

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg
Abteilung Pneumologie
Direktor: Professor Dr. med. Lars Maier
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

**Immunhistologische Untersuchungen der neurohumoralen Regulation und
des vaskulären Remodelings am Modell der Monocrotalin-induzierten
Pulmonalen Arteriellen Hypertonie der Ratte unter Anwendung des
nicht selektiven Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan im Vergleich
zum selektiven Endothelin A-Rezeptorantagonisten Ambrisentan**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von Antje Bettina Karle
aus Schopfheim

2017

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg

Abteilung Pneumologie

Direktor: Professor Dr. med. Lars Maier

der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

**Immunhistologische Untersuchungen der neurohumoralen Regulation und
des vaskulären Remodelings am Modell der Monocrotalin-induzierten
Pulmonalen Arteriellen Hypertonie der Ratte unter Anwendung des
nicht selektiven Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan im Vergleich
zum selektiven Endothelin A-Rezeptorantagonisten Ambrisentan**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von Antje Bettina Karle
aus Schopfheim

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Stephan Schroll
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Kühnel
Tag der mündlichen Prüfung:	25.10.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Pulmonale Arterielle Hypertonie. S. 3**
 - 1.1.1. Definition
 - 1.1.2. Pathogenese und Manifestation der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie
 - 1.1.3. Neurohumorale Regulation – Das Endothelinsystem

- 1.2. Arbeitshypothese. S. 7**

2. Methode

- 2.1. Tierexperimentelle Versuchsphase. S. 8**
 - 2.1.1. Tierhaltung und Versuchsgruppen
 - 2.1.2. Induktion der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie und medikamentöse
Behandlung
 - 2.1.3. Hämodynamik
 - 2.1.3.1. Blutdruckmessung
 - 2.1.3.2. Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes
 - 2.1.4. Organentnahme

- 2.2. Immunhistologische Untersuchungen. S. 11**
 - 2.2.1. Paraffineinbettung und Schnittherstellung
 - 2.2.2. Durchführung der Referenzfärbungen
 - 2.2.2.1. RECA
 - 2.2.2.2. Aktin
 - 2.2.3. Durchführung des immunhistologischen Nachweises der Prostaglandin
I-Synthase (PGI-Synthase)
 - 2.2.4. Auswertung mittels Remmele-Score

- 2.3. Untersuchung des vaskulären Remodeling. S. 18**
 - 2.3.1. Paraffineinbettung und Schnittherstellung
 - 2.3.2. Elastica van Gieson-Färbung
 - 2.3.3. Morphometrische Auswertung

2.4. Statistische Auswertung.	S. 21
--------------------------------------	--------------

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamik.	S. 22
--------------------------	--------------

3.1.1. Blutdruckmessung

3.1.2. Rechtsventrikulärer systolischer Druck

3.2. Ventrikuläres Remodeling.	S. 24
---------------------------------------	--------------

3.3. Immunhistologische Ergebnisse der Prostaglandin-I-Synthase.	S. 25
---	--------------

3.3.1. Kleine Pulmonalgefäße

3.3.2. Große Pulmonalgefäße

3.4. Pulmonalvaskuläres Remodeling.	S. 27
--	--------------

3.4.1. Mediafläche

3.4.2. Verhältnis der Mediafläche zur Lumenfläche

<u>4. Diskussion.</u>	S. 29
------------------------------	--------------

<u>5. Zusammenfassung.</u>	S. 33
-----------------------------------	--------------

<u>6. Literaturverzeichnis.</u>	S. 34
--	--------------

<u>7. Abkürzungsverzeichnis.</u>	S. 39
---	--------------

<u>8. Eigenständigkeitserklärung.</u>	S. 42
--	--------------

9. Danksagung

10. Lebenslauf

1. Einleitung

1. 1. Pulmonale Arterielle Hypertonie

1.1.1. Definition

Unter Pulmonaler Arterieller Hypertonie (PAH) versteht man die invasiv per Rechtsherzkatheter gemessene Erhöhung des mittleren pulmonal arteriellen Druckes (mPAP) ≥ 25 mmHg in Ruhe. Des Weiteren wird nach hämodynamischen Kriterien eine präkapilläre von einer postkapillären Form unterschieden (1).

Der mPAP $\geq 14 \pm 3$ mmHg gilt hierbei als Normalwert, wobei die obere mPAP-Grenze bei 20 mmHg liegt. Bei einem mPAP zwischen 21 und 24 mmHg wird von einer „borderline“ PAH gesprochen (1).

Hämodynamische Definition der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie :

Definition	Charakteristika ^a	Klinische Gruppe(n) ^b
PH	mPAP ≥ 25 mmHg	Alle
Prä-kapilläre PH	mPAP ≥ 25 mmHg PAWP ≤ 15 mmHg	1. Pulmonal arterielle Hypertonie 3. PH infolge von Lungen-erkrankungen 4. Chronisch-thrombembolische PH 5. PH mit unklarem und/oder multifaktoriellem Mechanismus
Postkapilläre PH	mPAP ≥ 25 mmHg PAWP > 15 mmHg	2. PH infolge von Linksherzerkrankungen 5. PH mit unklarem und/oder multifaktoriellem Mechanismus
Isoliert postkapilläre PH (Ipc-PH)	DPG < 7 mmHg und/oder PVR ≤ 3 WE ^c	
Kombiniert postkapilläre und präkapilläre PH (Cpc-PH)	DPG ≥ 7 mmHg und/oder PVR > 3 WE ^c	

Tabelle 1 (1) PH pulmonale Hypertonie, mPAP mittlerer pulmonal-arterieller Druck, PAWP „pulmonary arterial wedge pressure“ bzw. pulmonal-kapillärer Verschlussdruck, DPG diastolischer Druckgradient (diastolischer PAP-mPAWP), PVR pulmonal vaskulärer Widerstand, WE Wood Einheit. ^a Alle Werte werden in Ruhe gemessen. ^b Gemäß Tabelle 2. ^c Wood-Einheiten werden dyn.sek/cm⁻⁵ vorgezogen.

Eingeteilt wird die Pulmonale Arterielle Hypertonie in 5 Klassen (1):

<p>1. Pulmonale Arterielle Hypertonie</p> <ul style="list-style-type: none">1.1 Idiopathische PAH1.2 Hereditäre PAH<ul style="list-style-type: none">1.2.1. BMPR-2 Mutationen1.2.2. sonstige Mutationen1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht1.4 Assoziiert mit:<ul style="list-style-type: none">1.4.1 Bindegewbserkrankungen1.4.2 HIV-Infektion1.4.3 Portaler Hypertension1.4.4 Angeborenen Herzfehlern1.4.5 Schistosomiasis
<p>1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)</p>
<p>1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen</p>
<p>2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankung</p> <ul style="list-style-type: none">2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion2.3 Valvuläre Erkrankungen2.4. angeborene/erworbene Linksherz-Einfluß-/Ausflußtrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien2.5. angeborene/erworbene Pulmonalvenenstenose
<p>3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie</p> <ul style="list-style-type: none">3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen3.2 Interstitielle Lungenkrankheiten3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster3.4 Schlafbezogene Atemstörungen3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome3.6 Chronische Exposition in großer Höhe3.7 Fehlentwicklungen
<p>4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)</p>
<p>5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus</p> <ul style="list-style-type: none">5.1 Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie

- 5.2 Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden
- 5.3 Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- 5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Hämodialyse

Tabelle 2: Hoeper et al. 2016, Kommentar zu den ESC/ERS-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. Der Kardiologe 2016 (1)

BMPR-2 „bone morphogenetic protein receptor-2“, *ALK-1* „activin receptor-like Kinase 1 gene“

1.1.2. Pathogenese und Manifestation der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie

Die Pulmonale Arterielle Hypertonie (PAH) ist charakterisiert durch eine fortschreitende Zunahme des pulmonalen vaskulären Gefäßwiderstandes, welches zur Verschlechterung der rechtsventrikulären Herzfunktion und weiterführend zum rechtsventrikulären Versagen und schließlich zum Tod führt. Nach der Erstdiagnose ist die Erkrankung unbehandelt durch ein circa 2,5-jähriges Überleben gekennzeichnet. Hierbei zeigen sich Parameter der Belastbarkeit (WHO-Klasse, 6-Minuten-Gehtest, peak VO₂) und die Funktion des rechten Ventrikels („brain natriuretic peptide“ = BNP, „tricuspid annular plane systolic excursion“ = TAPSE) als wichtige prognostische Faktoren. Dabei ist die Mortalität eng mit der rechtsventrikulären Funktion verknüpft, welche im wesentlichen durch den mPAP, den mittleren rechtsventrikulären Druck und den Herzindex beeinflusst wird (2).

Die Zunahme des pulmonalen vaskulären Gefäßwiderstandes bei PAH wird verursacht durch die endotheliale Dysfunktion, in-situ-Thromben und das pulmonalvaskuläre Remodeling.

Die endotheliale Dysfunktion kennzeichnet ein Ungleichgewicht von verschiedenen Mediatoren, welches zu Gunsten einer Vasokonstriktion, einer Gefäßzellproliferation und der Neigung zur Entstehung von Thrombosen verschoben ist. Bei der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer verminderten Freisetzung von Vasodilatoren, wie Prostaglandin, NO und vasoaktivem intestinalem Peptid, sowie zur vermehrten Freisetzung von Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 (ET-1), Thromboxan A und Serotonin. Ebenso ist die Produktion von endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) erhöht (3,4).

1.1.3. Neurohumorale Regulation – Das Endothelinsystem

Das Endothelinsystem besteht aus vier strukturähnlichen Isopeptiden die als ET-1, ET-2, ET-3 und ET-4 benannt sind (5,6). Bei der PAH sind das ET-1, ET-2 und ET-3 wichtige Mediatoren und insbesondere ein erhöhtes ET-1 korreliert mit dem Schweregrad einer PAH. Das aktive ET-1 wird intrazellulär in zwei Schritten gebildet. Es entsteht zunächst das große Vorpeptid „prepro-ET-1“ das mit etwa 200 Aminosäuren gebildet wird (7). Dieses wird durch eine Endopeptidase in das ET-1 umgebaut, welches noch inaktiv ist. Durch das endotheliale Converting Enzym wird es in das aktive ET-1 umgewandelt (8,9,10).

Hierbei wird die Regulation des Endothelinsystems durch eine Vielzahl von Mediatoren und Faktoren beeinflusst. Während Mediatoren wie Angiotensin II, Katecholamine, Kardiotropin-1, Thrombin, Wachstumsfaktoren, Zytokine, freie Radikale, Insulin, Hypoxie und Scherkräfte stimulierend auf die ET-1 Produktion wirken (11,12,13,14,15), kommt es durch NO, natriuretisches Peptid, Heparin und Prostaglandine zu einer Inhibition (16,17,18,19).

Das aktive ET-1 weist nur eine kurze Halbwertszeit von einer Minute auf, wohingegen die ausgelösten Effekte bis zu einer Stunde anhalten können (20,21). Die Effekte werden durch Endothelinrezeptoren vermittelt, die auf verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel dem Gefäßendothel oder der glatten Gefäßmuskelzelle, lokalisiert sind. In der pulmonalen Zirkulation spielt das ET-1 eine sehr vielfältige Rolle, da es zwei Rezeptor-Subtypen anspricht, die entgegen gerichtete Effekte vermitteln.

So kommt es durch den ET-B Rezeptor des Gefäßendothels zu einer NO und Prostaglandin vermittelten Vasodilatation und zur antiproliferativen Wirkung. Durch den ET-B und ET-A Rezeptor auf der glatten Gefäßmuskelzelle jedoch zur Vasokonstriktion und Muskelzellproliferation (22,23,24). Da der ET-A Rezeptor hauptsächlich in pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert ist, wird die vermittelte Vasokonstriktion als eine Ursache für die Entwicklung einer PAH gesehen (25,26). Im Gegensatz dazu wird der ET-B Rezeptor vermehrt in Endothelzellen exprimiert und ist hier für die Elimination des ET-1 aus dem Körperkreislauf zuständig (25,27).

Des Weiteren muss beachtet werden, dass die verschiedenen Endothelin-Isopeptide mit unterschiedlicher Affinität an die Endothelinrezeptoren binden. Während ET-1 und ET-2 eine zehnmal höhere Bindungsaffinität als ET-3 zum ET-A Rezeptor besitzen, besteht beim ET-B Rezeptor eine vergleichbare Affinität zu allen 3 Endothelinsubtypen (22).

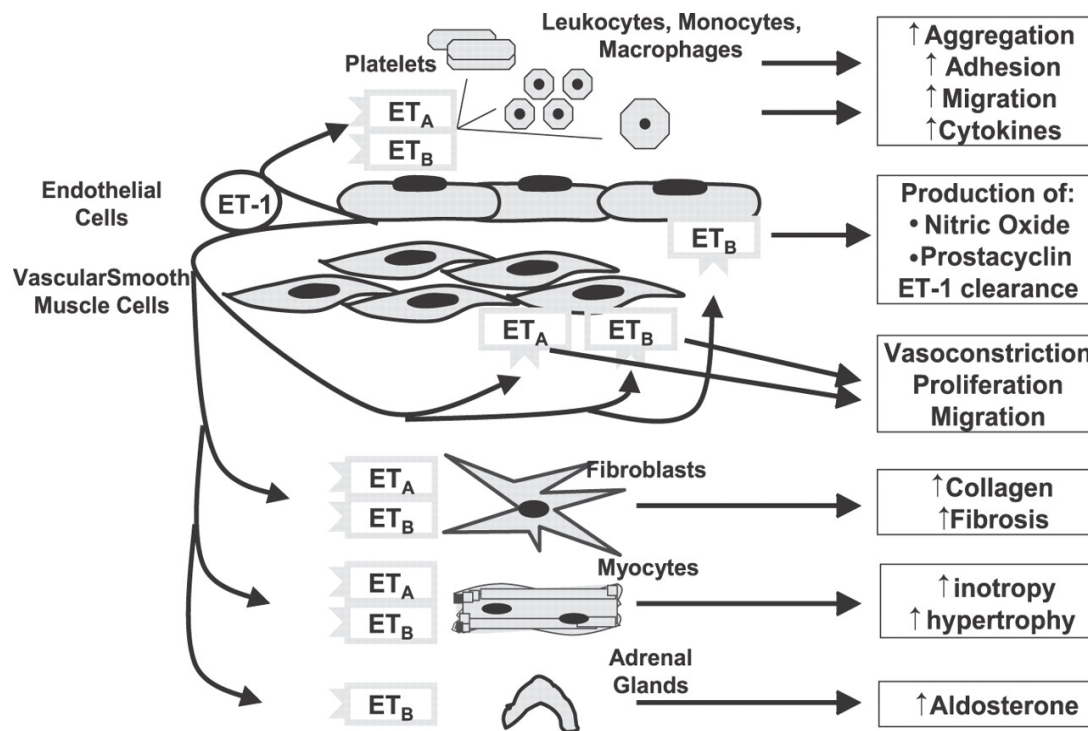


Abbildung 1: Galie N et al. Cardiovasc Res 2004;61:227-237 (28)

1.2. Arbeitshypothese

Eine etablierte Therapie der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie stellt die Gabe von Endothelinantagonisten dar. Hierbei gibt es verschiedene Endothelinantagonisten mit unterschiedlicher Selektivität gegenüber ET-A oder ET-B Rezeptoren.

So könnte ein selektiver ET-A Rezeptorantagonist einen Vorteil gegenüber einem unselektiven ET-Rezeptorantagonisten besitzen, da bei einer selektiven ET-A Rezeptorblockade positive Auswirkungen, die durch den ET-B Rezeptor vermittelt werden, wie zum Beispiel die Freisetzung der Vasodilatoren Prostaglandin und NO, erhalten bleiben könnten (29).

Deshalb überprüfen wir die Hypothese, dass die selektive Inhibierung des ET-A Rezeptors mit Ambrisentan im Vergleich zu einer unselektiven ET-Inhibition mit Bosentan einen Vorteil in der Therapie der PAH durch vermehrte Expression der Prostaglandin-Synthase erbringen könnte.

Der Effekt auf die PAH wurde durch die Bestimmung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) mittels Rechtsherzkatheter, histologische Auswertungen des pulmonalen Gefäßremodelings und der rechtsventrikulären Hypertrophie gemessen.

Als PAH-Modell wählten wir das etablierte Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Arteriellen Hypertonie.

2. Methode

2.1. Tierexperimentelle Versuchsphase

2.1.1. Tierhaltung und Versuchsgruppen

Das Forschungsvorhaben wurde von der Tierethikkommission der Universität Regensburg bewilligt und fand in den Räumen des Forschungsbaus H1 der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Dr. Stephan Schroll statt. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt. Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Anfangsgewicht von 250 g im Alter von 4 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum unter standardisierten Bedingungen gehalten. Dabei wurde ein 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus simuliert und der Zugang zu Trockenfutter und Trinkwasser erfolgte ad libitum. Während der vierwöchigen Versuchsphase wurden alle Tiere zweimal wöchentlich gewogen, um eine gewichtsadaptierte Medikamentengabe zu gewährleisten. Insgesamt wurden vier Versuchsgruppen gebildet.

1. Versuchsgruppe: Kontrolltiere ohne Behandlung (n = 13, KON)
2. Versuchsgruppe: behandelt mit Monocrotalin (n = 10, MCT)
3. Versuchsgruppe: behandelt mit Monocrotalin + Ambrisentan (n = 11, MCT+AMB)
4. Versuchsgruppe: behandelt mit Monocrotalin + Bosentan (n = 11, MCT+BOS)

2.1.2. Induktion der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie und medikamentöse Behandlung

Die Ratten der ersten Gruppe dienten als Kontrollgruppe und erhielten keine Medikation. Zur Induktion der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie wurde bei den Versuchsgruppen 2 bis 4 Monocrotalin (Fluka Biochemica, St. Gallen, Schweiz) verabreicht (30). Hierfür wurde einmalig eine intraperitoneale Injektion von 60 mg MCT/kg/KG durchgeführt. Dazu wurde MCT in 0,1 M Salzsäure (HCl) gelöst und dann mit Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert.

Der zweiten Versuchsgruppe wurde nur die MCT-Induktionsdosis verabreicht, während die Gruppen drei und vier neben der einmaligen Injektion von MCT, beginnend ab Tag 1, zusätzlich eine pharmakologische Intervention erhielten.

Den Tieren der dritten Gruppe wurde der selektive ET-A Rezeptorantagonist Ambrisentan (Knoll-AG, Ludwigshafen, Deutschland) täglich mittels Schlundsonde (1,2 x 80 mm, Scanbur

BK, Karlsunde, Dänemark) zugeführt. Dabei betrug die Dosis für Ambrisentan 35 mg/kg/KG (gelöst in 1 M NaOH und mittels 1 M HCL auf pH 7.4 auftitriert).

Die Ratten der vierten Gruppe erhielten täglich per Schlundsonde den unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan (Actelion, Zürich, Schweiz) in einer Dosis von 100 mg/kg/KG (gelöst in 5%-igem Gummi arabicum).

2.1.3. Hämodynamik

2.1.3.1 Blutdruckmessung

Am Ende der vierwöchigen Versuchsphase fand zum Ausschluss einer Systemischen Arteriellen Hypertonie an zwei aufeinander folgenden Tagen eine Blutdruckmessung statt. Die nicht-invasive systemische Blutdruckmessung erfolgte bei allen Tieren, analog zur Methode nach Riva-Rocci beim Menschen, mittels der „tail-cuff“-Methode (30). Dazu wurden die Ratten einzeln in einen schmalen röhrenförmigen Käfig eingesetzt und mit der Infrarotlampe bei ca. 37°C für 20 Minuten gewärmt, um die Durchblutung zu fördern. Am Ratenschwanz wurden eine Druckmanschette und ein Pulsaufnehmer befestigt. Mittels des Transducers wurde eine Pulsationskurve der Schwanzarterie erhoben, wobei die Amplitude den systolischen Blutdruck anzeigte (BP Recorder 8005, W&W Electronics, Hofheim, Deutschland). Die Blutdruckwerte wurden durch eine Doppelbestimmung und anschließende Mittelung der Werte erhoben.

2.1.3.2 Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes

Die Ratten wurden zu Versuchsende in einem Exsikator inhalativ mit Enfluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und anschließend mit einer einmaligen intraperitonealen Gabe von Trapanal in einer Dosierung von 0,1 ml/kgKG (Thiopental-Natrium 10 %, ALTANA Pharma, Konstanz, Deutschland) anästhesiert. Die narkotisierten Tiere wurden anschließend in Rückenposition gelagert und an den Extremitäten fixiert. Nach Rasur des Hals-Thoraxbereiches wurde durch Aufsuchen des rechten Halsdreieckes die Vena jugularis interna frei präpariert und punktiert. Es erfolgte die Rechtsherzkatheterisierung mit einem Liquemin N25 (Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespülten zentralen Kindervenenkatheter (1 mm × 80 mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Der zentrale Venenkatheter (ZVK) wurde unter Monitoring der angezeigten Druckkurven und Blutdruckamplituden mit Hilfe des zuvor geeichten Druckabnehmers (Programm 19, Hellige, Freiburg im Breisgau, Deutschland) im rechten Ventrikel platziert. Über diesen ZVK erfolgte die Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP).

2.1.4. Organentnahme

Nach Messung des RVSP wurden der Thorax und das Abdomen in der Medianlinie eröffnet. Es erfolgte die Freipräparation des Herzens und der Lunge. Diese wurden nach Durchtrennung sämtlicher Gefäße oberhalb der Herzbasis en bloc entnommen. Die Lunge wurde extrakorporal vom Herzen getrennt, wobei der linke und der rechte Lungenflügel nochmals am Hilus voneinander abgesetzt wurden.

Der linke Lungenflügel wurde mit 4 % PBS-gepuffertem Formaldehyd gespült, bis sich die Spülflüssigkeit nicht mehr trübte. Anschließend wurden die Organe in Einbettkassetten 24 h in Formalin fixiert. Der linke Lungenanteil wurde für die späteren histologischen und immunhistologischen Färbungen verwendet.

Der rechte Lungenflügel wurde mit isotoner Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Braun AG, Melsungen, Deutschland) in gleicher Weise gespült, im Anschluss auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung, die Teil einer weiteren Doktorarbeit war, bei - 80°C gelagert. Das explantierte Herz wurde mit kardiopleger Lösung gespült, um eine maximale Relaxation des Herzens zu erzielen. Nach Entfernung der Vorhöfe durch einen Horizontalschnitt auf der Klappenebene erfolgte die Abtrennung des rechten und linken Ventrikels vom Septum. Der rechte und linke Ventrikel sowie das Septum wurden gewogen, um im Anschluss die Herzquotienten berechnen zu können. Das Gewebe wurde abschließend bei - 80°C gelagert.

2.2. Immunhistologische Untersuchungen

Ein Teil der experimentellen Forschung bestand in der Untersuchung der neurohumoralen Regulation der Pathomechanismen der PAH mittels immunhistologischer Nachweisverfahren. Neben einer Quantifizierung erlaubt diese Methodik auch eine genaue Lokalisation der untersuchten Proteine. Das Prinzip der Immunhistologie ist der spezifische Nachweis bestimmter Rezeptoren oder Enzyme in paraffinfixierten Dünnschnitten mit Hilfe von Antikörpern.

Dabei wird der Paraffinschnitt, mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischem ersten Antikörper (primärer Antikörper), inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper werden abgewaschen und anschließend ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper), welcher gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist, auf die Schnitte aufgetragen. Mit Hilfe des Avidin-Biotin-Systems, welches an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, und dem Einsatz des Substrates 3,3-Diaminobenzidin (DAB) wird die Visualisierung des gewünschten markierten Proteins erreicht. Dabei wird die starke Affinität von Avidin zu Biotin zur Bildung von Avidin-Biotin-Komplexen nach folgendem Prinzip genutzt:

- Der sekundäre Antikörper ist Biotin-konjugiert, wobei das Biotin kovalent an den Antikörper gebunden ist. An dieses Biotin bindet das Avidin, welches noch weitere Biotin-Bindungsstellen besitzt.
- An diese weiteren Bindungsstellen bindet nun wiederum Biotin, das an ein Enzym, in diesem Fall an eine HRP, gebunden ist.
- Die Peroxidase katalysiert die Farbreaktion mit dem Substrat DAB, welches selektiv nur an Peroxidase positiven Arealen ausfällt und ein unlösliches braunes Endprodukt bildet.

Um nicht falsch positive Ergebnisse durch die endogen vorkommende Peroxidase zu erhalten, müssen diese blockiert werden, was meist durch ein 10 %-iges H_2O_2 -Bad erreicht wird. Des Weiteren müssen auch die endogen Biotin-bindenden Proteine und bindenden nichtspezifischen Substanzen blockiert werden. Dies geschieht durch Auftragen einer Avidin-Biotin-Blocklösung.

Da es durch die Formalinfixierung zu einer Quervernetzung der Proteine kommt und die antigenen Strukturen dadurch maskiert werden können, das heißt für die Antikörper nicht zugänglich sind, muss gegebenenfalls vor Inkubation mit dem primären Antikörper ein so genanntes Antigen-Retrieval (= Antigenwiederfindung) durchgeführt werden. Hierzu werden in der Literatur verschiedene Verfahren genannt, die Wahl des Verfahrens ist vom gesuchten

Protein abhängig. In dieser Arbeit kam das enzymatische Antigen Retrieval bzw. das thermische Verfahren mittels Kochen in Unmasking Solution zum Einsatz. Immunhistologisch sollte die Prostaglandin I-Synthase (PGIS) nachgewiesen werden. Um deren quantitative Auswertung zu ermöglichen, mussten zwei zusätzliche Referenzfärbungen durchgeführt werden. Zum einen der immunhistologische Nachweis von RECA 1 (= rat endothelial cell antibody) und zum anderen von Aktin.

2.2.1. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Die zuvor in Formalin fixierten Lungenflügel wurden in Paraffinblöcke gegossen. Nach Aushärtung erfolgte mit dem Mikrotom Mikrom HE 400 (Mikrom GmbH, Walldorf) die Herstellung von 4 µm dicken Schnitten. Die Schnitte wurden im Wasserbad bei 45°C gestreckt, auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Die Schnitte konnten nun weiter für die immunhistologischen Nachweise verwendet werden.

2.2.2. Durchführung der Referenzfärbungen

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten immunhistologischen Nachweise sollten semiquantitativ mittels Remmele-Score ausgewertet werden, welches das Mitführen von Referenzfärbungen erfordert. Die hier untersuchten Stoffe befinden sich vor allem in der Media und dem Endothel von Gefäßen. Deshalb wurden zwei verschiedene Referenzfärbungen durchgeführt. Zum einen die RECA1 Färbung zur Beurteilung von im Endothel vorkommenden Stoffen, zum Anderen die Aktinfärbung zur Beurteilung von Stoffen die in der Media exprimiert werden.

2.2.2.1. RECA1

RECA1 (= rat endothelial cell antibody) ist ein spezifischer Marker für Rattenendothelien. Dieser Marker wurde in der Auswertung mittels Remmele-Score als Referenz verwendet, um die Intensität der am Endothel vorkommenden Proteine semiquantitativ beurteilen zu können. Die spezifisch detektierten Endothelzellen erscheinen nach dem Färbvorgang braun bis graubraun und das Restgewebe grün.

Die Schnitte wurden in Xylol deparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe gewässert. Die endogene Peroxidase, die zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führen kann, wurde in einem 10 %-igen PBS/H₂O₂-Bad für 20 Minuten blockiert, woraufhin eine zusätzliche fünfzehnminütige Blockierung des endogenen Biotins und Avidins mit dem Vector Blocking Kit (Linaris Wertheim, Deutschland) bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer stattfand.

Das Antigen Retrieval erfolgte für 30 Minuten bei 37°C auf enzymatischem Wege mittels 50 µl 0,1%-iger Protease XIV (Sigma- Aldrich-Chemie- GmbH, München, Deutschland). Die zu Beginn durchgeführte Gewebefixierung in Formalin verursacht Quervernetzungen und dreidimensionale Konformationsänderungen bei Proteinen und Antigenen. Diese Prozesse müssen rückgängig gemacht und die Quervernetzungen aufgebrochen werden. Es muss also ein so genanntes demaskieren erfolgen, um dem Antikörper das Detektieren des Antigens wieder zu ermöglichen.

Eine zusätzliche Blockierung mit 50 µl Superblock (ID Labs inc, Kanada) wurde angewandt, um durch Proteinladungen entstehende unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. Anschließend wurden je 50 µl des 1:10 verdünnten mouse-anti-RECA1-Primärantikörpers (Acris, Hiddenhausen, Deutschland) auf jeden Schnitt aufgetragen. Eine Negativkontrolle, die stattdessen 50 µl PBS erhielt, wurde mitgeführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden 50 µl des Sekundärantikörpers (Jackson Immuno Research, Baltimore Pike, USA), ein goat-anti-mouse-biotinkonjugierter Antikörper in einer 1:500 Verdünnung mit PBS, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf alle Präparate aufgetragen.

Vor der Visualisierung mit DAB erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit dem Vectastain-ABC-Kit (Avidin-Biotin-Complex, Linaris, Wertheim, Deutschland). Das DAB-Substrat wurde folgendermaßen angesetzt:

- Zwei Tabletten à 10 mg DAB wurden in 40 ml PBS gelöst und unmittelbar vor dem Aufpipettieren mit 1600 µl 10%-igem H₂O₂ versetzt.
- Die Inkubation mit DAB erfolgte für fünf Minuten.
- Auf die dreiminütige Gegenfärbung mit Methylgrün folgte wiederum die aufsteigende Alkoholreihe, eine Inkubation in Xylol sowie das Eindeckeln mit Depex® (Serva, Heidelberg, Deutschland).
- Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit PBS gewaschen.

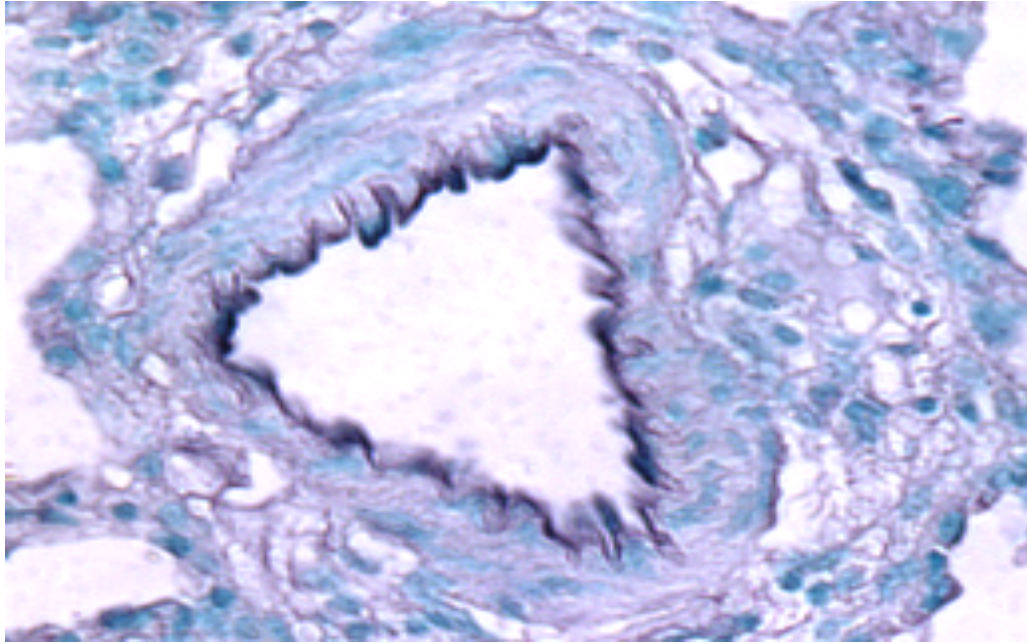


Abbildung 2: Beispiel eines RECA1-Nachweises als Referenz zur Beurteilung von Endothel im Rahmen der Remmele-Score-Quantifizierung

2.2.2.2. Aktin

Mit der Aktin-Immunhistologie können spezifisch glatte Muskelzellen dargestellt werden. Dieser Nachweis eignet sich als Referenzfärbung für die Auswertung mittels Remmele-Score, von in der Media vorkommenden Proteinen. Aktin-positive Areale erscheinen dabei braun bis graubraun.

Die Deparaffinierung, Hydrierung der Schnitte und die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte analog zum RECA1-Protokoll. Das Antigen-Retrieval erfolgte thermisch mittels Mikrowelle. Dazu wurden die Schnitte in einer Unmasking-Solution (Vector, Wertheim, Deutschland) bei 600 Watt aufgekocht. Die verwendete Lösung bestand aus 200 ml Aqua destillata versetzt mit 2 ml Unmasking-Solution.

Als Primärantikörper wurde ein mouse-antihuman smooth-muscle-Aktin-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland), der bekanntermaßen mit Rattengewebe kreuzreagiert, in einer 1:50 Verdünnung mit PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte 60 Minuten bei Raumtemperatur. Auch hier wurde eine mit PBS behandelte Negativkontrolle mitgeführt.

Der anti-mouse-Sekundärantikörper wurde in einer 1:100 Verdünnung (Jackson Immuno, Cambridgeshire, UK) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Feuchtkammer auf alle Präparate aufgetragen.

Das Avidin-Biotin-Verstärkersystem wurde analog zum RECA1-Protokoll verwendet.

Die Visualisierung erfolgte mittels fünfminütiger Inkubation mit DAB. Als Gegenfärbung wurde Methylgrün verwendet. Die Dehydrierung und das Eindeckeln erfolgte wie bereits unter 2.2.2.1. beschrieben.

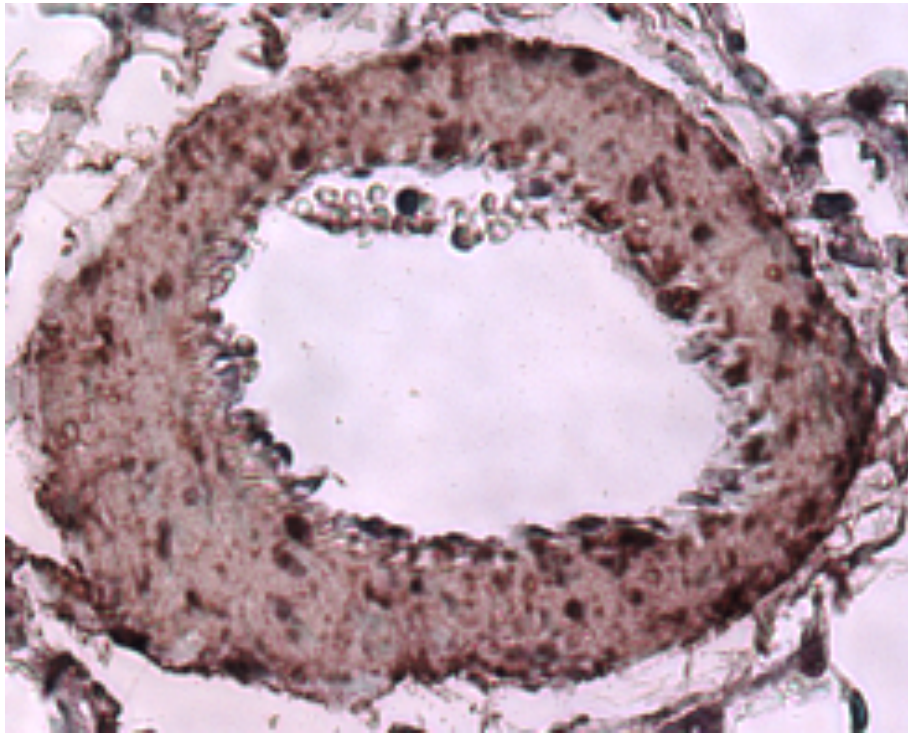


Abbildung 3: Beispiel eines Aktin-Nachweises als Referenz zur Beurteilung der Media im Rahmen der Remmele-Score-Quantifizierung

2.2.3. Durchführung des Immunhistologischen Nachweises der PGI-Synthase

PGI-Synthase positive Areale sind braun bis graubraun verfärbt. Die Deparaffinierung und Hydrierung der Schnitte erfolgten analog zum RECA1-Protokoll. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte in einem Bad aus 180 ml Methanol und 20 ml Wasserstoffperoxid für 20 Minuten. Ein Antigen-Retrieval war nicht nötig. Eine fünfzehnminütige Blockierung des endogenen Biotins und Avidins mit dem Vector Blocking Kit (Linaris Wertheim, Deutschland) bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer folgte. Eine zusätzliche Blockierung mit 50 µl Superblock (ID Labs inc, Kanada.) wurde angewandt, um durch Proteinladungen entstehende unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. Als Primärantikörper wurde ein mouse-anti-rat PGI-Synthase Antikörper (Cayman, Michigan, USA) in einer 1:100 Verdünnung mit PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Auch hier wurde eine mit PBS behandelte Negativkontrolle mitgeführt. Der anti-mouse Sekundärantikörper wurde in einer 1:200 Verdünnung (Jackson Immuno, Cambridgeshire, UK) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Feuchtkammer auf alle Präparate auftragen. Das weitere Procedere erfolgte wie bereits beschrieben nach dem RECA1-Protokoll.

2.2.4. Auswertung mittels Remmele-Score

Die Auswertung erfolgte nach einer modifizierten Methodik anhand des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele, W. zur semiquantitativen Analyse (31).

Pro Tier wurden jeweils PGI-Synthase, Aktin und RECA1-Nachweise angefertigt, wobei RECA1 als Referenzfärbung für die Endothelauswertung und Aktin als Referenzfärbung für die Mediaauswertung dienten.

Zur Analyse wurden zehn repräsentative Gefäße in einer Größenordnung von 30 - 100 µm und 100 - 200 µm Durchmesser und rundem Anschnitt durch zwei geblindete Untersucher ausgewählt.

Die Intensität der Färbung wurde anhand eines Punktescores bewertet, welcher sich an der Aktin- und RECA1-Referenzfärbung orientierte. Wurde das entsprechende Protein an der Media lokalisiert, wurde für die Abstufungen der Farbintensität die Aktin-Referenzfärbung herangezogen. Für Proteine die im Endothel lokalisiert waren, wurde in Bezug zur RECA1-Referenzfärbung die Intensität der Färbung beurteilt. Zudem wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen bewertet, indem das Gefäß in vier Quadranten unterteilt wurde. Je nach Anzahl der positiv gefärbten Areale erfolgte die Beurteilung mit 0 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 % Färbung. Ausschlaggebend hierbei war jeweils die stärkste Intensität. Der Remmele-Score wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{IRS} = \text{Färbeintensität} \times \text{Prozentsatz der positiv gefärbten Areale}$$

Der erhobene Remmele-Score pro Gefäß wurde gemittelt, so dass für jedes Gefäß ein repräsentativer Wert entstand.

Scoring	Farbintensität	Positive Färbung
0	keine Farbreaktion	Keine Reaktion
1	schwache Farbreaktion, gerade erkennbar	weniger als 10 % der Fläche
2	Mäßige bis intensive Färbung, aber schwächer als die Referenzfärbung	zwischen 10 und 50 % der Fläche
3	starke Farbreaktion entsprechend der Referenzfärbung	zwischen 51 und 80 % der Fläche
4	starke Farbreaktion entsprechend der Referenzfärbung	mehr als 80 % der Fläche

Tabelle 3: Remmele-Score Einteilung (31)

2.3. Untersuchung des vaskulären Remodeling

2.3.1. Paraffineinbettung und Schnitthanfertigung

Die zuvor in Formalin fixierten Lungenflügel wurden in Paraffinblöcke gegossen. Nach Aushärtung erfolgte mit dem Mikrotom Mikrom HE 400 (Mikrom GmbH, Walldorf, Deutschland) die Herstellung von 4 µm dicken Schnitten. Diese Schnitte wurden im Wasserbad bei 45°C gestreckt, auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

2.3.2. Elastica van Gieson-Färbung

Um das pulmonalvaskuläre Remodeling und die Zunahme der Mediafläche bestimmen zu können, musste die Fläche der Tunica media vermessen werden. Dazu wurden die Lungenschnitte mit dem Elastica van Gieson Färbe-Kit nach Herstellerprotokoll (Elastika van Gieson Färbekit, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt.

Die elastischen Fasern und Zellkerne färbten sich violett bis blau-schwarz, Bindegewebe erschien rot und Muskulatur braun-gelb. Diese Färbung ermöglichte eine Unterscheidung der Elastica interna von der Elastica externa, welche die Media umgeben und so zur morphometrischen Messung herangezogen werden konnten.

Zusammenfassend wurden die Schnitte deparaffiniert und am Ende mit Aqua destillata hydriert. Eine zehnmütige Färbung mit der Elastica-Färbelösung folgte. Die Differenzierung wurde durch zweimaliges Eintauchen in Eisenchloridlösung vollzogen. Eine dreiminütige Gegenfärbung mit Van Gieson, entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe und eine Fixierung mit Xylol wurde abschließend durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Depex eingedeckelt.

2.3.3. Morphometrische Auswertung

Mit dem Programm MetaVue wurden die Messungen an rund angeschnittenen Lungengefäßen mit einem Durchmesser von 30 bis 100 µm und gut erkennbarer Elastica interna und Elastica externa durch computergestützte Morphometrie am Durchlichtmikroskop (Leitz DM RBE Mikroskop, Bensheim, Deutschland) bei 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Schnitte wurden doppelt geblindet analysiert. Es wurden zehn Gefäße pro Tier ausgewertet. Der Durchmesser des Gefäßes wurde mittels eines median durch das Gefäß gelegten Messbalkens überprüft (Abb. 4a). Lag der Durchmesser im Range von 30-100 µm wurde mit der eigentlichen morphometrischen Messung fortgefahren. Es wurden jeweils die Gesamtfläche und die Lumenfläche jedes Gefäßes (Abb. 4b) in dreifacher Bestimmung

vermessen. Die Gesamtfläche wurde definiert als die Fläche innerhalb der Elastica externa ohne der Elastica externa.

Die Lumenfläche wurde festgelegt als die Fläche innerhalb der mit eingeschlossenen Elastica interna.

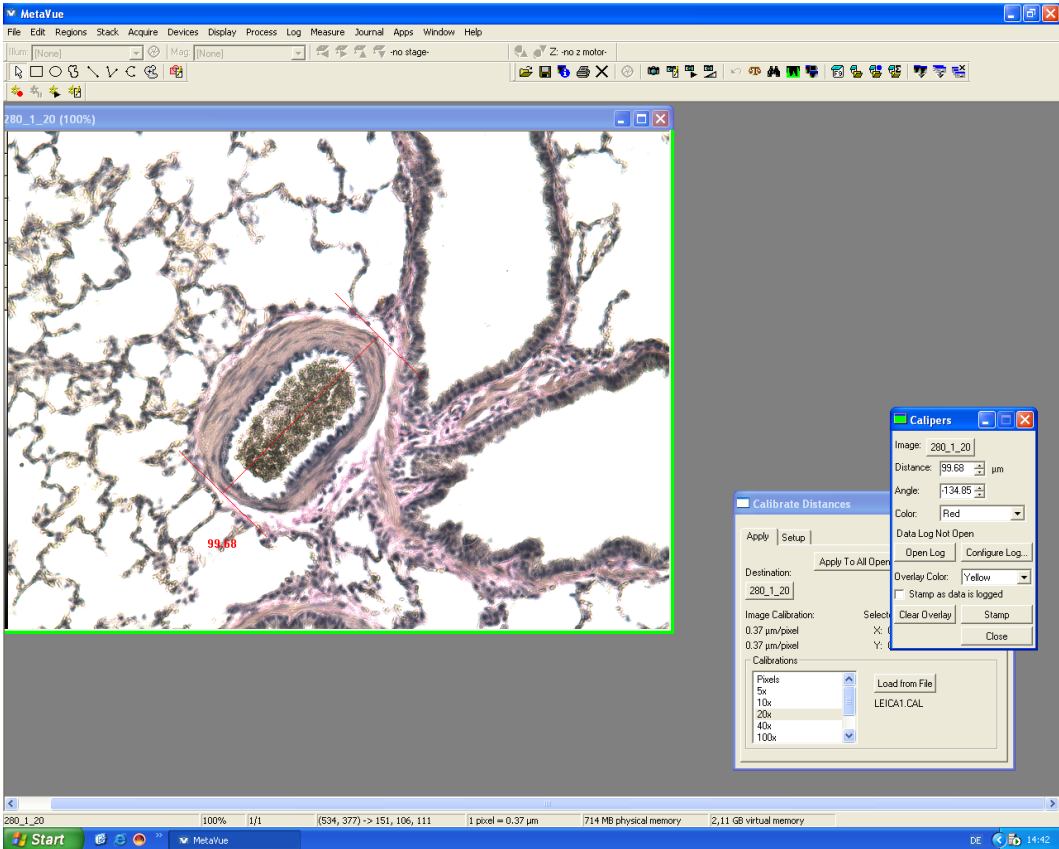


Abbildung 4a

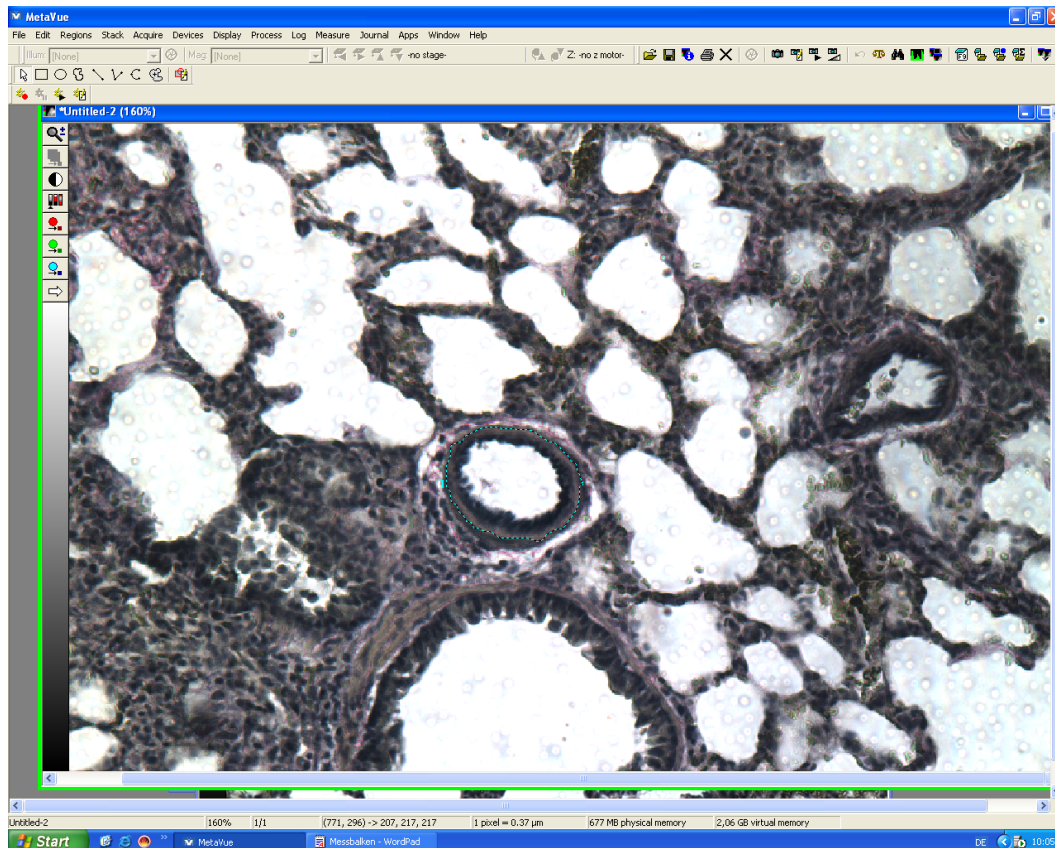


Abbildung 4b

Die Mediafläche wurde dann wie folgt berechnet:

$$\text{Mediafläche } [\mu\text{m}^2] = \text{Gesamtfläche} - \text{Lumenfläche}$$

Zusätzlich wurde das Verhältnis der Mediafläche zum Lumen beziehungsweise der Gesamtfläche betrachtet:

$$\text{Mediafläche} / \text{Lumenfläche} * 100$$

$$\text{Mediafläche} / \text{Gesamtfläche} * 100$$

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 12.0 G (SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Die Signifikanzschwelle wurde auf $p < 0,05$ gesetzt.

Standardabweichungen wurden ± 1 angegeben. Für die grafische Darstellung galt:

*	=	signifikant zur Kontrolle
#	=	signifikant zu MCT
§	=	signifikant zu AMB
\$	=	signifikant zu BOS

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamik

3.1.1 Systemische Blutdruckmessung

Der arterielle systolische Blutdruck wurde in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) gemessen.

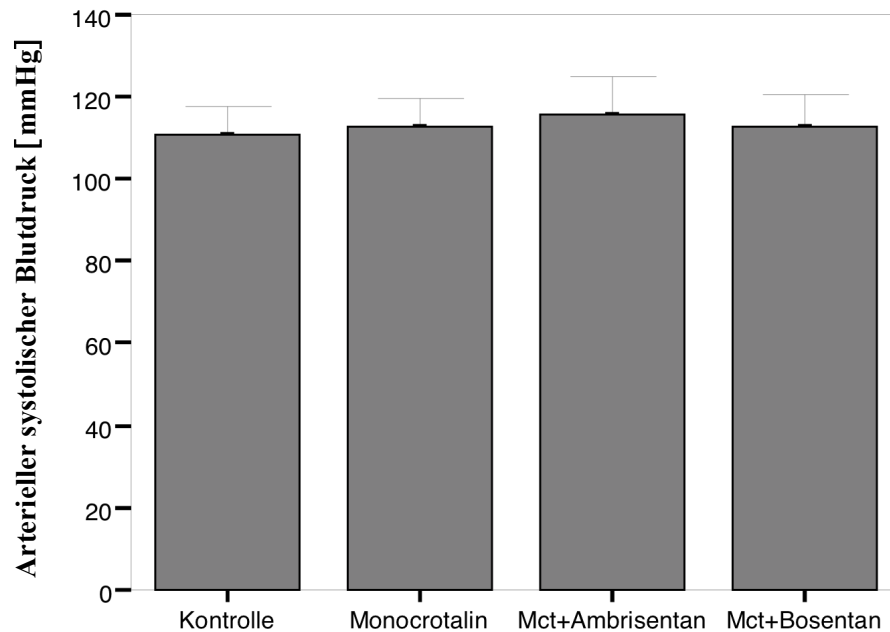


Abbildung 5: Arterieller systolischer Blutdruck in mmHg: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n = 13) 107 ± 7; Monocrotalin (MCT) (n = 10) 113 ± 7; MCT-Ambrisentan (n = 11) 116 ± 9; MCT- Bosentan (n = 11) 112 ± 8.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Blutdruckwerte befanden sich im Normbereich.

3.1.2. Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Die Veränderung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) wurde über die Rechtsherzkatheteruntersuchung erfasst und in mmHg gemessen.

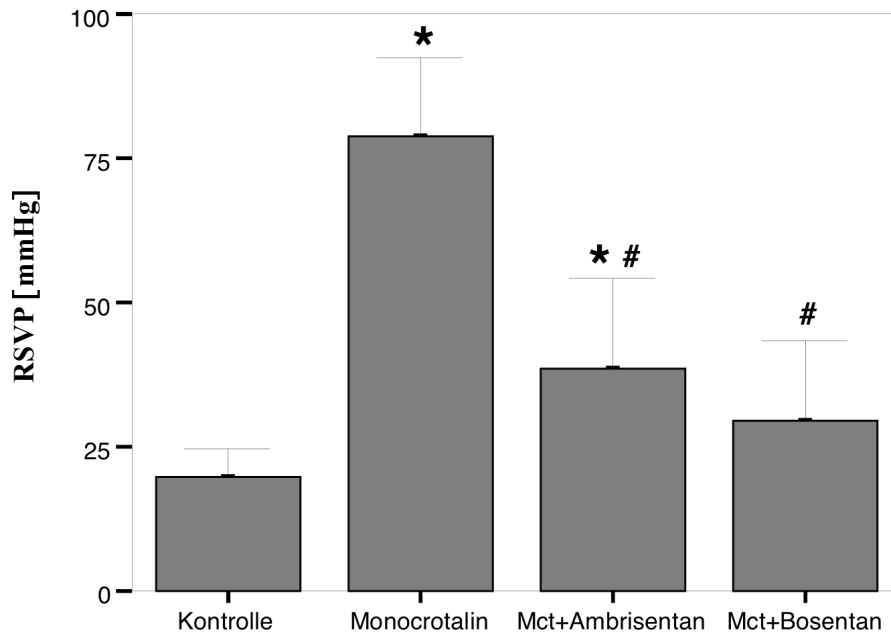


Abbildung 6: Rechtsventrikulärer systolischer Druck in mmHg: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n = 13) 20 ± 5; Monocrotalin (MCT) (n = 10) 75 ± 10; MCT-Ambrisentan (n = 11) 39 ± 16; MCT-Bosentan (n = 11) 28 ± 14.

Durch Gabe von MCT kam es zu einem signifikanten Anstieg des RVSP im Vergleich zur Kontrollgruppe (20 versus 75, $p < 0,05$).

Sowohl in der Ambrisentan als auch in der Bosentan Gruppe konnte eine signifikante Reaktion und Reduktion des RVSP im Vergleich zur MCT Gruppe festgestellt werden (39 und 28 versus 75, $p < 0,05$).

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte die Ambrisentan behandelte Gruppe einen signifikant höheren RVSP (39 versus 20, $p = 0,002$), während bei der Bosentan behandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (28 versus 20, $p = 0,076$). Zwischen den Behandlungsgruppen Ambrisentan und Bosentan konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (39 versus 28, $p = 0,230$).

3.2. Ventrikuläres Remodeling

Zur Analyse des rechtsventrikulären Remodelings wurde das Gewicht des rechten Ventrikels ins Verhältnis zur Summe aus linkem Ventrikel und Septum gesetzt.

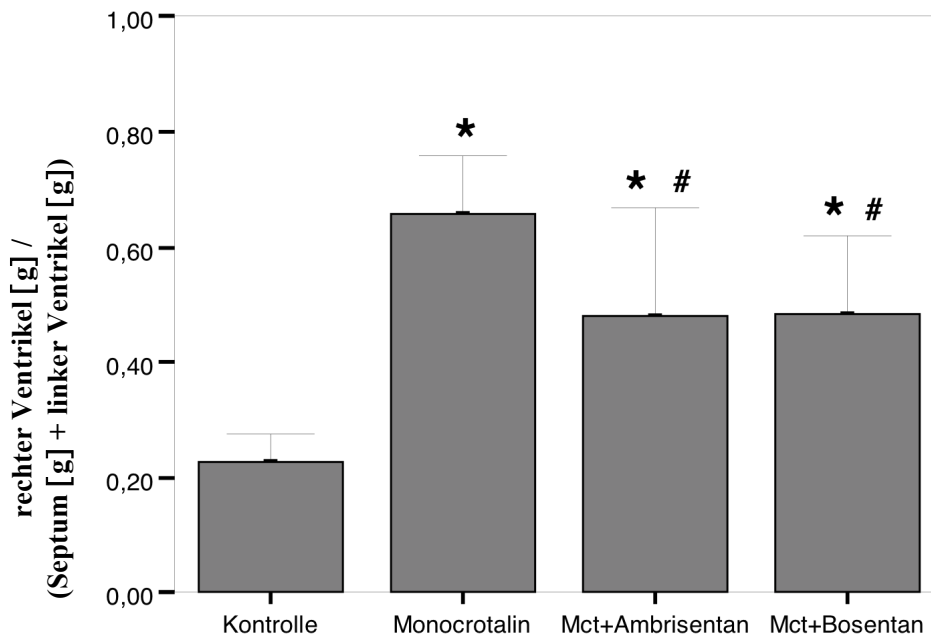


Abbildung 7: Rechtsherzquotient: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n=13) $0,23 \pm 0,05$; Monocrotalin (MCT) (n=10) $0,66 \pm 0,1$; MCT-Ambrisentan (n=11) $0,48 \pm 0,19$; MCT-Bosentan (n=11) $0,46 \pm 0,13$.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in allen behandelten Gruppen eine signifikante Zunahme des ventrikulären Remodelings nachgewiesen werden.

Kontrollgruppe zur MCT Gruppe (0,23 versus 0,66, $p = 0,000$), Kontrollgruppe zur Ambrisentan behandelten Gruppe (0,23 versus 0,48, $p = 0,000$) und die Kontrollgruppe zur Bosentan behandelten Gruppe (0,23 versus 0,46, $p = 0,000$).

In den Behandlungsgruppen mit Ambrisentan (0,48 versus 0,66, $p = 0,006$) und Bosentan (0,46 versus 0,66 $p = 0,003$) zeigten sich gegenüber der behandelten MCT Gruppe signifikante Unterschiede.

Keine Signifikanz gab es zwischen den Ambrisentan und Bosentan behandelten Tieren (0,48 versus 0,46, $p = 0,622$).

3.3. Immunhistologische Ergebnisse der Prostaglandin-I-Synthase

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden mit Hilfe des immunreaktiven Score (IRS) oder auch Remmele Score (RS) genannt, aufbereitet. Dieser beurteilt die Farbintensität multipliziert mit dem Prozentsatz der positiv angefärbten Areale.

3.3.1 Kleine Pulmonalgefäße

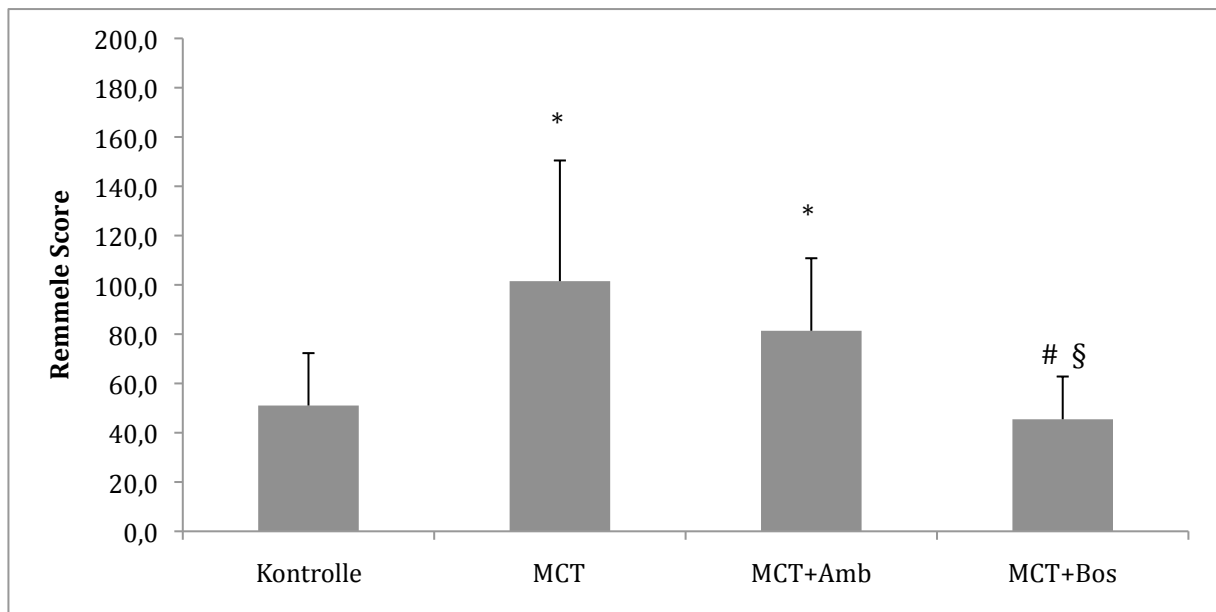


Abbildung 8: Remmele Score der Pulmonalarterien mit 30-100 μm Durchmesser: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n = 13) $51 \pm 21,3$; Monocrotalin (MCT) (n = 10) 102 ± 49 ; MCT- Ambrisentan (n = 11) $81 \pm 29,4$; MCT-Bosentan (n = 11) $45 \pm 17,4$.

Im Remmele Score (RS) zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe die erkrankte MCT Gruppe (51 versus 102; $p = 0,009$) und die behandelten Ambrisentan Tiere (51 versus 81; $p = 0,015$) jeweils mit signifikantem Unterschied.

Die Bosentan behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied zur MCT- (45 versus 102; $p = 0,004$) und Ambrisentan- Gruppe (45 versus 81, $p = 0,003$).

Weitere Signifikanzen zeigten sich nicht.

3.3.2 Große Pulmonalgefäße

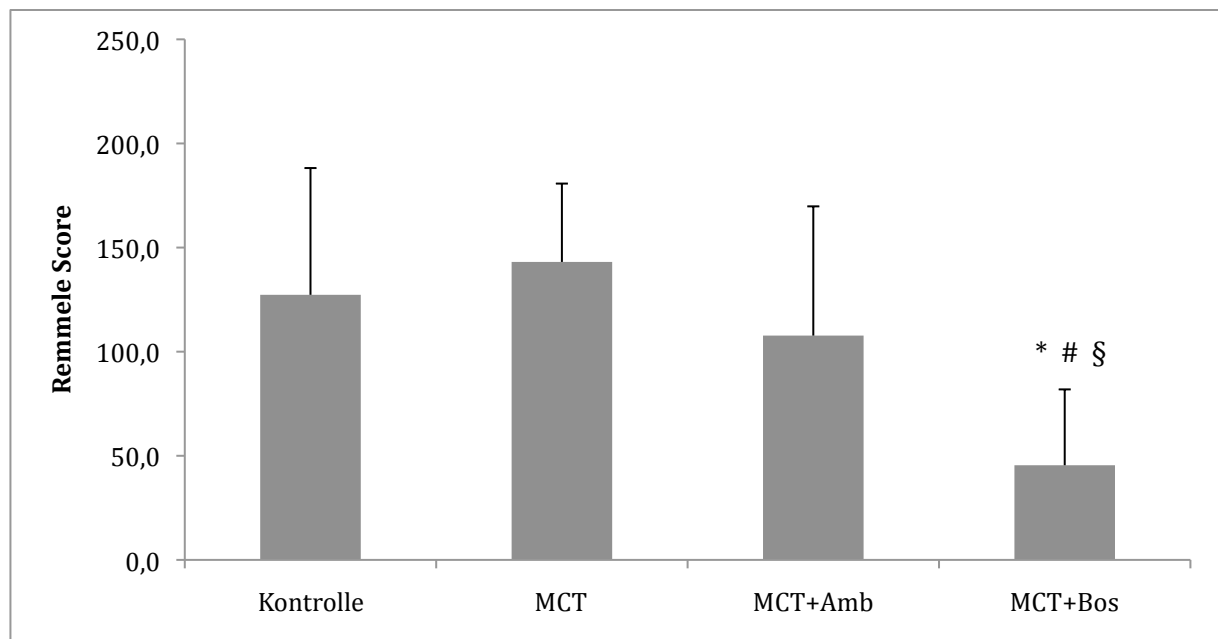


Abbildung 9: Remmele Score der Pulmonalarterien mit 100-200 μm Durchmesser: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n = 13) $127 \pm 60,88$; Monocrotalin (MCT) (n = 10) $143 \pm 37,63$; MCT- Ambrisentan (n = 11) $108 \pm 62,06$; MCT-Bosentan (n = 11) $45 \pm 36,43$.

In den großen Pulmonalgefäßen zeigte sich im Vergleich zur MCT Gruppe kein signifikanter Unterschied der Kontroll- und Ambrisentan behandelten Gruppen (143 versus 127, $p = 0,336$; 143 versus 108, $p = 0,149$).

Lediglich die mit Bosentan behandelte Gruppe wies eine hohe Signifikanz gegenüber der Kontroll- und der MCT- Gruppe auf (45 versus 127, $p = 0,001$; 45 versus 143, $p = 0,000$).

Eine geringe Signifikanz konnte zwischen der Bosentan und Ambrisentan Gruppe erhoben werden (45 versus 108; $p = 0,014$).

3.4. Pulmonalvaskuläres Remodeling

Zur Beurteilung des stattfindenden pulmonalen vaskulären Remodelings, wurde beobachtet wie sich bei gesunden, kranken und behandelten Tieren die Mediafläche der Gefäßwände verändert. Zusätzlich wurde die Mediafläche im Verhältnis zur Lumenfläche betrachtet.

3.4.1 Mediafläche

Die Mediafläche ergibt sich aus der gemessenen Gesamtfläche abzüglich der Lumenfläche gemessen in μm .

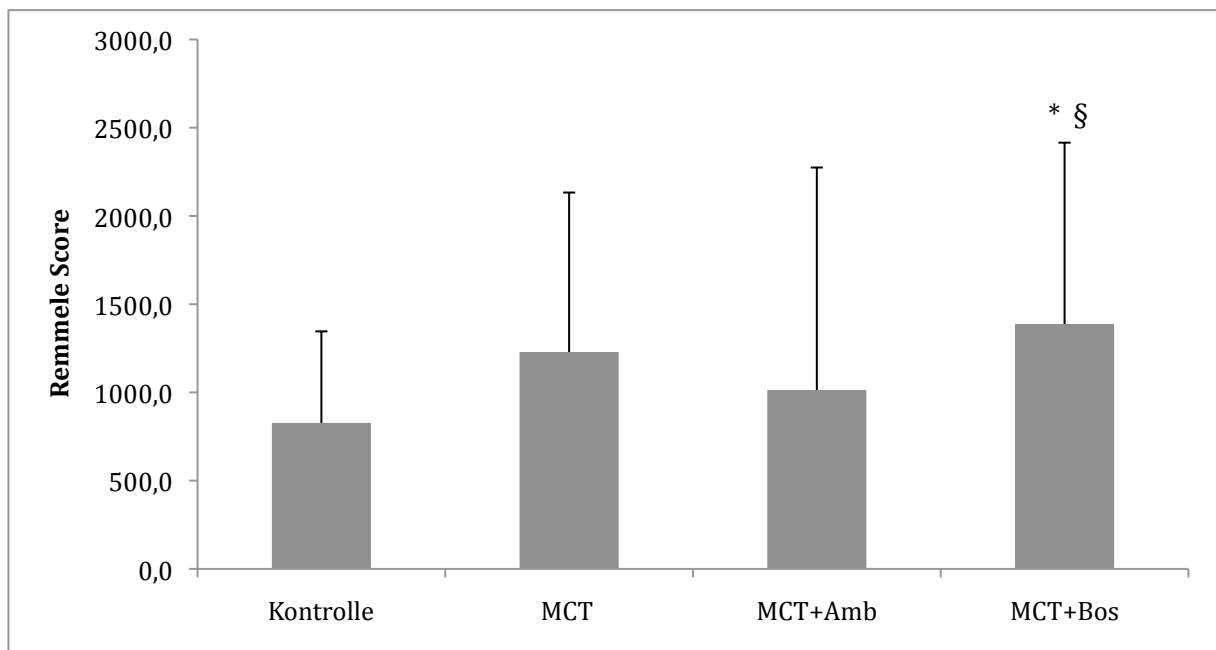


Abbildung 10: Mediafläche in μm : Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt.

Kontrolle (n = 25) 827 ± 518,78; Monocrotalin (MCT) (n = 25) 1229,12 ± 903,55; MCT-Ambrisentan (n = 25) 1013,68 ± 1260,82; MCT-Bosentan (n = 25) 1387,60 ± 1027,79.

Die Mediafläche zeigte einen signifikanten Unterschied der Bosentan behandelten Gruppe zur Kontrollgruppe (1386,60 versus 827,24; p = 0,028).

Auch gegenüber der mit Ambrisentan behandelten Gruppe zeigte sich die Bosentan Gruppe mit einem geringen signifikanten Unterschied (1013 versus 1387; p = 0,039).

In allen übrigen Gruppen konnten keine Signifikanzen erhoben werden.

3.4.2 Verhältnis der Mediafläche zur Lumenfläche

Das Verhältnis zwischen Mediafläche und Lumenfläche wird in Prozent angegeben.

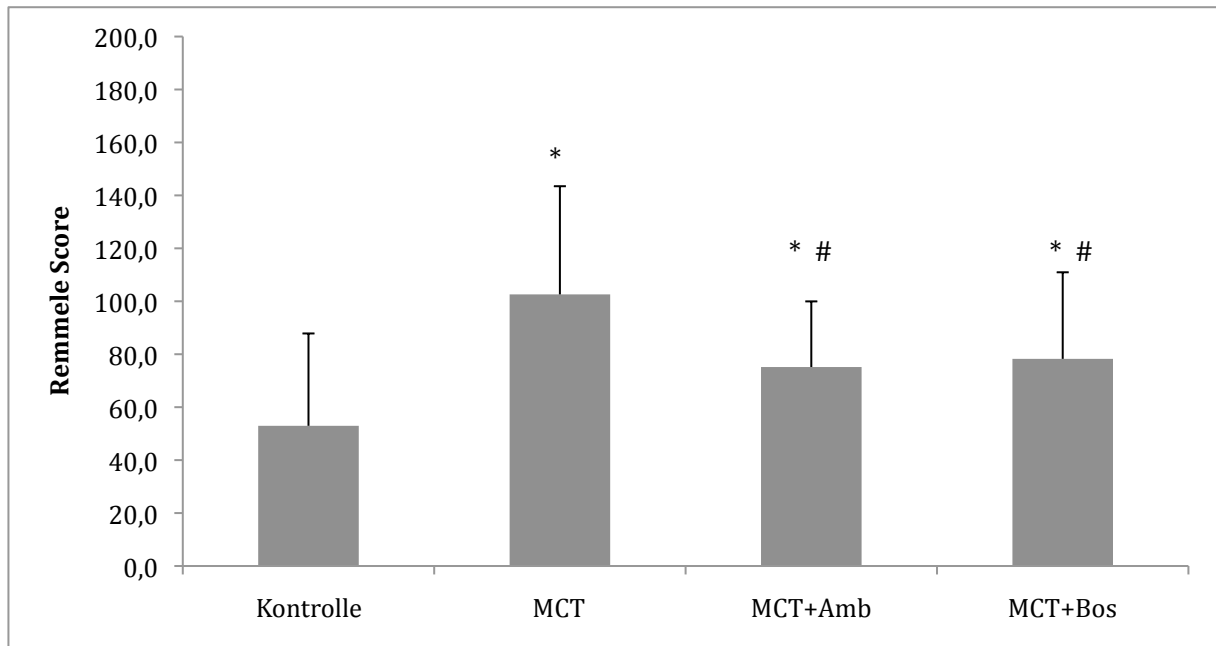


Abbildung 11: Ratio Mediafläche / Lumenfläche in %: Alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Kontrolle (n = 25) 52,96 ± 34,89; Monocrotalin (MCT) (n = 25) 102,60 ± 40,86; MCT-Ambrisentan (n = 25) 75,16 ± 24,80; MCT-Bosentan (n = 25) 78,25 ± 32,70.

Eine sehr hohe Signifikanz zeigte sich zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der MCT-erkrankten Gruppe (53 versus 103; $p = 0,000$).

Ebenfalls zeigte die Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied zu den beiden Behandlungsgruppen Bosentan (53 versus 78; $p = 0,003$) und Ambrisentan (53 versus 75; $p = 0,001$).

Im Vergleich der MCT Gruppe zu den mit Ambrisentan (103 versus 75; $p = 0,011$) und Bosentan behandelten Gruppen (103 versus 78; $p = 0,026$) konnte eine deutliche Signifikanz gezeigt werden.

Zwischen den beiden Behandlungsgruppen Ambrisentan und Bosentan (75 versus 78; $p = 0,823$) fand sich kein signifikanter Unterschied.

4. Diskussion

Sowohl selektive als auch unselektive Endothelin-Rezeptorantagonisten sind in der Behandlung der PAH etabliert und bewirken eine Verbesserung der klinischen Symptomatik, der Belastbarkeit, der Hämodynamik und des Patienten-Outcomes (29, 32).

Inwieweit die Therapie mit einem unselektiven Endothelin-Rezeptorantagonisten gegenüber einer Therapie mit einem selektiven ET-A-Rezeptorantagonisten, bei dem die ET-B-Rezeptoraktivität erhalten bleibt, unterschiedliche Auswirkungen auf die Behandlung der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie hat, ist nicht geklärt (29).

Die vorliegende Studie konnte erstmals einen signifikanten Anstieg der pulmonalen PGIS-Expression bei Ratten im Modell einer MCT-induzierten PAH zeigen. Dabei ist der Anstieg der PGIS-Expression anhand der immunhistochemischen Analysen primär im Endothel der sehr kleinen Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 30-100 µm lokalisiert.

Im Vergleich zum unspezifischen dualen ET-Rezeptorantagonisten Bosentan, kommt es unter der Behandlung mit dem selektiven ET-A-Rezeptorantagonisten Ambrisentan, nicht zu einer Abschwächung der erhöhten PGIS-Expression. Trotz der unterschiedlichen Auswirkungen auf die PGIS Expression bei MCT behandelten Tieren, zeigten sich sowohl unter Bosentan als auch unter Ambrisentan-Therapie keine Unterschiede auf den RVSP, die rechtsventrikuläre Hypertrophie und das pulmonalvaskuläre Remodeling.

Die signifikant erhöhte PGIS-Expression in den Rattenlungen bei MCT-induzierten PAH im Vergleich zu den Kontrolltieren, kann als ein potenziell kompensatorischer Mechanismus der PAH interpretiert werden. Die kleinen Pulmonalgefäße sind die Abschnitte des pulmonalvaskulären Systems, die am stärksten zur Kontrolle der Resistance beitragen und auch hauptsächlich bei der PAH betroffen sind (34). In der vorliegenden Studie konnte wie in einer weiteren Studie (33) eine Abhängigkeit der Expression von der Größe der Pulmonalarterien gezeigt werden. Hierbei fand sich übereinstimmend mit Rubin et al. (33) eine Hochregulierung der PGIS-Expression in den kleinen Pulmonalarterien (30-100µm). Die erhöhte PGIS-Expression in den kleinen Pulmonalarterien kann dem zu Folge ein kompensatorischer Mechanismus darstellen, welches zu einer Abschwächung der Entwicklung einer PAH führt (35).

Die in unserer Studie bei MCT-induzierter PAH gefundene signifikant erhöhte PGIS-Expression in den Lungengefäßen, konnte auch im Modell der Hypoxie-induzierten PAH nachgewiesen werden (36). Die Bedeutung der Prostaglandine werden des Weiteren durch die Entwicklung einer schweren PAH bei Mäusen, denen der Prostaglandinrezeptor fehlt, unterstützt (37). Ferner sind Prostaglandine ein wichtiges Standbein in der Therapie der PAH (38,39).

Betrachtet man die in der vorliegenden Studie und die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, dass eine erhöhte PGIS-Expression einem natürlichen Kompensationsmechanismus bei der Erkrankung der PAH entspricht, wird unsere Hypothese durch die gleichsinnigen Resultate unterstützt. Demzufolge könnte bei der medikamentösen Therapie mit Ambrisentan im Gegensatz zu Bosentan der Kompensationsmechanismus der erhöhten PGIS-Expression beibehalten werden.

Die damit verbundene protektive Rolle des ET-B-Rezeptors konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Hierbei führt der hauptsächlich auf den Gefäßendothelzellen lokalisierte ET-B Rezeptor zu einer NO- und Prostaglandin-vermittelten Vasodilatation, einer antiproliferativen Wirkung (22,23,24) und einer Elimination des ET-1 aus dem Körperkreislauf (25,27). Im Unterschied dazu trägt der ET-A Rezeptor, welcher hauptsächlich in den pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert ist, ursächlich zur Entwicklung der PAH bei, da er eine vasokonstriktive Reaktion vermittelt (25,26).

Somit könnten unsere Ergebnisse durch die Aktivierung des frei gebliebenen ET-B Rezeptors erklärt werden, der wie bereits beschrieben die Prostaglandinproduktion steigert, während der ET-A Rezeptor selektiv mit Ambrisentan blockiert wird (47).

Auch konnte im transgenen Rattenmodell bei fehlender ET-B-Rezeptor Expression, die protektive Rolle des Rezeptors bezüglich der Entwicklung einer PAH dargestellt werden. Bei den unbehandelten ET-B-Rezeptor depletierten transgenen Ratten fanden sich erhöhte pulmonalarterielle Drücke, eine verkürzte Reaktion auf Vasopressoren sowie eine erhöhte Empfindlichkeit bezüglich der Vasokonstriktion bei Hypoxie im pulmonalen Gefäßbett (40, 41).

In einer anderen Arbeit konnte bei erkrankten Wildtypen, durch Hypoxie- sowie auch durch MCT- induzierte PAH, ein signifikant erhöhter RSVP festgestellt werden (41,42). Darüber hinaus lässt sich bei Patienten mit einer chronischen thrombembolisch-induzierten PAH eine erhöhte Expression des ET-B-Rezeptors feststellen (43). Ferner kommt es bei Schafföten durch die Behandlung mit einem ET-B-Rezeptorantagonisten zur Entwicklung einer PAH (44).

Es ist jedoch auch bekannt, dass eine ET-B Rezeptorexpression auf glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion verursachen kann. Diese vasokonstriktive entgegengesetzte Wirkung zu den durch eine erhöhte PGIS-Expression hervorgerufenen vasodilatativen Effekt, könnte eine Rolle in der Behandlung und der Verbesserung der PAH durch selektive ET-A Rezeptorantagonisten darstellen (53).

Die positiven Effekte auf die PAH bei einer ET-B-Rezeptorblockade, durch Hemmung einer Vasokonstriktion in glatten Gefäßmuskelzellen und die verminderte Freisetzung von

Thromboxan aus endothelialen Zellen, konnte schon gezeigt werden (24). Eine weitere Studie beobachtete einen Rückgang der Fünf -Wochen-Mortalitätsrate im MCT-Modell durch die Therapie mit einem unselektiven ET-Rezeptorantagonisten, wobei die Behandlung mit einem selektiven ET-A-Rezeptorantagonisten nur zu einem positiven Trend einer verminderten Mortalität führte (45).

Auch in unserer Studie zeigte sich das Fehlen einer deutlicheren Verbesserung der PAH bei der Behandlung mit Ambrisentan verglichen mit Bosentan. Obwohl die PGIS-Expression in der behandelten Ambrisentangruppe im Gegensatz zur Bosentangruppe erhöht war, führen letztendlich beide Medikamente gleichermaßen zu einer signifikanten Verbesserung der pulmonalen Hämodynamik, zur Reduktion des pulmonalvaskulären Remodelings und der rechtsventrikulären Hypertrophie.

Zu gleichen Ergebnissen kamen Nishida et al., welche bei der Untersuchung von unselektiven Rezeptorantagonisten verglichen mit selektiven ET-A-Rezeptorantagonisten, gleiche Verbesserungen in der Hämodynamik und des pulmonalvaskulären Remodellings fanden (48). Erklärt werden könnten diese Beobachtungen durch positive Effekte einer dualen ET-Rezeptorblockade, welche das Benefit einer erhaltenen PGIS-Expression überwiegen könnte. So wird durch eine unselektive ET-Rezeptorblockade eine Hemmung der pulmonalen Vasokonstriktion in der hypoxiegetriggerten PAH beobachtet (46). Die damit verbundene Rechtsherzhypertrophie wird abgeschwächt und das Remodelling der kleinen pulmonalen Arterien verhindert (46).

Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Studie von Schiffrin et al. bei dualer ET-Rezeptorblockade mit Bosentan, verglichen zu Ambrisentan als selektiver ET-A-Rezeptorantagonist, eine leichte Verbesserung der PAH (53). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die positiven Auswirkungen der dualen Blockierung der Rezeptoren doch wichtiger ist als die positiven Effekte der erhaltenen PGIS-Expression. Wie bereits beschrieben ist bekannt, daß ET-B-Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion vermitteln.

Diese Auswirkung könnte auch eine gegenregulatorische Maßnahme gegenüber dem vasodilatativen Effekt sein, welcher unter der Therapie mit Ambrisentan auftritt. Die Vasodilatation entsteht dabei durch die erhöhte PGIS-Expression die unter der selektiven ET-A-Rezeptorblockade zustande kommt (53).

Unsere Ergebnisse zeigen bei der Behandlung der MCT-Gruppe mit dem unselektiven Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan, eine Herabsetzung der hochregulierten PGIS-Expression in den kleinen und sehr kleinen Pulmonalgefäßen. Wohingegen unter der

Behandlung mit dem selektiven ET-A-Rezeptorantagonisten Ambrisentan die hochregulierte PGIS-Expression erhalten bleibt. Dies könnte dem zu Folge durch den freien ET-B-Rezeptor erklärt werden.

Bei einer selektiven ET-A-Rezeptorblockade durch Ambrisentan wird durch die Aktivierung des ET-B-Rezeptors die Prostaglandinproduktion erhöht (47). Die fehlende signifikante Besserung der PAH trotz erhaltender PGIS-Expression in den kleinen Pulmonalgefäßen unter der Behandlung mit Ambrisentan im Vergleich zu Bosentan, könnte durch die nur moderat erhöhte PGIS-Expression unter der selektiven ET-A-Rezeptorblockade erklärt werden.

Möglicherweise könnte dies aber auch zusätzlich mit einer verminderten Expression des ET-B-Rezeptors in Verbindung stehen, da es Hinweise auf ein verändertes Verteilungsmuster der ET-Rezeptoren unter pathologischen Bedingungen im pulmonalen Gefäßbett gibt (49,50).

So konnte in einer anderen Studie, speziell in den Pulmonalarterien unter Hypoxie im Vergleich zu anderen systemischen Organen, ein Anstieg der ET-1-mRNA und der ET-B-mRNA beobachtet werden. Von diesem Anstieg waren die thorakale Aorta, der linke und rechte Vorhof und der rechte Ventrikel des Herzens ausgenommen. Hier fanden sich sowohl erhöhte ET-A- als auch erhöhte ET-B-mRNA-Spiegel (51).

Ein weiterer Faktor könnte die höhere ET-A zu ET-B Rezeptorselektivität sein, die für Ambrisentan im Vergleich zu Bosentan 77 zu 1 beträgt und somit zu einer stärkeren PGIS-Erhöhung führt (22,52).

Des Weiteren muss bei unseren Ergebnissen berücksichtigt werden, dass die Auswirkungen einer variablen Behandlungsdauer oder sich eventuell entwickelnde sich selbst potenzierende Langzeiteffekte nicht ausreichend untersucht werden konnten.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie an der durch MCT-induzierten PAH erkrankten Ratte zeigten einen protektiven Effekt der leicht erhöhten PGIS-Expression im Endothel der kleinen Gefäße von 30 - 100 µm Durchmesser auf.

In der medikamentösen Therapie zeigte sich unter Bosentan, verglichen zu den MCT behandelten Tieren, eine signifikant unterdrückte PGIS-Expression, wohingegen unter Ambrisentan sogar eine signifikant erhöhte PGIS-Expression vorzufinden war.

Zwischen der medikamentösen Behandlung mit Bosentan oder Ambrisentan, konnte jedoch trotz erhaltener PGIS-Expression unter Ambrisentan-Therapie, kein signifikanter Vorteil in der einen oder anderen Gruppe ermittelt werden.

Um in der Therapie von selektiven und unselektiven Rezeptorantagonisten eventuell sich summierende Langzeiteffekte und verschiedene Dosierungsschemata zu untersuchen, sind noch weiterführende Studien notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. S.Rosenkranz, S.Baldus, E.Grünig, H.Klose, C.Opitz, M.M.Hoeper, Kommentar zu den ESC/ERS-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Der Kardiologe* 2016, 10:211-221, DOI 10.1007/s12181-016-0068-2
2. D'Alonzo G, Barst R, Ayres S, Bergofsky E, Brundage B, Detre K. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991;115:343–9
3. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992;327:70–5
4. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1655–65
5. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K., et al. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isoforms predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 86, 2863–2867
6. Saida, K., Mitsui, Y., & Ishida, N. (1989). A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 264, 14613–14616
7. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., et al. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415
8. Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y., & Tanzawa, K. (1993). Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* 268, 21394–21398
9. Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., et al. (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78, 473–485
10. Emoto, N., & Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270, 15262–15268
11. Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., et al. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18, 165–170

12. Masaki, T., Kimura, S., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1991). Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation* 84, 1457–1468
13. Levin, E.R.(1995).Endothelins. *NEnglJMed* 333,356 – 363
14. Love, M. P. & McMurray, J. J. (1996). Endothelin in chronic heart failure: current position and future prospects. *Cardiovasc Res* 31, 665–674
15. Jougasaki, M., Larsen, A., Cataliotti, A., Christiansen, D., & Burnett, J. (2002). Cardiotrophin-1 stimulates endothelin-1 via gp130 in vascular endothelial cells. *Peptides* 23, 1441–1447
16. Boulanger, C., & Luscher, T. F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85, 587–590
17. Hu, R. M., Levin, E. R., Pedram, A., & Frank, H. J. (1992). Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J Biol Chem* 267, 17384 – 17389
18. Yokokawa, K., Tahara, H., Kohno, M., Mandal, A. K., Yanagisawa, M., & Takeda, T. (1993). Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 92, 2080–2085
19. Prins, B. A., Hu, R. M., Nazario, B., Pedram, A., Frank, H. J., Weber, M. A., et al. (1994). Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 269, 11938 – 11944
20. Sirvio, M. L., Metsarinne, K., Saijonmaa, O., & Fyhrquist, F. (1990). Tissue distribution and half-life of 125I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun* 167,1191 – 1195
21. Vierhapper, H., Wagner, O., Nowotny, P., & Waldhausl, W. (1990). Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 81, 1415–1418
22. Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 2006; 110:386–414
23. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno., Imai T, Ohta K. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;4:1367–73
24. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *JIntern Med* 2005;258:199–215
25. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 1994;89:1203–8

26. Zamora M, Dempsey EC, Stelzner TJ. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993;429–33
27. Dupuis, J., Goresky, C. A., & Fournier, A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81, 1510–1515
28. Galie N et al. *Cardiovasc Res* 2004;61:227-237
29. Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:529–35
30. Rhoden CH, Leeper DB, Smith IM, Evans TC, Duling BR. Blood pressure changes in mice after lethal staphylococcal infection and endotoxin challenge. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975 Jul;149(3):622-5 Rhoden et al. 1975
31. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 1987 May;8(3):138-40
32. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002;346:896–903
33. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1925–32
34. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1425–36
35. Okahara K, Sun B, Kambayashi J. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1922–6
36. Blumberg FC, Lorenz C, Wolf K, Sandner P, Riegger GAJ, Pfeifer M. Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2002;55:171–7
37. Hoshikawa Y, Voelkel NT, Gesell TL, Mark MD, Morris KG, Alger LA. Prostacyclin receptor dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:314–18
38. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002;106:1477–82
39. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002;347:322–9 Campian ME,

- Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL, How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006 Sep;373(6):391-400 Campian et al. 2006
40. Ivy D, McMurtry IF, Yanagisawa M, Gariepy CE, Le Cras TD, Gebb SA, Morris KG, Wiseman RC, Abman SH, Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 May;280(5):L1040-8
41. Ivy D, Yanagisawa M, Gariepy CE, Gebb SA, Colvin KL, McMurtry IF. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L703–12
42. Ivy D, McMurtry IF, Colvin K, Imamura M, Oka M, Lee DS. Development of occlusive neointimal lesions in distal pulmonary arteries of endothelin B receptor-deficient rats: a new model of severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111:2988–96
43. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002;105:1034–6
44. Ivy D, Parker TA, Abman SH. Prolonged endothelin B receptor blockade causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L758–65
45. Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;103:314–18
46. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*. 1995 Dec;79(6):2122-31
47. D’Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore JC. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 2002;95:221–38
48. Nishida M, Okada Y, Akiyoshi K, Eshiro K, Takaoka M, Gariepy CE. Role of endothelin ETB receptor in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;496:159–65
49. Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:620–30

50. Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Ienaga H, Fukuchi Y. Discrepant distribution of big endothelin (ET)-1 and ET receptors in the pulmonary artery. *Eur Respir J* 2001;18:5–14
51. Li H, Elton TS, Chen YF, Oparil S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *Am J Physiol*. 1994 May;266(5 Pt 1):L553-60
52. Croxtall JD, Keam SJ. Ambrisentan. *Drugs*. 2008;68(15):2195-204
53. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32 Suppl 3:S2–13

7. Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
ALK-1	activin receptor-like Kinase 1 gene
AMB	Ambrisentan

B

BMPR-2	bone morphogenic protein receptor-2
BNP	brain natriuretic peptide
BOS	Bosentan

C

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie

D

DAB	3,3-Diaminobenzidin
-----	---------------------

E

eNOS	endotheliale Nitritoxidsynthase
ERS	European Respiratory Society
ESC	European Society of Cardiology
ET	Endothelin
ET-A	Endothelin A
ET-B	Endothelin B
ET _A R	ET A Rezeptor
ET _B R	ET B Rezeptor

G

g	Gramm
---	-------

H

h	Stunde
HCL	Salzsäure
HIV	
H ₂ O ₂	
HRP	Meerretich-Peroxidase
HZV	Herzzeitvolumen

I

IC-50	mittlere inhibitorische Konzentration
IRS	immunreaktiver Score = Remmele Score

K	
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KON	Kontrolle
M	
m	Meter
M	Molar
MCT	Monocrotalin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalerarterieller Druck
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	
n	Anzahl
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid
NO	nitric oxid = Stickstoffmonoxid
P	
p	Signifikanz
PBS	phosphate buffered saline
PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PCWP	Pulmonary Capillary Wedge Pressure
PGI	Prostaglandin I-Synthase
pH	pH-Wert
PAH	Pulmonale Arterielle Hypertonie
PVOD	pulmonale venookklusive Erkrankung
R	
RECA	rat endothelial cell antibody
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
S	
SPSS	Name des Statistikprogramm
T	
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
Tab.	Tabelle
U	
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µm ²	Quadratmikrometer

V	
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VO ₂	Sauerstoffaufnahme
W	
WHO	World Health Organisation
Z	
ZVK	Zentraler Venenkatheter

8. Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 20.01.2017

Antje Karle

9. Danksagung

Mein Dank gilt meinen Doktorvätern Prof. Dr. M. Pfeifer und dem Initiator dieser Arbeit PD. Dr. F. Blumberg für die Überlassung dieser Arbeit und die Möglichkeit wissenschaftlich tätig zu sein.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Betreuer PD Dr. S. Schroll und unserer MTA D. Sebah für die Betreuung in wissenschaftlichen und in praktischen Dingen, ohne diese eine Umsetzung und Vollendung nicht möglich gewesen wäre.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden gilt ein besonderer Dank, die mir stets mit aufmunternden Worten und auch mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an meine Großeltern Berta und Ernst Blaznik, die mir zusammen mit meinen Eltern zum Medizinstudium verholfen und mich unermüdlich unterstützt haben.

Danke.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antje Bettina Karle
Geboren: 15.02.1977 in Schopfheim

Schulische Ausbildung

1984 - 1988 Grund- und Hauptschule Hausen im Wiesental
1988 - 1994 Montfort Realschule Zell im Wiesental
1994 - 1997 Berufliches Gymnasium ernährungswissenschaftlicher Richtung in Lörrach

Akademische Ausbildung

1999 - 2001 Medizinstudium Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
2001 - 2002 Fortsetzung an der Universität Tübingen
2002 - 2005 Fortsetzung an der Universität Regensburg
2003 - 2004 Famulaturen in Anästhesie, Pulmologie und Pädiatrie
2005 - 2006 Praktisches Jahr:
- Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie im Inselspital Bern, Schweiz
- Chirurgie und Anästhesiologie Universitätsklinikum Regensburg
2006 Approbation als Ärztin
Seit 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Regensburg (UKR)
Seit 2013 Fachärztin für Anästhesiologie

Berufliche Tätigkeiten und Qualifikationen

1997 - 1998 Freiwilliges Soziales Jahr im Deutsches Herzzentrum München, herzchirurgische IMC
1998 - 1999 Krankenpflegeausbildung des Bayerischen Roten Kreuz, Rotkreuz-Krankenhaus München
1999 - 2004 Pflegehelferin auf der herz- und gefäßchirurgischen Intensivstation Deutsches Herzzentrum München
2008 Fachkundenachweis Rettungsdienst
Seit 2009 Notärztin, Standort St. Josef und Regensburg Süd
2009 + 2010 Zusatzbezeichnung Höhenmedizin (Diploma in Mountain Medicine)

Seit 2011	Verlegungsnotärztin UKR
2013	Weiterbildung „Intensivtransport“ nach Empfehlungen der DIVI
05/2014 + 11/2014	Anästhesie Fokussierte Sonographie (AFS) Module 1-3 + 4-5 der DGAI
Seit 2014	Notärztin am RTH Christoph Regensburg (DRF)
2015	Weiterbildung Pre-Hospital Trauma Life Support (PHTLS)
2016	Humanitärer Einsatz „Aktion Lächeln“ mit „Ärzte der Welt“, Kambotscha
2017	Humanitärer Einsatz mit „Ärzte der Welt“, Kambotscha. Pilotprojekt mit Schwerpunkt Tumorchirurgie und Lappendeckung im Bereich Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie