

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II

PROF. DR. LARS MAIER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNGEN DES ENDOTHELINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF DIE
LEISTUNGSFÄHIGKEIT BEI PULMONALER HYPERTONIE IM TIERMODELL DER BLEOMYCIN-
INDUZIERTEN LUNGENFIBROSE

INAUGURAL- DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON JOHANNES RESCH

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II

PROF. DR. LARS MAIER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNGEN DES ENDOTHELINREZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN AUF DIE
LEISTUNGSFÄHIGKEIT BEI PULMONALER HYPERTONIE IM TIERMODELL DER BLEOMYCIN-
INDUZIERTEN LUNGENFIBROSE

INAUGURAL- DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON JOHANNES RESCH

2015

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Pfeifer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2015

Abstracts	3
Einleitung	5
1 Theoretischer Teil	6
1.1 Lungenfibrose	6
1.2 Pulmonale Hypertonie	6
1.2.1 Klassifikation	6
1.2.2 Pathophysiologie	7
1.2.3 Symptome	9
1.2.4 Diagnostik	9
1.2.5 Differentialdiagnose	10
1.2.6 Verlauf und Prognose	10
1.2.7 Therapie	10
1.3 Bleomycinmodell	11
1.4 Offene Fragen und Hypothesen der Arbeit	12
2 Empirischer Teil	13
2.1 Tierexperimentelle Versuchsphase	13
2.1.1 Tierhaltung	13
2.1.2 Gruppeneinteilung	13
2.1.3 Versuchsaufbau	13
2.1.4 Induktion der Lungenfibrose	13
2.1.5 Behandlung der Lungenfibrose mit Bosentan	14
2.1.6 Ermittlung der individuellen Leistung	14
2.1.7 Hämodynamische Messungen	16
2.2 Histologische Untersuchungen	17
2.2.1 Paraffineinbettung und Schnittherstellung	17
2.2.2 HE-Färbung	17
2.2.3 Immunhistologie	18
2.2.4 Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie mittels Remmele- Score	19
2.2.5 Hydroxyprolinbestimmung	20
2.2.6 Plasmabestimmung ET-1 ELISA	21
2.3 Statistische Auswertung	22
2.4 Zeichenlegende	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Entwicklung der Leistungsfähigkeit	24
3.2 Hämodynamische Messungen	25
3.2.1 Systemischer Blutdruck	25
3.2.2 Rechtshertikulärer systolischer Druck	26
3.3 Quantifizierung der Lungenfibrose und der pulmonalen Hypertonie	26
3.3.1 Makroskopische Beurteilung der Organe	26
3.3.2 Endgewicht	27
3.3.3 Linkshertikuläres Gewicht	28

3.3.4	Gewicht des linken Ventrikels in Relation zum Endgewicht	28
3.3.5	Gewicht des rechten Ventrikels	29
3.3.6	Rechtsventrikuläres Gewicht in Relation zum Endgewicht	30
3.3.7	Rechtsventrikuläres Gewicht in Relation zum linken Ventrikel und dem Septum	30
3.3.8	Septumgewicht	31
3.3.9	Lungengewicht	32
3.4	Histologische Untersuchungen	33
3.4.1	HE-Färbung	33
3.4.2	Endothelin-A-Rezeptor	33
3.4.3	Endothelin-B-Rezeptor	34
3.4.4	eNOS	34
3.4.5	Hydroxiprolin	35
3.4.6	Endothelin-1 ELISA	36
4	Zusammenfassung und Diskussion	37
4.1	Zusammenfassung	37
4.2	Diskussion	38
4.3	Konklusio	41
5	Verzeichnisse	42
6	Curriculum vitae	47
7	Danksagung	48

ABSTRACTS

Abstract Deutsch

HINTERGRUND:

Endothelin spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie (PH). In dieser Arbeit sollte die Wirkung des unselektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan auf das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie (PH), die im Tiermodell durch Entwicklung einer pulmonalen Fibrose (PF) mittels instilliertem Bleomycin induziert wurde, untersucht werden.

METHODEN:

Im Tiermodell wurden drei Gruppen randomisiert: Kontrollgruppe, Gruppe mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose (Bleomycin) und Gruppe mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose, die mit Bosentan behandelt wurde (Bleomycin+Bosentan). Die Leistungsfähigkeit wurde mittels Laufbandtestungen untersucht. Der pulmonale Fibrosegrad wurde durch Hydroxiprolingehalt (HPC) und HE-Färbungen gemessen. PH wurde durch hämodynamische Messungen (rechtsventrikulärer Druck = RSVP) und rechtsventrikuläres Gewicht (RVW) als Zeichen der Rechtsherzhypertrophie quantifiziert.

ERGEBNISSE:

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten Tiere der Bleomycingruppe eine signifikante Reduktion der Leistungsfähigkeit (44% vs. 100%), einen signifikant höheren HPC (61,8 vs. 15,2, $p=0,003$), einen signifikant höheren RSVP (65 mmHg vs. 23 mmHg, $p=0,003$) und signifikant höheres RVW (31 mg vs. 19 mg, $p=0,001$). Die Bosentanbehandlung führte bei Tieren mit Lungenfibrose zu einer signifikant verbesserten Leistungsfähigkeit (98% vs. 44%), einem signifikant niedrigerem HPC (15,7 vs. 61,8, $p=0,009$), einer tendenziellen Reduktion des RSVP (52 mmHg vs. 65 mmHg, $p=0,09$) sowie einer signifikanten Reduktion des RVW (23 mg vs. 31 mg, $p=0,01$).

KONKLUSIO:

Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Bosentan bei Lungenfibrose, die im Tiermodell durch Bleomycin induziert wurde, die Entstehung einer pulmonalen Fibrose und pulmonale Hypertonie verringert und dadurch eine verbesserte Leistungsfähigkeit erzielt werden kann.

Abstract English

BACKGROUND:

Endothelin plays an important role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. In this paper the effect of the unselective endothelin-receptor-antagonist Bosentan on development of pulmonary hypertension, which is caused by pulmonary fibrosis (PF) in the animal model by instillation of bleomycin, is investigated.

METHODS:

The following groups were randomized: untreated animals (controls), Animals with Bleomycin-induced pulmonary fibrosis (Bleomycin) and animals with Bleomycin-induced PF treated with Bosentan (Bleomycin+Bosentan). Exercise capacity was tested by treadmill exercise. To quantify pulmonary fibrosis (PF) Hydroxyprolin-content (HPC) was measured. PH was evaluated by haemodynamic measurement of the rightventricular pressure (RVSP) and rightventricular weight (RVW) marking hypertrophy of the right heart.

RESULTS:

Compared to controls, animals with Bleomycin-induced PF showed a significant reduction in exercise capacity (44% vs. 100%), significantly higher HPC (61,8 vs. 15,2, $p=0,003$), significantly higher RVSP (65 mmHg vs. 23 mmHg, $p=0,003$) and significantly higher RVW (31 mg vs. 19 mg, $p=0,001$). Bosentan treatment in animals with Bleomycin-induced PF resulted in significantly greater exercise capacity (98% vs. 44%), significantly lower HPC (15,7 vs. 61,8), a trend towards lower RVSP (52 mmHg vs. 65 mmHg, $p=0,09$) and significantly lower RVW (23 mg vs. 31 mg, $p=0,01$).

CONCLUSION:

It could be shown that treatment with bosentan in pulmonary hypertension, which was induced by bleomycin in an animal model, can reduce the development and progression of pulmonary hypertension and can improve the exercise capacity.

EINLEITUNG

Der Titel dieser Arbeit lautet die „Auswirkungen des Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan auf die Leistungsfähigkeit bei pulmonaler Hypertonie im Tiermodell der Bleomycin- induzierten Lungenfibrose“.

Ziel der Arbeit ist es zu zeigen, dass Endothelin in der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie bei Bleomycin induzierter pulmonaler Fibrose eine Schlüsselrolle spielt und dass durch Behandlung mit dem unselektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan eine Verbesserung der pulmonalen Hypertonie erzielt werden kann.

Am Beginn der Arbeit wird im Theorieteil über den aktuellen Wissenstand sowie über rezente Forschungsergebnisse informiert. Der darauf folgende empirische Teil beschäftigt sich mit der Methodik und den Ergebnissen der zu präsentierenden Arbeit. Im Diskussionsteil am Ende werden die gefundenen Ergebnisse mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen und herausgearbeitete Unterschiede aufgezeigt.

Aus den Ergebnissen und der Zusammenschau bekannter Studien sollen Rückschlüsse auf das Nutzen-Risiko-Profil einer Therapie mit Bosentan geschlossen werden können.

1 THEORETISCHER TEIL

1.1 LUNGENFIBROSE

Unter einer Lungenfibrose versteht man den fibrösen Umbau von Lungenparenchym mit konsekutiv gestörtem Gasaustausch und damit einhergehend Umbauvorgänge der Lungengefäße [Cushley, 1999]. Ursächlich können neben verschiedenen Noxen, wie etwa organische und anorganische Stäube, Dämpfe oder Aerosole verschiedener Gefahrenstoffe auch Autoimmunerkrankungen sein. Hier sind in erster Linie die Sarkoidose, Rheumatische Arthritis oder verschiedene Vaskulitiden zu nennen. Auch idiopathische Formen, das heißt Erkrankungen, die ohne erkennbare Ursache auftreten, kommen vor.

Die Inzidenz der Lungenfibrose liegt bei ca. 10/100.000 pro Jahr und betrifft häufiger Frauen als Männer im Alter von 50 Jahren. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung 3 Jahre ab Diagnosestellung [Carrington et al., 1978; Coultas et al., 1994]. Im Rahmen der Lungenfibrose kommt es oft zur Entstehung einer pulmonalen Hypertonie, die zu einer Druckbelastung des rechten Ventrikels führt.

1.2 PULMONALE HYPERTONIE

Die pulmonale Hypertonie ist definiert als eine persistierende Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks auf mehr als 25 mmHg in Ruhe oder 30 mmHg unter Belastung [Petkov and Doberer, 2003]. Durch die andauernde Druckbelastung kommt es zu Umbauvorgängen des rechten Ventrikels. Kann der erhöhte Druck schließlich nicht mehr kompensiert werden, führt dies zum progredienten Rechtsherzversagen, das eine häufige Todesursache der pulmonalen Hypertonie darstellt [King et al., 2001].

1.2.1 Klassifikation

Die Einteilung der pulmonalen Hypertonie sollte heute nach der im Jahr 2008 auf dem 4th World Symposium on PAH in Dana Point beschlossenen funktionellen Klassifikation erfolgen [Simonneau et al., 2009].

Dabei wurde die seit 2003 auf dem 3rd World Symposium on PAH in Venedig beschlossene Klassifikation bestätigt und geringe Modifikationen der Gruppe 1 durchgeführt, um eine genauere Einteilung der Erkrankungen nach dem zugrundeliegenden Pathomechanismus zu erreichen. So wurden etwa die pulmonale veno-okklusive Erkrankung und die pulmonale kapilläre Hämangiomatose in eine eigene Gruppe gegliedert. Auch die chronisch-hämolytische Anämie oder die Schistosomiasis erscheinen jetzt als separate Entitäten in der Subgruppe der mit bestimmten Erkrankungen assoziierten PAH (APAH).

1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)

- Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH)
- Familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie (FPAH)
- Noxen (Medikamente, Giftstoffe)
- Pulmonal-arterielle Hypertonie bei (APAH)
 - Bindegewbserkrankung
 - HIV-Infektion
 - Portale Hypertension
 - Angeborene systemisch-pulmonalen Shunts (z.B. Herzfehler)

- Schistosomiasis
 - Chronisch hämolytische Anämie
 - Persistierende pulmonale Hypertonie beim Neugeborenen
- 1' Pulmonal-arterielle Hypertonie mit relevanter venöser oder kapillärer Beteiligung
- Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
 - Pulmonale kapilläre Hämangiomatosis (PCH)
 - Persistierende pulmonal-arterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens
- Erkrankung des linken Vorhofes oder Ventrikels
 - Mitral- oder Aortenklappenfehler
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
- Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
 - Interstitielle Lungenerkrankung
 - Schlafapnoe-Syndrom
 - Alveoläre Hypoventilation
 - Chronische Höhenkrankheit
 - Anlagebedingte Fehlbildungen
4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)
- Thrombembolischer Verschluss proximaler Lungenarterien
 - Thrombembolischer Verschluss distaler Lungenarterien
 - Nicht-thrombotische Lungenembolien (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)
5. Sonstige
- z.B. Sarkoidose, Histiozytosis X, Lymphangiomatosis

In dieser Arbeit wurde die pulmonale Hypertonie im Rahmen einer Lungenfibrose untersucht, die nach der aktuellen Einteilung zur Gruppe 3 (Pulmonale Hypertonie mit Erkrankung der Atemwege und /oder Hypoxämie) gehört.

1.2.2 Pathophysiologie

Das Verständnis der Pathogenese der pulmonale Hypertonie und verwandter Erkrankungen hat sich in den letzten Jahren substantiell verbessert. Eine zentrale Rolle bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie spielt das pulmonale „vascular remodeling“, das alle drei Gefäßwandschichten (Intima, Media und Adventitia) involviert. Hypertrophie, Hyperplasie und vermehrte Deposition von extrazellulären Matrix-Komponenten führt zu Verdickung und heterogenen strukturellen Veränderungen der Gefäßwandarchitektur. Intima- und Media-Verdickungen verursachen eine Verengung des Gefäßlumens und erhöhten Widerstand, daraus folgt der Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks [Gaine and Rubin, 1998; Rubin et al., 2002]. Als Resultat der Adventitia-Verdickung sinkt die Compliance und Dehnbarkeit der Gefäße, was zu einem weiteren Druckanstieg führt.

Die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie stellt ein ernsthaftes Ereignis im Krankheitsverlauf einer Lungenfibrose dar, weil sie mit einer erhöhten Mortalität der Lungenfibrose einhergeht [Lettieri et al., 2006; Nadrous et al., 2005a; Nadrous et al., 2005b]. Die Ätiologie der pulmonalen Hypertonie ist nach wie vor unzureichend erklärt. Eine mögliche Ursache des erhöhten pulmonal-arteriellen Drucks bei einer Lungenfibrose stellt die hypoxische Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße dar. Durch die Fibrosierung des Lungenparenchyms kommt es zu einer Störung des Gasaustausches, was einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck nach sich zieht. Im Gegensatz zu systemischen arteriellen Gefäßen reagieren Lungengefäße

mit einer Vasokonstriktion auf den verminderten Sauerstoffpartialdruck, um ein optimales Verhältnis von Ventilation und Perfusion in der Lunge zu gewährleisten (Van-Euler-Liljestrand Mechanismus). Durch diese generalisierte pulmonale Vasokonstriktion kommt es bei Hypoxie zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie [Sweeney and Yuan, 2000]. Bei Patienten mit Lungenfibrose korreliert jedoch der Schweregrad der Hypoxie nicht immer mit dem Ausmaß des Anstieges des pulmonal-arteriellen Drucks [Leuchte et al., 2004]. Somit liegt es nahe, dass noch weitere Hypoxie-unabhängige Faktoren bei der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie eine Rolle spielen. Die endotheliale Zell-Schädigung und Dysfunktion resultiert in einer gesteigerten Vasokonstriktion und beeinträchtigten Vasodilatation: Synthese von vasodilatierenden Substanzen wie NO und Prostazyklin sind aufgrund einer reduzierten Expression von endothelialen Stickstoffmonooxidsynthetase (eNOS) und Prostazyklinsynthetase vermindert [Giaid and Saleh, 1995; Christman et al., 1992]. Endothelin, ein potenter Vasokonstriktor, ist jedoch in der Lunge von Patienten mit pulmonaler Hypertonie überexprimiert [Wensel et al., 2000; Giaid et al., 1993]. In vitro blockiert Endothelin die Wirkung von ANP auf die Steigerung der cGNP-Produktion [Marala et al., 1993]. Somit kommt Endothelin unter Bedingungen mit erhöhter ANP-Konzentration eine zusätzliche vasokonstriktorische Wirkung als ANP-Antagonist zu [Schäfers and Seeger, 2001]. Diese Befunde deuten auf eine Dysregulation der natürlichen Drucksenkungsmechanismen im pulmonalen Gefäßbett hin. Endothelin ist ein von den Endothelzellen produziertes Polypeptid, das 1988 von Yanisagawa entdeckt wurde [Yanagisawa et al., 1988]. Während es in niedrigen Konzentrationen selektiv den pulmonalen Druck und Widerstand senkt, sowie die hypoxische Vasokonstriktion antagonisiert [Deleuze et al., 1992], stellt es in höherer Konzentration einen potenten endothelialen Vasokonstriktor mit mitogener Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten dar [Yanagisawa et al., 1988; Weissberg et al., 1990; Shahar et al., 1999]. Sowohl die Endothelin-1 Plasmaspiegel als auch die pulmonale ET-1 Genexpression sind bei Patienten und Versuchstieren mit pulmonaler Hypertonie und Lungenfibrose erhöht [Uguccioni et al., 1995; Li et al., 1994; Giaid et al., 1993]. Die biologische Wirkung von ET-1 wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren sind nach ihrer Affinität zu den Mitgliedern der ET-Peptid Familie, namentlich ET-1, ET-2 und ET-3 klassifiziert. Während der ET-A Rezeptor bevorzugt ET-1 bindet hat der ET-B Rezeptor eine vergleichbare Affinität zu allen drei ET-Peptiden [Rubanyi and Polokoff, 1994]. Die Bindung von Endothelin an den entsprechenden Rezeptor an der Zelloberfläche aktiviert die Proteinkinase C, was die Expression von Protoonkogenen c-jun und c-fos in verschiedenen Zelltypen stimuliert, darunter auch Swiss 3T3 Fibroblasten [Takuwa et al., 1989; Battistini et al., 1993]. Die Rolle von Endothelin im Pulmonalkreislauf wird dadurch verkompliziert, dass die zwei oben genannten Rezeptoren zum Teil entgegengesetzte Effekte vermitteln. Die vasokonstriktiven und proliferativen Effekte von ET-1 werden über eine Aktivierung der ET-A Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen gesteuert [Zamora et al., 1993; Arai et al., 1990]. Eine Aktivierung der endothelialen ET-B Rezeptoren über eine Freisetzung von NO und Prostacyclin führt hingegen zu einer Vasodilatation [de Nucci et al., 1988]. Außerdem soll der ET-B Rezeptor für die Elimination von zirkulierendem ET-1 verantwortlich sein [Matthes and Groner, 2006]. Untersuchungen zeigten, dass beide Rezeptoren bei der chronisch hypoxischen pulmonalen Hypertonie der Ratte hochreguliert werden [de Nucci et al., 1988; Li et al., 1994]. Ferner ist eine Abschwächung beziehungsweise Ausbleiben der pulmonalen Gefäßkonstriktion auf Hypoxie durch ETA-Antagonisten beschrieben [Bonvallet et al., 1994]. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in der Entstehung einer Lungenfibrose eine Rolle spielen könnte, ist die durch Endothelin vermittelte mitogene Wirkung auf glatte Gefäßmuskeln, Fibroblasten und Endothelzellen [Hirata et al., 1989]. So konnten am Bleomycin induzierten Modell der Lungenfibrose bei Ratten erhöhte Endothelin-1 Konzentrationen in fibrotischen Lungenregionen im Vergleich zu Bereichen mit normalem Lungenparenchym nachgewiesen werden. In dieser Arbeit ging dem fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms auch ein Anstieg des Endothelingehalts der Lunge voraus [Mutsaers et al., 1998a]. Yanagisawa et al. (1988) konnten zeigen, dass die Expression von Endothelin-1 in alveolaren Endothelzellen beinahe ausschließlich bei Patienten mit Lungenfibrose und pulmonaler Hypertonie zu finden war. Eine solche Expression war in den Lungen gesunder Kontrollpatienten bzw. von Patienten mit

Lungenerkrankungen, aber ohne pulmonale Hypertonie, kaum zu finden [Giaid et al., 1993]. Eine weitere Studie stellte fest, dass es bei ET-1 transgenen Mäusen ebenfalls zu einem fibrotischen Umbau der Lunge kommt [Hochoer et al., 2000]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Endothelin in der Pathogenese der Lungenfibrose. Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen wurde eine Beteiligung von Endothelin an der Entstehung einer systemischen Sklerose postuliert [Yamane et al., 1991; Kahaleh, 1991], einer Erkrankung die mit einer übermäßigen Produktion von kollagenem Bindegewebe und Fibrose einhergeht. Endothelinantagonisten zeigten in vitro eine inhibierende Wirkung auf die Fibroblastenproliferation und die Kollagensynthese [Dawes et al., 1996; Cambrey et al., 1994]. Bei kontinuierlicher Gabe von Endothelinantagonisten gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Besserung der Lungenfibrose [Park et al., 1997; Mutsaers et al., 1998b].

1.2.3 Symptome

Die initial auftretenden Symptome der pulmonalen Hypertonie, wie etwa langsam zunehmende Belastungsdyspnoe und rasche Ermüdbarkeit sind unspezifisch, weshalb eine Diagnosestellung in den meisten Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien gelingt. Bei Fortschreiten der PAH können Symptome einer Herzinsuffizienz einschließlich Synkopen, Angina Pectoris, Raynaud-Syndrom und periphere Ödeme hinzukommen.

Basierend auf der NYHA-Klassifikation für Herzinsuffizienz wurde eine entsprechende Stadieneinteilung für die PAH entwickelt (oft auch als funktionelle WHO-Klasse bezeichnet) [McLaughlin and McGoon, 2006]:

Klasse I:	keine Einschränkung der körperlichen Aktivität; keine Erschöpfung, Dyspnoe, Thoraxschmerzen oder synkopalen Zustände bei normaler Aktivität
Klasse II:	leichte Einschränkung der körperlichen Aktivität; keine Beschwerden in Ruhe; normale Aktivität führt zu Erschöpfung, Dyspnoe, Thoraxschmerzen oder synkopalen Zuständen
Klasse III:	ausgeprägte Einschränkung der körperlichen Aktivität; keine Beschwerden in Ruhe; leichte körperliche Aktivität führt zu Erschöpfung, Dyspnoe, Thoraxschmerzen oder synkopalen Zuständen
Klasse IV:	keine körperlichen Aktivitäten ohne Symptome; Dyspnoe und/oder Erschöpfung in Ruhe; manifeste Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz; erhebliche, zunehmende Einschränkungen bei körperlicher Aktivität

1.2.4 Diagnostik

Die wichtigsten Untersuchungen zur Diagnosestellung einer pulmonalen Hypertonie sind neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung eine apparative Basisdiagnostik. Diese umfasst neben einem Standard-EKG eine komplette Lungenfunktionsprüfung mit Blutgasanalyse und eine Röntgen-Thorax-Aufnahme, sowie die transthorakale Echokardiographie mit Doppler-Fluß-Darstellung, mit deren Hilfe der systolische Pulmonaldruck abgeschätzt und die Rechtsherzbelastung beurteilt werden kann.

In der primären Diagnostik spielt die Rechtsherzkatheteruntersuchung eine untergeordnete Rolle, durch sie kann jedoch ein erhöhter Druck im kleinen Kreislauf direkt gemessen werden. Auch im Hinblick auf weitere Therapiemaßnahmen sollte mittels Testung der Vasoreagibilität eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt werden. Hierzu wird Adenosin intrakardial verabreicht und der eintretende Abfall der pulmonalen Drucks gemessen. Dadurch kann der zu erwartende Erfolg einer systemischen Therapie mit Calciumantagonisten abgeschätzt werden.

1.2.5 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch müssen Erkrankungen die zu einer sekundären pulmonal arteriellen Hypertonie führen wie etwa Lungenembolie, Erkrankungen der Atemwege wie COPD, Schlaf-Apnoe sowie Kollagenosen, HIV-Infektion, Bilharziose oder Vitien ausgeschlossen werden.

1.2.6 Verlauf und Prognose

Bei der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie unterscheidet man zwei Verläufe. Die akute PAH, die z.B. bei einer fulminanten Lungenembolie auftreten kann, ist charakterisiert durch einen sprunghaften Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks mit völligem Aufbrauchen der funktionellen Reservekapazitäten des Gefäßbettes und klinischen Zeichen der dekompensierten Rechtsherzinsuffizienz. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte PAH als Folge einer pulmonalen Fibrose zählt im Gegensatz dazu zur chronischen pulmonalen Hypertonie. Diese entwickelt sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis Jahren [Schäfers and Seeger, 2001]. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung 3 Jahre nach Diagnosestellung [Tukiainen et al., 1983].

1.2.7 Therapie

Die Therapie der PAH umfasst drei Säulen: Die erste Säule stellt Allgemeinmaßnahmen wie Gewichtsreduktion, Sauerstofflangzeittherapie, konsequenten Nikotinverzicht sowie bei Fehlen von Kontraindikationen die dauerhafte Antikoagulation dar. Cumarinderivate werden empfohlen, da durch den verminderten pulmonalen Blutfluß die lokale Thromboembolieneigung erhöht ist [Frank et al., 1997]. Die zweite Säule beinhaltet die Behandlung einer eventuell vorliegenden Grunderkrankung oder Komorbidität, wie etwa einer COPD oder Herzinsuffizienz. Die dritte Säule beschreibt die spezifische Therapie mit Substanzen, die eine Beeinflussung des strukturellen und funktionellen Defektzustands der pulmonal-arteriellen Widerstandsgefäße im Sinne einer Annäherung an den ursprünglichen physiologischen Zustand ermöglichen sollen. Von diesen Substanzen erhofft man sich durch Reduktion oder sogar Reversion des pulmonalen „vascular remodelling“ eine wirksame Langzeittherapie [Petkov and Doberer, 2003].

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Ansatzpunkte, um den Widerstand im Lungengefäßbett zu reduzieren. Prostacyclin und Phosphodiesteraseinhibitoren (PDE-5-Inhibitoren) bewirken durch Vasodilation eine Drucksenkung im kleinen Kreislauf, Endothelinrezeptorantagonisten und Calciumantagonisten erreichen dies durch Hemmung der Vasokonstriktion.

Prostacyclin ist in verschiedenen Applikationsformen verfügbar. In Studien konnte gezeigt werden, dass durch Inhalation von Prostacyclin eine selektive Senkung des pulmonal-arteriellen Drucks möglich ist [Olschewski et al., 2002]. Durch eine kontinuierliche intravenöse Prostacyclin-Therapie konnte in kontrollierten Studien eine Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik und ein Überlebensvorteil für Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie gezeigt werden [Barst et al., 1996]. Die Behandlung ist jedoch mit erheblichen Risiken wie systemischer Hypertonie, Tachyphylaxie und septischen Komplikationen durch Katheterinfektion verbunden. Neue Prostacyclinderivate, wie das oral verfügbare Beraprost überwinden zum Teil die Nachteile, die sich aus der intravenösen Anwendung von Prostacyclin ergeben.

Eine weitere Therapieoption stellt der Einsatz von 5-PDE-Inhibitoren wie etwa Sildenafil dar. Sildenafil kann bei Patienten mit PAH zu einer selektiven Vasodilatation im pulmonalen Gefäßsystem und - in geringerem Ausmaß - zu einer Vasodilatation im systemischen Kreislauf führen. Die klinische Wirkung wurde anhand einer

verlängerten Gehstrecke belegt, inwieweit auch eine Verbesserung der Überlebenszeit erreicht werden kann ist noch unklar [Galie et al., 2005].

Zur Hemmung der Vasokonstriktion gibt es momentan folgende Möglichkeiten: Bei den Patienten, die auf die Vasoreagibilitätstestung mittels Rechtherzkatheter positiv angesprochen haben, kann ein Therapieversuch mit Kalziumantagonisten vom Diltiazem- oder Nifedipintyp unternommen werden, welche jedoch eine mangelnde pulmonale Selektivität und kardiale Nebenwirkungen haben. Diese Therapie stellt die mit Abstand kostengünstigste Behandlungsoption dar. Alternativ können Endothelinantagonisten eingesetzt werden. Hierbei unterscheidet man unselektive Endothelin-Rezeptorantagonisten von selektiven Endothelin-A-Rezeptorantagonisten.

In der BREATHE-1 Studie konnte 2002 die Wirksamkeit des oralen dualen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Tracleer® (Bosentan) bei PAH im NYHA-Stadium III gezeigt werden [Rubin et al., 2002]. Seit 2008 liegt die Zulassung gleichfalls für die PAH der NYHA-Klasse II vor, nachdem sich in der EARLY-Studie signifikante Verbesserungen der funktionellen Belastbarkeit und des pulmonal-arteriellen Drucks zeigten [Galie et al., 2008].

Seit 2008 sind in Deutschland auch ET-A-selektive Endothelinrezeptorantagonisten (Ambrisentan, Sitaxentan) verfügbar. Unter der Annahme, dass diese Medikamente gezielt, die über den ET-A-Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion hemmen, ohne die über den ET-B-Rezeptor vermittelte Freisetzung von NO und Prostacyclinen zu beeinflussen, sollten diese einen zusätzlichen Benefit in der Behandlung der PAH erbringen. In der STRIDE-1 Studie konnte die Wirksamkeit von Sitaxentan im Vergleich zu Placebo belegt werden [Barst et al., 2004].

Als schwerwiegende Nebenwirkungen von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten treten vor allem eine Erhöhung der Transaminasen, dosisabhängig ein Absinken des Hämoglobinspiegels, sowie Hepatotoxizität auf. Die Lebertoxizität beruht wahrscheinlich auf der Interaktion mit Transportproteinen der Hepatozyten und dadurch einer Interferierung der Gallenbildung [Fouassier et al., 2002]. Deshalb stellen schwere Leberfunktionsstörungen eine Kontraindikation für den deren Einsatz dar, während Niereninsuffizienz keine Einschränkung bedeutet.

1.3 BLEOMYCINMODELL

Es gibt verschiedene Ansätze um im Tiermodell eine pulmonale Hypertonie zu erzeugen, wie etwa Bleomycin, Monocrotalin, ionisierender Strahlung, anorganischen Partikeln wie etwas Asbest oder Silikose oder auch Versuche mit transgenen Tieren.

Wir haben uns für das Bleomycinmodell entschieden, weil es in den letzten Jahren das führende Modell in der Erforschung der Lungenfibrose und pulmonalen Hypertonie darstellte. Zusätzlich erlaubte uns dieses Modell die Auswirkungen von Bosentan nicht nur auf die pulmonale Hypertonie sondern auch auf die Entwicklung der Lungenfibrose zu untersuchen.

Bleomycin entfaltet seine zytotoxische Wirkung durch eine spezifische Bindung an der DNS, wobei es zu Einzelstrangbrüchen, in höheren Konzentrationen auch zu Doppelstrangbrüchen führt. Hierbei wirkt Bleomycin als Endonuklease. Eine Inaktivierung von Bleomycin kann durch Hydrolasen, aber auch verschiedene niedrigmolekulare Eiweißfraktionen erfolgen. Eine selektive Organtoxizität korreliert möglicherweise mit dem betreffenden Gehalt an Bleomycin-Hydroxylasen in den entsprechenden Geweben. Aufgrund des niedrigen Hydroxylasengehalts der Lunge sind hier toxische Wirkungen von Bleomycin besonders ausgeprägt. Die lokale Anwendung verstärkt die Toxizität nochmals, so dass die lokale Injektion von Bleomycin eine anerkannte Methode zur Induktion einer Lungenfibrose und einer konsekutiven pulmonalen Hypertonie darstellt [Chua et al., 2005].

1.4 OFFENE FRAGEN UND HYPOTHESEN DER ARBEIT

In internationalen Studien werden viele neue Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Ätiologie, Pathogenese und Therapie der pulmonalen Hypertonie erbracht. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, dieses immer relevanter werdende Thema zu durchleuchten und die Vorteile einer Therapie mit dem ET-A und ET-B Antagonisten Bosentan zu untersuchen.

Es soll grundsätzlich geklärt werden, ob Bosentan bei Ratten mit einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose - und damit induzierter pulmonaler Hypertonie - zu einem Rückgang der Remodelling-Vorgänge und damit zu einem Anstieg der Leistungsfähigkeit führen kann.

Es soll die Frage beantwortet werden, inwieweit es nach Induktion einer Lungenfibrose durch Bleomycin zu Veränderungen der Hämodynamik und des pulmonalen Gefäßsystems, im Sinne von rechtsventrikulärer Hypertrophie und neurohumoralen Veränderungen, kommt.

Verändert sich die Hämodynamik indem der rechtsventrikuläre Druck ansteigt? Kommt es zu einer rechtsventrikulärer Hypertrophie, die sich in einer Zunahme des Gewichts des rechten Ventrikels und des Ventrikelseptums äußern würde? Kommt es zu einer veränderten Expression von ET-A, ET-B, eNOS und einer veränderten Endothelin-1-Konzentration, was auf eine Veränderung neurohumoraler Vorgänge hindeuten würde? Führen die genannten Veränderungen zu einer eingeschränkten Leistungsfähigkeit, bzw. steht der Grad an Fibrose und damit die Schwere der pulmonalen Hypertonie in indirektem Zusammenhang mit der Leistungsfähigkeit?

Und zu allerletzt: Sind die gegebenenfalls induzierten Veränderungen durch Bosentan reversibel?

Aus diesen Fragen lässt sich die Nullhypothese dieser Arbeit formulieren:

H (o): Es gibt keine Unterschiede bei der unabhängigen Variable „Gruppenzugehörigkeit“ (Kontrollgruppe, Bleomycingruppe, Bleomycin- und Bosentangruppe) bezogen auf die abhängige Variable.

Zu den abhängigen Variablen zählen:

- Veränderung der Leistungsfähigkeit
- Veränderung der Hämodynamik (Anstieg des rechtsventrikulären Drucks)
- Rechtsventrikuläre Hypertrophie (Gewichtszunahme des rechten Ventrikels)
- Neurohumorale Veränderungen (veränderten Expression von ET-A, ET-B, eNOS und Endothelin)
- Grad der Fibrose (HE-Färbung, Hydroxiprolin-Analyse)

2 EMPIRISCHER TEIL

2.1 TIEREXPERIMENTELLE VERSUCHSPHASE

2.1.1 Tierhaltung

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden gemäß §81 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Sie wurde im Zeitraum von 01.09.2004 bis 1.04.2005 durchgeführt. Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche, vier Wochen alte Wistar Ratten der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland), mit einem Durchschnittsgewicht von 260 +/- 5 Gramm. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei normaler Kost und Wasser ad libidum bei einem zwölf Stunden Tag – Nacht – Rhythmus gehalten.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Die Ratten wurden in folgende drei Gruppen unterteilt:

1= gesunde Kontrollgruppe (n=10)

2= Bleomycingruppe (n=10)

3= Bleomycin + Bosentangruppe (n=10)

2.1.3 Versuchsaufbau

Insgesamt wurde der Versuch mit 30 Tieren durchgeführt. Die Ratten erhielten ein siebentägiges Trainingsprogramm, um sie an das Laufband zu gewöhnen. Danach erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen die Bestimmung der Ausgangsleistung, die als individuelle Maximalleistung festgelegt wurde. Dieser Bestimmung schloss sich der eigentliche Versuch an. Die Tiere der Gruppen 2 und 3 erhielten an Tag 0 die individuelle Bleomycindosis. Zusätzlich erfolgte bei der Gruppe 3 beginnend mit Tag 1 die Behandlung mit Bosentan. Abschließend wurde an Tag 26 der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck (RVSP) gemessen, die Organe entnommen und im Anschluss auf verschiedenen Ebenen untersucht.

2.1.4 Induktion der Lungenfibrose

Die Lungenfibrose wurde durch das Zytostatikum Bleomycinsulfat induziert (cell-pharm-GmbH, Hannover, Deutschland), das normalerweise als Zytostatikum bei Seminomen, Nicht-Seminomen und Lymphomen verwendet wird.

Im Vorversuch hat sich eine Injektionsdosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht als geeignet erwiesen, wobei ein immer gleichbleibendes Gesamtvolumen von 0,25 ml appliziert wurde.

Das Medikament wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien zum Arbeiten mit Zytostatika in 0,9 prozentiger Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und an Tag 0 den Tieren der Bleomycin- und Bosentangruppe intratracheal verabreicht. Dazu wurden die Ratten in eine leichte Inhalationsnarkose mit Isofluran (Florene „R“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) versetzt, senkrecht gelagert und ein G16- Katheter (Johnson-Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland), mit Hilfe eines Führungsdrahtes in die Trachea eingeführt. Über diesen wurde die entsprechende Menge an Bleomycin mit einer Insulinspritze (BD Plastikpak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) appliziert und anschließend jeweils mit 0,5 ml Luft nachgespült, um eine adäquate Verteilung des Medikaments in der Lunge zu gewährleisten und um sicherzustellen, dass die gesamte Dosis appliziert wurde.

2.1.5 Behandlung der Lungenfibrose mit Bosentan

Bosentan (Actelion Ltd&Actelion Pharmaceuticals Ltd, Allschwil, Schweiz) wurde täglich frisch angesetzt und gewichtsadaptiert in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht per Magensonde (18mm, Scanbur A/S, Karslunde, Dänemark) verabreicht. Zur individuellen Dosisanpassung wurden die Tiere zweimal pro Woche gewogen.

2.1.6 Ermittlung der individuellen Leistung

In der vierwöchigen Versuchsphase sollten die Tiere auf ihre körperliche Belastbarkeit untersucht werden. Dazu mussten die Tiere vorher an das Laufen gewöhnt, ihre Ausgangskondition und täglich die Laufleistung gemessen werden.

Laufbandaufbau

Das Laufband wurde nach einer von uns angefertigten Skizze in der Biowerkstatt der Universität Regensburg gebaut. Bei dem Gerät handelt es sich um ein motorbetriebenes Laufband an dessen Ende 15 Bügel angebracht sind, die Strom von einer Stromquelle weiterleiten und bei Kontakt einen milden Stromschlag auslösen. Die Stromstärke wurde für diesen Versuch auf 1,5 mA festgesetzt. Zusätzlich kann die Neigung in jeweils 6 Gradschritten von 0 bis 12 Grad verstellt und die Geschwindigkeit von 0 bis 30 m/min verändert werden. Der Deckel des Plexiglaskastens, in dem die Tiere laufen, schließt durch Einrasten bei Verschluss den Stromkreis. Dadurch kann es bei geöffnetem System nicht zu einem akzidentiellen Stromschlag des Untersuchers kommen. Zusätzlich ist auch an der Außenseite ein Notausschalter angebracht, der sowohl das Laufband stoppt, als auch den Stromfluß unterbricht.

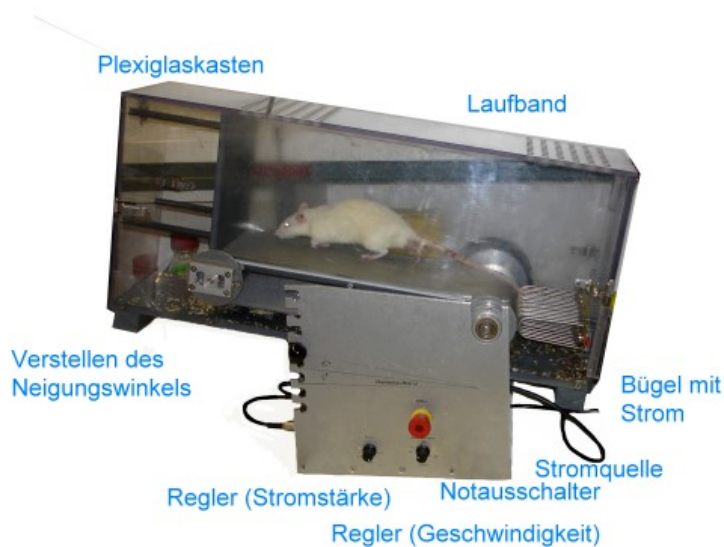


Abbildung 2-1: Bedienelemente des Laufbandes

Zu beachten ist, dass Verschmutzungen der Bügel wie etwa Rattenkot oder Urin einen Kurzschluss verursachen können, der bewirkt, dass kein Strom mehr auf den Bügeln fließt. Auf das Laufband selbst hat eine solche Verschmutzung jedoch keine Auswirkung.

Trainingsprogramm

Um die Tiere an das Laufband zu gewöhnen und um die individuelle Ausgangsleistung zu bestimmen erhielten sie ein siebentägiges Trainingsprogramm.

Das Laufband wurde so konstruiert, dass sich zwischen dem Ende der Lauffläche und der Bügel, die den milden Stromschlag auslösen eine für die Tiere deutlich wahrnehmbare Absenkung befand. Somit wurden die Tiere nicht direkt auf den Stromschlag konditioniert, sondern auf die vorgeschaltete Absenkung.

Das Trainingsprogramm verlief nach einem vorher festgelegten Schema, bei dem schrittweise die Parameter „Zeit“, „Geschwindigkeit“ und zusätzlich auch der Parameter „Winkelgrad“ verändert wurden, um eine Leistungssteigerung der Ratten zu erzielen:

Tag	Zeit in Minuten	Geschwindigkeit in Meter/Minute	Winkel in Grad
1	5	10	0
2	7,5	10	0
3	10	10	6
4	7,5	20	6
5	7,5	20	12
6	10	20	12
7	15	25	12

Tabelle 2.1-1 Trainingsprogramm

Der Strom stellte für die Ratten einen Schmerzreiz dar, aufgrund dessen sie weiterliefen. Bei zunehmender Erschöpfung häuften sich die Stromkontakte.

Ermittlung der Ausgangskondition

Nach Abschluss des Trainingsprogramms erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 25 Meter/Minute und einem Winkel von 12 Grad die Bestimmung der individuellen Maximalleistung, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Dabei wurde jeweils die Zeit gemessen bis die jeweilige Ratte dreimal eines der Abbruchkriterien erfüllte.

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

1. Kontakt mit der Stromquelle für länger als zwei Sekunden, ohne dass das Laufband berührt wurde.
2. Kontakt der Hinterbeinen mit der Stromquelle für länger als drei Sekunden, während die Vorderbeine noch auf dem Band weiterliefen.
3. Wiederholter Kontakt mit der Stromquelle innerhalb von 20 Sekunden. Wenn das Tier mit den Hinterbeinen die Stromquelle berührte aber sofort, wenn auch nur kurzfristig, wieder vollständig auf das Laufband gelangte.

Wenn ein Kriterium erfüllt war, wurde die Zeit angehalten, das Band gestoppt und die Ratte wieder auf das Band gesetzt. Dies wurde dreimal wiederholt, erst dann wurde die Leistungsabnahme endgültig abgebrochen.

Die Maximalleistung wurde als Ausgangswert für die folgende tägliche vierwöchige Leistungsabnahme als oberer „cut off“ Wert festgesetzt. Bei Erreichen dieser Leistung wurde der Lauf beendet.

Auswertung

Bei der Auswertung wurde die Ausgangsleistung als 100 % festgelegt und die Zeit an den folgenden Tagen als prozentualer Teil der Ausgangsleistung nach folgender Formel angegeben:

Ausgangskondition (t_0) = 100 %

Zeit an Tag 1 = (t_1)

$(t_1 * 100) / t_0 = x \%$

Bei der Auswertung im Programm SigmaPlot wurden die Prozentwerte von zwei aufeinander folgenden Tagen gemittelt. Dieser Mittelwert wurde dann als prozentualer Wert der Ausgangsleistung in einer Graphik aufgetragen.

2.1.7 Häodynamische Messungen

Systemischer Blutdruck mittels Tail-Cuff-Methode

Am Ende der vierwöchigen Versuchsphase wurde zum Ausschluss einer systemischen arteriellen Hypertonie vor der häodynamischen Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) an zwei aufeinander folgenden Tagen die Blutdruckmessung mittels der Tail-cuff-Methode mit dem BP-Recorder 8005 (W&W Electronics, Hofheim, Deutschland) durchgeführt. Mit dieser Methode [Chua et al., 2005] ist es möglich bei Ratten auf nicht-invasive Weise den systolischen Blutdruck zu messen. Dazu wurden die Tiere einzeln und in wachem Zustand in einen Röhrenkäfig gesperrt. Dieser unterbindet Bewegungen der Ratten, auf die das Messsystem sehr empfindlich reagiert. Vorher wurden die Tiere durch wiederholte Proben an diesen Käfig gewöhnt, um eine Stressreaktion und eine damit verbundene Erhöhung des systolischen Drucks möglichst zu vermeiden. Die zu untersuchende Schwanzarterie wurde durch ein Wärmekissen bei 37 ° C 20 Minuten lang erwärmt und dadurch hyperämisiert. Danach wurde am Schwanz der Ratte eine Druckmanschette, analog zur Riva-Rocci-Methode, und distal davon ein piezoelektrischer Pulsaufnehmer befestigt. Das piezoelektrische Kristall im Pulsaufnehmer wandelt die Druckschwankungen der Schwanzarterie in elektrische Signale um. Nach elektronischer Verstärkung und Filterung kann man so eine Pulsationskurve der Schwanzarterie aufzeichnen, aus der der systemische Blutdruck abgeleitet wird.

Auf diese Weise wurde der Blutdruck an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen und die beiden erhaltenen Werte gemittelt.

Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP)

Am 28. Tag erfolgte die Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes. Die Narkose der Tiere wurde mit Isofluran eingeleitet, an die sich die eigentliche Narkose durch intraperitoneale Injektion von Trapanal (100 mg/kg Körpergewicht; Altana Pharma, Konstanz, Deutschland) anschloss. Die adäquate Narkosetiefe wurde anhand der Reflexe auf einen Schmerzreiz an der rechten Hinterpfote überprüft. Nach Hautinzision und Präparation der V. jugularis externa wurde das Gefäß angeschnitten und ein mit Heparin (500 IU/ml; Liquemin N 25000, Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespülter Kinder-ZVK (1 mm*80 mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Unter stabilen häodynamischen Bedingungen erfolgte mit dem Druckabnehmer (Hellige, Programm19, Freiburg, Deutschland) die Ermittlung des RVSP.

Organ- und Blutentnahme

Im Anschluss an die RVSP-Messung wurde über den Katheter ein Röhrchen EDTA-Blut abgenommen, und bei 4°C mit 3000 G zehn Minuten lang zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode/Harz, Deutschland). Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 ° C gelagert. Danach wurde der Thorax parasternal eröffnet und das Herz und die Lunge en bloc entnommen. Das Abdomen wurde entlang

der Linea alba eröffnet und die Leber hinsichtlich Veränderungen sowie die Bauchhöhle auf Ascitesbildung überprüft. Die Lunge wurde nach Entnahme gewogen und anschließend in rechten und linken Lungenflügel getrennt. Die linke Lungenhälfte, die für die spätere Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes vorgesehen war, wurde auf flüssigem Stickstoff durchgefroren und bis zur Homogenisation bei -80°C gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt: Der rechte Oberlappen wurde mit 4 prozentigem-PBS-gepufferten Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter konstantem Druck mittels Infusionssystem gespült und anschließend 48 Stunden in derselben Lösung inkubiert. Daraufhin erfolgte die Paraffineinbettung. Die restliche Lungenfraktion wurde mit 0,9 prozentiger physiologischer Kochsalzlösung gespült, auf Stickstoff schockgefroren und zur Untersuchung von Genexpression im Rahmen einer anderen Doktorarbeit verwendet. In das Herz wurde kardioplege Lösung (Custodiol Lösung, Firma Köhler, Deutschland) injiziert und gewartet bis es zu einer Erschlaffung der Myozyten kam. Durch einen Horizontalschnitt auf Ventrikelebene wurden die Vorhöfe und das Septum voneinander getrennt und die Klappen und das Herzohr entfernt. Die beiden Kammern wurden gewogen, nochmals geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit bei -80°C aufbewahrt. Das Septum wurde nach dem Wiegen verworfen.

2.2 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

2.2.1 Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Nach der Organentnahme wurden die Lungenhälften für 48 Stunden in 4 prozentigem PBS-gepuffertem Formalin in Einbettkassetten inkubiert und anschließend eine automatisierte Paraffineinbettung am Gerät Histocentre 2 (Thermo Shandon GmbH, Frankfurt, Deutschland) am Institut für Pathologie der Universität Regensburg durchgeführt. Nach Gießen der Paraffinblöcke wurden mit dem Microm HM 400 (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt und kurz in einem 50 ° C warmen Wasserbad gestreckt, um Faltenbildung zu vermeiden. Danach wurden sie auf Superfrost-Objektträger (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei 37 ° C getrocknet.

2.2.2 HE-Färbung

Die angefertigten Paraffinschnitte wurden in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Die Färbezeit mit Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) betrug drei Minuten, daran schloss sich ein fünf minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser an. Die Gegenfärbung erfolgte drei Minuten lang mit Essigsäure angesäuertem Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der Differenzierung mit 70 prozentigem Alkohol, schloßen sich die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe, eine fünfminütige Xylolinkubation sowie das Eindeckeln mit Roti-Histokitt II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) an.

Die Zellkerne erscheinen in der HE-Färbung blau, Zytoplasma, Bindegewebe und Muskulatur rötlich-orange. Die Präparate wurden geblindet von zwei unabhängigen Betrachtern nach dem Fibrosegrad ausgewertet. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Dazu wurden die Schnitte meanderförmig durchgemustert und wie folgt beurteilt:

- 0 = keine Fibrose (keinerlei Fibroseherde im gesamten Schnitt sichtbar bzw. Fibrose < 25 % des Gesamtgewebe)
- 1 = leichte Fibrose (1-2 Fibroseherde sichtbar bzw. 25-50 % des Gesamtgewebe betroffen)
- 2 = mittlere Fibrose (3-4 Fibroseherde sichtbar bzw. 50-75 % des Gesamtgewebe betroffen)
- 3 = starke Fibrose (>4 Fibroseherde sichtbar bzw. >75 % des Gesamtgewebes betroffen)

Für jedes Tier wurden 5 Schnittpräparate ausgewertet, die Resultate gemittelt und als Mittelwert für die entsprechende Gruppe ausgewertet.

2.2.3 Immunhistologie

Um möglichst die ursprüngliche Zell- und Gewebemorphologie zu erhalten, haben wir zu Beginn eine Immersionsfixierung mit Formalin (vier % neutral gepufferte Formalinlösung pH 7) durchgeführt. Formalin bewirkt eine Quervernetzung zwischen Proteinen, indem es zwischen deren basischen Aminosäuren Hydroxymethylbrücken bildet [Luttmann et al., 2009]. Nach einer 24 stündigen Inkubation erfolgte die Paraffineinbettung, die vom Institut für Pathologie durchgeführt wurde. Anschließend wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und zur weiteren Untersuchung auf Superfrostobjektträgern aufgezogen. Danach wurde mit Xylol die Entparaffinierung und mit einer absteigenden Alkoholreihe die Rehydrierung durchgeführt. Durch die oben erwähnte Proteinquervernetzung kann jedoch das Epitop für den Primärantikörper so verändert sein, dass eine Bindung eben dessen nicht möglich ist. Deshalb muss vor der Antikörperauftragung ein sogenanntes Antigen Retrieval durchgeführt werden, das die fixativ-bedingten Quervernetzungen von Proteinen wieder aufrichtet oder rückgängig macht [Luttmann et al., 2009]. Da der Nachweis des gesuchten Antigens durch einen Substratumsatz sichtbar gemacht wird, müssen vor Antikörperauftragung endogene Enzyme geblockt werden, die dasselbe Substrat umsetzen und so zu unspezifischen Farbreaktionen führen würden. In unserem Fall wurde dazu die endogene Peroxidase durch ein Methanol/H₂O₂- bzw. PBS/H₂O₂- Gemisch blockiert. Wir haben zur Immundetektion ein Avidin-Biotin System verwendet. Endogenes Biotin stellt einen Co-Faktor vieler Enzyme da und ist deshalb auch in vielen Geweben zu finden. Um unspezifische Hintergrundfärbungen durch endogenes Biotin zu verhindern wurde es vor Antikörperauftragung durch unkonjugierte Avidin und Biotinlösung blockiert. Die eigentliche Antigendetektion wurde mit Hilfe einer indirekten, mehrstufigen Avidin-Biotin Enzym Komplex Technik durchgeführt. Nach Auftragung und Inkubation des jeweils spezifischen Primärantikörpers (rabbit-anti-rat) und gründlicher Spülung mit PBS, um nicht gebundene Antikörper abzuwaschen wurde ein biotinkonjugierter goat-anti-rabbit Sekundärantikörper zugefügt, der an den Primärantikörper bindet. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Vectastain-ABC-Kit (Avidin-Biotin-Complex, Linaris, Wertheim, Deutschland). Dieses musste mindestens 30 Minuten vorher angesetzt werden, um die Verbindung der drei Einzelkomponenten Avidin, Biotin und des Enzyms Horseradish-Peroxidase (HRP) zu ermöglichen. Dieser Komplex bindet dann an den biotinkonjugierten Sekundärantikörper und ermöglicht nach der Zugabe des Substrats DAB (=3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) dessen Umsatz. DAB wird durch den Substratumsatz von einer farblosen zu einer rötlich-braunen Substanz umgesetzt und nur dort fixiert, wo das gesuchte Antigen detektiert wurde. Danach erfolgte wieder die Spülung mit PBS, um ungebundenes DAB zu entfernen und anschließend die Gegenfärbung mit Methylgrün, um den nicht spezifisch angefärbten Gewebehintergrund darzustellen. Nach abgeschlossener Immundetektion wurde das Präparat eingedeckt, um eine bessere Haltbarkeit und Handhabung zu erzielen.

RECA 1

RECA1 (=rat endothelial cell antibody) ist ein spezifischen Marker für Rattenendothelien und wurde von uns als Referenzfärbung für Endothel verwendet. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte in einem 30 prozentigen PBS (Biochrom)/H₂O₂- Bad (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 20 Minuten. Zur Optimierung der Färbung wurden auch die endogenen Proteine Biotin und Avidin mit dem Vector Blocking Kit von Linaris (Wertheim, Deutschland) genau nach Herstellerangaben blockiert. Das Antigen Retrieval erfolgte für 30 Minuten bei 37 ° C auf enzymatischem Wege mittels 0,1 prozentiger Protease XIV (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland). Eine zusätzliche Blockierung mit 50 µl Superblock (Pierce Biotechnology, Rockford,

USA) wurde angewandt, um durch Proteinladungen entstehende unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. In einer Reihe von Vorversuchen wurde die ideale Konzentration des primären Antikörpers von 1:10 und des sekundären von 1:500 ermittelt. Je 50 µl des mouse-anti-RECA1- Primärantikörpers (Acris, Hiddenhausen, Deutschland) wurden auf jeden Schnitt aufgetragen, die Negativkontrolle erhielt stattdessen 50 µl PBS. Die Negativkontrolle sollte der Überprüfung eventuell auftretender unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers mit Rattengewebe dienen. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 ° C wurden 50 µl des Sekundärantikörpers (Jackson Immuno Research; Baltimore Pike, USA), ein goat-anti-mouse-biotinkonjugierter Antikörper, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf alle Präparate aufgetragen. Vor der Visualisierung mit DAB (= 3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit dem Vectastain-ABC-Kit (Avidin-Biotin-Complex, Linaris, Wertheim, Deutschland). DAB wurde folgendermaßen angesetzt: 2 Tabletten à 10 mg DAB wurden in 40 ml PBS gelöst und unmittelbar vor dem Pipettieren auf die Schnitte mit 1600 µl 10 prozentigem H₂O₂ sowie 1 ml NaCl versetzt. Die Färbezeit betrug 1 Minute. Die Gegenfärbung wurde für drei Minuten mit Methylgrün durchgeführt. Im Anschluß wurde in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, 5 Minuten in Xylol inkubiert und abschließend die Präparate eingedeckt. Die Bereiche, die spezifisch vom Primärantikörper RECA 1 detektiert worden sind erscheinen graubraun, das Restgewebe grün.

ET-A, ET-B

Der immunhistologische Nachweis von ET-A- bzw. ET-B-Rezeptor erfolgte nach folgendem Färbeprotokoll mit dem jeweils spezifischen Primärantikörper. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe gewässert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase kam ein 30 prozentiges Wasserstoffperoxid–Methanolbad zur Anwendung. Das enzymatische Antigen Retrieval wurde mit 50 µl 0,1 prozentiger Pronase (Linaris, Wertheim) pro Schnitt für 20 Minuten durchgeführt. Die Blockierung des Avidin–Biotin–Systems erfolgte analog zu RECA1. Die Inkubationszeit des jeweils spezifischen Primärantikörpers zum Nachweis von ET-A bzw. ET-B (Alomone labs, Israel) in einer 1:75 Verdünnung mit PBS betrug 60 Minuten in einer geschlossenen Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Wie bereits beschreiben wurde wiederum eine Negativkontrolle für ET-A und ET-B mitgeführt. Der Anti-rabbit–biotin-conjugated Sekundärantikörper (Santa Cruz, Kalifornien, USA) wurde in einer 1:50 Verdünnung für 30 Minuten ebenfalls in einer geschlossenen Feuchtkammer inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu RECA1.

eNOS

Der spezifische immunhistologische Nachweis von eNOS erfolgte analog dem obigen Färbeprotokoll für den Nachweis des ET-A- bzw. ET-B-Rezeptors, jedoch mit Änderungen in den folgenden Punkten:

Für das Antigen Retrieval wurden die Schnitte in einer auf Citratpuffer basierenden Lösung aus 400 ml destilliertem H₂O und 4 ml Unmasking solution (Vector, Deutschland) in der Mikrowelle zehn Minuten lang bei 600 Watt erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Präparate mit PBS gewaschen. Die Inkubation der Präparate mit dem spezifischen eNOS–Primärantikörper (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) wurde für 60 Minuten in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS in einer geschlossenen Feuchtkammer durchgeführt.

Der Anti-rabbit–biotin-conjugated Sekundärantikörper (Santa Cruz, Kalifornien, USA) kam in einer Verdünnung von 1:100 zum Einsatz.

2.2.4 Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie mittels Remmele- Score

Der Nachweis von eNOS, ET-A- und ET-B-Rezeptoren wurde durchgeführt, um diese Stoffe auf Proteinebene zu lokalisieren, aber auch um eine semiquantitative Analyse durchzuführen. Dazu wurde der sogenannte Remmele-Score angewandt. Dazu wird eine Referenzfärbung benötigt, in unserem Falle der Endothelmarker RECA1, da alle

drei Stoffe vor allem am Gefäßendothel gefunden werden. Anhand der Referenzfärbung wurde folgendes Scoring aufgestellt:

0 = keine Färbung

1 = schwache Färbung, gerade noch erkennbar

2 = Färbung vorhanden, aber schwächer als bei RECA1

3 = Färbung genauso stark wie bei RECA1

Von jedem Präparat haben wir Schnitte in Serie angefertigt, von denen wir dann jeweils Endothel (mit RECA1), eNOS, ET-A und ET-B gefärbt haben. Es wurden pro Schnitt je 5 horizontal angeschnittene Gefäße mit einem Durchmesser von 30-100 µm ausgewertet. Dabei wurde die Färbeintensität im Vergleich zu der Intensität der Anfärbung von RECA1 beurteilt. Zudem wurde der Prozentsatz der angefärbten Zellen im Endothel abgeschätzt; dazu wurde die Querschnittsfläche des Gefäßes in vier Quadranten aufgeteilt und die Anfärbung eines Quadranten mit 25 % gleichgesetzt. Ein Gefäß, das beispielsweise durchgehend genauso stark wie RECA1 angefärbt war, erhielt demnach folgende Beurteilung: Färbeintensität 3, Anteil der angefärbten Zellen 100 %

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

Remmele-Score = Färbeintensität * Prozentsatz

Im obigen Beispiel ergäbe sich also ein Wert von $3 \cdot 1,0 = 3$

Die Remmele-Scores der fünf einzelnen Gefäße wurden anschließend gemittelt und ergaben so einen repräsentativen Wert für den entsprechenden Schnitt.

2.2.5 Hydroxyprolinbestimmung

Für die Bestimmung von Hydroxyprolin wurde homogenisiertes Gewebe benötigt. Dafür zerkleinerten wir die mit 5 ml NaCl versetzten linken Lungenflügel der Versuchstiere im Homogenisator und lagerten sie danach bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -80 ° C im Gefrierschrank.

Für die Hydroxyprolinbestimmung musste zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt werden. Wegen der Instabilität der Substanzen musste der Standard immer frisch angesetzt werden. Aus einer Stammlösung, welche 1 mg Standard-Hydroxyprolin (cis-4-Hydroxy-L-Prolin, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) und 1 ml NaCl enthielt wurden folgende Verdünnungen hergestellt: 1, 2, 5, 15 sowie 20 µg der Standardlösung wurden in je einen Eppendorfcup gegeben und auf ein Endvolumen von 40 µl mit NaCl aufgefüllt. Zudem stellten wir einen Leerwert aus 40 µl NaCl her. Die Lungenhomogenisate wurden bei 4000 Umdrehungen 10 Minuten lang zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen bildeten: In der oberen Schicht befand sich Fett, in der mittleren Wasser und die hydrophile Aminosäure Hydroxyprolin und in der unteren grober Zelldetritus. 40 µl aus der mittleren Phase wurden in Eppendorf-Safety-Cups (Superior Scientific, Berea, USA) gegeben. Proben, Standard und Leerwert wurden nun mit je 10 µl 10M NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und nach kurzem Vortexen 25 Minuten lang autoklaviert bei 121 ° C und 1 bar Druck. Die Chloramin T-Lösung wurde wie folgt angesetzt: 1,27 g Chloramin T-Pulver (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 20 ml 50 prozentigem n-Propanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst und mit Citratpuffer (pH 6,5) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Nach Abschluß der Hydrolyse im Autoklaven wurde dann 450 µl der Chloramin T-Lösung in

jede Probe gegeben; nach kurzem Vortexen schloss sich eine 25-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an, während der Chloramin an Hydroxyprolin binden kann. Danach wurde Ehrlichsreagenz hinzugefügt, die sich wie folgt zusammensetzt: 3 g DMAP (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden mit 13,3 ml 100 prozentigem n-Propanol und 6,7 ml Perchlorsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zusammengefügt. Von diesem Reagenz wurden jeweils 500 µl zugegeben, gemischt und 20 Minuten lang im Heizblock bei 65 ° C inkubiert. Zur Bestimmung des Hydroxyprolingehalts wurden 200 µl in 96 Wells ELISA-Platten überführt und bei 540 nm photometrisch vermessen. Dieses Procedere wurde jeweils zwei mal durchgeführt, die Ergebnisse gemittelt und als Referenzwerte für die Eichkurve verwendet.

Der am Photometer gemessene Hydroxyprolingehalt wurde zunächst in optischer Dichte (=OD) angegeben. Anhand der Standardreihe erstellte die Computersoftware dann eine Eichkurve, auf die die OD- Werte der einzelnen Proben gefällt wurden. So erhielt man die Hydroxyprolinkonzentration pro eingesetzten 40 µl Homogenisat.

2.2.6 Plasmabestimmung ET-1 ELISA

Das Prinzip der Plasmabestimmung von ET-1 beruht auf dem quantitativen Nachweis eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der durch die spezifische Bindung des Analyten an einen Antikörper entsteht. Wie der Name impliziert, werden beim ELISA Enzyme zur Signalgenerierung verwendet. Damit kann die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden und es ist damit möglich Antigene im Picogramm-Bereich zu bestimmen [Luttmann et al., 2009]. In dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA verwendet, dessen Mikrotiterplatte schon mit immobilisierten, polyklonalen Antikörpern gegen Endothelin-1 beschichtet war. Der Ablauf dieses Verfahrens stellte sich folgendermaßen dar: In der ersten Phase wurde die Mikrotiterplatte mit dem Antigen Endothelin-1 in Form des Standards oder der Proben befüllt. Nach der Inkubation wurde das nicht gebundene ET-1 durch mehrmaliges Waschen wieder entfernt, um nur mit spezifisch gebundenem ET-1 weiterzuarbeiten. Anschließend wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Endothelin-1 hinzugefügt, der ebenfalls an das durch den Primärantikörper fixierte Antigen binden sollte. Nach erneuter Inkubation wurde der überschüssige Sekundärantikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt. In der dritten Phase wurde dem Ansatz dann die Substratlösung zugesetzt, die vor allem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Tetramethylbenzidin (TMB) enthielt. In der folgenden Inkubationsphase setzte die am Sekundärantikörper fixierte Meerrettich-Peroxidase das Wasserstoffperoxid in Wasser (H_2O) um. Dadurch wurde der Elektronendonator, das Tetramethylbenzidin, oxidiert und zeigte einen Farbumschlag von farblos nach blau. Mit Hilfe der Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und der, wegen der pH-Erniedrigung auftretende, erneute Farbumschlag nach gelb mittels Photometer bei 450 nm detektiert.

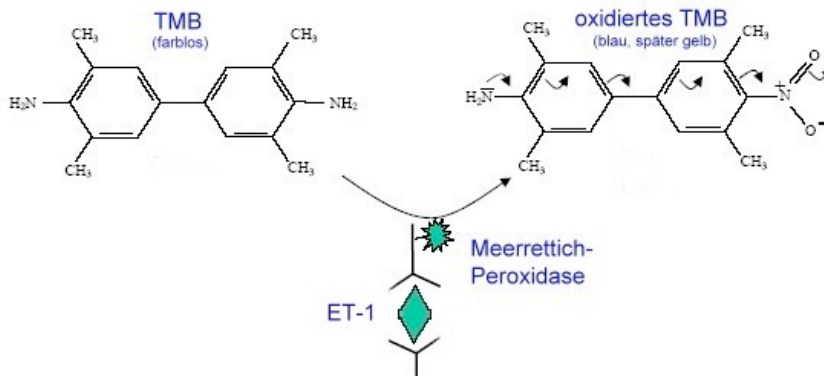


Abbildung 2-2: Oxidation von TMB mittels Meerrettichperoxidase

Die Plasmabestimmung von ET-1 wurde mit dem human Endothelin-1 Enzym Immunometric Assay Kit der Firma Assay Designs (Ann Arbor, USA) durchgeführt. Die ET-1 Bestimmung, die Reagenzienvorbereitung sowie die Probenvorbehandlung wurden von uns streng nach Anleitung durchgeführt. Vor der Durchführung wurden sämtliche Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht. Der Standard und die Proben wurden doppelt bestimmt. Dazu wurde jedes Well mit jeweils 400 µl Waschpuffer je zweimal gewaschen und danach durch Klopfen auf ein Papiertuch sämtlicher Waschpuffer wieder entfernt. Danach wurden jeweils 100 µl Assay buffer für den Leerwert, 100 µl von dem jeweiligen Standard und jeweils 100 µl der zu untersuchenden Proben in die entsprechenden Wells gegeben. Darauf folgte nach Versiegelung die Inkubation bei 37 ° C für eine Stunde. Nach der Stunde wurden die Wells geleert, mit jeweils 400 µl Waschpuffer insgesamt viermal gewaschen und außer beim Leerwert jeweils 100 µl Antikörper aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 ° C unter erneuter Versiegelung inkubiert. Hinterher wurden die Wells erneut geleert, wieder mit 400 µl Waschpuffer viermal gewaschen und danach 100 µl der Substratlösung zu jedem Well gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur in abgedunkeltem Zustand wurde die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl der Stopplösung beendet und nach Eichen gegen den Leerwert bei 450 nm am Photometer vermessen. Bei Doppelbestimmungen wurden die Werte anschließend gemittelt.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können, war es wichtig, dass bei dem von uns verwendeten ELISA die Menge an Enzym (Meerrettich-Peroxidase) proportional der Menge an gebundenen Sekundärantikörper war. Da auch der Substratumsatz wegen der Substratsättigung wiederum direkt proportional zur gebundenen Enzymmenge ist, ist also die Menge an gebildetem Produkt (oxidiertes TMB) direkt proportional zur Menge an gebundenem Antigen (Endothelin-1). Somit ist die gemessene optische Dichte (OD) direkt proportional zur Konzentration an Endothelin-1. Die gemittelte, um den Leerwert bereinigte OD der einzelnen Standardverdünnungen wurde gegen ihre jeweilige ET-1 Konzentration halblogarithmisch aufgetragen und zu einer Standardgeraden interpoliert. Nach dem Auftragen der OD der Proben konnte nun mit Hilfe der Standardgeraden deren Konzentration bestimmt werden.

2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Daten aller dargestellten Untersuchungen wurden mit den Programmen SPSS für Windows, Version 12.0 bzw. SigmaPlot 2001 (SPSS, Chicago, IL, USA) erfasst und statistisch ausgewertet. Alle Werte im Ergebnisteil wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt und eine Schwelle von $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt.

2.4 ZEICHENLEGENDE

Bleo	Gruppe der Tiere, die mit Bleomycin behandelt wurden
Bleo + Bos	Gruppe der Tiere, die sowohl mit Bleomycin als auch mit Bosentan behandelt wurden
*	Signifikanz zur Kontrollgruppe
#	Signifikanz zur Bleomycingruppe

3 ERGEBNISSE

3.1 ENTWICKLUNG DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

Die Laufbanduntersuchung diente zur Objektivierung der individuellen Belastungsfähigkeit der Tiere.

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Leistungsfähigkeit der drei Untersuchungsgruppen für die Dauer des Beobachtungszeitraums. Wie zu erwarten, zeigte die Kontrollgruppe eine konstante Leistung über den gesamten Zeitraum, diese entsprach 100 Prozent der Ausgangsleistung. Bei den Tieren der Bleomycin-Gruppe konnte bereits an Tag 1/2 ein signifikanter Rückgang der Belastungsfähigkeit im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen beobachtet werden. Auch in der Gruppe der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere kam es im Verlauf zu einem signifikanten Rückgang der Belastungsfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Abfall setzte jedoch im Vergleich zur Bleomycingruppe später ein und war geringer ausgeprägt.

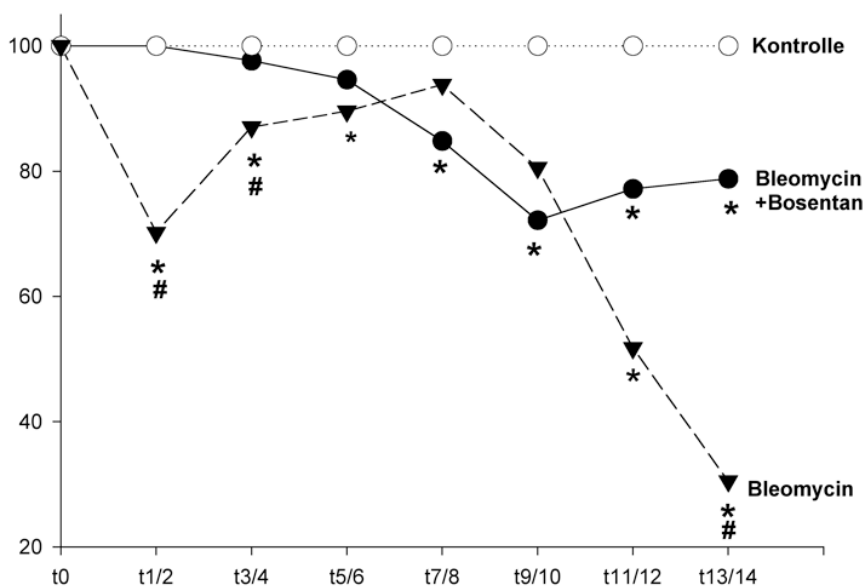


Abbildung 3-1: Entwicklung der Leistungsfähigkeit Tag 1-14

Ab Tag 16 musste die Geschwindigkeit auf 20 m/min reduziert werden, da die Tiere der Bleomycingruppe nicht länger in der Lage waren, die ursprüngliche Geschwindigkeit zu laufen. Aus diesem Grund wurden ab diesem Tag die Werte in einer zweiten Graphik separat aufgetragen.

Durch die Reduktion der Laufbandgeschwindigkeit kam es sowohl bei der Bleomycin- als auch bei der Bleomycin und Bosentangruppe zu einem scheinbaren Anstieg der prozentualen Leistungsfähigkeit. Dieser Anstieg spiegelt jedoch nur die Senkung der Anforderungen wieder und entspricht nicht einer tatsächlichen Leistungsverbesserung. Im Verlauf wurde die signifikante Reduktion der Leistungsfähigkeit der Bleomycingruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen besonders deutlich. Durch die gesenkten Anforderungen erreichte die Gruppe, der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere annähernd dieselbe Leistung wie die Kontrollgruppe.

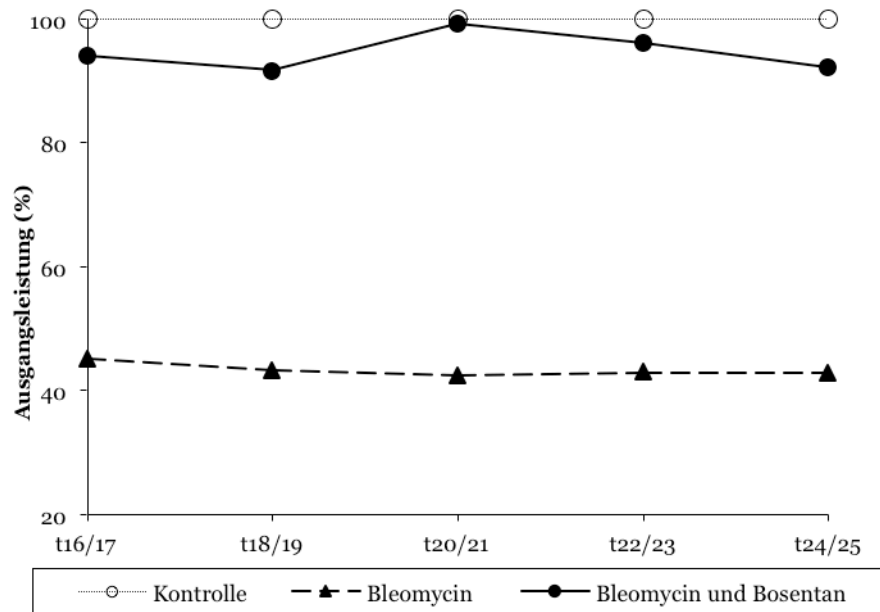


Abbildung 3-2: Entwicklung der Leistungsfähigkeit Tag 16-25

3.2 HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN

3.2.1 Systemischer Blutdruck

Der systolische Blutdruck wurde gemessen, um einen systemischen Fehler auszuschließen. Tiere bei denen ein systolischer Hypertonus vorliegt, wären vom Versuch ausgeschlossen worden.

Im Vergleich der drei Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden, sodass alle Tiere zur Auswertung herangezogen werden konnten.

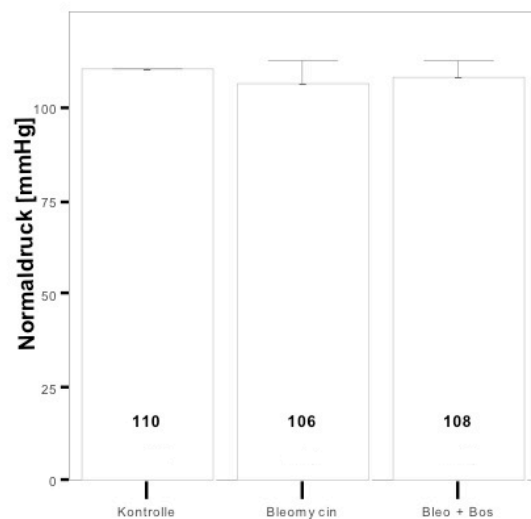


Abbildung 3-3: Systemischer Blutdruck

3.2.2 Rechtshventrikulärer systolischer Druck

Der rechtsventrikuläre systolische Druck wurde gemessen, um das Ausmaß der pulmonalen Hypertonie zu quantifizieren. Dabei zeigt sich eine signifikante Erhöhung des rechtsventrikulären Drucks in der Gruppe der mit Bleomycin ($p=0,003$), sowie in der Gruppe der mit Bleomycin und Bosentan ($p=0,003$) behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich der mit Bleomycin behandelten Tiere zur Gruppe der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere lassen sich keine Signifikanzen erkennen. Es zeigt sich jedoch ein Trend zu einem erniedrigten rechtsventrikulären systolischen Druck ($p=0,089$) in der Gruppe der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere.

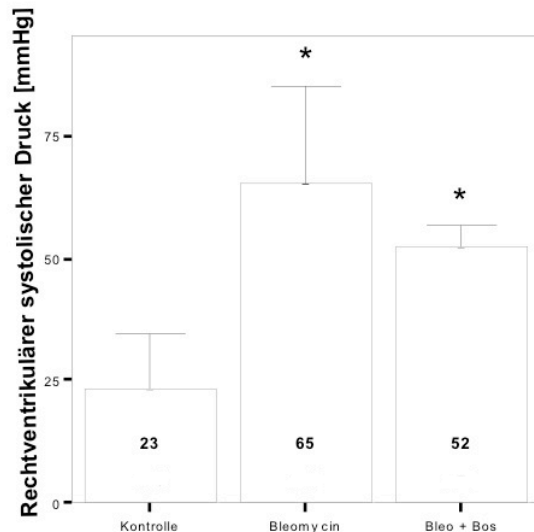


Abbildung 3-4: Rechtshventrikulärer systolischer Druck

3.3 QUANTIFIZIERUNG DER LUNGENFIBROSE UND DER PULMONALEN HYPERTONIE

3.3.1 Makroskopische Beurteilung der Organe

Postmortem erfolgte eine Beurteilung der Bauchhöhle auf Aszites, sowie der Lungen auf bullöse Veränderungen bzw. auf petechiale Einblutungen als makroskopisch sichtbarer Ausdruck einer Rechtsherzbelastung bzw. Lungenfibrose.

Wie zu erwarten zeigte die Kontrollgruppe einen unauffälligen Situs, während in der mit Bleomycin behandelte Gruppe die oben genannten Veränderungen häufiger als in der zusätzlich mit Bosentan behandelten Gruppe anzutreffen waren.

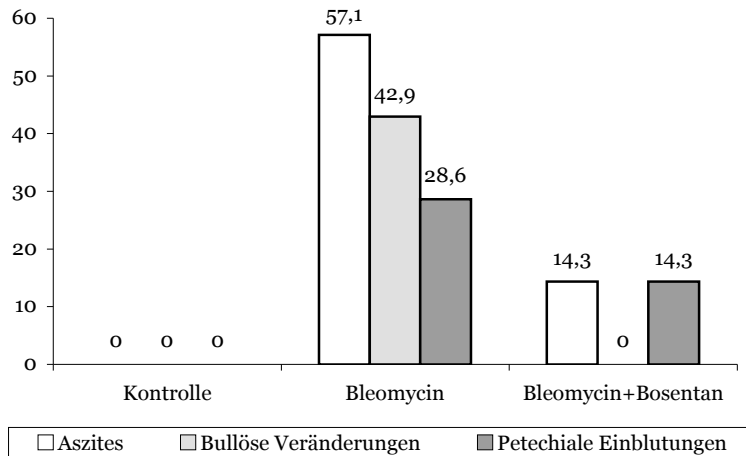


Abbildung 3-5: Makroskopische Organveränderungen

3.3.2 Endgewicht

Das Endgewicht (Körpergewicht) der Tiere wurde bestimmt, um es später in Relation zum rechtsventrikulären Gewicht zu setzen und damit einen systemischen Fehler zu verhindern.

Das Endgewicht der Tiere in der Bleomycingruppe war mit $p=0,002$ signifikant niedriger als das der Kontrolltiere. Die Tiere in der Bleomycin- und Bosentangruppe hatten ein mit $p=0,003$ signifikant niedrigeres Gewicht als die Tiere der Kontrollgruppe. Das Gewicht der Bleomycin- und Bosentangruppe war allerdings nicht signifikant höher als das der Bleomycingruppe.

Die auffallende Erniedrigung des Gewichts beider mit Bleomycin behandelter Gruppen könnte z.B. die Entwicklung einer kardialen Kachexie bzw. eine Gewichtsabnahme im Rahmen einer chronischen Erkrankung widerspiegeln.

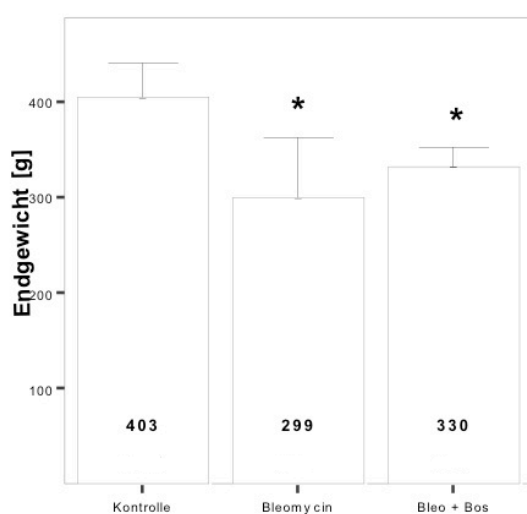


Abbildung 3-6: Endgewicht

3.3.3 *Linksventrikuläres Gewicht*

Das Gewicht des linken Ventrikels der Kontrollgruppe war signifikant erhöht im Vergleich zum dem der Bleomycingruppe mit $p=0,001$. Diese Entwicklung scheint direkt proportional zum Endgewicht der Tiere zu stehen. Ein niedrigeres Endgewicht dürfte auch mit einem niedrigeren linksventrikulären Gewicht vergesellschaftet sein.

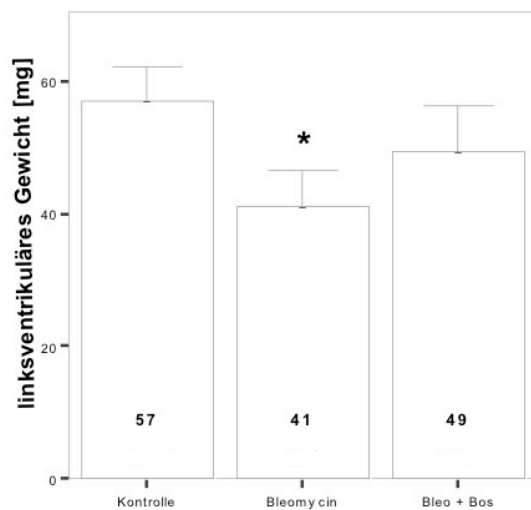


Abbildung 3-7: linksventrikuläres Gewicht

3.3.4 *Gewicht des linken Ventrikels in Relation zum Endgewicht*

Um zu verifizieren ob Tiere mit einem niedrigeren Körpergewicht auch ein niedrigeres linksventrikuläres Gewicht aufweisen, wurde das Gewicht des linken Ventrikels in Relation zum Endgewicht der Tiere gesetzt. Im Vergleich der einzelnen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies untermauert die These und legt nahe, dass keine linksventrikulären Veränderungen induziert wurden, die z.B. durch einen systemischen arteriellen Hypertonus entstehen und ebenfalls zu einer Leistungsminderung führen würden.

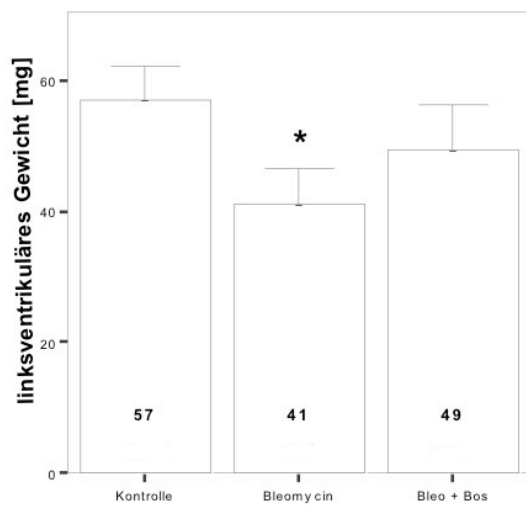


Abbildung 3-8: Linksventrikuläres Gewicht/Endgewicht

3.3.5 Gewicht des rechten Ventrikels

Das Gewicht des rechten Ventrikels stellte neben dem rechtsventrikulären systolischen Druck den zweiten Parameter zur Objektivierung der Schwere einer pulmonalen Hypertonie dar. Durch die Druckerhöhung im rechtsventrikulären System kommt es zu einer Hypertrophie des rechten Ventrikels und konsekutiv zu einer Gewichtserhöhung. Die Messung zeigte eine signifikante Erhöhung ($p=0,001$) des rechtsventrikulären Drucks bei den mit Bleomycin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls signifikant erhöht ($p=0,002$) war das rechtsventrikuläre Gewicht der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine signifikante Gewichtsreduktion der mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere im Vergleich zu den nur mit Bleomycin behandelten Tieren ($p=0,011$).

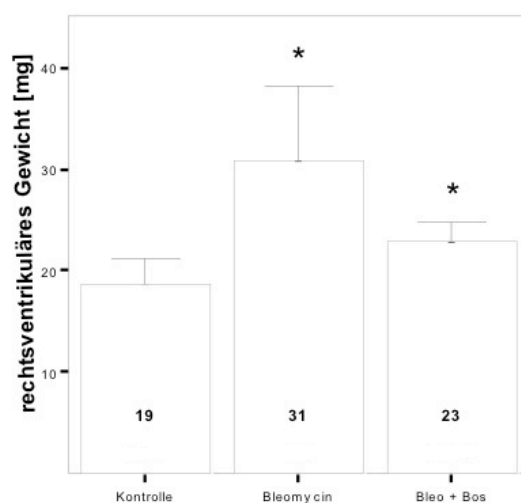


Abbildung 3-9: Rechtsventrikuläres Gewicht

3.3.6 Rechtsventrikuläres Gewicht in Relation zum Endgewicht

Analog zum linksventrikulären Gewicht wurde auch das Gewicht des rechten Ventrikels in Relation zum Endgewicht gesetzt, indem ein Quotient gebildet wurde. Dabei zeigte sich der Quotient der Bleomycingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,001$). Das Gleiche trifft für die mit Bleomycin und Bosentan behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Damit konnte gezeigt werden, dass es trotz Erniedrigung des Körpergewichts zu einer Erhöhung des rechtsventrikulären Gewichts gekommen ist. Dies verdeutlicht die spezifische Rechtsherzhypertrophie als Ausdruck der pulmonalen Hypertonie.

In den Untersuchungen zeigten die mit Bosentan behandelten Tiere ein tendenziell, allerdings nicht signifikant höheres Endgewicht und eine niedrigeres rechtsventrikuläres Gewicht. Durch die Bildung eines Quotienten konnte eine signifikante Erniedrigung ($p=0,003$) des rechtsventrikulären Druck bezogen auf das Endgewicht bei den mit Bosentan behandelten Tieren nachgewiesen werden.

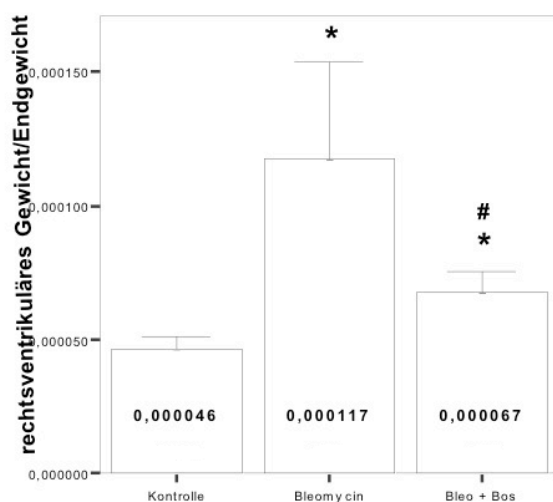


Abbildung 3-10: Rechtsventrikuläres Gewicht/Endgewicht

3.3.7 Rechtsventrikuläres Gewicht in Relation zum linken Ventrikel und dem Septum

Das Gewicht des rechten Ventrikels wurde in Relation zum linken Ventrikel und dem Septum gesetzt, um auszuschließen, dass die Tiere in den Medikamentengruppen ein unspezifisch vergrößertes Herz im Vergleich zur Kontrollgruppe haben.

Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Quotienten der Bleomycingruppe ($p=0,001$) und der Bleomycin und Bosentangruppe ($p=0,002$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Der Quotient der Bleomycin und Bosentangruppe war signifikant erniedrigt ($p=0,001$) im Vergleich zum Quotient der Bleomycingruppe. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Bleomycin eine spezifische Rechtsherzhypertrophie (als Ausdruck der pulmonalen Hypertonie) herbeigeführt werden konnte. Durch die gleichzeitige Verabreichung von Bosentan kam es zu einer signifikanten Reduktion dieser Umbauvorgänge.

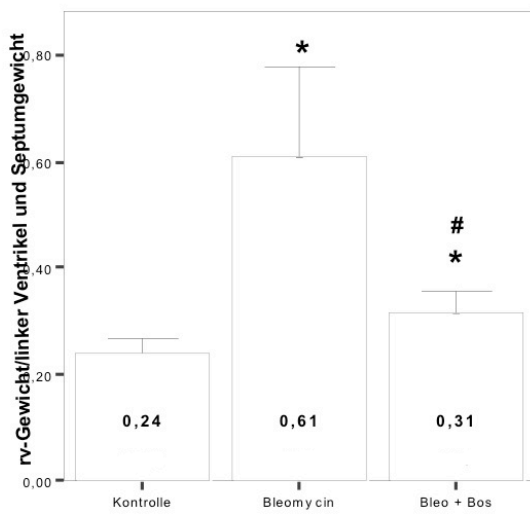


Abbildung 3-11: Rechtsventrikuläres Gewicht/linksventrikuläres- und Septumgewicht

3.3.8 Septumgewicht

Hierbei zeigte sich das Gewicht des Septums der Kontrollgruppe mit $p=0,012$ signifikant höher als das Gewicht der Bleomycingruppe. Das Septumgewicht der Bosentan- und Bleomycingruppe zeigte sich auch signifikant erhöht im Vergleich zur Bleomycingruppe mit $p=0,002$. Diese Veränderungen sind analog zum linksventrikulären Gewicht zu sehen.

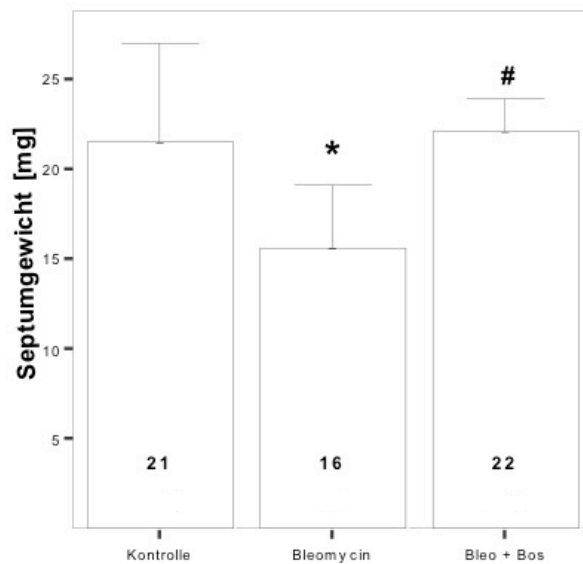


Abbildung 3-12: Septumgewicht

3.3.9 Lungengewicht

Das Lungengewicht diente als ein Marker zur Objektivierung der pulmonalen Fibrosierung.

Dabei zeigte sich das Lungengewicht der Bleomycingruppe signifikant höher als das der Kontrollgruppe ($p=0,001$) und der Bosentangruppe ($p=0,006$).

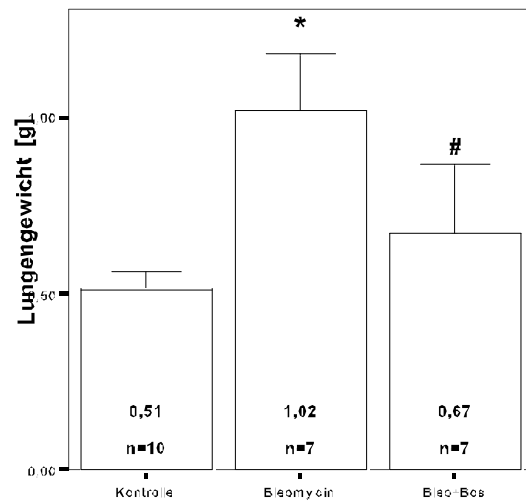


Abbildung 3-13: Lungengewicht

3.4 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.4.1 HE-Färbung

Die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung diente als Übersichtsfärbung, um den Fibrosegrad der Lungenpräparate zu beurteilen. Dabei zeigte sich der Fibrosegrad in der Bleomycin- und in der Bleomycin- und Bosentangruppe jeweils mit $p=0,000$ signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bei den mit Bosentan behandelten Tieren konnte ein tendenziell niedrigerer Fibrosegrad beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war.

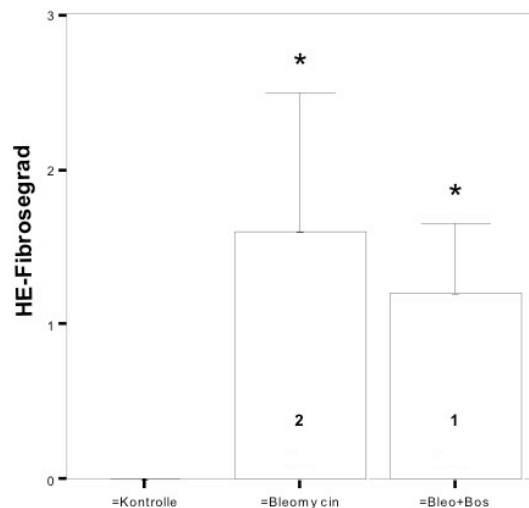


Abbildung 3-14: HE-Fibrosegrad

3.4.2 Endothelin-A-Rezeptor

Endothelin-1 vermittelt seine vasokonstriktorisches und proliferative Wirkung im pulmonalen Gefäßbett unter anderem über den ET-A-Rezeptor. Die Expression des Endothelin-A-Rezeptors (ermittelt über den Remmele-Score) war in der Bleomycingruppe ($p=0,003$) und in der zusätzlich mit Bosentan behandelten Gruppe ($p=0,024$) signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Der Remmele-Score der Bleomycin- und Bosentangruppe war allerdings mit $p=0,021$ signifikant niedriger im Vergleich zur Bleomycingruppe.

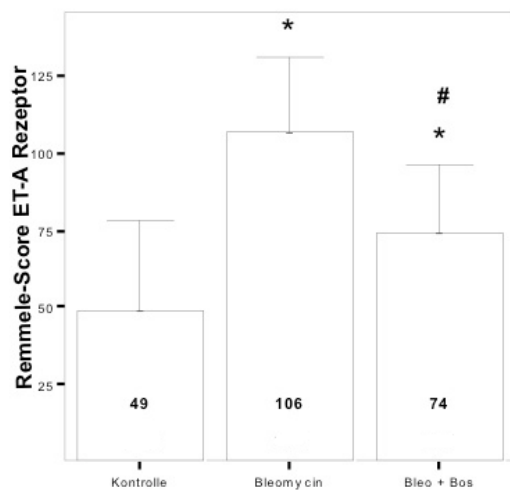


Abbildung 3-15: Remmele-Score-ET-A-Rezeptor

3.4.3 Endothelin-B-Rezeptor

Der Endothelin-B-Rezeptor scheint voasodilatierende Wirkung zu besitzen und es wird angenommen, dass er eine Rolle beim Abbau von ET-1 spielt. Die Rezeptorexpression war in der Bleomycingruppe ($p=0,001$) und in der Bleomycin- und Bosentangruppe ($p=0,003$) signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Gruppen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

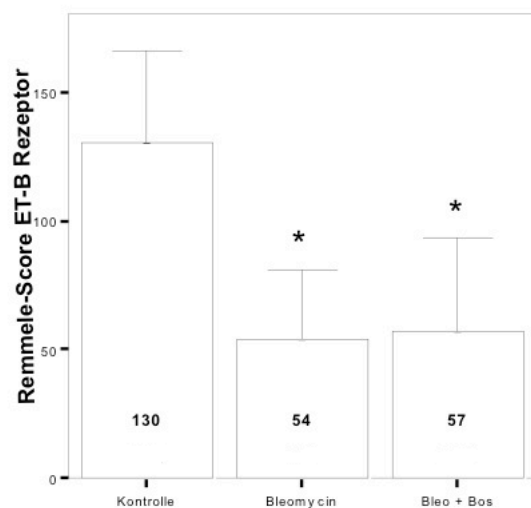


Abbildung 3-16: Remmele-Score-ET-B-Rezeptor

3.4.4 eNOS

Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) dürfte bei der pulmonalen Hypertonie vermindert exprimiert sein, sodass es zu einem Mangel an vasodilatierenden Substanzen (in diesem Fall NO) kommt. In der Bleomycingruppe konnte signifikant weniger ($p=0,014$) eNOS gefunden werden als in der Kontrollgruppe. Der

Vergleich der übrigen Gruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Bei den zusätzlich mit Bosentan behandelten Tieren war die eNOS-Expression im Vergleich zur Bleomycingruppe tendenziell höher.

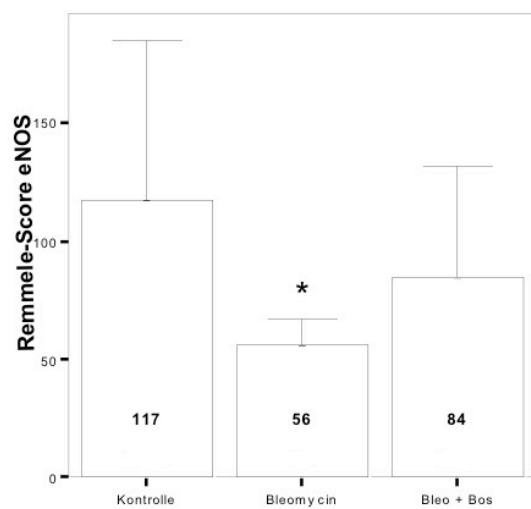


Abbildung 3-17: Remmele-Score eNOS

3.4.5 Hydroxyprolin

Hydroxyprolin ist eine Aminosäure die fast ausschließlich in kollagenem Bindegewebe vorkommt. Deshalb kann mit der Messung von Hydroxyprolin der Anteil an kollagenem Bindegewebe in einem Gewebe bestimmt werden. Die mit Bleomycin behandelten Tiere haben eine pulmonale Fibrose entwickelt und sollten dementsprechend einen höheren Anteil an kollagenem Bindegewebe aufweisen. Dementsprechend zeigte die Bleomycingruppe sowohl einen signifikant höheren Hydroxyprolingehalt als die Kontrollgruppe ($p=0,003$) als auch die zusätzlich mit Bosentan behandelte Gruppe ($p=0,009$). Im Vergleich der Kontrollgruppe zur Bleomycin- und Bosentangruppe zeigte sich mit $p=0,567$ kein signifikanter Unterschied.

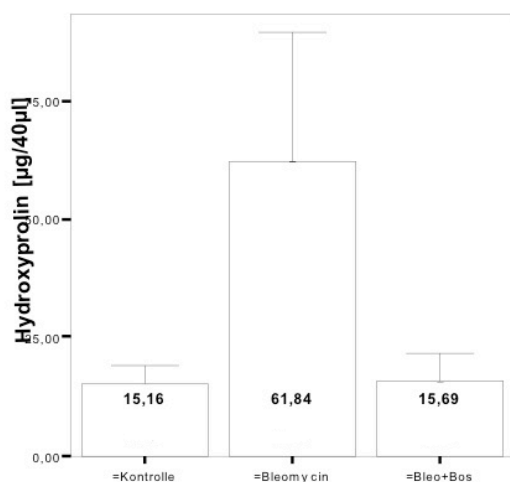


Abbildung 3-18: Hydroxyprolin

3.4.6 Endothelin-1 ELISA

Der freie Endothelin-1 Spiegel im Serum lag bei allen drei Versuchsgruppen auf gleichem Niveau. Zu erwarten wäre eine Erhöhung in der Bleomycingruppe gewesen.

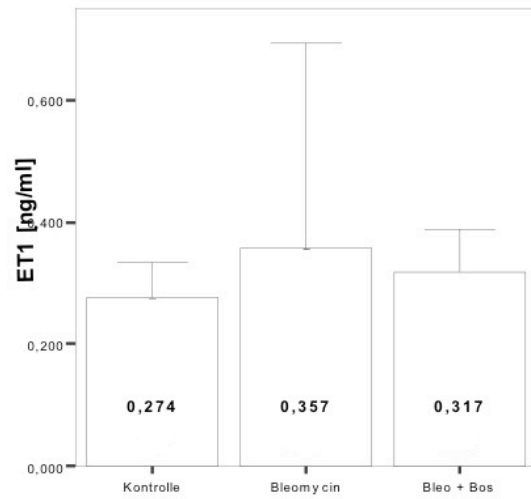


Abbildung 3-19: Endothelin-1 ELISA

4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

4.1 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Tiermodell die Auswirkungen einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose auf Entwicklung und Folgen einer pulmonalen Hypertonie zu überprüfen. Weiters sollte die Effektivität des unselektiven Endothelinantagonisten Bosentan bei der Behandlung einer pulmonalen Hypertonie untersucht werden.

Um die Leistungsfähigkeit der Tiere zu quantifizieren, wurde ein Laufband konstruiert, Ratten darauf konditioniert und eine entsprechende Ausgangsleistung bestimmt. Daraufhin sollte bei einem Drittel der Ratten mit Hilfe einer intratrachealen Installation von Bleomycin eine pulmonale Hypertonie induziert werden, das zweite Drittel wurde zusätzlich mit dem unselektiven Endothelinantagonisten Bosentan behandelt, ein weiteres Drittel der Tiere fungierte als gesunde Kontrollgruppe. Im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe zeigte sich sowohl in der Bleomycin- als in der Bosentangruppe zu Beginn ein signifikanter Rückgang der Laufleistung. Die Bosentanbehandlung führte jedoch im weiteren Verlauf zu einer Wiederannäherung an die gesunde Kontrollgruppe, so dass am Tag 28 kein relevanter Unterschied mehr zu verzeichnen war (100% vs. 98%), während Tiere in der Bleomycingruppe nur mehr 44% ihrer Ausgangsleistung erbringen konnten.

Am Ende der 28-tägigen Versuchsphase wurde bei den Tieren eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt, um das Ausmaß der pulmonalen Hypertonie zu erfassen. Hier zeigte die Bleomycingruppe mit 65 mmHg ($p=0,003$) einen signifikant höheren Druck als die Kontrollgruppe (23 mmHg). Durch die Bosentanbehandlung konnte eine nicht signifikante Druckreduktion auf 52 mmHg erreicht werden. Der systematische Fehler einer systemischen arteriellen Hypertonie konnte ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Blutdruckunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden konnten.

Bei der Untersuchung der Organe auf makroskopische Veränderungen konnten Aszites, bullöse Veränderungen der Lunge sowie petechiale Einblutungen in der Bleomycingruppe häufiger als in der Bosentangruppe nachgewiesen werden, während die Kontrolltiere einen unauffälligen Situs aufwiesen. Als Ausdruck der schweren Grunderkrankung kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als Adaption an die pulmonalen Druckerhöhung war eine Hypertrophie des rechten Ventrikels zu erwarten. Tatsächlich zeigte die Bleomycingruppe mit 31 mg das höchste rechtsventrikuläre Gewicht (Kontrollgruppe: 19 mg, $p=0,001$), während das Gewicht in der Bosentangruppe mit 23 mg signifikant niedriger war.

Das Ausmaß der Lungenfibrose wurde mittels verschiedener Messungen erfasst. Zum einen zeigte sich das Lungengewicht der Bleomycingruppe mit 1,02 g signifikant höher als das der Kontrollgruppe (0,51 g, $p=0,001$). Die Bosentanbehandlung führte zu einer signifikanten Reduktion auf 0,67 g ($p=0,006$). Zum anderen wurden in fibrosespezifischen Färbungen (HE) bei mit Bleomycin behandelten Tieren signifikant mehr Fibroseherde nachgewiesen ($p=0,000$). Wiederum wies die Bosentangruppe dabei einen tendenziell geringeren Fibrosegrad auf. Weiters diente die Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts (als Korrelat für kollagenes Bindegewebe) als Fibrosemarker. In der Bleomycingruppe zeigte sich ein signifikant erhöhter Hydroxyprolinegehalt im Vergleich zur Kontroll- (61,8 μ g vs. 15,2 μ g, $p=0,003$) und auch zur Bosentangruppe (61,8 μ g vs. 15,7 μ g, $p=0,009$).

Um die neurohumoralen Veränderungen zu untersuchen, wurde die Expression von Endothelin-A (ET-A)- und Endothelin-B (ET-B)-Rezeptoren semiquantitativ mittels Remmele-Score untersucht. Über die beiden

Rezeptoren wird die Wirkung von Endothelin-1 mediert. Die Expression von ET-A-Rezeptoren, die zu einer Vasokonstriktion und pulmonalen Gefäßproliferation führt, war in der Bleomycingruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,003$). Nach Bosentanapplikation konnte eine Annäherung an die Kontrollgruppe erreicht werden ($p=0,021$). Die ET-B-Rezeptor Expression, war in der Bleomycingruppe sowie in der Bosentangruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,001$). Bei der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS), die für die Produktion von NO im pulmonalen Gefäßbett verantwortlich ist, zeigte sich ein ähnliches Bild im Sinne einer Erniedrigung in der Bleomycingruppe ($p=0,014$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Bosentantherapie erhöhte wiederum den eNOS-Gehalt, jedoch nicht signifikant.

4.2 DISKUSSION

Park et al. untersuchten bereits 1997 die Auswirkungen von Bleomycin auf Zeichen der Entwicklung einer Lungenfibrose. Hier wurden pulmonale Volumina von Bindegewebe und Luft zur Quantifizierung der Fibrose zu Hilfe genommen, während in dieser Arbeit ein Schritt weitergegangen wurde und zusätzlich der Hydroxyprolingehalt bestimmt, sowie fibrosespezifische Färbungen angefertigt wurden. Auch auf die häufig assoziierte Folge, die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie, wurde eingegangen. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Bleomycininstillation zur Entwicklung einer Lungenfibrose kommt, was anhand unterschiedlicher Parameter festgemacht wurde. Einerseits wurde eine Erhöhung des Lungengewichts beobachtet, dies dürfte wahrscheinlich auf eine Zunahme von Bindegewebe und Stützgerüst der Lunge zurückzuführen sein. Natürlich könnten hierbei aber auch andere Faktoren hineinspielen, wie zum Beispiel eine Zunahme der interstitiellen Wassereinlagerungen wie bei Lungenödem oder eine starke lokale Entzündungsreaktion, die durch die lokale Vasodilatation und konsekutive entzündliche Exsudation ebenfalls eine Gewichtszunahme bedingen könnte. Deswegen erfolgte zur Untermauerung der These, dass es sich um kollagenes Bindegewebe handelt, noch andererseits die Bestimmung von Hydroxyprolingehalt im Gewebe. Hydroxyprolin ist eine alpha-Aminosäure, die Bestandteil von kollagenem Bindegewebe ist. Ihre quantitative Bestimmung wird zum Beispiel zur Beurteilung des Bindegewebsanteils in Fleischwaren herangezogen. Die Konzentration wurde in allen Lungenpräparaten bestimmt und es zeigte sich tatsächlich ein deutlich erhöhter Anteil bei den Tieren, bei denen eine Bleomycininstillation stattgefunden hat. Außerdem wurden die Lungenpräparate nach HE-Färbung mikroskopisch auf Zeichen der Fibrose hin untersucht, auch hier konnte nach Bleomycingabe eine Zunahme von Fibroseherden beobachtet werden.

Durch die Ergebnisse dieser drei verschiedenen Untersuchungen (Lungengewicht, Hydroxyprolingehalt und HE-Färbung) als Korrelat des Ausmaßes der Lungenfibrose konnte gezeigt werden, dass Bleomycininstillation bei der Ratte zur raschen Entwicklung einer Lungenfibrose führt. Das Modell scheint also auf den ersten Blick auch ideale Voraussetzungen für die Untersuchungen in der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie zu liefern. Im Bleomycinmodell kommt es wahrscheinlich über eine starke Entzündungsreaktion, die unter anderem zur Proliferation von Bindegewebe führt, zur Entstehung einer Lungenfibrose [McCullough et al., 1978]. Es können fokale peribronchiale Entzündungsreaktionen sowie ein paracicatriciales Emphysem (erweiterte terminale Luftwege) gesehen werden [Borzone et al., 2001]. In den meisten Arbeiten werden allerdings nur die akuten Veränderungen nach Bleomycininstillation untersucht. In der chronischen Phase zeigen die Tiere allerdings nicht die typischerweise zu erwartende pulmonale Restriktion, so dass die Ergebnisse der Studien, die anhand des Bleomycinmodells gemacht werden, nicht leichtfertig auf den Mensch übertragen werden können [Borzone et al., 2001]. Der Vorgang nach Bleomycininstillation dürfte in etwa der Pathogenese der Fibrose beim Menschen ähneln, die als Reaktion auf toxische Schäden auftritt oder unterschiedliche entzündliche Noxen als Ursache hat. Dazu zählt die idiopathische Lungenfibrose, die exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose und die Lungenfibrose, die nach einem ARDS (=acute respiratory distress syndrome) auftreten kann. Die Lungenfibrose und ihre

zugrundeliegenden verschiedenen Ursachen beim Menschen sind zu komplex, um sie in diesem Modell vollständig abbilden zu können. Beim Menschen gibt es unterschiedliche Formen der Lungenfibrose mehrere auch ohne Entzündungskomponente. Der Ansatz ist allerdings gut geeignet, um schnell eine Fibrose im Tiermodell zu induzieren und auch die weiteren Folgen auf das Herz- und Kreislaufsystem zu untersuchen.

Zu den Folgen der Lungenfibrose gehört eine Verengung der Lungengefäße und Verdickung der Gefäßmuskulatur mit konsekutivem Anstieg des Drucks im pulmonal-arteriellen Kreislauf und als Reaktion hierauf eine Adaptation des rechten Ventrikels, der mit Hypertrophie reagiert, um sich an die gestiegenen Anforderungen anzupassen. All diese Veränderungen wurden in der vorliegenden Arbeit verfolgt und über unterschiedliche Messungen verifiziert. Zu Beginn der Kaskade stehen lokale neurohumorale Vorgänge. Bereits [Christman et al., 1992; Giaid and Saleh, 1995] konnten zeigen, dass die endotheliale Stickstoffmonooxidsynthetase (eNOS) und Prostazyklinsynthetase vermindert exprimiert werden. Dies konnte so auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Nach Bleomycingabe kam es zu einer Verringerung von eNOS im pulmonalen Gefäßbett. Dies dürfte dementsprechend auch eine Reduktion der lokalen Konzentration dieses wichtigen lokalen Vasodilatators zur Folge haben. Ein weiterer wichtiger Faktor in der lokalen Vasokonstriktion ist eine Überexpression von Endothelin. Giaid et al. zeigten 1993, dass die Endothelin-1 Immunreaktion in Endothelzellen von Pulmonalarterien mit Mediaverdickung und Intimafibrose besonders hoch war und dass auch die Endothelin-1 messenger RNA bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie höher war. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der drei Versuchsgruppen gefunden werden, allerdings zeigten sich bei den Endothelin-1 Rezeptoren signifikante Unterschiede. Bei den Tieren bei denen eine Lungenfibrose induziert wurde, konnte eine Hochregulation des Endothelin-A-Rezeptor beobachtet werden, allerdings eine verringerte Expression des Endothelin-B-Rezeptors. Durch den Endothelin-A Rezeptor wird eine lokale Vasokonstriktion und Zellproliferation bewirkt. Welche Rolle der Endothelin-B-Rezeptors in der Pathogenese spielt, ist noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert.

Der Rechtsventrikuläre Druck diente als Zeichen für die Druckerhöhung im Lungenkreislauf. Nach überstiegener Kompensation der pulmonal-arteriellen Druckzunahme kommt es auch zu einer Zunahme des Drucks im rechten Ventrikels. Die Druckzunahme äußert sich in einer Hypertrophie. Dies konnte quantifiziert werden, in dem eine Gewichtszunahme des rechten Ventrikels in der Bleomycin-Gruppe zu verzeichnen war. Durch Bosentan ließ sich hier eine signifikante Erniedrigung (rechtsventrikulären Druck bezogen auf das Endgewicht) erzielen, als Ausdruck einer besseren Kompensation und wahrscheinlich auch geringer ausgeprägten PAH.

Für betroffene Patienten sind die für sie fassbaren subjektiven Verbesserungen besonders relevant. Der Nachweis einer Optimierung der Gehstrecke und damit Verbesserung der Lebensqualität ist das Kriterium, das ein modernes Medikament in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie heutzutage klinisch erbringen muss. Um diese Anforderungen auf das Tiermodell zu übertragen und die Belastungsfähigkeit der Tiere im Verlauf zu überprüfen wurde das bereits im Methodenteil geschilderte Laufbandmodell etabliert. Anfangs wurde die Ausgangskondition der Tiere bestimmt und der Test für den jeweiligen Tag abgebrochen, falls die Tiere diesen Wert erreicht hatten (oberer cut off-Wert). Dieses Vorgehen erwies sich als recht zeitintensiv, da einzelne Tiere zwei Stunden und mehr pro Tag liefen. Deshalb ist es für nachfolgende Versuche ratsam sich nach alternativen Modellen umzusehen. Bei der Untersuchung der Belastungsfähigkeit bei Menschen im Rahmen einer Lungenfibrose wird oft der 6-Minuten Belastungstest durchgeführt. Dabei haben die Patienten 6 Minuten Zeit eine möglichst große Strecke zurückzulegen. Die zurückgelegte Gehstrecke wird dann als Maß für die Belastungsfähigkeit genommen. Dieses Modell ist jedoch nur schwer in den Tierversuch umzusetzen, da es die aktive Mitarbeit der Probanden voraussetzt. Ein weiteres Modell, das bei Menschen im Einsatz ist, ist ein Mehrstufen-Belastungstest, wie er etwa beim Belastungs-EKG mit dem Fahrradergometer oder Laufband

angewandt wird. Dabei wird die Belastung nach einem definierten Zeitintervall erhöht, bis der Versuch aufgrund der Erschöpfung des Patienten abgebrochen wird. Dieses Modell liefert bei einem begrenzten Zeitbedarf gute Aussagen über die Belastungsfähigkeit der Probanden. Diese Methode könnte auch auf unser Laufband übertragen werden und würde eine bedenkenwerte Alternative darstellen. Trotz alledem konnten mit dem vorliegenden Versuchsaufbau aussagekräftige Ergebnisse gewonnen werden. Es kam wie bereits erwähnt zu einer starken Leistungsabnahme bei den Tieren bei denen eine Lungenfibrose induziert wurde. Die Tiere wurden zunehmend kachektisch und schwach, was sich auch in einer Reduktion der Muskelmasse des linksventrikulären Herzmuskels widerspiegelte.

Als möglicher Ansatzpunkt in der Therapie der pulmonalen Hypertonie bietet sich eine Blockierung der neurohumoralen Vorgänge an, die zu den komplexen und teilweise irreversiblen Veränderung im pulmonalen Gefäßbett führen. In dieser Arbeit wurde der Endothelinantagonist Bosentan gewählt, der unselektiv sowohl an Endothelin-A Rezeptoren als auch an Endothelin-B Rezeptoren bindet. Bei der Untersuchung der Rezeptoren am Endothel zeigte sich eine Hochregulierung des Endothelin-A-Rezeptors nach Induktion einer Fibrose. Durch Bosentantherapie kam es zu einer Abnahme dieser Hochregulation. Es konnte gezeigt werden, dass Bosentan die Effekte, die durch Bleomycin verursacht wurden zum Teil abblenden oder sogar umkehren kann. Die Laufleistung konnte beinahe an die Ausgangsleistung zurückgeführt werden und auch der rechtsventrikuläre Druck und die Hypertrophie des rechten Ventrikels zeigten deutlich bessere Werte. Interessanterweise konnten aber auch Zeichen der Lungenfibrose positiv beeinflusst werden. So kam es unter Bosentanbehandlung nach Bleomycininstillation zu einem geringeren Hydroxyprolinegehalt, weniger Fibroseherden und einem geringeren Lungengewicht. Diese Resultate dienen als Zeichen dafür, dass offenbar weniger kollagenes Bindegewebe unter Bosentanbehandlung in der Lunge zu finden ist. Ähnliche Ergebnisse konnten bei [Hirata et al., 1989] beobachtet werden: Hier zeigte sich eine durch Endothelin vermittelte mitogene Wirkung auf glatte Gefäßmuskeln, Fibroblasten und Endothelzellen. So konnten im Bleomycinmodell erhöhte Endothelin-1 Konzentrationen in fibrotischen Lungenregionen nachgewiesen werden. Eine weitere Studie zeigte, dass es auch bei ET-1 transgenen Mäusen zu einem fibrotischen Umbau der Lunge kommt [Hochar et al., 2000]. Bereits Cambrey et al. (1994) und Dawes et al. (1996) zeigten, dass Endothelinantagonisten in vitro eine inhibierende Wirkung auf die Fibroblastenproliferation und die Kollagensynthese haben. Nun muss man sich im Umkehrschluss die Frage stellen, ob sich Bosentan auch für die Behandlung der Lungenfibrose qualifizieren könnte. Hier muss wieder auf die mannigfaltigen Ursachen einer Lungenfibrose verwiesen werden. Bei Krankheitsbildern die mit einer Überproduktion von Endothelin-1 vergesellschaftet sind, dürften allerdings gewisse Effekte auch am Menschen zu erhoffen sein. Dawes et al. (1996) zeigten im Tiermodell, dass eine Endothelin-A Blockade den prokollagenen Effekt von Endothelin-1 aufheben kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bosentan eine durch Bleomycin induzierte Fibrose aufhalten kann. Wie bereits erwähnt dürfte es sich dabei um eine Fibrose handeln, die durch Entzündungsvorgänge zustande gekommen ist. Gamze et al. (2007) postulierten auch dementsprechend, dass Bosentan zu einer reduzierten Entzündungsreaktion durch Verringerung diverser proinflammatorischer Zytokine führt. Im Umkehrschluss könnte sich Bosentan also bei Fibrosearten wie idiopathischer Fibrose oder postentzündlichen Formen als wirksames Therapeutikum erweisen.

Als Kritikpunkt der Arbeit muss die Design-immanente Problematik angesprochen werden, dass die Tiere Bosentan nicht therapeutisch nach Entwicklung einer Lungenfibrose und pulmonalen Hypertonie erhalten haben, sondern zeitgleich mit der Bleomycininstillation. Nach der Erkenntnis, dass Bosentan antiproliferative Wirkung hat, stellt sich die Frage, ob die Effekte auf Reduktion der pulmonalen Hypertonie nun auch ausschließlich auf die Bosentantherapie zurückgeführt werden können. Kommt es einfach durch eine geringer ausgeprägte Fibrose auch zu geringer ausgeprägten Veränderungen im pulmonalen Gefäßbett? Diese Frage kann durch diese Arbeit so nicht beantwortet werden, allerdings konnte in der BREATHE-1 Studie 2002 die Wirksamkeit von Bosentan bei

pulmonal-arterieller Hypertonie gezeigt werden. In dieser Studie wurden nicht nur Patienten mit einer Lungenfibrose als Ursache für die pulmonale Hypertonie eingeschlossen [Rubin et al., 2002], so dass diese Überlegung wahrscheinlich widerlegt werden kann. Trotz alledem sollte man sich auch in Zukunft nach anderen Tiermodellen umsehen, die die Situation am Menschen besser widerspiegeln. Es ist schwierig zu unterscheiden, ob das zu testende Medikament mit der inflammatorischen und frühen fibrotischen Antwort durch Bleomycin interagiert, ob es das Fortschreiten der Fibrose verlangsamt oder tatsächlich die pulmonal arterielle Hypertonie als Endstrecke verbessert. So wird gefordert, dass alle potenziellen antifibrotischen Medikamente erst nach erfolgter Fibroseinduktion getestet werden sollten. Auch eine partielle Reversibilität bei der bleomycininduzierten Fibrose wird postuliert. Insgesamt sollte also der Nachweis der Wirksamkeit eines Medikaments im Bleomycinmodell nicht bedenkenlos auf den Menschen übertragen werden [Moeller et al., 2008].

Als weiterer Kritikpunkt lässt sich zum einen die begrenzte Fallzahl von gesamt 30 Tieren nennen. Durch eine Erhöhung der Fallzahlen, wäre es eventuell möglich gewesen mehr Signifikanzniveaus zu erreichen, wo jetzt nur Tendenzen zu sehen waren. Zum anderen muss genannt werden, dass die histologischen Untersuchungen nur semiquantitativ durchgeführten wurden. Auch die Dauer des Beobachtungszeitraums könnte kritisiert werden, da sich beim Menschen eine pulmonale Hypertonie nicht in diesem kurzen Zeitraum entwickeln kann. Vielmehr ist erst nach etwa 10 Jahren nach Bleomycinapplikation im Rahmen einer zytostatischen Therapie mit einer Fibrose zu rechnen.

4.3 KONKLUSIO

Übereinstimmend mit früheren Studien [Mutsaers et al., 1998b; Park et al., 1997] konnte gezeigt werden, dass die intratracheale Instillation von Bleomycin das Entstehen einer pulmonalen Fibrose bewirkt. Die in der Bleomycingruppe nachgewiesenen Veränderungen zeigen die Wirksamkeit des Bleomycinmodells bei der Induktion einer pulmonalen Hypertonie. Somit bietet dieses Modell eine gute Grundvoraussetzung für die Überprüfung von Behandlungsansätzen bei der pulmonalen Hypertonie bzw. Lungenfibrose. Weiters konnte die Wirksamkeit des unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie gezeigt werden. Sowohl eine geringere Rechtsherzhypertrophie, als auch eine Verringerung des rechtsventrikulären Drucks und zum Schluss auch eine verbesserte Leistungsfähigkeit konnten erreicht werden.

5 VERZEICHNISSE

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Bedienelemente des Laufbandes	14
Abbildung 2-2: Oxidation von TMB mittels Meerrettichperoxidase	22
Abbildung 3-1: Entwicklung der Leistungsfähigkeit Tag 1-14	24
Abbildung 3-2: Entwicklung der Leistungsfähigkeit Tag 16-25	25
Abbildung 3-3: Systemischer Blutdruck	25
Abbildung 3-4: Rechtsventrikulärer systolischer Druck	26
Abbildung 3-5: Makroskopische Organveränderungen	27
Abbildung 3-6: Endgewicht	27
Abbildung 3-7: linksventrikuläres Gewicht	28
Abbildung 3-8: Linksventrikuläres Gewicht/Endgewicht	29
Abbildung 3-9: Rechtsventrikuläres Gewicht	29
Abbildung 3-10: Rechtsventrikuläres Gewicht/Endgewicht	30
Abbildung 3-11: Rechtsventrikuläres Gewicht/linksventrikuläres- und Septumgewicht	31
Abbildung 3-12: Septumgewicht	31
Abbildung 3-13: Lungengewicht	32
Abbildung 3-14: HE-Fibrosegrad	33
Abbildung 3-15: Remmele-Score-ET-A-Rezeptor	34
Abbildung 3-16: Remmele-Score-ET-B-Rezeptor	34
Abbildung 3-17: Remmele-Score eNOS	35
Abbildung 3-18: Hydroxyprolin	35
Abbildung 3-19: Endothelin-1 ELISA	36

Literaturverzeichnis

- ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348, 730-2.
- BARST, R. J., LANGLEBEN, D., FROST, A., HORN, E. M., OUDIZ, R., SHAPIRO, S., MCLAUGHLIN, V., HILL, N., TAPSON, V. F., ROBBINS, I. M., ZWICKE, D., DUNCAN, B., DIXON, R. A. & FRUMKIN, L. R. (2004) Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 169, 441-7.
- BARST, R. J., RUBIN, L. J., LONG, W. A., MCGOON, M. D., RICH, S., BADESCH, D. B., GROVES, B. M., TAPSON, V. F., BOURGE, R. C., BRUNDAGE, B. H. & ET AL. (1996) A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*, 334, 296-302.
- BATTISTINI, B., CHAILLER, P., D'ORLEANS-JUSTE, P., BRIERE, N. & SIROIS, P. (1993) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14, 385-99.
- BONVALLET, S. T., ZAMORA, M. R., HASUNUMA, K., SATO, K., HANASATO, N., ANDERSON, D., SATO, K. & STELZNER, T. J. (1994) BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol*, 266, H1327-31.
- BORZONE, G., MORENO, R., URREA, R., MENESES, M., OYARZUN, M. & LISBOA, C. (2001) Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 1648-53.
- CAMBREY, A. D., HARRISON, N. K., DAWES, K. E., SOUTHCOTT, A. M., BLACK, C. M., DU BOIS, R. M., LAURENT, G. J. & MCANULTY, R. J. (1994) Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11, 439-45.
- CARRINGTON, C. B., GAENSLER, E. A., COUTU, R. E., FITZGERALD, M. X. & GUPTA, R. G. (1978) Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med*, 298, 801-9.
- CHRISTMAN, B. W., MCPHERSON, C. D., NEWMAN, J. H., KING, G. A., BERNARD, G. R., GROVES, B. M. & LOYD, J. E. (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 327, 70-5.
- CHUA, F., GAULDIE, J. & LAURENT, G. J. (2005) Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33, 9-13.
- COULTAS, D. B., ZUMWALT, R. E., BLACK, W. C. & SOBONYA, R. E. (1994) The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 150, 967-72.
- CUSHLEY, M. J. (1999) The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. Introduction. *Thorax*, 54 Suppl 1, S1-14.
- DAWES, K. E., CAMBREY, A. D., CAMPA, J. S., BISHOP, J. E., MCANULTY, R. J., PEACOCK, A. J. & LAURENT, G. J. (1996) Changes in collagen metabolism in response to endothelin-1: evidence for fibroblast heterogeneity. *Int J Biochem Cell Biol*, 28, 229-38.
- DE NUCCI, G., THOMAS, R., D'ORLEANS-JUSTE, P., ANTUNES, E., WALDER, C., WARNER, T. D. & VANE, J. R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9797-800.
- DELEUZE, P. H., ADNOT, S., SHIYA, N., ROUDOT THORAVAL, F., EDDAHIBI, S., BRAQUET, P., CHABRIER, P. E. & LOISANCE, D. Y. (1992) Endothelin dilates bovine pulmonary circulation and reverses hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 19, 354-60.

- FOUASSIER, L., KINNMAN, N., LEFEVRE, G., LASNIER, E., REY, C., POUPON, R., ELFERINK, R. P. & HOUSSET, C. (2002) Contribution of mrp2 in alterations of canalicular bile formation by the endothelin antagonist bosentan. *J Hepatol*, 37, 184-91.
- FRANK, H., MLCZUCH, J., HUBER, K., SCHUSTER, E., GURTNER, H. P. & KNEUSSL, M. (1997) The effect of anticoagulant therapy in primary and anorectic drug-induced pulmonary hypertension. *Chest*, 112, 714-21.
- GAINE, S. P. & RUBIN, L. J. (1998) Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 352, 719-25.
- GALIE, N., GHOFrani, H. A., TORBICKI, A., BARST, R. J., RUBIN, L. J., BADESCH, D., FLEMING, T., PARPIA, T., BURGESS, G., BRANZI, A., GRIMMINGER, F., KURZYNA, M. & SIMONNEAU, G. (2005) Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 353, 2148-57.
- GALIE, N., RUBIN, L., HOEPER, M., JANSÁ, P., AL-HITI, H., MEYER, G., CHIOSSI, E., KUSIC-PAJIC, A. & SIMONNEAU, G. (2008) Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 371, 2093-100.
- GAMZE, K., MEHMET, H. M., DEVECI, F., TURGUT, T., ILHAN, F. & OZERCAN, I. (2007) Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model of emphysema. *Exp Mol Med*, 39, 614-20.
- GIAID, A. & SALEH, D. (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 333, 214-21.
- GIAID, A., YANAGISAWA, M., LANGLEBEN, D., MICHEL, R. P., LEVY, R., SHENNIB, H., KIMURA, S., MASAKI, T., DUGUID, W. P. & STEWART, D. J. (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 328, 1732-9.
- HIRATA, Y., TAKAGI, Y., FUKUDA, Y. & MARUMO, F. (1989) Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 78, 225-8.
- HOCHER, B., SCHWARZ, A., FAGAN, K. A., THONE-REINEKE, C., EL-HAG, K., KUSSEROW, H., ELITOK, S., BAUER, C., NEUMAYER, H. H., RODMAN, D. M. & THEURING, F. (2000) Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23, 19-26.
- KAHALEH, M. B. (1991) Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum*, 34, 978-83.
- KING, T. E., JR., TOOZE, J. A., SCHWARZ, M. I., BROWN, K. R. & CHERNIACK, R. M. (2001) Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1171-81.
- LETTIERI, C. J., NATHAN, S. D., BARNETT, S. D., AHMAD, S. & SHORR, A. F. (2006) Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 129, 746-52.
- LEUCHTE, H. H., NEUROHR, C., BAUMGARTNER, R., HOLZAPFEL, M., GIEHRL, W., VOGESER, M. & BEHR, J. (2004) Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 360-5.
- LI, H., CHEN, S. J., CHEN, Y. F., MENG, Q. C., DURAND, J., OPARIL, S. & ELTON, T. S. (1994) Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, 77, 1451-9.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. (2009) *Der Experimentator: Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag.

- MARALA, R. B., DUDA, T. & SHARMA, R. K. (1993) Interaction of atrial natriuretic factor and endothelin-1 signals through receptor guanylate cyclase in pulmonary artery endothelial cells. *Mol Cell Biochem*, 120, 69-80.
- MATTHES, J. & GRONER, F. (2006) [Bosentan: a new pillar in the treatment of pulmonary hypertension?]. *Dtsch Med Wochenschr*, 131, 1031-4.
- MCCULLOUGH, B., COLLINS, J. F., JOHANSON, W. G., JR. & GROVER, F. L. (1978) Bleomycin-induced diffuse interstitial pulmonary fibrosis in baboons. *J Clin Invest*, 61, 79-88.
- MCLAUGHLIN, V. V. & MCGOON, M. D. (2006) Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 114, 1417-31.
- MOELLER, A., ASK, K., WARBURTON, D., GAULDIE, J. & KOLB, M. (2008) The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 362-82.
- MUTSAERS, S. E., FOSTER, M. L., CHAMBERS, R. C., LAURENT, G. J. & MCANULTY, R. J. (1998a) Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18, 611-9.
- MUTSAERS, S. E., MARSHALL, R. P., GOLDSACK, N. R., LAURENT, G. J. & MCANULTY, R. J. (1998b) 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, 221-5.
- NADROUS, H. F., PELLIKKA, P. A., KROWKA, M. J., SWANSON, K. L., CHAOWALIT, N., DECKER, P. A. & RYU, J. H. (2005a) Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 128, 2393-9.
- NADROUS, H. F., PELLIKKA, P. A., KROWKA, M. J., SWANSON, K. L., CHAOWALIT, N., DECKER, P. A. & RYU, J. H. (2005b) The impact of pulmonary hypertension on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 128, 616S-617S.
- OLSCHEWSKI, H., SIMONNEAU, G., GALIE, N., HIGENBOTTAM, T., NAEIJE, R., RUBIN, L. J., NIKKHO, S., SPEICH, R., HOEPER, M. M., BEHR, J., WINKLER, J., SITBON, O., POPOV, W., GHOFrani, H. A., MANES, A., KIELY, D. G., EWERT, R., MEYER, A., CORRIS, P. A., DELCROIX, M., GOMEZ-SANCHEZ, M., SIEDENTOP, H. & SEEGER, W. (2002) Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 347, 322-9.
- PARK, S. H., SALEH, D., GIAID, A. & MICHEL, R. P. (1997) Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, 600-8.
- PETKOV, V. & DOBERER, D. (2003) Pulmonale Hypertonie. *Journal für Hypertonie - Austrian Journal of Hypertension*, 7 (3), 7-14.
- RUBANYI, G. M. & POLOKOFF, M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46, 325-415.
- RUBIN, L. J., BADESCH, D. B., BARST, R. J., GALIE, N., BLACK, C. M., KEOGH, A., PULIDO, T., FROST, A., ROUX, S., LECONTE, I., LANDZBERG, M. & SIMONNEAU, G. (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 346, 896-903.
- SCHÄFERS, H.-J. & SEEGER, W. (2001) *Pulmonale Hypertonie*, Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin.
- SHAHAR, I., FIREMAN, E., TOPILSKY, M., GRIEF, J., SCHWARZ, Y., KIVITY, S., BEN-EFRAIM, S. & SPIRER, Z. (1999) Effect of endothelin-1 on alpha-smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblasts proliferation in interstitial lung diseases. *Int J Immunopharmacol*, 21, 759-75.

- SIMONNEAU, G., ROBBINS, I. M., BEGHETTI, M., CHANNICK, R. N., DELCROIX, M., DENTON, C. P., ELLIOTT, C. G., GAINE, S. P., GLADWIN, M. T., JING, Z. C., KROWKA, M. J., LANGLEBEN, D., NAKANISHI, N. & SOUZA, R. (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54, S43-54.
- SWEENEY, M. & YUAN, J. X. (2000) Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res*, 1, 40-8.
- TAKUWA, N., TAKUWA, Y., YANAGISAWA, M., YAMASHITA, K. & MASAKI, T. (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 264, 7856-61.
- TUKIAINEN, P., TASKINEN, E., HOLSTI, P., KORHOLA, O. & VALLE, M. (1983) Prognosis of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*, 38, 349-55.
- UGUCCIONI, M., PULSATELLI, L., GRIGOLO, B., FACCHINI, A., FASANO, L., CINTI, C., FABBRI, M., GASBARRINI, G. & MELICONI, R. (1995) Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*, 48, 330-4.
- WEISSBERG, P. L., WITCHELL, C., DAVENPORT, A. P., HESKETH, T. R. & METCALFE, J. C. (1990) The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 85, 257-62.
- WENSEL, R., OPITZ, C. F., EWERT, R., BRUCH, L. & KLEBER, F. X. (2000) Effects of iloprost inhalation on exercise capacity and ventilatory efficiency in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*, 101, 2388-92.
- YAMANE, K., KASHIWAGI, H., SUZUKI, N., MIYAUCHI, T., YANAGISAWA, M., GOTO, K. & MASAKI, T. (1991) Elevated plasma levels of endothelin-1 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 34, 243-4.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-5.
- ZAMORA, M. A., DEMPSEY, E. C., WALCHAK, S. J. & STELZNER, T. J. (1993) BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9, 429-33.

6 CURRICULUM VITAE

Johannes Resch

Geboren 1981 in Passau



Berufliche Qualifikation

2013-2014	Facharzt am Juliusspital Würzburg, Facharztausbildung Innere Medizin und Rheumatologie
04/13-09/14	Weiterbildung Rheumatologie, Chefarzt Prof. Dr. W. Scheppach
2013	Anerkennung Facharzt für Innere Medizin
2007-2012	Assistenzarzt am Klinikum Passau, Facharztausbildung Innere Medizin
01/07-02/09	Weiterbildung Kardiologie und Pneumologie, III. Med. Klinik, Chefarzt Prof. D. Elsner
03/09-08/10	Weiterbildung Hämatologie und Onkologie, II. Med. Klinik, Chefarzt Prof. T. Südhoff
08/10-03/12	Weiterbildung Gastroenterologie, Nephrologie und Infektiologie (dabei 9 Monate interdisziplinäre Notaufnahme), I. Med. Klinik, Chefarzt Prof. M. Wettstein
03/12-12/12	Weiterbildung Medizinische Intensivmedizin, III. Med. Klinik, Chefarzt Prof. D. Elsner
2012-Heute	Teilnahme am Ärztlichen Notfalldienst der KV Bayern

Ausbildung

2000-2006	Medizinstudium an der Universität Regensburg
2000	Abitur, Gymnasium Freudenhain Passau

Zusatzqualifikationen

Fachkunde Rettungsdienst
DEGUM Grund-und Aufbaukurs Abdomen-,Retroperitoneal- und Thoraxsonographie
DEGUM Grundkurs Transthorakale Echokardiographie
DEGUM Grundkurs Duplexsonographie

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Norwegisch (gute Kenntnisse)

7 DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Professor Pfeifer bedanken, der die Betreuung der Arbeit nach Jahren des Stillstandes übernommen hat. Ohne Ihn wäre eine Fertigstellung nicht möglich gewesen.

Der Universität Regensburg und insbesondere der II. Medizinischen Klinik danke ich für die Themenstellung und die Überlassung Ihrer Einrichtungen.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Katharina Passini, die nicht nur die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens auf sich genommen hat, sondern mich vor allem in den letzten Jahren stets motiviert hat, die Fertigstellung voranzutreiben. Ihrem unermüdlichen Einsatz verdanke ich viel.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, durch die mein Medizinstudium und die damit verbundene Doktorarbeit erst möglich wurde.

Danke!