

AUS DER ABTEILUNG FÜR THORAXCHIRURGIE  
PROF. HANS-STEFAN HOFMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung vasomodulierender Rezeptoren an humanen Pulmonalgefäßen  
mittels konventioneller histologischer und immunchemischer Methoden**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stefan Ferdinand Hertling

2018



AUS DER ABTEILUNG FÜR THORAXCHIRURGIE  
PROF. HANS-STEFAN HOFMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung vasomodulierender Rezeptoren an humanen Pulmonalgefäßen  
mittels konventioneller histologischer und immunchemischer Methoden**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stefan Ferdinand Hertling

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann
2. Berichterstatter:	PD Dr. Petra Rümmele
Tag der mündlichen Prüfung:	11.05.2018





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen.....</b>	<b>2</b>
2.1 Anatomische und physiologische Grundlagen.....	2
2.2 Lungenkreislauf.....	3
2.3 Gefäßaufbau.....	4
2.3.1 Arterien.....	5
2.3.2 Venen.....	8
2.4 Atherosklerose.....	9
2.5 Pulmonale Hypertonie.....	11
2.5.1 Pathogenese.....	11
2.5.2 Therapiemöglichkeiten.....	13
2.6 Vasoaktive Peptide.....	14
2.6.1 Endothel.....	14
2.6.2 Endotheline.....	15
2.6.3 Endothelinrezeptoren.....	17
2.6.4 Endothelinrezeptorantagonist Bosentan.....	18
2.6.5 PDE-5-A-Enzym und PDE-5-A-Hemmer Sildenafil.....	18
2.7 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe.....	19
2.8 Studiendesign und –ziel.....	20
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	21
3.2 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials.....	24
3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	24
3.2.2 Elastika van Gieson-Färbung.....	24
3.2.3 Resorcin-Fuchsin- und Sirius-Färbung.....	25
3.2.4 Immunchemische Färbungen.....	25
3.3 PubMed-Recherche.....	28
3.4 Auswertung.....	29
3.4.1 Deskriptive Anatomie und Pathologie.....	29
3.4.2 Konventionelle Histologie.....	30
3.4.3 Immunhistochemie.....	30

3.4.3.1	Bestimmung der Rezeptorenverteilung und –dichte.....	30
3.4.3.2	Bestimmung der Rezeptorenpositivität.....	31
3.4.3.3	L-A-D-Score.....	31
3.5	Materialien.....	33
3.5.1	Chemikalien und Reagenzien.....	33
3.5.2	Verbrauchsmaterial und Kits.....	33
3.5.3	Geräte und Software.....	34
3.5.4	Verwendete Antikörper.....	35
3.5.4.1	Primärantikörper.....	35
3.5.4.2	Sekundärantikörper.....	35
3.5.5	hergestellte Lösungen.....	35
3.5.6	Statistische Auswertung .....	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1	Konventionelle Histologie.....	37
4.1.1	Pulmonalarterien.....	38
4.1.2	Pulmonalvenen.....	43
4.1.3	Gefäßpathologien.....	48
4.1.3.1	Pulmonalarterien .....	48
4.1.3.2	Pulmonalvenen.....	55
4.2	Immunchemische Untersuchungen.....	60
4.2.1	ETA-Rezeptor.....	60
4.2.1.1	Pulmonalarterien.....	60
4.2.1.2	Pulmonalvenen.....	61
4.2.1.3	Gefäßveränderungen.....	62
4.2.2	ETB-Rezeptor.....	64
4.2.2.1	Pulmonalarterien.....	64
4.2.2.2	Pulmonalvenen.....	65
4.2.2.3	Gefäßveränderungen.....	66
4.2.3	PDE-5-A-Enzym.....	69
4.2.3.1	Pulmonalarterien.....	69
4.2.3.2	Pulmonalvenen.....	70
4.2.3.3	Gefäßveränderungen.....	70
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>

5.1 Fehlerquellen.....	80
<b>6. Schlussfolgerung.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>93</b>
9.1. Veröffentlichte Vorträge und Abstracts.....	93
9.2 Poster.....	95
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>98</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>99</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A. – Arteria

Aa – Arteriae

Abb – Abbildung

AK – Antikörper

CD – Cluster of differentiation

et al. – et alii, und andere

ET - Endothelin

ETA – Endothelinrezeptor-A

ETB – Endothelonrezeptor-B

g - Gramm

HE – Hämatoxylin-Eosin-Färbung

ISHLT – International Society for Heart and Lung Transplantation

Kg – Kilogramm

L – Liter

mg – Milligramm

mL – Milliliter

PA – Pulmonalarterie

PBS-Lösung – Phosphate buffered saline, phospahtgepufferte Salzlösung

PDE-5-A – Phosphodiesterase-5-A-Enzym

PAH – Pulmonal-arterielle Hypertonie

PH – Pulmonale Hypertonie

PV – Pulmonalvene

R. – Ramus

Rr - Rami

V. – Vena

Vv – Venea

ZVD – Zentraler Venendruck

µm - Mikrometer

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb 1</b> Übersichtsdarstellung Lungenaufbau.....	2
<b>Abb 2</b> Allgemeiner Gefäßaufbau Arterien und Venen.....	4
<b>Abb 3</b> Gefäßaufbau Arterien.....	7
<b>Abb 4</b> histologische Anschnitte Vene.....	8
<b>Abb 5</b> Histopathologische Einteilung der Atherosklerose.....	10
<b>Abb 6</b> Übersichtsdarstellung PH.....	12
<b>Abb 7</b> Übersichtsabbildung Endotheline.....	16
<b>Abb 8</b> Lobektomiepräparat.....	22
<b>Abb 9</b> Probenröhrchen.....	22
<b>Abb 10</b> Gefäßsegment.....	23
<b>Abb 11</b> Gefäßschneider.....	23
<b>Abb 12</b> Gefäßsegmentringe.....	23
<b>Abb 13</b> Positivkontrolle ETA-Rezeptorfärbung.....	27
<b>Abb 14</b> ETA-Rezeptorfärbung Vene .....	27
<b>Abb 15</b> ABC-Methode.....	28
<b>Abb 16</b> HE-Färbung, Arterie.....	37
<b>Abb 17</b> HE-Färbung, Vene.....	38
<b>Abb 18</b> HE Färbung Arterie in Übersichtsaufnahme.....	39
<b>Abb 19</b> HE Färbung Arterie.....	40
<b>Abb 20</b> HE-Färbung Arterie.....	41
<b>Abb 21</b> Sirius-Färbung mit Resorcin-Fuchsin-Färbung Arterie.....	42
<b>Abb 22</b> HE-Färbung Vene.....	44
<b>Abb 23</b> HE-Färbung Vene.....	44
<b>Abb 24</b> HE-Färbung Vene.....	45
<b>Abb 25</b> Sirius-Färbung mit Resorcin-Fuchsin-Färbung Vene.....	46
<b>Abb 26</b> Intimaverdickung Arterie.....	49
<b>Abb 27</b> ausgeprägte Intimaveränderung Arterie.....	49
<b>Abb 28</b> Intimaveränderung Arterie, SMA-Färbung.....	50

<b>Abb 29</b> $\alpha$ -SMA-Färbung Arterie.....	51
<b>Abb 30</b> HE-Färbung Arterie Adventitiaverdickung und Neovaskularisation.....	52
<b>Abb 31</b> Sirius-Färbung Intimafibrose Arterie.....	53
<b>Abb 32</b> Sirius-Elastica-Färbung Arterie mit Atherom.....	54
<b>Abb 33</b> $\alpha$ -SMA-Färbung Arterie mit Atherom.....	54
<b>Abb 34</b> $\alpha$ -SMA-Färbung Intimaverdickung Vene.....	56
<b>Abb 35</b> HE-Färbung Intimaverdickung Vene.....	56
<b>Abb 36</b> SMA-Färbung Mediaverdickung Vene.....	57
<b>Abb 37</b> $\alpha$ -SMA-Färbung Vene.....	58
<b>Abb 38</b> $\alpha$ -SMA-Färbung Vene Zellformation Adventitia.....	59
<b>Abb 39</b> Sirius-Elastica-Färbung Vene Fibrose.....	60
<b>Abb 40</b> Arterie ETA-Rezeptor.....	61
<b>Abb 41</b> Vene ETA-Rezeptor.....	62
<b>Abb 42</b> ETA-Rezeptorfärbung Arterie.....	63
<b>Abb 43</b> ETA-Färbung Arterie mit Präatherom.....	64
<b>Abb 44</b> Arterie ETB-Rezeptor.....	65
<b>Abb 45</b> Vene ETB-Rezeptor.....	66
<b>Abb 46</b> ETB-Rezeptor-Färbung: Rezeptordichteveränderung.....	67
<b>Abb 47</b> ETB-Färbung Vene.....	67
<b>Abb 48</b> ETB-Rezeptor-Färbung Vene.....	68
<b>Abb 49</b> PDE-5-A-Enzym-Färbung Arterie.....	69
<b>Abb 50</b> PDE-5-A-Enzym-Färbung Vene.....	70
<b>Abb 51</b> PDE-5-A-Enzym-Färbung Arterie mit Intimaverdickung.....	71
<b>Abb 52</b> PDE-5-A-Enzym Färbung Arterie mit Intimafibrose.....	71
<b>Abb 53</b> PDE-5-A-Enzym-Färbung Vene.....	72
<b>Abb 54</b> PDE-5-A-Enzym-Färbung Arterie mit Atherom.....	73
<b>Abb 55</b> verzogene Intima und Media einer Arterie.....	80

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	verwendete Primärantikörper.....	26
<b>Tabelle 2</b>	Auswertungstabelle Immunhistochemie Gefäßschicht.....	31
<b>Tabelle 3</b>	IRS-Score Anwendungsbeispiel.....	32
<b>Tabelle 4</b>	zweiter Teil des Auswertungsscores.....	32
<b>Tabelle 5</b>	Primärantikörper.....	35
<b>Tabelle 6</b>	Sekundärantikörper.....	35





## **1. Einleitung**

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist durch eine Erhöhung des Gesamtwiderstandes und damit des Blutdruckes im Lungenkreislauf gekennzeichnet. Die Ursachen sind vielfältig. Es ist jedoch bekannt, dass vasokonstriktive sowie vasodilatative Faktoren Schlüsselrollen bei der Entwicklung der PAH einnehmen. Pulmonalarterien (PA) nehmen hierbei eine zentrale Stellung ein. Klinische und pharmakologische Studien zur PAH sind vorhanden. Allen gemein ist die Beschreibung eines optimalen Behandlungsregimes. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (Sildenafil/Vardenafil) und Endothelinrezeptor-Antagonisten (Bosentan) haben einen kontraktionshemmenden Effekt auf humane PA. Beide Substanzklassen sind wichtige Bestandteile der leitliniengerechten Behandlung der PAH und werden hierfür im klinischen Alltag einzeln oder in Kombination eingesetzt. Ein Großteil der aktuellen Therapieansätze der PAH beruht auf den Erkenntnissen aus vorwiegend tierexperimentellen oder pharmakoklinischen Studien. In-vitro-Untersuchungen an humanen Pulmonalgefäßen sind bisher ausstehend.

Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es daher, in klinisch unauffälligen humanen PA und Pulmonalvenen (PV) vasomodulierende Faktoren (ETA, ETB und PDE-5-A-Enzym) zu untersuchen. In Ergänzung dazu soll der histomorphologische Gefäßaufbau beider Gefäßarten evaluiert werden, um eine Aussage über deren allgemeine Gefäßmorphometrie treffen zu können. Anhand dieser lassen sich Faktoren bestimmen, die die Rezeptorendichte- und positivität der genannten vasomodulierenden Faktoren beeinflussen können.

## 2. Grundlagen

### 2.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Lunge ist paarig aus Pulmo dexter und Pulmo sinister angelegt. Beide Lungen bestehen makroskopisch aus einer Lungenbasis und Lungenspitze. Die Basis liegt der Zwerchfellkuppel mit der Facies diaphragmatica auf. Pulmo dexter ist dreilappig und Pulmo sinister zweilappig angelegt (Schiebler und Korf, 2007). Die Lungenlappen lassen sich in Lungensegmente, den Segmenta bronchopulmonalia, einteilen. Links gibt es neun Segmente, rechts sind es zehn Segmente (s. Abb 1). Wiederum lassen sich die Segmenta bronchopulmonalia in Lobuli pulmonis, den Lungenläppchen, untergliedern. Die Lungenläppchen sind durch die Septa interlobulares, bestehend aus lockerem Bindegewebe, voneinander abgegrenzt (Schiebler, 2005).

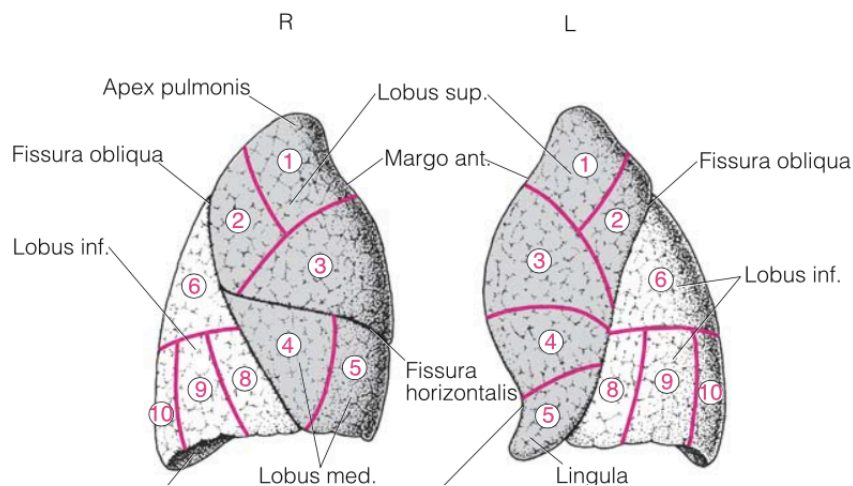


Abbildung 1: Übersichtsdarstellung Lungenaufbau (Schiebler, 2005)

In der Lunge gibt es luftleitende und respiratorische Abschnitte. Zu den luftleitenden Abschnitten gehört die Trachea. Sie teilt sich in zwei Hauptbronchien, den Bronchus principalis sinister et dexter auf. Diese verzweigen sich weiter baumartig zum Arbor bronchialis, in die sekundären (Bronchi lobares) und tertiären Bronchien (Bronchi segmentales) auf. Durch Verzweigung der tertiären Bronchien entstehen bronchopulmonale Segmente. Im Zentrum dieser Segmente verlaufen Bronchien und Lungenarterienäste. Hingegen verlaufen die V. pulmonalisäste intersegmental im Bindegewebe. Diese bronchopulmonalen Segmente stellen eine eigene funktionelle Einheit dar und können daher einzeln operativ entfernt werden. Nun folgen die respiratorischen Endabschnitte. Hier findet der Gasaustausch zwischen der Atemluft

und dem Blut durch die Blut-Luft-Schranke statt (Schiebler, 2005). Der Bluttransport ist ein Schwerpunkt des Kreislaufsystems. In der Lunge wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und gelangt von der linken Herzkammer über die Aorta, Arterien und Arteriolen zu den Kapillaren. Hier findet der Stoffaustausch zwischen Blut und dem entsprechenden Gewebe statt. Hernach gelangt das Blut über die Venolen, Venen, Vena cava superior und inferior zum rechten Herzvorhof. Von dort wird es über die Pulmonalarterien und -arteriolen zu den Kapillaren der Lunge transportiert, um von dort über die Pulmonalvenolen und -venen wieder zum linken Herzvorhof zu gelangen. Man unterscheidet dabei das Hochdruck- vom Niederdrucksystem, in dem sich das Blut verteilt. Zum Hochdrucksystem gehören die linke Herzkammer während der Systole, die Aorta sowie die folgenden Arterien und Arteriolen (Lang und Lang, 2007). Zum Niederdrucksystem zählt man das Venensystem, das rechte Herz, die Lungengefäße und den linken Vorhof und die linke Herzkammer während der Diastole. Physiologisch herrschen im kleinen Kreislauf niedrigere Druckwerte und Widerstände als im großen Kreislauf (Schiebler, 2005).

## **2.2 Lungenkreislauf**

Im Lungenkreislauf lassen sich zwei Gefäßsysteme unterscheiden: Vasa publica und Vasa privata. Die Vasa publica versorgen den Körperkreislauf und sind für den Gasaustausch und die Oxygenierung zuständig. Über die Aa. Pulmonales (PA) wird kohlendioxidreiches Blut aus dem Körperkreislauf in die Lunge und nach der Sauerstoffanreicherung in den Kapillaren der Alveolen über die Vv. Pulmonales (PV) zum Herz zurücktransportiert. Die Aa. und Vv. pulmonales bilden mit den dazwischengeschalteten Kapillaren den Lungenkreislauf (Schiebler und Korf, 2007). Die Vasa publica sind für 99% der Lungendurchblutung verantwortlich (Ittrich, 2017). Die Vasa privata hingegen sorgen für 1% der Lungendurchblutung, dabei sind diese mit den Koranargefäßen des Herzens zu vergleichen, die wie diese für die Blutversorgung des eigenen Gewebes zuständig sind (Cauldwell, 1948). Die Rr. Bronchiales (Bronchialarterien) entspringen aus dem großen Körperkreislauf. Ihr Ursprung ist häufig variabel (Cauldwell, 1948 und Lang und Lang, 2007). Bronchopulmonale Anastomosen zwischen beiden Kreisläufen existieren (Botenga, 1970). Diese können nach Bedarf geöffnet oder geschlossen werden (Schiebler und Korf, 2007). In der PA herrschen äquivalente Druckschwankungen wie in der Aorta. Der von der rechten Herzkammer erzeugte Druck erreicht zwischen 20 bis 25 mmHg in der Systole. Diastolisch liegt der Druck bei 14 mmHg und damit unterhalb der Druckwerte des Körperkreislaufes. Daher sind PV dünnwandiger und

kürzer als die entsprechenden Gefäße des Hochdrucksystems. Der Gesamtwiderstand entspricht etwa 10% des großen Kreislaufes. Der Druck der Kapillaren liegt im Mittel bei sieben mmHg (Lang und Lang, 2007). Ist die pulmonalarterielle Zirkulation eingeschränkt, können neoangiogenetische Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden und es kann zur pulmo-bronchialen Arterienproliferation kommen (Ferris, 1981, Marshall, 1997 und McDonald, 2001). Die Folgen können eine erhöhte system-arterielle Druckbelastung durch chronische Inflamationszonen in den Lungengefäßen sein (Mc Donald, 2001).

## 2.3 Gefäßaufbau

Man unterscheidet zwei Gefäßarten: Arterien und Venen. Allen gemein ist ein grundlegender Gefäßwandaufbau, der sich von innen nach außen wie folgt beschreiben lässt: Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia (s. Abb. 2).

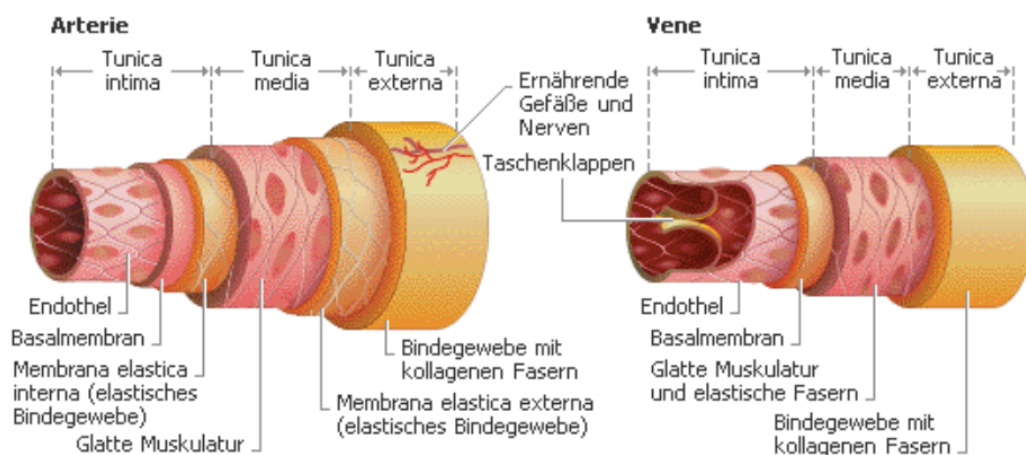


Abbildung 2: Allgemeiner Gefäßaufbau Arterien und Venen aus Joubert-Huebner 2009

Die Tunica Intima beider Gefäßarten besteht aus Endothel und dem subendotheliale Bindegewebe. Dieses setzt sich aus losem Fibronektin und elastischem Gewebe zusammen. Die American Heart Association Committee on Vascular Lesions definiert die Tunica membrana elastica interna, die sich zwischen der Tunica Intima und Tunica Media befindet, als deren Grenze zueinander (Butany und Buja, 2016). Die Tunica Media besteht aus glatten Muskelzellen und einer Vielzahl extrazellulärer Bindegewebsingredienzien. Sie werden von den glatten Muskelzellen eigens produziert. Als Grenze zwischen Tunica Media und der folgenden Tunica Adventitia wird die Tunica membrana elastica externa angesehen. Die Prominenz bzw. Existenz der Tunica membrana elastica interna und externa ist nicht einheitlich

und kann in ihrer Gestalt erheblich voneinander variieren (Butany und Buja, 2016 und Lüllmann-Rauch, 2015). Die Tunica Adventitia besteht vorwiegend aus kollagenem Bindegewebe. In ihr verlaufen Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße. Trotz vieler Ähnlichkeiten in der Architektur und funktionellen Organisation, gibt es wesentliche Unterschiede in der Gefäßgröße und in Besonderheiten der individuellen Funktion. Abhängig sind diese auch vom vorherrschenden Blutdruck vor Ort (Butany und Buja, 2016).

### **2.3.1 Arterien**

Man unterscheidet die Arterien (s. Abb. 3) hinsichtlich ihrer Größe und Konfiguration der Tunica Media. Es gibt Arterien vom elastischen Typ und muskulären Typ, sowie kleine Arterien und Arteriolen. Arterien vom elastischen Typ sind herznah. Die elastischen Arterien dienen primär als Leitungsrohre und bewegen große Blutmengen vom Herzen zu den mittelgroßen Arterien. Durch ihren hohen Anteil an elastischen Fasern in der Tunica Media kann die Pulswelle während der Systole absorbiert werden. Daher neigen sie in der Diastole zur Kontraktion. Dies erlaubt wiederum einen kontinuierlichen Blutfluss (Windkesselfunktion). Ihr Diameter ist mehr als ein Zentimeter und ihre Gefäßwand, in Bezug auf den Durchmesser, relativ dünn. Distal verzweigen sie sich in Muskelarterien auf (Lüllmann-Rauch, 2015). Peripher gelegene Arterien werden dem muskulären Typ zugeschrieben. Zu ihnen werden alle grobsichtbaren und anatomisch-benannten Arterien gezählt. Sie unterscheiden sich zu den Arterien vom elastischen Typ in der Anzahl der glatten Muskelzellen (Joubert-Huebner, 2009). Durch ihre hohe Anzahl an glatten Muskelzellen können sie sich aktiv kontrahieren und darüber den Blutfluss zu einem Organ oder Gefäßabschnitt beeinflussen. Ihre Diameter variieren von einem bis 0,05 Zentimeter und besitzen, im Vergleich zu ihrem Gesamtdurchmesser, relativ dicke Gefäßwände (Butany und Buja, 2016). Viele Arterien verjüngen sich im Gefäßkaliber und so ist eine genaue Einteilung zu einem speziellen Arterientypen aktuell nicht möglich. Daher spricht man auch von Arterien des gemischten Types, die vor allem in Übergangsregionen wie den axillären, poplitealen und iliacalen Arterien vorkommen und sich distal mit Arteriolen vermischen (Butany und Buja, 2016).

#### **Tunica Intima**

Auf der luminalen Oberfläche befinden sich polygonale Endothelzellen. Sie sind langgestreckt und können mit der langen Achse des Gefäßes ausgerichtet sein. Ihre Basallamina kann direkt der Membrana elastica interna anliegen. Während bei größeren Arterien die Endothelzellen von

der Basalmembran durch eine subendotheliale Schicht getrennt sind. Die subendothelialen Schicht besteht aus Kollagen, elastischen Fasern, vereinzelt Fibroblasten und aus wenigen in Längsrichtung angeordneten glatten Muskelzellen. In den tieferen Schichten der Intima sind Makrophagen angeordnet. Sie spielen eine Rolle bei der Phagozytose und sind an der Einlagerung von Lipiden beteiligt. Die Membrana elastica interna ist in Arterien vom muskulären Typ prominent und kann sich mikroskopisch klar dargestellt werden. Sie ist eine dicke, fenestrierte Schicht aus verwobenen elastischen Fasern. Sie hat eine gewellte Erscheinung. Dies entsteht aufgrund künstlicher Kontraktion und kann an Arterienabzweigpunkten und Gefäßgabeln fehlen. Die Dicke der Intima variiert mit dem Alter und den pathologischen Zuständen der Gefäße (Butany und Buja, 2016).

#### Tunica Media

Die Gefäßschicht der Tunica Media stellt die Hauptkomponente der Arterien vom muskulären Typ dar. Die glatten Muskelzellen sind hier spiralförmig in konzentrischen lamellaren Einheiten angeordnet. Bis zu vierzig Schichten können in größeren Arterien auftreten. In ihr sind eine große Menge an Proteoglykanen und geringe Mengen an Kollagen und elastischen Fasern eingelagert. In größeren Arterien kann eine Membrana elastica externa beschrieben werden. Auch unterliegt die Tunica Media den Prozessen der Altersveränderungen. So kann die Anzahl der Muskelzelllamellen und die Dicke von Geburt bis zum hohen Lebensalter und in Reaktion auf Drucküberlastung bei systemischer arterieller Hypertonie zunehmen (Butany und Buja, 2016).

#### Tunica Adventitia

Die Tunica Adventitia ist eine Schicht aus kollagenen und elastischen Fasern. Bei Arterien vom muskulären Typ ist diese Gefäßschicht ähnlich dick wie deren Tunica Media. Sie dient als Schutz vor übermäßiger Gefäßausdehnung und soll Rückstöße abfangen. In ihr verlaufen Lymphgefäße und die Vasa vasorum. Darunter versteht sich ein dünnwandiges Netzwerk aus arteriellen und venösen Komponenten. Diese vaskulären Elemente durchdringen die Adventitia und dienen zur vitalen Versorgung der Tunica Media. Zudem können Nervenfasern aus sympathischen Ganglien in dieser Gefäßwand verlaufen. Sie sind an der Innervation glatter Muskelzellen der Tunica Media beteiligt. In der Gesamtheit besteht die Tunica Adventitia aus einer Vielzahl von Zellen: Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Mastzellen, eosinophilen und in kleiner Zahl neutrophiler Zellen. Hauptanteil der

Zellen nehmen die Fibroblasten ein. Sie werden auch als „die Sentinelzellen“ (Butany und Buja, 2016) der Tunica Adventitia bezeichnet. Sie reagieren auf eine Vielzahl von Reizen und können dadurch aktiviert werden. Die Aktivierung der Fibroblasten führt zu einer Differenzierung zu alpha-glatten-Muskelaktin-exprimierenden Myofibroblasten. Diese nehmen eine Schlüsselrolle bei der vaskulären Remodellierung ein. Daher wird die Tunica Adventitia auch als ein komplex-dynamisches Kompartiment angesehen. In ihr finden die Integration, Lagerung und Freigabe von Schlüsselreglern der Gefäßwandfunktion statt. Sie verfügt über eine Vielzahl von Aufgaben, wie den entzündlichen Zelltransport, das Wachstum und die Reparatur der Gefäßwand und die Immunüberwachung. Über die neuronalen Leitungsbahnen in der Tunica Adventitia findet eine Kommunikation zwischen vaskulären endothelialen Zellen und den glatten Muskelzellen der Tunica Media und dem periadventitialen Gewebe statt (Butany und Buja, 2016).

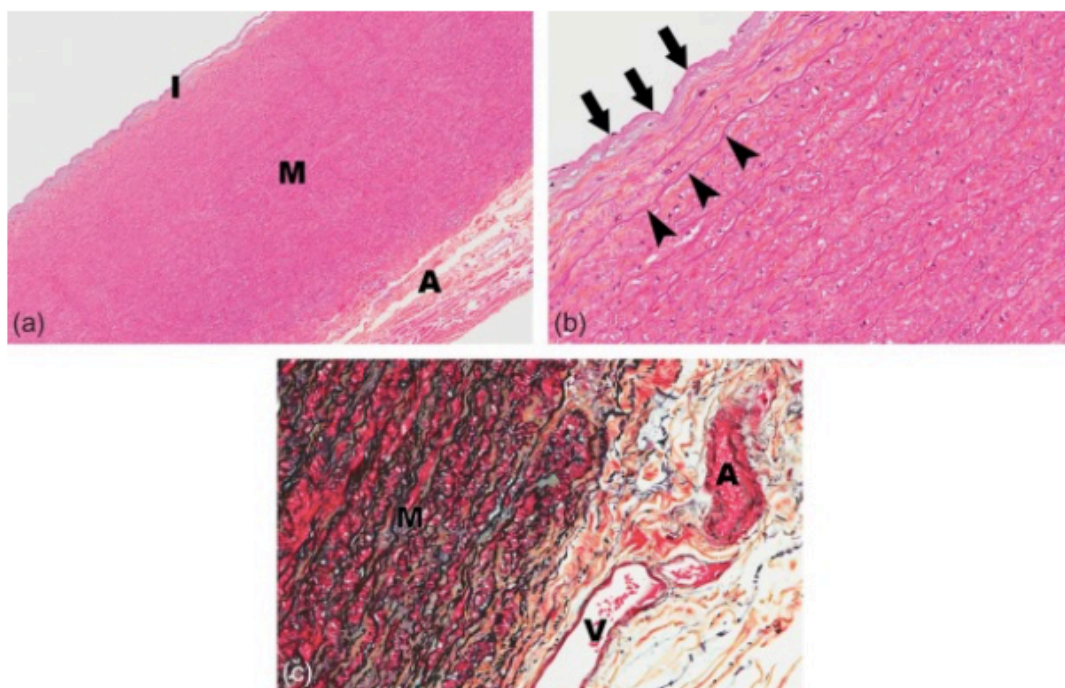


Abbildung 3: Gefäßaufbau Arterien

a Aufteilung in Intima, Media und Adventitia, 50-fache Vergrößerung. b 200facher Vergrößerung Endothelaufbau, c Übergang Media zu Adventitia mit Gefäßanschnitten V. und A. (Butany und Buja, 2016)



### 2.3.2 Venen

Die Venen (s. Abb. 4) zeigen im Vergleich zu Arterien eine größere Variabilität in der Gefäßmorphometrie. Grundlegend ist die Anzahl der Venen zahlreicher (Lang und Lang, 2007). Sie haben meist größere Kaliber und eine dünnere Gefäßwand als ihre arteriellen Gegenstücke. Hierdurch haben sie einen geringeren Anteil an glatten Muskelzellen und somit eine morphologisch dezent ausgebildete Tunica Media (Butany und Buja, 2016). Große Venen haben einen Diameter von mehr als einem Zentimeter. Zu ihnen werden die Vena cava inferior et superior, V. pulmonales, V. lienalis, V. mesenterica und V. ilica externae gezählt. Ihre Tunica Intima besteht aus dem Endothel mit seiner Basallamina mit aufliegender subendothelialer Matrix. Die Tunica Media ist eher dünnwandig. Die Tunica Adventitia ist die dickste Schicht. Die Vasa vasorum sind prominent (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Diameter mittlerer Venen liegen zwischen 0,01 und einem Zentimeter. In der Tunica Intima sitzt das Endothel mit seiner Basallamina auf einer dünnen subendothelialen Matrix. Eine prominente Membrana elastica interna wird nicht ausgebildet. Die Tunica Media ist bei diesen Venen gut entwickelt und einige haben eine stark ausgeprägte muskuläre Komponente. Die Tunica Adventitia besteht aus kollagenem Bindegewebe, welches mit elastischen Fasern durchsetzt ist. Glatte Muskelzellen und Nervenfasern kommen in geringer Anzahl vor.

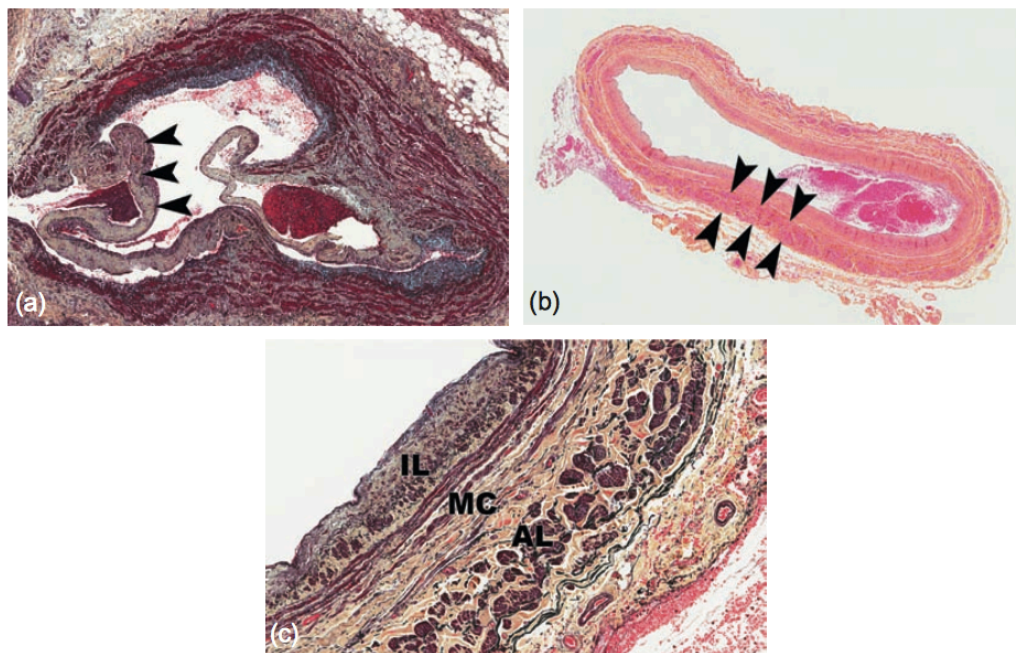


Abbildung 4: histologischer Anschnitte Vene

a Vene in 40 x Vergrößerung b große Vene c 100fache Vergrößerung mit Schichtdarstellung (IL= Tunica Intima, MC= Tunica Media; AL= Tunica Adventia) (Butany und Buja, 2016)

## **2.4 Atherosklerose**

Epidemiologisch handelt es sich bei der Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen um ein weltweites Problem. Sie gilt als Hauptursache für Morbidität und Mortalität. So zeigt die aktuelle Todesstatistik aus dem Jahr 2015 vom Statistischen Bundesamtes Deutschlands insgesamt 925 200 Sterbefälle. Dabei gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen mit 356 616 Betroffenen (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2017). Bei diesen genannten Erkrankungen spielt in deren Pathogenese die Atherosklerose eine wichtige Rolle. Verschiedene Risikofaktoren beeinflussen und beschleunigen diese (Kronmal, 2007). Hierzu zählen vorrangig die arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus, genetische Faktoren, das Rauchen oder auch zunehmendes Lebensalter (Galyean, 1978). Die Klinik der Atherosklerose verläuft allermeist stumm. Lange haben die Betroffenen keine klinischen Beschwerden und ein subjektives Wohlbefinden. Erst bei weit fortgeschrittenen atherosklerotischen Veränderungen in den betroffenen Gefäßen zeigen die Patienten eine Klinik u.a. in Form von kardiovaskulären Beschwerden wie Kurzatmigkeit, Herzstechen (Angina pectoris) oder Kreislaufproblemen (Go, 2014). Daher ist eine Identifizierung von Frühindikatoren einer beginnenden atherosklerotischen Veränderung essentiell wie soeben effektive Präventionsmaßnahmen zur Aufklärung und Verhinderung der Atherosklerose (Schrodt, 2014). Sie entsteht als Folge eines sich wiederholenden und mehrstufigen Entzündungsprozesses in der betroffenen Gefäßwand. Hierbei kommt es meist zu einer Gefäßschichtläsion der Tunica Intima und in deren Folge zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels. Hierdurch wird eine komplexe Kaskade ausgelöst, die durch multiple Faktoren beeinflusst wird. In das geschädigte Endothel dringen verschiedene Plasmabestandteile ein. Blutfettbestandteile wie LDL und HDL scheinen hierbei eine übergeordnete Rolle zu spielen (Gebbers, 2007). Diese Blutplasmabestandteile werden in der Tunica Intima oxidiert und dort von zellulären Bestandteilen wie Makrophagen Rezeptor-vermittelt aufgenommen (Ross, 1999). Die LDL-beladenen Makrophagen wandeln sich zu Schaumzellen, den fatty streaks um. Es werden lokal Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Die glatten Muskelzellen aus der Tunica Media der betroffenen Gefäße wandern in die Tunica Intima ein und werden dort zur Proliferation angeregt (Stary, 1995). Die glatten Muskelzellen produzieren eine extrazelluläre Matrix und umhüllen die Schaumzellen. Es

entsteht im Verlauf ein Atherom, welches sich zu verschiedenen Anteilen aus Fett und kollagenem Bindegewebe zusammensetzen kann (Ross, 1999). Verschiedene wissenschaftliche Hypothesen zur ursächlichen Gefäßschädigung sind verbreitet (Schrodt, 2014). Es gibt eine deskriptive histopathologische Einteilung der American Heart Association (AHA) (Stary, 1995). Die Klassifikation besteht aus sechs Kategorien (s. Abb. 5). Kategorie I dient zur Beschreibung beginnender Atherosklerose. Sie beschreibt frühzeitige adaptive Veränderungen der Tunica Intima in Form von Intimaverdickungen. Kategorie II beschreibt das Vorkommen von (mehrlagigen) Makrophagen bzw. Schaumzellen und mit oxidierten glatten Muskelzellen mit den makroskopisch auffälligen fatty streaks. Kategorie III beschreibt die Übergangs- oder Zwischenläsionsstadium zwischen Kategorie II und IV in Form von Präatheromen. Fortgeschrittene Plaques werden zu der vierten Kategorie gezählt. Atherome gehören der Kategorie IV an. Die fünfte Kategorie beschreiben Fibroatherome, also Atherome mit ausgeprägter Fibrosekappe. Kategorie VI beschreibt ausgedehnte Plaques mit Oberflächendefekten und ausgeprägten Kalzifikationen in diesen Bereich (Stary, 1995).

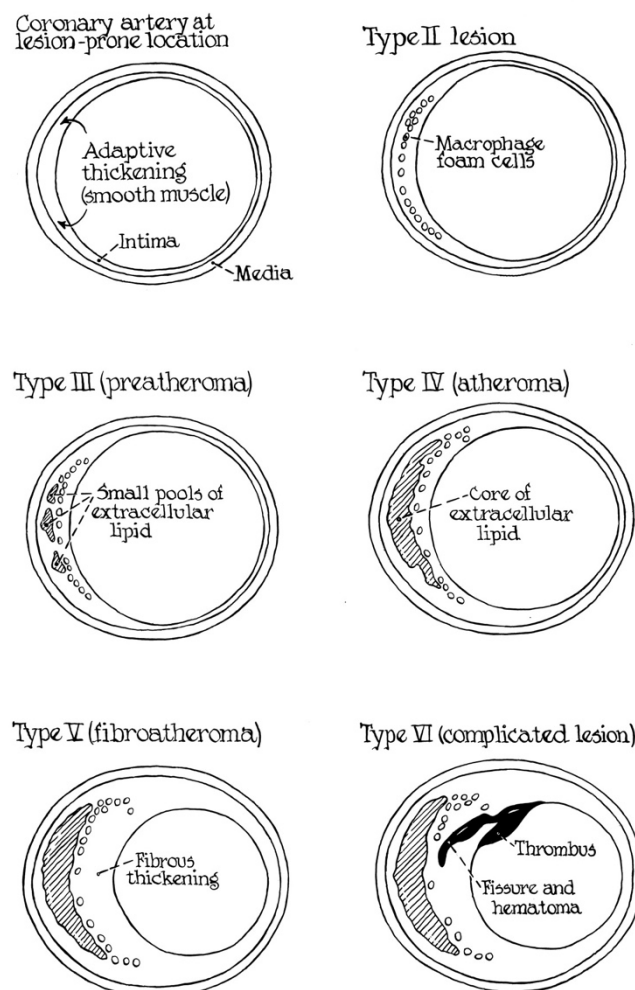


Abbildung 5: Histopathologische Einteilung der Atherosklerose (Staracy, 1995)

## **2.5 Pulmonale Hypertonie (PH)**

Epidemiologisch wird die PH zu den seltenen Erkrankungen gezählt. Es sind ca. 15 bis 25 von 1 Million Menschen betroffen (European Lung Foundation, 2017). Hierbei kommt es zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion im Lungenkreislauf und führt zu einer Rechtsherzbelastung und verminderter Gewebeoxygenation (Rubin 1997). Ein progredientes bzw. fulminantes Rechtsherzversagen kann dabei eine häufig schwerwiegende und lebensbedrohliche Komplikation sein (Voswinckel, 2012). Patienten mit klinisch manifester PH haben eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Benza, 2010). Eine PH liegt vor, wenn der mittlere pulmonale arterielle Druck (PAPm) einen Wert  $\geq 25$  mmHg in Ruhe übersteigt. (Galie, 2016). Der PAPm wird mit einer Rechtsherzkathederuntersuchung bestimmt. PAPm-Werte  $\leq 20$  mmHg gelten als klinische Normwerte. Weitere diagnostische Marker wie der pulmonale-vaskuläre Widerstand (PVR), der pulmonal arterielle Wedge-Druck (PAWP), das Herzzeitvolumen (HZV) und der diastolische Druckgradient (DPG) finden zur Definition der PH Verwendung. Bei einer PH liegen die Werte des PVR  $> 3$  Wood-Einheiten (WR), der PAWP  $\leq 15$  mmHg, der DPG  $\geq 7$  mmHg. Alle aufgezeigten Werte werden in Ruhe gemessen. Die Verwendung und Gegenüberstellung der verschiedenen diagnostischen Marker lassen eine hämodynamische Klassifikation der PH zu (Galie, 2016). Eine spezifische klinische Symptomatik lässt sich der PH nicht zuweisen. Allgemeine Symptome wie Kurzatmigkeit, Synkopen, trockener Husten, Müdigkeit oder Angina pectoris zeigen sich. Treten diese Beschwerden in Ruhe auf, lässt dies auf ein fortgeschrittenes Stadium der PH schließen. Zudem kann die Präsenz der Symptome der PH durch andere Krankheitsbilder verändert oder assoziiert sein (Humbert, 2009). Bei der körperlichen Untersuchung können eine links-parasternale Pulsationen, ein dritter Herzton, ein pansystolisches Herzgeräusch bei Trikuspidalklappeninsuffizienz und ein Diastolikum bei Pulmonalklappeninsuffizienz nachgewiesen werden. Im fortgeschrittenen Stadium zeigen sich häufiger ein erhöhter Jugularvenendruck, Aszites, Hepatosplenomegalie, periphere Ödeme und kühle Extremitäten (Galie, 2016).

### **2.5.1 Pathogenese**

Die Pathogenese der PH ist multifaktoriell (Galie, 2016). Eine dauerhafte Vasokonstriktion im pulmo-vaskulären Gefäßbett, der Vorgang des pulmonal-vaskulären Remodelling der Gefäßschichten und Thrombosen in diesen anatomischen Bereich lassen den pulmonal-arteriellen Druck ansteigen. Diese Veränderungen finden in allen Gefäßwandschichten statt und werden durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener unterschiedlicher Zellarten innerhalb der Gefäßwandschichten verstärkt (s. Abb. 6). Hier sind Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten genauso wie Entzündungszellen und Thrombozyten verantwortlich. Diese Zellen nehmen eine weitere Schlüsselfunktion in der Pathogenese der PH ein (Humbert, 2004). Diese Vorgänge wiederum vermindern die Gefäßelastizität und das Gefäßlumen. Die Folge ist ein dauerhaft erhöhter pulmo-arterieller Druck. Diese dauerhafte Widerstandserhöhung in den Lungengefäßen verursacht eine Druckbelastung des rechten Ventrikels. Im weiteren Verlauf entsteht eine Rechtsherzhypertrophie, das Cor pulmonale (Rubin, 2006). Die Betroffenen sind in ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit eingeschränkt und die Lebenserwartung ist verkürzt (Benza, 2010 und Ried, 2014). Die rechtsventrikuläre Insuffizienz ist eine häufige, schwerwiegende und oft lebensbedrohliche Komplikation der PH (Voswinckel, 2012). Das pulmonal-vaskuläre Remodelling betrifft alle Gefäßschichten. Dieser Vorgang wird als äußerst komplex angesehen (Humbert, 2004).

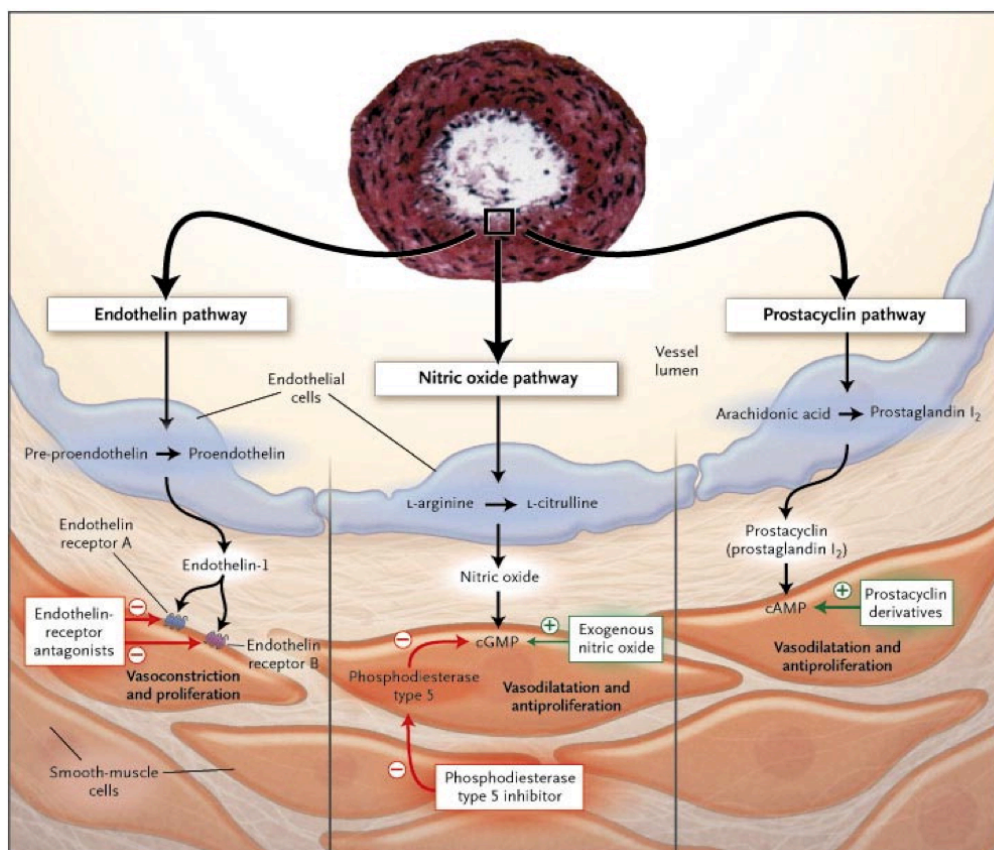


Abbildung 6: Übersichtsdarstellung der Hauptwege zur Entstehung pathologischer Veränderungen der PH mit Aufschlüsselung der Therapieoptionen (Humbert, 2004)

### **2.5.2 Therapiemöglichkeiten**

Die Therapie der PH erfolgt stufenweise. Erst folgen Basismaßnahmen, anschließend die Einleitung einer spezifischen PH-Therapie sowie bei Nichtansprechen der bisher durchgeführten Therapie die Erwägung weiterer Behandlungsmaßnahmen (Galie, 2016 und Humbert, 2004). Zu den Basismaßnahmen zählen neben der Überweisung an ein PH-Experten-Zentrum, u.a. eine Immunisierung gegen Influenza und Pneumokoken, sowie eine psychologische Betreuung und bei betroffenen Frauen eine Kontrazeption und die Vasoreagibilitätstestung. Diese Basismaßnahmen können um supportive Maßnahmen wie z.B. Antikoagulation oder Reduzierung der Rechtsherzbelastung mit Diuretika ergänzt werden. Hierbei sollte stets der individuelle Patientenstatus ausschlaggebend für die Wahl der Breite der unterstützenden Maßnahmen sein. Anschließend knüpft sich die spezifische Behandlung der PH an. Diese erfolgt mit diversen Medikamenten. Grundlegend unterscheidet sich die Therapie zwischen sog. „Respondern“, also Patienten, die ein gutes Ansprechen auf den hochdosiert-verordneten Kalziumkanalblocker haben und Patienten mit zugelassenen PH-Medikamenten. Zur medikamentösen Therapie stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Medikamente zur Verfügung. Eine Monotherapie wird primär empfohlen (Galie, 2016). Kalziumkanalblocker sind Substanzen, die selektiv den spannungsabhängigen Einstrom von Calcium durch den L-Typ-Calciumkanal blockieren und weitere Calciumkanäle nicht beeinflussen. Der L-Typ-Calciumkanal ist im menschlichen Organismus in der glatten Muskulatur und kardiovaskulären System vorhanden. Der L-Typ-Calciumkanal, der bei Depolarisation der Zellmembran einen langsamen Calciumeinstrom in die Zelle ermöglicht, ist essentiell für die elektromechanische Kopplung (Lang und Lang, 2007). Angewendete Kalziumantagonisten sind Dihydropyridine, Benzothiazepine und Phenylalkylamine. Patienten, bei denen die Vasoreagibilitätstestung klinisch auffällig ausfällt, können nachgewiesener Maßen von dieser Kalziumkanalblockertherapie durch eine Zunahme der kardio-pulmonalen Leistungsfähigkeit profitieren (Galie, 2016 und Hoeper, 2004). Die Prostanoiden sind eine weitere Wirkstoffklasse, die zum Einsatz kommt. Der Wirkstoff Prostacyclin wird von der Cyclooxygenase aus Arachidonsäure synthetisiert. Wirkziel sind zellmembranegebundene IP-Rezeptoren, die über G-proteine eine Vasodilatation in den Lungengefäßen vermitteln und somit den erhöhten Pulmonaldruck reduzieren (Humbert, 2004).

Angewendete Medikamente sind hierbei Epoprostanol, Iloprost oder Treprostinil (Galie, 2016). Weiter kommen Endothelinrezeptorantagonisten und PDE-5-Hemmer zum Einsatz. Diese beiden Medikamentenklasse werden in der Monotherapie der Behandlung der PH eingesetzt und sind Gegenstand dieser Untersuchung. Stimulatoren der Guanylatzyklase und IP-Rezeptor-Agonist zählen zu den neueren Medikamenten. Hierbei findet Riociguat und Selexipag (oral) Anwendung. Sie sind in den aktuellen Leitlinien zur Behandlung der PH neu aufgelistet (Galie, 2016). Nach eingeleiteter Therapie ist eine regelmäßige Kontrolle indiziert. Erfolgt unter der eingeleiteten Therapie kein adäquates Therapieansprechen, eine Verschlechterung der klinischen Untersuchungsbefunde oder eine Verschlechterung der Risikoeinschätzung, wird die Therapie um weiterführende Maßnahmen ergänzt. Hierbei stehen verschiedene Kombinationstherapien (bis zur sequentiellen Dreifachkombination), der als monotherapiegeführten Medikamente zur Wahl. Hierbei handelt es sich derzeit um Off-Label-Use-Anwendungen, deren Wirkungsweise und Folgen klinisch nicht abzuschätzen sind. Weitere Therapieoptionen stellen intensivmedizinische Behandlungsansätze, eine Lungentransplantation oder als äußerste Möglichkeit die Ballonatrioseptostomie dar (Galie, 2016).

## **2.6 Vasoaktive Peptide**

Vasoaktive Peptide nehmen in der Entstehung der PH eine Schlüsselrolle ein und ihr Wirkort ist das Gefäßendothel (Humbert, 2004). Zu diesen vasoaktiven Peptiden zählen u.a. Prostacyclin, Stickstoffmonoxid und Endotheline. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Weite der Gefäße und sind daher Ausgangspunkt vieler Medikamente. Eine große Anzahl an vasoaktiven Stoffen ist bekannt. So könnten hier im Verlauf eine Menge weitere Stoffe aufgezählt und erläutert werden (Lang und Lang, 2007). Allerdings wird im Folgenden ausschließlich auf die für die durchgeführte Studienuntersuchung relevanten vasoaktiven Peptiden eingegangen.

### **2.6.1 Endothel**

Das Endothel kleidet das Herzinnere und die Gefäße aus. Es besteht aus einer einzigen flachen Endothelzellschicht (Tennant und McGeachie, 1990). Es dient einer Vielzahl struktureller, immuner und hämostatischer Aufgaben. So ist es am Stofftransport, der Tonusregulation der glatten Muskelzellen und in diversen pathophysiologischen Prozessen involviert (Moncada und Higgs, 2006). Je nach Funktion kann das Endothel unterschiedlich aufgebaut sein:

kontinuierlich, gefenstert oder diskontinuierlich (Benett, 1959). Endothelphänotypen unterscheiden sich nicht nur in Organsystemen und Lebewesen, sondern auch innerhalb direkt aufeinanderfolgender Gefäßabschnitten. Unabhängig vom hämodynamischen Einfluss produzieren arterielle und venöse Endothelzellen unterschiedliche Botenstoffe und Mediatoren. So unterscheiden sich die Endothelzellen in ihrer Morphologie, Antigenpräsentation, Mediatorenfreisetzung und in ihrer Stressreaktion (Aird, 2003). Eine Untersuchung zur Plastizität zeigt, dass Endothelzellen nicht auf organspezifische Phänotypen angewiesen sind. Dies gilt auch hinsichtlich ihrer arteriellen-venösen Differenzierung. So haben sich in Hühnerembryonen transplantierte Arterien und Venen an das Genexpressionsprofil ihres Gegenspielers anpassen können. Arterielle Endothelzellen kolonisierten Venen und umgekehrt (Moyon, 2001 und Othman-Hassan, 2001). Dies zeigt, dass sich Endothelzellen genetisch an hämodynamischen Veränderungen anpassen können und ein hohes Maß an Plastizität besitzen (le Noble, 2005).

Die Endothelzellen sind polygonal und können in Blutflussrichtung verlängert sein. Sie messen eine Länge von 25 µm und sind 15 µm breit (Moncada und Higgs, 2006). Sie produzieren vasoaktive Peptide. In der Regel sind in Arterien endothelabhängige Relaxationen stärker ausgeprägt als in den entsprechenden Venen (Seidel und LaRochelle, 1987). Sie reagieren gut auf Nitrovasodilatoren. Somit scheinen die endothelabhängigen Reaktionen durch das Endothel selbst und nicht durch den glatten Muskel bestimmt zu werden (Moncada und Higgs, 2006). Das Endothel reguliert daher durch seinen lokalen Einfluss die Funktion der glatten Muskelzellen. Eine enge Verbindung zwischen Endothelfunktion und glatter Muskelzellen scheint vorzuherrschen. So sorgt das Endothel bei physiologischen Bedingungen durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren für einen konstanten Gefäßtonus und verhindert eine Proliferation glatter Muskelzellen. Treten pathologische Veränderungen auf, wird das Endothel aktiviert und sezerniert vasoaktive Stoffe (Giaid, 1993). Desweiteren hat Endothelin einen Einfluss auf andere Gewebearten. So hat es einen nachgewiesenen Effekt vor allem auf Fibroblasten und andere Bindegewebszellen (Muldoon, 1990).

### **2.6.2 Endotheline**

Ihr Vorkommen wurde erstmals 1988 beschrieben (Yanagisawa, 1988). Produziert werden sie von endothelialen Zellen und anderen Zellen wie Neurone und Epithelzellen (Lang und Lang, 2007). Zur Endothelinfamilie zählen drei Isopeptide: ET1, ET2 und ET3. Die Endotheline werden aus einem Vorläufermolekül, dem Proendothelins (Prepro-ET), synthetisiert. Es setzt



sich aus 212 Aminosäuren zusammen. Nach Spaltung dieses Vorläufermoleküls erhält man das Proendothelin (Pro-ET). Es besteht aus 38 Aminosäuren und wird als großes Endothelin (big ET) bezeichnet. Durch weitere Spaltung durch das Endothelin-konvertierte Enzym (ECEs) entsteht das aus 21 Aminosäure bestehende Endothelin. Alle drei Isopeptide bestehen aus 21 Aminosäuren. Sie werden durch verschiedene Gene kodiert und kommen in unterschiedlichen Gewebearten vor (Remuzzi, 2002). ETs haben eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Funktionen (s. Abb. 7). Physiologisch bewirken sie über einen intrazellulären Kalziumanstieg eine Vasokonstriktion und hemmen die Vermehrung der glatten Muskelzellen (Giaid, 1993). Pathologische Vorgänge werden durch ETs induziert. So sind sie an der Induktion für Gewebshypertrophien, v.a. in Fibroblasten und in vaskulären glatten Muskelzellen, beteiligt (Yang, 1999 und Muldoon, 1990). In den beiden vorherigen Zellarten induzieren ETs in Abhängigkeit von ihrer Konzentration im Blut eine Zellproliferation (Cambrey, 1994) und sind auch an Entzündungsreaktionen beteiligt. Sie erhöhen dabei die Gefäßpermeabilität, stimulieren zytokinproduzierende Zellen (z.B. IL6), aktivieren Entzündungszellen (Neutrophile und Mastzellen) und verändern die Blutgerinnung (gesteigerte Plättchenaggregation) (Helset, 1996). Als Folge können Endothelzellverletzungen, vor allem im Lungenkreislauf resultieren (Browatzki, 2000). Das Endothelin-1 wird als besonders stark vasoaktiv beschrieben (Dhaun, 2007). Es ist ein hundertfach potenterer Vasokonstriktor als Epinephrin (Yanagisawa, 1988) und wirkt nach Aktivierung an zwei Endothelinrezeptoren: dem Endothelin ETA Rezeptor und Endothelin ETB Rezeptor.

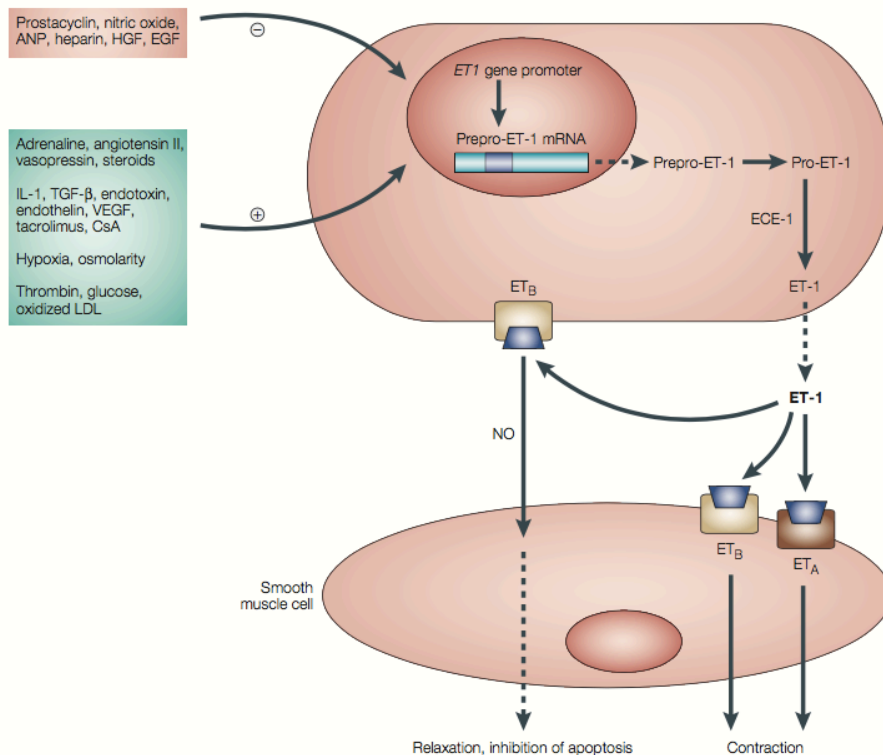


Abbildung 7: Übersichtsabbildung Endotheline: über Regulation der ET-Synthese, intrazelluläre Wirkweise und Rezeptormodulation (Remuzzi, 2002)

### 2.6.3 Endothelinrezeptoren

Sie kommen in unterschiedlichen Organen und Geweben vor. Diese Endothelinrezeptoren nehmen bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie, arteriellen Hypertonie, Atherosklerose und Entzündungsreaktion inklusive der Nozizeption eine Schlüsselrolle ein (Waldiceu, 2009). Beiden Rezeptoren werden unterschiedliche physiologische Aufgaben zugeschrieben (Hirata, 1993). In den Koronargefäßen treten beide Rezeptorarten auf. Hier rufen sie eine Vasokonstriktion hervor. In der Lunge werden sie in den PA beschrieben. Hierbei sorgen beide Rezeptoren für eine Vasokonstriktion (Dhaun, 2007). Der ETA-Rezeptor wird von den vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert. Bindet ET-1 an den Rezeptor, so wird eine Vasokonstriktion hervorgerufen (Lösch, 2005). Neben der Vasokonstriktion kann der ETA-Rezeptor eine Zellproliferation hervorrufen (Hirata, 1993). Der ETB-Rezeptor wird von vaskulären glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. Bindet ET-1 an den Rezeptor, so wird entweder eine Vasokonstriktion oder eine Vasodilatation hervorgerufen (Lösch, 2005). Zudem ist der ETB-Rezeptor für die Beseitigung von ET-1 aus dem Blutplasma verantwortlich (Dupuis, 1996). Aktivierte ETB-Rezeptoren im Endothel stimulieren die Stickstofffreigabe und Prostzyklinsynthese, Stoppen die Apoptose, inhibieren

die ECEs-Expression in Endothelzellen und spielen eine Schlüsselrolle in der ET-abhängigen Vasodilatation. (Hirata, 1993 und Shichiri, 1997 und Clozel, 2005). ETB-Rezeptoren sind auch an proinflammatorischen Vorgängen beteiligt. Bindet ET an ihnen auf Monozyten, sind sie an deren Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie TNFalpha, beteiligt (Jürgens, 2008). Verschiedene Tiermodelle beschreiben eine Verbindung der beiden Endothelrezeptoren zueinander in bestimmten Krankheitsstadien bzw. bei pathologischen Veränderungen (Cardozo, 1997). So kann bei Rezeptorblockaden der nicht betroffene Rezeptor die Funktion des anderen Rezeptors übernehmen: Wird der ETA-Rezeptor selektiv blockiert, übernimmt der ETB-Rezeptor dessen Funktionen (Cardozo, 1997 und Fukuroda, 1994). Daher müssen beide Rezeptoren blockiert werden, wenn man die Funktion gesamtes Zellsystem ausschalten möchte. Die Auswirkungen auf die cross-talk-Verbindungen sind nicht genau bekannt: blockiert man beide Rezeptorenarten, weiß man nicht, ob sich diese Blockade synergisch oder additiv auswirkt im Vergleich zur Blockierung einer Rezeptorenart (Lui, 1996). Beide Endothelinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Rhodopsin Klasse A mit sieben Transmembranproteinen (Lagerstrom und Schioth 2008). Sie ähneln in ihrem strukturellen Aufbau dem GABA-Rezeptor und beide Rezeptoren sind Heterodimere. Hierin liegt die Erklärung der cross-talk-Verbindungen und der Adaptionfunktion v.a. des ETB-Rezeptors. Derzeitige Untersuchungen zeigen, dass beide Endothelrezeptoren funktionelle Heterodimerformen ausbilden (Harada, 2002). Unterstützt wird diese Annahme durch die bivalente Ligandenformation des ET-1. Dies ermöglicht die Bindung sowohl an ETA- als auch den ETB-Rezeptors. Sein N-terminales Ende bindet dabei am ETA-Rezeptor, sein C-terminales Ende bindet am ETB-Rezeptor. Zudem ermöglichen funktionelle Heterodimere den synergischen Effekt zwischen beiden Rezeptoren (Gegan, 2004). Die Dichteverteilung beider Rezeptoren variiert je nach Gewebsart und kann durch pathologische Prozesse und Krankheiten verändert sein. Daher ist keine einheitliche Folgerung möglich, wie und auf welchem Gewebe der jeweilige Rezeptor durch den Einfluss von ET-1 verteilt ist (Davie, 2002).

#### **3.6.4 Endothelinrezeptorantagonist Bosentan**

Das Medikament Bosentan ist ein dualer Antagonist beider Endothelinrezeptoren (Remuzzi, 2002). Es findet Anwendung zu Behandlung der PH. In Arterien und Venen bewirkt es eine Vasodilation (Dumont, 2001 und Ried, 2013). So war nach Bosentangabe der erhöhte Druck in den PA annähernd im Normbereich und pathologische Gefäßveränderungen im pulmonalen Gefäßbett zeigten sich regredient. Zudem hat es einen positiven Effekt auf das vaskuläre

Remodelling. Bosentan schützt PA vor diesen Gefäßveränderungen. Es unterbindet die vaskuläre Hypertrophie und übt einen positiven Effekt auf die Vorbeugung der Verdickung der Tunica Media aus (Rondelet, 2003 und Chen, 1995). In tierexperimentellen Studien zeigte sich ein Einfluss von Bosentan auf Entzündungsreaktionen. So konnte eine Reduzierung der Inflammation im Rattenmodell nachgewiesen werden. Eine iatrogene Entzündungsreaktion in der Trachea von Ratten wurde hervorgerufen. Bei Ratten, die eine Vorbehandlung mit Bosentan erhielten, fiel die Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert aus (Finsnes, 1997). Allerdings sind bis heute die systemischen Wirkungen auf den humanen Gefäßtonus und das Entzündungssystem nach Bosentangebe nicht bekannt (Trow und Taichman, 2009).

### **3.6.5 PDE-5-A-Enzym und PDE-5-A-Hemmer**

Das PDE-5-A-Enzym wird in verschiedenen Geweben und Organen des Menschen exprimiert. Dabei spielen die Lunge und die glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle (Fiorito, 2013). Es wird intrazellulär auf mRNA-Ebene verstoffwechselt, sodass man hier nicht von einem Rezeptor sprechen kann. Hierbei handelt es sich um ein Targetenzym. In klinischen Anwendung der PH-Therapie kommen PDE-5-A-Hemmer zum Einsatz. Hier ist das Medikament Sildenafil federführend. Es wirkt durch Hemmung der Phosphodiesterase-5. Es kommt hierbei nicht zur Phosphorylierung, dadurch wird PDE-5-A nicht in den Zellen verstoffwechselt. Eine Vasodilatation ist die Folge (Humbert, 2004).

## **2.7 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe**

Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Professor Dr. med. H-S. Hofmann und PD Dr. med. M. Ried hat sich mit dem Thema der PH auseinandergesetzt und verschiedene in-vitro Studien durchgeführt. Das hierzu verwendete Organbad, in dem die entnommenen Lungengefäße inkubiert werden, ist im Jahr 2011 durch die Arbeitsgruppe als wissenschaftliche Untersuchungsmethode etabliert worden (Hoenicka, 2011). Zudem zeigte diese Studie erste Erkenntnisse über die Aufteilung und physiologische Wirkungsweise von Endothelin-A und Endothelin-B Rezeptorenantagonisten. Hierbei zeigt sich, dass diese bei Arterien oder Venen angewendet, die für eine Bypassoperation entnommen werden, einen positiven Einfluss auf die Vasokonstriktion der Gefäße haben und den gefürchteten Vasospasmus dieser Gefäße deutlich reduzieren können. Somit kommt es nach deren Einsatz bei einer Bypassoperation zu einer besseren und schnelleren Reperfusion des entsprechenden Herzareals (Hoenicka, 2011).

Unterschiedliche Medikamente kommen zur Behandlung der PH im klinischen Alltag zum Einsatz. Vor allem Wirkstoffe aus der Gruppe der Vasodilatoren, die den Tonus der betroffenen Lungengefäße reduzieren und somit die Engstellung verringern sollen. In einer pharmakokinetisch-elektrophysiologischen Untersuchung aus dem Jahr 2014 (Ried, 2014) wurden zwei Vasodilatoren, der Phosphodiesterase-5-(PDE-5-A-)Hemmer (Wirkstoff Sildenafil) und der Endothelin-(ET) Rezeptorantagonist (Wirkstoff Bosentan), die beide auf unterschiedliche Signalwege fungieren, an isolierten humanen Pulmonalgefäßen in Kombinationswirkung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination von Sildenafil und Bosentan zu einer stärkeren Verminderung der Kontraktion von Pulmonalgefäßen verglichen mit ihrer Einzelapplikation führt. Diese elektrophysiologische Vorarbeit bestätigt die klinische Beobachtung, dass Patienten mit PH von einer Kombinationstherapie profitieren können (Ried, 2014).

## **2.8 Studiendesign- und ziel**

Bei der Pathogenese der PH nehmen vasomodulierende Faktoren zur Regulation des Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf eine Schlüsselrolle ein. PA nehmen dabei eine zentrale Stellung ein. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (Sildenafil) und Endothelinrezeptor-Antagonisten (Bosentan) haben einen kontraktionshemmenden Effekt auf humane PA. Beide Substanzklassen sind wichtige Bestandteile der leitliniengerechten Behandlung der PH und werden hierfür im klinischen Alltag in der Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt (Galia, 2016). Ein Großteil der aktuellen Therapieansätze der PH beruht auf den Erkenntnissen aus vorwiegend tierexperimentellen oder pharmako-klinischen und elektrophysiologischen Studien. Allen gemein ist die Beschreibung eines optimalen Behandlungsregimes. In-vitro-Untersuchungen an humanen Pulmonalgefäßen sind bisher ausstehend. Die Ergebnisse von Ried et. al (2014) und Hoenicka et. al (2011) unterstreichen die Notwendigkeit einer effektiven Therapie zur Behandlung der PH. Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es daher beide Pulmonalgefäßarten, die PA und PV, mittels histologischer und immunhistochemischer Methoden zu untersuchen. Es soll der allgemeine Gefäßaufbau der entnommenen Segmentpulmonalarterien und -Pulmonalvenen (Gefäßmorphometrie) deskriptiv beschrieben (deskriptive Pathologie) und darauf aufbauend die Pulmonalgefäße auf die beschriebenen

Rezeptoren (Targetenzymverteilung) mittels molekularpathologischer Anfärbetechnik untersucht werden, um eine Aussage über die Rezeptorverteilung- und -dichte in diesen Gefäßen treffen zu können und so ein mögliches immunhistologisches Korrelat zwischen der Morphologie, Funktion und der Wirkungsweise der beschriebenen Medikamentenklassen besser beschreiben und verstehen zu können. Zentrale Fragestellungen dieser Untersuchung sind:

- a) Wie ist der histologische Aufbau der klinisch unauffälligen und enbloc-entnommenen Segmentlungengefäße?

Diese Frage stellt den Leitfaden des histologischen Teils der Arbeit dar. Hieraus ergeben sich die histologische Untersuchungen von klinisch unauffälligen PV und PA zur Beschreibung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten sowie möglichen pathologischen Veränderungen und Sichtung möglicher pathologischer Auffälligkeiten. (wie bei KHK, Stichwort: Arteriosklerose, Remodelling). Zudem soll die Stellung der PV in diesem Kontext näher untersucht werden, ob diese Gefäßart u.a. für künftige pharmakokinetische-elektrophysiologische Untersuchungen als potenzielles Untersuchungsmaterial in Frage kommen könnte.

- b) Wie ist die Target-Verteilung von Sildenafil und Bosentan in den entnommenen Pulmonalgefäßen von PH-gesunden Patienten?

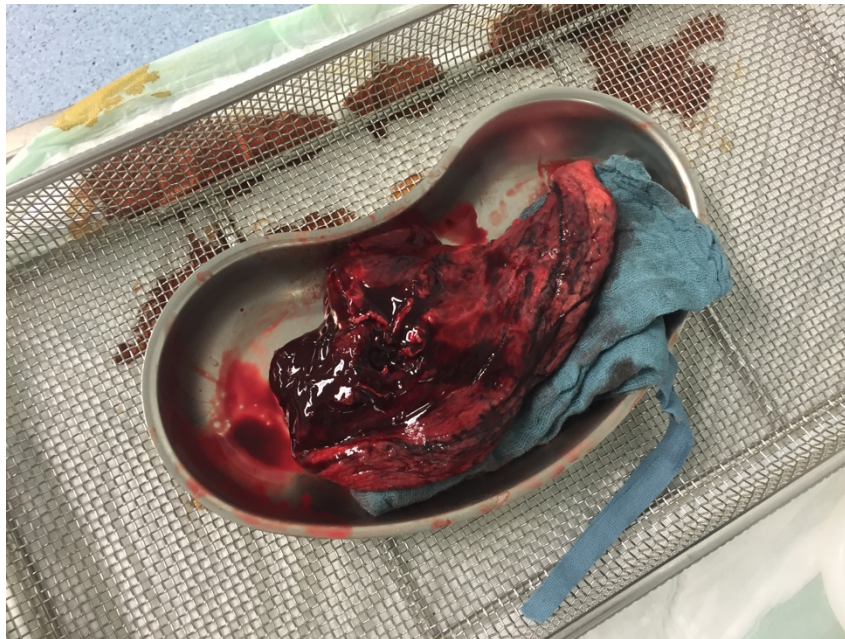
Diese Frage stellt den Leitfaden des immunchemischen Teils der Arbeit dar. Auch hierfür werden beide Gefäßarten untersucht. Diese Untersuchung von PV und PA dient auch zur weiteren Beschreibung von Gemeinsamkeiten, Unterschieden sowie möglichen pathologischen Veränderungen und Sichtung möglicher pathologischer Auffälligkeiten zwischen den beiden Gefäßarten.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

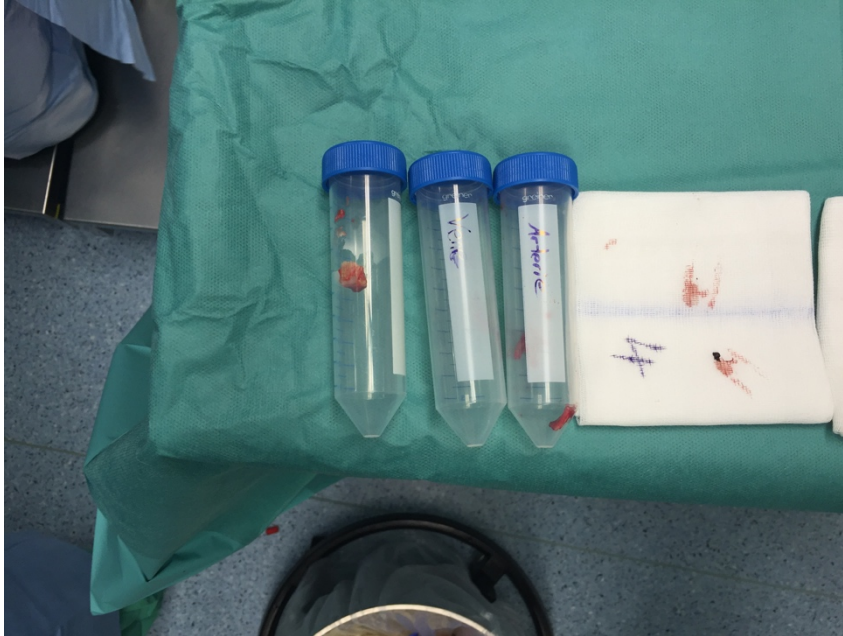
Zur Durchführung der geplanten Versuchsreihe wurden 50 Patienten im Zeitraum von September 2011 bis März 2016, die sich einer elektiven Lobektomie in der Klinik für Thoraxchirurgie (Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Regensburg) oder in der Abteilung für Thoraxchirurgie (Universitätsklinikum Regensburg), unterzogen haben, in die

Untersuchung eingeschlossen. Patienten mit einer präoperativ diagnostizierten PH sowie Patienten unter 18 Jahren wurden von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Präoperativ mussten die teilnehmenden Patienten nach ausführlicher Aufklärung schriftlich eine Einwilligungserklärung/Einverständniserklärung unterzeichnen. Es ergab sich für die Patienten kein erhöhtes perioperatives Risiko, keine verlängerte OP-Zeit oder eine aufwendigere OP-Methode. Es sind mehrere Abschnitte von klinisch unauffälligen Segmentpulmonalarterien und Segmentpulmonalvenen aus dem entnommenen Lungenlappen präpariert worden. Eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikum Regensburg liegt für alle Untersuchungen vor. Im Folgenden wird ein typischer Entnahmeablauf dargestellt: Die Lobektomien wurden minimal-invasiv (thorakoskopisch) oder konventionell (offen) durchgeführt. Unmittelbar nach Entfernung des Lobektomiepräparates (s. Abb. 8) werden die beschriebenen Gefäße vorsichtig freipräpariert. Die entnommenen Segmente wurden getrennt in PA und PV in die dafür vorgesehenen Röhrchen gelagert (s. Abb. 9). Zuvor wurden die Röhrchen mit



vollheparisierten Patientenblut befüllt.

Abbildung 8: Lobektomiepräparat



Abbildung

9:

Probenröhrchen

Die Probenröhrchen wurden auf direktem Wege in das Labor der experimentellen Herz-Thorax-Chirurgie transportiert. Bei Entnahmen aus dem Krankenhaus der Barmherzigen Brüder sind die Proben per Bestelltaxi in das genannte Labor transportiert. Dort anschließend aus den Probenröhrchen entnommen und in Ringe geschnitten (s. Abb 10 bis 12). Ein Teil der Ringe wurde für die Organbadversuchsreihe verwendet. Die zugeschnittenen Ringe wurden in markierte Schälchen gegeben, damit später eine Unterscheidung zwischen Vene und Arterie möglich war.





Abbildung 10:

Gefäßsegment

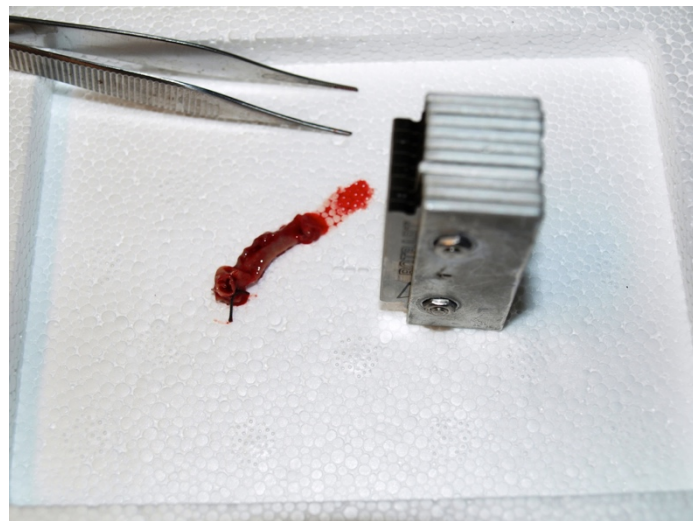


Abbildung 11: Gefäßschneider



Abbildung 12: Gefäßsegmentringe

Die Ringe wurden in vierprozentiger Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgte das Zuschneiden mit dem Paraffin-Mikrotom (Fa. Thermo Science; Rotationsmikrotom, HM 340 E) mit fünf µm Schichtdicke. Pro Objektträger wurden mindestens drei höchstens sechs Ringe der fünf µm dicken Gefäßschnittringe aufgebracht. Diese Paraffinschnitte wurden für weitere histologische und immunchemische Analysen verwendet. Diese werden in den folgenden Teilen weiter ausgeführt.

### **3.2 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials**

#### **3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zum Entparaffinieren wurden die Paraffinschnitte zunächst zwei Mal hintereinander für zwei bis fünf Minuten in Xylol (Fa. VWR, Hannover) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte zur Rehydratisierung in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 1x 70%) für drei Minuten gewaschen und zweimal mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gereinigt. In das zuvor filtrierte Hämalaun nach Mayer (Firma Merck, Darmstadt) wurden die bearbeiteten Schnitte für zwei Minuten gelegt. Anschließend mit VE-Wasser abgespült bis keine Farbrückstände mehr sichtbar waren. Die Präparate wurden in einer Salzsäure-Ethanollösung (ad 2,7 ml 37 % Salzsäure: 1L 70% Ethanol) gedippt. Danach wurden die Schnitte ordentlich mit VE-Wasser abgespült und mit lauwarmen Leitungswasser für zwei Mal fünf Minuten gebläut. Danach wurden die Träger in eine aufsteigende Ethanolreihe (1x 70 %, 1x 96 %) für je zwei Minuten eingegeben. Als weiterer Schritt erfolgt die Gegenfärbung mit Eosin G (Fa. Merck, Darmstadt) für zehn Minuten. Danach wurden die Präparate mit 96% Ethanol gespült und wieder in eine aufsteigende Ethanolreihe (2 x 96 %; 2 x 100%) für jeweils zwei Minuten gegeben. Zum Ende wurden die Färbungen für zwei Mal fünf Minuten in Xylol gelegt. Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt). Bei dieser Färbung imponieren die Zellkerne blau, das Zytoplasma rosa, die Muskulatur pink und die Erythrozyten ziegelrot.

#### **3.2.2 Elastika van Gieson-Färbung**

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst zwei Mal hintereinander für zwei bis fünf Minuten in Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte zur Rehydratisierung in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 2x 96 %, 1 x 70 %) für drei Minuten gewaschen und mit VE-Wasser gereinigt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert

(Fa. Waldeck, Münster) für acht Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Präparate mit Aqua dest. kurz abgespült. Nun wurden die Präparate mit der Hämatoxylinlösung nach Weigert (Fa. Roth, Karlsruhe; ad Hämatoxylinlösung A : Hämatoxylinlösung B) für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült und die Schnitte mit Leitungswasser für fünf Minuten bewässert. Kurz mit Aqua dest. abgespült. Nun wurden die Präparate in die selbst hergestellte Pikrofuchsinlösung ((insgesamt 300 ml; ad 285 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure (Fa. Roth, Karlsruhe): 15ml einprozentige wässrige Säurefuchsinlösung: 0,75 ml konzentrierte Salzsäure (37% HCL, rauchend)) für 15 Minuten inkubiert. Wiederholtes Abspülen mit Aqua dest und Eintauchen in aufsteigende Ethanolreihe (2 x 96 %, 2 x 100 %) erfolgte für je zwei Minuten. Abschließend wurden die Präparate in Xylol für zwei Mal fünf Minuten gelegt. Das Eindeckeln erfolgte mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt). Bei dieser Färbung imponieren das Bindegewebe rot, die Muskulatur gelb, die elastischen Fasern schwarz und die Zellkerne braun.

### **3.2.3 Resorcin-Fuchsin- und Sirius-Färbung**

Die Präparate wurden zum Entparaffinieren zwei Mal hintereinander für zwei bis fünf Minuten in Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitten rehydratisiert (s. oben). Anschließend wurden die Präparate in die Resorcin-Fuchsin-Lösung (hergestellt s. oben) für 20 Minuten in einem 60 Grad warmen Wasserbad erhitzt. Für weitere 10 Minuten abgekühlt bei Raumtemperatur. Anschließend in 96 % Ethanol differenziert bis der Präparathintergrund entfärbt war und die elastischen Fasern schwarz hervortreten. Nun Erfolgte die Inkubation mit der Hämatoxylinlösung nach Weigert (s. oben) für drei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate mit lauwarmem Wasser für zwei Mal fünf Minuten gebläut. Nach dem Bläuen erfolgte das Waschen mit VE-Wasser. Die Präparate wurden für 45 Minuten in die Picro-Siriuslösung (Fa. Roth, Karlsruhe) inkubiert und anschließend zwei Mal mit angesäuertem Wasser (0,5 % Essigsäure ad Aqua dest.) gewaschen. Das angesäuerte Wasser musste gut abgeklopft werden. Nun erfolgte das Inkubieren in Ethanolreihe (3 x 100 %) und zwei Mal baden in Xylol. Das Eindeckeln erfolgte mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt).

### **3.2.4 Immunchemische Färbungen**

Immunhistochemisch wurden die Targetenzyme ETA, ETB, PDE-5-A und zur Darstellung der glatten Muskelzellen die Färbung alpha-smooth-muscle-actin (kurz  $\alpha$ -SMA) angefertigt. Hierzu wurden die in zuvor Paraffin eingebetteten Immunschnitte entparaffiniert. Sie wurden für zwei Mal zehn Minuten in Xylol eingelegt, anschließend in absteigender Ethanolreihe (2 x

100%, 2 x 96 %, 1 x 70 %) für je fünf Minuten eingegeben und mit VE-Wasser für zwei Mal fünf Minuten abgewaschen. Allen weiteren Färbungen war folgender Färbemethodeschritt gleichsam. Es handelt sich hierbei um spezifische Antigen-Antikörperfärbungen. Nach Fixierung der Schnitte für 15 Minuten in unverdünntem Aceton erfolgte zum Aufschluss der Epitope das Kochen in Target Retrieval Solution Citrate pH6 (Fa. Dako, S 2369, Hamburg) und mit Phosphate Buffered Saline (PBS) wurde mehrmals gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde jeder Objektträger mit 100µl Normal Goat Serum (NGS; Fa. Sigma, München) betröpfelt (1:20 mit PBS verdünnt) und für 20 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen des Serums konnte dann der jeweilige Primärantikörper (s. unten) (100 µl/Schnitt) aufgebracht werden. Die folgenden primären Antikörper (s. Tabelle 1) wurden verwendet, um spezifische Epitope zu detektieren:

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper

Targetenzym	Primärantikörper	Händler/Verkäufer
Endothelinrezeptor A	polyclonal rabbit anti-human ab117521	Abcam
Endothelinrezeptor B	monoclonal rabbit anti-human epr7013	Abcam
Phosphodiesterase-5-A	polyclonal rabbit anti-human H-120	Santa Cruz
$\alpha$ -SMA	monoclonal mouse anti-human 1A4, A2547	Sigma

Dieser hatte sich spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe gebunden. Die Präparate wurden erneut für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimalig für jeweils fünf Minuten in PBS-Lösung gespült. Im nächsten Schritt wurden die gebundenen primären Antikörper mit einem spezifischen biotinylierten sekundären Antikörpern markiert (goat-anti-rabbit, Vektor BA-1000 bei 4 Grad Celsius, K3, 1:300, goat-anti-mouse, Vektor BA-2000 bei vier Grad Celsius, K3, 1:300) und anschließend mit einem Avidin-HRP-Komplex (Vectastain ABC Kit, Vector PK-6100) inkubiert. Durch das Auftragen des Brückenantikörpers mit gebundenem Markermolekül gelang es, die Antigen-Antikörperbindungsstellen und somit die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen. Nach dreimaliger Spülung für jeweils fünf Minuten in PBS wurde zur Darstellung der Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Fa.

Sigma, Missouri) gegengefärbt. Hierzu wurde das 3,3-Diaminobenzidin als Substrat (200 µl/Schnitt) aufgebracht. Es diente der Intensivierung der Antigen- Antikörperbindung. Nach 15 Minuten Inkubation in einer abgedunkelten Umgebung erfolgte die Spülung der Präparate mit reichlich Leitungswasser. Anschließend wurden die Objektträger mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Von allen angefertigten Schnitten wurde unter Weglassen des Primärantikörpers eine Negativkontrolle angelegt, um nicht spezifisch auf den Primärantikörper zurückführende Effekte als Referenz zu erfassen. Zudem wurden für die durchgeführten immunhistochemischen Präparatgruppen Positivkontrollen (s. Abb 13 und 14) angefertigt.

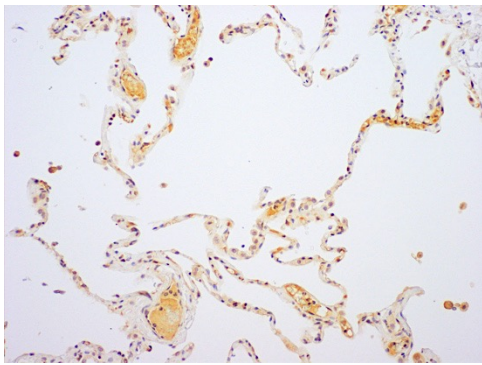


Abbildung 13:  
Positivkontrolle ETA-Rezeptorfärbung

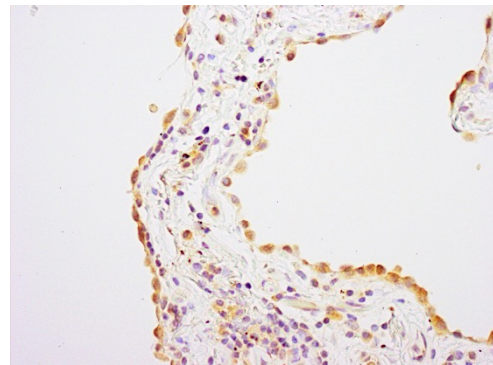


Abbildung 14:  
ETA-Rezeptorfärbung Vene

Bei der beschriebenen immunchemischen Färbetechnik handelte es sich um ein indirektes Zwei-Schritt-Verfahren. Im ersten Schritt wurde ein spezifischer Antikörper (AK) aufgebracht, der an das gesuchte Antigen-Epitop bindet. Im zweiten Schritt erfolgte die Auftragung des Brücken-AK, der sich gegen den Primär-AK richtet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Substratzugabe löste der in dieser Studie verwendete Enzymkomplex aus Avidin und Biotin eine Farbentstehung mit Hilfe einer Enzym-Substrat-Reaktion aus. Dies ist ein hochspezifischer Bindungstest zur Sichtbarmachung der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, die fest verbunden sind. Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein aus Hühnereiweiß. Dessen vier Untereinheiten eine sehr hohe Bindungsaffinität an Biotin haben. Dadurch wird der gewünschte Farbumschlag verstärkt. Die ABC-Technik (= Avidin-Biotin-Technik) findet regelhaft Anwendung in der Immunhistochemie (s. Abb. 15)

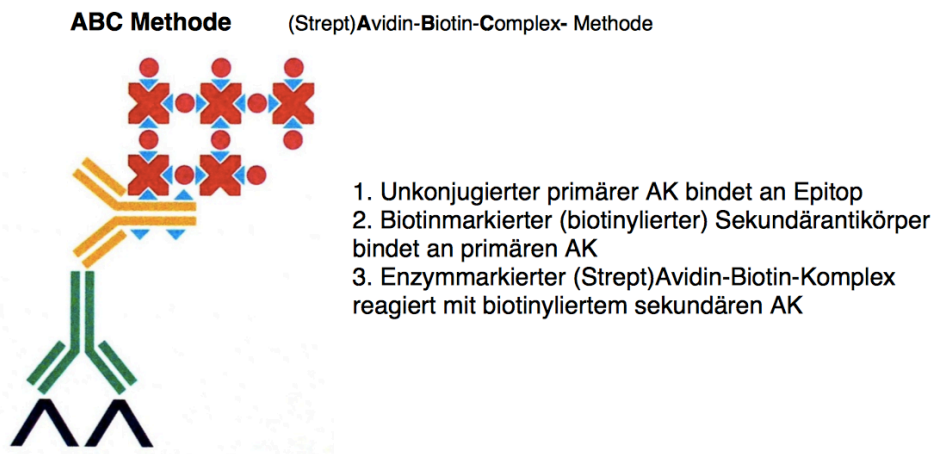


Abbildung 15: ABC-Methode (Osterwalder 2013)

### 3.3 PubMed-Recherche

Diese Methode basiert auf einer selektiven Literaturrecherche in PubMed (Blettner, 1997 und Friedenreich, 1993 und Ressing, 2009). Es wurden hierzu Reviews, randomisierte kontrollierte Studien, Registerstudien, fallkontrollierte Studien und Fallberichte eingeschlossen. Gegenstand/Fragestellung dieser Literaturrecherche war die Suche nach Daten, die zur Beschreibung der Gefäßmorphometrie von Segmentallungengefäßen (PA und PV), die nicht anhand von Lungengewebsschnitten histopathologisch oder/und immunhistochemisch untersucht wurden sind, sondern isoliert untersucht wurden. Als Datenbank wurde PubMed ausgewählt. Angeleitet und unterstützt wurde diese Literaturrecherche durch Herrn Dr. Helge Knüttel, Fachreferent aus der Universitätsbibliothek Medizin Uni Regensburg. Die Suchbegriffe waren: „pulmonary hypertension“, „pulmonary artery“, „pulmonary veins“, „histology“. Hierbei kamen die Boole'schen Operatoren zum Einsatz (Reitemeier, 2006). Die Suchstrategie wurde durch das in PubMed zur Verfügung stehende MeSH, „Medical Subject Headings“ unterstützt. Das Ergebnis der Suche waren 458 Treffer. Daher wurde der Zeitraum der Suche auf Ergebnisse der letzten 10 Jahre festgelegt, von 2007 bis 2017. Hierbei zeigten sich noch 126 Treffer(Stand 11.08.2017, 15.56 Uhr, feed: [https://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/erss.cgi?rss\\_guid=1-iHUQr\\_EQh7LW8w5ym7zlnQlyYrSP7m09lhwJwPrkXiu3BQ5p](https://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/erss.cgi?rss_guid=1-iHUQr_EQh7LW8w5ym7zlnQlyYrSP7m09lhwJwPrkXiu3BQ5p)).

Hierzu wurden die Abstracts systematisch nach der festgelegten Fragestellung durchgearbeitet. In keiner der bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Arbeiten konnte eine Gefäßmorphometriebeschreibung von Segmentalpulmonalgefäßen, die en bloc untersucht worden sind, als Treffer verzeichnet werden. Daher nehmen wir zum aktuellen Zeitpunkt der

Untersuchung an, dass bisherige wissenschaftliche Veröffentlichungen bzw. Erkenntnisse zu dieser Fragestellung unter Berücksichtigung der in dieser Untersuchung angewendeten histologischen und immunchemischen Methoden ausstehend sind.

### **3.4 Auswertung**

Die Auswertung der angefertigten immunhistochemischen Schnitte erfolgte semiquantativ. Hierzu wurden die Präparate von zwei unabhängigen Untersuchern lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Proben waren verblindet, lediglich die Gefäßart war bekannt. Beide Untersucher hatten eine Übereinstimmung von 92%. 15 % der randomisierten Schnitte wurden von einem erfahrenem Pathologen re-evaluiert, um die interindividuellen Unterschiede der einzelnen Beobachter hinsichtlich des Ergebnisses zu analysieren. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Leica Mikroskop DM RBE (Bensheim, Deutschland).

#### **3.4.1 Dekriptive Anatomie und Pathologie**

Aufgrund der Ergebnisse der in Pubmed durchgeführten selektiven Literaturrecherche mit der Fragestellung nach der Gefäßmorphometrie von enbloc entnommenen Segmentlungengefäßen zeigten sich wenige bis keine Vergleichsarbeiten. Dies liegt zu einem anhand der oben beschriebenen Entnahmemethode, d.h. enbloc gewonnenen Gefäße. Zum anderen an der Entnahme von reinen Segmentpulmonalgefäßen und die damit verbundenen Untersuchungen auf die bereits aufgeführten Rezeptoren. Um eine möglichst aussagekräftige Auswertungsgrundlage zur Beschreibung der Rezeptorenverteilung und -dichte erstellen zu können, wird für diesen Teil der Arbeit das Auswertungsinstrument der deskriptiven Anatomie und dekriptiven Pathologie verwendet. Die Methodik der deskriptiven Anatomie zeichnet sich durch die reine Strukturbeschreibung makroskopischer und mikroskopischer Befunde des menschlichen Körpers aus (Anderhuber, 2012). In dieser Untersuchung diente sie zur Erfassung der entnommenen Gefäßstrukturen. Sie soll als Grundlage für die Erfassung der weiteren Beschreibung und Auswertung der histologischen und immunchemischen Präparate dieser Untersuchung dienen und einen Zusammenhang der funktionellen, topographischen und systematischen Aspekte näher beschreiben (Kohlbach, 2007). Die Methodik gilt als klassisches Auswertungsinstrument und findet auch noch in heutigen Untersuchungen stets Anwendung.

#### **3.4.2 Konventionelle Histologie**

Die entnommenen Segmente wurden im Labor standardisiert nach etablierten Protokoll verarbeitet (s. oben). Für den Teil der konventionellen Histologie wurden die Färbungen Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE), Elastika van Gieson-Färbung und Resorcin-Fuchsin sowie Sirius-Färbung verwendet. Um Pathologien und Veränderungen der Gefäßmorphometrie der entnommenen Lungensegmentgefäße erkennen und als solche abgrenzen zu können, wird der histologische Aufbau gesunder Arterien vom Muskularistyp und Venen vom Mitteltyp als Referenz verwendet. Der histologische Aufbau der ausgewählten Referenz-Gefäße ist in der Einleitung dieser Arbeit zu finden. Die Untersucher haben die Anschnitte in zehner, 20er und 40er Übersichtsvergrößerung betrachtet. Untersucht wurden ausschließlich (Halb-)Ringe. Es wurden pro Objektträger drei willkürliche (Halb-)Ringe ausgewertet.

### **3.4.3 Auswertung der Immunhistochemie**

#### **3.4.3.1 Bestimmung der Rezeptorenverteilung und -dichte**

Die entnommenen Segmente wurden im Labor standardisiert nach etablierten Protokoll angefertigt (s. oben) und die immunchemischen Färbungen: ETA, ETB, PDE-5-A-Enzym und  $\alpha$ -SMA angefertigt. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung und die damit untersuchte Gefäßmorphometrie der entnommenen Gefäße bildeten die Grundlage der immunchemischen Auswertungsreihe. Die immunchemischen Färbungen sind von zwei unabhängigen Untersuchern semiquantitativ ausgewertet worden. Die Präparate waren verblindet, lediglich Färbeart und Gefäßart waren den Untersuchern bekannt. Beide Untersucher hatten eine Ergebnisübereinkunft von 89 %. Eine Re-evaluation durch einen erfahrenen Pathologen fand für 20 % der randomisierten Fälle statt. Sie diente der Unterscheidung der interindividuellen Ergebnisse zwischen den beiden Untersuchern. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert 135 (Fa. Zeiss, Jena). Simultan wurden stets die Negativkontrollen beurteilt. Bei fehlender Hintergrundaktivität wurde mit der Auswertung begonnen. Ausgewertet wurden pro Objektträger drei zufällig bestimmte, repräsentative (Halb-)Ringe. Diese wurden mit dem zehner Objektiv bestimmt, anschließend mit dem 40er Objektiv ausgewertet. Mit dem 40er Objektiv wurde innerhalb eines (Halb-)Ringes ein repräsentativer Ausschnitt aus diesem bestimmt. Hierbei lag das Augenmerk auf der Gefäßmorphometrie des zu untersuchenden Gefäßes, d.h. die einzelnen Gefäßschichten wurden bestimmt und anhand des modifizierten Auswertungsschemas bewertet, sodass für jede einzelne Gefäßschicht (Tunica Intima, Tunica Media, Tunica Adventitia) ein Punktwert für die Rezeptorendichte zwischen 0 und +++



bestimmt worden ist. Der Mittelwert für die einzelnen Gefäßschichten diene als Maß für die Rezeptordichte. Hierzu wurde folgende Tabelle (s. Tabelle 2) verwendet:

Tabelle 2: Auswertungstabelle Immunhistochemie Gefäßschicht

Präparatnr.:	Gefäßschicht:	
Score	Kriterium	Interpretation
0	< 10 Zellen/Gesichtsfeld	Keine Färbung
+	10 – 20 Z/GF	Schwache Färbung
++	20- 29 Z/GF	Mittlere Färbung
+++	≥ 30 Z/GF	Starke Färbung

### 3.4.3.2 Bestimmung der Rezeptorenpositivität

Im Verlauf der weiteren Auswertung wurden die Daten der einzelnen Untersuchungen zur Bestimmung der Rezeptorendichte der einzelnen Gefäßschichten weiterverwendet. Hier war die Anpassung der Werte auf römischen Zahlen notwendig, hierbei gilt:

$$0 = 0; + = 1; ++ = 2; +++ = 3$$

Mit den römischen Zahlen wurde fortan ausgewertet. In der Summe erhielt jeder untersuchte Halb-(Ring) einen Punktwert für die Tunica Intima, Tunica Media und die Tunica Adventitia. Diese Mittelwerte der einzelnen Gefäßschichten wurden in einem weiteren Auswertungsschritt addiert. Die Summe hieraus soll das Maß der Rezeptorenpositivität für die entsprechende Gefäßart auf dem jeweiligen Objektträger erfassen. Hierbei handelte es sich um eine Auswertung der Rezeptorenverteilung unter Hinzunahme der Gefäßmorphometrie. Es ergab sich ein eigenskonzipierter Auswertungsscore mit dem Namen L-A-D-Score.

### 2.4.3.3 L-A-D-Auswertungsscore

Das Auswertungsschema orientiert sich an den Score zur Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts nach Remmele und Stegner. Hierbei wird die Farbintensität sowie die Anzahl der positiven Zellen im Präparat bestimmt. Die beiden Ergebnisse werden anschließend miteinander multipliziert und man erhält den immunreaktiven Score (= IRS) (Remmele und Stegner, 1987). Im Folgenden wird ein Beispiel der Anwendung des IRS aufgezeigt (s. Tabelle 3):

Tabelle 3: IRS-Score Anwendungsbeispiel (nach Remmele 1987)

Färbeintensität	Anteil positiver Tumorzellen	max. Wert
<b>0</b> = keine Färbereaktion	<b>0</b> = keine positiven Zellen	<b>3 x 4 = 12</b>
<b>1</b> = schwache Färbereaktion	<b>1</b> = < 10% positive Zellen	
<b>2</b> = mäßige Färbereaktion	<b>2</b> = 10 - 50% positive Zellen	
<b>3</b> = starke Färbereaktion	<b>3</b> = 51 - 80% positive Zellen	
	<b>4</b> = > 80% positive Zellen	

**Beispiel:** starke Expression von Östrogenrezeptoren in ca. 60% der Tumorzellen: 3 x 3 = IRS 9

In dieser Arbeit diente der IRS als Basis und wurde in modifizierter Form angewendet. Zur Bestimmung des L-A-D-Scores wurde hierzu zuerst für jede einzelne Gefäßschicht ein Punktwert zwischen 0 und 3 bestimmt und jeder untersuchte Halb-(Ring) erhielt einen Punktwert für die Tunica Intima, Tunica Media und die Tunica Adventitia (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: zweiter Teil des Auswertungsscores

Präparatnummer:			
Tunica Intima	Tunica Media	Tunica Adventitia	Rezeptorpositivität

In einem weiteren Auswertungsschritt wurden die einzelnen Punktwerte summiert, sodass man für die jeweilige Gefäßart auf dem Objektträger ein Maß für die Rezeptorenpositivität erhielt. Somit ließ sich eine Verteilung der Rezeptorenintensität/dichte unter Berücksichtigung der Gefäßmorphometrie bestimmen und eine Aussage über die Rezeptorenverteilung im Gesamten zu untersuchenden Gefäß treffen. Dieser Score kann womöglich als histo-pathologisches Werkzeug zur differenzierten Einschätzung des Ausmaßes der Medikamentenwirkung von Bosentan und Sildenafil auf die Tonusregulierung der Lungengefäße dienen. Zudem lässt sich mit Unterstützung dieses Scores eine mögliche Tendenz zur Entwicklung einer Medikamentenresistenz gegenüber der beiden aufgezählten Medikamentenklassen ableiten. Dies kann vor allem helfen, Krankheitsverläufe der PH und Medikamentenwirkungen von Bosentan und Sildenafil besser bewerten und verstehen zu können. Daraus lassen sich

wiederum ggf. neue Therapieansätze ableiten und somit könnte der Krankheitsverlauf möglicherweise positiv beeinflusst werden.

### **3.5 Materialien**

#### **3.5.1 Chemikalien und Reagenzien**

Entellan	Merck, Darmstadt, D.
Eosin G	Merck, Darmstadt, D.
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D.
Ethanol	Sigma, St. Louis, USA
Gesättigte, wässrige Pikrinsäure	Roth, Karlsruhe, D.
Hämalaun	Merck, Darmstadt, D.
Hämatoxylinlösung A	Roth, Karlsruhe, D.
Hämatoxylinlösung B	Roth, Karlsruhe, D.
HCL (37%)	Roth, Karlsruhe, D.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, D.
NaCl	VWR, Darmstadt, D.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D.
NaOH	Merck, Darmstadt, D.
Natriumacetat	Sigma/Merck, St. Louis, USA
Normal Goat Serum	Sigma/Merck, München, D.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D.
Picro-Siriuslösung	Roth, Karlsruhe, D.
Resorcin-Fuchsin n. Weigert	Waldeck, Münster, D.
Triton	Sigma, St. Louis, USA
Xylol	VWR, Hannover, D.

#### **3.5.2 Verbrauchsmaterial und Kits**

DAB	Sigma, Missouri, USA
Deckgläschen, Glas 12 mm	VWR, Darmstadt, D.
Deckgläschen, Glas 22 mm	VWR, Darmstadt, D.
Deckgläschen, Glas, 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe, D.
Glaspipetten	VWR, Darmstadt, D.

Handschuhe, Latex  
 Küvetten, Plastik 1ml  
 Objektträger, Glas 76 x 26 mm  
 Objektträger, steril SLIDEFLASK  
 Petrischalen; Plastik 10 cm  
 Petrischalen, Plastik 6cm  
 Pipettenspitzen, Plastik  
 Reaktionsgefäß 15 ml  
 Reaktionsgefäß 50 ml  
 Röhrchen 5ml  
 Sterilfilter, 0,22 µm  
 Target Retrieval Solution Citrate pH 6 S 2369  
 Vectastatin ABC Kit Vektor PK-6100  
  
 Zellschaber

Kimberley-Clark, Irving, USA  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 R.Langenbrinck, Emmendingen, D.  
 Nunc, Roskilde, DK  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.  
 VWR, Darmstadt, D.  
 Dako, Hamburg, D.  
 Vector Laboratories, Peterborough,  
 UK  
 Sarstedt, Nümbrecht, D.

### 3.5.3 Geräte und Software

Autoklav Varioclav Damsterilisaton  
  
 Dispensiersystem Multiple plus  
 pH-Meter 766 Calimatic  
 Pipettierhilfe Pipetboy acu  
 Waage BL1500S  
 Mikropipette LABMate 100 – 1000 µl  
 Mikropipette LABMATE 20 – 200 µl  
 Mikropipette LABMATE 2 – 20 µl  
 Mikropipette PIPETMAN 0,2 – 2 µl  
 Mikroskop Axiovert 135  
 Mikroskop Leica Mikroskop DM RBE  
 Paraffin-Mikrotom HM 340 E

H + P Labortechnik,  
 Oberschleißheim, D.  
 Eppendorf, Hamburg, D.  
 Knick, Berlin, D.  
 Integra Bioscience, Dietikon, CH.  
 Sartorius, Göttingen, D.  
 LABMATE, Hertfordshire, UK.  
 LABMATE, Hertfordshire, UK.  
 LABMATE, Hertfordshire, UK.  
 Gilson, Middleton, USA  
 Zeiss, Jena, D.  
 Leica, Bensheim, D.  
 Thermo Fisher Science, Waltham,  
 USA

Sterilbank Hera safe Heraeus Instruments  
Sterilbank Laminair Heraeus Instruments

Heraeus Holdings, Hanau, D.  
Heraeus Holdings, Hanau, D.

### 3.5.4 verwendete Antikörper

#### 3.5.4.1 Primärantikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

Targetenzym	Primärantikörper/Verdünnung	Händler/Verkäufer
Endothelinrezeptor A	polyclonal rabbit anti-human ab117521, 1: 1000	Abcam, Cambridge, UK
Endothelinrezeptor B	monoclonal rabbit anti-human epr7013, 1: 2000	Abcam, Cambridge, UK
Phosphodiesterase-5-A	polyclonal rabbit anti-human H- 120, 1: 300	Santa Cruz, Dallas, USA
$\alpha$ -SMA	monoclonal mouse anti-human 1A4, A2547, 1: 800	Sigma/Merck, Darmstadt, D.

#### 3.5.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Name	Bezeichnung/Verdünnung	Firma
Biot. goat-anti-rabbit	Vektor BA-1000, K3, 1:300	Sigma/Merck, Darmstadt, D.
Biot. goat-anti-mouse	Vektor BA-2000, K3, 1:300	Sigma/Merck, Darmstadt, D.

### 3.5.5 hergestellte Lösungen

angesäuertes Wasser:

0,5 % Essigsäure ad Aqua dest.

Hämatoxylinlösung nach Weigert:

Hämatoxylinlösung A ad Hämatoxylinlösung B

Paraformaldehyd-Vorratslösung (8%):

- + 800 mL Aqua bidest
- + 80g Paraformaldehyd
- + 2 Plättchen NaOH

+ 200 mL PBS-Gebrauchslösung

Paraformaldehyd-Verbrauchslösung (4%):

½ Paraformaldehyd-Vorratslösung  
+ ½ PBS-Stammlösung

PBS-Puffer (Stammlösung):

80 g NaCl ad 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 2g KCL ad 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS-Puffer (Gebrauchslösung):

100 mL PBS-Lösung ad 1000 mL Aqua bidest.

PBST-Puffer:

1mL Triton ad 100 mL PBS-Lösung ad 1000mL Aqua bidest.

Pikrofuchsinlösung:

ad 285 mL gesättigte, wässrige Pikrinsäure  
+ 15 mL einprozentige wässrige Säurefuchsinlösung  
+ 0,75 mL konzentrierte Salzsäure

Salzsäure-Ethanollösung

ad 2,7 mL 37 % Salzsäure : 1L 70 % Ethanol

Alle Pufferlösungen werden mit HCL oder NaOH auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### **3.5.6 Statistische Auswertung**

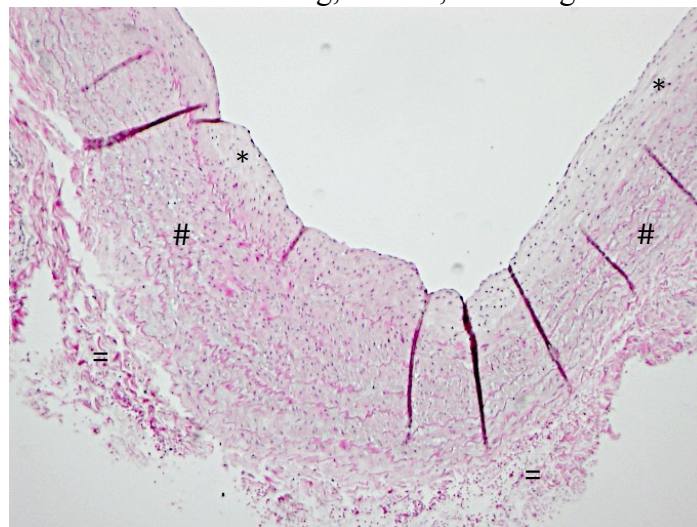
Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2011 (Microsoft Corp.) Die vorliegenden Diagramme und Tabellen wurden mit Excel 2011 (Microsoft Corp.) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Konventionelle Histologie

Die histologischen Präparate wurden mit dem biokulärem Mikroskop Axiovert 135 der Firma Carl Zeiss aus Jena untersucht. Hierfür wurden die erstellten histologischen Färbungen ausgewertet. Es handelt sich dabei um Gefäßproben von 50 Patienten. Jedem Patienten wurde ein Segment einer Pulmonalarterie und Pulmonalvene entnommen. Hierbei ergab sich eine Anzahl von insgesamt 100 HE-Färbungen und 100 Elastika van Gieson und 100 Sirius mit Resorcin-Fuchsin-Färbungen, die für diese Auswertungsreihe mit einbezogen worden sind. Bei der Untersuchung der Histologie wurde vor allem Augenmerk auf die Beschreibung der Gefäßmorphometrie gelegt. Im Folgenden wird der histomorphologische Aufbau der PA und PV beschrieben. Die Ergebnisse werden deskriptiv für die einzelnen Gefäßtypen beschrieben. Die Beschreibungsform orientiert sich an jeweils einer PA und PV. Diese Beschreibung des Gefäßaufbaus einer PA und PV steht stellvertretend für alle untersuchten PA und PV, die einen kontinuierlichen und homogenen Gefäßschichtaufbau zeigen. Diese konstante Gefäßmorphometrie zeigte sich in 58 % der untersuchten PA und PV. Die Färbungen von PA und PV zeigten den typischen Aufbau eines Gefäßes mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=) (s. Abb. 16 und 17). In der Tunica Media beider Gefäßarten befand sich der höchste Anteil an Kollagenfasern und glatten Muskelzellen.

Abb. 16: HE-Färbung, Arterie, 10 x vergrößert



typischer Aufbau eines Gefäßes mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

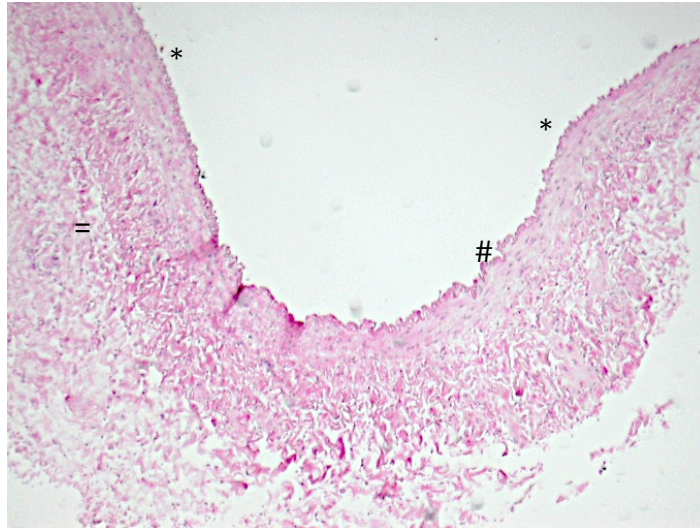


Abb. 17: HE-Färbung, Vene, 10 x vergrößert

typischer Aufbau eines Gefäßes mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

#### 4.1.1 Pulmonalarterien

In der lichtmikroskopischen Beurteilung fand sich für die PA in der HE-Übersichtsfärbung bei zehnfacher Vergrößerung ein nahezu einheitlicher strukturierter Gefäßaufbau mit den Gefäßschichten von luminal ausgehend: Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia (s. Abb 18). Zwischen der Tunica Intima und Tunica Media fand sich die wellenförmige ausgeprägte und rosafarben angefärbte Membrana elastica interna als Trennschicht. Zwischen der Tunica Media und Tunica Adventitia fand sich die ebenfalls wellenförmig und rosafarbende Membrana elastica externa. Die Membrana elastica interna ist im Vergleich zur Membrana elastica externa kompakter strukturiert und erscheint somit im Kaliber ausgeprägter. Eine Abgrenzung der Tunica Intima zur Tunica Media zeigt sich ausgeprägter als der Übergang zwischen der Tunica Media und Tunica Adventitia.



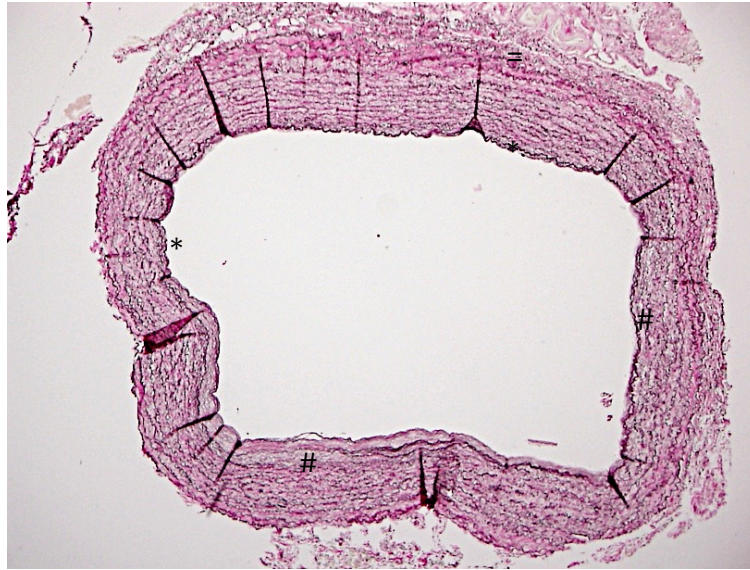


Abbildung 18: HE Färbung Arterie in Übersichtsaufnahme (2fache Vergrößerung)  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

In einigen Arterien ist eine exakte Abgrenzung zwischen der Tunica Media zur Tunica Adventitia hin nicht möglich. Hier wirkt der Übergang zwischen den beiden einzelnen Gefäßschichten fließend. Die Tunica Media präsentiert sich hell rosafarben. Die Zellkerne der glatten Muskelzellen sind in dieser Schicht überwiegend pallisadenartig verlaufend. Je nach Anschnittsebene lassen sich in dieser Schicht kollagene Faserzüge im Längs- und Querverlauf darstellen. Diese Faserzüge sind im Vergleich zur restlichen Umgebung stark rosa angefärbt. Die Anzahl und Dichte der blau angefärbten Zellkerne der glatten Muskelzellen nimmt nach peripher hin ab. Der pallisadenartige Verlauf der Zellkerne der glatten Muskelzellen hebt sich nach peripher auf und geht in eine ungleichmäßige und in der Anzahl abnehmender Zellverteilung über. Daran schließt sich die Membrana elastica externa (s. Abb. 19).

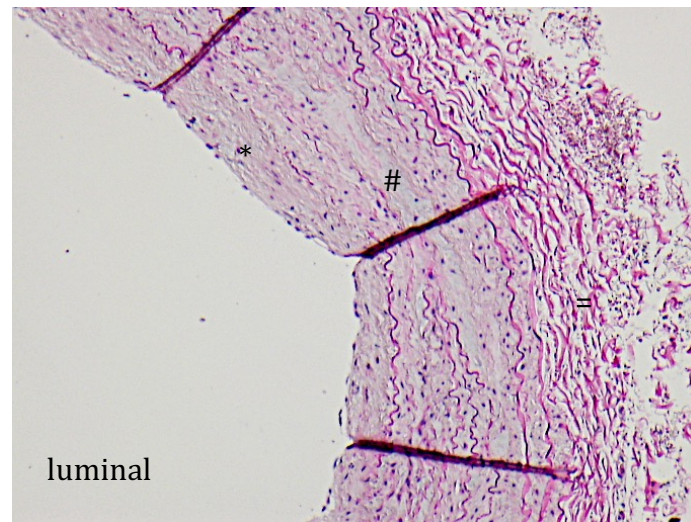


Abbildung 19: HE Färbung Arterie, 10 x vergrößert  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=) und Verstreichung des  
palissadenähnlichen Verlaufs der glatten Muskelzellen nach peripher

Weiter peripher liegt die Tunica Adventitia. In der Übersichtsvergrößerung wirkt die Strukturaufteilung der Tunica Adventitia im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Gefäßschichten aufgehoben. Zum einen ist diese Gefäßschicht im Vergleich zur Tunica Intima und Tunica Media weniger rosa angefärbt. Die Strukturverteilung der kollagenen Fasern ist ungeordneter und der Anteil der glatten Muskelzellen ist im Vergleich zur Tunica Media reduzierter. Hier scheinen die blau angefärbten Zellkerne der glatten Muskelzellen unwillkürlich und in größeren Abständen zueinander verteilt. In der Tunica Adventitia sind Anschnitte von peripheren Venen und Arterien enthalten. Diese sind regelhaft mit einem einschichtigen Endothel ausgekleidet, deren plane Zellkerne längsförmig angeordnet sind. Diese in Vasa-Endothelschicht zeigt sich in unseren Präparaten kontinuierlich oder diskontinuierlich ausgekleidet (s. Abb. 20).

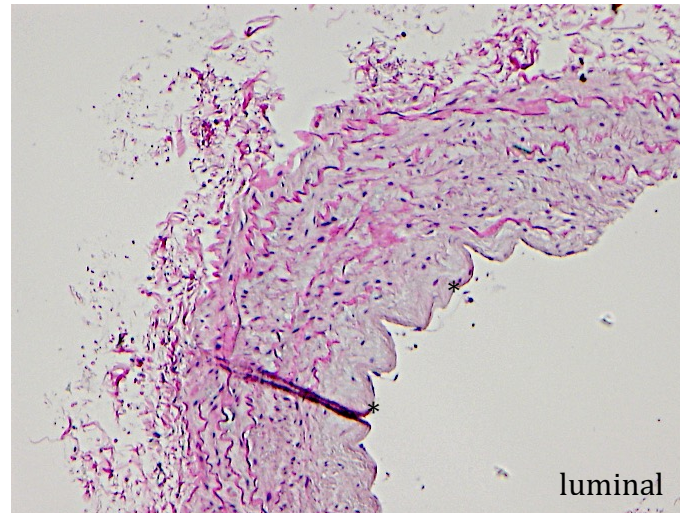


Abbildung 20: HE-Färbung Arterie, 10 x vergrößert  
mit kontinuierlicher Vasa-Endothelschicht (\*)

Je nach Gefäßkaliber dieser peripheren Gefäße weisen diese eine eigene Gefäßschichtstrukturierung mit Tunica Intima und Tunica Media auf. Eine Abgrenzung einer Tunica Adventita dieser peripheren Gefäße zur Tunica Adventitia der Segmentpulmonalarterie scheint nicht immer eindeutig möglich. Hier wirkt der Übergang dieser beiden Gefäßschichten oft ineinanderfließend. Singuläre Anschnitte von Lymphgefäßen lassen sich vereinzelt sichtbar in der Tunica Adventitia darstellen. Bei der vergrößerten Betrachtung der PA mit dem 40er Objektiv (s. Abb. 21) zeigt sich die Tunica Intima mit einem einschichtigen, unbeschädigten und kontinuierlich ausgekleideten Plattenendothel mit bläulich langgezogenen Zellkernen. Unterhalb dieser dünnen Endothelschicht lässt sich eine dünne bläulich-weislich schimmernde Schicht mit einzelnen leicht hellrosa angefärbten wellenförmig verlaufenden kollagen Fasern darstellen. Diese Schicht gehört zur extrazellulären Matrix der Tunica Intima. Zwischen der Tunica Intima und Tunica Media ist die Membrana elastica interna an ihren hellrosa-angefärbten und kreisrunden zum Gefäßlumen verlaufenden kollagenen Fasern zu erkennen. Diese Fasern verlaufen dicht beieinanderliegend zirkulär umeinander. Der einzelne

Faserverlauf ist dabei deutlich nachvollziehbar. Die Schichtdicke der Membrana elastica interna ist im Vergleich zur Tunica Intima und Tunica Media im Kaliber schmal wirkend. An dieser Schicht schließt sich die Tunica Media. In dieser Schicht verlaufen die zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen. Ihre Zellkerne sind bläulich langgezogen und verlaufen zirkulär gerichtet zum Gefäßlumen. Ihr Zytoplasma ist hellrosa angefärbt. Zwischen den zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen sind Anschnitte von kollagenen Fasern in unterschiedlichen Richtungsverläufen aufzufinden. Je nach Anschnittsebene schimmern diese hell-bläulich im Kontrast zu den rosa angefärbten glatten Muskelzellen. Die Tunica muscularis ist in ihrer Gesamtheit kontinuierlich vielschichtig und basig-konzentrisch. An ihr schließt sich die Membrana elastica externa. Wie die Membrana elastica interna verläuft die Membrana elastica externa auch zirkulär zum Gefäßlumen. Ihre wellenförmigen kollagenen Fasern schimmern hellrosa. Die Schichtdicke der Membrana elastica externa ist im Vergleich mit der Schichtdicke der Membrana elastica interna dezent er ausgebildet. An ihr schließt sich die Tunica Adventitia. In dieser Gefäßschicht verlaufen vereinzelt kollagene Fasern, im Vergleich zu den kollagenen Fasern der Tunica muscularis distanzierter zueinander verlaufend um die in dieser Schicht liegenden glatten Muskelzellen und peripheren Blutgefäße, den Vasa privata dieser zu untersuchenden PA. Zu den Vasa privata gehören Anschnitte von kleinen Venen/Venolen und Arterien/Arteriolen. Die Arteriolen sind mit einem einschichtigen flachverlaufenden Plattenepithel ausgekleidet. Die Zellkerne sind blau angefärbt und verlaufen zirkulär zum Gefäßlumen der Arteriole. Die folgende Tunica muscularis der Arteriolen ist hellrosa und erscheint kontinuierlich in ihrem Verlauf zu ihren Gefäßlumen. Zwischen den beiden Gefäßschichten ist die Membrana elastica interna an ihrem wellenförmig-zirkulär verlaufenden Kollagenfasern zu erkennen.

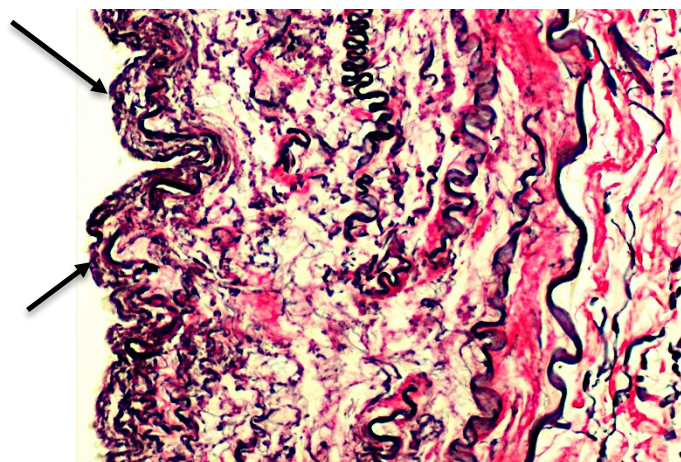


Abbildung 21: Sirius-Färbung mit Resorcin-Fuchsin-Färbung Arterie, 40 x vergrößert

Tunica Intima mit einschichtigen, unbeschädigten und kontinuierlich ausgekleideten  
Plattenendothel (Pfeil)

Die Tunica Adventitia der Arteriolen verschmilzt mit der Tunica Adventitia der zu untersuchenden PA. Eine klare Abtrennung zwischen diesen beiden Gefäßwandschichten der Gefäße zueinander ist nicht erkennen. Der Übergang ist oftmals fließend. Wie die Arteriolen, zeigen die Venolen, die in den Vasa privata in der Tunica Adventita der PA liegen, einen simultanen Aufbau. Ihre Tunica Intima ist mit einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Dieses Epithel verläuft zirkulär zum Gefäßlumen der Venole. Eine Membrana elastica interna ist durch ihre hellrosa-bläulich schimmernden kollagenen Faserzüge zu erkennen. Die Membrana elastica interna ist im Vergleich zu der Membrana elastica interna der Arteriolen dünnschichtiger ausgeprägt. Anhand ihrer Struktur ist die Membrana elastica interna deutlich als Abgrenzung zur nachfolgenden und zirkulär zum Gefäßlumen der Venole verlaufenden Tunica Muscularis abzugrenzen. Die Tunica Muscularis der Venole ist dünnschichtiger, als die Tunica Muscularis der Arteriolen in den Vasa privata. Deren glatten Muskelzellen verlaufen zirkulär. Eine Membrana elastica externa lässt sich nicht eindeutig abgrenzen. Auch hier ist der Verlauf der Tunica Muscularis der Venole zur Tunica Adventitia im Übergang fließend. Der Übergang der Tunica Adventitia der Venole zur Tunica Adventitia der PA ist fließend in ihrem Übergang. Zu den Vasa privata der PA zählt man Anschnitte von Lymphgefäßen. Diese sind mit einem diskontinuierlichen einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Zellenkörper wirken in ihrer Form kubisch bis backsteinartig. Die Zellkerne liegen Nahe an dem Lymphgefäßlumen.

#### **4.1.2 Pulmonalvenen**

In der lichtmikroskopischen Beurteilung fand sich für die PV in der HE-Übersichtsfärbung bei zehnfacher Vergrößerung ein nahezu einheitlicher strukturierter Gefäßaufbau mit den Gefäßschichten von luminal ausgehend: der Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia (s. Abb. 22). Zwischen der Tunica Intima und Tunica Media fand sich die wellenförmige ausgeprägte und rosafarben angefärbte Membrana elastica interna. Sie dient als Trennschicht zwischen diesen beiden Gefäßschichten. Zwischen der Tunica Media und Tunica Adventitia fand sich die ebenfalls die wellenförmig und rosafarbene Membrana elastica



externa. Die Membrana elastica interna ist im Vergleich zur Membrana elastica externa kompakter strukturiert und im Kaliber kräftiger wirkend ausgebildet.

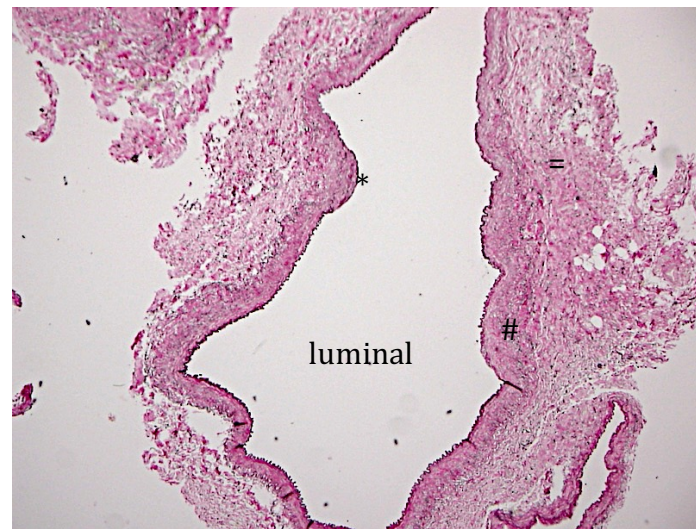


Abbildung 22: HE-Färbung Vene, 2x vergrößert  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

Eine Abgrenzung der Tunica Intima zur Tunica Media ist daher deutlicher als der Übergang zwischen der Tunica Media zur Tunica Adventitia. In einigen PV-Anschnitten ist eine exakte Abgrenzung zwischen der Tunica Media und Tunica Adventitia nicht möglich. Hier wirkt der Übergang zwischen den beiden einzelnen Gefäßschichten fließend. Die Tunica Media präsentiert sich hell rosafarben. Die Zellkerne der glatten Muskelzellen sind in dieser Schicht pallisadenartig verlaufend. Je nach Anschnittsebene lassen sich in dieser Schicht kollagene Faserzüge im Längs- und Querverlauf darstellen. Diese Faserzüge sind im Vergleich zur Umgebung stark rosa angefärbt. Die Anzahl und Dichte der blau angefärbten Zellkernen der glatten Muskelzellen scheint nach peripher hin in der Anzahl und Zelldichte zueinander abzunehmen (s. Abb. 23).

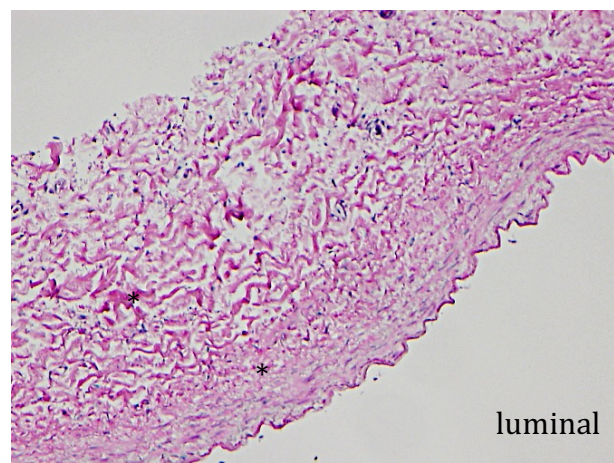
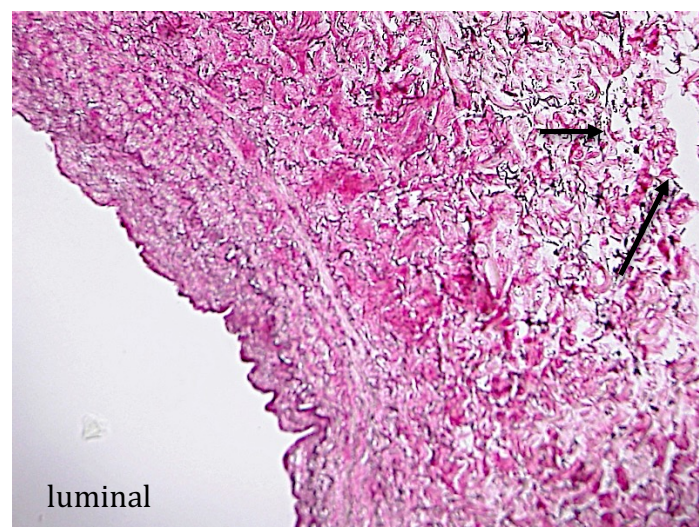


Abbildung 23: HE-Färbung Vene, 10 x Vergrößerung

Abnahme der glatten Muskelzellen nach peripher (\*)

Der pallisadenartige Verlauf der Zellkerne der glatten Muskelzellen zeigt sich nach peripher aufgelockert und scheint in eine ungleichmäßige Verteilung überzugehen. Es schließt sich folgend nach peripher die Membrana elastica externa an. Diese ist durch ihre zirkulär zum Gefäßlumen der PV verlaufenden kollagenen Faserzügen definiert. Weiter im Verlauf nach peripher zeigt sich die Tunica Adventitia. In der Übersichtsvergrößerung wirkt die Strukturaufteilung der Tunica Adventitia im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Gefäßschichten aufgehoben. Zum einen ist diese Gefäßschicht im Vergleich zur Tunica Media weniger rosa anfärbt und die Strukturverteilung der kollagenen Fasern ist ungeordneter und der Anteil der glatten Muskelzellen ist im Vergleich zur Tunica Media reduzierter. Hier scheinen die blau anfärbten Zellkerne der glatten Muskelzellen in größeren Abständen und unwillkürliche Lage zueinander zu liegen. In der Tunica Adventitia sind Anschnitte von peripheren Venen und Arterien enthalten. Diese sind regelhaft mit einem einschichtigen Endothel ausgekleidet, deren plane Zellkerne längsförmig angeordnet sind. Diese Endothelschicht erscheint kontinuierlich bis diskontinuierlich ausgekleidet. Je nach Gefäßkaliber dieser peripheren Gefäße weisen diese Gefäße eine eigene Gefäßschichtstrukturierung mit Tunica Intima und Tunica Media auf. Je größer das Gefäß der Vasa Privata der PV ausgeprägt ist, umso häufiger zeigt sich eine eigene Gefäßmorphometrie dieser Gefäße. Der Übergang Abgrenzung der Tunica Adventita dieser peripheren Gefäße zur Tunica Adventitia der Pulmonalvenenanschnitte erscheint fließend. Singuläre Anschnitte von Lymphgefäßen sind vereinzelt sichtbar (s. Abb 24).



24: HE-Färbung Vene, 20 x vergrößert  
Singuläre Anschnitte von Lymphgefäßen (Pfeile)

Bei der vergrößerten Betrachtung der PV mit dem 40er Objektiv zeigt sich die Tunica Intima mit einem einschichtigen, unbeschädigten und kontinuierlich ausgekleideten Plattenendothel mit bläulich langgezogenen Zellkernen (s. Abb. 25). Unterhalb dieser dünnen Endothelschicht lässt sich eine dünne bläulich-weisliche Schicht mit einzelnen leicht hellrosa angefärbten wellenförmig verlaufenden kollagen Fasern darstellen. Diese Schicht gehört zur extrazellulären Matrix der Tunica Intima. Zwischen der Tunica Intima und Tunica Media ist die Membrana elastica interna an ihren hellrosa-angefärbten und kreisrunden zum Gefäßlumen verlaufenden kollagenen Fasern zu erkennen. Diese Fasern verlaufen dicht beieinanderliegend zirkulär umeinander. Der einzelne Faserverlauf scheint dabei deutlich nachvollziehbar. Die Schichtdicke der Membrana elastica interna ist im Vergleich zur Tunica Intima und Tunica Media sehr schmal im Kaliber. An diese Schicht schließt sich die Tunica Media. In dieser Schicht verlaufen die zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen. Ihre Zellkerne sind bläulich langgezogen und verlaufen zirkulär gerichtet zum Gefäßlumen. Ihr Zytoplasma ist hellrosa angefärbt. Zwischen den zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen sind Anschnitte von kollagenen Fasern in unterschiedlichen Richtungsverläufen aufzufinden. Je nach Anschnittsebene schimmern diese hell-bläulich im Kontrast zu den rosa angefärbten glatten Muskelzellen. Die Tunica muscularis ist in ihrer Gesamtheit kontinuierlich vielschichtig und basig-konzentrisch. An ihr schließt sich die Membrana elastica externa an. Wie die zuvor beschriebene Membrana elastica interna verläuft die Membrana elastica externa zirkulär zum Gefäßlumen. Ihre welligförmigen kollagenen Fasern schimmern hellrosa.

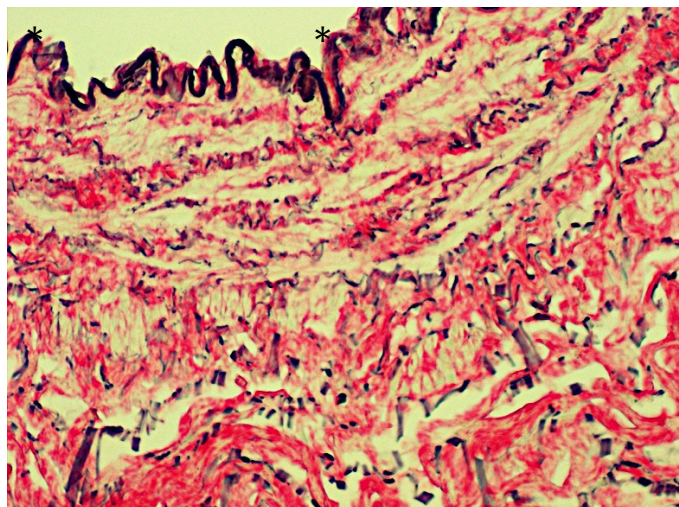




Abbildung 25: Sirius-Färbung mit Resorcin-Fuchsin-Färbung Vene, 40x vergrößert  
Tunica Intima mit einem einschichtigen, unbeschädigten und kontinuierlich ausgekleideten  
Plattenendothel (\*)

Die Schichtdicke der Membrana elastica externa ist dünner als die der Membrana elastica interna. An ihr schließt sich die Tunica Adventitia an. In ihr verlaufen kollagene Fasern, vereinzelte aber im Vergleich zur Tunica muscularis weiter voneinander entfernte glatte Muskelzellen sowie periphere Blutgefäße, der Vasa privata der PV. Den Vasa privata gehören Anschnitte von kleinen Venen/Venolen und Arterien/Arteriolen an. Die Arteriolen sind mit einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Zellkerne sind blau angefärbt und verlaufen zirkulär zum Gefäßlumen der Arteriole. Die folgende Tunica Muscularis der Arteriole ist hellrosa und verläuft kontinuierlich zum Gefäßlumen. Zwischen den beiden Gefäßschichten ist die Membrana elastica interna in ihren wellenförmig-zirkulär verlaufenden Kollagenfasern zu erkennen. Die Tunica Adventitia der Arteriole scheint mit der Tunica Adventitia der PV verschmolzen. Somit lässt sich keine Abtrennung dieser beiden Gefäßschichten zueinander erkennen. Der Übergang scheint fließend. Wie die Arteriolen der Vasa privata der PV, zeigen die Venolen der PV einen simultanen Aufbau. Ihre Tunica Intima ist mit einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Dieses verläuft zirkulär zum Gefäßlumen der Venole. Eine Membrana elastica interna ist durch ihre hellrosa-bläulich schimmernden kollagenen Fasern zu erkennen. Die Membrana elastica interna ist im Vergleich zu der Membrana elastica interna der Arteriolen dünnere ausgeprägt. Anhand ihrer Struktur ist diese deutlich als Abgrenzung zur nachfolgenden und zirkulär zum Gefäßlumen der Venole verlaufenden Tunica Muscularis abzugrenzen. Die Tunica Muscularis der Venole ist dünnere, als die Tunica Muscularis der Arteriolen. Ihre glatten Muskelzellen verlaufen kontinuierlich zirkulär. Eine Membrana elastica externa ist nicht klar abzugrenzen. Der Verlauf der Tunica Muscularis der Venole zur ihrer Tunica Adventitia erscheint im Übergang fließend. Der Übergang der Tunica Adventitia der Venole zur Tunica Adventitia der PV zeigt sich fließend und ist nicht eindeutig ersichtlich. Zur Vas privata der PV zählt man Anschnitte von Lymphgefäßen. Diese sind mit einem diskontinuierlichen einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Zellkörper wirken in ihrer Form kubisch bis backsteinartig. Die Zellkerne liegen Nahe am Lymphgefäßlumen.

### **4.1.3 Gefäßpathologien**

Der klassische Gefäßaufbau der untersuchten Gefäßarten ist bei histologisch unauffälligen Gefäßen homogen. Die Gefäßmorphometrie von homogen aufgebauten PA und PV aus 4.1.1 und 4.1.2 dient als Grundlage für die Ergebnisbeschreibung der nachfolgenden Gefäßveränderungen. Finden sich Veränderungen, so erscheint die klassische Gefäßmorphometrie verändert. Innerhalb der drei Gefäßschichten können in beiden Gefäßtypen Veränderungen beschrieben werden. So fanden sich in 42 % der angefertigten Gefäßschnitte Wandverdickungen und in 20 % der 100 angefertigten Gefäßpräparate artherosklerotische Ausprägungen.

#### **4.1.3.1 Pulmonalarterien**

##### **Intimaverdickungen**

Intimaverdickungen fanden sich in den angefertigten PA-Anschnitten in unterschiedlichen Ausprägungen (s. Abb. 26-28). Fand sich eine Verdickung, so änderte sich der homogene Strukturaufbau. Hierbei kommt es zu einer Verdickung der subendothelialen Matrix. Bei Gefäßanschnitten von mikroskopisch auffälligen PA ist die sonst strukturierte wellenförmigen zum Gefäßlumen verlaufende Endothelschicht im Verlauf weniger wellenförmig ausgeprägt und kontinuierlich ausgebildet. Ihre Zellkerne zeigen sich länglich-oval und liegen regelhaft zentral im Zellkörper. In den untersuchten PA mit Intimaverdickungen zeigt sich die Endothelschicht in ihrem Verlauf unruhiger und in ihrer Farbdichte abnehmend. Die Zellkerne sind eher zusammengepresst und entrundet und sie liegen dezentral zur Zellbasis ausgerichtet aufliegend. Die subendotheliale Matrix lässt sich in mikroskopisch unauffälligen PAs nur sehr dezent darstellen, da diese sehr dünn ausgeprägt ist. Ein leichter baulich-wirkender Rand direkt unterhalb der Endothelzellen lässt eine subendotheliale Matrix diskret darstellen. Bei den mikroskopisch auffälligen PA mit Intimaverdickungen lässt sich die extrazelluläre Matrix darstellen. Sie wirkt bauschig aufgetrieben und liegt direkt der Endothelschicht an. Mikroskopisch auffällig erscheinen Stellen, an denen die Endothelschicht marginal ausgeprägt ist. Hier ist die subendotheliale Matrix vermehrt ausgebildet. Bei der Betrachtung mit dem 40er

Objektiv fällt die kollagene Einlagerung in dieser veränderten Tunica Intima auf. Der Faserverlauf zeigt sich unregelmäßig aufgetrieben. Bei Erhöhung der Polarisation des einfallenden Mikroskoplichtes lässt sich der Faserverlauf der subendothelialen Matrix darstellen. Bei Gefäßanschnitten der PA mit besonders dicken Intimaverdickungen lassen sich einsprossende glatte Muskelzellen vereinzelt darstellen. Ihre Dichte und Anzahl scheint mit der Ausprägung der Intimaverdickung zuzunehmen. So ist bei PA mit einer geringer Intimaverdickung die Anzahl der glatten Muskelzellen in der Tunica Intima garnicht bis kaum vorhanden. Ist die Intimaverdickung ausgeprägter, so lassen sich vereinzelt glatte Muskelzellen nachweisen. Dies wird deutlich, wenn man HE und SMA-Färbungen der selben PA miteinander vergleicht. So zeigt sich bei starker Ausprägung der Verdickung der Tunica Intima eine Abgrenzung zur nachfolgenden Tunica Media aufgelöst. Der Übergang wirkt fließend und eine Abgrenzung durch die Membrana elastica interna aufgehoben.

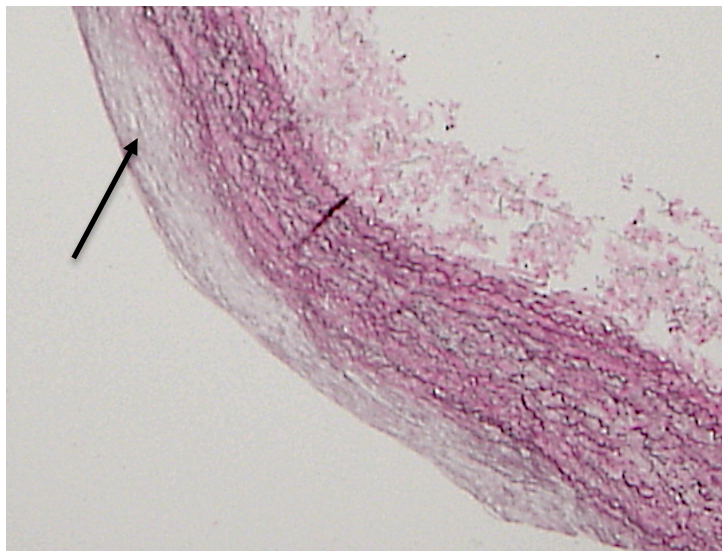


Abbildung 26: Intimaverdickung (Pfeil) Arterie, 20 x vergrößert

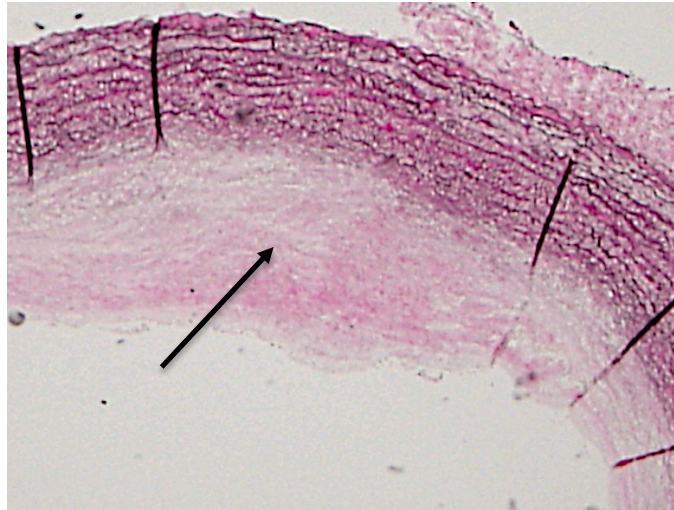


Abbildung 27: ausgeprägte Intimaveränderung (Pfeil) Arterie, 20 x vergrößert

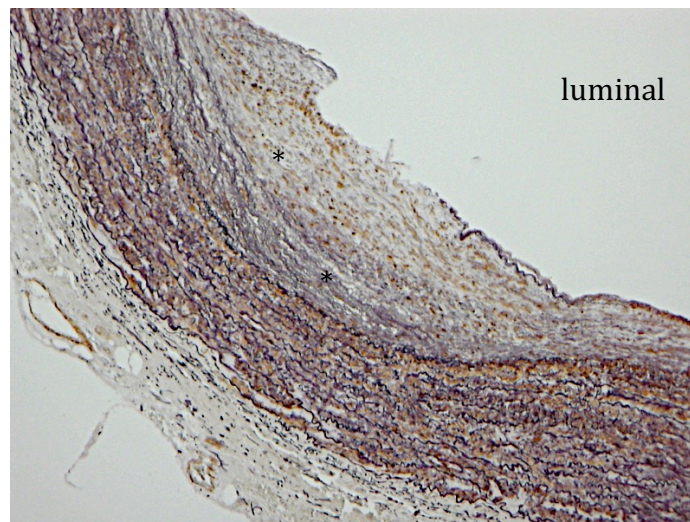


Abbildung 28: Intimaveränderung (\*) Arterie, SMA-Färbung, 20 x vergrößert

### Mediaverdickungen

Fand sich eine Verdickung der Tunica Media, so änderte sich der homogene Gefäßaufbau. Hierbei scheint es vermehrt zu einer Verdickung der Tunica Muscularis zu kommen. Bei mikroskopisch unauffälligen PA zeigt sich die Tunica Muscularis zirkumferent zum Gefäßlumen. Die Anordnung der glatten Muskelzellen war kontinuierlich. Diese Gefäßschichtung wirkt bei mikroskopisch auffälligen PA aufgehoben. Hier wirkt die Tunica Muscularis im Bereich der Verdickung aufgetrieben und die glatten Muskelzellen liegen nicht in einem zirkumferenten Verband zueinander (s. Abb. 29). Sie liegen in Verbundgruppen zueinander, denn die Dichte der blauangefärbten Zellkerne der glatten Muskelzellen im Bereich der Verdickung nimmt zu. Zwischen diesen Nestern von glatten Muskelzellen lässt sich in der

40er Vergrößerung ein erhöhter Anteil an kollagenen Fasern darstellen. Die Fasern zeigen einen unruhigen und inhomogenen Verlauf. Ist die Mediaverdickung besonders ausgeprägt, so scheint eine klare Abtrennung der einzelnen Gefäßschichten nicht mehr möglich. Die Tunica Intima und die Tunica Media sind nicht voneinander zu unterscheiden. Der Übergang zeigt sich fließend. Nachfolgend scheint die Ausprägung der Membrana elastica interna verschmälert bis aufgehoben. Die Ausprägung der Mediaverdickung kann die Tunica Adventitia mitbetreffen. So wirkt die Membrana elastica externa in ihrem Übergang verwaschen und der Übergang der verdickten Tunica Media zur angrenzenden Tunica Adventitia fließend.

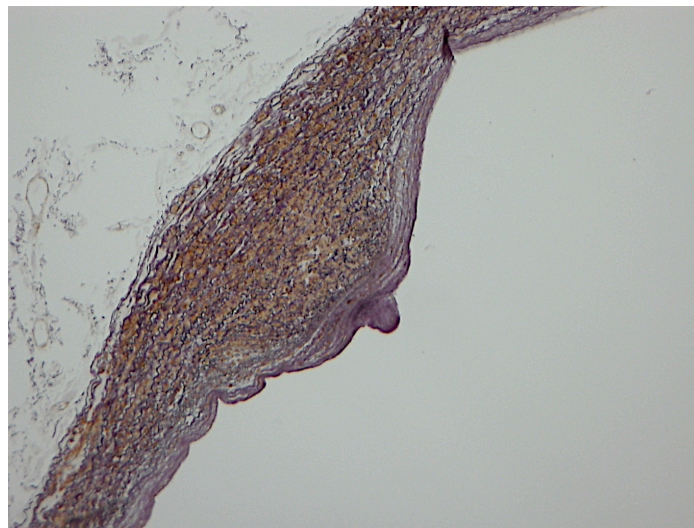


Abbildung 29:  $\alpha$ -SMA-Färbung Arterie, 10 x vergrößert  
Tunica muscularis im Bereich der Verdickung aufgetrieben;  
glatte Muskelzellen liegen nicht in einem zirkumferenten Verband zueinander

#### Adventitiaverdickungen und periphere Neovaskularisation

Die Verdickung der Tunica Adventitia lässt sich einerseits bei den untersuchten PA durch eine gesteigerte periphere Neovaskularisation beschreiben als auch durch eine gesteigerte Anzahl an glatten Muskelzellen in dieser Gefäßschicht. Die glatten Muskelzellen sind in ihrer Morphologie mit den glatten Muskelzellen der Tunica Muscularis identisch (s. oben). In verdickten Tunica Adventitia liegen sie streng vereinzelt zu einander oder in einer nesterähnlichen Anordnung. Ist die Tunica Intima verdickt, so kann die Tunica Adventitia mitbetroffen sein. Ist die Tunica Intima und Tunica Media verdickt, so ist die Tunica Adventitia auch verdickt. Scheinen alle drei Gefäßschichten von Veränderungen in Form von Verdickungen betroffen zu sein, scheint keine klare Abgrenzung der einzelnen Gefäßschichten



mikroskopisch zueinander möglich. Die periphere Neovaskularisation lässt sich mikroskopisch durch eine erhöhte Anzahl und Dichte der Gefäßanschnitte in der Tunica Adventitia beschreiben. Die Venolen und Arteriolen der Vasa Privata der PA zeigen eine veränderte Konfiguration. So wirkt ihre Endothelschicht verdichtet oder deren Tunica Muscularis verdickt (s. Abb. 30).



Abbildung 30: HE-Färbung Arterie mit Adventitiaverdickung (Pfeile) und Neovaskularisation (Sternchen), 10x vergrößert

## Fibrosen

In den PA-Gefäßschnitten zeigen sich mikroskopisch Fibrosen (s. Abb. 31). Diese können alle drei Gefäßschichten betreffen. Sie können isoliert in einer Gefäßschicht diktiert werden oder sich in ihrem Verlauf gefäßschichtübergreifend präsentieren. Im Bereich der Fibrose wirkt die HE-Färbung verwaschen und hebt sich deutlich von der übrigen Gefäßschichtfärbung, die rosa bis hellrosa ist, ab. Diese Fibrosebereiche sind dezent bis nicht angefärbt. In den betroffenen PA-Präparaten wirkt der fibrotische Bereich im Mikroskop durchsichtig. Lediglich der wellenförmige Verlauf der sich kreuzenden kollagenen Fasern lässt sich durch Polarisierung des Lichtes darstellen. Innerhalb einer Fibrose können glatte Muskelzellen in dieser eingelagert erscheinen. Diese Zellen zeigen sich in ihrem Verlauf langgezogen mit fingerförmigen Ausziehungen. Die Anzahl der glatten Muskelzellen innerhalb einer Fibrose kann erhöht sowie erniedrigt sein. Die Verteilung wirkt diskontinuierlich. In den untersuchten PA scheint bei

zunehmendem Fibrosegrad die Gefäßmorphometrie inhomogener. Eine deutliche Trennung der betroffenen einzelnen Gefäßschichten scheint nicht mehr möglich.

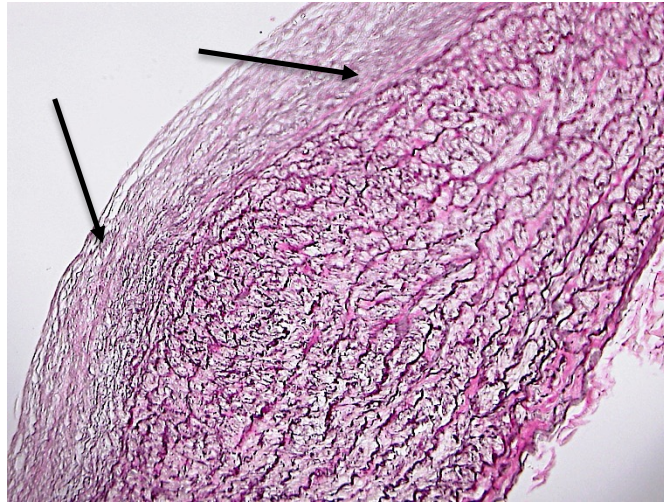


Abbildung 31: Sirius-Färbung Intimafibrose (Pfeile) Arterie, 10 x vergrößert

#### Präatherome, Atherome und Fibroatherome

In den untersuchten PA fanden sich Anschnitte und Vorstufen von Präatheromen, Atheromen und Fibroatheromen (s. Abb. 32 und 33). In der zehnfachen Übersichtsvergrößerung waren diese Gefäßschichtveränderungen prominent. Diese Veränderungen präsentieren sich in einer sich wiederholenden Konfiguration. Mikroskopisch ist hierbei die Veränderung der Tunica Intima auffällig. Diese scheint deutlich in ihrem Schichtaufbau verändert. So ist deren Endothelzellschicht massiv vergrößert oder gar nicht vorhanden. Eine Membrana elastica interna scheint komplett aufgebrochen und Zellen glatter Muskelzellen im dichten Verband mit vereinzelt im längs- und querverlauf folgenden kollagenen Fasern in die Tunica Intima eingewandert. In der Sirius-Färbung zeigt sich diese Strukturveränderung besonders ausgeprägt. In kugeligen Verbänden scheinen scharf abgrenzbar eingewanderte Kollagenfasernester. Bei Präatheromen scheint die Aufbrechung der Tunica Intima weniger massiv als bei einem ausgebildeten Atherom oder Fibroatherom. Die Tunica Media kann dabei

in ihrer Schichtdicke verändert sein. Bei voll ausgebildeten (Fibro)-Atheromen erscheint die Tunica Media verdickt. Mikroskopisch auffällig ist hier die Zunahme der Fibrozyten und Kollagenfasern. Die Tunica Media wirkt dabei in diesem veränderten Bereich dezentrier angefärbt. Es erscheint, als ob der Anteil der zuvor dort anzutreffenden glatten Muskelzellen reduziert ist und diese luminal in die Tunica Intima eingewandert seien. In den angefertigten  $\alpha$ -SMA-Färbungen lässt sich dieses mikroskopische Bild nachvollziehen. Hier sind die glatten Muskelzellen ein Bestandteil der Tunica Intima oder die beiden betroffenen Gefäßschichten erscheinen miteinander verschmolzen, sodass die vorherrschende Gefäßmorphometrie verändert sein kann.

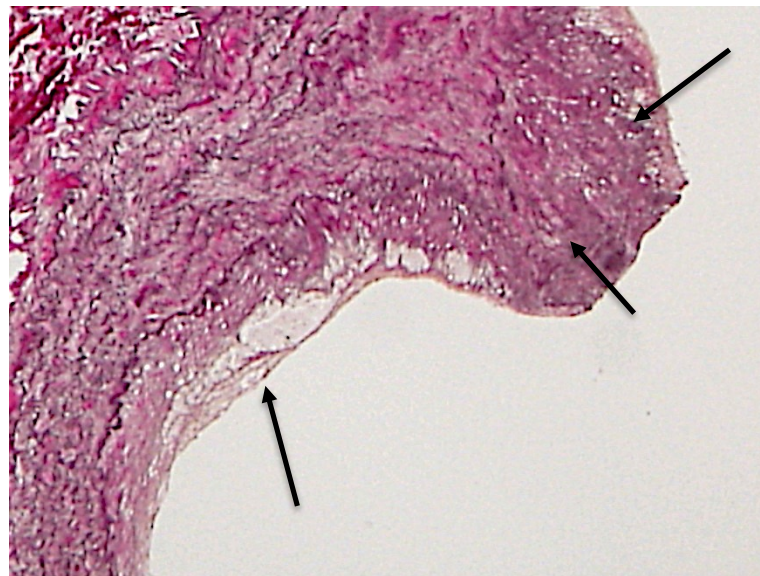


Abbildung 32: Sirius-Elastica-Färbung Arterie mit Atherom, 10 x vergrößert  
Pfeile markieren die in eingelagerten Schaumzellen innerhalb des Atheroms bei aufgehobener Gefäßwandmorphometrie mit für den für Atheromen typischen fibrotischen Einlagerungen.



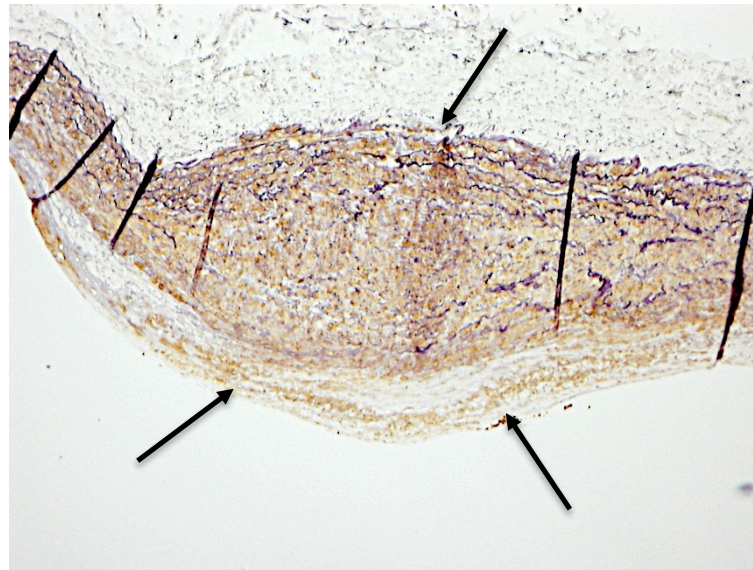


Abbildung 33:  $\alpha$ -SMA-Färbung Arterie mit Atherom, 10 x vergrößert

Die Pfeile markieren die Ausprägung des Atheroms bei aufgehobener Gefäßmorphometrie bei fehlender Unterscheidung zwischen den einzelnen Gefäßwänden.

#### 4.1.3.2 Pulmonalvenen

##### Intimaverdickungen

Intimaverdickungen fanden sich in den angefertigten PV-Präparaten in unterschiedlichen Ausprägungen (s. Abb. 34 und 35). Fand sich eine Verdickung, so änderte sich der homogene Strukturaufbau. Hierbei kommt es zu einer Verdickung der subendothelialen Matrix. Bei Gefäßanschnitten von mikroskopisch auffälligen PV ist die sonst strukturierte wellenförmigen zum Gefäßlumen verlaufende Endothelschicht im Verlauf weniger wellenförmig ausgeprägt und kontinuierlich ausgebildet. Ihre Zellkerne zeigen sich länglich-oval und liegen regelhaft zentral im Zellkörper. In den untersuchten PV mit Intimaverdickungen zeigt sich die Endothelschicht in ihrem Verlauf unruhiger und in ihrer Farbdichte abnehmend. Die Zellkerne sind eher zusammengepresst und entrundet und sie liegen dezentral zur Zellbasis ausgerichtet aufliegend. Die subendotheliale Matrix lässt sich in mikroskopisch unauffälligen PVs nur sehr dezent darstellen, da diese sehr dünn ausgeprägt ist. Ein leichter baulich-wirkender Rand direkt unterhalb der Endothelzellen lässt eine subendotheliale Matrix diskret darstellen. Bei den mikroskopisch auffälligen PV mit Intimaverdickungen lässt sich die extrazelluläre Matrix darstellen. Sie wirkt bauschig aufgetrieben und liegt direkt der Endothelschicht an. Mikroskopisch auffällig erscheinen Stellen, an denen die Endothelschicht marginal ausgeprägt ist. Hier ist die subendotheliale Matrix vermehrt ausgebildet. Bei der Betrachtung mit dem 40er

Objektiv fällt die kollagene Einlagerung in dieser veränderten Tunica Intima auf. Der Faserverlauf zeigt sich unregelmäßig aufgetrieben. Bei Erhöhung der Polarisation des einfallenden Mikroskoplichtes lässt sich der Faserverlauf der subendothelialen Matrix darstellen. Bei Gefäßanschnitten der PV mit besonders dicken Intimaverdickungen lassen sich einsprossende glatte Muskelzellen vereinzelt darstellen. Ihre Dichte und Anzahl scheint mit der Ausprägung der Intimaverdickung zuzunehmen. So ist bei PV mit einer geringer Intimaverdickung die Anzahl der glatten Muskelzellen in der Tunica Intima nicht bis kaum vorhanden. Ist die Intimaverdickung ausgeprägter, so lassen sich vereinzelt glatte Muskelzellen nachweisen. Dies wird deutlich, wenn man HE und SMA-Färbungen der selben PV miteinander vergleicht. So zeigt sich bei starker Ausprägung der Verdickung der Tunica Intima eine Abgrenzung zur nachfolgenden Tunica Media aufgelöst. Der Übergang wirkt fließend und eine Abgrenzung durch die Membrana elastica interna aufgehoben.

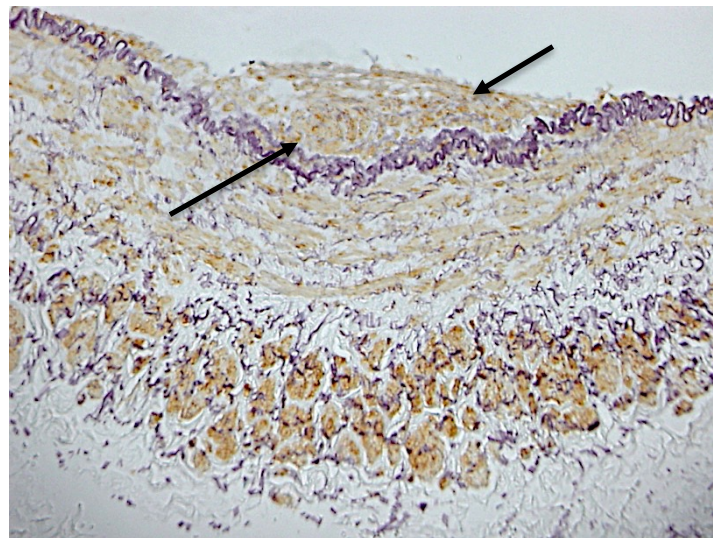


Abbildung 34:  $\alpha$ -SMA-Färbung Intimaverdickung (Pfeile) Vene, 20 x vergrößert

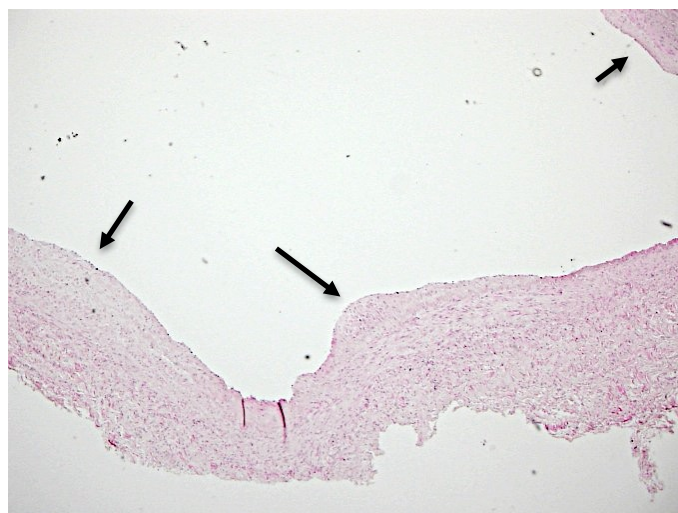


Abbildung 35: HE-Färbung Intimaverdickung (Pfeile) Vene, 10 x vergrößert

### Mediaverdickungen

Fand sich eine Verdickung der Tunica Media, so änderte sich der homogene Gefäßaufbau. Hierbei scheint es vermehrt zu einer Verdickung der Tunica Muscularis zu kommen. Bei mikroskopisch unauffälligen PV zeigt sich die Tunica Muscularis zirkumferent zum Gefäßlumen. Die Anordnung der glatten Muskelzellen war kontinuierlich. Diese Gefäßschichtung wirkt bei mikroskopisch auffälligen PV aufgehoben. Hier wirkt die Tunica Muscularis im Bereich der Verdickung aufgetrieben und die glatten Muskelzellen liegen nicht in einem zirkumferenten Verband zueinander (s. Abb. 36). Sie liegen in Verbundgruppen zueinander, denn die Dichte der blauangefärbten Zellkerne der glatten Muskelzellen im Bereich der Verdickung nimmt zu. Zwischen diesen Nestern von glatten Muskelzellen lässt sich in der 40er Vergrößerung ein erhöhter Anteil an kollagenen Fasern darstellen. Die Fasern zeigen einen unruhigen und inhomogenen Verlauf. Ist die Mediaverdickung besonders ausgeprägt, so scheint eine klare Abtrennung der einzelnen Gefäßschichten nicht mehr möglich. Die Tunica Intima und die Tunica Media sind nicht voneinander zu unterscheiden. Der Übergang zeigt sich fließend. Nachfolgend scheint die Ausprägung der Membrana elastica interna scheint verschmälert bis aufgehoben. Die Ausprägung der Mediaverdickung kann die Tunica Adventitia mitbetreffen. So erscheint die Membrana elastica externa in ihrem Übergang verwaschen und der Übergang der verdickten Tunica Media zur angrenzenden Tunica Adventitia fließend.

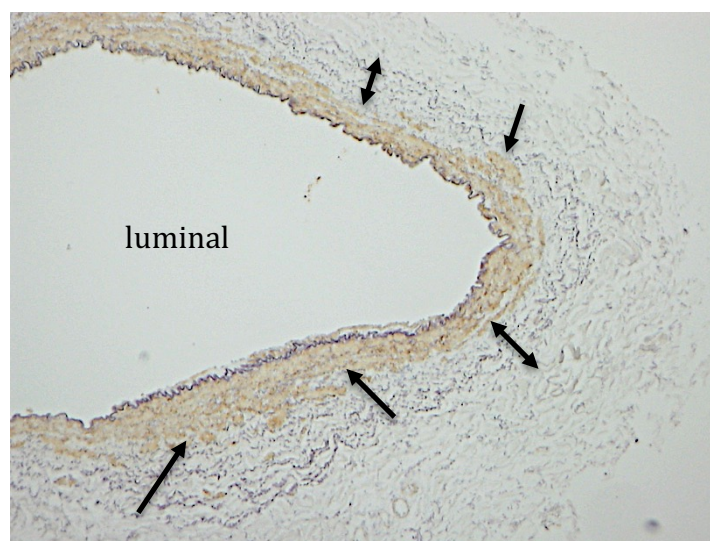


Abbildung 36: SMA-Färbung Mediaverdickung Vene, 10 x vergrößert

Pfeile markieren den Bereich des zirkumferentenfreien Verlaufs der glatten Muskelzellen innerhalb der Tunica Media bei Veränderungen der Gefäßmorphometrie. Doppelpfeile zeigen den Verlauf bei homogener Zirkumferenz.

Adventitiaverdickungen und periphere Neovaskularisation

Die Verdickung der Tunica Adventitia lässt sich einerseits bei den untersuchten PV durch eine gesteigerte periphere Neovaskularisation beschreiben als auch durch eine gesteigerte Anzahl an glatten Muskelzellen in dieser Gefäßschicht. Die glatten Muskelzellen sind in ihrer Morphologie mit den glatten Muskelzellen der Tunica Muscularis identisch (s. Abb. 37). In verdickten Tunica Adventitia liegen sie streng vereinzelt zu einander oder in einer nesterähnlichen Anordnung. Ist die Tunica Intima verdickt, so kann die Tunica Adventitia mitbetroffen sein. Ist die Tunica Intima und Tunica Media verdickt, so ist die Tunica Adventitia auch verdickt. Scheinen alle drei Gefäßschichten von Veränderungen in Form von Verdickungen betroffen zu sein, scheint aller keine klare Abgrenzung der einzelnen Gefäßschichten mikroskopisch zueinander möglich. Die periphere Neovaskularisation lässt sich mikroskopisch durch eine erhöhte Anzahl und Dichte der Gefäßanschnitte in der Tunica Adventitia beschreiben. Die Venolen und Arteriolen der Vasa Privata der PV zeigen eine veränderte Konfiguration. So wirkt ihre Endothelschicht verdichtet oder deren Tunica Muscularis verdickt. In 28 % der PV konnten glatte Muskelzellen als abgegrenzte Zellinseln (SMA-positiv) in derer Tunica Adventitia nachgewiesen werden. Diese Zellinseln waren größer, je stärker die zugehörige Media schien (s. Abb. 38).



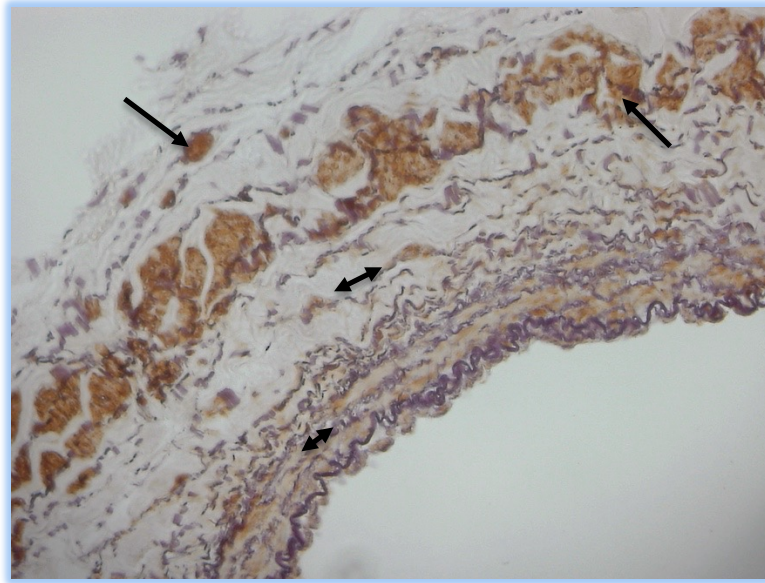


Abbildung 37:  $\alpha$ -SMA-Färbung Vene, 20 x vergrößert

Pfeile markieren glatte Muskelzellen der Tunica Adventitia.

Doppelpfeile markieren glatte Muskelzellen in Tunica Muscularis und Tunica Intima.

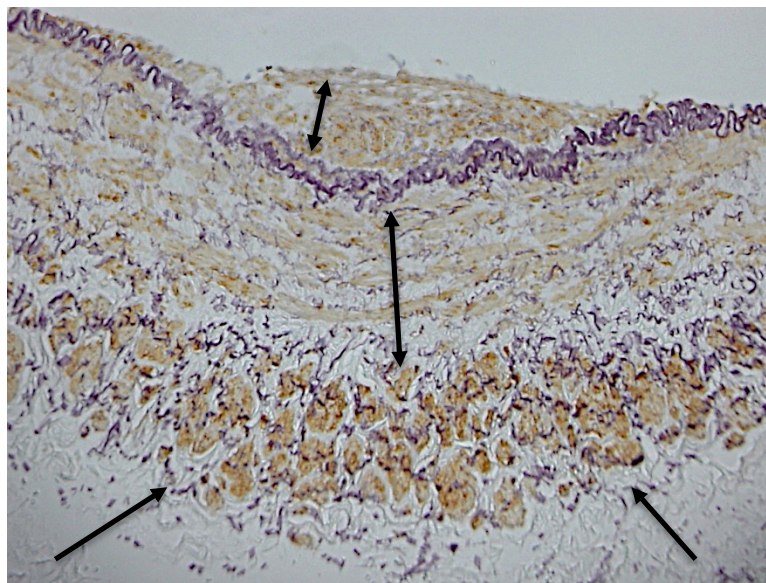


Abbildung 38:  $\alpha$ -SMA-Färbung Vene Zellformation Adventitia, 10 x vergrößert

Pfeile markieren gesteigerte Zellinselanzahl bei verbreiteter Tunica Intima und Media.

Doppelpfeile markieren Gefäßwandverdickungen

Fibrosen

In den PV-Gefäßschnitten zeigen sich mikroskopisch Fibrosen. Diese können alle drei Gefäßschichten betreffen. Sie kommen isoliert in einer Gefäßschicht diktiert werden oder sich in ihrem Verlauf gefäßschichtübergreifend präsentieren. Im Bereich der Fibrose wirkt die Färbung verwaschen und hebt sich deutlich von der übrigen Gefäßschichtfärbung, die rosa bis hellrosa ist, ab. Diese Fibrosebereiche sind dezent bis nicht angefärbt. In den betroffenen PV-Präparaten wirkt der fibrotische Bereich im Mikroskop durchsichtig (s. Abb. 39). Lediglich der wellenförmige Verlauf der sich kreuzenden kollagenen Fasern lässt sich durch Polarisierung des Lichtes darstellen. Innerhalb einer Fibrose können glatte Muskelzellen in dieser eingelagert erscheinen. Diese Zellen zeigen sich in ihrem Verlauf langgezogen mit fingerförmigen Ausziehungen. Die Anzahl der glatten Muskelzellen innerhalb einer Fibrose kann erhöht sowie erniedrigt sein. Die Verteilung wirkt diskontinuierlich. In den untersuchten PV scheinen bei zunehmenden Fibrosegrad, die Gefäßmorphometrie inhomogener. Eine deutliche Trennung der betroffenen einzelnen Gefäßschichten scheint nicht mehr möglich.

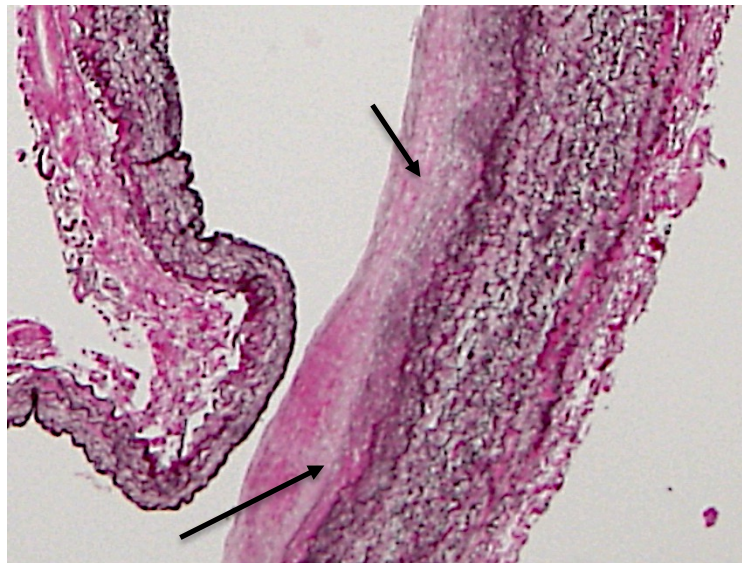


Abbildung 39: Sirius-Elastica-Färbung Vene Fibrose; 10x vergrößert  
Die Pfeile markieren den fibrotischen Bereich.

## 4.2 Immunhistochemische Untersuchungen

### 4.2.1 ETA-Rezeptor

Der ETA-Rezeptor zeigte sich sowohl in PA als auch in PV in jeder Gefäßschicht. Beide Gefäßarten hatten für diesen Rezeptor ein ähnliches Anfärbeverhalten. Die höchste Rezeptordichte lag vor allem in der Tunica Intima und Tunica Media vor. Der ETA-Rezeptor in PA konnte etwas ausgeprägter dargestellt werden. Zeigten die Gefäße einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich deren Rezeptordichte homogen verteilt.

#### 4.2.1.1 Pulmonalarterien

In den angefertigten humanen Gefäßschnitten der ETA-Rezeptorenfärbungen der PA zeigen diese ein Rezeptorvorkommen im Bereich der Tunica Intima (in Endothelzellen) und in der Tunica Muscularis (an glatten Muskelzellen). Vereinzelt zeigen PA in der Tunica Adventitia und Vasa vasorum ein Rezeptorvorkommen (s. Abb. 40).

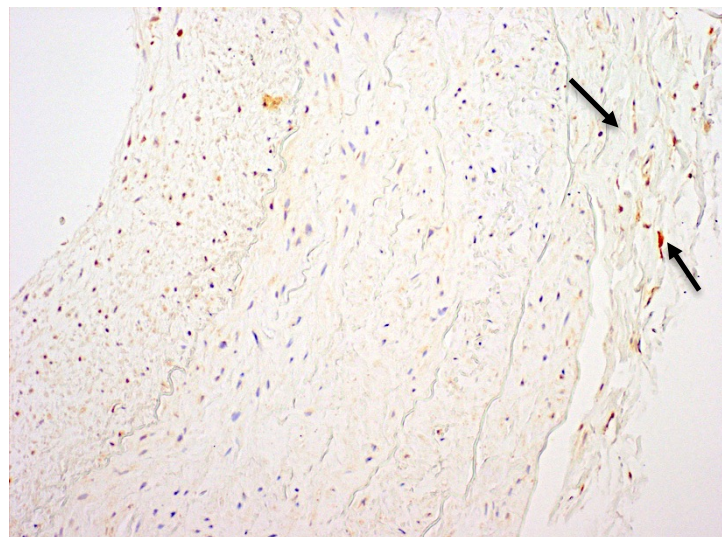


Abbildung 40: Arterie ETA-Rezeptor, 20 x vergrößert

Die Pfeile zeigen auf eine dezente Rezeptorpositivität in der Tunia Adventitia

Der ETA-Rezeptor konnte in jeder Gefäßschicht der PA dargestellt werden. Die Rezeptordichte zeigte sich in der Tunica Intima und Tunica Media am höchsten. Zeigten die Gefäße einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich deren Rezeptordichte homogen. Hier stellten sich vor



allein die Tunica Intima und Tunica Media positiv (++) da. Während in der Tunica Adventitia keine (0) bis schwache (+) Rezeptordichten festgestellt werden konnte.

#### 4.2.1.2 Pulmonalvenen

In den angefertigten humanen Gefäßschnitten der ETA-Rezeptorenfärbungen der PV zeigen diese ein Rezeptorvorkommen im Bereich der Tunica Intima (in Endothelzellen) und in der Tunica Muscularis (an glatten Muskelzellen). Vereinzelt zeigten PV in der Tunica Adventitia und Vasa vasorum ein Rezeptorvorkommen (s. Abb. 41).

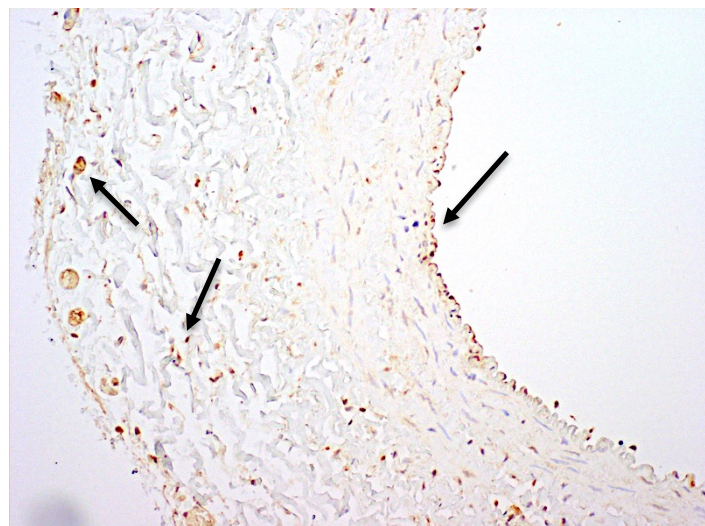


Abbildung 41: Vene ETA-Rezeptor, 10 x vergrößert  
Pfeile markieren die angefärbten ETA-Rezeptorgebiete

Der ETA-Rezeptor konnte in jeder Gefäßschicht der PV dargestellt werden. Die Rezeptordichte zeigte sich in der Tunica Intima und Tunica Media am höchsten. Zeigten die Gefäße einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich die ETA-Rezeptorenverteilung homogen. Hier stellten sich vor allem die Tunica Intima und Tunica Media positiv (++) da. Während in der Tunica Adventitia keine (0) bis eine schwache (+) Rezeptordichte festgestellt werden konnte.



#### 4.2.1.3 Gefäßveränderungen

Die Rezeptordichte wurde durch Veränderungen der Gefäßstruktur beeinflusst. Zeigte sich der strukturierte Gefäßaufbau in seiner Morphometrie verändert, so hatte dies einen Einfluss auf die Rezeptorendichte.

##### Intimaverdickungen

Bei Intimaverdickungen war die homogene Rezeptorkonfiguration eine andere. So zeigte sich die ETA-Rezeptorendichte in der Tunica Media schwächer (+ bis ++) und es ließ sich eine erhöhte Rezeptordichte (+++) in der Tunica Intima nachweisen. Die Rezeptoren schienen sich in diesen Inseln zu versammeln.

##### Fibrose

Zeigten sich in den Gefäßschichten Veränderungen im Sinne einer Fibrose, so schien sich die Rezeptorendichte zu sogenannten Clustern, also Rezeptornestern zu konfigurieren. Je stärker die fibrotische Veränderung erschien, umso höher zeigte sich die Anzahl und die Ausprägung der Rezeptorendichte innerhalb der Cluster.

##### Präatherome, Atherome und Fibroatherome

In den atherosklerotisch veränderten Gefäßen zeigte sich eine Veränderung in der Rezeptordichte (s. Abb. 42 und 43). In Präatheromen zeigten sich ein verstrichener histologischer Gefäßschichtaufbau, sodass eine Unterscheidung von Tunica Intima und Tunica Media fließend erschien. Hierbei zeigten sich keine angefärbten ETA-Rezeptoren in unmittelbarer Nähe zu den Schaumzellen (0). Wenn sich die Änderungen auf die Tunica Media erstreckten, erhöhte sich die ETA-Rezeptorendichte in den betroffenen Gebieten (+++), während sich die Rezeptorendichte in den umliegenden Teilen der Tunica Media, die mikroskopisch vor der Gefäßschichtveränderung lagen, erniedrigt erschien. Die Tunica Adventitia dieser betroffenen Gefäße zeigte sich ebenfalls von diesen Veränderungen beeinflusst. Es zeigte sich ein geringes (+) bis mittleres (++) ETA-Rezeptordichtesignal.

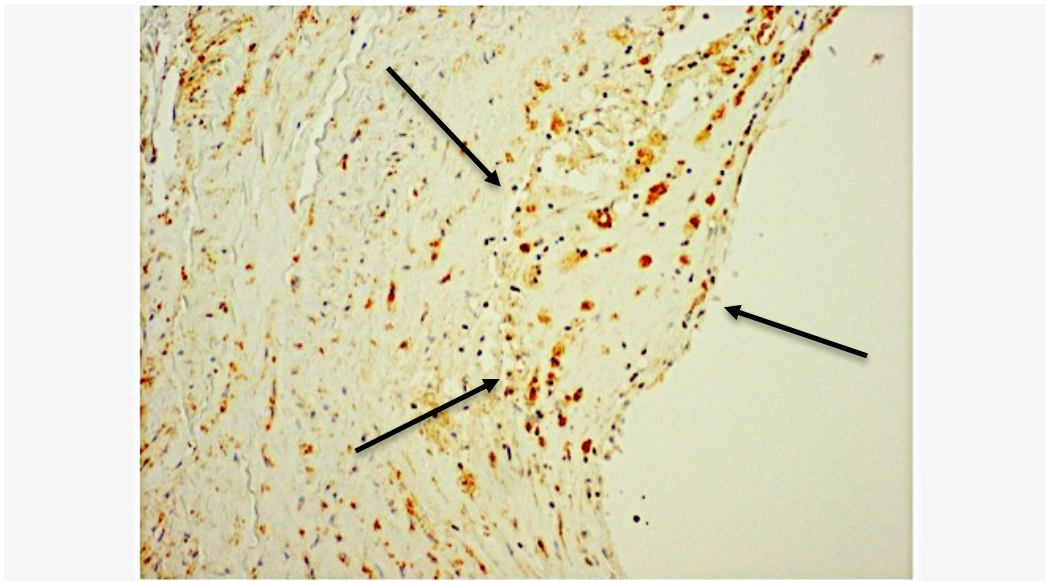


Abbildung 42: ETA-Rezeptorfärbung Arterie; Atherom (Pfeile) , 20 x vergrößert  
Die Pfeile markieren hierbei die gesamte Größe des Atheroms

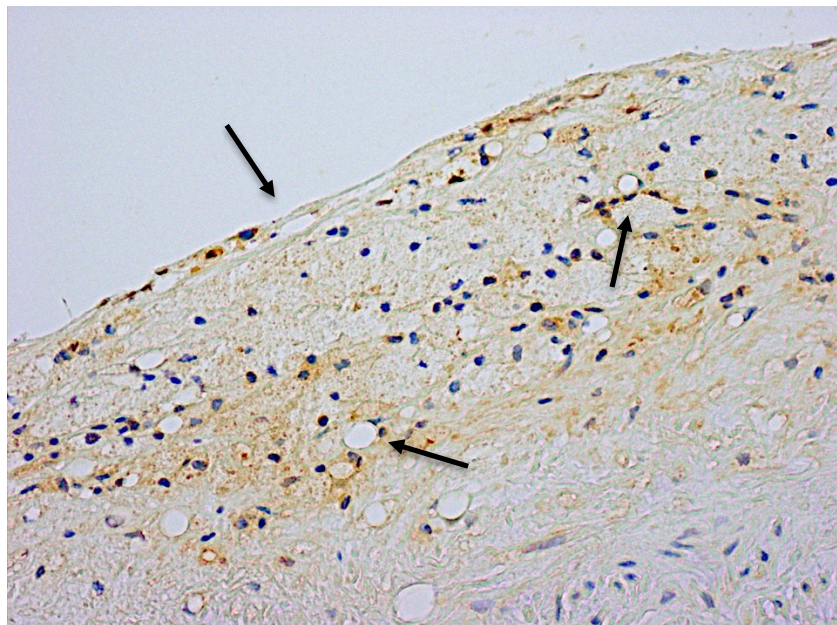


Abbildung 43: ETA-Färbung Arterie mit Präatherom.  
Intensitätsschwankungen der Rezeptordichte im Bereich eingelagerter Schaumzellen (Pfeile),  
40 x vergrößert

#### 4.2.2 ETB-Rezeptor

Der ETB-Rezeptor konnte in PA und PV mit homogener Gefäßmorphometrie in jeder Gefäßschicht dargestellt werden. Beide Gefäßarten zeigten für diesen Rezeptor ein ähnliches Anfärbeverhalten. Der Hauptanteil der höchsten Rezeptorendichte zeigte sich in der Tunica Intima (in Endothelzellen) und Tunica Media (an glatten Muskelzellen) In einigen PA auch in der Tunica Adventitia und Vasa vasorum. Im Vergleich konnte der ETB-Rezeptor in PA etwas positiver dargestellt werden.

##### 4.2.2.1 Pulmonalarterien

Zeigten die angefertigten humanen Gefäßschnitten der ETB-Rezeptorenfärbungen der PA mikroskopisch einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich deren Rezeptordichte Verteilung homogen. Diese war im Bereich der Tunica Intima (in Endothelzellen) und in der Tunica Muscularis (an glatten Muskelzellen) mittel (++) ausgeprägt. Während in der Tunica Adventitia keine (0) bis geringe (+) ausgeprägt Rezeptorendichte festgestellt werden konnte (s. Abb. 44).

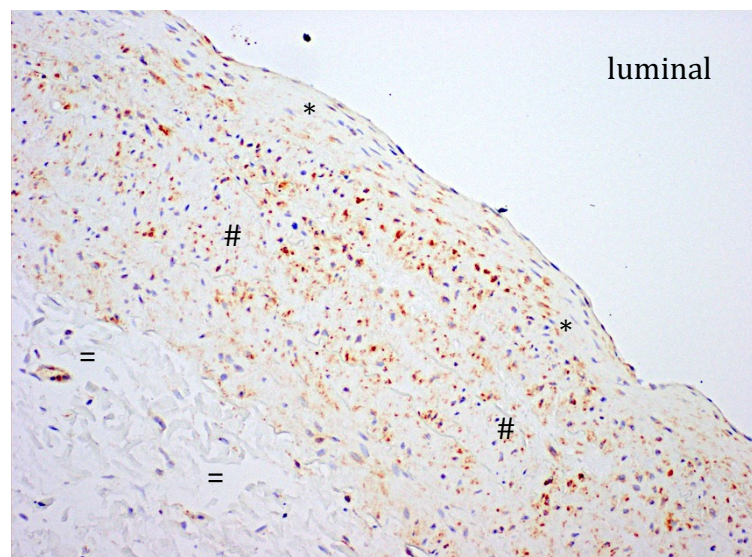
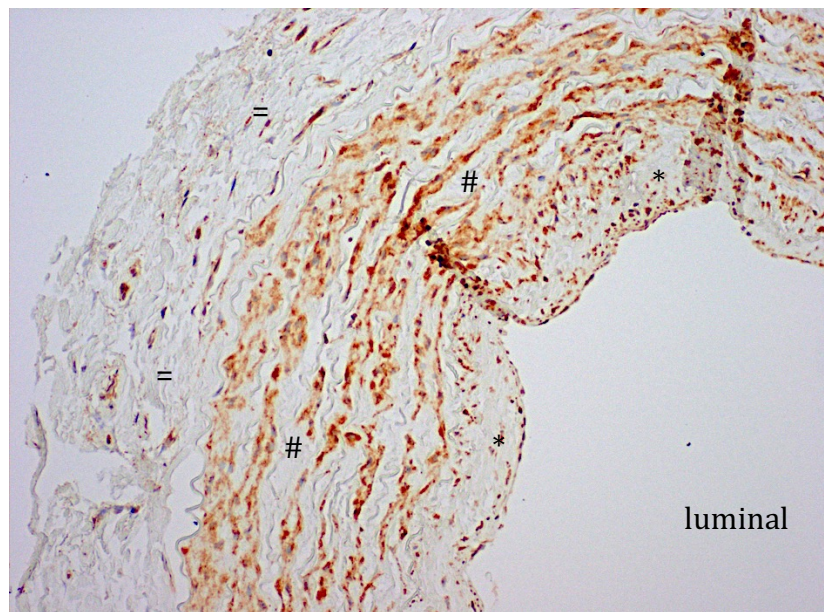


Abbildung 44: Arterie ETB-Rezeptor, 10 x vergrößert  
unterschiedlich ausgeprägte Rezeptorendichte in den Gefäßschichten  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

##### 4.2.2.2 Pulmonalvenen

In den angefertigten humanen Gefäßschnitten der ETB-Rezeptorenfärbungen der PV zeigten diese bei homogener Gefäßmorphometrie ein homogenes Rezeptorvorkommen im Bereich der

Tunica Intima (in Endothelzellen) und in der Tunica Muscularis (an glatten Muskelzellen). Vereinzelt stellten sich in den PV in der Tunica Adventitia und Vasa vasorum ein Rezeptorvorkommen dar. Der ETB-Rezeptor konnte in jeder Gefäßschicht der PV dargestellt werden. Die Rezeptordichte zeigte sich in der Tunica Intima und Tunica Media am höchsten. Zeigten die Gefäße einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich die ETB-Rezeptorenverteilung homogen. Hier stellten sich vor allem die Tunica Intima und Tunica Media mit einer mittleren Rezeptorendichte (++) dar. Während in der Tunica Adventitia keine (0) bis eine schwache (+) Rezeptorendichte festgestellt werden konnte (s. Abb. 45).



Abbildung

45: Vene

ETB-Rezeptor, 20 x vergrößert

unterschiedlich ausgeprägte Rezeptorendichte in den Gefäßschichten  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

#### 4.2.2.3 Gefäßveränderungen



Die ETB-Rezeptordichte wurde durch Veränderungen der Gefäßstruktur beeinflusst. Zeigte sich der strukturierte Gefäßaufbau in seiner Morphometrie verändert, so hatte dies einen Einfluss auf die Rezeptordichte.

#### Gefäßwandverdickungen

Bei Mediaaverdickungen war die homogene Rezeptorkonfiguration eine andere. So zeigte sich die ETB-Rezeptordichte in der Tunica Media schwächer (+ bis ++), und es ließ sich eine erhöhte Rezeptordichte (+++) in der Tunica Intima nachweisen. Die Rezeptoren schienen sich in Inseln zu versammeln (s. Abb. 46).

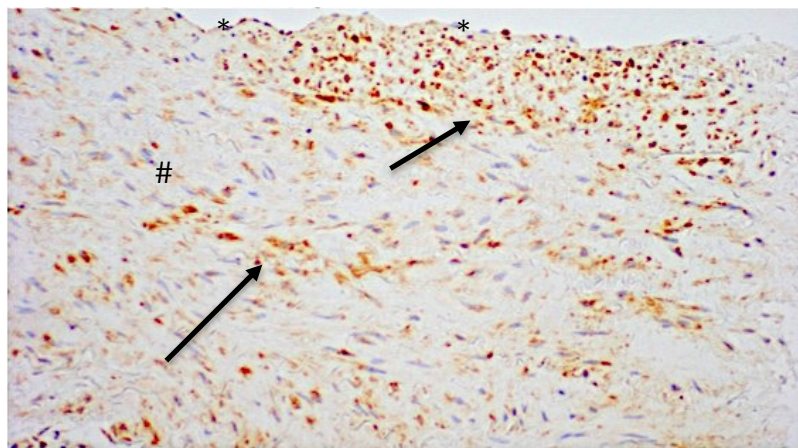


Abbildung 46: ETB-Rezeptor-Färbung, 20 x vergrößert

Rezeptordichteveränderung bei Mediaverdickung mit Inselbildung (Pfeil), 20 x vergrößert  
mit Tunica Intima (\*) und Tunica Media (#)

#### Fibrose

Zeigten sich in den Gefäßschichten Veränderungen im Sinne einer Fibrose, so schien sich die Rezeptorendichte zu sogenannten Clustern, also Rezeptornestern zu konfigurieren. Je stärker die fibrotische Veränderung erschien, umso höher zeigte sich die Anzahl und die Ausprägung der Rezeptorendichte innerhalb der Cluster (+++) (s. Abb. 47).

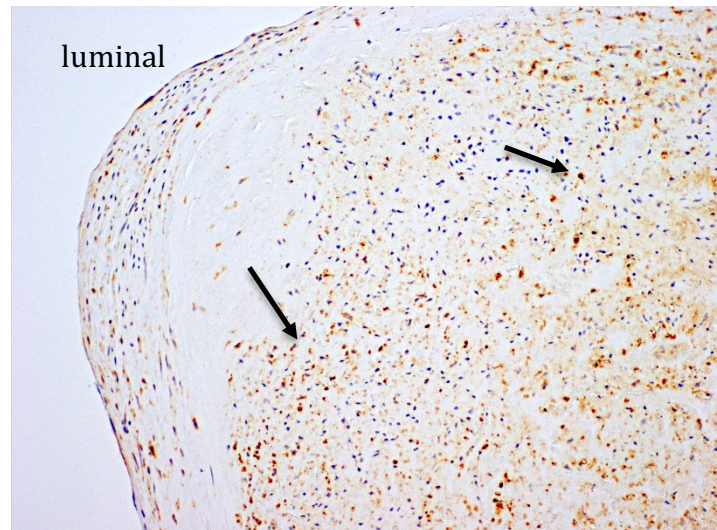


Abbildung 47: ETB-Färbung Vene, Fibrose, 10 x vergrößert  
Veränderung der Rezeptorendichte innerhalb der Cluster (Pfeil)

#### Präatherome, Atherome und Fibroatherome

In den atherosklerotisch veränderten Gefäßen zeigte sich eine Veränderung in der Rezeptordichte. In Präatheromen zeigten sich ein verstrichener histologischer Gefäßschichtaufbau, sodass ein Übergang von Tunica Intima und Tunica Media fließend erschien. Hierbei zeigten sich stark angefärbte ETB-Rezeptoren in unmittelbarer Nähe der Schaumzellen (++ bis +++) (s. Abb. 48). Diese ETB-Rezeptoren zeigten sich hier auch in Clustern liegend. Die Rezeptorendichte in der Tunica Media nahm im Bereich der Übergangszone vor dem (Prä-, Fibro-) Atherom von (++) zu (+) ab. Im Bereich der morphologischen Veränderungen der Tunica Media zeigt diese weiter eine erniedrigte Rezeptorendichte (+) und (0) an. Die Tunica Adventitia dieser betroffenen Gefäße zeigte sich ebenfalls von diesen Veränderungen beeinflusst. Es zeigte sich ein geringes (+) bis mittleres (++) ETB-Rezeptordichtesignal durch angeschnittene Arteriolen und Venolen, die in ihrer Anzahl erhöht erschienen.

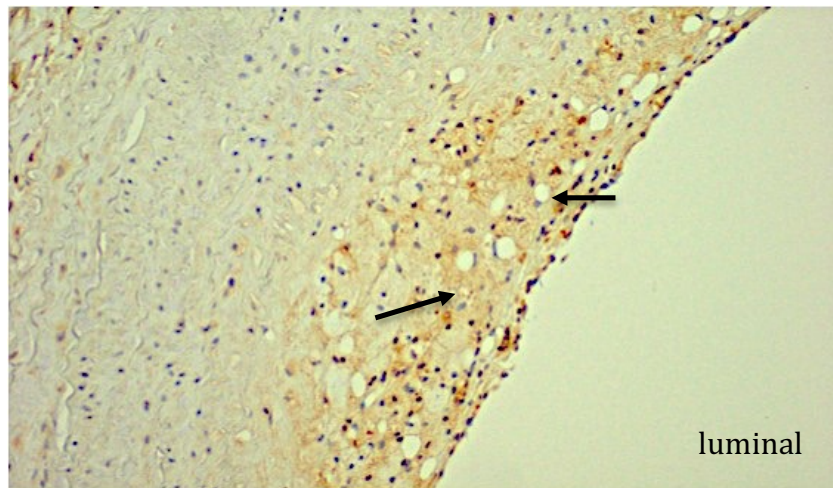


Abbildung 48: ETB-Rezeptor-Färbung Vene; 20 x vergrößert  
 Atherom und Veränderung der Rezeptorendichte stark angefärbte ETB-Rezeptoren in unmittelbarer Nähe der Schaumzellen (Pfeile)

### 4.2.3 PDE-5-A-Enzym

PDE-5-A konnte in PA und PV mit homogener Gefäßmorphometrie in jeder Gefäßschicht dargestellt werden. Beide Gefäßarten zeigten für dieses Enzym ein ähnliches Anfärbeverhalten. Der Hauptanteil der höchsten Enzymdichte zeigte sich in der Tunica Intima (in Endothelzellen) und Tunica Media (an glatten Muskelzellen) beider Gefäßarten. Im Vergleich zeigte sich PDE-5-A-Enzym in PA positiver.

#### 4.2.3.1 Pulmonalarterien

Zeigten die angefertigten humanen Gefäßschnitten der PDE-5-A-Enzym-Färbungen der PA mikroskopisch einen harmonischen Gefäßaufbau, zeigte sich deren Dichteverteilung homogen. Diese war im Bereich der Tunica Muscularis (an glatten Muskelzellen) mittel (++) bis stark (+++) ausgeprägt. Während sich in der Tunica Adventitia eine geringe (+) Rezeptorendichte zeigte. In der Tunica Intima konnte keine bis eine schwache Färbedichte festgestellt werden (0

bis +). Der PDE-5-A-Enzym zeigte sich in PA in allen Gefäßschichten. In der Tunica Media zeigte sich die höchste Enzymdichte (++ bis +++). In der Tunica Intima konnte keine bis eine geringe (0 bis +) sowie in der Tunica Adventitia keine bis schwache Positivität bewertet werden (0) bis (+) (s. Abb. 49).

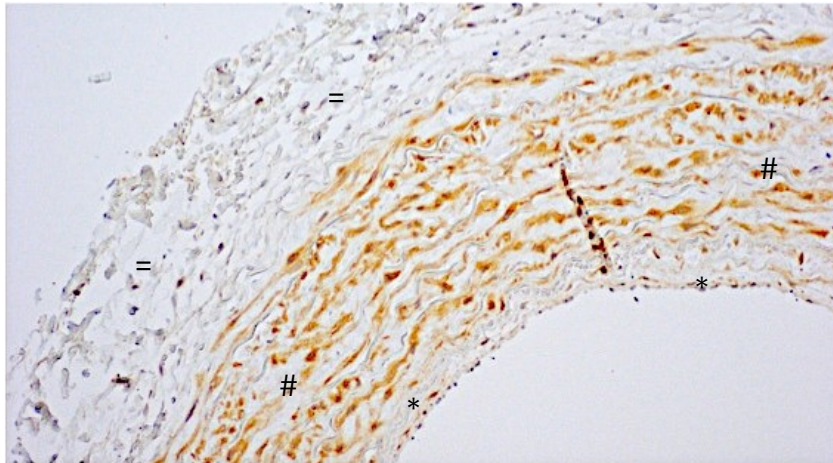


Abbildung 49: PDE-5A-Enzym-Färbung Arterie, 20x vergrößert  
unterschiedlich ausgeprägte Rezeptorendichte in den Gefäßschichten  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

#### 4.2.3.2 Pulmonalvenen

In den angefertigten humanen Gefäßschnitten der PDE-5-A-Enzymfärbungen der PV zeigen diese bei homogener Gefäßmorphometrie eine homogene Rezeptordichte. Im Bereich der Tunica Media (an glatten Muskelzellen) zeigte sich die höchste Rezeptorendichte (++ bis +++). In der Tunica Adventitia und Vasa vasorum zeigte sich keine bis geringe (0 bis +) ausgeprägte Rezeptorendichte. Die Rezeptordichte in der Tunica Intima zeigte eine ähnliche Verteilung der Rezeptoren mit (0) bis (+) (s. Abb. 50).





Abbildung 50: PDE-5A-Rezeptor-Färbung Vene, 20 x vergrößert  
unterschiedlich ausgeprägte Rezeptorendichte in den Gefäßschichten  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia(=)

#### 4.2.3.3 Gefäßveränderungen

##### Gefäßwandverdickungen

Zeigten sich Wandverdickungen, war die homogene Enzympositivitätskonfiguration verändert. So zeigte sich die PDE-5-A-Enzymdichte in der Tunica Media schwächer (+ bis ++), und es ließ sich eine erhöhte Enzymdichte (+++) in der Tunica Intima nachweisen. Die Targetenzyme schienen sich in Inseln zu versammeln (s. Abb. 51).

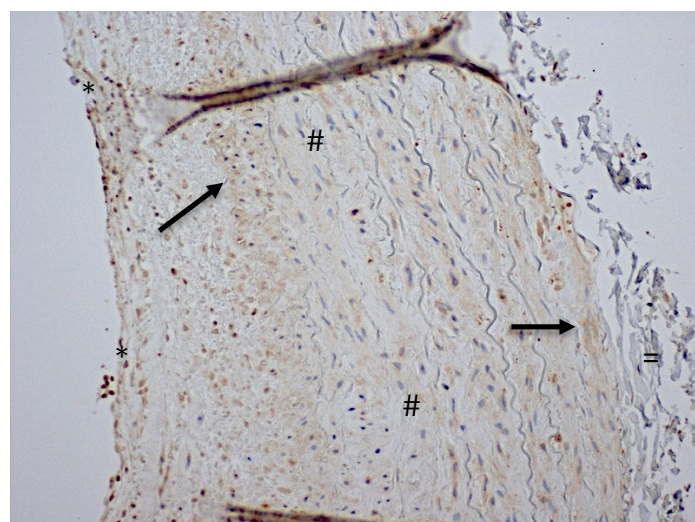


Abbildung 51: PDE-5-A-Enzymfärbung Arterie mit Intimaverdickung, 20 x vergrößert  
Targetenzyminseln (Pfeil) mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia(=)

## Fibrose

Zeigten sich in den Gefäßschichten Veränderungen im Sinne einer Fibrose, so schien sich die PDE-5-A-Enzymdichte innerhalb der Fibrose abzuschwächen. So zeigte sich diese garnicht bis schwach (0 bis +) auftretend. Im Umgebungsbereich der Fibrosen hingegen konnte eine erhöhte PDE-5-A-Enzymdichte (++) nachgewiesen werden (s. Abb. 52).

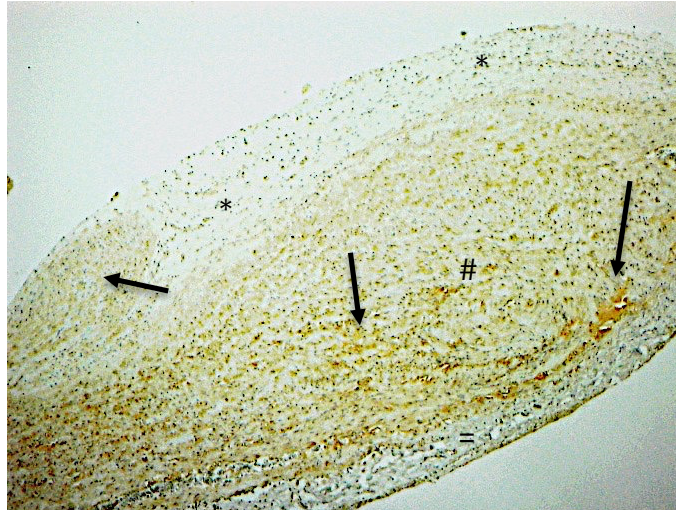


Abbildung 52: Arterie mit PDE-5-A-Enzymfärbung und Intimafibrose mit Clusterbildung in Tunica Intima und Tunia Media (Pfeil), 10 x vergrößert mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)

Zudem zeigte sich in PV bei Gefäßwandveränderungen in der Tunica Adventitia und im Bereich der Vasa vasorum PDE-5-A-Enzymdichten Clusterformationen. Diese zeigten sich in unterschiedlichen Ausprägungen. Je ausgeprägter die Fibrose war, umso mehr PDE-5-A-Enzym dichtere Areale zeigten sich (++ bis +++) (s. Abb. 53).

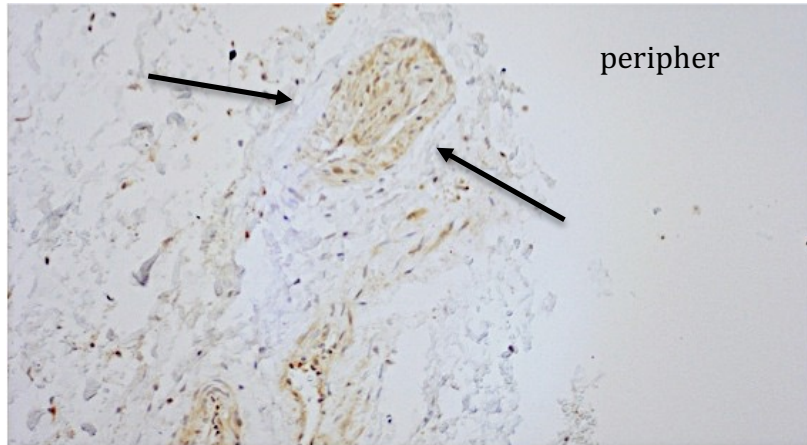


Abbildung 53: PDE-5A-Enzym-Färbung Vene, Nesterformationen im Vasa vasorum (Pfeil), 40 x vergrößert

#### Präatherome, Atherome und Fibroatherome

In den atherosklerotisch veränderten Gefäßen zeigte sich eine Veränderung in der Targetenzymdichte. In Präatheromen zeigten sich ein verstrichener histologischer Gefäßschichtaufbau, sodass ein Übergang von Tunica Intima und Tunica Media fließend erschien. Hierbei zeigten sich mittel bis stark angefärbte PDE-5-A-dichte Areale (++ bis +++). In unmittelbarer Nähe zu Schaumzellen zeigten sich keine Cluster oder verdichteten PDE-5-A-Zonen. In diesen Bereichen kam es eher zu einer Abnahme der Targetenzymdichte (+). Die Enzymdichte in der Tunica Media bleibt im Bereich der Übergangszone vor dem und im (Prä-,Fibro-) Atherom konstant (++) . Die Tunica Adventitia dieser betroffenen Gefäße zeigte sich ebenfalls von diesen Veränderungen beeinflusst. Es zeigte sich eine erhöhte (+ bis ++) Targetenzymdichte (s. Abb. 54).

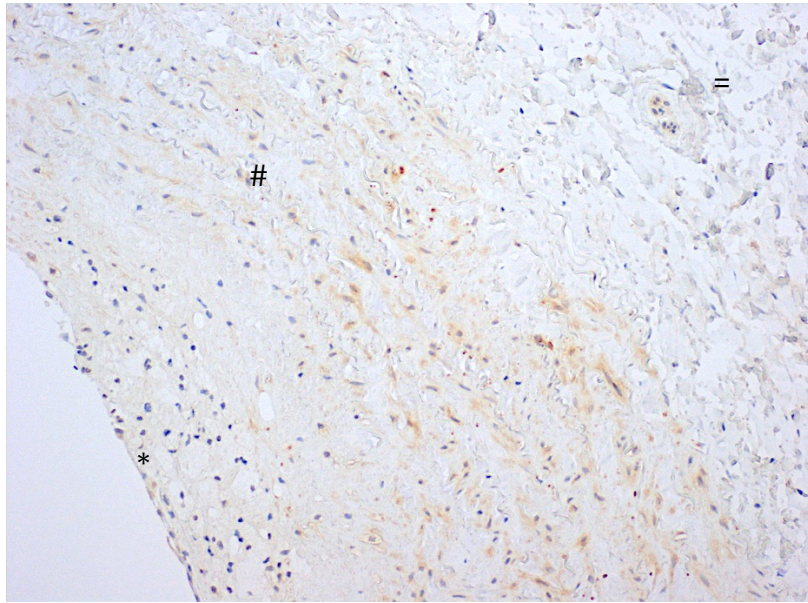


Abbildung 54: PDE-5-A-Enzymfärbung Arterie mit Atherom, 20 x vergrößert  
mit Tunica Intima (\*), Tunica Media (#) und Tunica Adventitia (=)  
mit Zunahme der PDE-5-A-Enzympositivität nach peripher



## 5. Diskussion

Die Symptome der pulmonalen Hypertonie können mit einer Vielzahl von Arzneimitteln behandelt werden. Folgende Medikamentengruppen finden im klinischen Alltag als Monotherapie Verwendung: PDE-5-Inhibitoren, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Prostacyclin-Analoga. Alle reduzieren den pulmonalen arteriellen Blutdruck (Ghofrani, 2006 und Olschewski, 2006). Allerdings reagieren nicht alle Patienten auf Monotherapien, da einige Patienten eine sog. Drogen-Toleranz im Laufe der Zeit entwickeln. Klinische Studien zeigen, dass die kardio-pulmonale Leistungsfähigkeit von Patienten mit PH insbesondere durch Kombinationstherapien verbessert werden kann (Hoeper, 2004). Deshalb sind durch unsere Arbeitsgruppe Kombinationseffekte zweier dieser Wirkstoffklassen, den PDE5-Inhibitoren und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, in einem Organbadmodell an humanen Pulmonalgefäßen untersucht worden (Ried, 2014). Eine Kombinationstherapie aus Sildenafil (PDE-5-Hemmer) und Bosentan (Endothelin-Rezeptor-Antagonisten) konnte die Vasokonstriktion der PA im Vergleich zur Monoanwendung deutlich reduzieren (Ried, 2014). PDE-5-Inhibitoren und Endothelin (ET)-Rezeptor-Antagonisten wirken allerdings auf unterschiedlichen Signalwegen (Humper, 2004). Zahlreiche klinische, pharmakokinetische und tierexperimentelle Untersuchungen zeigen dies auf (Humper, 2004 und Ried, 2014 und Sun, 2010). All diesen Untersuchungen ist gemein, dass sie überwiegend PA in den Fokus ihrer Untersuchung setzten und diese entnommenen Gefäße sind in Lungengewebeschnitten histologisch angefärbt worden (Hall, 2011 und Humper, 2004 und Haworth, 1983). Durchgeführte Untersuchungen an singulär entnommenen Pulmonalarterien standen aus. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die enbloc und in einem Segment entnommenen PA. Wie die durchgeführte selektive Literaturrecherche (s. Material und Methoden) zeigte, gibt es wenige Untersuchungen zur Bestimmung der Gefäßmorphometrie der singulären Segmentgefäße. Neben der Entnahme der PA, untersuchten wir auch die PV. Die Venen haben im Vergleich zu den Arterien im Lungenkreislauf eine 200fache erhöhte Compliance (Wanddehnbarkeit). Dies zeichnet sie als Kapazitätsgefäße aus (Lang und Lang, 2007). In der Pathogenese der PH zeigt sich ein erhöhter Druck in den Lungengefäßen. Dieser erhöhte Lungendruck hat auf Dauer einen Einfluss auf die Wandbeschaffenheit der PA (Humper, 2004). Da es zu den PV analog zu den PA wenig bis keine vorherrschenden Untersuchungen über die grundlegende Gefäßmorphometrie gibt, wurden auch die PV untersucht, um auch für diese Gefäßart die Gefäßmorphometrie beschreiben und bestimmen zu können. Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten unserer Studie (n=50) ist im Vergleich zu anderen Studien, die sich mit immunhistologischen

Fragestellungen beschäftigen (Haworth, 1983 und Allen, 1993 und Rosenzweig, 2004) und im Durchschnitt zwischen sieben bis 20 Patienten in ihrer Untersuchungsgruppe einschließen, in der Anzahl erhöht. In den genannten Studien wurden vorwiegend Lungengewebe von Kleinkindern und Heranwachsenden entnommen und histologisch untersucht. Hierbei handelte es sich stets um erkrankte Lungengefäßen (IPAH), auf denen histopathologische und immunchemische Grundlagen gebildet worden sind (Haworth, 1983 und Humper, 2004). Die Aussagekraft dieser bisher gewonnenen Erkenntnisse, die durch Untersuchungen an durch verschiedene Krankheiten histologisch veränderten Gefäße durchgeführt und gewonnen worden sind, scheint hierdurch eingeschränkt zu sein. Diese Erkenntnisse können daher aus histopathologischer Sicht nicht als Grundlage zur Beschreibung der normalen Gefäßmorphometrie bei gesunden Patienten zur Anwendung kommen. Hierbei lässt sich nicht auszuschließen, dass diese erkrankten Gefäßarten andere histopathologische und immunchemische Veränderungen aufweisen und somit die Ergebnisse verfälschen könnten. Dies war der Anlass zur Untersuchung zur Bestimmung der grundlegenden Gefäßmorphometrie bei den enbloc entnommenen Segmenten der PA und PV.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser histologischen Untersuchungen zeigen eine Ähnlichkeit im Aufbau der PA und PV. Beide Gefäßarten haben die gleiche Gefäßkonfiguration. Im Vergleich zu den PV scheinen die PA in ihrer Gesamtanfärbbarkeit in den histologischen Präparaten (HE, Elastika van Gieson, Resorcin-Fuchsin mit Sirius-Färbung) in der Farbintensität ausgeprägter. So zeigt sich in der HE-Färbung die Muscularis der PA dunkelrosa angefärbter als die Muscularis der PV. Die Schichtdicke der zirkulär verlaufenden glatten Muskelzellen der PV erscheint dünnschichtiger ausgeprägt, somit haben die PV eine geringe Dichte an glatten Muskelzellen aufgrund ihrer niedrigen Anzahl an glatten Muskelzellen in ihrer Tunica Media als die PA in ihrer Tunica Media. Daher kann die PV im Vergleich zur PA dezenter in ihrer Anfärbbarkeit erscheinen. Die stärkere Anfärbbarkeit der PA scheint durch die Anzahl der in ihr vorherrschenden glatten Muskelzellen beeinflusst zu sein. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die verstärkte Rolle der PA in der Pathogenese der PH sein (Humper, 2004). PA haben von Grund auf eine erhöhte Anzahl glatter Muskelzellen in ihrer Gefäßmorphometrie und können daher von pathologischen Prozessen ausgeprägter als PV betroffen sein. Im Vergleich zu den PA fanden sich in dieser durchgeführten Untersuchung in 20 % der PV im Übergang zwischen der Tunica Media und Tunica Adventitia  $\alpha$ -SMA-positive Zellformationen. Diese Zellformationen sind Clusterbilder glatter Muskelzellen. Diese Zellformationen können

daher eine zusätzliche kontraktile Einheit abbilden, die bei der Regulation oder Verstärkung der Vasokonstriktion in den betroffenen PV eine Rolle spielen könnte. Im Hinblick auf die Pathogenese der PH könnten diese kontraktile Einheiten als Wirkziel für die angewendeten Medikamente dienen. Die dargestellten Untersuchungen zeigten auch, dass ein veränderter Gefäßaufbau eine veränderte Gefäßmorphometrie zur Folge haben kann. Hierbei zeigten sich vorwiegend Pathologien in Form von Gefäßwandverdickungen, Fibrosen, Artheromen oder eine gesteigerte Neovaskularisation. Betroffen zeigten sich hiervon alle Gefäßschichten. Bei den beschriebenen Pathologien handelt es sich um atherosklerotische Veränderungen. Diese zeigten sich in dieser Arbeit in beiden Gefäßarten und in unterschiedlichen Ausprägungen. Die hier beschriebenen Veränderungen zeigen sich identisch mit den atherosklerotischen Veränderungen in großen Blutgefäßen, wie der Aorta oder Arteria subclavia (Ladich 2016). Die atherosklerotischen Veränderungen werden in sechs verschiedene Kategorien eingeteilt (Sary 1995). In unseren Ergebnissen zeigten sich vermehrt Gefäßwandveränderungen gemäß der AHA-Klassifikation (Sary 1995). Aber auch präatheromgleiche und atheromähnliche Veränderungen konnten wir in unseren makroskopisch unauffälligen Gefäßen beschreiben. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Vermutung annehmen, dass nicht nur Gefäße des großen Körperkreislaufes von diesen pathologischen Veränderungen betroffen sein können, sondern auch wie in dieser Untersuchung gezeigt, Gefäße des Lungenkreislaufes. Zudem konnten wir auch atherosklerotische Veränderungen in den untersuchten PV beschreiben. Hierbei ist davon auszugehen, dass diese pathologischen Veränderungen einen Einfluss auf die Gefäßwandsteife dieser Gefäße haben, was wiederum erneuter Ausgangspunkt für Prozesse der Atherogenese sein kann (Schrodt, 2014). Vergleicht man die histopathologischen Ergebnisse dieser Untersuchung mit vorangegangenen Studien zur histologischen Untersuchung zur Beurteilung und Kategorisierung von Lungengewebe bei Patienten mit einer diagnostizierten PH (Tuder, 2007 und Ewert, 1999), zeigen sich histologische Gemeinsamkeiten in den beschriebenen pathologischen Veränderungen. Erstmals wurde 1958 durch Heath und Edwards Lungengewebe von Patienten mit einer diagnostizierten PH histologisch ausgewertet. Ergebnis dieser durchgeführten Untersuchung war eine ausführliche histologische Graduierung dieser erkrankten Gefäße (Heath, 1958), die sich in sechs Grade der unterschiedlichen Gefäßwandveränderungen aufteilt. Diese Klassifikation findet noch heute in der Klinik Anwendung und wurde durch Ewert et al. 1999 modifiziert. Ewert untersuchte PA vom elastischen und muskulären Typ sowie Arteriolen und verwendete Lungengewebeschnitte. Er zeigte auf, dass die PA von Patienten mit PH histologisch pathologische

Gefäßschichtveränderungen in Form von Intima- und Mediaverdickungen, Fibrosen und eine gesteigerte Neovaskularisation aufweisen. Zudem hat er durch immunchemische Untersuchungen gezeigt, dass glatte Muskelzellen in der Pathogenese der PH eine Schlüsselrolle spielen. Denn je ausgeprägter die Neomuskularisation der PA war, umso stärker zeigten sich die Gefäßwandveränderungen. Die Folge ist eine höhere Graduierung dieser betroffenen Gefäße in das beschriebene Graduierungsschema. Zudem beschrieb Ewert das Vorkommen atherosklerotischer Gefäßveränderungen in Form von intimalen, fibrinösen Plaques in den Pulmonalarterien (Ewert, 1999). Hiermit zeigte er auf, dass diese beschriebenen histologischen Veränderungen in PA von Patienten mit PH auftreten und sich somit als histologisches Korrelat für das Vorliegen einer PAH erweisen können. Vergleicht man diese histologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen von Ewert, so gibt es mehrere Übereinstimmungen in den beschriebenen pathologischen Veränderungen der Ewert-Gefäße und der hier untersuchten Gefäße. In dieser Untersuchung zeigten sich die gleichen durch Ewert beschriebenen pathologischen Veränderungen. Allerdings konnten diese Veränderungen nicht nur in PA, sondern auch in PV nachgewiesen werden. Bei Ewert kamen diese Pathologien ausschließlich in PA vor. In dieser Untersuchung waren auch PV betroffen. Zudem zeigten sich bei uns diese Ergebnisse bei Patienten, die an keiner diagnostizierten PH erkrankt waren. Es handelte sich bei den entnommenen Gefäßen um makroskopisch und klinisch unauffällige Gefäße. Es stellt sich daher die Vermutung, dass die beschriebenen pathologischen Veränderungen mit zunehmenden Alter einhergehen könnten, zumal es bei diesen Veränderungen der Gefäßmorphometrie ausgeprägte Ähnlichkeiten zwischen diesen und den histologisch-atherosklerotischen Prozessen gibt und hierbei gilt das Alter in der Atherogenese als ein wesentlicher Risikofaktor (Schrodt, 2014). Hierfür können die beschriebenen Prozesse der Atherogenese und des Remodellings sprechen. Zwar sind schon bei Kindern und Jugendlichen leichte atherosklerotische Veränderungen histologisch differenzierbar (Ladich, 2016), allerdings werden Läsionen der dritten und vierten Kategorie der AHA-Einteilung (Sary, 1995), die sich auch in unseren histologischen Präparaten darstellen ließen, überwiegend histopathologisch bei Menschen mit erhöhtem Lebensalter nachweisen lassen (Tuder, 2007).

Hier wirft sich die Frage, ob das Krankheitsbild der PH keine seltene Erkrankung (Humbert, 2009) sondern eine Erkrankung ist, die auch mit zunehmendem Alter einher gehen könnte. Hierfür können die beschriebenen Prozesse der Atherogenese, des Remodellings und die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit sprechen. Ein weiterer Aspekt, der für diese Annahme



sprechen könnte, ist die in dieser Untersuchung aufgezeigten atherosklerotischen Veränderungen, die wiederum kardiovaskuläre Krankheiten wie KHK, Mikroangiopathien und Thrombosen hervorrufen können (Schrodt, 2014). Allesamt sind dies Erkrankungen, die vornehmlich die ältere Bevölkerung betrifft und ab der sechsten Lebensdekade für die höchste Todesrate sorgt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016). Diese Erkrankungen betreffen Arterien des großen Kreislaufsystems und verursachen eine Veränderung ihrer Gefäßmorphometrie (Ladich, 2016). Diese Veränderungen zeigten sich auch in unseren angefertigten histologischen Präparaten. Neben den PA zeigen die untersuchten PV selbige histologische Veränderungen. Sodass aus diesem histopathologischen Aspekt die Annahme, dass die PH auch eine Alterserkrankung sein kann, möglich erscheint.

Die Erkenntnisse zur Bestimmung der Gefäßmorphometrie dieser Arbeit bilden die Grundlage für die Bewertung der durchgeführten immunchemischen Targetenzymuntersuchung und zur Erfassung der immunhistochemischen Rezeptorenverteilung und -dichte in den angefertigten Präparaten. Denn viele der bisher publizierten Studien zur Erkenntnisgewinnung der PH bzw. immunhistochemischer Untersuchungen zur Targetenzymexpression der Medikamentenklasse von PDE-5-Hemmern und Endothelinrezeptoreantagonisten, die bei der PH-Therapie Verwendung finden, sind tierexperimentelle Untersuchungen, die vornehmlich an Mäusen oder Ratten durchgeführt worden sind (Kuc, 2006 und Toque, 2008 und Hunsmann, 2003). Im klinischen Alltag ist es schwierig einen Zugang zur Gewinnung humaner pulmonaler Gefäßpräparate zu bekommen. Dies liegt zum einen an der niedrigen Anzahl potentieller Patienten und zum anderen an den strengen Auflagen, die bei der Genehmigung möglicher PH-Untersuchungen durch lokale Ethikkommissionen eingehalten werden müssen (Ramirez, 2015). Daher werden viele tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt. Hunsmann et al. 2003 untersuchte in seiner Arbeit mittels immunhistochemischer Methoden die Rezeptorenverteilung von ETA und ETB-Rezeptoren in Rattenlungengefäßen. Hier zeigte sich, dass bei diesen Tieren der Endothelin-A-Rezeptor an glatten Muskelzellen und an Endothelzellen der Pulmonalarterien und an glatten Muskelzellen in Pulmonalvenen nachgewiesen werden konnte. Die Expression des Endothelin-B-Rezeptors wurde in glatten Muskelzellen der Tunica Media und in PA und PV gezeigt. Kuc et al. 2006 untersuchte Mäuse mittels Autoradiographie. Kuc konnte in den untersuchten Mäusen den ETA-Rezeptor in glatten Muskelzellen und in Endothelzellen nachweisen. Der ETB-Rezeptor wurde anders als erwartet, weder in glatten Muskelzellen der Versuchstiere noch in ihren Endothelzellen mittels

Autoradiographie dediziert. Diese Verteilungsdaten der Ratten- und Mäusegefäße zeigen im Vergleich zu den in dieser Untersuchung erhobenen Daten zwar Ähnlichkeiten zwischen der tierexperimentellen und humanen Rezeptorenexpression. Allerdings zeigte sich in den Daten dieser Untersuchung, dass beide Endothelin-Rezeptoren in humanen Gefäßen mit einer starken Präferenz gegenüber endothelialen und glatten Muskelzellen in der Tunica Intima und Mediaschicht exprimiert werden. Hieraus lässt sich vermuten, dass tierexperimentelle Untersuchungen zur ETA und ETB-Rezeptorenexpression eine gewisse Grundaussage liefern. Allerdings zeigen die hier erhobenen Daten an humanen Gefäßen eine erweiterte Expressionstendenz als die in tierexperimentellen Untersuchungen gewonnen Erkenntnisse. Dies kann hierbei auch für elektrophysiologische Untersuchungen gelten, die an gewonnenen Tierpräparaten durchgeführt wurden (Kuc, 2006). Diese liefern wichtige Grundkenntnisse und daraus lassen sich mögliche Tendenzen zur Wirkungsweise der genannten Medikamentenklasse ableiten. Allerdings sollten auch diese tierexperimentellen elektrophysiologischen Untersuchungen mit Daten aus humanen Organbaduntersuchungen (Ried, 2014 und Hoenicka, 2011) verglichen und erweitert werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen auf, dass weitere Untersuchungen an humanem Gewebe ausstehend sind und die Daten aus der tierexperimentellen Forschung nur eine Grundtendenz mit eingeschränkter Aussagekraft für diese Fragestellung liefern können. Ergänzend hierzu lässt sich aus den erhobenen Erkenntnissen dieser Untersuchung über die Gemeinsamkeiten der PA und PV in Bezug auf Gefäßmorphometrie, Gefäßpathologien und Rezeptorenexpression und deren Veränderung bei auftretenden Gefäßpathologien die Annahme ableiten, dass sowohl PA als auch PV für künftige elektrophysiologische oder pharmakokinetische Untersuchungen als Untersuchungsgegenstand geeignet sein sollten. Beide Gefäßarten zeigten in der Histologie eine similare Gefäßmorphometrie und in der Targetenzymexpression als auch in der ETA und ETB Rezeptorenverteilung ein ähnliches Verteilungsmuster. Zudem konnten in beiden Gewebearten histopathologische Veränderungen aufgezeigt werden, die bei beiden Gefäßarten in ähnlicher Weise mikroskopisch dekretiert werden konnten. Diese Veränderungen der Gefäßmorphometrie können daher einen simultanen Einfluss auf die Expression der drei untersuchten Targetenzyme bzw. Rezeptoren haben. Dies zeigt auf, dass Pulmonalvenen nicht mehr unabhängig von den Pulmonalartereien betrachtet und untersucht werden sollten. Deshalb sollten beide Gefäßarten, wenn möglich, synchron untersucht werden, um noch genauere Erkenntnisse aus künftigen Untersuchungen ableiten zu können. Zudem können damit weitere

Grundlagen geschaffen werden, um bereits erhobene Daten besser und genauer miteinander vergleichen zu können.

### 5.1 Fehlerquellen

Bei der Auswertung von Gefäßen bzw. Gefäßanschnitten nach Routinetechniken können histologische Artefakte auftreten. Vor allem glatte Muskelkontraktionsbänder sind sehr häufig, sowohl bei der Autopsie als auch bei chirurgisch entferntem Material betroffen. Diese können als vaskuläre verzogene zwiebelschalen-ähnliche oder mehrschichtige Intima betroffenen Arterien gesehen werden. Diese Artefakte (s. Abb. 55) treten auf, wenn entweder ein kleiner Anteil des Gefäßes traumatisch verschoben wird oder eine Kontraktion der glatten Muskelzellen, die im Rahmen der Biopsie provoziert wird, auftritt. Nicht selten werden diese Gefäße makroskopisch und histologisch mit thrombosierten oder verschlossenen Gefäßen verwechselt (Butany und Buja 2016).

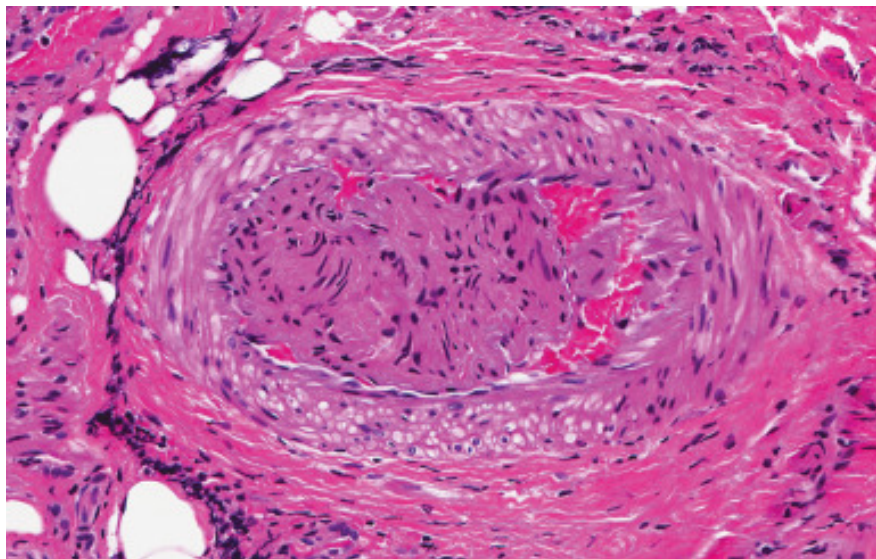


Abbildung 55: verzogene Intima und Media einer Arterie (HE-Färbung in 200-fache Vergrößerung) (Butany und Buja 2016)

Die Membrena elastica interna ist in Arterien vom muskulären Typ prominent und kann klar definiert werden. Diese Schicht ist eine dicke, fenestrierte Schicht aus verwobenen elastischen Fasern. Sie hat wellenförmige oder gewellte Erscheinung. Dies entsteht aufgrund künstlicher Kontraktion und kann an Arterienabzweigpunkten und Gefäßgabeln fehlen. Diese leeren Bereiche können sich bei der histologischen Auswertung als Pathologien präsentieren. Sie

können als Bereiche alter Gefäßwandverletzungen interpretiert werden. Sogar dem Bild einer ausgeheilten Vaskulitis entsprechen. Intimaverdickungen sind altersentsprechende Veränderungen und können in einigen Gefäßen bis in die Tunica Media reichen bzw. diese auch betreffen. Zudem kann aufgrund dieser altersentsprechenden Prozesse die klar definierte Membrana elastica interna zerrüttet, verkleinert oder auch mehrschichtig erscheinen. Auch sie kann verkalken. Die Tunica Media muskulärer Arterien unterliegt auch altersbedingten Prozessen, sodass hier Mediafibrosen beschrieben werden. Geringgradige Degeneration der Tunica Media sind einschließlich der elastischen Fragmentierung, der medialen Fibrosierung, Nekrose sowie der extrazellulären Akkumulation von Glykosaminoglykanen normal und zeigen eine Zunahme mit dem Patientenalter (Butany und Buja 2016). Durch die anhaltende Gefäßwanddehnung der glatten Muskelzellen kommt es vorübergehend zu einem transienten erhöhten Gefäßtonus. Hält die Dehnung länger an, so erfolgt eine Zelladaptation der glatten Muskulatur. Das Prinzip der plastischen Dehnung tritt ein, die Muskelzellen gewöhnen sich an ihre neue Länge (Lang und Lang 2007). Sie teilen sich mitotisch und hypertrophieren. Im Zytoplasma kommt Sekretgranula vor, sie können Glykosaminoglykane, Elastin und Kollagen sezernieren (Schiebler und Korf 2007). Darüberhinaus ist die Plastizität von Endothelzellen nicht auf organspezifische Phänotypen beschränkt, sondern gilt auch für die arteriell-venöse Differenzierung. Durch die Implantation von Quail-Arterien und Venen in Hühnerembryonen wurde gezeigt, dass arterielle Endothelzellen Venen kolonisieren und umgekehrt und ihr Genexpressionsprofil entsprechend anpassen können (Moyon 2001, Othman-Hassan 2001). Daher ist die phänotypische Heterogenität des Endothels vermutlich das Ergebnis einer Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren.

## **6. Schlussfolgerung**

Schlussfolgernd lässt sich mit unserer Untersuchung festhalten, dass es histologische und immunochemische Gemeinsamkeiten zwischen PA und PV gibt. Bei der Pathogenese der PH scheinen viele Faktoren eine Rolle zu spielen, die beide Gefäßarten betreffen. Daher sind künftige Untersuchungen an beiden Gefäßarten ausstehend, um die hier gewonnen Erkenntnisse zu unterstreichen. Vasoaktive Peptide nehmen in der Pathogenese der PH eine Schlüsselrolle ein. In dieser Untersuchung wurden zwei Medikamentenklassen auf ihre Targetenzymexpression bzw. Rezeptorenverteilung näher untersucht. Neben Sildenafil und Bosentan können in künftigen immunochemischen und Organbad-Untersuchungen weitere Medikamente, die die vasoaktiven Peptide downregulieren können, wie u.a Prostazykline, Kalziuminhibitoren und

Biologicals untersucht werden. Ergänzend hierzu sollte ein Augenmerk auf Faktoren, die bei der Atherogenese eine Rolle spielen, gelegt werden und diese näher untersucht werden. Denn wie in dieser Untersuchung gezeigt wurde, scheint es einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gefäßatherogenese und der Pathogenese der PH zu geben. Hier scheint u.a. die NO-Synthetase in Bezug auf die endotheliale Dysfunktion und nachfolgend der CD-31-Ligand eine übergeordnete Rolle zu spielen. Daher sollten in künftigen Untersuchungen diese Zusammenhänge betrachtet, hinterfragt und untersucht werden. Ein weiterer Aspekt dieser Untersuchung zeigt sich in dem Zusammenhang zwischen Lebensalter und der Entwicklung einer PH. Hier sollten anknüpfend klinische und histologische Untersuchungen erfolgen, um weitere Erkenntnisse gewinnen zu können und die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der PH-Pathogenese zu finden und diesen näher beschreiben zu können. Weiterhin bleibt die Vermutung offen, dass das Erkrankungsbild der PH nicht zu den seltenen Erkrankungen gezählt werden sollte, sondern wie andere Erkrankungen auch, die das kardiovaskuläre Gefäßsystem betreffen, klinisch häufig auftreten und in der frühen Krankheitsform stumm ablaufen. Zudem sollten die Erkenntnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen von Untersuchungen mit PH-Präparaten verglichen werden, um auch in diesem Aspekt weitere Erkenntnisse über die hier ausgewerteten Daten gewinnen zu können und diese in der klinischen Anwendung umsetzen zu können. Hierbei können die Erkenntnisse dieser Arbeit genutzt werden, um daraus mögliche Parameter zur exakteren und detaillierten Risikostratifizierung, die bei einer PH ein wichtiges diagnostisches und auch therapeutisches Werkzeug sind, definieren zu können. Aufgrunddessen kann eine Identifizierung von Frühfaktoren, wie sie auch für beginnende atherosklerotische Veränderung angewandt wird, möglich sein und sich daraus mögliche Präventionsmaßnahmen ableiten lassen. Hierfür scheint es, anders als im Vergleich zu der Erforschung internistischer Krankheitsbilder, die vor allem das kardiovaskuläre System betreffen, ein reduziertes klinisches Interesse zu geben. Dazu tragen womöglich die Tatsachen bei, dass die Erkrankung der PH zu den seltenen Erkrankungen gezählt wird und als Rarität im klinischen Alltag zählt. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und weiteren folgenden Untersuchungen, könnte sich das klinische Forschungsinteresse steigern lassen und somit schneller nützliche und adäquate Therapien erschließen, umso die hohe Morbidität und Mortalität der PH reduzieren zu können.

## 7. Zusammenfassung

Hintergrund dieser Untersuchung war die Erkrankung der PH, welche durch eine erhöhte Vasokonstriktion der Pulmonalgefäße verursacht wird. Hiervon sind vornehmlich die PA betroffen. Medikamente unterschiedlicher Wirkstoffklassen kommen hierbei zum klinischen Einsatz. Eine experimentelle Untersuchung an humanen Pulmonalgefäßen aus der eigenen Arbeitsgruppe hatte bereits gezeigt, dass eine Kombinationstherapie aus Bosentan (Endothelinrezeptorantagonist) und Sildenafil (PDE-5-Hemmer) im Vergleich zur Monoanwendung die Vasokonstriktion deutlich reduzieren kann. Diese ersten Ergebnisse konnten die klinischen Erfahrungen untermauern, bei denen PH-Patienten durch eine Kombinationstherapie ihre kardio-pulmonale Leistungsfähigkeit gesteigert werden konnte.

Ziel dieser Untersuchung war es ein histologisches und immunhistologisches Korrelat zur Beschreibung der Substanzwirkung zu evaluieren, um deren Wirkweise klinisch besser nachvollziehen zu können. Hierzu sollte mit der vorliegenden Untersuchung die Gefäßmorphometrie klinischer und makroskopisch unauffälliger PA und PV beschrieben werden, damit diese für die anschließenden immunchemischen Untersuchungen der Präparate zur Bestimmung der Targetenzymexpression als Grundlage dienen kann. Für diese Untersuchung sind histologische und immunhistologische Präparate angefertigt worden. Hierfür wurden 50 Patienten im Zeitraum von 2011 bis Anfang 2016 während einer elektiven Lobektomie, Segmente von makroskopisch und klinisch-unauffälligen von PA und PV entnommen. Eine Genehmigung für diese Untersuchung durch die lokale Ethikkommission des Uniklinikums Regensburg war gegeben. Patienten, bei denen präoperativ eine PH diagnostiziert wurde und Personen unter 18 Jahren, sind von dieser Studie ausgeschlossen wurden. Alle teilnehmenden Personen wurden schriftlich aufgeklärt und haben dieser Untersuchung schriftlich zugestimmt. Nach der Entnahme sind die entnommenen Gefäßsegmente nach standardisierten Protokollen histologisch und immunchemisch im eigenen Labor aufgearbeitet wurden. Hierfür sind für die histologische Auswertung die HE-Färbung, Elastica van Gieson Färbung, Resorcin-Fuchsin und Sirius-Färbung angefertigt wurden. Für die immunchemische Untersuchung von Bosentan wurden die Präparate mit der ETA- und ETB-Rezeptor, für Sildenafil mit der PDE-5-A-Enzymfärbung bearbeitet worden. Zuvor erfolgte eine selektive Literaturrecherche in PubMed. Gegenstand dieser Recherche war die Frage nach aktuellen Erkenntnissen über die Beschreibung der Gefäßmorphometrie von PA und PV, die enbloc und auf Segmentebene entfernt wurden. Eine bereits publizierte Vorarbeit zeigte sich hierfür nicht. Daher wurde die Gefäßmorphometrie von PA und PV durch die Methodik der deskriptiven

Anatomie und Pathologie ausgewertet und beschrieben. Hierbei zeigte sich für beide Gefäßarten ein homogener Gefäßaufbau aus den drei bekannten Schichten: Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia. Sobald sich diese homogene Gefäßschichtaufteilung veränderte, zeigten sich Änderungen in der Gefäßmorphometrie. Hierbei fanden sich pathologische Veränderungen in Form von Atherosklerose. Diese Pathologien zeigten sich in beiden untersuchten Gefäßarten. Die Atherosklerose der Gefäße präsentierte sich in Form von Wandverdickungen, Fibrosen, gesteigerter Neovaskularisierung und (Prä-) Atheromen. Insgesamt waren 42 Prozent der Gefäße hiervon betroffen. In einem weiteren Untersuchungsschritt sind die erstellten Färbungen ausgewertet worden. Hierbei zeigte sich, dass alle drei untersuchten Targetfärbungen in beiden Gefäßarten nachgewiesen werden konnten. Sowohl in PA als auch in PV fand sich die höchste Expression in Bereichen von glatten Muskelzellen und Endothelzellen. War der Gefäßschichtaufbau homogen, so zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster für ETA, ETB und PDE-5-A-Enzym. Veränderungen der Gefäßmorphometrie hatten einen Einfluss auf die Targetexpression. So veränderte sich die ETA-Rezeptorverfärbung am stärksten bei histologisch gesichertem Atherom. Hierbei nahm die Rezeptorendichte innerhalb der Gefäßläsion ab. Die ETB-Rezeptorexpression hingegen veränderte sich zugunsten des Atheroms. Im Vergleich zeigen sich beide Endothelinrezeptoranfärbungen in Bezug auf die Gefäßschichtexpression simultan. Allerdings scheinen pathologische Veränderungen in ausgeprägter Form einen unterschiedlichen Einfluss auf beide Endothelinrezeptoren zu haben. Die PDE-5-A-Enzymexpression veränderte sich nach dem gleichen Muster wie der ETA-Rezeptor.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Untersuchung mit publizierten histopathologischen Arbeiten zur histologischen Klassifikation nach atherosklerotischen Veränderungen (Vgl. AHA-Klassifikation) und mit histologischen Graduierungen von Gefäßveränderungen bei PH (Ewert, 1999), so sind viele Gemeinsamkeiten in der Gefäßmorphometrie und in der Beschreibung der pathologischen Veränderungen zu finden. Sodass sich die Erkenntnisse, die mit dieser Untersuchung gewonnen worden sind, sich auf künftige PH-Untersuchungen übertragen lassen könnten. Gegenstand dieser beschriebenen publizierten Arbeiten waren stets PA. Ergänzend hierzu lässt sich durch diese Untersuchung die Annahme ableiten, dass für zukünftige Studien die PV Gegenstand klinischer Forschung werden sollten. Zwischen den PV und PA zeigten sich immunhistologische Gemeinsamkeiten in der Gefäßmorphometrie, der Histopathologie und in der Targetenzymexpression.

## 8. Literaturverzeichnis

Abdelfattah A, Allam HS, Wann S, Thompson CR, et al; Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Egyptian Women: 1570 Bce-2011 Ce, *Int J Cardiol* (2012).

Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, et al. Increases levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol* 1997;151(3):831-841

Aird WC (2003) Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 31:S221-S230

Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, et al. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 519–522.

Anderhuber F, Pera F, Streicher J, Waldeyer A, Waldeyer- Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band (De Gruyter Studium), De Gruyter, 19. Auflage Berlin (2012), S. 2 – 4

Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M, Quantification of Alterations in Structure and Function of Elastin in the Arterial Media, *Hypertension*, 32 (1998), 170– 5.

Benett HS, Luft JH, Hampton JC (1959) Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol* 196:381–390

Benza RL, Gomberg-Maitland M, Frost AE, Frantz RP; Development of prognostics tools in pulmonary arterial hypertension: lessons from modern day registries; *Thromb Haemost.* 2012; 108 (6):1049-60.

Blettner M, Sauerbrei W, Schlehofer B, Scheuchenpflug T, et al: Vergleich von traditionellen Reviews, Metaanalysen und gepoolten Analysen zur Bewertung von Risikofaktoren. *Informatik, Biometrie und Epidemiologie in Medizin und Biologie* 1997; 28: 148–66.

Botenga AS; Broncho-bronchial anastomosis. A selective angiographic study. *Ann Radiol* 1970;13: 1 – 16.

Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, et al. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2000;95(2):98-105

Butany J, Buja M L, Hrsg. *Cardiovascular Pathology*. 4. Aufl. London: Elsevier Verlag; 2016

Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, et al. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11(4):439-45

Cardazo AM, D'Orleans-Juste P, Yano M, et al. Influence of endothelin ET(A) and ET(B) receptor antagonists on endothelin-induced contractions of guinea pig isolated gall bladder. *Regul Pept* 1997;69(1):15-23



Cardillo C, Kilcoyne CM, Wacławski M, et al. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999;33(3):753-8

Caudwell EW, Siekert RG, Linninger RE; The bronchial arteries; an anatomic study of 150

Chen SJ, Chen YF, Meng QC, et al. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995;79(6):2122-31

Clozel M, Breu V, Gray GA, et al. In vivo pharmacology of Ro 46-2005, the first synthetic nonpeptide endothelin receptor antagonist: implications for endothelin physiology. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl.8):S377-9

Davie N, Haleen SJ, Upton PD, et al. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *AM J Respir Crit Care Med* 2002;165(3):398-405

Dhaun N, Pollock DM, Goddard J, Webb DJ (2007). Selective and mixed endothelin receptor antagonism in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 28:573-579

Dony E. Dualselektive Phosphodiesterase 3 und 4 Inhibition in experimenteller pulmonaler

Dupius J, Goresky Ca, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996;81(4):1510-5

EuropeanLungFoundation.org (Internet), UK: Sheffield Pulmonal arterielle Hypertonie (updated 13.05.2017, zuletzt gesehen 13.08.2017. verfügbar unter: <http://www.europeanlung.org/assets/files/de/publications/pah-de.pdf>

Farrar DJ, Green HD, Bond MG, Wagner WD, et al; Aortic Pulse Wave Velocity, Elasticity, and Composition in a Nonhuman Primate Model of Atherosclerosis, *Circ Res*, 43 (1978), 52-62.

Ferris EJ; Pulmonary hemorrhage. Vascular evaluation and interventional therapy. *Chest* 1981; 80: 710-14.

Finsnes F, Skjongsberg OH, Tonnessen T, et al. Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation. *AM J Respir Crit Care Med* 1997;155(4):1404-12

Friedenreich CM: Methods for pooled analyses of epidemiologic studies. *Epidemiology* 1993; 4: 295–302.

Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, et al. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1994;113(2):336-8

Gaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel R, Levy R, Shennib H. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-39

Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S; 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European

Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), Eur Heart J, 2016 1; 37(1): 67 bis 119.

Galyean JR, 3rd, 'Risk Factors for Coronary Heart Disease', South Med J, 71 (1978), 694-704.

Gaziano JM, Triglycerides and Coronary Risk, Curr Cardiol Rep, 1 (1999), 125-30.

Gebbers O, Atherosclerosis, Cholesterol, Nutrition, and Statins - a Critical Review, Ger Med Sci, 5 (2007), Doc04.

Ghofrani HA, Grimminger F. Treatment of pulmonary arterial hypertension: phosphodiesterase-5 inhibitors. Dtsch Med Wochenschr 2006; 8 (131): 311-4

Go A, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, et al; Committee American Heart Association Statistics, and Subcommittee Stroke Statistics, Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2014 Update: A Report from the American Heart Association', Circulation, 129 (2014), 399-410.

Goldstein JL, Brown MS, The Low-Density Lipoprotein Pathway and Its Relation to Atherosclerosis, Annu Rev Biochem, 46 (1977), 897-930.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS; Binding Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition, Proc Natl Acad Sci U S A, 76 (1979), 333-7.

Goldstein JL; Atherosclerosis: The Low-Density Lipoprotein Receptor Hypothesis, Metabolism, 26 (1977), 1257-75.

Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, et al. Ligand-depent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. J Biol Chem 2004;279(26):27679-87

Hahn E.J., American Laboratory 15: 64-71, 1983 Source: Spectronics Corp.

Hall SM, Dave N, Klein N, Haworth SG; Endothelin receptor expression in idiopathic pulmonary arterial hypertension: effect of bosentan and epoprosentol treatment; Eur Respir J, 2011; 38 :851 - 60

Harada N, Himeno A, Shigematsu K, et al. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. Cell Mol Neurobiol 2002; 22(2):207-26

Haworth SG, Hislop AA; Pulmonary vascular development: normal values of peripheral vascular structure. AM J Cardiol. 1983 52(5): 578-83

Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. Circulation 1958; 18:533-47.

Helset E, Lindal S, Olsen R, et al. Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. *AM J Physiol* 1996;271:L538-46

Hirata Y, Emori T, Eguchi S, et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;91(4):1367-73

Hoienicka M, Keyser A, Rupprecht L, Puehler T, et al. Endothelium-dependent vasoconstriction in isolated vessel grafts: a novel mechanism of vasospasm? *Ann Thorac Surg* 2011, 92: 1299 - 307

Hoepfer MM, Faulenbach C, Golpon H, Winkler J et al. Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary hypertension. *Eur Resp J*. 2004; 24:1007-10.  
human cadavers. *Surg Gynecol Obstet* 1948;86: 395-412.

Hunsmann T. Lokalisation von Endothelin-Rezeptoren in der Lungenstrombahn. Immunhistochemische Untersuchungen an der Rattenlunge und Beschreibung der Endothelin-Rezeptor-assoziierten Effekte (Dissertation), Mannheim, Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim, 2003.

Ittrich H, Bockhorn M, Klose H, Simon M: the diagnosis and treatment of hemoptysis. *Dtsch Arztebl Int* 2017; 114:371-81.

Joubert-Huebner E, editor. Arterien, Venen und Kapillarnetz. Anatomie und Pathophysiologie. [Internet]. Hamburg; 2009 [abgerufen am 06.03.2017]. Verfügbar unter: <http://www.kardiotechnik.org/Blutgefasssystem.pdf>

Jürgens UR, Racke K, Uen S, et al. Inflammatory responses after endothelin B (ET(B)) receptor activation in human monocytes: new evidence for beneficial anti-inflammatory potency of ET(B)-receptor antagonism. *Pulm Pharmacol Ther* 2008

Klob J. Endarteriitis pulmonalis deformans. *Wien Wochenblatt* 1865;(31):45.

Kohlbach Wolfgang, Deskriptive Anatomie der Zähne und des kraniofaszialen Systems, Quintessenz Verlag, Berlin 2007

Kolodgie F, Nakazawa G, Sangiorgi G, Ladich E, et al; Pathology of Atherosclerosis and Stenting. *Neuroimaging Clin N Am*. 2007 August;17(3): 285–vii.

Kronmal A, McClelland RL, Detrano R, Shea S, et al; Risk Factors for the Progression of Coronary Artery Calcification in Asymptomatic Subjects: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (Mesa), *Circulation*, 115 (2007), 2722-30.

Kuc RE, Maguire JJ, Davenport AP. Quantification of endothelin receptor subtypes in peripheral tissues reveals downregulation of ET-A receptors in ET-B-deficient mice. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006; 231: 741–745.

Ladich ER, Burke PA, atherosclerosis pathology: definition, epidemiology, etiology (2016); <http://reference.medscape.com/article/1612610-overview> (12.08.2017/14:14 Uhr)

Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(4):339-57

Lang F und Lang P. *Basiswissen Physiologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Springer Verlag; 2007

le Noble F, Fleury V, Pries A, Corvol P, Eichmann A, Reneman RS (2005) Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc Res* 65:619– 628

Liu JJ, Chen JR, Buxton BF. Unique response of human arteries to endothelin B receptor agonist and antagonist. *Clin Sci (Lond)* 1996;90(2):91-96

Lösch A. Localisation of endothelin-1 and its receptors in vascular tissue as seen at the electron microscopic level. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3(4):831-41

Lüllmann-Rauch; *Taschenbuch der Histologie*; Thieme-Verlag, 5. Auflage; 2015

Lutz J, Gorenflo M, Habighorst M, et al. Endothelin-1- and endothelin-receptors in lung biopsies of patients with pulmonary hypertension due congenital heart disease. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(4):424-8

Marshall TJ, Jackson JE; Vascular intervention in the thorax: bronchial artery embolization for haemoptysis. *Eur Radiol* 1997; 7: 1221-27.

McDonald DM; Angiogenesis and remodelling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*; 164: 39 – 45.

Moncada S, Higgs A, editors. *The Vascular endothelium I*, Heidelberg: Springer Verlag; 2006

Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Breant C, Eichmann A (2001a) Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 128:3359–3370

Muldoon LL, Pribnow D, Rodland KD, et al. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and anchorage-independent growth of Rat-1 fibroblasts through a protein kinase C-dependent mechanism. *Cell Regul* 1990; 1 (4): 379-90

Nichols WW, Denardo SJ, Wilkinson IB, McEniery CM, et al; Effects of Arterial Stiffness, Pulse Wave Velocity, and Wave Reflections on the Central Aortic Pressure Waveform, *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 10 (2008), 295- 303.

Nichols WW, Edwards DG, Arterial Elastance and Wave Reflection Augmentation of Systolic Blood Pressure: Deleterious Effects and Implications for Therapy, *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 6 (2001), 5-21.

Nurnberger J, Kribben A, Philipp T, Erbel R, [Arterial Compliance (Stiffness) as a Marker of Subclinical Atherosclerosis], *Herz*, 32 (2007), 379-86.

Olschewski et al, *Pneumologie* 2006; 60 (12): 749-71

Osterwalder E, Immunhistochemie kompakt. Eine Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Theorie und Praxis (Internet). Baden/Schweiz 2013; verfügbar unter: [http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung\\_immunhistochemie.pdf](http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung_immunhistochemie.pdf) (Update vom 13.08.2017/16:19 Uhr)

Othman-Hassan K, Patel K, Papoutsi M, Rodriguez-Niendenfuhr M, Christ B, Wilting J (2001) Arterial identity of endothelial cells is controlled by local cues. *Dev Biol* 237:398–409

Ramirez I, Navigating the maze of requirements for obtaining approval of non-interventional studies (NIS) in the European Union. *Ger Med Sci* 2015, 17;13:Doc 21.

Reitemeier B, Schwenzer Norbert, Michael Ehrenfeld. Einführung in die Zahnmedizin. Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, S. 264 – 67 (2006)

Remmele W, Stegner HE, Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*; 8(3):138-40 (1987)

Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(12):986-1001

Ressing M, Blettner M, Klug S, Systematische Übersichtsarbeiten und Metaanalysen. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(27):456 - 63

Ried M, Potzger T, Neu R, Sziklavari Z, et al. Combination of Sildenafil and Bosentan for Pulmonary Hypertension in a Human Ex Vivo Model. *Cardiovasc Drugs Ther* (2014) 28:45 – 51

Romberg E. Über Sklerose der Pulmonalarterie. *Dtsch Arch Klin Med* 1891;(48):197-206.

Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, et al. Bosentan fort he prevention of circulation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003; 107(9):1329-35

Rosenzweig EB, Widlitz AC, Barst RJ, et al. Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38: 2–22.

Ross R, 'The Pathogenesis of Atherosclerosis', *Mechanisms of Ageing and Development*, 9 (1979), 435-40.

Ross R, Atherosclerosis - an Inflammatory Disease, *N Engl J Med*, 340 (1999), 115-26.

Ross R, Glomset JA, Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis, *Science*, 180 (1973), 1332-9.

Rubin LJ; Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997 9;336(2):111-117

Sato K, Oka M, Hasunuma K, et al. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-a-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 1):L 668-72

Schiebler H T und Korf H-W. Anatomie 10. Aufl. Heidelberg: Steinkopff Verlag; 2007

Schiebler H T. Anatomie 9. Aufl. Heidelberg: Springer Verlag; 2005

Schmidt R F und Lang F. Physiologie des Menschen. 30. Aufl. Heidelberg: Springer Verlag; 2007

Schrodt C, Histologische Untersuchungen zur Entwicklung der Atherosklerose unter besonderer Berücksichtigung der Elastin- und Kollagenkomponenten sowie der Inflammation der Gefäßwand an ApoE-Knockout-Mäusen, Universität Würzburg, (Dissertation) 2014

Seidel CL, LaRochelle J (1987) Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. *Circ Res* 60:626–630

Shichiri M, Kato H, Marumo F, et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 1997;30(5):1198-203

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, et al; A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Circulation*, 92 (1995), 1355-74.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, et al; A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Circulation*, 92 (1995), 1355-74.

Statistisches Bundesamt Deutschland; Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4, Wiesbaden 2017

Sun XZ, Li ZF, Liu Y, Fang P et al, Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses matrix metalloproteinase-2 production in pulmonary artery smooth muscles cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37 (3): 362-7

Tennant M, McGeachie JK. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *Aust N Z J Surg* 1990;60:747–53.

Toque HA, Teixeira CE, Priviero FB, Morganti RP, Antunes E, De Nucci G. Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium- channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. *Br J Pharmacol*. 2008;154(4):787–96.

Trow TK, Taichman DB. Endothelin receptor blockade in the management of pulmonary arterial hypertension: selective and dual antagonism. *Resp Med* 2009; 103:951-62

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27–36.

Verri WA, Thiago MC, Magro DA, Guerrero ATG, Vieira SM, Carregaro V. (2009)  
Voswinckel R, Hoeper MM, Kramm T, Ghofrani HA; Right heart failure in chronic  
pulmonary hypertension and acute pulmonary embolism. *Internist (Berl)*. 2012; 53 (5):535-56

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced  
by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332(6163):411-5

Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth  
to PDGF: effects of ETA und ETB rezeptor blockade. *Circulation* 1999;100 (1):5-8

Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA, Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial  
Stiffness, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), 932-43.



## 9. Anhang

### 9.1 Veröffentlichte Abstracts und Vorträge

Die Arbeit diente als Grundlage für Veröffentlichungen und Kongresspräsentationen. Im Folgenden sind die veröffentlichten Abstracts angehängt. Im Anschluss folgt eine Auflistung der bisher gehaltenen Kongressvorträge und Posterpräsentationen.

#### Veröffentlichte Abstracts:

1. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2016): Are Pulmonary Veins an Equivalent Tool for Pharmacological Studies? – Histological Evaluation of Wall Construction. Eur Surg Res 2016;57: 318
2. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2016): Distribution of Vasoactive Receptors in the Vessel Wall of Human Pulmonary Vessels – An Immunohistochemical Study. Eur Surg Res 2016;57: 319
3. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, Hofmann H.-S, von Süsskind-Schwendi M (2016): Sind Pulmonalvenen den Pulmonalarterien gleichzustellen? Eine histologische Untersuchung. Zentralbl Chir 2016; 141 - PP5
4. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2016): Vasomodulierende Rezeptoren an humanen Pulmonalgefäßen – eine immunhistochemische Untersuchung. Zentralbl Chir 2016; 141 - FP2
5. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2017): Targeted Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie – immunhistologische Aspekte. Eur Surg Res Vol. 58, Suppl. 1, 2017
6. **Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2017): Target distribution of PDE-5-inhibitors and endothelin-1-antagonists in human pulmonary vessels – an immunohistochemical study. Innov Surg Sci 2017; 2, (Suppl 1): s310–s326
7. **Hertling S**, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S (2017): Targetverteilung von PDE-5-Hemmern und Endothelin-1-Rezeptorantagonisten in humanen Pulmonalgefäßen – eine immunhistochemische Untersuchung. Pneumologie 2017; 71(S 01): S1-S125

## **(Kongress)Vorträge**

1. Die Verteilung vasoaktiver Rezeptoren in humanen Pulmonalgefäßen – Immunhistochemische Untersuchung

**Hertling S**, Ried M, Lehle K, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S;

Orientierungstag Forschung 2015, 28.10.15, Uniklinikum Regensburg

2. Are Pulmonary Veins an Equivalent Tool for Pharmacological Studies? – Histological Evaluation of Wall Construction

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S; 20. Chirurgische Forschungstage, 08.09. bis 10.09.2016, Magdeburg (internationaler Kongress) Distribution of

3. Vasoactive Receptors in the Vessel Wall of Human Pulmonary Vessels – An Immunohistochemical Study

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S; 20. Chirurgische Forschungstage, 08.09. bis 10.09.2016, Magdeburg (internationaler Kongress)

4. Sind Pulmonalvenen den Pulmonalarterien gleichzustellen? Eine histologische Untersuchung

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, Hofmann H-S, von Süsskind-Schwendi M;

25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie und 4. D-A-CH-Tagung gemeinsam mit: Österreichischer Gesellschaft für Thorax- und Herzchirurgie und Schweizerischer Gesellschaft für Thoraxchirurgie, 29.09.2016 bis 01.10.2016, Freiburg (internationaler Kongress)

5. Vasomodulierende Rezeptoren an humanen Pulmonalgefäßen – eine immunhistochemische Untersuchung

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S;

25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie und 4. D-A-CH-Tagung gemeinsam mit: Österreichischer Gesellschaft für Thorax- und Herzchirurgie und Schweizerischer Gesellschaft für Thoraxchirurgie, 29.09.2016 bis 01.10.2016, Freiburg (internationaler Kongress)

6.Targeted Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie – immunhistologische Aspekte

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S; 134. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, 21. Bis 24.03.2017, München  
(internationaler Kongress)

7.Target distribution of PDE-5-inhibitors and endothelin-1-antagonists in human pulmonary vessels – an immunohistochemical study

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S; 134. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, 21. Bis 24.03.2017, München  
(internationaler Kongress)

## **9.2 Poster**

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, Hofmann H-S, von Süsskind-Schwendi M: Sind Pulmonalvenen den Pulmonalarterien gleichzustellen? Eine histologische Untersuchung

25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie und 4. D-A-CH-Tagung gemeinsam mit: Österreichischer Gesellschaft für Thorax- und Herzchirurgie und Schweizerischer Gesellschaft für Thoraxchirurgie, 29.09.2016 bis 01.10.2016, Freiburg

**Hertling S**, Lehle K, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S: Target distribution of PDE-5-inhibitors and endothelin-1-antagonists in human pulmonary vessels – an immunohistochemical study

134. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, 21. Bis 24.03.2017, München

**Hertling S**, Ried M, von Süsskind-Schwendi M, Hofmann H-S: Targetverteilung von PDE-5-Hemmern und Endothelin-1-Rezeptorantagonisten in humanen Pulmonalgefäßen – eine immunhistochemische Untersuchung

58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 22.03.2017 bis 25.03.2017, Stuttgart

## **DGT-Kongress 2016, Freiburg**

Hintergrund. Klinische und pharmakologische Studien zur pulmonal-arteriellen Hypertonie sind vorhanden. Allen gemein ist die Beschreibung eines optimalen Behandlungsregimes. Pulmonalarterien (PA) nehmen eine zentrale Stellung ein.

Material und Methode. 50 Patienten wurde während einer elektiven Lobektomie Segmente von PA und PV entnommen und histologische Gefäßquerschnitte gefärbt (HE, Sirius, SMA). Dabei handelt es sich um klinisch unauffällige Gefäßabschnitte. Zwei Untersucher haben die Präparate unabhängig und verblindet ausgewertet.

Ergebnis. Die HE-Färbungen von PA und PV zeigten den typischen Aufbau eines Gefäßes mit Intima, Media und Adventitia. In der Tunica Media beider Gefäßarten befand sich der höchste Anteil an Kollagenfasern und glatten Muskelzellen. Hierbei zeigte sich, dass diese im Verhältnis zur Gefäßgröße annähernd gleichwertig bei beiden Gefäßtypen ausgeprägt waren. In 28 % der PV konnten glatte Muskelzellen als abgegrenzte Zellinseln (SMA-positiv) in derer Tunica Adventitia nachgewiesen werden. Diese Zellinseln waren größer, je stärker die zugehörige Media schien. Innerhalb der drei Gefäßschichten konnten in beiden Gefäßtypen Veränderungen beobachtet werden (42 % Wandverdickungen und 20 % artherosklerotische Ausprägungen).

Schlussfolgerung. Diese histologische Untersuchung zeigt eine Ähnlichkeit im Aufbau der PA und PV. Da bisher das Hauptaugenmerk auf der PA lag, sollte nunmehr auch der PV mehr Beachtung geschenkt werden. Die beschriebenen abgegrenzten Zellformationen können für eine kontraktile Einheit sprechen, sodass die Kontraktionsfähigkeit beider Gefäßarten ähnlich ausfallen könnte. Für künftige pharmakokinetische Untersuchungen (Organbadversuche) wäre es sinnvoll beide Gefäßtypen zu untersuchen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Wandaufbau der Gefäße und die beschriebenen Auffälligkeiten einen Einfluss auf die Rezeptorverteilung haben und somit die Therapie und Wirkungsweise von Medikamenten beeinflussen können.

## **DGT-Kongress 2016, Freiburg**

Hintergrund. Die pulmonale-arterielle Hypertonie (PAH) ist durch eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf gekennzeichnet. Bei der Pathogenese nehmen vasomodulierende Faktoren eine Schlüsselrolle ein.

Material und Methode. 50 Patienten wurden während einer Lobektomie Segmente von Pulmonalarterie (PA) und Pulmonalvene (PV) entnommen. Mittels Immunhistologie wurden Endothelinrezeptoren ETa/ETb, sowie der Phosphodiester-5(PDE5)-Rezeptor untersucht. Zwei Untersucher werteten die Gefäßschnitte unabhängig und verblindet mit einem dafür konzipierten Auswertungsscores aus.

Ergebnis. Beide Gefäßarten hatten ein ähnliches Anfärbeverhalten. ETa und ETb-Rezeptoren färbten sich positiv (++) in allen Wandschichten. In Anlehnung an die Veränderungen der Wandschichten (z.B. Intimafibrose) zeigten sich in diesen Bereichen auch Veränderungen in der Rezeptordichte sowie deren Anfärbbarkeit. Pathologisch unauffällige Gefäße präsentieren ein homogenes Verteilungsmuster, während dies in pathologisch veränderten Bereichen sich änderte. So verstärkte sich die Anfärbbarkeit zu stark positiv (+++) von Eta/Etb-Rezeptoren bei Intimaveränderungen. Dies wurde in PA und PV gleichermaßen beobachtet. Eine leichte positive (+) Färbung des PDE5- Rezeptors konnte in PA und PV in allen Wandschichten dargestellt werden. Er zeigte eine schwächere Verteilung in beiden Gefäßen als die Endothelin-Rezeptoren. Bei vermehrter Neovaskularisation im peripheren Gefäßschnitt der PA verstärkte sich das Auftreten des PDE5-Rezeptors Richtung Gefäßlumen (++).

Schlussfolgerung. Die untersuchten Rezeptoren treten in allen Gefäßschichten auf. Ein Vorkommen auf einen Wandabschnitt allein scheint nicht der Fall zu sein. Bei strukturellen Veränderungen der Gefäßwand erscheint die Rezeptorverteilung verändert. PA und PV zeigen ein ähnliches Anfärbeverhalten für ETa-, ETb- und PDE5-Rezeptoren, sodass vasomodulierende Substanzen zur Therapie der PAH sowohl durch die Wirkung an PA als auch an PV wirken können.

## 10. Lebenslauf

Name: Hertling

Vornamen: Stefan Ferdinand

Geburtsdatum/-ort: 02.02.1988 in Köthen/Anhalt

Wohnort: Sperbersloher Straße 33 A, 90530 Wendelstein

Familienstand: ledig

Studium: 2013 1. Staatsexamen  
2016 2. Staatsexamen  
2017 3. Staatsexamen

Wendelstein, 11.05.2018

Stefan Ferdinand Hertling

## 11. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann für die Übernahme der Doktorvaterschaft und die kompetente und durchweg angenehme Betreuung dieser Dissertation bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michael Ried für die fachliche und praktische Betreuung während der gesamten Projektdauer.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi für ihre durchweg intensive und unermüdliche Betreuung. Vor allem bei der Projektdurchführung sowie der Präparatauswertung stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite. Auch menschlich fand ich besondere Wertschätzung. Hier bedanke ich mich vor allem für den unermüdlichen Zuspruch und den Glauben und Unterstützung für meine Vorhaben. Ein großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle. Besonders ihre hilfreichen Tipps zur Durchführung und zum Verfassen dieser Arbeit haben diese vorangebracht. Auch möchte ich mich bei Ihr für die konstruktiven Diskussionen bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht dabei auch an Frau Katrin Bielenberg für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung der immunhistochemischen Schnitte. Ohne ihre Mitarbeit wäre eine Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Auch möchte ich mich bei ihr für ihre zwischenmenschliche Unterstützung bedanken. Gerne erinnere ich mich an die gemeinsamen, oft spätabendlichen Gespräche zurück. Danke!

Frau PD Dr. med. Petra Rümmele danke ich für die tatkräftige und sachkundige Unterstützung bei der Beurteilung der Präparate.

Auch Frau cand. med. Elke Boxhammer gilt mein besonderer Dank. Du hattest zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr und unterstützende Worte für mich. Danke dir dafür!

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei vielen Menschen bedanken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg geprägt, begleitet und unterstützt haben. Mein herzlicher Dank gilt hier meinen Eltern, meiner Schwester Doreen und Benjamin Hell.

Mein besonderer Dank gilt auch Fr. Dr. med. Franziska Loss für die uneingeschränkte Unterstützung.



## **Erklärung**

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 Vermittlung- 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 steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stefan Ferdinand Hertling

Regensburg, 2018