in jeder der 5 Stufen. Durch eine randomisierte Verteilung der Versuchstiere auf die jeweiligen Gruppen 1, 2, 3 und 4 vor Beginn des Trainingsprogramms ergab sich innerhalb jeder Gruppe eine in etwa gleich bleibende Verteilung zwischen schlechten und guten Läufern. Einige Ratten liefen nicht die vollen 5 Minuten in allen Geschwindigkeitsstufen, während andere das volle Programm absolvierten. Deshalb wurde die individuelle maximale Laufleistung am Tag 5 als Ausgangskondition festgelegt. Diese repräsentierte den oberen cut-off für die Leistung dar, die jedes Tier im Rahmen des Belastungstest maximal erbringen musste und als Maß für einen individuellen Leistungsabfall über die Versuchsperiode. Als erreicht wurde die Ausgangskondition angesehen, wenn ein Tier dreimal eines der Abbruchkriterien erfüllte. Die hierbei gemessene Zeit in Sekunden wurde für die Berechnung als 100% der Leistung festgesetzt.

2.1.4.6 Berechnung

Den einzelnen Tieren aus den verschiedenen Gruppen wurden an den Tagen 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 und 25 nach Bleomycin-Gabe die Laufleistung abgenommen. Die Werte zweier aufeinander folgender Tage wurden hierauf für die Berechnung gemittelt und das Ergebnis als Mittelwert ins Verhältnis zur Ausgangsleistung gesetzt. 100 %-ige Laufleistung erzielten die Ratten deren Laufleistung der am Tag 0 gemessenen Laufleistung entsprach. Lag die am jeweiligen Tage gemessene Leistung unter dem Ausgangswert, so ließ sich der Leistungsabfall genau in %-Werten ausgehend von der Ausgangsleistung angeben. Die so für eine Gruppe an Tieren erhaltenen Werte wurden für jede der Gruppen gemittelt und graphisch in einer Verlaufskurve festgehalten.

2.1.5 Hämodynamische Messung

2.1.5.1 Blutdruckmessung

Zum Ausschluss einer systemischen Hypertonie der Versuchstiere wurde am Ende der Leistungsabnahmen der systolische Blutdruck bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nicht invasiv mittels Tail-Cuff-Methode mit dem blood pressure BP Rekorder 8005 (W+W Electronics, Hofheim, Deutschland). Die Tiere wurden Einzeln in schmale, röhrenförmige Käfige eingespannt und zur Förderung der Durchblutung durch eine untergelegte 37°C warme Heizdecke vorgewärmt. An einer am Schwanz der Ratten angelegten Druckmanschette und einem Pulsaufnehmer wurde mit Hilfe des Transducer eine Pulsationskurve abgeleitet und computergestützt aufgezeichnet.

2.1.5.2 Messung des Rechtsventrikulären Druckes

Der rechtsventrikuläre Druck (RVSP) wurde mit dem vorher geeichten Druckabnehmer (Hellige, Freiburg/Breisgau, Deutschland) gemessen. Mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) wurde die Narkose bei den Versuchsratten eingeleitet und anschließend mit einer intraperitonealen Injektion von Trapanal (100 mg/kgKG.; Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) aufrechterhalten. Um eine adäquate Narkosetiefe sicherzustellen wurden die Reflexe durch einen Schmerzreiz an der rechten Hinterpfote überprüft. Am rechten Halsdreieck wurde die Vena jugularis externa freipräpariert und das Gefäß angeschnitten. Durch diese Vene wurde ein zuvor mit Liquemin (500IU/ml, Roche Pharma, Deutschland) gespülter Kindervenenkatheter (1mm*80mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bis in das rechte Atrium vorgeschoben und dort unter Beobachtung der Blutdruckamplitude der RVSP abgelesen.

2.1.6 Blutentnahme

Um im Verlauf der Versuchszeit den Herzinsuffizienzmarker BNP bestimmen zu können, wurde den Ratten während der Versuchszeit regelmäßig Blut abgenommen. Dies erfolgte bei den Versuchstieren an der Schwanzvene. Um die Tiere zu fixieren, wurden sie in kleinen Käfigen, deren Rauminhalt verstellbar ist, fest eingespannt, um den Tieren ein Wegziehen des Schwanzes nicht zu ermöglichen. Der Schwanz wurde zunächst mit 70 % Alkohol desinfiziert. Durch Aufdrücken des Daumens ca. 1 cm vor der Einstichstelle wurde das Gefäß gestaut, und die Vene mit einer Kanüle (Sedent Lmted., Haan, Deutschland) punktiert. Das gewonnene Blut wurde mit Kapillaren (Coagu Check Kapillaren Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gesammelt, und in EDTA-Mikrogefäße (Multiply PCR Gefäße Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Das EDTA-Blut musste anschließend zur Plasma-Gewinnung bei 4°C und 3000 g 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Unmittelbar danach wurde der Überstand abpipettiert und das erhaltene Plasma bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Blutentnahmen erfolgten am Tag 4, 13, 19 und 25 nach Bleomycin-Gabe. Nach RVSP-Messung wurde zusätzlich am Tag 28 über den Katheter ebenfalls ein EDTA-Röhrchen venöses Blut abgenommen und analog verarbeitet und gelagert.

2.1.7 Organentnahme

Nach der Messung des RVSP und der Blutentnahme über den Rechtsherzkatheter musste den Ratten für anschließende Untersuchungen Herz und Lunge „en bloc“ entnommen werden. Die Tiere wurden dazu an den Extremitäten fixiert. Dann wurde der Brustkorb parasternal eröffnet, um Herz und Lunge entnehmen zu können. Der Schnitt wurde entlang der Linea alba weitergeführt und das Abdomen eröffnet, um Veränderungen der Leber oder die Bildung eines Aszites beurteilen zu können. Nachdem das Herz-Lungen-Paket mitsamt der Trachea aus der Brusthöhle herausgenommen wurde, wurden die verschiedenen Organe für Einzelbestimmungen voneinander separiert. Das noch schwach schlagende Herz wurde von der Lunge an der Herzbasis abgetrennt, in einem Schälchen abgelegt und kardioplege Custodiol-Lösung (Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) in den rechten Vorhof injiziert, um eine baldige Erschlaffung der sich noch kontrahierenden Muskeln zu erreichen. Auf Herzklappenebene wurden hierauf durch einen Horizontalschnitt die Vorhöfe entfernt und durch mehrere Längsschnitte linker und rechter Ventrikel vom Septum abgetrennt. Daraufhin wurden Reste von Herzohren und Klappen säuberlich wegpräpariert und die verbliebenen Bestandteile separat gewogen. Das Septum wurde nach dem Wiegen verworfen, während die beiden Ventrikel anschließend halbiert und eine Hälfte jeweils für die molekularbiologische Bestimmungen und die andere für die Herstellung von Gefrierschnitten in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die gefrorenen Organbestandteile wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingelagert. Der linke Lungenlappen wurde keiner weiteren

Behandlung unterzogen, in -20°C schockgefroren und bis zur Auswertung des Hydroxyprolinegehaltes gekühlt gelagert.

2.2 Plasmabestimmung BNP

2.2.1 Prinzip

Das an den einzelnen Tagen gewonnene und sorgfältig gekühlt aufbewahrte Plasma wurde im Folgenden verwendet, um den Gehalt an BNP im Plasma der einzelnen Tieren jeder Gruppe im Verlauf der Versuchstage zu bestimmen. Mit Hilfe des kompetitiven Immunoassays (ELISA) wurde der BNP-Gehalt des Plasmas bestimmt. Das Endothelin 1 im Plasma und ein biotinkonjugiertes Peptid konkurrieren um die Bindungsstellen am Fab-Fragment des spezifischen anti-Endothelin Antikörpers. Das Fc-Fragment dieses Antikörpers bindet seinerseits am Sekundärantikörper, mit dem die ELISA-Platte vorbeschichtet ist. Das biotinmarkierte Peptid katalysiert als einziges beteiligtes Enzym mit Hilfe von SA-HRP (Streptavidinperoxidase) eine Reaktion zwischen dem Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) und H_2O_2 , durch die es zu einer Farbentwicklung kommt, die photometrisch bei 450nm abgelesen werden kann. Die optische Dichte ist dabei invers proportional zum Endothelingeht.

2.2.2 Durchführung

Mit Hilfe des ELISA-Kits der Firma Phoenix Europe GmbH (Karlsruhe, Deutschland) erfolgte die Bestimmung des ET1-Gehaltes streng nach Herstellerangaben und –protokoll. Zuerst wurde eine Standardreihe erstellt. Dazu wurde die Standardstocklösung mit Puffern auf festgeschriebene Konzentrationen verdünnt: 25; 5; 1; 0,2; und 0,04 ng/ml. Je 50µl wurden pro Probe bzw. Standardverdünnungsstufe in die 96well-Platte pipettiert. Als Leerwert wurden 50µl Puffer verwendet. Außer in das well des Leerwertes wurden in jedes einzelne well 25µl des Primärantikörpers und 25µl des biotinmarkierten Peptids hineinpipettiert. Danach erfolgte die Inkubation der versiegelten Platte mit dem Reaktionsansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur und 300 r.p.m. auf dem Schüttler (IKA HS 260 basic, Staufen/Deutschland). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Inhalt der wells abgekippt. Im Anschluss wurde die Platte fünfmal mit Puffer gewaschen und danach trocken geklopft. Hierauf wurde in jedes well 100µl SA-HRP-Lösung hineingegeben, die Platte versiegelt und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur und 300 r.p.m. auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Platten wie bereits zu Anfang abgekippt, gewaschen und getrocknet. Daraufhin wurden die wells jeweils mit 100µl des TMB-Substrates (3,3',5,5'-Tetramethylbenzin) gefüllt und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und 300 r.p.m. für eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden schließlich jedem well

100µl 2N HCl zugegeben. Die photometrische Messung der Optischen Dichte der entstandenen Farbreaktion erfolgte bei 450 nm. Dabei wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.3 Berechnung:

Mittels des Programmes Softmax konnte anhand der ermittelten Optischen Dichten eine 4-parametrische Eichkurve erstellt werden. Die gemittelten Optischen Dichten konnten so auf eine Standardkurve gefällt und die ET1-Konzentration der einzelnen Proben extrapoliert werden.

2.3 Genexpressionsanalyse

2.3.1 RNA-Isolation

Die „Single-Step“-Methode (nach Chomczynski und Sacchi, 1987) wurde angewandt, um die Gesamt-RNA aus dem entnommenen Organgewebe zu isolieren. Die so erhaltenen reinen Ribonukleinsäuren (RNA) konnten im Folgenden, nachdem sie in cDNA transskribiert wurden, mit Hilfe von PCR und Taqman®-Verfahren weiter analysiert werden. Das ubiquitäre Vorkommen der extrem schwer zu denaturierenden exogenen RNAsen erforderte äußerste Umsicht bei der Vorbereitung der RNA und allen anderen verwendeten Materialien. Das Tragen von Handschuhen (Peha-Soft, Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) war ebenso selbstverständlich wie die Kühlung der Materialien auf Eis bzw. in auf 4°C gekühlten Zentrifugen (Varifuge 20RS, Heraeus Serpatech, GmbH, Osterode, Deutschland), um eine Enzymaktivität der RNAsen und so eine Schädigung des zu untersuchenden Produktes zu unterbinden. Die Verwendung steriler Einwegs-Materialien war darüber hinaus ebenso verpflichtend wie die Behandlung der Lösungen und Puffer mit einer 1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). 100 mg des gefrorenen Gewebes wurde in 1 ml denaturierender Lösung (Solution D: 4 M GTC (Guanidin Thiocyanat), 25mM Na-Citrat, 0,5% Sarcosyl, 0,1 M Mercaptoethanol) mit Hilfe des Polytrongewebshomogenisators Ultra Turrax® T 25 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert und zur Extraktion der Gesamt-RNA weiterverwendet. Das GTC in der Lösung lysiert die enthaltenen Zellen und denaturiert alle vorhandenen Proteine wie die endogenen Ribonukleasen, die eine genaue Auswertung der Gesamt-RNA unmöglich machen können. Im Anschluss wurden in der so genannten Phenol-Chloroformextraktion, zuerst 0,1 2 M Natriumacetat (pH 4) und anschließend 1 ml wassergesättigtes, saures Phenol (pH 4) (Merk KGaA, Darmstadt) addiert und solange im Vortex Genie 2 (Scientific Industries INC., New York, USA) in kreisenden Bewegungen auf hoher Geschwindigkeit durchgemischt, bis sich die so erhaltene Suspension deutlich aufklarte. In einem dritten Schritt erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) (Sigma®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,

Deutschland) und dessen erneute Mischung im Vortex Genie 2 (Scientific Industries INC., New York, USA) bis die erhaltene Lösungen einen milchig, homogenen Charakter erhielt. Um die einzelnen Phasen aufzutrennen, wurde die Lösung 15 Minuten lange auf Eis inkubiert und darauf bei 10000 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Netheler-Hinz GmbH, Homburg, Deutschland). Der auf diese Weise erhaltene klare, RNA-haltige Überstand wurde vorsichtig von der Interphase, die in großer Zahl fragmentierte DNA und Proteine enthält, abgenommen und nach Beimischung von 1 ml Isopropanol (2-Propanol, Sigma®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einem weiteren Durchgang in der Zentrifuge bei 10000g und 4°C für 20 Minuten wurde das so erhaltene RNA-Pellet mittels 300 µl Solution D resuspendiert, anschließend mit 300 µl Isopropanol versetzt, für eine weitere Stunde bei -20°C gefällt und anschließend noch einmal bei 10000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und diesem 600 µl 70%iger, -20°C kaltes Ethanol beigemischt und das Gemisch noch einmal für 20 Minuten bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Das auf diese Weise hergestellte RNA-Pellet wurde hierauf zuerst für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, danach mit 500 µl sterilem Aqua (Aqua ad injectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und abschließend bei 60 - 65°C für 3 Minuten inkubiert (HTC Blockthermostat BT1301, USA/Scientific (Europe) Limited, Great Britain), um eine bessere Löslichkeit des Produktes zu erhalten. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Um die RNA-Konzentrationen der jeweiligen Proben photometrisch bestimmen zu können, wurde von jeder einzelnen eine Verdünnung von 1:100 (5 µl Probe auf 495 µl Aqua dest (Aqua ad injectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) angesetzt. Die Messung der verschiedenen optischen Dichten (OD) in der verdünnten Lösung erfolgte in einer Präzisionsküvette (Schichtdicke 10 mm) (Quarzglas Suprasil®, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) auf einem Spektrometer (GeneQuant pro RNA/DANN Calculator, Biochrom Limited, Cambridge, Groß-Britannien) gegen Aqua dest (Aqua ad injectabilia Braun, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland). Dabei wurde mittels der OD bei 260 nm der RNA-Gehalt und mittels der OD bei 280 nm die Verunreinigung durch einzelne Proteine in der jeweiligen Lösung gemessen. Die bei 320 nm gemessene OD diente zur Bestimmung unspezifischer Background-Signale und sollte bei 0 liegen. Um eine Aussage über die Reinheit der einzelnen Proben machen zu können, musste im Anschluss nur der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm ausgerechnet werden. Idealerweise sollten sich die erhaltenen Werte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Mit folgender Gleichung ließ sich im Weiteren die RNA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] ermitteln:

$$\text{OD bei 260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Faktor} = \text{Konzentration}$$

Für die Messung der RNA wurde der Faktor 40 eingesetzt, da ein bei einer OD von 260nm gemessener Wert 1 einer RNA-Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$ entspricht. Um exakte Ergebnisse zu erhalten wurde für jede Probe eine Dreifachbestimmung vorgenommen und die so erhaltenen Werte im Anschluss gemittelt.

2.3.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Da für eine weitere Auswertung durch Real-Time-PCR und Taqman cDNA als Template zur Gewinnung komplementärer DNA-Stränge benötigt wird, musste die isolierte RNA mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Bei dem dafür verwendeten Enzym, der M-MLV RT, handelt es sich um eine aus Moloney-Maus Leukämie Virus isolierte, RNA-spezifische DNA-Polymerase (RNase H-Aktivität neg.). Als Signalgeber für den Beginn der RT wurden als Random Primer bezeichnete unspezifische Hexanukleotide verwendet. Da es den Primern möglich ist, an grundsätzlich jeder Stelle des RNA-Stranges zu hybridisieren, kann man von einer kompletten Transkription aller Abschnitte ausgehen. Die Empfindlichkeit der verwendeten Materialien und das Vorhandensein schädlicher Faktoren am Arbeitsplatz verlangten auch hier wieder, dass alle Arbeitsschritte in gefrorenem Aggregatzustand erfolgten und die für die Gewinnung der cDNA nötigen Reaktionspartner vor Gebrauch aufgetaut, gemischt und kurz abzentrifugiert wurden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Mit sterilem Aqua dest. (Aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde $1\mu\text{g}$ isolierte RNA auf ein Volumen von $9\mu\text{l}$ aufgefüllt. Danach wurde dieser Lösung $1\mu\text{l}$ Random Primer ($500\mu\text{g/ml}$; Promega, Madison WI, USA) beigemischt und das Ganze bei 70°C für 3 Minuten inkubiert, damit sich eine Denaturierung der Sekundärstrukturen der RNA einstellte. Die Hybridisierung der Primer wurde durch eine darauf folgende Kühlung der gelösten Produkte beschleunigt. Der im Anschluss jeder Probe hinzugegebene Master-Mix gliederte sich in folgende Einzelbestandteile, die in der beschriebenen Reihenfolge und in den angegebenen Mengenverhältnissen genauestens zusammenpipettiert wurden:

$4\mu\text{l}$ $2,5\text{ mM}$ dNTP (dATP/dGTP/dCTP/dTTP)(Amersham Pharmacia Biotech INC. Piscataway, New Jersey, USA), $4\mu\text{l}$ M-MLV RT-5 x-Buffer (Promega, Madison WI, USA), $1\mu\text{l}$ RNAsin®Rnase Inhibitor [$40\text{ u}/\mu\text{l}$] (Promega, Madison WI, USA) und $1\mu\text{l}$ [$200\text{ u}/\mu\text{l}$] M-MLV Reverse Transcriptase, Rnase H Minus, Point Mutant (Promega, Madison WI, USA).

Die einzelnen Proben wurden ein weiteres Mal gevortext, herunterzentrifugiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluss für 2 Minuten auf 95°C erhitzt, um die M-MLV RT zu inaktivieren und die Elongationsreaktion auf diese Weise zu stoppen. Die so gewonnene cDNA wurde unmittelbar nach Beendigung der Reaktion auf Eis gekühlt, mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

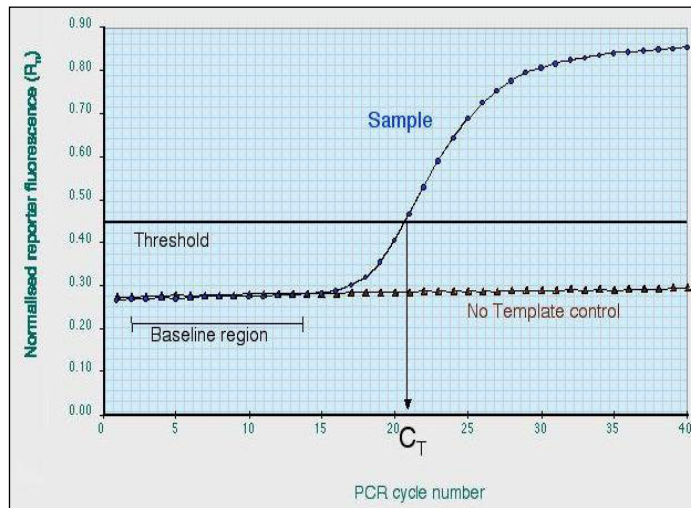
2.3.4 Quantifizierung mit Taqman-Technologie

2.3.4.1 Prinzip

Durch die Einführung der Taqman®-Technologie, eine Kombination aus konventioneller Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Exonuklease-Assay (Anfang der Neunziger Jahre von Gelfand et al entwickelt) wurde es möglich, die Genexpressionsstärke eines gesuchten Produktes quantitativ und sequenzspezifisch auszuwerten. In unserer Studie verwendeten wir diese zur Auswertung der Genexpressionsstärke von BNP und ctgf an der Lunge und am Herzen. Dem jeweiligen PCR-Ansatz wird hierbei zusätzlich zu den spezifischen Primern eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde zugegeben. Diese lagert sich zwischen den Bindungsstellen der Primer am einzelnen Strang an der Ziel-cDNA an. Beide Enden der Sonde werden mit einem bestimmten Farbstoff versehen: Das 5'-Ende mit dem sogenannten Reporter-Farbstoff, einem Fluorescein-Derivat (FAM) und das 3'-Ende mit dem sogenannten Quencher-Farbstoff, einem Rhodamin-Derivat (TAMRA) (Livak et al., 1995/1999). Diese Farbstoffe sind verantwortlich für den Prozess des Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfers (FRET) (Förster, 1948; Lakowicz, 1968). Ist die Sonde nicht beschädigt, die beiden Farbstoffe befinden sich in einer vorgegeben räumlichen Entfernung und es wird mittels eines Argon-Lasers eine bestimmte Emissions-Energie auf den Reporter übertragen, so überträgt dieser die Energie auf den Quencher. Dieser unterdrückt eine Reaktion des Reporters (to quench), indem er diese Energie absorbiert und selbst zu fluoreszieren beginnt. In der Taqman®-Reaktion setzt sich eine sogenannte Taq-Polymerase an die Stelle der Sonde und drängt sie so während der Extensionsphase aus der Bindung an die Template-DNA. Die Abspaltung der Sonde von der Template-DNA verleiht dem jeweiligen Doppelstrang eine y-förmige Sekundärstruktur. Diese bedingt eine Aktivierung der Exonuklease der Taq-Polymerase, welche eine Hydrolyse der bereits hybridisierten Sondenmoleküle verursacht. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher so weit voneinander, dass der Quencher seine Kontrollfunktion auf den Reporter nicht mehr ausüben kann. Auf den Reporter übertragene Energie bringt diesen nun selbst zum Fluoreszieren. Nach jedem Extentionszyklus kann auf diese Weise mit Hilfe der CCD-Kamera des ABI PRISM® 7900 HAT Sequence Detection System (Applied Biosystem, CA, USA) das Fluoreszenz-Signal des Reporters exakt detektiert werden. Dieser Anstieg der Fluoreszenzemission durch den Reporter ist direkt proportional zur

amplifizierten DNA. Dies erlaubt Schlussfolgerungen zur eingesetzten cDNA während der exponentiellen Phase der PCR und genaue Auswertungen im Bezug darauf, da die Fluoreszenzen mehrmals pro Zyklus gemessen werden und der Verlauf darüber hinaus als Amplifikationsplot dargestellt wird.

Abb.2: Prinzip der Auswertung mittels der Taqman-Technologie



Zur genauen Auswertung der jeweiligen Genexpression anhand von Referenz-Genen und ihre relative Quantifizierung, musste ein sogenannter Threshold Cycle(C_T) festgesetzt werden. D.h. eine Zyklenanzahl bei der die detektierte Fluoreszenz des Reporters einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) im exponentiellen Kurvenverlauf zum ersten Mal überschreitet. Auf diese lassen sich ebenfalls Schlussfolgerungen auf die eingesetzte cDNA-Menge machen. Je niedriger der C_T -Wert, desto höher war die Ausgangskonzentration an eingesetzter Template-cDNA. Um eine konstante Expression zu erhalten, wurde als interner endogene Kontrolle (Housekeeper) 18sRNA verwendet.

2.3.4.2 Primerdesign ctgf und BNP

Online wurden über die Homepage der Firma Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) die spezifischen Primer, als auch die zugehörigen Sonden gesucht und als vordesignte 5'-Nuklease-Assays-on-Demand bestellt.

Tab.4: Auflistung der verwendeten und von Applied Biosystems gelieferten sequenzspezifischen Assays-on-Demand (TaqMan®-Sonden und Primer für die jeweilige Gensequenz)

Zielgen	Assay-on-Demand ID
BNP	Rn 00580641_m1
ctgf	Rn 0573960_g1
18S-RNA	4352656-0507004

Bei der Auswahl der Primer und Sonden wurde speziell darauf geachtet, dass sie sich an Exon/Exon-Übergängen und/oder in verschiedenen Exons befanden, um eine Detektion genomischer DNA ausschließen zu können, denn diese kann bei Verwendung von cDNA grundsätzlich immer noch als Verunreinigung vorhanden sein. Die Sonden waren an beiden Enden mit den spezifischen Farbstoffen versehen: Am 5'-Ende mit FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, an das zusätzlich eine Phosphat bzw. Amidgruppe befestigt war, um eine vorzeitige Extension der Sonden durch die Taq-Polymerase zu vermeiden.

2.3.4.3 Durchführung

Für jeden Lauf wurden jeweils Doppelbestimmungen in einer 96-well Mikrotiterplatte (Microamp® Optical 96 well reaction plate, applied Biosystems, Weiterstadt) für das jeweilige Zielgen und für die 18sRNA, und Negativkontrollen, sogenannte Non template controls (NTC) mit Aqua dest. anstelle von cDNA erstellt. Der Taqman® Universal PCR Master Mix (Nr. 4304437, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) setzte sich aus folgenden Einzelbestandteilen zusammen: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Amp Erase® Uracil-N-Glycosylase (UNG), dNTPs mit dUTP, ROXTM (6-Carboxy-X-rhodamin) und optimierte Pufferbestandteile mit MgCl₂. Die AmpliTaq® Gold DNA ist eine modifizierte DNA-Polymerase, die erst bei einer bestimmten Temperatur (95°C) und nach einer Dauer von 10 Minuten aktiviert wird. Auf diese Weise wird das Entstehen von Primer-Dimeren verhindert. Die AmpErase® UNG verhält sich ähnlich und ist erst unter einer Temperatur von 50°C über einen Zeitraum von 2 Minuten aktiviert. Sie beseitigt uracilhaltige cDNA-Kontaminationen, die als Rückstände von vorhergehenden PCR-Amplifikationen zurückgeblieben sein können. Beim Temperaturanstieg zur Aktivierung der AmpliTaq® Gold DNA Polymerase wird die AmpErase® UNG gleichzeitig inaktiviert. Mit ROXTM als passivem Referenzfarbstoff konnten Fluoreszenzfluktuationen durch Konzentrationsschwankungen der Reportersignale im Reaktionsansatz systemintern abgeschwächt werden. Die einzelnen Substanzen zur Erstellung des Reaktionsansatzes wurden vor Verwendung aufgetaut, gemischt und kurz an zentrifugiert.

Die Bestandteile jedes Reaktionsansatzes mit 20µl Reaktionsvolumen waren 9 µl cDNA bzw. NTC als Grundbestandteil bei 3000rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert, 1 µl 20x Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und 10 µl QuantiTect™ Probe PCR-Mastermix (Quiagen, Hilden, Deutschland). Der Ansatz wurde nochmals bei 3000rpm für 60 Sekunden zentrifugiert, die Wellplatte mit einer optischen Deckfolie (ABI PRISIM® Optical Adhesive Cover, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) abgedichtet und der Taqman®-Lauf mit folgendem Temperaturprofil gestartet:

Tab. 5: Ablaufschema der qRT-PCR mit TaqMan®

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	95	600
Amplifizierung:		
Denaturierung	95	15
Anealing/Elongation	60	60
Anzahl der Zyklen: 40		

2.3.4.4. Berechnung

Das Analyse-Programm Gene Amp SDS Software, Version 2.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) diente zur Auswertung. Zu Beginn erfolgte durch die Software ein automatischer Abgleich aller Rohdaten gegen den Referenzfarbstoff ROX™, der im Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) enthalten war. Für jede einzelne Probe erstellte das Programm die zugehörige Amplifikationskurve. Diese Kurvendiagramme setzten sich zusammen aus den ermittelten normalisierten Reportersignalen (R_n), die vom System den jeweiligen Zykluszahlen zugeordnet wurden. Ein manuell bestimmter Schwellenwert legte fest, wann sich die jeweiligen Amplifikationskurven in die exponentielle Phase der Extension bewegten und das Programm errechnete daraus für jeden Ansatz den jeweiligen C_T -Wert. Für jede Ziel-cDNA wurde ein C_T -Wert bestimmt und im gleichen Durchgang ein ebensolcher für die endogene Kontrolle erstellt. Die Berechnung erfolgte folgendermaßen:

$$C_{T\text{-Ziel}} - C_{t\text{-18sRNA}} = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T - \text{Kalibrator} = \Delta \Delta C_T$$

Der ΔC_T -Wert in der Probe des Kalibrators wurde gleich 1 gesetzt und die Menge des zu untersuchenden Produktes in den restlichen Proben relativ zu diesem Wert als x-Vielfaches beschrieben. Als Kalibrator wurde ein Tier der Kontrollgruppe gewählt (~1) und alle anderen Tiere auf diese normiert, d. h. im Verhältnis dazu ausgedrückt.

$$RQ = \text{Eff}^{-\Delta\Delta C_T} \sim 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Eine Gewährleistung der Effizienz von fast 100% für jede einzelne Komponente des Assays-on-demand™ durch die Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) ermöglichte es, dass die als eingesetzt ermittelte cDNA einer einzelnen Probe, sofern sie als Referenz-Gen 18sRNA normalisiert worden war, relativ zur verwendeten jeweiligen Kalibrator-Probe als Potenz von 2 mit dem $\Delta\Delta C_T$ -Wert als Exponent ($= 2^{-\Delta\Delta C_T}$) berechnet werden konnte.

2.4 Quantifizierung der Fibrose

2.4.1 Hydroxyprolinbestimmung

2.4.1.1 Prinzip

Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die durch die Hydroxylierung des Aminosäurestes von Prolin, einer der 20 kanonischen Aminosäuren, entsteht. Diese Aminosäure kommt fast ausschließlich in Bindegeweben vor und kann bei vermehrter Entstehung von Kollagen als Marker für den fibrotischen Umbau eines bestimmten Gewebes herangezogen werden. Daher eignet sich Hydroxyprolin auch ausgezeichnet, um in der vorliegenden Studie das Voranschreiten und den Grad der durch das Bleomycin induzierten Lungenfibrose zu bestimmen. Natürlich darf dabei nicht vergessen werden, dass die zu Anfang durch Bleomycin induzierte und stetig zunehmende Fibrosierung ab einem Zeitraum von vier Wochen wieder reversibel ist.

Um das Hydroxyprolin aus einem bestimmten Gewebe zu gewinnen, muss es basisch hydrolysiert werden. Danach folgt eine schrittweise Oxidation zu Pyrol durch Chloramin T. Das so entstandene Pyrol bildet nach Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyds, einer Komponente des Ehrlichs-Reagenz, einen Farbkomplex aus, dessen optische Dichte bei einer Wellenlänge von 540nm exakt photometrisch vermessen werden kann. Diese ist zum Hydroxyprolin-Gehalt der Probe direkt proportional.

2.4.1.2 Probenvorbereitung und -lagerung

Die linken Lungenflügel und die rechten Ventrikel wurden zur Vermessung des Hydroxyprolingehaltes der Lunge und des Herzens herangezogen. Beide Bestandteile waren nach der Entnahme gewogen und ungespült bei -20°C gelagert worden. Nach der Zugabe von 0,9%igem NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde mittels des Ultraturrax (Ultra

Turrax® T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) aus dem verwendeten Gewebe ein Homogenisat zur weiteren Analyse gemacht und dieses bei 3000 Umdrehungen und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Netheler-Hinz GmbH, Homburg, Deutschland). Die drei so entstehenden Phasen gliedern sich wie folgt: Die oberste trübe Schicht enthält fetthaltige Bestandteile, die mittlere wässrige die hydrophile Aminosäure Hydroxyprolin und die unterste sanduhrartige den Zelldetritus. Zur weiteren Untersuchung des Hydroxyprolins wurde die mittlere Phase säuberlich abpipetiert und bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert.

2.4.1.3 Durchführung

Zur genauen Erfassung und quantitativen Auswertung des Hydroxyprolingehaltes wurde eine Standardlösung aus trans-4-Hydroxyprolin (Fluka, Steinheim, Deutschland) hergestellt. Aus dieser wurden folgende Standardverdünnungsstufen erstellt: 0,5; 0,7; 1,5; 10; 15; 20 µg/nl. Anhand dieser Verdünnungsstufen konnte eine Standardkurve abgeleitet werden, mit deren Hilfe im Anschluss der Hydroxyprolingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden konnte. Der Standard wurde im weiteren Verlauf des Protokolls den Proben gleichwertig behandelt.

Zur weiteren Erfassung des Hydroxyprolingehaltes wurden 40 µl des Homogenisats, die einzelnen Standards und als Leerwert 40 µl NaCl in Eppendorfcups (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipetiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 10 µl 10 N NaOH (Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland) zu den einzelnen Proben, um diese zu hydrolysieren. Dann wurden die Proben 25 Minuten bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 121°C autoklaviert. Im Anschluss an die Hydrolyse mussten die Proben oxidiert werden. Dafür musste eine Chloramin T-Lösung angesetzt werden, die sich wie folgt zusammensetzte: 1,27 g Chloramin T (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); 20 ml 50%igem n-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 80 ml Acetat-Citratpuffer (pH 6,5). Von diesem Ansatz wurden jedem Cup 450 µl beigegeben, das erhaltene Gemisch gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Industries, INC.; N.Y, USA) und im Anschluss bei Raumtemperatur für 25 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Ehrlichs-Reagenz aus 3 g Dimethylaminobenzaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 13,3 ml n-Propanol und 6,7 ml Perchlorsäure angesetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurden 500 µl in jede Probe hineinpipetiert. Daraufhin wurden die Proben ein weiteres Mal gevortext und für 20 Minuten bei 65°C (HTC Blockthermostat BT1301, USA/Scientific (Europe) Ltd., Groß Britannien) inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden in 96well-Platten (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und die optische Dichte der einzelnen Proben bei 540 nm am Photometer (Genesys 10 UV-S, Thermo Fisher Scientific INC., Waltham MA, USA) vermessen.

2.4.1.4 Berechnung (Formel zur Hydroxyprolinbestimmung)

Die Bestimmung des Hydroxyprolingehalts erfolgte mit Hilfe der mitgeführten Standardreihe. Die einzelnen Standardverdünnungen wurden mit Hilfe des Programms Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) aufgetragen und eine lineare Eichkurve (Extinktion = Y-Achse; Konzentration = x-Achse) ermittelt. Mit Hilfe des Programms Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) wurde zuallererst anhand der Konzentrationen der Standardverdünnungen und den photometrischen Messergebnissen eine linear aufgetragene Eichkurve ermittelt. Nach Abzug des Leerwertes wurden die gemessenen optischen Dichten jeder Probe auf eine Standardkurve gefällt und so die einzelnen Hydroxyprolinkonzentrationen bestimmt. Bei der Auswertung der Proben wurden immer Doppelbestimmungen vorgenommen, die Mittelwerte errechnet und diese zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung und statistische Auswertung aller dargestellten Untersuchungen erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows®, Version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) bzw. SigmaPlot 2001 (Aspire Software International, Ashburn, VA, USA). Alle Werte im Ergebnisteil wurden angegeben als Mittelwerte ± 1 Standardabweichung. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für die Signifikanz wurde eine Schwelle von $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

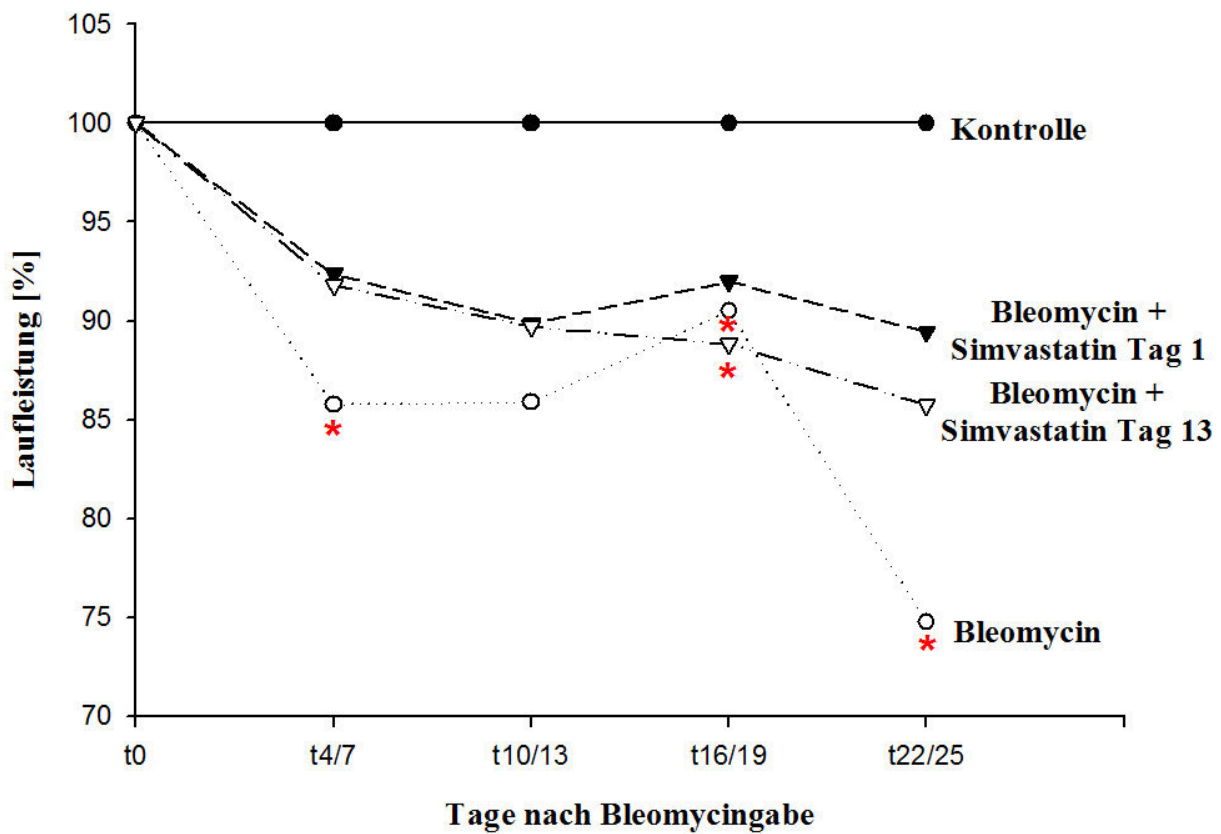
Zur Bezeichnung der jeweiligen Signifikanzen wurde nachfolgende Symbolik festgelegt:

Tab. 6: Markierung der festgestellten Signifikanzen:

Symbol	Bedeutung
*	Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe
#	Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe
\$	Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

3.1 Laufbandbelastungstest

Grafik 1: Signifikanzen im Laufbandbelastungstest



Tab 7: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 4)

Tag 4	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,004	0,016	0,000
Bleomycin	0,004		0,429	0,853
Bleomycin + Simvastatin d1	0,016	0,429		0,437
Bleomycin + Simvastatin d13	0,000	0,853	0,437	

Tab 8: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 7)

Tag 7	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,004	0,004	0,003
Bleomycin	0,004		0,888	0,850
Bleomycin + Simvastatin d1	0,004	0,888		0,753
Bleomycin + Simvastatin d13	0,003	0,850	0,753	

Tab 9: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 10)

Tag 10	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,016	0,008	0,025
Bleomycin	0,016		0,966	0,503
Bleomycin + Simvastatin d1	0,008	0,966		0,322
Bleomycin + Simvastatin d13	0,025	0,503	0,322	

Tab 10: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 13)

Tag 13	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,008	0,003	0,000
Bleomycin	0,008		0,750	0,189
Bleomycin + Simvastatin d1	0,003	0,750		0,260
Bleomycin + Simvastatin d13	0,000	0,189	0,260	

Tab 11: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 16)

Tag 16	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,004	0,004	0,006
Bleomycin	0,004		0,586	0,831
Bleomycin + Simvastatin d1	0,004	0,586		0,949
Bleomycin + Simvastatin d13	0,006	0,831	0,949	

Tab 12: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 19)

Tag 19	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,000	0,016	0,001
Bleomycin	0,000		0,059	0,286
Bleomycin + Simvastatin d1	0,016	0,059		0,338
Bleomycin + Simvastatin d13	0,001	0,286	0,338	

Tab 13: Signifikanzen im Vergleich der Leistungskapazität der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum (Tag 22)

Tag 22	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,000	0,000	0,001
Bleomycin	0,000		0,361	0,195
Bleomycin + Simvastatin d1	0,000	0,361		0,616
Bleomycin + Simvastatin d13	0,001	0,195	0,616	

3.2 Messung des Endgewichtes:

Grafik 4: Signifikanzen bei der Messung des Endgewichtes

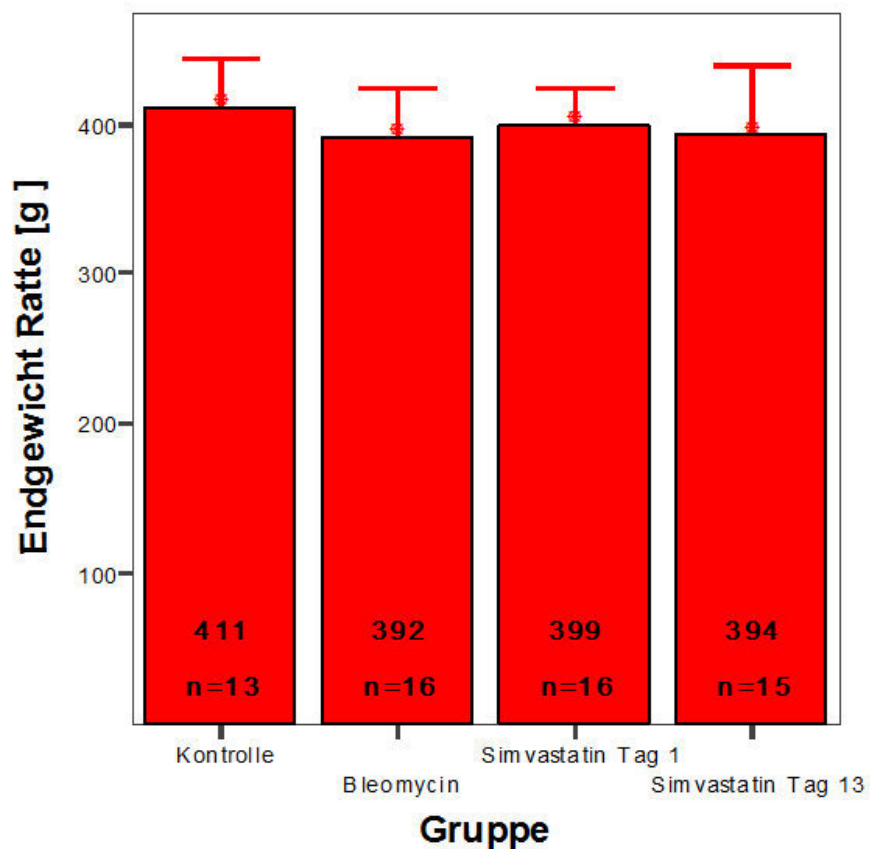


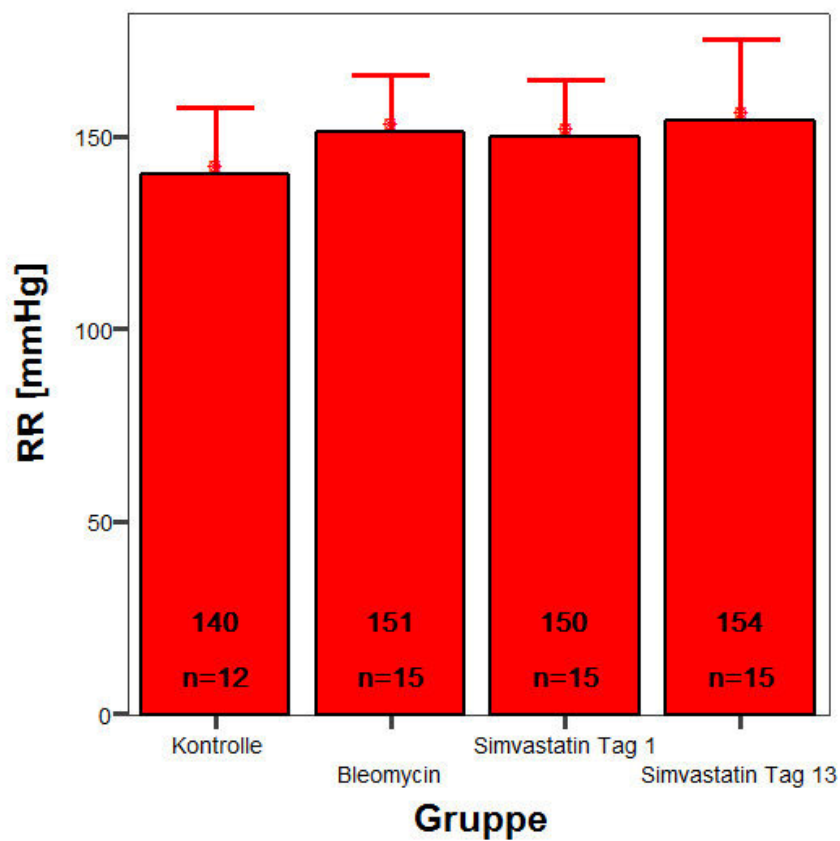
Tabelle 16: Signifikanzen Endgewicht

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,056	0,282	0,333
Bleomycin	0,056		0,250	0,607
Bleomycin + Simvastatin d 1	0,282	0,250		0,812
Bleomycin + Simvastatin d13	0,333	0,607	0,812	

3.3 Hämodynamische Messungen

3.3.1 Messung des systolischen Blutdrucks

Grafik 2: Systolischer Blutdruck

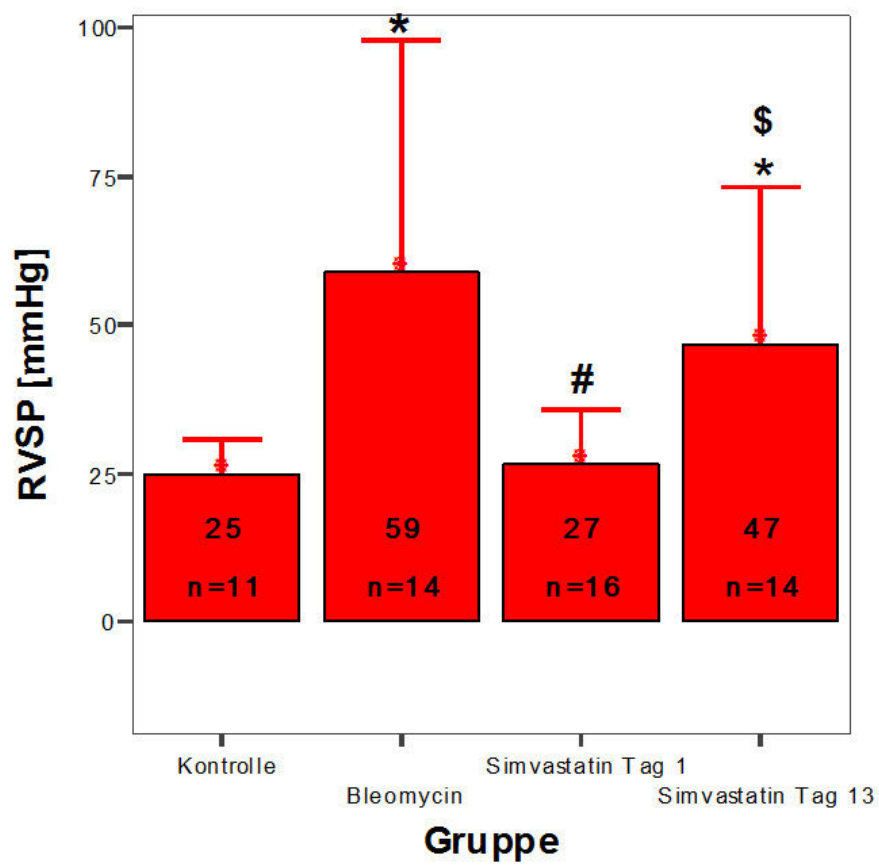


Tab 14: Signifikanzen systolischer Blutdruck

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,088	0,120	0,057
Bleomycin	0,088		0,867	0,377
Bleomycin + Simvastatin d1	0,120	0,867		0,305
Bleomycin + Simvastatin d13	0,057	0,377	0,305	

3.3.2 Messung des RVSP

Grafik 3: Signifikanzen RVSP



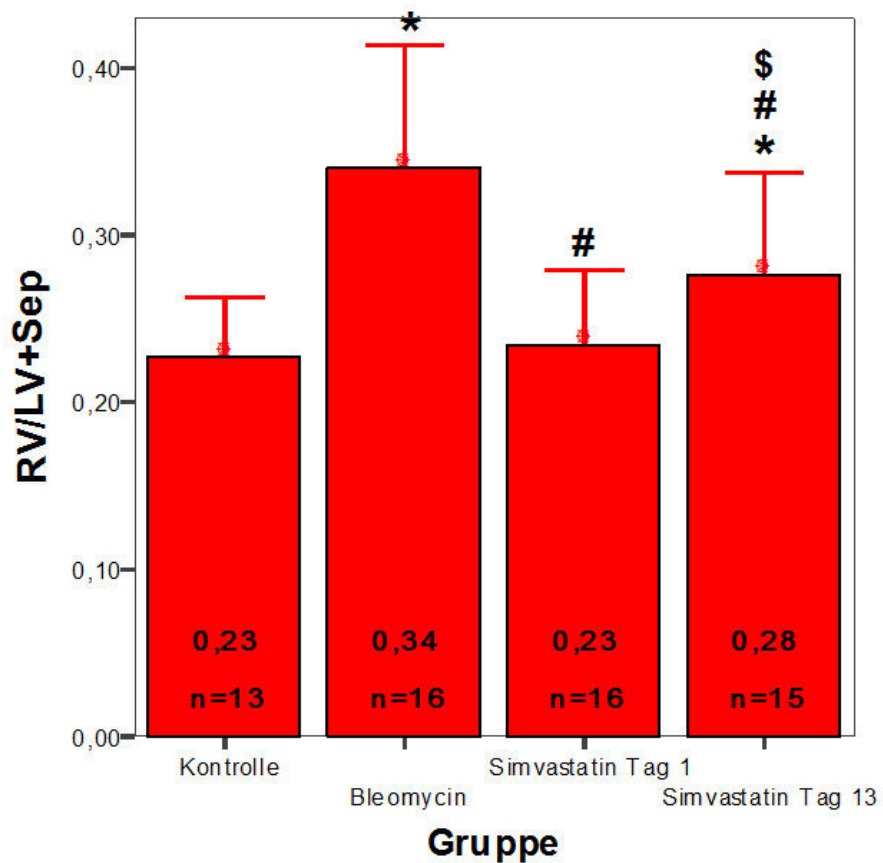
Tab 15: Signifikanzen RVSP

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,00	0,921	0,001
Bleomycin	0,00		0,000	0,300
Bleomycin + Simvastatin d1	0,921	0,000		0,001
Bleomycin + Simvastatin d13	0,001	0,300	0,001	

3.4 Bestimmung des vaskulären Remodelings

3.4.1 Rechtsherzquotient

Grafik 5: Signifikanzen rechtsventrikuläres Gewicht zu linkem Ventrikel und Septum

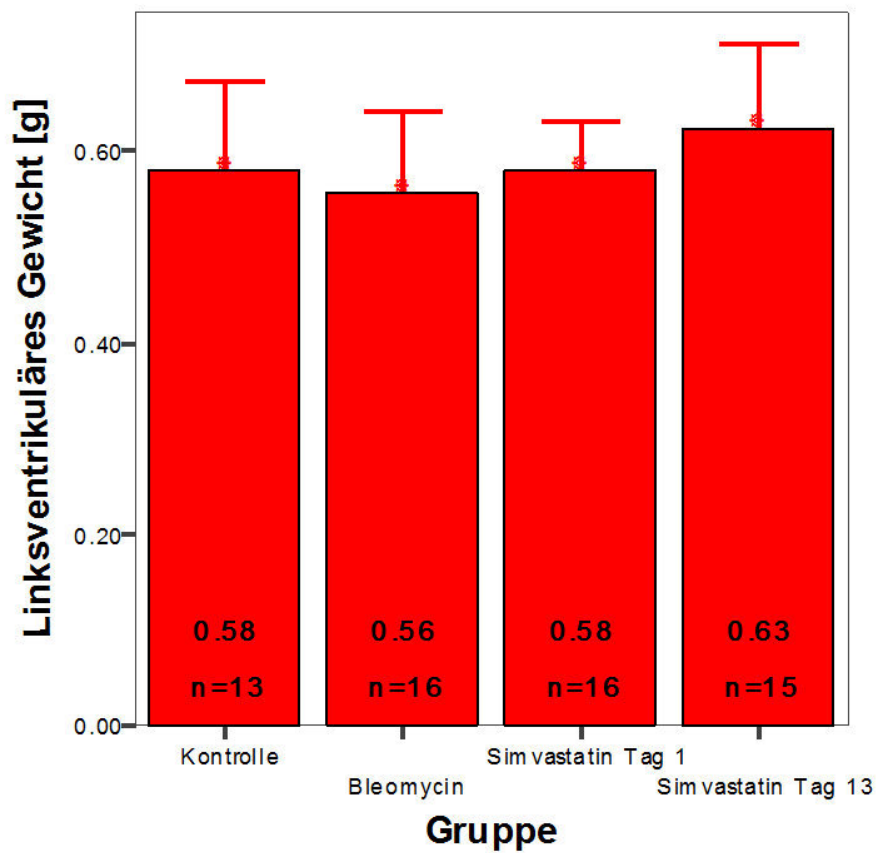


Tab 17: Signifikanzen rechtsventrikuläres Gewicht zu linkem Ventrikel und Septum

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,000	0,599	0,032
Bleomycin	0,000		0,000	0,010
Bleomycin + Simvastatin d1	0,599	0,000		0,036
Bleomycin + Simvastatin d13	0,032	0,010	0,036	

3.4.5 Linksventrikuläres Endgewicht

Grafik 6: Signifikanzen beim linksventrikulären Endgewicht

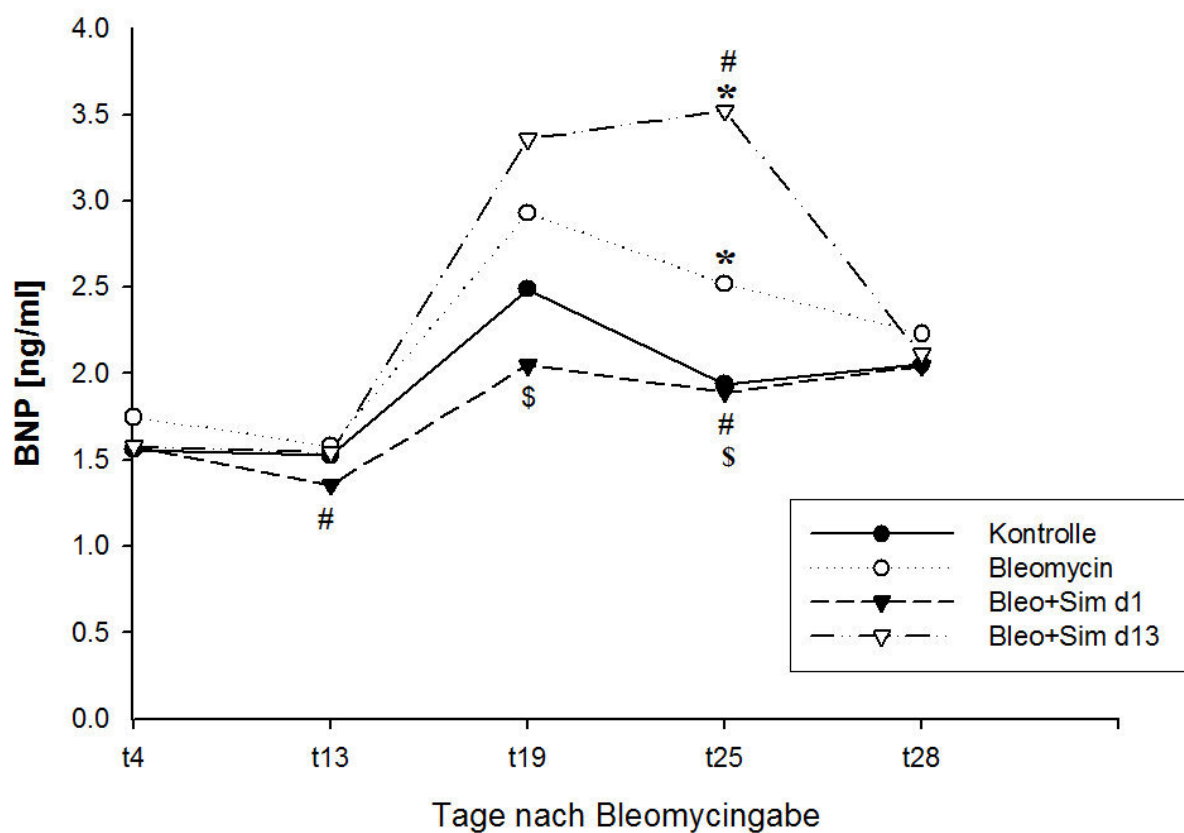


Tab 18: Signifikanzen linksventrikuläres Gewicht

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,345	0,496	0,517
Bleomycin	0,345		0,394	0,032
Bleomycin + Simvastatin d1	0,496	0,394		0,171
Bleomycin + Simvastatin d13	0,517	0,032	0,171	

3.5 BNP-Plasma-Bestimmung

Grafik 7: Signifikanzen im BNP-Plasma-Gehalt



Tab 19: Signifikanzen der BNP-Genexpression über den Versuchszeitraum (Tag 4)

Tag 4	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,159	0,897	0,936
Bleomycin	0,159		0,321	0,119
Bleomycin + Simvastatin d1	0,897	0,321		0,699
Bleomycin + Simvastatin d13	0,936	0,119	0,699	

Tab 20: Signifikanzen der BNP-Genexpression über den Versuchszeitraum (Tag 13)

Tag 13	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,419	0,072	0,947
Bleomycin	0,419		0,030	0,810
Bleomycin + Simvastatin d1	0,072	0,030		0,085
Bleomycin + Simvastatin d13	0,947	0,810	0,085	

Tab 21: Signifikanzen der BNP-Genexpression über den Versuchszeitraum (Tag 19)

Tag 19	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,385	0,208	0,052
Bleomycin	0,385		0,064	0,297
Bleomycin + Simvastatin d1	0,208	0,064		0,002
Bleomycin + Simvastatin d13	0,052	0,297	0,002	

Tab 22: Signifikanzen der BNP-Genexpression über den Versuchszeitraum (Tag 25)

Tag 25	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,028	0,826	0,001
Bleomycin	0,028		0,042	0,013
Bleomycin + Simvastatin d1	0,826	0,042		0,004
Bleomycin + Simvastatin d13	0,001	0,013	0,004	

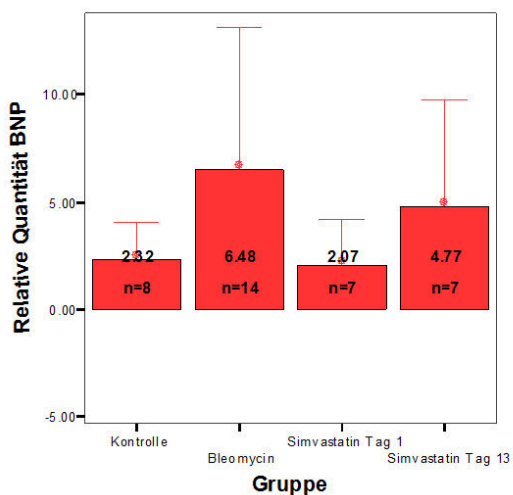
Tab 23: Signifikanzen der BNP-Genexpression über den Versuchszeitraum (Tag 28)

Tag 28	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,540	0,699	0,838
Bleomycin	0,540		0,277	0,220
Bleomycin + Simvastatin d1	0,699	0,277		0,827
Bleomycin + Simvastatin d13	0,838	0,220	0,827	

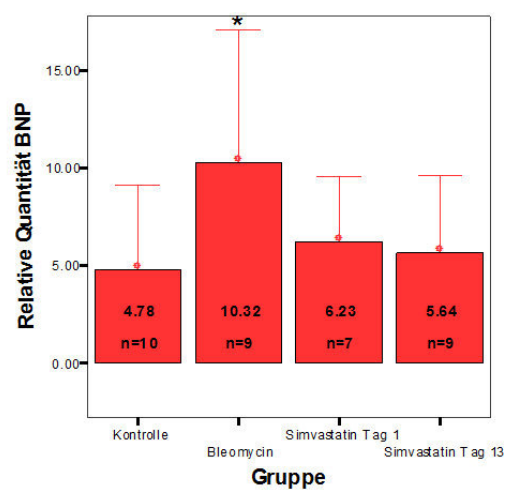
3.6 Genexpressionsanalyse

3.6.1 Quantifizierung der BNP-Genexpression des Herzens mittels Taqman™-Technologie

Grafik 8: Rechter Ventrikel :



Grafik 9: Linker Ventrikel :



Tab 24: Signifikanzen BNP-Genexpression LV

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,022	0,558	0,595
Bleomycin	0,022		0,125	0,122
Bleomycin + Simvastatin d1	0,558	0,125		0,525
Bleomycin + Simvastatin d13	0,595	0,122	0,525	

Tab 25: Signifikanzen BNP-Genexpression RV

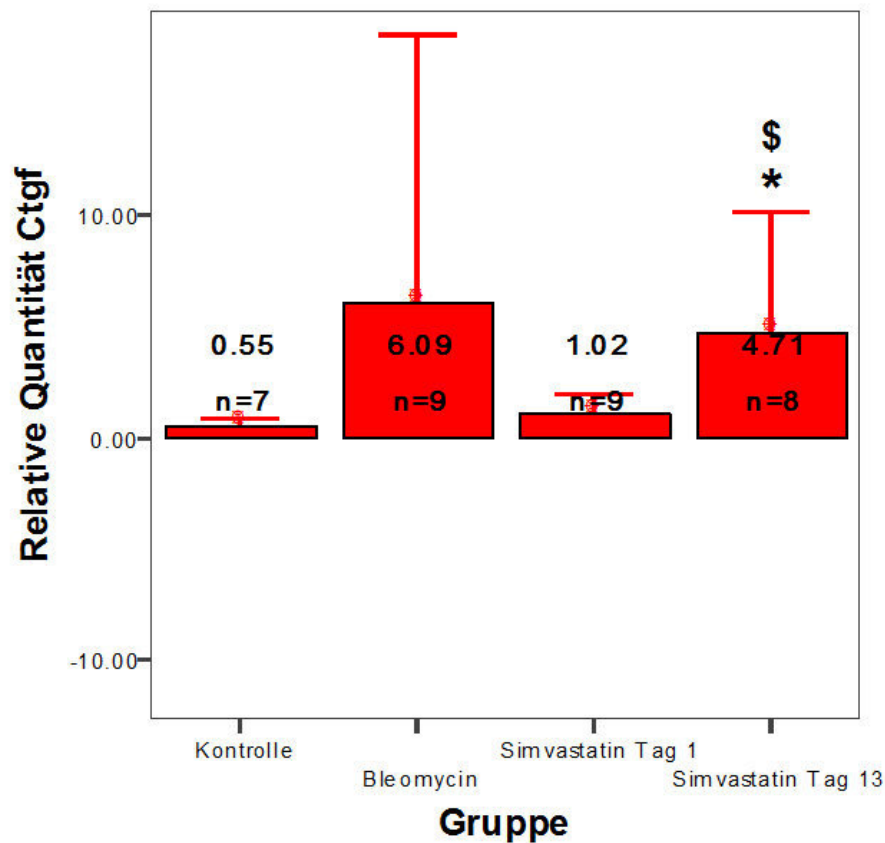
	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,076	0,728	0,418
Bleomycin	0,076		0,052	0,551
Bleomycin + Simvastatin d1	0,728	0,052		0,338
Bleomycin + Simvastatin d13	0,418	0,551	0,338	

3.7 Quantifizierung der Lungenfibrose mittels der ctgf-Genexpression

3.7.1 ctgf-Genexpression Herz

3.7.1.1 ctgf-Genexpression linker Ventrikel

Grafik 10: Signifikanzen ctgf-Genexpression linker Ventrikel:

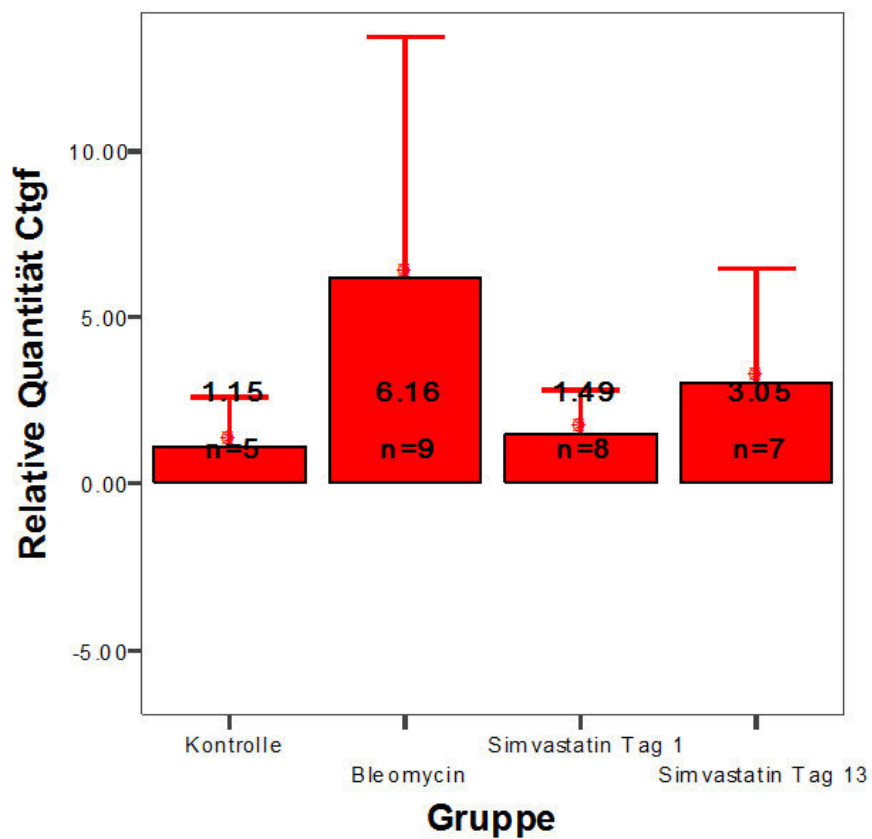


Tab 26: Signifikanzen ctgf-Genexpression linker Ventrikel

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,336	0,501	0,016
Bleomycin	0,336		0,331	0,700
Bleomycin + Simvastatin d1	0,501	0,331		0,043
Bleomycin + Simvastatin d13	0,016	0,700	0,043	

3.7.1.2 ctgf-Genexpression rechter Ventrikel

Grafik 11: Signifikanzen Genexpression rechter Ventrikel

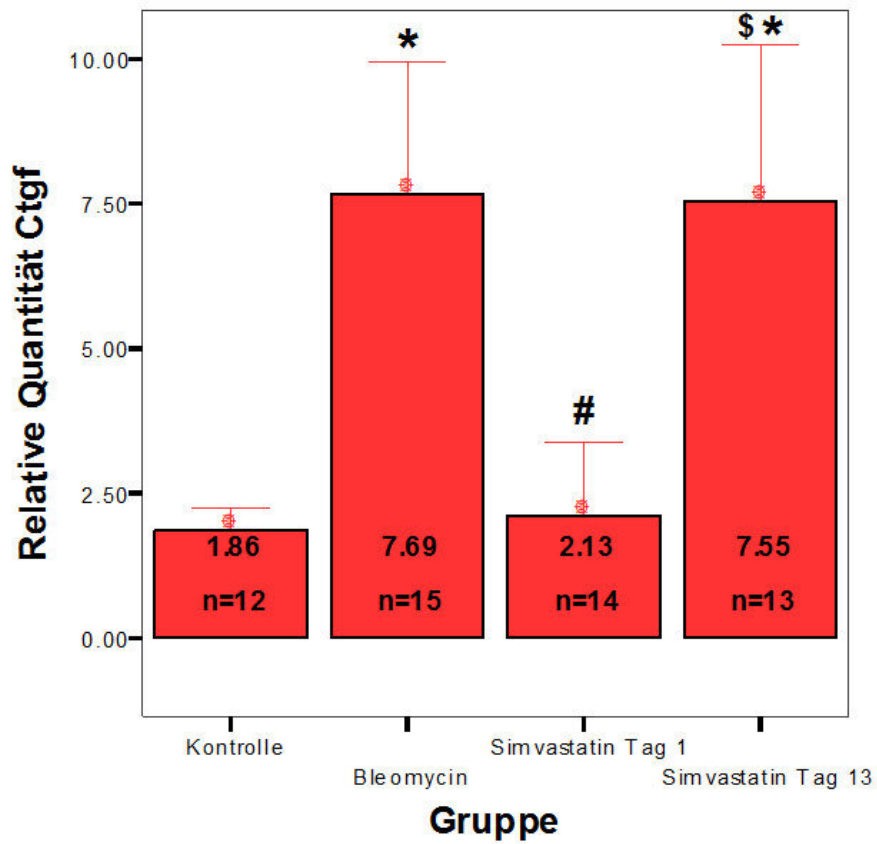


Tab 27: Signifikanzen CTGF-Genexpression rechter Ventrikel

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,053	0,380	0,223
Bleomycin	0,053		0,054	0,427
Bleomycin + Simvastatin d1	0,380	0,054		0,165
Bleomycin + Simvastatin d13	0,223	0,427	0,165	

3.7.2 ctgf-Genexpression Lunge

Grafik 12: Signifikanzen CTGF-Genexpression Lunge



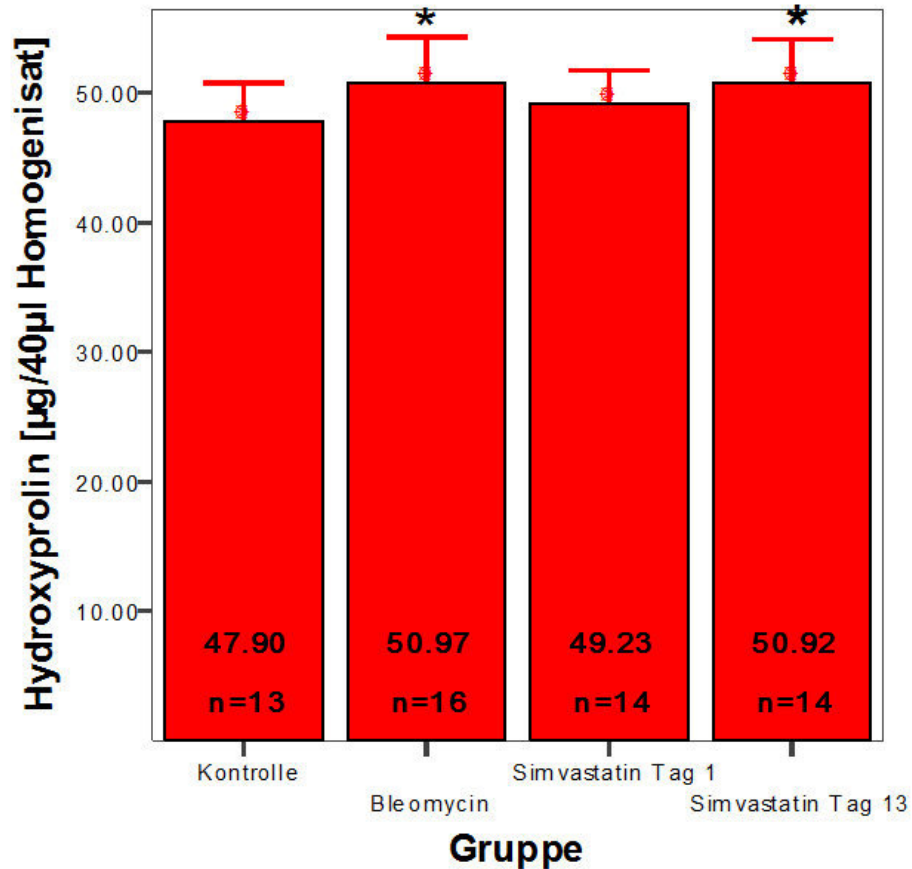
Tab 28: Signifikanzen CTGF-Genexpression Lunge

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,000	0,777	0,000
Bleomycin	0,000		0,000	0,662
Bleomycin + Simvastatin d1	0,777	0,000		0,000
Bleomycin + Simvastatin d13	0,000	0,662	0,000	

3.8 Quantifizierung der Lungenfibrose anhand des Hydroxyprolinegehaltes

3.8.1 Hydroxyprolinegehalt Lunge

Grafik 13: Signifikanzen Hydroxyprolinegehalt Lunge



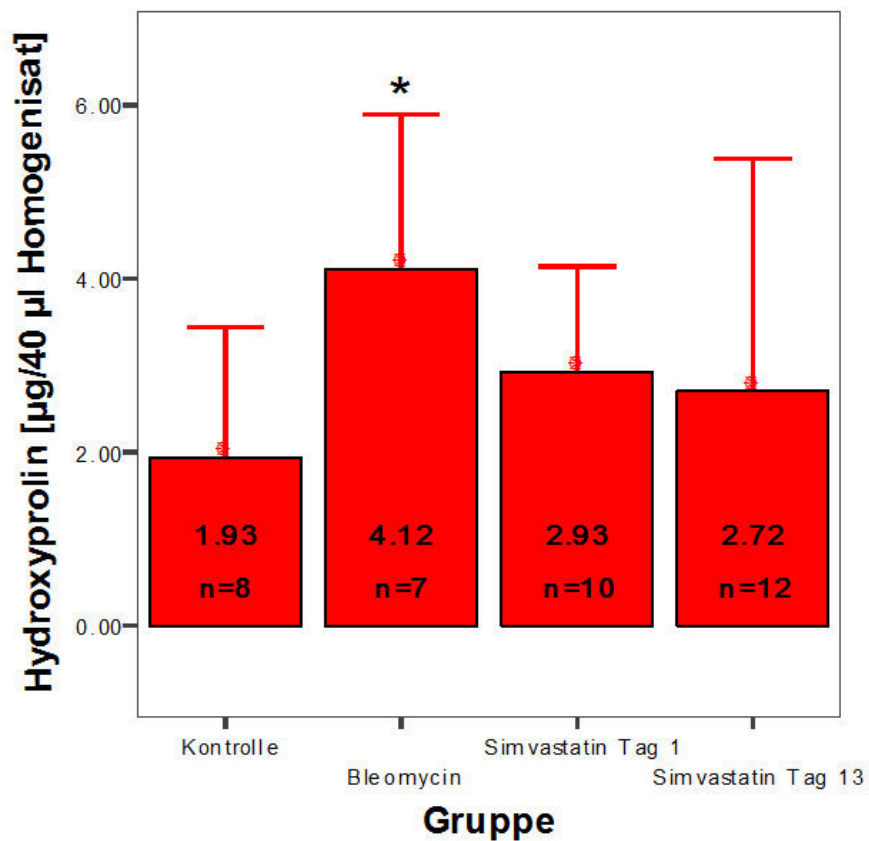
Tab 29: Signifikanzen Hydroxyprolinegehalt Lunge

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,024	0,190	0,008
Bleomycin	0,024		0,119	0,442
Bleomycin + Simvastatin d1	0,190	0,119		0,054
Bleomycin + Simvastatin d13	0,008	0,442	0,054	

3.8.2 Hydroxyprolingehalt Herz

3.8.2.1 Hydroxyprolingehalt linker Ventrikel

Grafik 14: Signifikanzen Hydroxyprolingehalt linker Ventrikel

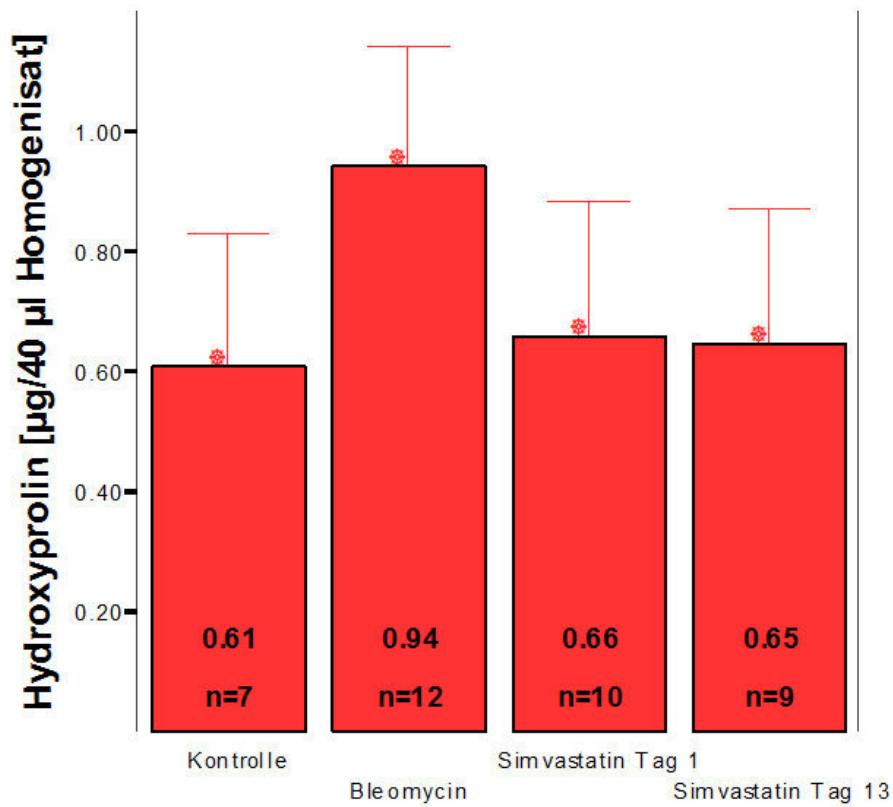


Tab 30: Signifikanzen Hydroxyprolingehalt linker Ventrikel

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,028	0,155	0,934
Bleomycin	0,028		0,118	0,052
Bleomycin + Simvastatin d1	0,155	0,118		0,121
Bleomycin + Simvastatin d13	0,934	0,052	0,121	

3.8.2.2 Hydroxyprolinegehalt rechter Ventrikel

Grafik 15: Signifikanzen Hydroxyprolinegehalt rechter Ventrikel



Tab 31: Signifikanzen Hydroxyprolinegehalt rechter Ventrikel

	Kontrolle	Bleomycin	Bleomycin + Simvastatin d1	Bleomycin + Simvastatin d13
Kontrolle		0,022	0,056	0,028
Bleomycin	0,022		0,056	0,028
Bleomycin + Simvastatin d1	0,056	0,056		0,054
Bleomycin + Simvastatin d13	0,028	0,028	0,054	

4. Diskussion:

In unserer Studie wurde zum ersten Mal die Wirkung einer Simvastatin-Behandlung auf eine PH der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose im Tiermodell der Ratte erprobt. Dabei handelt es sich um ein bereits etabliertes Modell zur Erforschung beider Entitäten (93, 94, 97). Die Tiere, die in obig beschriebener Versuchsanordnung Bleomycin intratracheal erhalten, entwickeln gewöhnlicherweise über einen Zeitraum von etwa 10 Tagen eine massive Lungenfibrose, deren Symptome sich in der Folge auch auf den Lungenkreislauf ausweiten, üblicherweise in Form einer pulmonalen Hypertonie. Infolge der Fibrosierungen in den kleinen Lungengefäßen kommt es zu einer Erhöhung der Drücke in der Lungenstrombahn und zu einer reflektorischen Vasokonstriktion. Dies wiederum führt über verschiedene Signalwege zur Ausbildung einer rechtsventrikulären Hypertrophie und dem Phänomen des vaskulären Remodelings. Um die Hypothese einer bessernden Wirkung einer Medikation bei beiden Krankheitsbildern, in diesem Falle der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und der dadurch verursachten pulmonalen Hypertonie zu prüfen, bedienten wir uns der in Methodik und Einleitung beschriebenen Versuchsanordnung:

Eine erste Gruppe, die sogenannte Kontroll-Gruppe, erhielt kein Bleomycin, während eine zweite Gruppe, die sogenannte Bleomycin-Gruppe, ausschließlich dieses Zytostatikum verabreicht bekam. Eine dritte Gruppe erhielt das genannte Statin ab Tag 1 der Bleomycin-Exposition im Sinne einer prophylaktischen Verabreichung, während einer vierten Gruppe der Cholesterinsynthesehemmer ab Tag 13, also bei bereits etablierter IPF und laut früherer Studien im Anfangsstadium einer pulmonalen Hypertonie im Sinne einer therapeutischen Gabe appliziert wurde. Nach 4 Wochen Versuchslaufzeit erbrachte die Versuchsreihe entsprechend der Zielsetzung mehrere aufschlussreiche Ergebnisse:

Ein besonderer Schwerpunkt der Studie war die Ermittlung der Leistungskapazität der Tiere. Hierzu kam ein Stufenbelastungstest mittels Laufband zum Einsatz, der mit dem 6-Minute-Walk vergleichbar ist, der in der Klinikroutine für die Verlaufskontrolle bei Pulmonaler Hypertonie eingesetzt wird. Am Ende der Versuchslaufzeit war die Kondition bei den Tieren der Bleomycin-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Es ergab sich erfreulicherweise eine signifikant bessere Kondition der Tiere in beiden Gruppen mit Simvastatin-Gabe im Vergleich zur Bleomycingruppe. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in der Leistungsfähigkeit zwischen beiden Gruppen mit Simvastatineinnahme festgestellt werden. Die Messung des Endgewichtes der Versuchstiere als weiterer Anhaltspunkt für eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit ergab trotz teilweise erheblicher Abweichungen im Rahmen der Messung der Leistungsfähigkeit keine signifikanten Unterschiede.

Anhand der Auswertungen der rechtsventrikulären Drücke im Versuchsverlauf zeigte sich, dass Simvastatin die Entstehung einer Pulmonalen Hypertonie auf dem Boden einer Lungenfibrose verhindern kann. So war der RVSP nach 4 Wochen in der Bleomycin-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe führte die Simvastatin-Gabe ab Tag 1 zu einem signifikant niedrigerem RVSP. Die Verabreichung von Simvastatin ab Tag 13 ergab lediglich einen Trend zur Signifikanz im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe. Daraus lässt sich immerhin schließen, dass Simvastatin die Ausbildung einer Pulmonalen Hypertonie durchaus verzögern, wenn nicht sogar deren Verlauf deutlich verbessern kann. Die Messung des systolischen Blutdrucks nach Belastung ergab im Vergleich der einzelnen Gruppen im Rahmen unserer vierwöchigen Versuchsreihe zunächst keine nennenswerten Signifikanzen. Es dürfte der kurzen Versuchszeit geschuldet sein, dass sich die im Folgenden beschriebenen Auswirkungen auf den Lungenkreislauf noch nicht auf das komplette Kreislaufsystem niedergeschlagen haben.

Ein weiterer Beweis für die These eines Benefits durch Simvastatin-Gabe konnte aus der verhinderten Hypertrophierung des rechten Ventrikels geschlossen werden. Wir entnahmen den Tieren die Herzen, vermaßen das Gewicht der rechten und linken Ventrikel und des Septums und errechneten den sog. Herzquotienten (Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels (RV) zum Gewicht des linken Ventrikel (LV) + Septum (Sep)), um das Ausmaß der rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH) zu bestimmen. Aus dem Quotienten kann man Rückschlüsse auf die Ausprägung der pulmonalen Hypertonie ziehen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe besaß die Bleomycin-Gruppe ein signifikant erhöhtes rechtsventrikuläres Endgewicht in Relation zur Summe von linkem Ventrikel und Septum. Die RVH war im Vergleich zur Bleomycingruppe in der Gruppe mit Simvastatin ab Tag 1 und in der Gruppe mit Simvastatin ab Tag 13 signifikant erniedrigt. Wie bei den Ergebnissen der systolischen Blutdrücke, so ergaben sich auch bei der Messung der Endgewichte der linken Ventrikel keine nennenswerten Signifikanzen.

Als weiteren Marker für den Grad einer RVH auf molekularer Ebene wurden zum einen das zirkulierende BNP-Level, zum anderen sowohl rechtsventrikuläre als auch die linksventrikuläre BNP-Expression bestimmt. In der Bleomycin-Gruppe waren die im Serum gemessenen BNP-Werte, wie zu erwarten, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Im Vergleich zur Bleomycingruppe führte die Gabe von Simvastatin ab Tag 1 zu einem signifikant niedrigeren BNP-Gehalt im Serum. Dabei konnte sogar ein annähernd normwertiges zirkulierendes BNP-Level bei an Tag 1 mit Simvastatin behandelten Tieren nachgewiesen werden. Darüber hinaus bewirkte die Gabe von Simvastatin ab Tag 13 eine Tendenz hin zur Signifikanz im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe. Die BNP-Genexpression des rechten Ventrikels der Bleomycin-Gruppe war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich zur Bleomycingruppe führte die Applikation von Simvastatin ab Tag 1 zu einer signifikant niedrigeren BNP-Genexpression des rechten Ventrikels. Auch

hier konnte eine fast normwertige rechtsventrikuläre BNP-Expression bei ab Tag 1 mit Simvastatin behandelten Tieren ermittelt werden. Die Simvastatin-Gabe ab Tag 13 führte auch hier zu einer Tendenz zur Signifikanz im Vergleich zur Bleomycin-Gruppe. Die Genexpression von BNP im linken Ventrikel hielt sich in allen Gruppen auf ähnlichem Niveau. Interessanterweise fanden sich auch hier bei der linksventrikulären BNP-Expression Signifikanzen im Vergleich zwischen Bleomycingruppe und der Gruppe mit Bleomycin und Simvastatin ab Tag 1. Anhand der Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass Simvastatin in prophylaktischer Gabe die Entstehung einer PH auf dem Boden einer IPF verhindern und darüber hinaus die Auswirkungen einer bereits etablierten PH auf dem Boden einer IPF deutlich lindern bzw. die weitere Verschlechterung der pulmonalen Druckverhältnisse verhindern kann.

Auch im Hinblick auf die mögliche medikamentöse Behandlung einer Lungenfibrose konnten in unserer Studie analog zu früheren Versuchsreihen gute Ergebnisse erzielt werden (94 - 97). Die Entwicklung einer Bleomycin-induzierten IPF ist gekennzeichnet durch einen entzündlichen Prozess mit initial gesteigerter Proliferation von profibrotischen Markern. Diesem folgt eine fibrotische Phase, die den Ergebnissen einiger Studien zufolge etwa 10 Tage nach der Bleomycin-Instillation beginnt (98 - 100). In unserer Versuchsanordnung erfolgte eine Untersuchung des Fibrosierungsgrades auf RNA-Ebene mittels der Genexpressionsanalyse des Bindegewebs-Wachstumsfaktors *ctgf*. Eine erhöhte Expression dieses Proteins konnte bei der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose nachgewiesen werden. Die Genexpression von *ctgf* eignet sich darüber hinaus für die Ermittlung der Ausprägung und des Grades eines bestehenden fibrotischen Prozesses, sowie für Verlaufskontrollen. Bei der Messung der *ctgf*-Genexpression der Lunge zeigten sich, wie zu erwarten, ausgeprägte Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen: Die *ctgf*-Expression in der Lunge war in der Bleomycin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Verabreichung von Simvastatin ab Tag 1 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikant niedrigeren *ctgf*-Expression. Die Genexpression von *ctgf* bei den Ratten aus der Gruppe mit Simvastatin ab Tag 13 nach Bleomycingabe blieb aber weitestgehend erhöht. Bei der Messung der *ctgf*-Expression des rechten Ventrikels ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse, jedoch passend zu den zuvor beschriebenen Werten der Genexpression der Lunge eine eindeutige Tendenz in Richtung Signifikanz bei der Simvastatin-Gabe ab Tag 1. Entsprechend konnten wir signifikant verzögerte Entzündungsreaktionen im Bereich des linken Ventrikels bei Simvastatin-Gabe ab Tag 13 im Vergleich zur Kontrollgruppe und derjenigen mit Simvastatin ab Tag 1 messen.

Zur Quantifizierung der Fibrosierung auf Proteinebene wurde die Bestimmung des Hydroxyprolin-Spiegels des entnommenen Lungengewebes verwendet. Eine Messung des Hydroxyprolinwertes (HPC) lässt Rückschlüsse auf den Gehalt an Kollagen und, auf unsere Versuchsanordnung bezogen, auf den Grad der Fibrosierung des untersuchten Gewebes zu. Der HPC der Lunge war in der Bleo-

mycin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Behandlung mit Simvastatin ab Tag 1 zeitigte einen signifikant niedrigeren HPC im Vergleich zur Bleomycingruppe, wohin gegen keine nennenswerte Veränderung des HPC in der Gruppe mit Bleomycin und Simvastatin ab Tag 13, verglichen mit der Bleomycin-Gruppe, festgestellt werden konnte. Dies lässt analog zu anderen Studien vermuten, dass der Effekt des Simvastatins in unserer Versuchsanordnung hauptsächlich auf seiner antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkung und weniger auf spezifisch-antifibrotischen Eigenschaften beruht (100 - 103). Entsprechend verhinderte die prophylaktische Gabe vom Simvastatin in unserer Versuchsreihe die Entstehung einer Bleomycin-induzierten IPF, konnte aber eine bereits entstandene IPF nicht rückgängig machen oder eine weitere Progression verhindern. Auf eine bereits entstandene IPF hatte die Simvastatin-Gabe im Sinne einer therapeutischen Verabreichung somit keinen nennenswerten Effekt.

Somit legt unsere Studie die Vermutung nahe, dass Simvastatin auf sehr unterschiedliche Weise auf IPF und PH wirkt. Es zeigte sich außerdem, dass der Zeitpunkt des Therapiebeginns der Simvastatin-Behandlung bei der Wirkung auf die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie eindeutig weniger entscheidend ist als bei der Lungenfibrose. Der genaue Mechanismus, durch den Simvastatin seine bessernden Effekte auf eine PH bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose hat, bleibt ungeklärt.

Wie bereits kürzlich in einer unserer Vorgänger-Studien beschrieben, zeigten Bleomycin-behandelte Tiere vier Wochen nach Verabreichung erhebliche Leistungsdefizite bei der Messung der Ausdauer auf einem durch unsere Abteilung speziell entwickelten Laufband für Ratten (97). Obwohl eine relativ große Bandbreite in der gemessenen Leistungskapazität der mit Bleomycin behandelten Versuchstiere festgestellt werden konnte, zeigte sich eine Verbesserung der Leistungskapazität durch Simvastatingabe in der Einzelmessung sowohl in prophylaktischer als auch in therapeutischer Gabe als Indikator einer geringeren Ausprägung einer PH bei den mit Statin behandelten Tieren.

Nachdem die Entstehung einer IPF nur in prophylaktischer Verabreichung von Simvastatin eingeschränkt werden konnte, lässt sich aus den Messergebnissen folgern, dass die Einschränkung der Leistungsfähigkeit in erster Linie durch die PH und nicht durch die IPF verursacht wird. Andererseits konnte eine präventive Gabe die volle Leistungsfähigkeit, wie sie in der Kontrollgruppe gemessen wurde, nicht wiederherstellen. Dies könnte durch Veränderungen in der Lungenfunktion und der pulmonalen Hämodynamik, die nicht in Ruhe gemessen werden können, bedingt sein (104). Unsere Studie stützt jedoch die Annahme, dass die PH in signifikanter Weise zur Minderung der Leistungsfähigkeit bei Patienten mit einer IPF beiträgt und eine Behandlung dieser Begleiterkrankung den an einer IPF erkrankten Patienten somit eine deutliche Besserung der Lebensqualität verschaffen könnte (105 - 109). Auch sowohl die in der Einleitung beschriebene erhöhte Mortalität als

auch die deutlich eingeschränkte Lebenserwartung bei ausgeprägter Manifestation beider Krankheitsbilder soll hier noch einmal erwähnt werden.

Eine gewisse Einschränkung in dem in unserer Studie verwendeten Versuchsaufbaus bestand darin, dass der genaue Mechanismus, über den Simvastatin sowohl PH und IPF verbessert, nicht evaluiert werden konnte. Darüber hinaus wurde in der Versuchsreihe nicht die Hämodynamik bei Anstrengung bestimmt, die letztendlich erst komplett Aufschluss über die rechtsventrikuläre Funktionstüchtigkeit und damit die genaue Ursache der gemessenen Konditionsverschlechterung erbringen könnte. Ferner wurden keine histologischen Untersuchungen des untersuchten Gewebes zur Bestimmung des Ausmaßes der IPF in unserer Versuchsreihe durchgeführt. Dennoch handelt es sich bei den bestimmten Werten einer zwar mäßigen, aber tendenziell signifikanten Erhöhung des HPC, sowie einer erhöhten ctgf-Expression, um schlüssige und allgemeingültige Nachweise einer etablierten IPF. Letztlich konnte in unserer Versuchsreihe gezeigt werden, dass die Gabe von Simvastatin bei Bleomycin-induzierter IPF unterschiedliche Auswirkungen auf eine IPF, die daraus resultierende PAH und die Leistungsfähigkeit der untersuchten Probanden abhängig vom Zeitpunkt seiner Verabreichung hat. Während eine prophylaktische Gabe die Entstehung einer IPF verhindern kann, ergab sich bei bereits etablierter IPF keine Besserung. Im Gegensatz dazu ließ sich die PH und die Leistungsfähigkeit am Laufband bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose durch prophylaktische und therapeutische Gabe von Simvastatin durchaus verbessern.

Ob Statine letztlich eine Behandlungsoption bei IPF beim Menschen darstellen, bleibt weiterhin offen und muss in weiterführenden Studien gesondert analysiert werden. Unsere Ergebnisse stimmen jedoch zuversichtlich.

5. Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
M	Mol(ar)
ANP	engl. Atrial natriuretic peptide/ dt. Atriales natriuretisches Peptid
Aqua dest.	Aqua destillata
BMPs	Bone morphogenetic proteins
BNP	engl. Brain natriuretic peptide/ dt. B-Typ natriuretisches Peptid
bP	Basenpaare
Ca ⁺⁺	Calcium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	engl. Complementary DNA/ dt. Komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanisinmonophosphat
COPD	engl. Chronic obstructive pulmonary disease/ dt. chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CP	Crossing point
C _T	Threshold cycle
d	engl. Day/ dt. Tag
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat

dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat
ECs	engl. Endothelial cells/ dt. Endothelzellen
EDGF	Endothelium derived growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ET-1	Endothelin-1
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer
g	Gramm
g	Zentrifugalbeschleunigung
GDF	Growth and differentiation factors
G-Protein	Guaninnucleotidbindendes Protein
h	engl. hour/dt. Stunde
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
HIV	Human immunodeficiency virus
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
log	logarithmisch
Lsg.	Lösung
lv	linksventrikulär
m	Meter

mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min.	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	engl. Mean pulmonary arterial pressure/ dt. Mittlerer pulmonalarterieller Druck
mRNA	messenger ribonucleotid acid/ dt. Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	engl. Nitric oxid/ dt. Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NW	Nebenwirkung
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
-OH	Hydroxylgruppe
PH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PASMCs	engl. Pulmonary arterial smooth muscle cells/ dt. Pulmonalarterielle glatte Myozyten
PCR	engl. Polymerase chain reaction/ dt. Polymerase Kettenreaktion
PDE-5	Phosphodiesterase Typ 5
PDGF	engl. Platelet derived growth factor
pH	pH-Wert
pRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR

PVR	engl. Pulmonary vascular resistance/ dt. Pulmonalvaskulärer Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotor speed per minute
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
RT	Reverse Transkriptase
rv	rechtsventrikulär
RVH	rechtsventrikuläre Hypertrophie
RVSP	engl. Right ventricular systolic pressure/ dt. Rechtsventrikulärer systolischer Druck
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SBD	Systolischer Blutdruck
SMCs	engl. Smooth muscle cells/ dt. glatte Myozyten
ss	engl. single stranded/ dt. einzelsträngig
Stammlsg.	Stammlösung
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamine
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA Puffer
TGF	engl. transforming growth factor
TPR	engl. Total pulmonary resistance/ dt. Gesamter pulmonaler Widerstand
V	Volt
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor dt. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VSMCs	engl. Vascular smooth muscle cells/ dt. vaskuläre glatte Myozyten
WHO	World Health Organization

6. Literaturverzeichnis:

- (1) Behr J., Ryu JH. Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 31: 1357-1367, 2008
- (2) Olschewski H. Dana Point: Was ist neu in der Diagnostik der Pulmonalen Hypertonie? *Dtsch Med Wochenschr.* 133:180-182, 2008
- (3) Boutou AK, Pitsiou GG, Trigonis I, Papakosta D, Kontou PK, Chavouzis N, Nakou C, Argyropoulou P, Wasserman K, and Stanopoulos I. Exercise capacity in idiopathic pulmonary fibrosis: the effect of pulmonary hypertension. *Respirology* 16: 451-458, 2011
- (4) Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD, Ahmad S, and Shorr AF. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis: *Chest* 129: 746-752, 2006
- (5) Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, Holzapfel M, Giehl W, Vogeser W, and Behr J: Brain natriuretic peptide and exercise capacity in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 360-365, 2004
- (6) Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA, and Ryu JH. The Impact of Pulmonary Hypertension on Survival in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 128: 616S-a-617, 2005
- (7) Lettieri C.J., Nathan S.D., Barnett S.D., Ahmad S., Shorr A.F.. Prevalence and outcome of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis *Chest* 129:746-752, 2006
- (8) Patel N.M., Lederer D.J., Borczuk A.C., Kawut S.M.. Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 132:998-1006, 2007
- (9) Allen JT, Knight RA, Bloor CA, and Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 693-700, 1999
- (10) Coward WR, Saini G, and Jenkins G. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 4: 367-388, 2010; Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122: 286S-289S, 2002
- (11) Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, and Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 145: 114-125, 1994
- (12) Khalil N., A.H. Greenberg. The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis. *Ciba Found. Symp.* 157:194-207, 1991
- (13) Letterio J.J., A.B. Roberts. Transforming growth factor-beta-1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 59:769-774, 1996

- (14) Yang Y.A., O. Dukhanina, B. Tang, M. Mamura, J.J. Letterio, J. MacGregor, S.C. Patel, S.Khozin, Z.Y. Liu, J. Green, M.R. Anver, G. Merlino, L.M. Wakefield. Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without advert side effects.J. Clin.Invest.109:1607-1615, 2002
- (15) Sime P.J., Z. Xing, F.L. Graham, K.G.Gauldie. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung.J.Clin.Invest.100:768-770, 1997
- (16) Zhang H.Y.,M. Gharaee-Kermani, K. Zhang, S.H. Phan. Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.Am.J.Pathol.148:527-537, 1996
- (17) Roy S.G., Y. Nozaki, S.H. Phan. Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation form rat lung fibroblasts.Int.J.Biochem.Cell Biol.33:723-734, 2001
- (18) Leask A, Holmes A, Black CM, and Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. J Biol Chem 278: 13008-13015, 2003
- (19) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, and Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor B-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. The FASEB Journal 13: 1774- 1786, 1999
- (20) Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-B action on fibroblasts. Cytokine & Growth Factor Reviews 8: 171, 1997
- (21) Allen JT, Knight RA, Bloor CA, and Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Cell Mol Biol 21: 693-700, 1999
- (22) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, BrodyA, and Friedman M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. Am J Physiol 275: L365-371, 1998
- (23) Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, and Sawai T:Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. European Respiratory Journal 17: 1220-1227, 2001
- (24) Richter A.,Yeager M.E.,Zaiman A.,Cool C.D.,Voelkel N.F.,Tuder R.M.. Impaired transforming growth factor- β signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension.Am.J.Respir.Crit.Care Med.170:1340-1348, 2004
- (25) Ask K.,Martin G.E.,Kolb M.,Gauldie J.. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls.Proc.Am.Thorac.Soc.3:389-393, 2006

- (26) Schermuly R.T., Dony E.,Ghofrani H.A., Pullamsetti S.,Savai R.,Roth M.,Sydykov A.,Lai Y.J.,Weissmann N.,Seeger W.,et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition.J.Clin.Invest.115:2811-2821, 2005
- (27) Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F.. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension.N.Engl.J.Med.353:1412-1413, 2005
- (28) Charbeneau R.P., Peters-Golden M.. Eicosanoids:mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease.Clin.Sci.108:479-491, 2005
- (29) Budhiraja R.,Tuder R.M.,Hassoun P.M.. Endothelial dysfunction in puolmonary hypertension.Circulation 109:159-165, 2004
- (30) Giaid A.,Michel R.P.,Stewart D.J.,Sheppard M.,Corrin B., Hamid Q.. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis.Lancet 341:1550-1554, 1993
- (31) Saleh D., Furukawa K. Tao M.S., Maghazachi A.,Corrin B.,Yanagisawa M., Barnes P.J.,Giaid A.. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-1-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis:possible involvement of proinflammatory cytokines.Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.16:187-193, 1997
- (32) Trakada G.,Spiropoulos K..2001.Arterial endothelin-1 in interstitial lung disease patients with pulmonary hypertension.Monaldi Arch Chest Dis.56:379-383
- (33) King T.E.,Behr J.,Brown K.K.,du Bois R.M., Raghu G.. Bosentan use in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF):results of the placebo-controlled BUILD-1 study.Proc.Am.Thorac.Soc.3:A524, 2006
- (34) Eberlein, Heusinger-Ribeiro J, and Goppelt-Strube M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). Br J Pharmacol 133: 1172-1180, 2001
- (35) Watts KL, Sampson EM, Schultz GS, and Spiteri MA. Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 32: 290-300, 2005
- (36) Watts KL, and Spiteri MA. Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor-beta is abrogated by simvastatin via a Rho signaling mechanism. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287: L1323-1332, 2004
- (37) Patel R, Naguch SF, Tsybouleva N, Abdellatif M, Lutucuta S, Kopelen HA, Quinones MA, Zoghbi WA, Entman ML, Roberts R, et al.: Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic crdiomyopathy. Circulation; 104: 317-324, 2001

- (38) Qin J Zhang Z, Liu J, Sun L, Hu L, Cooper ME, Cao Z: Effects of the combination of an angiotensin II antagonist with an HMG-CoA reductase inhibitor in experimental diabetes. *Kidney Int*; 64: 565-571, 2003
- (39) Kim SI, Kim HJ, Han DC, Lee HB: Effect of lovastatin on small GTP binding proteins and on TGF-beta1 and fibronectin expression. *Kidney Int Suppl*; 77: S88-S92, 2000
- (40) Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T: Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J*; 17: 1220-1227, 2001
- (41) Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, Suganami T, Yahate K, Fujinaga Y, Tanaka I, et al.: Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*; 282: F933-F942, 2002
- (42) Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A: Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatogastroenterology*; 49: 133-135, 2002
- (43) King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, Toze JA, Colby TV, Waldron JA Jr, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM: Idiopathic pulmonary fibrosis. relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*; 164: 1025-1032, 2001
- (44) Watts KL, Spiteri MA: Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor (beta) is abrogated by simvastatin via a Rho signalling mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 287: L1323-L1332, 2004
- (45) Goppelt-Struebe M, Hahn A, Iwanciw D, Rehm M, Banas B: Regulation of connective tissue growth factor (ccn2; ctgf) gene expression in human mesangial cells; modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Mol Pathol*; 54:176-179, 2001
- (46) Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M: Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol*; 133: 1172-1180, 2001
- (47) Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Balmforth AJ, Ball SG: Simvastatin reduces human atrial myofibroblast proliferation independently of cholesterol lowering via inhibition of RhoA. *Cardiovasc Res*; 61:745-755, 2004
- (48) Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho GTPase-induced down-regulation of p27 kip1. *J Biol Chem*; 274: 1926-2193, 1999

- (49) Roumbouts K, Kisanga E, Hellemans K., Wielant A, Schuppan D, Geerts A: Effect of HMG CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*; 38:564-572, 2003
- (50) Tan A, Levrey H, Dahm C, Polunovsky VA, Rubins J, Bitterman PB: Lovastatin induces fibroblasts apoptosis in vitro and in vivo: a possible therapy for fibroproliferative disorders. *Am J Respir Crit Care Med*; 159: 220-227, 1999
- (51) Parker E, Bloor Ca, Spiteri MA, Allen JT: Simvastatin (Zocor) induces lung fibroblast apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 164: s710.(Abstr.), 2001
- (52) Archer SL, Michelakis ED: An evidence-based approach to the management of pulmonary hypertension. *Curr Opin Cardiol*; 21: 385-392, 2006
- (53) Ali O, Wharton J, Gibbs JS, et al. Emerging therapies for pulmonary hypertension. *Expert Opin Invest Drugs*; 16: 803-818, 2007
- (54) Girgis RE, Ma SF, Ye S, Grigoryev DN, Li D, Hassoun PM, Tudor RM, Johns RA, and Garcia JG. Differential gene expression in chronic hypoxic pulmonary hypertension: effect of simvastatin treatment. *Chest* 128: 579S, 2005
- (55) Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, and Kao PN. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1403-1408, 2002
- (56) Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, Qiu D, Benson G, Pearl RG, and Kao PN. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 108: 1640-1645, 2003
- (57) Rakotoniaina Z, Guerard P, Lirussi F, Goirand F, Rochette L, Dumas M, and Bardou M. The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374: 195-206, 2006
- (58) Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, and Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *Eur Heart J* 24: 225-248, 2003
- (59) Fouty BW, and Rodman DM. Mevastatin can cause G1 arrest and induce apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells through a p27Kip1-independent pathway. *Circ Res* 92: 501-509, 2003
- (60) Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, and Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101: 2711- 2719, 1998

- (61) Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, and Lamas S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 87: 616-622, 2000
- (62) Hu H, Sung A, Zhao G, Shi L, Qiu D, Nishimura T, and Kao PN. Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 59-64, 2006
- (63) Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H, Karaki H, and Ozaki H. Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2335-2342, 2005
- (64) Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, and Kao PN. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1403-1408, 2002
- (65) Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, Qiu D, Benson G, Pearl RG, and Kao PN. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 108: 1640-1645, 2003
- (66) Rakotoniaina Z, Guerard P, Lirussi F, Goirand F, Rochette L, Dumas M, and Bardou M. The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 374: 195-206, 2006
- (67) Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Cool C, Wood K, Tudor RM, Burns N, Kasper M, and Voelkel NF. Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L668-676, 2006
- (68) Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23 729-736, 2003
- (69) Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 45: 89-118, 2005
- (70) Loirand G, Guerin P, Pacaud P: Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*; 98: 322-334, 2006
- (71) Girgis RE, Mozammel S, et al.: Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1105-L1110
- (72) Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 96: 24F-33F, 2005
- (73) Corsini A, Maggi FM, Catapano AL: Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 31: 9-27, 1995

- (74) Nishimura T, Faul JF, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN: Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1403-1408, 2003
- (75) Kozai s.o.; Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho-GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274: 21926-21931, 1999
- (76) Quinlan TR, LI D, Laubach VE, Shesely EG, Zhou N, Johns RA. eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L641-L650, 2000
- (77) Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 89-118, 2005
- (78) Simko F. Statins: a perspective for left ventricular hypertrophy treatment. *Eur J Clin Invest*; 37: 681-691, 2007
- (79) Carlin CM, Peacock AJ, Welsh DJ: Fluvastatin inhibits hypoxic proliferation and p38 MAPK activity in pulmonary artery fibroblasts. *Am Respir Cell Mol Biol*; 37; 447-456, 2007
- (80) Ali O, Wharton J, Gibbs JS, et al. Emerging therapies for pulmonary hypertension. *Expert Opin Invest Drugs*; 16: 803-818, 2007
- (81) Loirand G, Guerin P, Pacaud P: Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*; 98: 322-334, 2006
- (82) Girgis RE, Li D, Zhan X, et al.: Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285; H938-H945, 2003
- (83) Guerard P, Rakotoniaina Z, Goriand F, et al.: The HMG-CoA reductase inhibitor, pravastatin, prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat through reduction of endothelial cell apoptosis and overexpression of eNOS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 373: 40-405, 2006
- (84) Murata T, Kinoshita K, Hori M, et al.: Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25: 2335-2342, 2005
- (85) Nishimura T, Faul JL, Berry G, et al.: Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*; 166: 1403-1408, 2002
- (86) Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, et al.: Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 291: L668-676, 2006

- (87) Nishimura T, Vaszar LT, Fal JL, et al.: Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation*; 108: 1640-1645, 2003
- (88) Girgis RE, Mozammel S, Champion HC, et al.: Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292: L1150-L1110, 2007
- (89) Nishimura T, Faul JL, Berry G, et al.: Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*; 166: 1403-1408, 2002
- (90) Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, Qiu D, Benson G, Pearl RG, and Kao PN. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 108: 1640-1645, 2003
- (91) Satoh K, Fukumoto Y, Nakano M, et al. Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1. *Cardiovasc Res*; 81: 226-234, 2009
- (92) Mutsaers SE, Marshall RP, Goldsack NR, Laurent GJ, and McAnulty RJ. Effect of endothelin receptor antagonists (BQ-485, Ro 47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 11: 221-225, 1998
- (93) Sato S, Kato S, Arisaka Y, Takahashi H, Takahashi K, and Tomoike H. Changes in pulmonary hemodynamics during normoxia and hypoxia in awake rats treated with intratracheal bleomycin. *Tohoku J Exp Med* 169: 233-244, 1993
- (94) Williams JH, Jr., Bodell P, Hosseini S, Tran H, and Baldwin KM. Haemodynamic sequelae of pulmonary fibrosis following intratracheal bleomycin in rats. *Cardiovasc Res* 26: 401-408, 1992
- (95) Mutsaers SE, Marshall RP, Goldsack NR, Laurent GJ, and McAnulty RJ. Effect of endothelin receptor antagonists (BQ-485, Ro 47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 11: 221-225, 1998
- (96) Osanai K, Takahashi K, Sato S, Iwabuchi K, Ohtake K, Sata M, and Yasui S. Changes of lung surfactant and pressure-volume curve in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Appl Physiol* 70: 1300-1308, 1991
- (97) Schroll S, Arzt M, Sebah D, Nuchterlein M, Blumberg F, and Pfeifer M. Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist Bosentan. *Respir Physiol Neurobiol* 170: 32-36, 2010
- (98) Chaudhary NI, Schnapp A, and Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 769-776, 2006

- (99) Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, and Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83: 111-119, 2002
- (100) Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, and Kolb M. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 362, 2008
- (101) Ceylan A, Karasu C, Aktan F, Guven C, Can B, and Ozansoy G. Effects of simvastatin treatment on oxidant/antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Gen Physiol Biophys* 22: 535-547, 2003
- (102) Chang LT, Sun CK, Chiang CH, Wu CJ, Chua S, and Yip HK. Impact of simvastatin and losartan on antiinflammatory effect: in vitro study. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 20- 26, 2007
- (103) Ou XM, Feng YL, Wen FQ, Huang XY, Xiao J, Wang K, and Wang T. Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chin Med J (Engl)* 121: 1821-1829, 2008
- (104) Blumberg FC, Riegger GA, and Pfeifer M. Hemodynamic effects of aerosolized iloprost in pulmonary hypertension at rest and during exercise. *Chest* 121: 1566-1571, 2002
- (105) Boutou AK, Pitsiou GG, Trigonis I, Papakosta D, Kontou PK, Chavouzis N, Nakou C, Argyropoulou P, Wasserman K, and Stanopoulos I. Exercise capacity in idiopathic pulmonary fibrosis: the effect of pulmonary hypertension. *Respirology* 16: 451-458, 2011
- (106) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, and Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 895- 900, 2002
- (107) Glaser S, Noga O, Koch B, Opitz CF, Schmidt B, Temmesfeld B, Dorr M, Ewert R, and Schaper C. Impact of pulmonary hypertension on gas exchange and exercise capacity in patients with pulmonary fibrosis. *Respir Med* 103: 317-324, 2009
- (108) King TE, Jr., Brown KK, Raghu G, du Bois RM, Lynch DA, Martinez F, Valeyre D, Leconte I, Morganti A, Roux S, and Behr J. BUILD-3: A Randomized, Controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 92- 99, 2011
- (109) Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, Holzapfel M, Giehl W, Vogeser M, and Behr J. Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 360-365, 2004

7. Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1.: Laufbandaufbau zur Versuchsdurchführung (Vorlage Arbeitsgruppe)

Abb. 2: Prinzip der Auswertung mittels der Taqman-Technologie (entnommen aus cgr.otago.ac.nz/SLIDES/TAQMAN/SLD006.HTM)

8. Publikation:

Schroll S, Lange T J, Arzt M, Sebah D, Nowrotak A, Lehmann H, Wensel R, Pfeifer M, Blumberg F C. Effects of simvastatin on pulmonary fibrosis, pulmonary hypertension and exercise capacity in bleomycin-treated rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2013; 208: 191-201

9.Danksagung:

Ich widme diese Doktorarbeit meinen Familien, den Familien Dickert, Lehmann und Rech, ohne die ich diese Arbeit wohl nie vollendet, Daniela Sebah, ohne die ich das Abenteuer Doktorarbeit wohl nie unternommen hätte und meiner Anja für den letzten Feinschliff.

10. Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name:	Heinz Lehmann
Adresse:	Am Pfaffensteiner Hang 31, D- 93059 Regensburg
Mobil:	0179 2249696
E-Mail:	heinz.lehmann.h1 @googlemail.com
Geburtsdatum:	24.02.1979
Geburtsort:	Regensburg
Familienstatus:	ledig
Assistenzzeit:	
seit 09/2013	Praxis Dres. Kiefmann/Pickl/Seubert/Mehringer Bad Abbach Assistenzarzt Allgemeinmedizin
03/2013 - 09/2013	Praxis Dres. Hoffmann/Günther/Deinlein Burglengenfeld Assistenzarzt Orthopädie/Unfallchirurgie/Chirurgie/ Allgemeinmedizin
02/2010 - 02/2013	Klinikum Asklepios Burglengenfeld Assistenzarzt in der Abteilung der Inneren Medizin
Praxis-Erfahrung:	
04/2009 - 07/2009	Caritas-Krankenhaus St. Josef Regensburg Drittes Tertial des praktischen Jahres in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
12/2008 - 04/2009	Universitäts-Klinikum Regensburg Zweites Tertial in der Abteilung Innere Medizin
08/2008 - 12/2008	Hospital Santo Tomás, Panama Erstes Tertial in der Abteilung Chirurgie

02/2007 - 03/2007	Allgemeinarztpraxis Dr. Reinhold Lehmann Famulatur Allgemeinmedizin
08/2005 - 09/2005	Hospital Universidad de Botucatu, Sao Paolo Famulatur in der Inneren Medizin und Infektiologie
03/2005 – 04/2005	Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg Famulatur in der Inneren Medizin.
03/2005 – 04/2005	Universitäts-Klinikum Regensburg Famulatur in der Anästhesie
Ausbildung:	
Universitäten	
10/2009 – 12/2009	Universität Regensburg Zweites Staatsexamen
04/2005 - 09/2009	Universität Regensburg Klinischer Teil des Medizinstudiums
03/2005	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Erstes Staatsexamen
10/2002 – 03/2005	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Vorklinischer Teil des Medizinstudiums
Schulbildung	
1989 - 2000	Albertus-Magnus-Gymnasium Regensburg Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst:	
2000 - 2001	Wehrdienst bei der Luftwaffe in Penzing/Landsberg Am Lech
Sonstiges:	
2002	Ausbildung zum Rettungssanitäter/Malteser Regensburg