

*AUS DER ABTEILUNG
FÜR THORAXCHIRURGIE
PROF. DR. HANS-STEFAN HOFMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*KOMBINATIONSTHERAPIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE
MIT VARDENAFIL UND BOSENTAN IN EINEM EX-VIVO/IN-VITRO-SETTING*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Thomas Stadlbauer

2020

*AUS DER ABTEILUNG
FÜR THORAXCHIRURGIE
PROF. DR. HANS-STEFAN HOFMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*KOMBINATIONSTHERAPIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE
MIT VARDENAFIL UND BOSENTAN IN EINEM EX-VIVO/IN-VITRO-SETTING*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Thomas Stadlbauer

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Christian Schulz*

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Januar 2020

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	Seite 5
1.1. Hintergrund.....	Seite 5
1.2. Definition PAH.....	Seite 6
1.3. Epidemiologie und klinische Einteilung.....	Seite 6
1.4. Klinik und Diagnostik.....	Seite 9
1.5. Pathophysiologie.....	Seite 10
1.5.1. Pathomechanismus.....	Seite 10
1.5.2. Endothelin - Signalweg.....	Seite 10
1.5.3. NO/cGMP - Signalweg.....	Seite 11
1.5.4. Prostacyclin - Signalweg.....	Seite 12
1.6. Pathohistologie.....	Seite 13
1.7. Therapie.....	Seite 15
1.7.1. Therapeutische Ziele und Ansätze.....	Seite 15
1.7.2. Prostacyclin und Derivate.....	Seite 16
1.7.3. Bosentan.....	Seite 17
1.7.4. Vardenafil.....	Seite 19
1.7.5. Kombinationstherapie.....	Seite 20
1.8. Zielsetzung.....	Seite 21
2. Material/Methoden	Seite 24
2.1. Blutgefäße.....	Seite 24
2.1.1. Rindervenen.....	Seite 24
2.1.2. Humane Pulmonalgefäße.....	Seite 25
2.2. Organbad-Methodik.....	Seite 26
2.3. Substanzen.....	Seite 29
2.4. Versuchsdurchführung.....	Seite 32
2.5. Versuchsprotokoll.....	Seite 33
2.5.1. Etablierung: Dosis-Wirkungskurve (Vardenafil).....	Seite 33
2.5.2. Vergleich von Mono- und Kombinationstherapie.....	Seite 33
2.6. Auswertung/Statistik.....	Seite 34

3. Ergebnisse	Seite 35
3.1. Etablierung der Methodik anhand von Rindervenen.....	Seite 35
3.1.1. Lagerung bei 4° C für 24 Stunden.....	Seite 36
3.1.2. Fehlerhafte Normierung des maximalen Kontraktionsniveaus.....	Seite 36
3.1.3. Ergebnisse der übrigen Versuche.....	Seite 37
3.2. Humane Pulmonalgefäße aus Lungentransplantationen.....	Seite 39
4. Diskussion	Seite 44
5. Zusammenfassung	Seite 59
6. Anhang	Seite 61
6.1. Verzeichnis der Abkürzungen.....	Seite 61
6.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	Seite 63
6.2.1. Abbildungen.....	Seite 63
6.2.2. Tabellen.....	Seite 63
7. Literaturverzeichnis	Seite 64
8. Danksagung	Seite 73
9. Selbstständigkeitserklärung	Seite 74

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Bei der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) handelt es sich um einen pathologischen Anstieg der Druckverhältnisse im Lungenkreislauf. Während die idiopathische PAH als eigenständiges Krankheitsbild zu verstehen ist, umfasst der Überbegriff der pulmonalen Hypertonie (PH) zusätzlich sämtliche übernormwertigen Druckerhöhungen, die als Folge einer kardialen, pulmonalen oder systemischen Grunderkrankung auftreten (1). Unabhängig von ihrer Genese stellt die PH eine gravierende Kreislaufdysregulation dar, die unbehandelt zur kardialen Dekompensation in Form einer Rechtsherzinsuffizienz führt (2). Die einzige kausale Therapie der PH besteht in der Behandlung der Grunderkrankung, sofern möglich. Darüber hinaus existieren pharmakologische Ansätze zur Senkung des pulmonalen Blutdrucks. Die drei wesentlichen Medikamentenklassen sind Prostacyclin-Analoga, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sowie Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (3 – 5). Sie induzieren vor allem in den arteriellen Lungengefäßen eine Vasodilatation und verringern so die Nachlast des rechten Ventrikels, wodurch sich die Symptomatik der Patienten bessert. Durch den kombinierten Einsatz mehrerer Substanzklassen lässt sich dieser Effekt klinisch steigern (6).

Obwohl die medikamentöse Behandlung in den vergangenen drei Jahrzehnten stetig weiterentwickelt wurde, sind die pathophysiologischen Hintergründe der PAH/PH derzeit noch nicht restlos geklärt. Mehrheitlich beruht der aktuelle Kenntnisstand der Therapie auf den Ergebnissen klinischer Studien, welche allerdings für die Erschließung pharmakologischer Interaktionen oder von Dosis-Wirkungs-Relationen nur bedingt geeignet sind. Für diese experimentelle Grundlagenforschung sind spezielle *in-vitro*-Methoden wie die Untersuchung isolierter Lungengefäße im Organbad hilfreich. Anders als in der klinischen Anwendung kann im Organbad die Reagibilität der Pulmonalgefäße auf die Zugabe vasoaktiver Substanzen dosisabhängig evaluiert werden (7). Die hierzu bisher veröffentlichten Organbad-Studien wurden allerdings zum großen Teil am Tiermodell durchgeführt, während funktionelle Untersuchungen an humanem Gefäßmaterial noch vergleichsweise selten sind.

1.2. Definition PAH

Die PAH ist charakterisiert durch eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (mPAP) von $14 \pm 3,3$ mmHg beim Gesunden auf Werte von über 25 mmHg in Ruhe. Des weiteren kann ein Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR) auf mehr als 3 WU (*Wood unit*, entspricht 3 mmHg·min/l) beobachtet werden (8). Zur sicheren Stellung der Diagnose ist eine Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter (RHC) notwendig (9).

1.3. Epidemiologie und klinische Einteilung

Die jährliche weltweite Inzidenz der PAH liegt bei etwa ein bis zwei Neuerkrankungen pro Million (10). Sie gehört zum Formenkreis der pulmonalen Hypertonie. Unter diesem Überbegriff werden mehrere Krankheitsentitäten zusammengefasst, denen ein Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR) und damit eine chronische Erhöhung des Drucks im kleinen Blutkreislauf gemeinsam sind. Als langfristige Konsequenz dieses Druckanstiegs kommt es zur Umstrukturierung der betroffenen Gefäße: durch reaktive Proliferation der glatten Muskelzellen der Tunica media nimmt die Wandstärke zu. Dies zieht wiederum eine Verringerung der Gefäßelastizität nach sich. Der PVR steigt an, wodurch die Nachlast des rechten Ventrikels erhöht wird (11). Hierzu trägt auch eine ebenfalls u.a. aufgrund des hohen Druckes entstehende Sklerosierung und Proliferation der Gefäßoberfläche (Intima) bei. Die Konsequenz ist eine deutliche Einengung, im Extremfall sogar eine vollständige Okklusion der betroffenen Gefäße (8). Infolge dieser degenerativen Veränderungen kann es zum Rechtsherzversagen kommen, welches eine häufige lebensbedrohliche Komplikation der PH darstellt (2). Das Risiko für Thromboembolien ist erhöht. Bei einer unbehandelten pulmonalen Hypertonie beträgt die mittlere Überlebenszeit 2,5 Jahre, die Fünf-Jahres-Überlebensraten werden abhängig vom Ausmaß der Druckerhöhung zwischen 49 und 58% angegeben (10, 12).

Der ursächliche Druckanstieg kann sowohl primär als auch sekundär, d.h. in Assoziation mit einer anderen zugrundeliegenden Erkrankung, auftreten. Letztere schließen unter anderem Pathologien des linken Herzens wie Klappenvitien, die einen Blutrückstau in den Lungenkreislauf verursachen können, ein. Auch chronische

Thromboembolien und Krankheiten der Lunge wie das Schlafapnoe-Syndrom und die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) können das Auftreten einer PH begünstigen (1). Umgekehrt beeinträchtigt das Vorliegen einer sekundären PH zusätzlich Lebensqualität und Outcome der Patienten deutlich. Einen ausführlicheren Überblick über die umfangreiche klinische Einteilung der primären und sekundären PH bietet die in *Abbildung 1* dargestellte Nizza-Klassifikation (9).

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der PH stellt die Unterscheidung zwischen prä- und postkapillären Hypertonieformen dar. Die PAH zählt hierbei zu den Erstgenannten, während zu den postkapillären Ursachen des pulmonalen Druckanstiegs beispielsweise die oben erwähnte Linksherzinsuffizienz mit resultierendem Blutrückstau gerechnet wird. In der Diagnostik kann durch eine Untersuchung mittels RHC zwischen einer präkapillären und einer postkapillären PH differenziert werden; der entscheidende Parameter ist der sogenannte *Wedge-Druck* oder Lungenkapillaren-Verschlussdruck (PCWP). Bei einem gemessenen Wert von maximal 15 mmHg kann eine postkapilläre Ursache ausgeschlossen werden.

Detaillierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	
1. Pulmonal arterielle Hypertonie	
1.1 Idiopathisch	
1.2 Hereditär	
1.2.1 BMPR2-Mutationen	
1.2.2 Sonstige Mutationen	
1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht	
1.4 Assoziiert mit:	
1.4.1 Bindegewebserkrankungen	
1.4.2 Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)	
1.4.3 Portaler Hypertension	
1.4.4 Angeborenen Herzfehlern	
1.4.5 Schistosomiasis	
1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämagiomatose	
1'.1 Idiopathisch	
1'.2 Hereditär	
1'.2.1 EIF2AK4-Mutation	
1'.2.2 Sonstige Mutationen	
1'.3 Durch Medikamente, Toxine und Strahlung verursacht	
1'.4 Assoziiert mit:	
1'.4.1 Bindegewebserkrankungen	
1'.4.2 HIV-Infektion	
1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen	
2. Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen	
2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion	
2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion	
2.3 Klappenerkrankungen	
2.4 Angeborene/erworbene Linksherz-Einfluss-/Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien	
2.5 Angeborene/erworbene Pulmonalvenenstenose	
3. Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie	
3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	
3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen	
3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem und obstruktivem Muster	
3.4 Schlafbezogene Atemstörungen	
3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome	
3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe	
3.7 Entwicklungsstörungen der Lunge	
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie und andere Pulmonalarterien-Obstruktionen	
4.1 Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie	
4.2 Andere Pulmonalarterien-Obstruktionen	
4.2.1 Angiosarkom	
4.2.2 Andere intravaskuläre Tumore	
4.2.3 Arteriitis	
4.2.4 Angeborene Pulmonalarterienstenose	
4.2.5 Parasiten (Hydatidose)	
5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem und/oder multifaktoriellem Mechanismus	
5.1 Hämatologische Erkrankungen: chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie	
5.2 Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose	
5.3 Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen	
5.4 Andere: pulmonale tumorbedingte thrombotische Mikroangiopathie, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen (mit/ohne Dialyse), segmentale pulmonale Hypertonie	

Abbildung 1: Klinische Einteilung der pulmonalen Hypertonie anhand der Nizza-Klassifikation (2013) (9)

1.4. Klinik und Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild der PAH/PH ist unspezifisch. Zu den am häufigsten auftretenden Symptomen gehören ein generell reduzierter Allgemeinzustand, Dyspnoe sowohl in Ruhe als auch unter Belastung, Angina pectoris und Kreislaufbeeinträchtigungen bis hin zur Synkope (10). Zudem können bei längerem, untherapiertem Fortbestehen der PH periphere Ödeme, insbesondere im Bereich der Unterschenkel, auftreten. Abhängig von der Schwere der Erkrankung lässt sich analog zur NYHA-Klassifikation (*New York Heart Association*) zwischen vier funktionellen WHO-Klassen unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Formen der PH ausschließlich anhand der klinischen Befunde ist nicht möglich.

Im Bereich der apparativen Diagnostik haben sich bei der Erkennung der PH die Röntgenuntersuchung des Thorax sowie insbesondere die transthorakale Echokardiographie (TTE) und die direkte Druckmessung mittels Rechtsherzkatheter bewährt (9). Parameter wie die rechtsventrikuläre Pumpfunktion und der mPAP lassen sich ebenso beurteilen wie eine Dilatation der Pulmonalarterien und des rechtsseitigen Ventrikels und Vorhofs oder eine Insuffizienz der Trikuspidalklappe. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen etwa 90% der PH-Patienten korrelierende pathologische Röntgenbefunde auf (9). Weitere, allerdings unspezifische Befunde lassen sich mitunter auch in der Lungenfunktionsdiagnostik erheben: abgesehen von einer eingeschränkten CO-Diffusionskapazität (DLCO) können auch niedrigere arterielle Blutgaswerte (pO₂, pCO₂) als Zeichen der respiratorischen Insuffizienz auftreten (9). Ein verringelter Tiffeneau-Quotient aus der Einsekundenkapazität (FEV₁) und der Vitalkapazität (VC), der ab einem Wert von unter 0,7 auf eine Atemwegsobstruktion hindeuten würde, kommt bei der idiopathischen PAH dagegen eher selten vor (13).

Von den oben genannten diagnostischen Methoden kann allerdings nur eine Untersuchung mittels RHC den zweifelsfreien Nachweis einer PH erbringen. In den Leitlinien der *European Society for Cardiology* und der *European Respiratory Society* (ESC/ERS) ist die RHC daher als obligates Mittel zur Diagnosesicherung festgelegt (Stand: 2015). Neben der invasiven Messung von mPAP und PCWP ist hier auch eine genaue Beurteilung des PVR möglich.

1.5. Pathophysiologie

1.5.1. Pathomechanismus

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die PH kurzfristig durch einen Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes und folglich des pulmonalarteriellen Drucks, langfristig durch einen Umbau der Gefäßwand gekennzeichnet. Die für diese Veränderungen ursächlichen Mechanismen sind einerseits eine dauerhafte Erhöhung des Gefäßtonus (Vasokonstriktion) und andererseits eine Schädigung des Endothels, unter anderem als wahrscheinliche Folge der veränderten hämodynamischen Verhältnisse und gesteigerten Scherkräfte, die auf die Blutgefäße einwirken (14). Verletzungen der Gefäßwand, Hypoxie und inflammatorische Vorgänge tragen darüber hinaus zum *vaskulären Remodeling* bei (8). Durch den endothelialen Funktionsverlust ergibt sich ein Ungleichgewicht zwischen der Sekretion von Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 (ET-1), und Vasodilatatoren, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostacyclin.

1.5.2. Endothelin-Signalweg

ET-1 ist die stärkste der drei bekannten Endothelin-Varianten und wird in den Endothelzellen synthetisiert. Seine Wirkung entfaltet es über zwei verschiedene Rezeptortypen, ET_A und ET_B, die an der Oberfläche der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand lokalisiert sind. Zudem existiert eine weitere Variante von ET_B-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der Endothelzellen befinden (Abb. 2). Während die muskulären ET_A- und ET_B-Rezeptoren eine Kontraktion der glatten Muskulatur vermitteln können, wird durch Stimulation des endothelialen ET_B-Subtyps die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert, welche eine Relaxation der Muskelzellen der Tunica media induziert. Der Abbau von ET-1 erfolgt ebenfalls ET_B-vermittelt. Man spricht hierbei von der *ET-1-Clearance* (15 – 17). Für die Pathophysiologie der PAH/PH ist ET_A von weitaus größerer Bedeutung; etwa 90% der Endothelin-Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Lungengefäße gehören diesem Subtypen an (18). Durch Anbindung von ET-1 an ET_A kommt es G-Protein-vermittelt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration und infolgedessen zur Kontraktion der Muskelzelle im Sinne einer Vasokonstriktion.

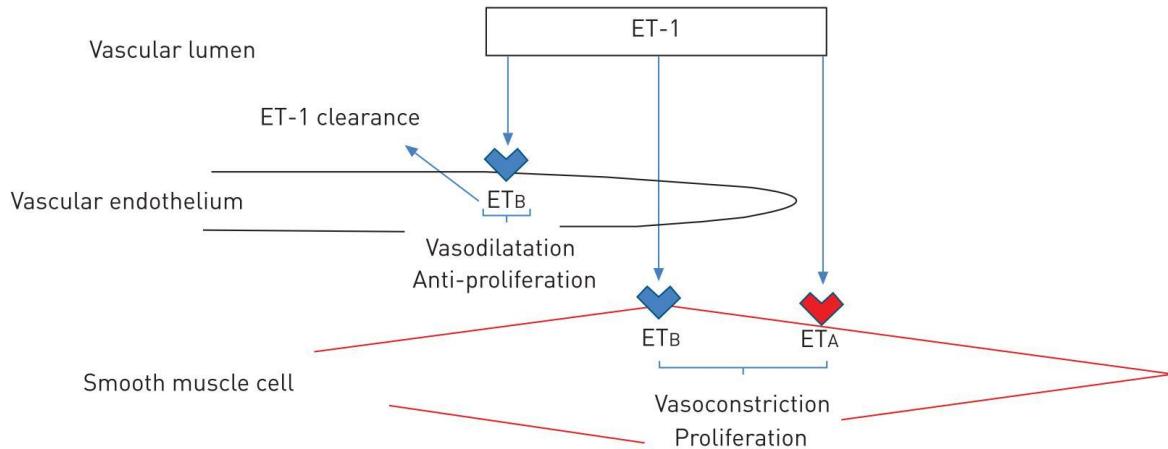


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Endothelin-Signalwegs (19)

Darüber hinaus wirkt ET-1 in Verbindung mit Entzündungsmediatoren als Mitogen für die glatte Muskulatur und bewirkt so eine Proliferation der Tunica media (20).

1.5.3. NO/cGMP-Signalweg

Gleichermaßen bedeutsam für die Entstehung der PH ist der NO/cGMP-Signalweg (Abb. 3). Ähnlich wie Endothelin entsteht auch NO in den Endothelzellen der Gefäße und gelangt von dort entweder in den Blutkreislauf oder durch Diffusion direkt in die glatten Muskelzellen der Media. In der Muskulatur aktiviert NO die zytosolische Guanylat-Cyclase; dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (*cyclisches Guanosin-Monophosphat*). Mittels cGMP-abhängiger Proteinkinasen wird ein Kalziumausstrom aus der Zelle induziert, wodurch es zu einer Relaxation der Gefäßwandmuskulatur kommt (21). Bei Vorliegen einer PH ist dieser Signalweg in gleich doppelter Hinsicht beeinträchtigt: einerseits kommt es durch verminderte Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zu einer geringeren NO-Sekretion (22). Auf der anderen Seite ist die Aktivität der Phosphodiesterase-5 (PDE-5) erhöht (23). Dieses Enzym ist für den hydrolytischen Abbau von cGMP in den glatten Muskelzellen verantwortlich und hemmt dadurch zusätzlich die relaxierende Wirkung von NO.

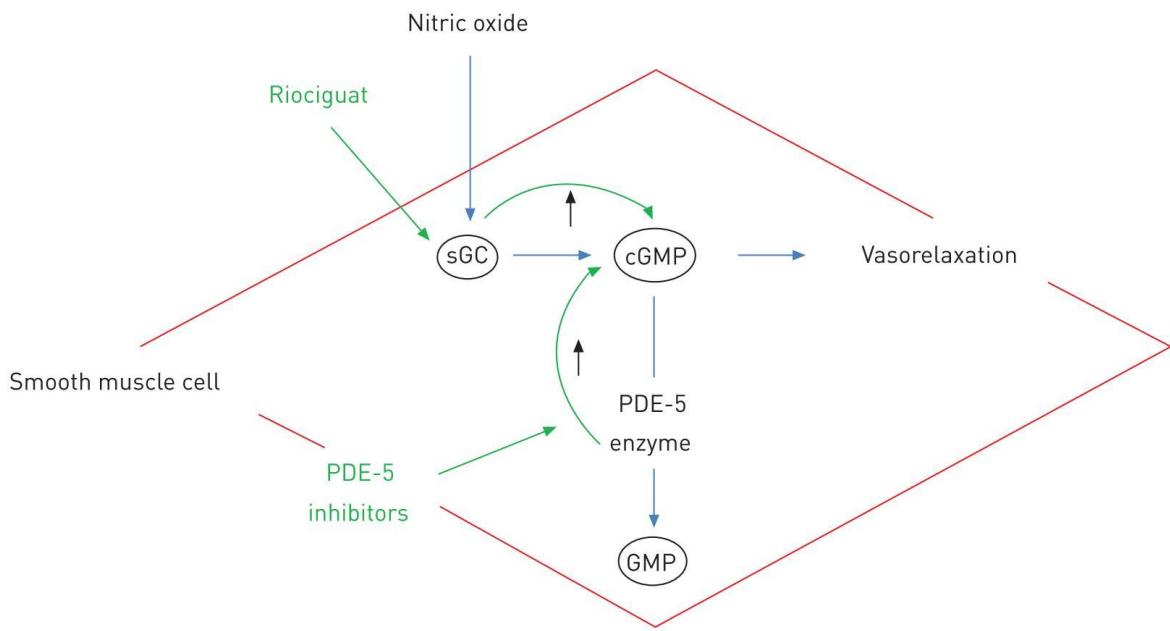


Abbildung 3: Schematische Darstellung des NO/cGMP-Signalwegs (19)

1.5.4. Prostacyclin-Signalweg

Als drittem zentralen Faktor für die Entstehung der PAH soll im Folgenden noch auf den Prostacyclin-Signalweg eingegangen werden. Auch Prostacyclin wird in den vaskulären Endothelzellen synthetisiert (19). Abhängig vom gebundenen Rezeptortyp kann entweder eine Vasodilatation (IP, DP₁, EP₂, EP₄) oder eine Vasokonstriktion (EP₁, EP₃, FP, TP) induziert werden. Für die Lunge und somit für die Pathogenese der PAH sind jedoch lediglich IP, EP₃ und TP von Bedeutung; die übrigen Rezeptoren finden sich hauptsächlich an der glatten Muskulatur des systemischen Blutkreislaufes (24). Die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen erfolgt G-Protein-vermittelt durch Stimulation der zytosolischen Adenylylatcyclase, was einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (*cyclisches Adenosin-Monophosphat*) bewirkt. Die Folge ist ein vermehrter Kalziumausstrom, ermöglicht durch die Aktivierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen. Seine vasokonstriktive Wirkung entfaltet Prostacyclin entweder über die Inhibition der Adenylylatcyclase (EP₃) oder durch Stimulation der Phospholipase C (TP, FP, EP₁), welche eine vermehrte Kalziummobilisation bedingt (25). Da Prostacyclin in der Lunge eine besonders hohe Selektivität für den IP-Rezeptor aufweist (24), überwiegt dort folglich die gefäßerweiternde Wirkung; diese entfällt jedoch bei Vorliegen einer PAH, da die

endotheliale Prostacyclin-Synthese eingeschränkt ist (26). Im Gegenzug liegt außerdem eine vermehrte Expression von Thromboxan A2 vor, was eine Vasokonstriktion und darüber hinaus eine gesteigerte Thrombozytenaggregation mit konsekutiv erhöhtem thromboembolischen Risiko nach sich zieht (27). Im Hinblick auf therapeutische Ansatzpunkte erscheint es einleuchtend, mithilfe einer selektiven Stimulation des IP-Rezeptors eine pulmonale Vasodilatation zu induzieren. In diesem Zusammenhang soll an späterer Stelle noch auf den neuen IP-Rezeptoragonisten Selexipag eingegangen werden.

1.6. Pathohistologie

Mikroskopisch stellt sich die PH als recht heterogene Pathologie dar. Auffällig und für die Krankheitsentwicklung von zentraler Bedeutung ist dabei die ausgeprägte Proliferation der Gefäßwand. Diese Proliferation beruht auf einem unkontrollierten Wachstum von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie dem Auftreten inflammatorisch aktiver Zellen (Lymphozyten, Mastzellen, Makrophagen; Abb. 4) speziell im perivaskulären Bereich (8). Die genauen Pathomechanismen sind hierbei noch nicht geklärt: eine mögliche Ursache liegt in der Ansammlung von extrazellulärer Matrix, welche Zellwachstum und die Einwanderung monozytärer Zellen induziert sowie die Bildung von Kollagen, Fibronectin und Laminin stimuliert (8). Wenngleich unwahrscheinlich, ist ebenfalls noch nicht geklärt, inwieweit auch die Therapie mit Prostacyclinen das Auftreten von Entzündungszellen beeinflusst (28). *Stacher et al.* untersuchten 2012 in einer groß angelegten Studie (n=90) histologische Auffälligkeiten in den Pulmonalgefäßen lungentransplantiertener PH-Patienten und setzten diese in Korrelation mit den gemessenen hämodynamischen Parametern (28). Im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Verdickung von Intima und Media (Abb. 5), jedoch weniger der Adventitia. Insbesondere die Intimaproliferation war mit einem um mehr als das Dreifache erhöhtem Durchmesser deutlich erkennbar und sowohl kon- als auch exzentrisch ausgeprägt (28). Darüber hinaus waren bei 90% der Patienten mit PAH sogenannte plexiforme Läsionen (Abb. 6) zu finden (28). Dabei handelt es sich um Endothelzellwucherungen, deren Aussehen an die Glomerula der Niere erinnert (8). Umso stärker war das Intimaremodeling bei Patienten ausgeprägt, die eine Mutation im BMPR-II-Gen aufwiesen – der häufigsten Mutation bei Patienten mit familiärer

PAH (9). Im Vergleich zu den zuvor erhobenen Werten von mPAP und PVR zeigte sich insbesondere ein signifikanter Zusammenhang mit der Proliferation der Media, während Veränderungen an der Adventitia offensichtlich nur geringen Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik haben (28). Es wird also deutlich, dass im Sinne einer zielorientierten Therapie der PH die langfristige Vermeidung eines umfangreichen Gefäßumbaus hohe Priorität haben sollte.

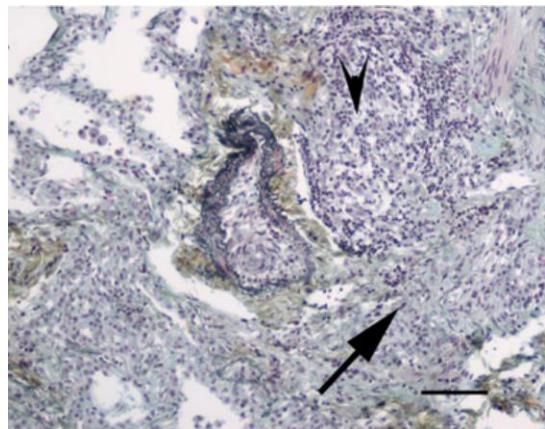


Abb. 4: Fibrosierung (Pfeil) und inflammatorische Infiltrate (Pfeilspitze)(Russel-Movat-Pentachromfärbung) (28)

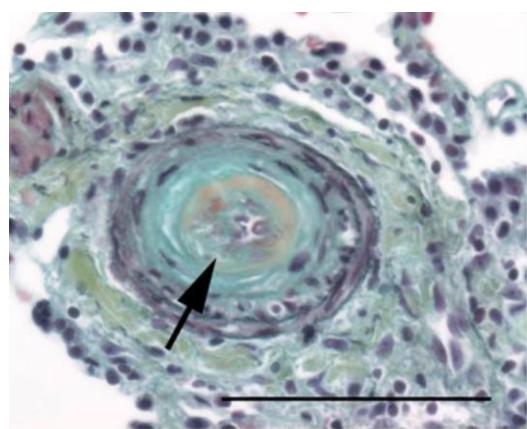


Abb. 5: Intimaverdickung mit subtotaler luminaler Okklusion (Russel-Movat-Pentachromfärbung) (28)

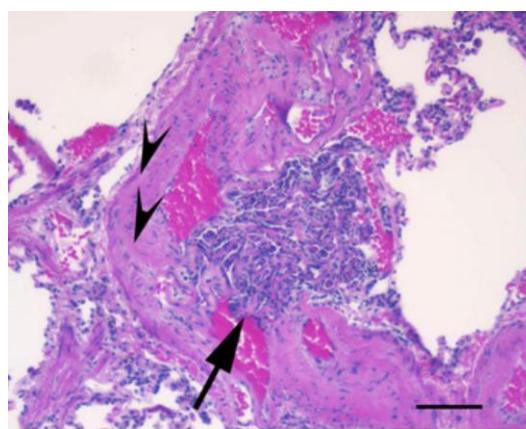


Abb. 6: Plexiforme Läsion (Pfeil) aus einer Arterie (Pfeilspitzen) (HE) (28)

1.7. Therapie

1.7.1. Therapeutische Ziele und Ansätze

Da die primäre (idiopathische) PAH nach heutigem Forschungsstand nicht heilbar ist, werden in den Behandlungsleitlinien eine Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit, der rechtsventrikulären Funktion und der Lebensqualität sowie eine Senkung der Mortalität als therapeutische Ziele postuliert (9). Zur Objektivierung der oben genannten Therapieziele in Form messbarer Parameter bieten sich unter anderem Herzindex (HI), funktionelle WHO-Klasse (WHO-FC), die zurückgelegte Strecke im Sechs-Minuten-Gehtest (6MWD), die gemischtvenöse Sauerstoffsättigung sowie die Konzentration von NT-proBNP im Blut an (29 – 31). Diese Variablen haben sich sowohl vor Therapiebeginn als auch im Verlauf als aussagekräftige prognostische Marker für den Behandlungserfolg erwiesen (29, 32). Für die therapeutische Verlaufskontrolle anhand solch objektiver Parameter hat sich der Begriff des *goal-oriented Treatment* etabliert. Medikamentöse Therapiealternativen sind neben den bereits erwähnten Prostacyclinderivaten sowie den oral verfügbaren ET-1-Antagonisten (Bosentan, Ambrisentan) und PDE-5-Inhibitoren (Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil) auch, wenngleich in eher eingeschränktem Ausmaß, Kalziumkanalblocker (CCBs) wie Diltiazem und Nifedipin (9). All diesen Medikamenten ist eine vasodilatative Wirkung und damit eine Senkung des PVR gemeinsam. Zwar zählt der PVR isoliert betrachtet nicht zu den Targets der *goal-oriented Therapy*, jedoch beeinflusst er sowohl den HI als auch den rechtsventrikulären Druck; beide sind Parameter, die in der Behandlung der PAH von hohem prädiktivem Wert für das Patientenoutcome sind (32).

Aktuell beruht die Therapie der PAH auf einem dreistufigen Schema. Während die genannten Pharmaka allesamt den Stufen II und III zuzuordnen sind, finden sich auf der ersten Behandlungsstufe eher allgemeine und supportive Maßnahmen. Dazu gehören unter anderem die Gabe von Sauerstoff, Diuretika oder Digitalispräparaten. Aufgrund der veränderten hämodynamischen Eigenschaften im Lungenkreislauf und des daraus resultierenden erhöhten Risikos für Thromboembolien sollte außerdem eine antikoagulative Therapie erwogen werden (9). Bei einer sekundären PH steht in erster Linie die Therapie der zugrunde liegenden Erkrankung im Fokus.

1.7.2. Prostacyclin und Derivate

Frühere Therapieansätze wie beispielsweise die therapeutische Substitution von NO erscheinen nicht zuletzt aufgrund der geringen Halbwertszeit für eine langfristige Behandlung der PAH als wenig sinnvoll (33). Um die zuvor dargestellten pathologischen Mechanismen wirksam hemmen zu können, mussten andere Alternativen gesucht werden. Als effektiver Ansatzpunkt in der Behandlung der PH hat sich in den vergangenen Jahren der Einsatz von Prostacyclinen, ET-1-Rezeptorantagonisten und PDE-5-Inhibitoren erwiesen. Erstmals konnte im Jahr 1996 mithilfe des Medikaments Epoprostenol ein verbessertes Outcome in der Behandlung von PAH-Patienten erzielt werden (34). Ursprünglich nur als Bridging-Medikament bei Transplantationspatienten gedacht, handelt es sich dabei um ein Prostacyclinanalogon, welches intravenös appliziert wurde und eine deutliche Besserung von Symptomen und Hämodynamik bewirkte (35). Auch zwanzig Jahre später sind nach wie vor Substanzen aus dieser pharmakologischen Gruppe im Einsatz, wie zum Beispiel Treprostinil oder Iloprost. Die Effektivität dieser Prostacyclinderivate wurde in randomisierten kontrollierten Studien (RCTs) evaluiert. Bei jedem der drei Medikamente zeigten sich deutliche Vorteile im Vergleich zu konventioneller Therapie (bestehend u.a. aus Antikoagulation, Langzeit-O₂-Gabe, Diuretika) oder Placebo. So kam es zu einem Anstieg der zurückgelegten Strecke im 6-Minuten-Gehtest, einer Verringerung von PVR und mPAP und einer Verbesserung der Lebensqualität in Form der WHO-Funktionsklasse (35 – 37). Allerdings ist die PAH-Therapie mittels Prostacyclinderivaten auch mit gravierenden Nachteilen und Komplikationen verbunden: zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen neben Schwindel, Kopf- und Gliederschmerzen und Übelkeit auch Hypotonie, Flush und das Auftreten einer Tachykardie (24). Zudem war es bei den ersten Behandlungsversuchen mit Epoprostenol zwingend notwendig, das Medikament kontinuierlich intravenös zu verabreichen: Grund dafür war die kurze Halbwertszeit von weniger als sechs Minuten (9). Diese invasive Applikationsform führte in der Folge nicht nur zu einem erhöhten Risiko für Infektionen oder Thromboembolien, sondern bedeutete für die Patienten auch einen größeren Aufwand, was das Vorbereiten und Verabreichen der Infusionen zuhause betraf. Erst einige Jahre später wurde dieser Problematik Rechnung getragen, als mit Treprostinil (subkutan) und Iloprost (inhalativ) neuere Prostacyclinanaloga eingeführt wurden, deren Einsatz

weniger aufwendig und invasiv ist. So kann Treprostinil aufgrund seiner längeren Halbwertszeit von bis zu vier Stunden sowohl intravenös als auch subkutan appliziert werden, wodurch das Infektionsrisiko gesenkt wird (37). Dennoch wird in den aktuellen Leitlinien weiterhin die intravenöse Applikation von Prostacyclinen gerade bei mittelschwerer bis schwerer PAH (WHO-FC III oder IV) ausdrücklich empfohlen (9). Diese Richtlinie wird in der Praxis allerdings nicht immer befolgt, wie die 2011 erschienene *Registry to Evaluate Early and Long-Term PAH Disease Management (REVEAL)* zeigte: so waren nur etwa 43% der eingeschlossenen Patienten im Verlauf ihrer PAH-Therapie mit intravenösem Prostacyclin behandelt worden, bevor sie an den Folgen ihrer Erkrankung verstorben waren (24, 38). Als mögliche Gründe für diesen Mindereinsatz von Prostacyclinen wurden, abgesehen von den bereits erwähnten Risiken für Infektionen und Thromboembolien sowie dem erhöhten Aufwand, auch Ungenauigkeiten im Follow-up ausgemacht, wodurch eine Zustandsverschlechterung des Patienten leicht übersehen werden kann. Zudem bestehe die Gefahr, dass Ärzte ihren oftmals älteren und multimorbidien Patienten keine komplexe intravenöse Therapie zumuten wollen (38).

Mit dem neuen oralen Prostacyclin-Rezeptoragonist Selexipag existiert bereits ein therapeutischer Ansatz, der in dieser Problematik Abhilfe schaffen könnte. Selexipag wirkt spezifisch am Prostacyclin-Rezeptortyp IP, dessen Stimulation gerade in den Blutgefäßen der Lunge eine Vasodilatation bewirken kann (s. Abschnitt 1.5.4.). Ersten klinischen Untersuchungen zufolge führt Selexipag neben einer Verminderung des PVR auch zu einem Anstieg der 6MWD (39). Ähnlich wie bei den intravenösen Prostacyclinen zählen auch hier Kopf- und Gliederschmerzen zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen (39, 40). In Kombination mit ET-1-Rezeptorantagonisten und/oder PDE-5-Inhibitoren konnte eine Verringerung von Mortalität und Morbidität nachgewiesen werden; in den Leitlinien wurde Selexipag als therapeutische Alternative für die Behandlung von PAH-Patienten der WHO-FC II und III aufgenommen (9).

1.7.3. Bosentan

Bosentan ist ein klinisch erprobter ET-1-Antagonist, der gleichermaßen die Rezeptorsubtypen ET_A und ET_B blockiert (41). In verschiedenen RCTs wurden bei Patienten unter oraler Bosentan-Therapie Verbesserungen von Symptomatik und

Outcome festgestellt (4, 41). Unter anderem wurden bei meist guter Verträglichkeit des Medikaments mehrfach eine Steigerung der zurückgelegten Strecke im 6MWD und eine Verbesserung der WHO-Funktionsklasse beobachtet. Ursache hierfür ist die Senkung von PVR und Nachlast des rechtsseitigen Ventrikels durch Inhibierung der G-Protein-vermittelten Vasokonstriktion. Blieb eine Besserung aus, so konnte zumindest jedoch keine Verschlechterung der genannten Parameter festgestellt werden (41, 42). Untersuchungen am Tiermodell zufolge hemmt Bosentan auch die proliferative Wirkung von ET-1 auf die glatten Muskelzellen der Tunica media (43), was einen wichtigen Faktor für die langfristige Aufrechterhaltung der Lungenfunktion darstellt. Einen Überblick über die Resultate einiger der bedeutendsten klinischen Studien zum Einsatz Bosentans in der Behandlung der PAH bietet *Tabelle 1* (4).

Eine dosisabhängige, pathologische Erhöhung der hepatischen Transaminasen ALT und AST ist die häufigste klinisch relevante Nebenwirkung von Bosentan, welche mitunter auch zum Abbruch der Therapie führen kann (42, 44, 45). Weitere, seltene Nebenwirkungen der ET-1-Antagonisten sind periphere Ödembildung und leichtgradige Anämien (46).

Tabelle 1: Bosentan-Studien (4)

Autor	Name	Jahr	n=	Patienten	Kontrolle	Design	Effekt	p-Wert
Channick	Study 351	2001	32	IPAH;SSc	Placebo	DB R	6MWD +76 m	<0,05
Rubin	BREATHE-1	2002	213	IPAH; CTD	Placebo	DB R	6MWD +35 m	<0,01
Barst	BREATHE-3	2003	19		Baseline	OL	mPAP -8 mmHg PVR -300 dynes/s/cm ⁵	
Humbert	BREATHE-2	2004	33	IPAH; CTD	Placebo	R	PVR -188 dynes/s/cm ⁵	ns
Sitbon	BREATHE-4	2004	16	HIV	Baseline	OL	6MWD +91 m	<0,001
Wilkins	SERAPH	2005	26	IPAH; CTD	Sildenafil	R	6MWD -16 m	ns
Barst	STRIDE-2	2006	185	IPAH; CTD; CHD	Sitaxentan	OL R	6MWD +1,5 m	ns
Galiè	BREATHE-5	2006	54	CHD	Placebo	DB R	PVR -472 dynes/s/cm ⁵ 6MWD +53 m	<0,05 <0,01
Mathai		2006	25	IPAH; SSc	Baseline	OL	6MWD +52 m	ns
Denton	TRUST	2007	53	CTD	Baseline	OL	bessere FC (n=12)	
Akagi		2008	8	IPAH	Baseline	OL	mPAP -13 mmHg	<0,05
Galiè	EARLY	2008	185	IPAH; CHD; CTD; HIV	Placebo	DB R	6MWD +19 m	ns
Jaïs	BENEFIT	2008	99	CTEPH	Placebo	DB R	PVR -197 dynes/s/cm ⁵ PVR -193 dynes/s/cm ⁵ 6MWD +2 m	<0,0001 <0,0001 ns

Abkürzungen: IPAH, idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie; SSc, Sklerodermie-assoziierte PH; CTD, Kollagenose-assoziierte PH; CHD, PH in Assoziation mit kongenitalen Herzfehlern; CTEPH, chronisch-thromboembolische PH; DB, doppelblind; R, randomisiert; OL, open-label;

1.7.4. Vardenafil

Wie bereits zuvor erwähnt bewirkt auch Vardenafil eine Dilatation der Pulmonalgefäße und damit eine Verringerung des PVR (47). Ansatzpunkt ist die Inhibierung des Enzyms PDE-5 im NO/cGMP-Signalweg, wodurch es zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration intrazellulär kommt und somit zu einer verlängerten Relaxation der Gefäßwandmuskulatur (Abb. 7). Verglichen mit den beiden gängigen PDE-5-Inhibitoren Tadalafil und Sildenafil weist Vardenafil aufgrund seiner chemischen Struktur eine höhere Bindungsaffinität für das katalytische Zentrum von PDE-5 auf (48, 49). Das Auftreten des Enzyms ist in der Lunge bei Vorliegen einer PH sehr stark ausgeprägt, was eine mögliche Erklärung dafür darstellt, warum in erster Linie der pulmonale, nicht jedoch der systemische Blutdruck bei Applikation von PDE-5-Inhibitoren gesenkt wird (23). Eine ähnlich große Enzymexpression findet sich zudem in den Schwellkörpern des Penis; tatsächlich wurden und werden Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil auch zur Behandlung von erektiler Dysfunktion eingesetzt (50). Ihre klinische Nutzbarkeit in der Therapie der PH wurde ebenfalls in mehreren RCTs evaluiert (3, 51).

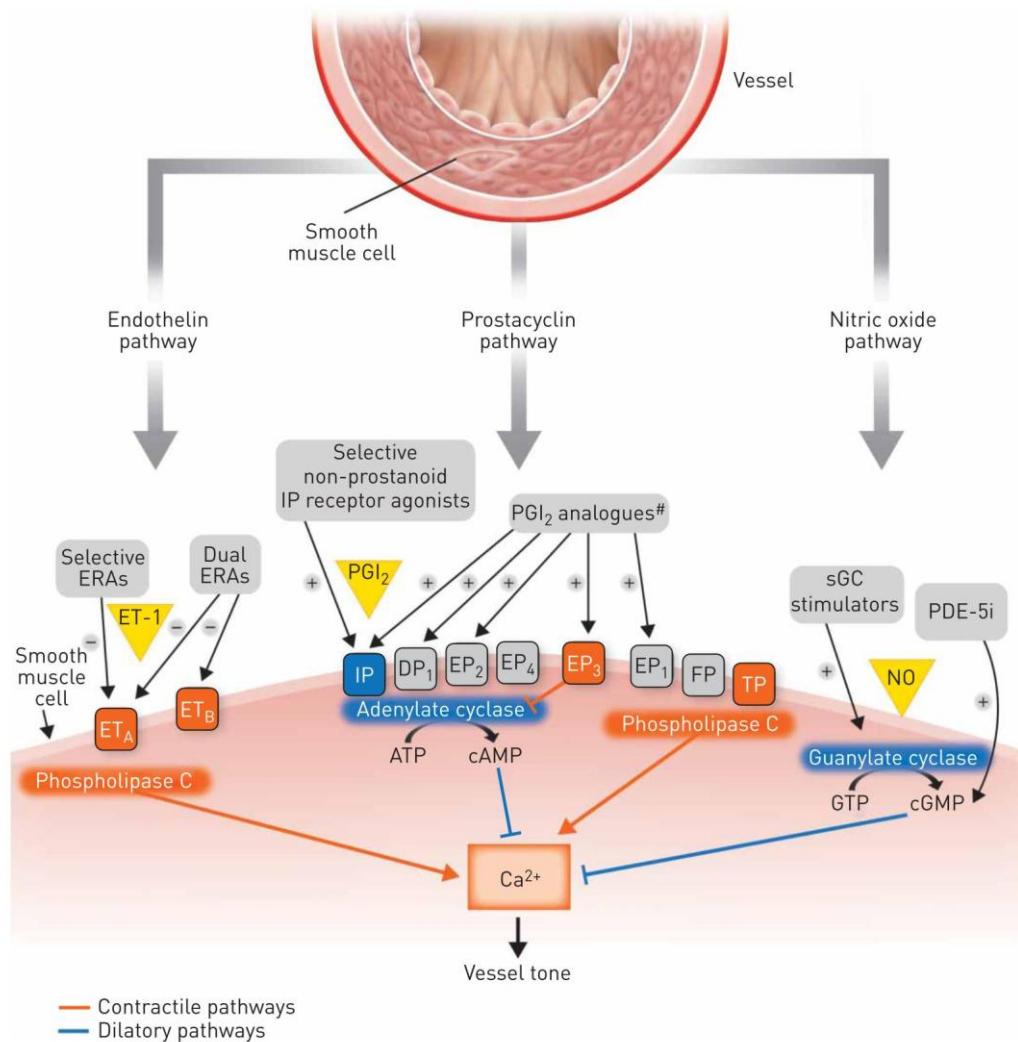


Abbildung 7: Schematische Darstellung der wichtigsten Ansatzpunkte bei der Therapie der PAH (25)

1.7.5. Kombinationstherapie

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der kombinierte Einsatz von Medikamenten aus den oben genannten Gruppen in der Behandlung der PAH. Bei Untersuchungen im experimentellen und klinischen Bereich haben sich kombinierte Therapieregime bereits als erfolgversprechend erwiesen (6, 52). Channick berichtete 2013 von drei erwarteten Vorteilen gegenüber Behandlungsansätzen mit nur einem einzigen Medikament: zunächst könne die PAH durch Kombinationstherapie zielorientierter und somit effizienter therapiert werden. Darüber hinaus sei es möglich, beim Einsatz mehrerer Substanzen die jeweiligen Einzeldosen geringer zu halten als bei einer Einzeltherapie. Hierdurch würde das

Risiko unerwünschter Nebenwirkungen minimiert, ohne dabei insgesamt im Vergleich zur Monotherapie die Wirkung zu verlieren. Drittens verspricht sich Channick durch die Kombinationstherapie eine einfachere Behandlung, beispielsweise durch orale Einnahme von ET-1-Antagonisten und PDE-5-Hemmern anstelle der intravenösen Applikation von Prostacyclinanaloga. Gerade im Hinblick auf die beiden letztgenannten Punkte sei jedoch noch weitere Forschung nötig (6). In der Behandlung der PAH ist der kombinierte Einsatz von Medikamenten unterschiedlicher Substanzklassen bereits etabliert; man unterscheidet zwischen initialer und sequentieller Kombinationstherapie. Letztere ist dabei im Alltag stärker verbreitet und beschreibt nichts anderes als die zusätzliche Gabe eines weiteren Medikamentes bei insuffizienter Monotherapie, ganz im Sinne des *goal-oriented treatment* (29, 31).

1.8. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die vasorelaxierenden Effekte einer Dualtherapie aus Vardenafil (PDE-5-Inhibitor) und Bosentan (ET-1-Antagonist) mit denen der Monotherapie verglichen werden. Die Versuchsreihe wurde als Kooperation zwischen den thoraxchirurgischen Abteilungen der Universitätskliniken Regensburg (UKR) und München (Campus Großhadern) durchgeführt. Zuvor waren durch die PAH-Forschungsgruppe des UKR bereits zwei ähnliche experimentelle Organbad-Untersuchungen an humanen Pulmonalgefäßen lungengesunder Patienten veröffentlicht worden. In einer dieser Arbeiten wurden die Vorteile der kombinierten Gabe des PDE-5-Hemmers Sildenafil zusammen mit Bosentan gegenüber der Monotherapie evaluiert (52). Die zweite Versuchsreihe diente dem Vergleich der Effektivität der drei PDE-5-Inhibitoren Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil in Bezug auf die pulmonale Vasodilatation (53). In beiden Arbeiten wurden im Organbad normotensive Lungengefäße von Patienten untersucht, die sich aufgrund pulmonaler Tumorerkrankungen einer Lobektomie unterzogen hatten. Beide Studien suggerierten einen signifikanten Benefit der Dualtherapie gegenüber der Monotherapie *in vitro*. Zudem hatte sich Vardenafil als der potenteste der drei genannten PDE-5-Inhibitoren erwiesen, weshalb in der vorliegenden Arbeit neben Bosentan auch Vardenafil zum Einsatz kam (52, 53). Einen völlig neuen Ansatz stellte allerdings die funktionelle Untersuchung pathologisch veränderter humaner

Pulmonalgefäße im Organbad dar. Hinter diesem Vorhaben stand der Gedanke, ob hinsichtlich der in-vitro-Reaktionen auf vasokonstriktorische oder –dilatatorische Substanzen nennenswerte Unterschiede zwischen gesunden und hypertensiv veränderten Pulmonalgefäßen existieren, und inwiefern diese Unterschiede Konsequenzen für die klinische Behandlung der PAH nach sich ziehen. Diese Hypothese beruhte auf den bisherigen Erkenntnissen über die Pathophysiologie und Pathohistologie der PAH, welche sich unter anderem durch gesteigerte ET-1-Freisetzung, eine veränderte ET-Rezeptorexpression und eine verringerte Aktivität der eNOS auszeichnet (16, 21, 54 – 56). Das vordergründige Ziel bestand zunächst darin, die relaxierenden Effekte von Vardenafil und Bosentan in Einzeladministration mit denen einer dualen Therapie aus beiden Medikamenten zu vergleichen. Erwartet wurde, dass die kombinierte Zufuhr beider Medikamente eine deutlich stärkere kontraktionshemmende Wirkung auf den Vasotonus hervorrufen würde als die Einzeldosis. Im Vergleich zur Monotherapie waren zwei mögliche Zielgrößen von besonderem Interesse: einerseits die Steigerung des maximalen relaxierenden Effekts auf den pulmonalen Vasotonus durch die simultane Stimulation zweier verschiedener Signalwege; andererseits die Risikoreduktion für Toleranzentwicklung sowie für das Auftreten von Nebenwirkungen durch den Einsatz geringerer medikamentöser Einzeldosen in Dualtherapie, ohne dabei jedoch insgesamt an kontraktionshemmender Wirkung einzubüßen. Darüber hinaus sollten anhand der Resultate der bisherigen Organbad-Versuchsreihen der PAH-Forschungsgruppe des UKR Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur Reaktivität der Pulmonalgefäße lungengesunder Patienten dargestellt werden. Von besonderem Interesse war die Frage nach der klinischen Relevanz möglicher Unterschiede in der Vasoreagibilität, die sich aufgrund von vaskulären Remodeling ergeben können.

Vor Beginn der Experimente mit Pulmonalgefäßen lungentransplantiert Patienten wurde in einer Reihe von Pilotversuchen die Methodik des Organbads mithilfe von Rindervenen (V. Saphena) erlernt und etabliert. Hierbei wurde in einem ex-vivo/in-vitro-Design die Wirkung von Vardenafil auf die kontraktilen Eigenschaften der Gefäße untersucht. Diese waren zuvor mit dem Vasokonstriktor Noradrenalin (NE) behandelt worden. Neben der Einarbeitung in die Durchführung und Auswertung der Versuche war es das Ziel, am Beispiel der Rindervenen darzustellen, wie sich der Einfluss von Vardenafil auf die Vasoaktivität im Organbad messen lässt. Im

Folgenden werden auch die hierfür durchgeführten Experimente dokumentiert und so ein Einblick in die Vorgehensweise bei der Untersuchung von isolierten Blutgefäßen im Organbad vermittelt.

2. Material/Methoden

2.1 Blutgefäße

2.1.1. Rindervenen

Der Einsatz von Rindervenen zur Etablierung der Organbad-Methodik ergab sich aus praktischen Gründen: zunächst waren sie einfacher verfügbar als humane Pulmonalgefäße von lobektomierten oder lungentransplantierten Patienten. Die V. Saphena vom Rind ist robuster und verfügt über einen größeren Innendurchmesser als die üblicherweise verwendeten humanen Pulmonalgefäße (2-4 mm vs. 5-6 mm), dennoch sind die Gefäßtypen bezüglich ihres Verhaltens im Organbad miteinander vergleichbar. Um die Messungen am Organbad optimal durchführen zu können, sollte der Durchmesser des Gefäßlumens etwa 2-4 mm betragen; da die Versuchsreihe jedoch lediglich der Veranschaulichung der Organbad-Methodik dienen sollte, waren die etwas größerkalibrigen Rindervenen akzeptabel. Ein weiterer bedeutender Aspekt war der zeitliche Faktor: der Zeitraum bis zum Erreichen des Äquilibrationsniveaus ist bei der Verwendung von Rindergefäßen deutlich kürzer, woraus sich folglich eine geringere Gesamtdauer des Versuchs ergibt (10 h vs. 8h).

Insgesamt wurden fünf Versuche zur Etablierung durchgeführt. Die hierfür verwendeten Rindervenen stammten von drei verschiedenen Metzgereien aus der Umgebung von Regensburg. Die Abholung der Gefäße durch Mitarbeiter des Forschungslabors für Thoraxchirurgie am UKR erfolgte immer direkt im Anschluss an die Schlachtung, sodass innerhalb von maximal 90 Minuten der Versuch begonnen werden konnte. Lediglich in einem Fall wurden die Gefäße über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und der Versuch am darauffolgenden Tag durchgeführt. Als Aufbewahrungsmedium bei Kühlung auf 4 – 8 °C diente eine Krebs-Henseleit-gepufferte Arbeitslösung, welche auch für die Inkubation der Gefäße während des eigentlichen Experiments verwendet wurde (vgl. Abschnitt 2.3., Tab. 3 und 4). Die Entnahme der Gefäße erfolgte durch das Personal des jeweiligen Metzgereibetriebs.

2.1.2. Humane Pulmonalgefäße

Die in dieser Versuchsreihe untersuchten humanen Pulmonalarterien (PA) und – venen (PV) wurden im Rahmen von Lungentransplantationen in der Abteilung für Thoraxchirurgie am Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, entnommen. Sie entstammten den resezierten, pathologisch veränderten Lungen der Transplantat-Empfänger; folglich entstand durch die Präparation der Gefäße für die Patienten keine Beeinträchtigung im Outcome. Der Ethikantrag war vor Studienbeginn von den zuständigen Kommissionen in München (Geschäftszeichen 28-16) und Regensburg (Geschäftszeichen 11-101-0133) bewilligt worden. Die Patienten wurden über die Gefäßentnahme aufgeklärt und mussten eine schriftliche Einverständniserklärung vorlegen. Ausgeschlossen wurden Patienten, die jünger als 18 Jahre alt oder aber von einer Infektionskrankheit (HIV, Hepatitis) betroffen waren.

Für die Versuche im Organbad wurden 3-4 cm lange arterielle und venöse Gefäßabschnitte aus dem Ober- oder Unterlappen präpariert; bei Doppellungentransplantationen war auch eine Entnahme aus beiden Lungen möglich. Um die Messungen im Organbad optimal durchführen zu können, sollte der innere Gefäßdurchmesser etwa 2-4 mm betragen. Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang eine schonende Präparation durch den Operateur, da durch übermäßigen Zug am Gefäß Vasospasmen ausgelöst werden können (7). Diese hätten eine anschließende Untersuchung im Organbad stark erschweren oder sogar unmöglich machen können. Gleiches gilt für eine zu starke Schädigung des Endothels: die Beurteilung einer endothelabhängigen Relaxation oder Kontraktion des Gefäßes kann hierdurch verfälscht werden (57). Der Transport der Gewebeproben zum Forschungslabor der Abteilung für Thoraxchirurgie des UKR erfolgte in der Regel noch am gleichen Tag. Während des Zeitraums bis zum Versuchsbeginn wurden die Proben bei 4-8 °C in HEPES-gepuffertem Medium (vgl. Abschnitt 2.3.) gelagert. Die Auswahl der Patienten und deren Aufklärung über die Studie erfolgten durch die Abteilung für Thoraxchirurgie des Klinikums Großhadern. Durch anonymisierte Weitergabe der Gefäßproben nach Regensburg wurde der Datenschutz der Probanden gewährleistet.

2.2. Organbad-Methodik

Das Organbad ermöglicht die Untersuchung von Lungengefäßen im Hinblick auf ihre konstriktiven und dilatativen Eigenschaften unter Einfluss verschiedener vasoaktiver Substanzen (7). Die entnommenen Lungenarterien und –venen wurden, sofern nötig, zunächst von überschüssigem Parenchym befreit und anschließend mithilfe eines Klingenblocks (Abb. 8) in ca. 2 mm breite Segmente zerteilt. Je ein Gefäßring wurde zwischen zwei Drahthaken eingespannt und im Organbad (Fassungsvermögen 5ml) inkubiert (Abb. 9, 10 und 11). Durch diese Fixierung der Segmente konnte die Kontraktionskraft der Gefäße im Sinne einer isometrischen Messung beurteilt werden. Die entstehenden Kräfte, die auf die beiden Drahthaken einwirkten, wurden von einem *Wandler* erfasst und mittels einer speziellen Software (*Amon32*) am PC graphisch dargestellt. Die Inkubationslösung wurde zur Simulation physiologischer Bedingungen auf 37 °C erwärmt. Unter kontinuierlicher Carbogen-Begasung (5% CO₂/95% O₂) betrug der pH-Wert der Lösung 7,4. Die verwendete Organbad-Apparatur (IOA-5301, FMI GmbH Seeheim/Ober-Beerbach) verfügte über acht Einzelbäder, folglich war eine zeitgleiche Untersuchung von jeweils vier Pulmonalarterien und –venen möglich. Eine Ausnahme bildeten sogenannte *Doppelbestimmungen* (Kombination mehrerer Vasodilatatoren): hier verlangte das Versuchsprotokoll acht Gefäße vom gleichen Typ: in diesen Fällen wurden ausschließlich Pulmonalarterien verwendet, da deren Bedeutung für die Pathogenese der PAH als größer eingeschätzt wird als die der Pulmonalvenen (52).

Heutzutage hat sich die Organbad-Methodik als wichtiges Instrument zur *in-vitro*-Beurteilung der Effekte vasoaktiver Substanzen auf das Gefäßsystem etabliert, insbesondere im Bereich der PAH-Forschung (52, 59). Das Prinzip der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche beruht auf einer aufeinander folgenden Zugabe von Vasodilatatoren (Vardenafil, Bosentan) und –konstriktoren (ET-1, NE), entweder einzeln und/oder in Kombination. Anschließend wurde evaluiert, inwieweit sich beispielsweise die ET-1-bedingte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur durch vorherige Inkubation mit einem oder beiden Vasodilatatoren im Vergleich mit einer Kontrollgruppe beeinflussen lässt. Auch ein entgegengesetztes Vorgehen, also die Zugabe von Vasodilatatoren auf präkontrahierte Gefäße, ist möglich. Anders als in klinischen Studien kann im Organbad gezielt der Einfluss vasoaktiver Substanzen auf

den muskulären Tonus des Gefäßsystems evaluiert und dosisabhängig beschrieben werden. *Tabelle 2* vergleicht die Charakteristika klinischer und experimenteller Evaluationen der pulmonalen Vasoaktivität (7).

Tabelle 2: Möglichkeiten und Limitationen von Organbad-Versuchen im Vergleich mit in-vivo-Untersuchungen (7)

Faktoren	Organbad	Klinisches Setting
Präparation	Isoliertes Gefäß	In-situ-Gefäß
Dosis-Wirkungs-Kurven	Ja	Nein
Klinisch wirksame Dosis	Teilweise	Ja
Ursache d. Kontraktion	Vasokonstriktor	Vasospasmen
Beurteilung v. UAWs	Nein	Ja

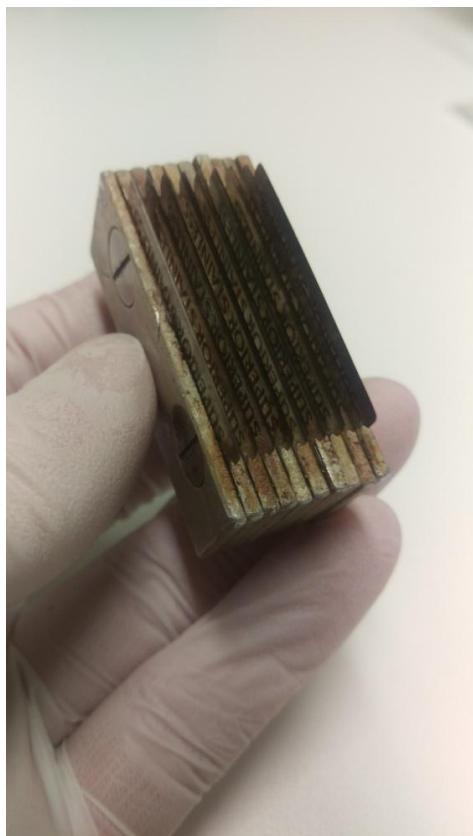


Abb. 8: Klingenblock zur Präparation der Pulmonalgefäße in Ringe von 2 mm Breite



Abb. 9: Nahaufnahme eines im Organbad montierten pulmonalarteriellen Gefäßsegments

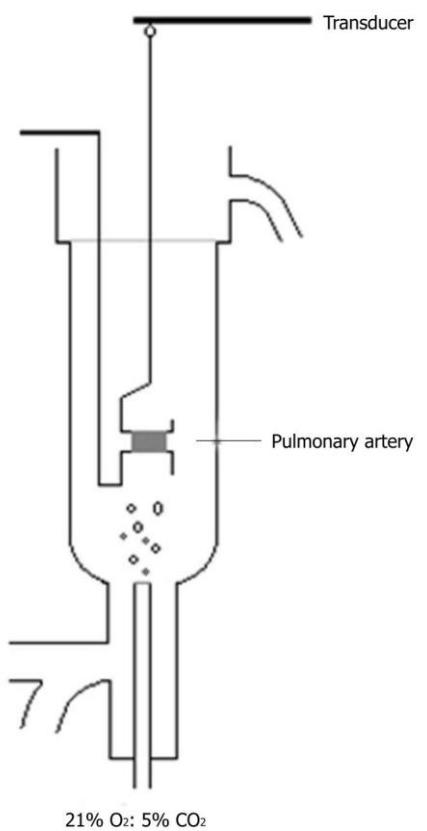


Abb. 10: Organbad-Schema (58)



Abbildung 11: Organbad (IOA-5301, FMI GmbH)

Die beiden bedeutendsten Kenngrößen, die sich im Organbad messen lassen, sind die *Potenz* der verwendeten Pharmaka sowie die *maximale Kontraktionskraft*, welche die untersuchten Gefäße in Gegenwart des jeweiligen Medikaments unter Einfluss von Vasokonstriktoren entwickeln können (7).

Die Potenz beschreibt hierbei nichts anderes als die Sensibilität und Reagibilität der Gefäße auf einen bestimmten Vasodilatator. Darstellbar wird diese durch die IC_{50} : die inhibitorische Konzentration, in der der Vasodilatator vorliegen muss, um eine halbmaximale Relaxation präkontrahierter Gefäße zu bewirken. Analog hierzu bezeichnet die EC_{50} die Dosierung eines Vasokonstriktors, die für das Erreichen der halbmaximalen kontraktilen Gefäßantwort notwendig ist (7).

2.3. Substanzen

Für die Dauer des Transportes von München nach Regensburg wurden die humanen Pulmonalarterien in HEPES-gepuffertem DMEM (*Firma Sigma, München; Artikel-Nr. D5546*) inkubiert. Die vollständige Transportlösung setzte sich aus 500 ml DMEM, 5 ml L-Glutamin, 500 µl Gentamicin, 1000 µl Amphotericin B, 10 ml FKS (Fetales Kälberserum) und 2,9 g HEPES zusammen. Nach Sterilfiltration wurde das Transportmedium aliquotiert (10 ml) und bei Temperaturen von 4 – 8 °C gelagert. Der pH-Wert der fertigen Lösung lag im Bereich von 7,3 – 7,4.

Die Arbeitslösung, in welcher die eigentlichen Organbadversuche durchgeführt wurden, enthielt 5,5 mM D-Glucose-Monohydrat f. Mikrobiologie, 16,7 mM Natriumhydrogencarbonat p.A. (beides Firma Merck, Darmstadt), 1,2 mM Calciumchlorid (Reinheitsstufe ≥98%; Firma Fluka, München) sowie Krebs-Henseleit-Puffer (Tab. 3 und 4).

Für die Etablierung der Organbadmethodik waren gemäß dem Versuchsprotokoll NE als Vasokonstriktor sowie der PDE-5-Inhibitor Vardenafil vorgesehen. Die funktionellen Untersuchungen an humanen Pulmonalarterien erforderten zusätzlich ET-1 sowie den non-selektiven ET-Rezeptorantagonisten Bosentan. ET-1 wurde von Alexis (*Läufelfingen, Schweiz*) bezogen, NE von Aventis (*Frankfurt/Main, Deutschland*). Vardenafil stammte von Chemos (*Regenstauf, Deutschland*) und Bosentan wurde von der Firma Actelion (*Allschwil, Schweiz*) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die eingesetzten Vasokonstriktoren und – dilatatoren.

Vor Beginn der Versuche war es notwendig, die Reagenzien für den Einsatz im Organbad korrekt vorzubereiten. Die hier verwendeten Dosierungen ergaben sich aus den Erkenntnissen der bereits abgeschlossenen Versuchsreihen an den Pulmonalgefäßen lungengesunder Patienten (52) (53). Im Fall von ET-1 erfolgte zunächst die Herstellung einer Stammlösung ($1\text{E-}4$ M); hierfür wurden 0,1 mg ET-1 in 400 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Stammlösung wurde aliquotiert (90 µl) und war bei -20 °C für zwei Wochen haltbar. Durch weitere serielle Verdünnung in DMSO konnte hiervon ausgehend die benötigte Konzentrationsreihe ($1\text{E-}11$ M bis $1\text{E-}8$ M ET-1) angelegt werden. Pro Bad wurden 5 µl ET-1 für die Konzentrationsreihe pipettiert.

Vardenafil musste ebenfalls nicht vor jedem Versuch neu angesetzt werden: die Lösung von 1 mg des PDE-5-Inhibitors in 0,356 ml DMSO ergab eine 5 mM Stammlösung, welche ebenfalls aliquotiert (70 µl) wurde und bei -20 °C für acht Wochen haltbar war. Die Zugabe von 10 µl Stammlösung pro Bad (5 ml) ergab die finale Konzentration von $1\text{E-}5$ M Vardenafil.

Für die Herstellung einer 3 mM Bosentan-Stammlösung wurde 1 mg des ET-1-Rezeptorantagonisten in 57,9 µl A. bidest angesetzt. Um eine vollständige Lösung Bosentans zu erzielen, wurde die Verdünnung in einem Inkubator auf 50 °C erwärmt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 5 µl der Stammlösung in 995 µl KH-Puffer pipettiert; in dieser Lösung betrug die Bosentan-Konzentration $1\text{E-}5$ M. Um die für den Organbadversuch benötigte Dosis von $1\text{E-}7$ M Bosentan zu erhalten, wurden 50 µl davon in die jeweiligen Bäder gegeben. Die übrige Stammlösung wurde verworfen. NE (*Norepinephrin-Hydrochlorid*) musste grundsätzlich vor Licht geschützt bei -4 °C aufbewahrt werden. Die Stammlösung ($1\text{E-}3$ M) ergab sich durch Verdünnung von 169 µl NE in 831 µl Bisulfit-Puffer (0,5%). Dieser entstand durch Lösung von 10 mg Natrium-Metabisulfit (*VWR, Darmstadt/Deutschland*) in 20 ml A. bidest und musste vor jedem Versuch neu angesetzt werden. Ausgehend von der $1\text{E-}3$ M NE-Stammlösung wurde der Vasokonstriktor weiter seriell in 0,5% Bisulfit-Puffer bis zu einer Konzentration von $1\text{E-}6$ M NE verdünnt. Während des gesamten Verdünnungsvorgangs war eine durchgehende Kühlung der NE-Lösungen auf -4 °C

gewährleistet. Die finale Dosisreihe (1E-8 M bis 1E-5 M NE) entstand durch Zugabe von jeweils 50 µl NE in die einzelnen Bäder.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Stammlösung. Auffüllen mit A. bidest auf 10 l.

Substanz	Hersteller	Menge
Natriumchlorid	VWR	690,0 g
Kaliumchlorid	Roth	35,0 g
Magnesiumsulfat	Merck	29,6 g
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	16,6 g

Tabelle 4: Zusammensetzung der Arbeitslösung für die Organbadversuche. Auffüllen mit A. bidest auf insgesamt 7,5 l.

Substanz	Hersteller	Menge
A. bidest	-	5 l
D-Glucose-Monohydrat	Merck	8,175 g
Natriumhydrogencarbonat	Merck	10,5 g
Calciumchlorid	Fluka	9 ml
Krebs-Henseleit-Stammlösung	s. Tab. 3	750 ml

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Vasokonstriktoren und -dilatatoren

Substanz	Hersteller	Dosierung im Organbad
ET-1(ALX-155-001-PC01)	Alexis (Läufelfingen, Schweiz)	1E-11 M bis 1E-8 M
NE (PZN-0073016)	Aventis (Frankfurt/Main, Deutschland)	1E-8 M bis 1E-5 M
Bosentan (Ro 47-0203/001)	Actelion (Allschwil, Schweiz)	1E-7 M
Vardenafil (189904)	Chemos (Regenstauf, Deutschland)	1E-5 M

2.4. Versuchsdurchführung

Nach dem Einhängen der Gefäßringe in das Organbad erfolgte stets eine initiale Äquilibrationsphase von etwa einstündiger Dauer. Während dieses Zeitraums sollten sich die Gefäße spontan entspannen und manuell auf einen Basaltonus von 16 mN (PA) beziehungsweise 12 mN (PV) eingestellt werden (58). Bei stark oszillierendem Tonus wurden die Ringe mit Inkubationslösung gespült, um eventuell noch anhaftende, gefäßeigene Vasokonstriktoren auszuwaschen. Nach Erreichen dieses stabilen Ruheniveaus wurde durch Zugabe von 150 mM Kaliumchlorid (KCl) eine starke Kontraktion provoziert, um die Depolarisationsfähigkeit der Gefäße zu überprüfen. Betrug die gemessene Kraftänderung weniger als 4 mN, so wurde der entsprechende Ring in der Versuchsauswertung nicht berücksichtigt. Das Ausbleiben einer nennenswerten Reaktion bei mehreren Gefäßringen führte in einigen Fällen sogar zum vollständigen Abbruch der Versuche. Anschließend erfolgten in Abständen von 5-10 Minuten mehrere Waschungen, um den Vasokonstriktor KCl zu entfernen, und eine weitere Äquilibrationsphase. Während dieser zweiten Entspannungsphase wurde der ursprüngliche Ruhetonus in der Regel nicht mehr erreicht; individuell verschieden betrug das Ruheniveau nun zwischen 19 und 23 mN.

Analog zur ersten Äquilibrationsphase wurden die Gefäße erneut nach Erreichen eines stabilen Tonus durch KCl-Gabe zur Depolarisation gebracht. Ziel dieser Maßnahme war der Nachweis eines stabilen Basaltonus. Idealerweise sollten hierbei die Basalwerte vor und nach der zweiten KCl-vermittelten Kontraktion identisch sein. Darüber hinaus ermöglichte die erneute KCl-Gabe die Bestimmung der höchstmöglichen Kraft, welche die Gefäßringe unter Einfluss von KCl entwickeln können. Dieser Wert darf allerdings nicht verwechselt werden mit der zuvor erwähnten *maximalen Kraft*, die in Gegenwart eines versuchsspezifischen Vasokonstriktors (wie ET-1 oder NE) entwickelt werden kann. Die KCl-induzierte Kraft entspricht einem Wert von 100%; die Kräfte, welche im Verlauf des Versuchs unter Einfluss von Vasodilatatoren und/oder -konstriktoren entstehen, können auf diesen Wert normiert werden (in % von 150 mM KCl). Der Vorteil einer solchen Darstellungsweise besteht darin, dass inter- und intraindividuelle Unterschiede bei den gemessenen Absolutwerten eliminiert werden können: die Untersuchungen lassen sich so miteinander vergleichen.

Im Anschluss an eine weitere Entspannungsphase, nach dem oben beschriebenen Prozedere, erfolgte schließlich die eigentliche Evaluation der konstriktiven und dilatativen Gefäßeigenschaften. Die verschiedenen Vorgehensweisen hierbei waren abhängig vom verwendeten Versuchsprotokoll.

2.5. Protokoll

2.5.1. Etablierung: Dosis-Wirkungskurve (Vardenafil)

Kontraktion mit NE, Relaxation mit Vardenafil

Zunächst erfolgte die Präkontraktion der Rindervenen mit einer NE-Konzentrationsreihe ($1E-11$ M bis $1E-5$ M), um die maximale Kontraktionskraft festzustellen. Im Anschluss daran wurde der Vasokonstriktor ausgespült und die Gefäße erneut mittels NE auf 80% der Maximalkraft kontrahiert. Diese Herangehensweise mit einer maximalen und einer submaximalen Kontraktionsreihe stellt den Standard für derartige Untersuchungen der Effekte von Vasodilatatoren dar (7, 57). Durch Zugabe des PDE-5-Inhibitors Vardenafil ($1E-10$ M bis $1E-5$ M) wurde eine dosisabhängige Relaxation induziert, wobei stets zwei Gefäßringe als Zeitkontrollen dienten und anstelle von Vardenafil 10 µl DMSO erhielten. Abschließend erfolgte die vollständige Relaxation aller Gefäßproben mithilfe von $3E-4$ M Natriumnitroprussid (SNP; Fa. Alexis, Läufelfingen/Schweiz). Durch diese Maßnahme konnte unabhängig von Vardenafil eine Beeinträchtigung der Relaxationsfähigkeit der Gefäße durch zu lange Lagerungszeiten oder andere Schädigung ausgeschlossen werden.

2.5.2. Vergleich von Mono- und Kombinationstherapie

Präinkubation mit Vardenafil und Bosentan, Kontraktion mit ET-1 und NE

Da die experimentellen Vorgaben den Vergleich der kontraktionshemmenden Effekte von Vardenafil und/oder Bosentan mit einer Kontrollgruppe vorsahen, war es notwendig, ausschließlich Pulmonalgefäße des gleichen Gefäßtyps zu verwenden. Hierbei entschied man sich für den Einsatz von Pulmonalarterien, da deren Bedeutung für die Pathogenese der PAH als größer erachtet wurde als die des pulmonalvenösen Systems. Je zwei Gefäßringe wurden zunächst für 15 Minuten in Bosentan ($1E-7$ M), Vardenafil ($1E-5$ M) oder einer Kombination beider Medikamente

in den genannten Dosierungen inkubiert. Die verbleibenden beiden Ringe dienten gemäß den oben dargestellten Protokollen als Kontrollgruppe ($10 \mu\text{l}$ DMSO). Es folgte für alle Bäder gemeinsam eine submaximale Kontraktion mit ET-1 (1E-11 M bis 1E-8 M), daran direkt anschließend die maximale Kontraktion mit NE (1E-8 M bis 1E-5 M). Ziel war der Vergleich der Wirkung der kombinierten Vasodilatatoren auf die Pulmonalarterien gegenüber ihrer Einzeldosierung und der Kontrollgruppe. Die sequentielle Verwendung zweier Vasokonstriktoren war notwendig, da die beiden eingesetzten Medikamente jeweils entweder nur den ET-1-Signalweg (Bosentan) oder den NO/cGMP-Weg (Vardenafil) beeinflussen. Letzterer wurde durch die gesteigerte cGMP-Synthese als Folge der NE-Gabe stimuliert.

2.6. Datenauswertung und Statistik

Für die Auswertung der Versuche war es zunächst erforderlich, mithilfe der zum Organbad gehörigen Software *Amon32* die relevanten Messpunkte der acht Gefäßproben festzulegen. In diesen Messpunkten waren sowohl die Zeitangabe als auch die zu dem jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden Kontraktionskräfte hinterlegt. Von großer Bedeutung war zunächst die Bestimmung der höchstmöglichen Kraftentwicklung durch KCl (150 mM). Wie bereits zuvor erwähnt wurde diese Kraft für die Normierung der Versuche benötigt, d.h. die gemessenen Kontraktionskräfte wurden nicht nur als Absolutwerte (in mN) dargestellt, sondern auch in Relation zum KCl-induzierten Wert (in % von 150 mM KCl). Diese Vorgehensweise ermöglichte den Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Versuche. Folglich stellten in jedem Versuch die ersten beiden Messpunkte die Kontraktionsverhältnisse direkt vor (Basaltonus) und nach der zweiten KCl-Gabe dar. Analog erfolgte auch die Messung der Vasokonstriktoren und –dilatatoren: ein Messpunkt vor der Zugabe der jeweiligen Substanz, um den Basaltonus zu erfassen, und nach jeder zugegebenen Dosis; so konnte die Auswirkung der Titration der steigenden Konzentrationen auf die entstehenden Kräfte schrittweise dokumentiert werden. Nach Positionierung aller relevanten Messpunkte erfolgte die Übertragung der Werte in eine Tabelle (*Microsoft Editor*). Hier wurden die gemessenen Werte der jeweils zugehörigen Substanz zugeordnet, bevor die Konversion in ein Excel-gängiges Format erfolgte; dafür wurde das Perl-Skript *tsv.pl* genutzt. Die Datenverarbeitung mittels Skript erfolgte mithilfe der Unix-Umgebung *Cygwin64*. In *Microsoft Excel* konnten anschließend Mittelwert

und Standardabweichung der Werte berechnet werden. Zunächst mussten jedoch die korrespondierenden Messkanäle zusammengefasst werden: enthielten beispielsweise die Kanäle 1 und 2 Zeitkontrollen, war nur die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen aus den Werten dieser beiden Kanäle möglich. Analog dazu wurden alle anderen Messkanäle kombiniert, sofern ihre Gefäßproben mit identischen Substanzen in denselben Konzentrationen behandelt worden waren. Abschließend wurden die gemittelten Werte graphisch aufbereitet (*SigmaPlot*) und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (in % der Präkontraktion durch 150 mM KCl). Der medikamentöse Einfluss auf den Basaltonus der Pulmonalarterien wurde als *Box Plot* veranschaulicht. Dieser ist begrenzt durch die 25. und 75. Perzentile. Dazwischen befindet sich der Medianwert als Linie dargestellt. Die beiden Fehlerbalken (*Whiskers*) definieren die 10. und 90. Perzentile.

Die statistische Auswertung mittels SPSS und *SigmaPlot* wurde als *zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (RM-ANOVA)* durchgeführt. Mittels *Holm-Sidak-post-hoc-Test* wurden, sofern praktikabel, dosisabhängige Vergleiche zwischen den Effekten der eingesetzten Medikamente gezogen. Für die Bestimmung der Auswirkungen der verschiedenen Pharmaka auf den Basaltonus der Pulmonalgefäße wurde ein *paarweiser t-Test mit Messwiederholung* eingesetzt. Wahrscheinlichkeiten mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Methodik anhand von Rindervenen

Insgesamt wurden fünf Versuche nach dem oben beschriebenen Protokoll (*Vardenafil Dosis-Wirkungs-Kurve*) durchgeführt. Untersucht wurden Blutgefäße (V. Saphena) von vier verschiedenen Rindern; in einem Fall war die entnommene Gefäßprobe lang genug, um damit zwei Experimente durchzuführen. Ein Teil dieser Probe wurde über Nacht bei 4 °C in KH-gepufferter Arbeitslösung aufbewahrt und am folgenden Tag im Organbad untersucht. Allerdings lassen sich die Ergebnisse dieses sowie eines weiteren Versuches, bei dem Werte außerhalb des messbaren Bereichs aufgetreten waren, nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen der übrigen drei Gefäßproben vergleichen, weshalb diese beiden Fälle im Folgenden gesondert

betrachtet werden sollen. Aus denselben Gründen wurden diese Gefäße auch von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

3.1.1. Lagerung bei 4 °C für 24 Stunden

Die hier verwendete Rindervenenhälften war vor Versuchsbeginn für 24 Stunden in Arbeitslösung aufbewahrt worden, während der andere Teil des Gefäßes direkt nach Abholung im Organbad untersucht worden war. Eine Kühlung der eingelagerten Gefäßprobe auf 4 °C war während dieses gesamten Zeitraums gewährleistet. Bei der Relaxation der auf 80% der Maximalkraft präkontrahierten Gefäßringe mithilfe von Vardenafil zeigte sich in der graphischen Darstellung auch nach Zugabe der höchsten Vardenafildosis (1E-5 M) kein relevanter Unterschied zur Spontanrelaxation der Zeitkontrollen (Ko: $41,0 \pm 9,7\%$ vs. Var: $53,1 \pm 99,9\%$). In beiden Gruppen fiel die Relaxation vergleichsweise gering aus; die Kontraktion konnte lediglich um etwa die Hälfte ihres Ausgangswertes reduziert werden (Abb. 12). In Abbildung 13 sind zum Vergleich die erreichten Kontraktionswerte der anderen Venenhälften abgebildet, die noch am Tag der Akquirierung der funktionellen Untersuchung im Organbad unterzogen worden war (Ko: $77,1 \pm 7,4\%$ vs. Var: $35,7 \pm 19,1\%$).

3.1.2. Fehlerhafte Normierung des maximalen Kontraktionsniveaus

In diesem Fall konnte die Maximalkraft für die Präkontraktion nicht korrekt definiert werden: bei Titration der ersten NE-Verdünnungssreihe (1E-11 M bis 1E-5 M) waren bereits vor Zugabe der höchsten Konzentration Werte von annähernd 300 mN aufgetreten. Als Grund dieser überhöhten Werte wurde vermutet, dass anstelle der V. Saphena fälschlicherweise eine benachbart verlaufende Arterie untersucht worden war. Da somit der messbare Bereich des Organbads überschritten worden wäre, hatte es keinen Sinn, diese Kontraktionsreihe fortzusetzen; sie endete hier bereits nach der Zugabe von 3E-6 M NE. Das zu diesem Zeitpunkt erreichte Kontraktionsniveau wurde in der Folge als Wert der maximalen Kraft verwendet und der 80%-Wert daraus abgeleitet. Bei der Vardenafil-abhängigen Relaxation zeigte sich im Verlauf des Graphen bei der Zugabe von Vardenafil in den Konzentrationen 1E-6 M (Ko: $65,6 \pm 1,9\%$ vs. Var: $36,0 \pm 13,7\%$) und 1 E-5 M (Ko: $47,4 \pm 0,6\%$ vs. Var: $5,8 \pm 5,8\%$) ein deutlicher Unterschied gegenüber den Kontrollen; die Zugabe

des PDE-5-Inhibitors bewirkte eine fast vollständige Aufhebung der Präkontraktion (Abb. 14).

3.1.3. Ergebnisse der übrigen Versuche

Die Untersuchungen der übrigen Rindervenen ($n=3$) wurden innerhalb von höchstens 90 Minuten nach der Entnahme begonnen und konnten ohne Abänderung des Protokolls durchgeführt werden (Abb. 15). In allen drei Fällen konnte durch Zugabe von Vardenafil die NE-vermittelte Präkontraktion vollständig aufgehoben werden; insgesamt waren jedoch keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen feststellbar ($p=0,305$). Auch hier war erst unter Einfluss von Vardenafil in der maximalen Dosis ($1E-5 M$) eine nennenswerte Differenz zwischen den Gruppen erkennbar (Ko: $20,1 \pm 49,4\%$ vs. Var: $-2,1 \pm 34,7\%$).

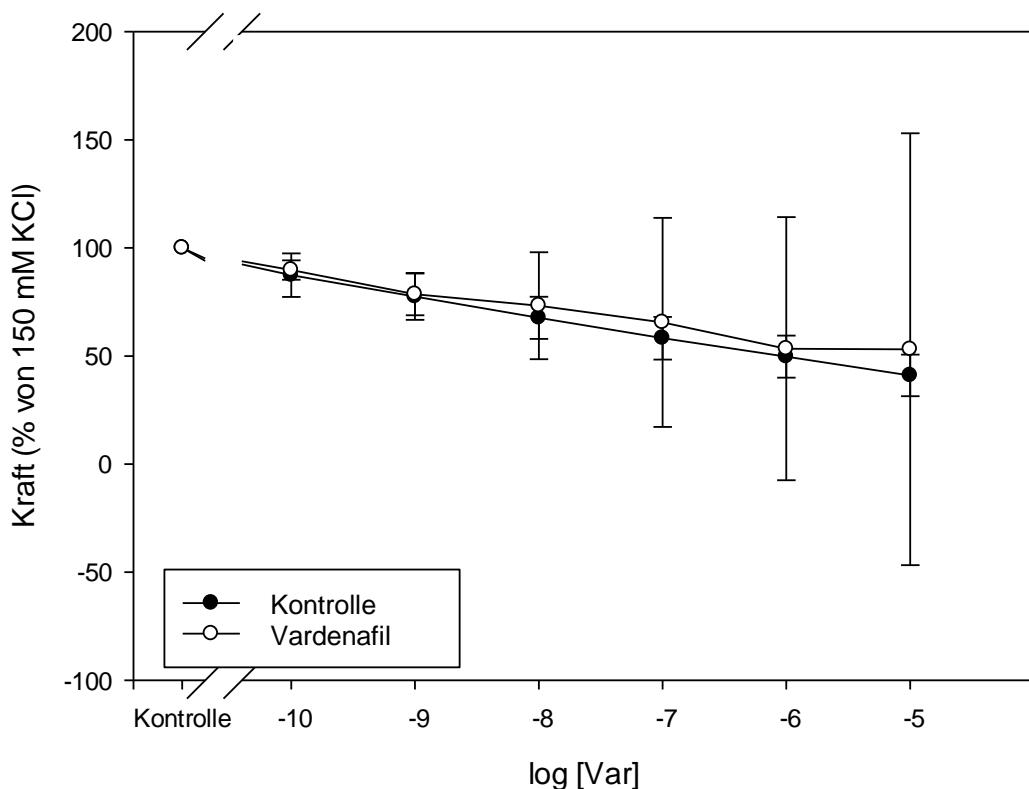


Abbildung 12: Vardenafil-Dosis-Wirkungskurve nach Aufbewahrung für 24 h. Kein Unterschied zur Kontrollgruppe, insgesamt eher schwach ausgeprägte Relaxation in beiden Gruppen ($n=1$).

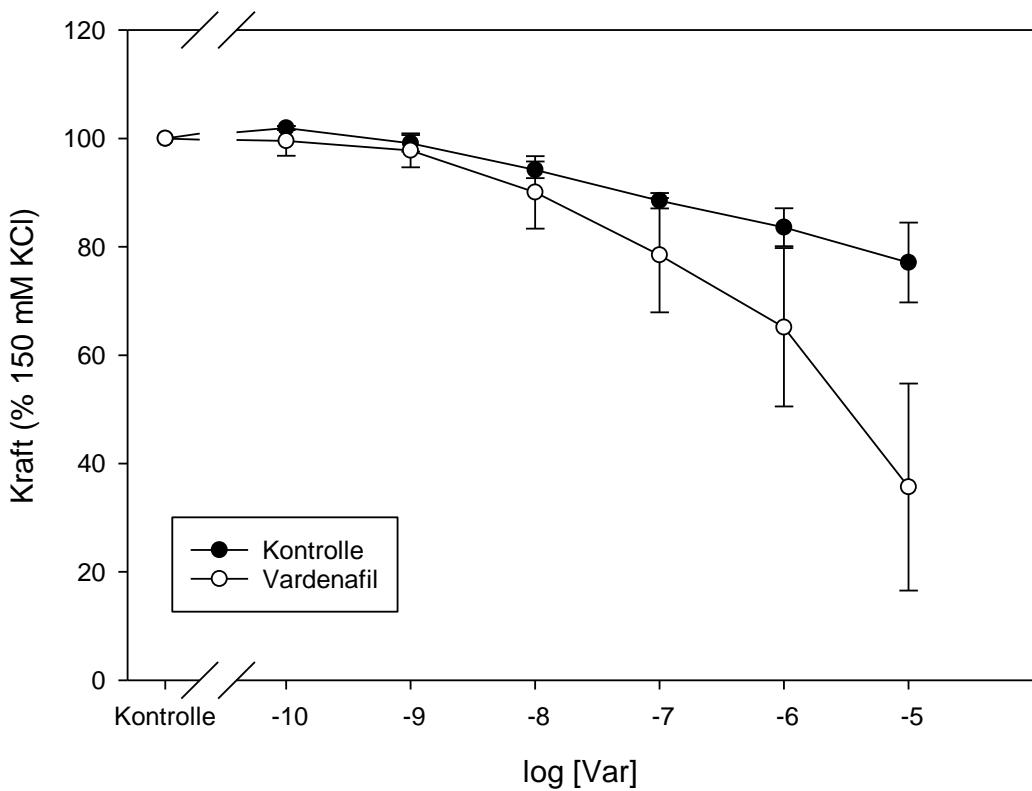


Abbildung 13: Vardenafil-Dosis-Wirkungs-Kurve. Verwendet wurde die andere Hälfte der in Abb. 12 dargestellten Rindervene, allerdings ohne Aufbewahrung für 24 h ($n=1$). Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in Abb. 15 miteinberechnet.

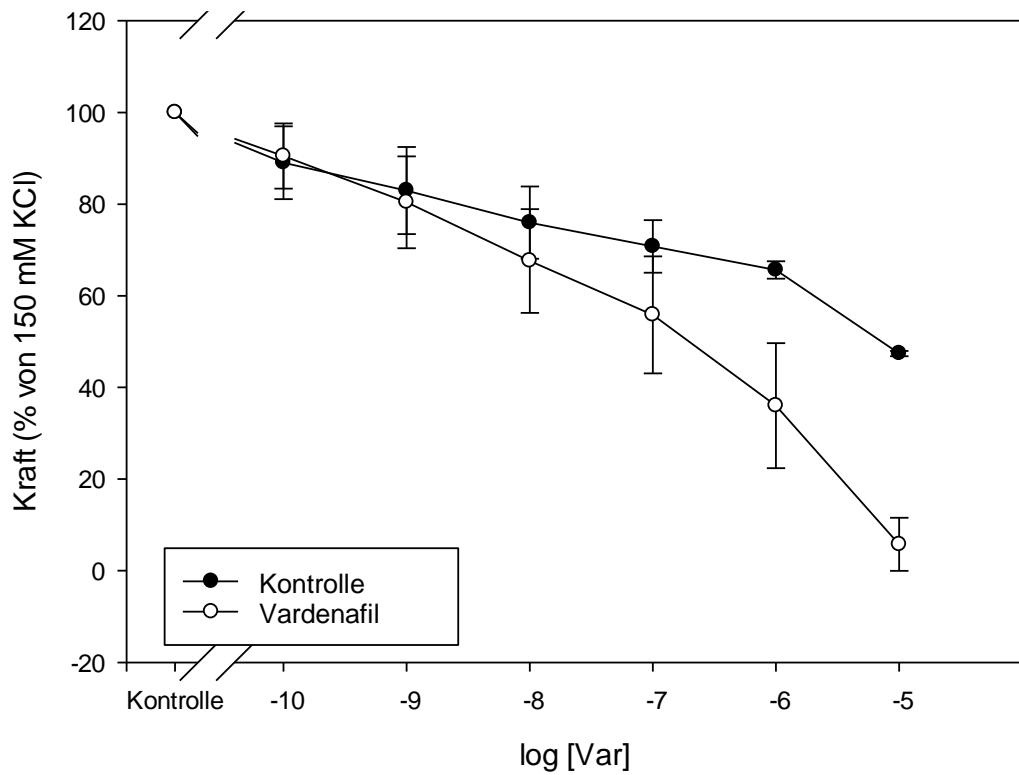


Abbildung 14: Vardenafil-Dosis-Wirkungskurve bei vermuteter Rinderarterie. Aufgrund der überhöhten Kontraktionskraft des Gefäßes war eine genaue Bestimmung des Maximalniveaus nicht möglich gewesen. Deutlicher Effekt gegenüber der Zeitkontrolle in den höheren Konzentrationen ($n=1$).

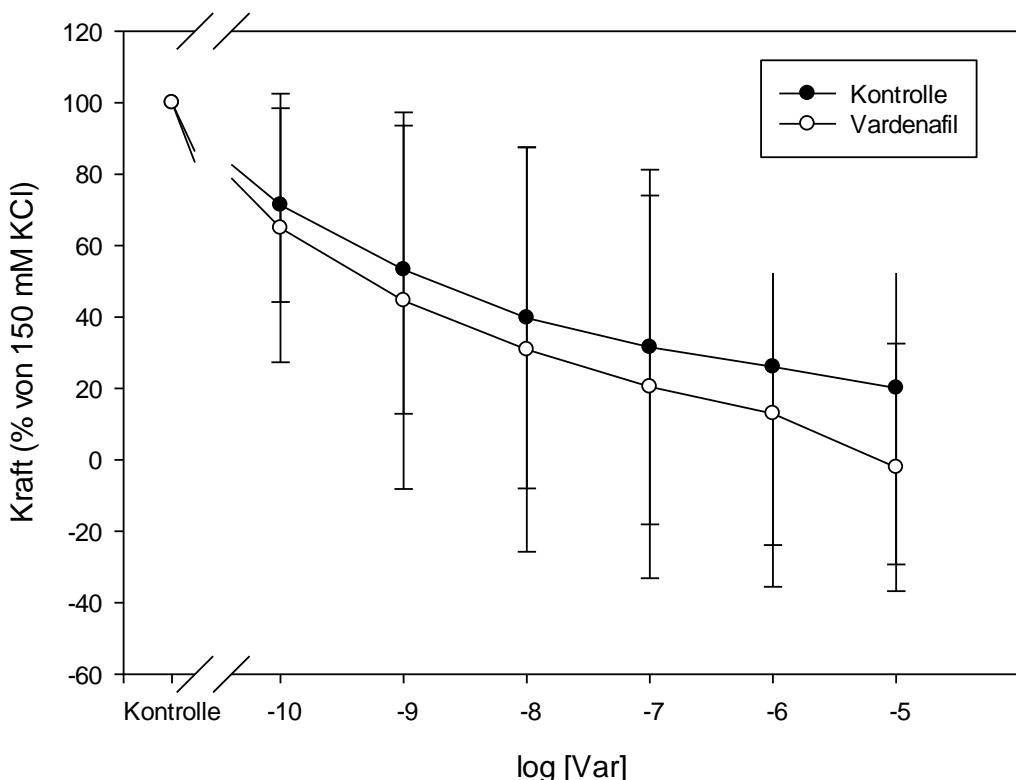


Abbildung 15: Gemittelte Werte der übrigen drei Versuche. Ein erkennbarer Effekt von Vardenafil stellt sich erst bei maximaler Konzentration ($1E-5$ M) ein, jedoch ohne insgesamt Signifikanz zu erreichen ($n=3$; $p=0,305$).

3.2. Humane Pulmonalgefäße aus Lungentransplantationen

Für die nachfolgend beschriebene Versuchsreihe wurde die Vasoaktivität der Pulmonalgefäße von sechs Patienten im Organbad evaluiert. Ursprünglich war Gefäßmaterial von 17 verschiedenen Transplantationspatienten akquiriert worden, jedoch mussten in vier Fällen die Ergebnisse von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Versuche fehlerhaft durchgeführt worden waren oder vorzeitig beendet werden mussten. Grund für den Versuchsabbruch waren in der Regel zu geringe oder vollständig ausbleibende kontraktile Reaktionen der Gefäßproben auf die Zugabe von KCl, definiert als Kraftänderung von weniger als 4 mN (s. Abschnitt 2.4.). Die Pulmonalarterien weiterer sieben Patienten konnten im Organbad nicht eingesetzt werden, da sie einen deutlich größeren Innendurchmesser als die benötigten 2-4 mm aufwiesen. In einem dieser Fälle waren die Gefäße nach Entnahme zudem irrtümlicherweise in Formalin eingelagert worden, wodurch keine funktionellen Untersuchungen ihres Kontraktionsverhaltens mehr möglich gewesen

Tabelle 6: Demografische Charakteristika und klinische Daten der Transplantationspatienten, sofern im RHC erhoben. Eine medikamentöse Vortherapie mittels PDE-5-Inhibitoren oder ET-Rezeptorantagonisten hatte keiner der sechs Probanden erhalten.

Patient	Alter	Geschlecht	mPAP [mmHg]	PCWP [mmHg]	Druck RA [mmHg]	Druck RV [mmHg]	PAH/PH- Vortherapie	Diagnose
1	55	M	22	8	4	5	Keine	EAA
2	56	M	22			3	Keine	EAA
3	63	W	21	9	4	6	Keine	IPF
4	64	W	14				Keine	NSIP
5	59	M	23	8	6	12	Keine	COPD GOLD IV
6	61	M	22	6	3	5	Keine	NSIP

wären. Zwischen dem Ende der Transplantation und dem Beginn des Organbadversuchs vergingen im Mittel 11,98 Stunden, bei einer Mindestdauer von 4,37 Stunden sowie 21, 83 Stunden im längsten Fall. Die inkludierten sechs Patienten waren zwischen 55 und 64 Jahren alt. Zwei von ihnen waren weiblich und vier männlich. Die im RHC gemessenen präoperativen Druckwerte der A. pulmonalis lagen zwischen 14 und 23 mmHg. Definitionsgemäß lag somit bei keinem der Patienten eine manifeste PH ($mPAP > 25 \text{ mmHg}$) vor. Die Indikation zur Lungentransplantation war aufgrund von respiratorischer Insuffizienz bei nicht mehr vorhandenen medikamentös-therapeutischen Optionen gestellt worden. Die exogen-allergische Alveolitis (EAA) und die non-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP) waren mit je zwei Fällen die häufigsten Transplantationsindikationen. Die pulmonalen Grunderkrankungen der beiden übrigen Patienten waren eine idiopathische Lungenfibrose (IPF) sowie eine COPD im Stadium GOLD IV. Keiner der Patienten hatte im Vorfeld bereits eine medikamentöse Behandlung mittels PDE-5-Inhibitoren oder ET-Rezeptorantagonisten erhalten (Tab. 6). Die Transplantationen wurden sowohl als Einzel- als auch als Doppellungentransplantationen durchgeführt.

Präinkubation mit Vardenafil und Bosentan, Kontraktion mit ET-1 und NE

Vor Zugabe der Vasokonstriktoren wurden die Auswirkungen der jeweiligen Pharmaka auf den Basaltonus der Pulmonalarterien gemessen. Vardenafil konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe weder in Einzeladministration, noch in Kombination mit

Bosentan einen nennenswerten Effekt auf den Vasotonus hervorrufen. Allerdings bestand bei Monotherapie mit Vardenafil eine Tendenz zur Signifikanz (Kontrolle vs. Vardenafil: $p=0,084$; Kontrolle vs. Kombination: $p=0,938$). Die alleinige Zugabe des ET-1-Antagonisten Bosentan bewirkte einen leichten Anstieg des Basaltonus, welcher sich bezogen auf die Zeitkontrolle als signifikant erwies (Kontrolle vs. Bosentan: $p=0,013$). In *Abbildung 16* sind die Effekte der verschiedenen Therapieschemata auf den basalen Gefäßtonus dargestellt.

Bei der sequenziellen Zugabe von ET-1 und NE in ansteigender Konzentration konnte eine signifikante Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Vorbehandlung und der zunehmenden Dosierung der Vasokonstriktoren festgestellt werden ($p<0,001$). Die p-Werte der verschiedenen medikamentösen Behandlungen im Vergleich können der *Tabelle 7* entnommen werden. Die submaximale ET-1-Kontraktionsreihe der Pulmonalarterien zeigte in den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen ($3E-9$ M und $1E-8$ M) des Vasokonstriktors nennenswerte Verlaufsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Medikamenten. Zwischen der Kontrollgruppe und Bosentan allein sowie der Dualtherapie waren die relaxierenden Effekte bereits nach der Zugabe von $3E-9$ M ET-1 signifikant (Kontrolle vs. Bosentan: $p=0,004$; Kontrolle vs. Kombination: $p<0,001$). Diese Beobachtung wurde nach Zugabe der maximalen ET-1-Dosis ($1E-8$ M) bestätigt; sowohl einzeln als auch in Kombination bewirkten Vardenafil und Bosentan einen deutlichen Benefit gegenüber der Zeitkontrolle (Kontrolle vs. Vardenafil: $p=0,002$; Kontrolle vs. Bosentan: $p<0,001$; Kontrolle vs. Kombination: $p<0,001$). Zudem konnte die Vasokonstriktion durch den kombinierten Einsatz der beiden Medikamente wirkungsvoller inhibiert werden als durch deren jeweilige Einzeladministration (Vardenafil vs. Kombination: $p=0,028$; Bosentan vs. Kombination: $p=0,040$).

Kein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen Vardenafil und Bosentan in Monotherapie ($p=0,763$). Diese Beobachtung ist konform mit den erreichten submaximalen Kontraktionswerten nach Abschluss der ET-1-Dosisreihe: nach ausschließlicher Vardenafil-Behandlung erreichten die Pulmonalarterien ein ähnliches Kontraktionsniveau wie nach Inkubation in Bosentan (Vardenafil: $32,3 \pm 12,8\%$ vs. Bosentan: $30,1 \pm 12,7\%$).

Tab. 7: Übersicht über die p-Werte der unterschiedlichen Therapieschemata im Vergleich. Während die Dualtherapie insgesamt einen deutlichen Benefit gegenüber der Kontrolle und Bosentan in Monotherapie zeigte, konnte im Vergleich zur Vardenafil-Monotherapie kein signifikanter Vorteil nachgewiesen werden.

	Kontrolle	Vardenafil	Bosentan
Vardenafil	0,006	-	-
Bosentan	0,169	0,140	-
Vardenafil + Bosentan	<0,001	0,323	0,039

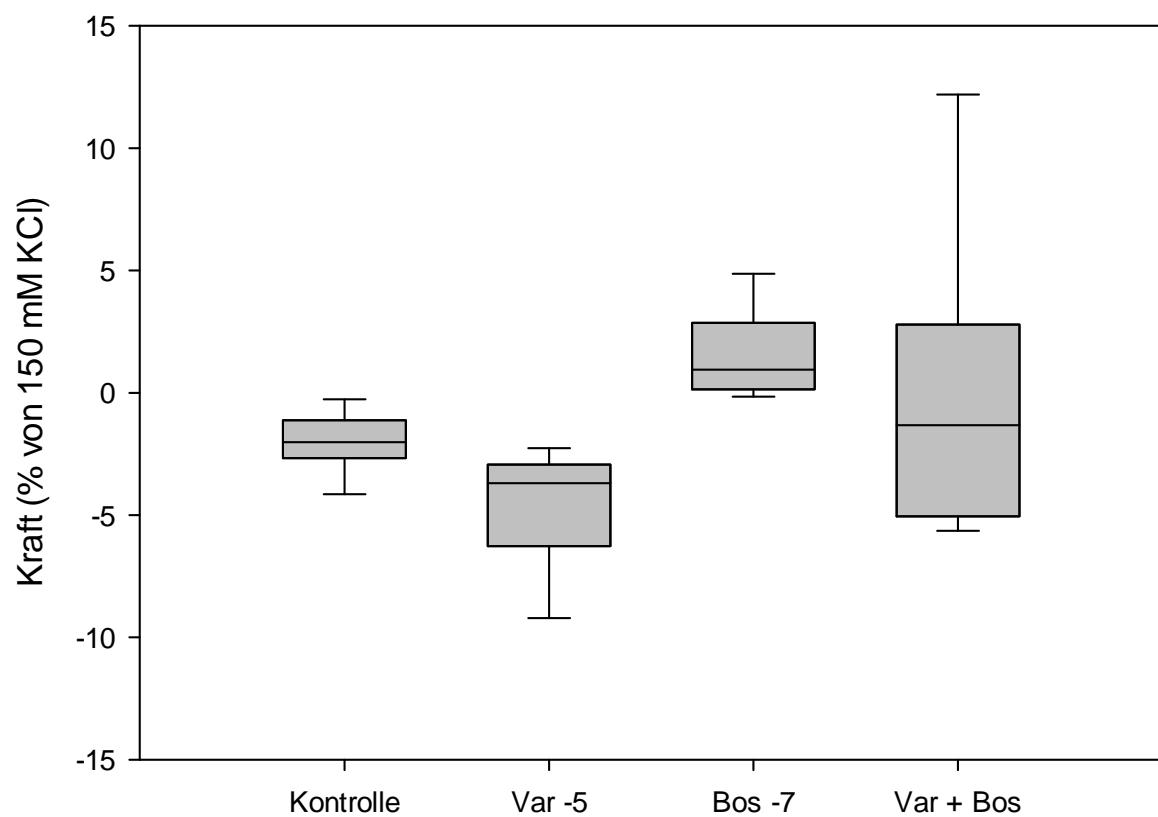


Abb. 16: Bosentan bewirkte einen leichten Anstieg des Basaltonus der Pulmonalarterien ($p=0,013$); Vardenafil sowie die Kombinationstherapie konnten den Basaltonus verringern, jedoch ohne Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe zu erreichen (Kontrolle vs. Vardenafil: $p=0,084$; Kontrolle vs. Kombination: $p=0,938$).

Noch stärker im Vergleich zur Kontrollgruppe fiel die relaxierende Wirkung der Kombinationstherapie aus (Kontrolle: $59,6 \pm 13,3\%$ vs. Kombination: $12,4 \pm 13,3\%$). Nach Erreichen eines stabilen Vasotonus erfolgte direkt im Anschluss an die ET-1-Konzentrationsreihe die Titration von NE ($1E-8$ M bis $1E-5$ M) in analoger Vorgehensweise, um die maximalen Kontraktionsniveaus der Pulmonalgefäße in Abhängigkeit von ihrer Vorbehandlung zu erreichen. Im Vergleich zur Ausgangssituation direkt nach Abschluss der ET-1-Kurve bestand nach Gabe von $1E-8$ M NE kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Wirkungen der Dualtherapie und Vardenafil in Einzelanwendung ($p=0,088$). Tatsächlich war von allen Medikamentengruppen bei den in Vardenafil präinkubierten Gefäßproben im Verlauf der NE-Dosisreihe der geringste Anstieg der kontraktilen Reaktionen zu verzeichnen; das abschließende Niveau war annähernd identisch mit dem der Kombinationsgruppe (Vardenafil: $46,0 \pm 14,0\%$ vs. Kombination: $48,4 \pm 14,0\%$).

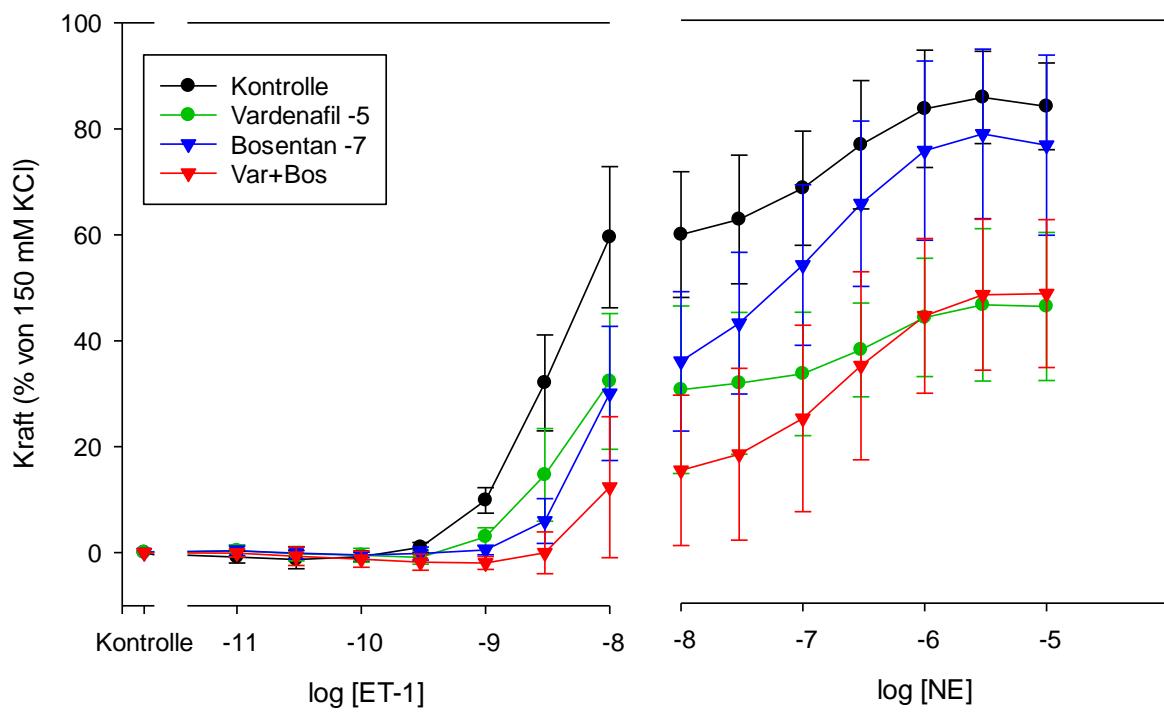


Abb. 17: Die Pulmonalarterien wurden mit Vardenafil und Bosentan einzeln oder in Kombination vorbehandelt; anschließend erfolgten die Konzentrationsreihen der beiden Vasokonstriktoren. Der kontraktionshemmende Effekt durch Vardenafil fiel nach NE-Zugabe sowohl in Einzelanwendung als auch in Kombination mit Bosentan deutlich stärker aus als in den beiden anderen Behandlungen (s. Tabelle 7).

Darüber hinaus führte die Steigerung der NE-Dosis in der Folge zu einem starken Anstieg der Vasokonstriktion in der Bosentangruppe, sodass bereits nach Zugabe von 1E-7 M NE keine Signifikanz mehr zwischen den Werten der Zeitkontrolle und jenen der mit Bosentan vorbehandelten Pulmonalgefäß bestand ($p=0,109$). Nach Beendigung der NE-Konzentrationsreihe hatten letztere annähernd das gleiche Kontraktionsniveau erreicht wie die Kontrollgruppe (Kontrolle: $83,8 \pm 8,2\%$ vs. Bosentan: $76,4 \pm 17,0\%$; $p=0,550$). Auch die Kombinationstherapie konnte die NE-vermittelte Vasokonstriktion nicht mehr so wirkungsvoll abschwächen, wie es zuvor in der ET-1-Reihe der Fall gewesen war: zwar kam es zu keinem so deutlichen Kurvenanstieg wie in der Bosentangruppe, jedoch war das erreichte Kontraktionsniveau nach Gabe der höchsten NE-Dosis (1E-5 M) annähernd viermal so hoch wie vor Beginn der NE-Konzentrationsreihe ($48,4 \pm 14,0\%$). Der größere Benefit der kombinierten Vorbehandlung gegenüber Bosentan und der Zeitkontrolle blieb jedoch bis zuletzt erhalten und hochsignifikant (Kombination vs. Kontrolle: $p<0,001$; Kombination vs. Bosentan: $p=0,001$). Ein ähnliches Bild bot sich bei der Evaluation der relaxierenden Effekte von Vardenafil in Einzelanwendung (Vardenafil vs. Kontrolle: $p<0,001$; Vardenafil vs. Bosentan: $p<0,001$; Abb. 17).

4. Diskussion

Wann die ersten Bestimmungen an pulmonalen oder anderen Blutgefäßen mittels Organbad durchgeführt wurden, ist nicht bekannt. Eine frühe Beschreibung der isometrischen Kraftmessung mittels Myographen lieferte Ranney im Jahr 1954, als Untersuchungsobjekt diente seinerzeit allerdings Skelettmuskulatur (60). Dieses ursprüngliche Konzept wurde in den folgenden Jahrzehnten weiterentwickelt und in zahlreichen experimentellen Studien angewendet (57, 61, 62). Auch in der PAH-Forschung stellt die in-vitro-Untersuchung der Blutgefäße von Menschen und Tieren im Organbad ein bekanntes und bereits mehrfach angewandtes Prinzip dar, erlauben die in solchen Versuchsreihen gewonnenen Erkenntnisse doch bedeutende Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der Erkrankung. So wurden in der Vergangenheit gerade in der Grundlagenforschung Versuche am Tiermodell durchgeführt, um die Funktion zellulärer Signalwege zu erfassen (63). Auch die Auswirkung von Vardenafil auf den pulmonalen Gefäßtonus wurde bereits auf diese

Weise evaluiert, beispielsweise anhand der Pulmonalarterien von Kaninchen oder Ratten (64, 65). Selbstredend ist im Organbad keine ideale Simulation der physiologischen Eigenschaften des Blutkreislaufs, wie sie sich *in vivo* darstellen, möglich. Der Blutfluss, entstehende Scherkräfte am Gefäß oder die hormonelle Beeinflussung können in diesem Setting nicht imitiert werden, ebenso wenig wie die körpereigene Metabolisierung der Medikamente in der Leber. Jedoch erlaubt das Organbad wichtige Grundlagenforschung, wie die Beurteilung der Pharmakodynamik und der effektiven Konzentrationen von Medikamenten (7). Eine Überprüfung der hierbei gewonnenen Erkenntnisse in der klinischen Anwendung ist allerdings unerlässlich (vgl. Tab. 2).

Ein klinisch relevanter Ansatz in der Behandlung der PAH besteht darin, die vasorelaxierenden Effekte der verschiedenen Pharmaka durch die Anwendung von Mehrfachtherapien zu potenzieren. Dies spiegelt sich in der Stufentherapie wider: bei Ausbleiben eines monotherapeutischen Benefits für die Patienten erfolgt die Gabe eines zusätzlichem Medikaments aus einer anderen Substanzklasse, um eine Verbesserung der hämodynamischen Situation und damit der Symptomatik zu erreichen (9). Sowohl die Augmentation des vasodilatatorischen Effekts durch die Kombinationstherapie als auch dessen Beeinflussung durch die verwendete Medikamentendosis sind Größen, die sich im Organbad ideal messen lassen. Hierzu wurde auf das identische Versuchsdesign zurückgegriffen wie in den bisherigen *in vitro*-Versuchsreihen der PAH-Forschungsgruppe des UKR (52, 53). Die Methodik des Organbads wurde anhand von Rindervenen im ersten Teil dieser Arbeit bereits dargestellt; im Folgenden soll beschrieben werden, wie die hierbei erlangten Kenntnisse auf die Arbeit mit humanen Pulmonalgefäßern übertragen wurden.

Dem Versuchsprotokoll entsprechend folgte der Zugabe der jeweiligen Medikamente ins Organbad eine Inkubationsphase von 15 Minuten. Innerhalb dieses Zeitraums konnte das Ausmaß der vasodilatatorischen Wirkung auf den Basaltonus unabhängig von exogen zugeführten Vasokonstriktoren gemessen werden. Tatsächlich kam es in der mit Bosentan vorbehandelten Versuchsgruppe, allerdings anders als erwartet, nicht zu einer Relaxation, sondern zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und damit zu einem geringen, jedoch signifikanten Anstieg des Vasotonus. Diese Beobachtung unterscheidet sich von den Ergebnissen früherer Versuchsreihen im

Organbad, in denen die Inkubation von Pulmonalgefäßen in Bosentan ($1E-5$ M) tendenziell eher eine Verringerung des Basaltonus nach sich gezogen hatte (52). Auch in klinischen Erfahrungsberichten hat sich Bosentan als potenter Vasodilatator bei hypertensiven Lungenerkrankungen erwiesen (4, 44, 45). Eine mögliche Erklärung für dieses von der Literatur abweichende Verhalten der Pulmonalgefäße liegt im Wirkungsprofil von Bosentan: als non-selektiver ET-1-Rezeptorantagonist blockiert Bosentan sowohl ET_A - als auch ET_B -Rezeptoren (9, 41). Während die Bindung von ET-1 an ET_A generell zu einer Vasokonstriktion führt, gilt es im Fall von ET_B zu unterscheiden, ob sich die Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothel- oder glatten Muskelzellen der Gefäßwand befinden (15). Erstere rufen durch ihre Aktivierung mittels ET-1 eine Freisetzung von NO und Prostacyclin aus den Endothelzellen hervor, was eine Relaxation der glatten Muskulatur der Tunica media nach sich zieht (16). Sind die ET_B -Rezeptoren jedoch direkt auf den glatten Muskelzellen exprimiert, so führt ihre Stimulation analog zur Wirkung von ET_A zu einer G-Protein-vermittelten Vasokonstriktion aufgrund eines vermehrten Einstroms von Kalzium in den Intrazellulärraum (15, 66).

Der geringfügige, allerdings signifikante Anstieg des pulmonalarteriellen Vasotonus nach Zuführung von Bosentan lässt sich durch eine basale endogene Freisetzung von Endothelin-1 aus den Gefäßen erklären, welches durch Anbindung an endotheliale ET_B -Rezeptoren eine Vasodilatation verursacht. Durch die Bosentan-vermittelte Blockade der Rezeptoren kommt es zur Hemmung dieses relaxierenden Effekts im Sinne einer lokalen Vasokonstriktion. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits zuvor *in vivo* von Verhaar *et al.* beschrieben: bei der Untersuchung der Folgen selektiver ET_B -Rezeptorblockade kam es ebenfalls zu einem Anstieg des basalen Vasotonus, in diesem Fall der A. radialis. Auch bei gleichzeitiger Inhibition der ET_A -Rezeptoren ließ sich diese Beobachtung reproduzieren, wenngleich in dem Fall insgesamt die vasodilatative Wirkung überwog (67). In Zusammenschau dieser Ergebnisse liegt es nahe, dass ET-1 physiologischerweise gegenüber dem endothelialen ET_B -Rezeptor eine höhere Affinität aufweist als gegenüber dem muskulären Subtypen, weshalb bei Inhibition der Rezeptoren die vasokonstriktive Wirkung überwiegt. Untersuchungen am Tiermodell stützen diese Theorie und lassen darauf schließen, dass die ausschließliche Blockade der ET_B -Rezeptoren in Hinblick

auf Hämodynamik und vaskuläres Remodeling potenziell negative Folgen nach sich zieht (68).

Da im vorliegenden Fall sowohl ET_A - als auch ET_B -Rezeptoren von der bosentanvermittelten Inhibierung betroffen waren, hielt sich der gemessene Anstieg des Basaltonus in Grenzen. Angesichts der *in vivo* mehrfach nachgewiesenen hohen Potenz Bosentans in der Therapie der PAH sollte die Relevanz dieser *in-vitro*-Beobachtung für den klinischen Einsatz daher nicht überbewertet werden (44, 45). Die ursprünglich erwartete, überwiegend muskelrelaxierende Wirkung der non-selektiven Rezeptorantagonisierung zeigte sich deutlich im Verlauf der ET-1-vermittelten, submaximalen Kontraktionsreihe. Die alleinige Gabe von Bosentan erwies sich insbesondere in Gegenwart hoher Endothelin-Konzentrationen (ab 3E-9 M) als effektive Maßnahme, konnte das abschließende submaximale ET-1-Kontraktionsniveau der Pulmonalarterien im Vergleich zur Kontrollgruppe doch annähernd um die Hälfte reduziert werden. Noch deutlicher fiel der Effekt in Kombination mit Vardenafil aus: die Dualtherapie aus ET-1-Rezeptorantagonist und PDE-5-Inhibitor senkte das Kontraktionsniveau nach Zugabe der höchsten ET-1-Dosis auf weniger als ein Viertel des abschließenden Wertes der Kontrollgruppe. Dieses Resultat war zu erwarten: erfahrungsgemäß überwiegt bei unselektiver Endothelin-Rezeptorblockade und gleichzeitiger exogener Endothelinzuführung die relaxierende Wirkung Bosentans auf den Vasotonus (52, 53). Wie bereits zuvor erwähnt handelt es sich bei der großen Mehrheit der pulmonalvaskulären Endothelin-Rezeptoren um Vertreter des Subtyps ET_A , dessen Inhibition sich in einer Vasodilatation äußert (18, 67). Zudem ist die Affinität Bosentans für ET_A etwa elfmal höher als für ET_B (69). Bosentan zeigte sich, sowohl in Einzeladministration als auch in Kombination mit einem PDE-5-Inhibitor (Vardenafil oder Sildenafil), als stark wirksamer Gegenspieler ET-1-induzierter Vasokonstriktion, was mit den Ergebnissen vorangegangener Organbaduntersuchungen an den Pulmonalgefäßen lungengesunder Patienten übereinstimmt. In allen drei Versuchsreihen gleichermaßen betrug die Dosis des ET-Rezeptorantagonisten 1E-7 M, was einen direkten Vergleich der jeweiligen Resultate zulässt (52, 53). Im Gegensatz zur vorliegenden Messung konnte Bosentan allerdings an den Pulmonalarterien lungengesunder Lobektomie-Patienten sowohl einzeln als auch in Kombination mit dem jeweiligen PDE-5-Inhibitor jegliche kontraktile Antwort auf Vasokonstriktor-

Zugabe bis zur höchsten verwendeten ET-1-Dosis von 1E-8 M annähernd vollständig ausschalten (52, 53). Im Vergleich ist das hier erreichte submaximale Kontraktionsniveau der Bosentangruppe deutlich erhöht, was bezüglich der effektiven Wirkung Bosentans *in vitro* auf einen Unterschied zwischen normotensiven und wahrscheinlich hypertensiv veränderten Pulmonalarterien hinweist. Analog zum zuvor beobachteten Anstieg des Basaltonus stellt auch in diesem Fall die Inhibition vasodilatatorisch aktiver ET_B-Rezeptoren eine mögliche Ursache für die geringere Effizienz Bosentans dar. Im Umkehrschluss könnte dies in Vergleich zu gesunden Gefäßproben auf eine veränderte ET-Rezeptoraktivität in pathologisch veränderten Pulmonalarterien hindeuten. *Langleben et al.* vertraten die Ansicht, dass bei einem Großteil der an PAH oder PH erkrankten Patienten Vorkommen und Funktionalität der ET_B-Rezeptoren durchaus erhalten bleibe (70). Weitere Untersuchungen lassen sogar einen erhöhten Anteil des ET_B-Subtyps bei PAH-Patienten vermuten, insbesondere in den peripher gelegenen Pulmonalgefäßen. Von dieser Umstrukturierung sind auch das Parenchym und die Bronchien betroffen. Bezogen auf den gesamten pulmonalvaskulären Kreislauf bleibt das Verhältnis von ET_A- und ET_B-Rezeptoren zueinander dabei jedoch vermutlich konstant (55, 69). Tatsächlich existieren auch Untersuchungen, wonach lediglich Rezeptoren vom Subtyp ET_B hochreguliert seien, während ET_A konstant bleibt (71). Interindividuelle Unterschiede sind demzufolge nicht auszuschließen. Die lokale Hochregulation der dilatativen ET_B-Rezeptoren in der Peripherie ist hierbei als Kompensationsmechanismus des Organismus gegen den erhöhten pulmonalarteriellen Druck zu verstehen; infolge dessen ist ET_B jedoch voraussichtlich stärker von der non-selektiven Rezeptorantagonisierung durch Bosentan betroffen, was zu lokaler Vasokonstriktion führt. Diese wirkt der insgesamt relaxierenden Wirkung Bosentans durch ET_A-Blockade entgegen und führt somit möglicherweise an den hypertensiv veränderten, eher peripher gelegenen Pulmonalarterien zu etwas höheren Kontraktionsniveaus als an den Gefäßen lungengesunder Patienten (52, 53, 67).

Vor dem Hintergrund dieser Resultate stellt sich die Frage, ob im Sinne einer zielorientierten PAH-Therapie nicht der Einsatz selektiver ET_A-Rezeptorantagonisten einer non-selektiven ET_A- und ET_B-Blockade vorzuziehen wäre. Erstere haben den Vorteil, dass der physiologische, vasodilatative Effekt der endothelialen ET_B-Stimulation erhalten bleibt. Gleichzeitig tragen jedoch auf der glatten Muskulatur der Gefäßwand lokalisierte ET_B-Rezeptoren in geringem Ausmaß zur Tonuserhöhung bei. Eine unselektive Blockade sämtlicher ET-Rezeptortypen inhibiert beide Effekte, wobei die vorliegenden Ergebnisse *in vitro* eine gewisse Einschränkung der vasorelaxierenden Wirkung suggerieren (16, 69). Um einen entscheidenden Nachteil der dualen ET-Rezeptorantagonisierung nachzuweisen wären jedoch weitere Organbad-Untersuchungen nötig, beispielsweise um die relaxierende Wirkung Bosentans direkt mit der eines spezifischen ET_A-Antagonisten wie Ambrisentan zu vergleichen. In kontrollierten klinischen Untersuchungen konnten bislang keine signifikanten Vorteile einer selektiven ET_A-Blockade im Pulmonalkreislauf nachgewiesen werden; die Datenlage hierzu ist widersprüchlich (55, 69, 72). Untersuchungen zur *systemischen* Wirkung von Endothelinrezeptor-Antagonisten bei Herzinsuffizienz am Hundemodell suggerieren *in vivo* einen Vorteil der non-selektiven Rezeptorblockade gegenüber der isolierten ET_A-Inhibition in Form einer verminderten Flüssigkeitsretention durch Hemmung der Aldosteronausschüttung (73, 74). In den aktuellen Leitlinien werden selektive ET_A-Antagonisten (Ambrisentan) und duale ET_A/ET_B-Antagonisten (Bosentan, Macitentan) als gleichwertige therapeutische Alternativen aufgeführt (9).

Keinen nennenswerten kontraktionshemmenden Effekt konnte der ET-Rezeptorantagonist in Gegenwart von NE erzielen. Es zeigte sich eine starke Annäherung der Bosentankurve an die Werte der unbehandelten Kontrollgruppe. Bereits nach Zugabe der dritt niedrigsten NE-Dosis (1E-7 M) bestand zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine Signifikanz mehr. Das abschließende maximale Kontraktionsniveau der Pulmonalarterien war nach Präinkubation in Bosentan nur unwesentlich geringer als das der Kontrolle. Dieser Verlauf ist konform mit den Ergebnissen der Organbaduntersuchungen an lungengesunden Patienten, wenngleich Bosentan in diesen Versuchsreihen auch nach Zugabe der maximalen NE-Dosis noch einen signifikanten Benefit gegenüber der untherapierten

Kontrollgruppe aufgewiesen hatte (52, 53). Dies lässt sich allerdings damit begründen, dass im vorliegenden Fall die mit Bosentan vorbehandelten Arterien bereits nach dem Pipettieren der ET-1-Konzentrationsreihe ein deutlich höheres Kraftniveau entwickelt hatten als in den bisherigen Versuchsreihen. Der Anstieg der Kontraktionskräfte im Verlauf der NE-Dosiskurve unterschied sich jedoch nicht wesentlich von den Resultaten früherer Versuchsreihen (52, 53). Eine ausgeprägte Hemmung der NE-vermittelten Kontraktion durch Bosentan in Monotherapie wäre ohnehin nicht zu erwarten gewesen, da NE seine konstriktive Wirkung über die Stimulation adrenerger Rezeptoren entfaltet. Eine Interaktion Bosentans mit diesen Rezeptortypen ist bislang nicht bekannt.

Dennoch bleibt festzustellen, dass die vorliegenden Daten eine abgeschwächte Wirkung von Bosentan auf hypertensiv veränderte Pulmonalarterien nahelegen. Bisherige klinische Erfahrungsberichte über den Einsatz Bosentans unterstützen diese These allerdings nicht (4, 44, 45). Eine mögliche Erklärung für die geringere Effizienz von Bosentan könnte beispielsweise eine bestehende medikamentöse Gewöhnung und Toleranzentwicklung der Patienten durch längerfristige orale Bosentantherapie sein. Allerdings war bei keinem der untersuchten sechs Patienten eine Vorbehandlung mit ET-Rezeptorantagonisten oder PDE-5-Inhibitoren bekannt. Wahrscheinlicher ist daher, dass sich diese Unterschiede zum klinischen Alltag aus den natürlichen Einschränkungen des Versuchsdesigns ergaben. Einerseits sind *in vivo* mehr als zwei Signalwege für die Regulation des pulmonalen Vasotonus verantwortlich (10, 21). Die sequentielle Zugabe von ET-1 und NE in ansteigender Dosis sollte die physiologischen Umstände im Organismus imitieren; eine exakte Darstellung dieser Verhältnisse ist jedoch selbstverständlich nicht möglich, zumal die zahlreichen Vorgänge, die zur Entstehung der PAH beitragen, noch nicht restlos geklärt sind. Andererseits beschränkt sich die Untersuchung im Organbad ausschließlich auf pulmonale Segmentgefäß. Tatsächlich ist jedoch davon auszugehen, dass Variablen wie PVR und mPAP größtenteils durch die Regulation kleinstter Widerstandsgefäß und Arteriolen in der Peripherie der Lunge bestimmt werden (52, 75, 76). Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Widerstandsgefäß unterscheiden sich möglicherweise deutlich von denen der hier verwendeten Segmentarterien, beispielsweise aufgrund veränderter Rezeptorexpression; aufgrund ihres geringen Durchmessers sind sie jedoch für den

Einsatz im Organbad ungeeignet (52, 55). Eine Option, um die Reagibilität der pulmonalen Widerstandsgefäße auf Medikamente ausreichend beurteilen zu können, bestünde in der Messung des Perfusionswiderstandes am perfundierten Lungenmodell. Alternativ sind auch Untersuchungen am Tiermodell mittels spezieller Katheter denkbar.

Verglichen mit Bosentan handelt es sich bei dem PDE-5-Inhibitor Vardenafil um ein relativ neues Medikament für die Therapie der PAH. Ursprünglich für die Behandlung erektiler Dysfunktion entwickelt, war es 2015 bereits in den *ESC/ERS-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie* enthalten (9). Durch Hemmung des Enzyms PDE-5 steigt die cGMP-Konzentration innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media, was über cGMP-abhängige Proteinkinasen letztendlich die Aktivierung von Kalziumkanälen nach sich zieht: der Ausstrom von Kalzium aus dem Intrazellulärraum führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (33). Die bei PAH-Patienten verhältnismäßig hohe Expression von PDE-5 im pulmonalvaskulären System trägt gemeinsam mit der verringerten Aktivität der endothelialen NO-Synthase zum Anstieg des Vasotonus bei: dadurch wird sie zu einem lohnenden therapeutischen Ansatzpunkt (14, 21, 54). Insbesondere Vardenafil hat sich unter den PDE-5-Inhibitoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als überaus potente Behandlungsoption erwiesen, welche die Leistungsfähigkeit und WHO-FC der Patienten signifikant verbessern kann (47, 51, 64). Auch in der bereits mehrmals erwähnten Vergleichsstudie dreier PDE-5-Inhibitoren fanden Ried *et al.* Hinweise darauf, dass die vasodilatative Wirkung Vardenafils zumindest *in vitro* höher einzuschätzen ist als jene Sildenafils oder Tadalafils: so konnte lediglich Vardenafil die NE-induzierte Vasokonstriktion humaner Pulmonalarterien fast vollständig inhibieren. Ebenso war der relaxierende Effekt Vardenafils auf präkontrahierte Pulmonalarterien deutlich stärker ausgeprägt als bei den anderen beiden PDE-5-Inhibitoren (53). Nicht zuletzt aus diesem Grund fiel für die vorliegende *in-vitro*-Evaluation der Wirkung von PDE-5-Inhibitoren und ET-Rezeptorantagonisten an pathologisch veränderten Pulmonalgefäßen die Wahl auf Vardenafil als Kombinationspartner zu Bosentan.

Der Effekt von Vardenafil in Monotherapie auf den pulmonalarteriellen Basaltonus blieb insgesamt nicht signifikant und zeigte allenfalls eine Tendenz gegenüber der

Kontrollgruppe. Ähnlich wie am Beispiel der Pulmonalarterien lungengesunder Patienten kam es in beiden Gruppen nach Zugabe von Medikament oder Kontrolllösung (DMSO) zu einer leichten Relaxation der Gefäßwandmuskulatur (53). Ursache hierfür könnte die durchaus auch in hypertensiv veränderten Pulmonalgefäßen erhaltene basale Freisetzung von NO aus dem Endothel sein (77). Möglicherweise führt auch, wie zuvor dargestellt, eine geringfügige Stimulation von ET_B-Rezeptoren durch endogene ET-1-Produktion zur Tonusminderung. Anders als an den gesunden Pulmonalgefäßen fiel die Vasodilatation allerdings an den nun verwendeten pathologisch veränderten Arterien unter Einfluss von Vardenafil etwas stärker aus als in der Kontrollgruppe (53). Dies könnte in der Tat auf einen geringen inhibitorischen Effekt Vardenafils auf die basale hydrolytische Aktivität des Enzyms PDE-5 hinweisen, welches in hypertensiv veränderten Gefäßen höher exprimiert ist (21, 81). Deutlich ausgeprägter war die kontraktionshemmende Leistung Vardenafils nach der exogenen Zuführung von ET-1 und NE: beide Vasokonstriktoren konnten in Gegenwart des PDE-5-Inhibitors wirksam inhibiert werden. Dies ist insbesondere im Hinblick auf ET-1 bemerkenswert, da der therapeutische Ansatzpunkt Vardenafils im NO/cGMP-Weg liegt und bislang keine ET-1-assoziierte Wirkung bekannt ist. Tatsächlich erwies sich Vardenafil bezüglich der Hemmung ET-1-vermittelter Vasokonstriktion dem non-selektiven ET-Rezeptorantagonisten Bosentan als ebenbürtig, mit allenfalls marginalen Unterschieden. Folglich erbrachte Vardenafil in Monotherapie gleichermaßen einen signifikanten Benefit gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,002$), wurde gleichzeitig jedoch vom vasorelaxierenden Effekt der Kombinationstherapie noch deutlich übertroffen ($p<0,001$). Diese Beobachtung suggeriert Berührungspunkte zwischen dem Wirkprofil Vardenafils und dem ET-Signalweg. Tatsächlich wurde bereits zuvor von durchaus zahlreichen Interaktionen zwischen ET-Aktivität und der NO/cGMP-vermittelten Kreislaufregulation berichtet. Demzufolge inhibiert NO sowohl die mRNA-Expression als auch die Freisetzung von ET-1 aus dem Endothel; die Kontraktion glatter Muskulatur kann durch NO antagonisiert werden, indem der Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärtraum sowie dem sarkoplasmatischen Retikulum ausgeschaltet wird. Zudem wird vermutet, dass NO über cGMP-abhängige Prozesse zur Inaktivierung von ERK-1/2, PKB oder Pyk-2 führt: allesamt Mediatoren und Enzyme, die hypertrophische und proliferative Prozesse im Sinne eines vaskulären Remodelings vermitteln (21, 78, 79). Da PDE-5-

Inhibitoren vereinfacht ausgedrückt einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration induzieren, scheint eine wechselseitige Interaktion mit dem ET-Signalweg vor diesem Hintergrund nicht unmöglich. Bisherige Organbad-Untersuchungen mit Sildenafil und Bosentan sprachen eher gegen diese Theorie, da die Präinkubation in Sildenafil die ET-1-vermittelte Tonuserhöhung der Pulmonalgefäße nicht nennenswert abschwächen konnte (52). Im Fall von Vardenafil gestaltet sich die Ausgangslage jedoch etwas anders: einerseits gilt generell eine höhere Potenz Vardenafils als überaus wahrscheinlich (49), andererseits scheinen auch vom NO/cGMP-Weg unabhängige Prozesse eine Rolle zu spielen. Mehrere *in-vitro*-Studien am Tiermodell attestieren Vardenafil im Gegensatz zu Sildenafil oder Tadalafil die Eigenschaft, Kalziumkanäle glatter Muskelzellen blockieren zu können (64, 65, 80). Diese Sonderstellung ist möglicherweise mitunter eine Ursache für die überlegene Effizienz Vardenafils gegenüber den beiden anderen PDE-5-Inhibitoren. *Toque et al.* verglichen die vasodilatatorische Kompetenz der drei Medikamente im Organbad anhand der Pulmonalarterien von Kaninchen. Vardenafil erwies sich als wirksamste Alternative in der Relaxation präkontrahierter Gefäße. Diese Beobachtung bestätigte sich auch nach Durchführung des identischen Versuchs mit deendothelialisierten Arterien. Darüber hinaus konnte Vardenafil die CaCl_2 -induzierte Kontraktion deendothelialisierter Gefäße ähnlich effektiv inhibieren wie der Kalziumantagonist Nifedipin (64). Weitere *in-vitro*-Untersuchungen am Rattenmodell unterstützen die Theorie, dass Vardenafil sowohl endothelabhängig als auch endothelunabhängig dilatative Effekte am Gefäßsystem vermitteln kann, beispielsweise über die Blockade von Kalziumkanälen des L-Typs (64, 65, 80). Auch wenn dies weniger eine spezifische Interaktion mit dem ET-1-assoziierten Vorgängen auf zellulärer Ebene darstellt, so könnte man die CCB-Aktivität Vardenafils dennoch als Eingriff in die gemeinsame Endstrecke der für die Pathogenese der PAH relevanten Signalwege interpretieren, welcher der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirkt.

Nicht zuletzt aufgrund der Wirkung Vardenafils auf Kalziumkanäle der glatten Gefäßmuskulatur konnte auch die NE-induzierte Vasokonstriktion effizient inhibiert werden. Nach Zugabe der maximalen NE-Dosis war das erreichte maximale Kontraktionsniveau der Vardenafilgruppe etwas mehr als halb so hoch wie das der Zeitkontrolle (Vardenafil: $46,0 \pm 14,0\%$ vs. Kontrolle: $83,8 \pm 8,2\%$). Darüber hinaus

zeigte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zur Kombinationstherapie (48,4 ± 14,0%), wohl aber zur Bosentan-Monotherapie bereits ab einer erreichten NE-Konzentration von 1E-7 M. Mit nur etwa 14 Prozentpunkten Unterschied zur Ausgangssituation hatte die Vardenafilgruppe im Verlauf der NE-Konzentrationsreihe den geringsten Anstieg der Kontraktionskräfte zu verzeichnen. Dieses Resultat ist konform mit den Ergebnissen der Organbadversuche an Pulmonalarterien lungengesunder Patienten: auch in diesen Versuchsreihen war die vasodilatierende Wirkung Vardenafils (1E-5 M) in Gegenwart zweier Vasokonstriktoren stärker ausgeprägt als die Wirkung Bosentans (1E-7 M), sowie der Dualtherapie aus beiden Medikamenten ebenbürtig (53).

Folglich lässt sich konstatieren, dass im vorliegenden Fall der kombinierte Einsatz von ET-1-Rezeptorantagonist und PDE-5-Inhibitor nur bedingt im direkten Vergleich mit Vardenafil in Einzeladministration einen signifikanten Vorteil erbringt. Keines der beiden Therapieregimes zeigte einen nennenswerten Effekt auf den Basaltonus der untersuchten Pulmonalarterien, wenngleich die Relaxation bei alleiniger Gabe von Vardenafil dezent stärker ausgeprägt war als bei Dualtherapie. In Anbetracht der Tatsache, dass die Bosentan-Monotherapie einen geringen Anstieg des basalen Vasotonus bewirkt hatte, ist dies nicht ungewöhnlich. Es ist davon auszugehen, dass die hier gegensätzlichen Effekte der beiden Kombinationspartner einander annähernd neutralisierten. In Gegenwart von ET-1 war allerdings ein verstärkter vasodilatativer Effekt der Dualtherapie gegenüber beiden monotherapeutischen Schemata vorhanden, wenngleich erst ab der höchsten ET-1-Dosis von 1E-8 M statistische Signifikanz bestand (Kombination vs. Vardenafil: $p=0,028$; Kombination vs. Bosentan: $p<0,001$). Es bleibt also festzuhalten, dass an dieser Stelle durchaus ein therapeutischer Mehrwert durch den kombinierten Einsatz beider Medikamente entstanden war. Während dieser signifikante Trend im Vergleich zu Bosentan auch über die gesamte NE-Konzentrationsreihe erhalten blieb, war der Benefit der Kombinationstherapie gegenüber Vardenafil jedoch bereits nach Zugabe der geringsten NE-Dosis (1E-8 M) nicht mehr signifikant. Vielmehr hatte sich im Fall der Dualtherapie das vorher erreichte Kontraktionsniveau im Verlauf der NE-Dosisreihe annähernd vervierfacht; der gemessene Anstieg des Vasotonus durch NE-Zugabe war damit deutlich höher als in der Vardenafilgruppe.

Die Frage nach einem potenziellen Vorteil der Kombinationstherapie oder Synergismen zwischen PDE-5-Inhibitoren und ET-Rezeptorantagonisten ist damit allein natürlich nicht restlos zu klären. Im Hinblick auf pharmakokinetische Interaktionen von Bosentan und Vardenafil gibt es durchaus Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung: *in-vivo*-Studien berichten von geringeren maximalen Vardenafilkonzentrationen im Blutplasma von PAH/PH-Patienten, die gleichzeitig mit Bosentan therapiert worden waren. Verglichen mit Patienten, die kein Bosentan erhalten hatten, war diese Differenz der Konzentrationen zwar recht deutlich ausgefallen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erlangen. Dies wurde damit begründet, dass Bosentan die Aktivität des Enzyms CYP3A4 stimuliert, welches zur Metabolisierung von Vardenafil beiträgt (82). Obwohl eine deutliche inverse Korrelation zwischen Vardenafil-Plasmaspiegel und Verminderung von mPAP und PVR im RHC bestand, war zwischen Patienten mit und ohne Bosentan-Komedikation zumindest kein signifikanter Unterschied der hämodynamischen Parameter nachweisbar. Ursache war in beiden Fällen womöglich die geringe Stichprobengröße von lediglich 16 Patienten (82, 83). In einer ähnlichen randomisierten klinischen Studie an gesunden männlichen Probanden wurde von pharmakokinetischen Interaktionen zwischen Bosentan und Sildenafil berichtet, die ebenfalls zu einer Verringerung der Plasmakonzentration des PDE-5-Inhibitors geführt hatten (84). Von der klinischen PAH-Behandlung mittels zusammengesetzter Therapieschemata aus PDE-5-Inhibitoren und ET-1-Rezeptorantagonisten wird in der Literatur durchaus positiv berichtet. So soll beispielsweise die Kombination mit Sildenafil eine Halbierung der täglichen Bosentandosis bei Patienten mit PAH oder PH ermöglichen, ohne dass dafür signifikante Verschlechterungen im Outcome hingenommen werden müssen (85). Einer anderen klinischen Studie zufolge soll die Dualtherapie aus diesen beiden Medikamenten zumindest einen stabilisierenden Effekt auf die hämodynamische Situation nach sich ziehen (86). Die vorliegende *in-vitro*-Versuchsreihe deutete in den hier verwendeten medikamentösen Dosierungen zwar auf einen ausgeprägten vasorelaxierenden Mehreffekt der Dualtherapie gegenüber Bosentan in Einzeladministration hin. Verglichen mit der alleinigen Gabe von Vardenafil war jedoch lediglich in Gegenwart von ET-1 in Höchstkonzentration (1E-8 M) ein signifikanter Benefit nachweisbar. Dieses Resultat stimmt überein mit den bisherigen Versuchsergebnissen an den Pulmonalgefäßen lungengesunder

Patienten. Auch hier war Vardenafil zunächst in der Dosierung 1E-5 M eingesetzt worden und hatte sich als gleichwertig zur Kombinationstherapie erwiesen. Um festzustellen, ob auch geringere Konzentrationen des PDE-5-Inhibitors einen ausreichenden Effekt hervorrufen könnten, wurde die identische Versuchsreihe ein weiteres Mal durchgeführt, allerdings mit Vardenafil in der nächstniedrigeren Dosis (1E-6 M). Es zeigte sich, dass die additive Gabe von Bosentan den vasodilatierenden Effekt Vardenafils gegenüber beiden monotherapeutischen Schemata tatsächlich signifikant verbessern konnte (53). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass auch im vorliegenden Fall Vardenafil initial zu hochdosiert eingesetzt worden war. Infolge dessen war die vasodilatierende Wirkung des PDE-5-Inhibitors bereits in Einzeladministration derart ausgeprägt, dass ein möglicherweise supportiver Effekt Bosentans davon vollständig überlagert wurde. Dies deutet darauf hin, dass Vardenafil in künftig folgenden Organbadversuchen an pathologisch veränderten Pulmonalgefäßßen ebenfalls niedriger dosiert werden könnte.

Vor dem Hintergrund des *ex-vivo/in-vitro*-Settings des Organbads muss bei der Interpretation der Versuchsergebnisse auf die Limitationen des experimentellen Designs hingewiesen werden. Wie bereits angesprochen kann das Organbad keine exakte Nachbildung der physiologischen Kreislaufverhältnisse gewährleisten. Die Verwendung zweier endogener Vasokonstriktoren (ET-1 und NE) soll zwar die Verhältnisse im Organismus imitieren, allein aufgrund der in weiten Teilen noch unbekannten Pathogenese der PAH können die zahlreichen regulatorischen Mechanismen des Lungenkreislaufs *in vivo* hier nicht dargestellt werden. Selbiges gilt für Veränderungen im Blutfluss oder für Scherkräfte, die auf die Gefäßwand einwirken (7). Ein kritikloser Transfer der Versuchsresultate auf die Klinik ist auch deshalb nicht zu empfehlen, da das Organbad lediglich die funktionelle Untersuchung von Lungensegmentarterien ermöglicht. Parameter wie mPAP oder PVR werden jedoch hauptsächlich durch Arteriolen und Widerstandsgefäße reguliert, deren Durchmesser viel zu gering für die Fixierung im Organbad sind. Heterogene pharmakologische Eigenschaften der verschiedenen Gefäßtypen lassen sich allerdings ebenso wenig ausschließen wie interindividuelle Unterschiede in Rezeptorexpression oder Enzymaktivität (55, 69, 75). Auch die in der Literatur suggerierte gegenseitige Beeinflussung von Vardenafil und Bosentan bezüglich ihrer Metabolisierung kann *in vitro* nicht simuliert werden. Angesichts der im Vergleich zu

früheren Versuchsreihen etwas geringeren erreichten maximalen Kontraktionskräfte ist nicht auszuschließen, dass die transportbedingt längere Zeitspanne zwischen Entnahme der Pulmonalarterien und Beginn der Untersuchung im Organbad Auswirkungen auf die Funktionalität der Gefäße hat. Auch die Resultate der Untersuchungen an Rindervenen in der vorliegenden Arbeit suggerieren einen Einfluss von Lagerungszeit und –medium auf die Reagibilität (vgl. Abb. 12 und 13). Wenngleich dies im vorliegenden Fall keinen negativen Einfluss auf Durchführung oder Aussagekraft der Versuche hatte, sind dennoch kurze Transferzeiten und die Aufbewahrung des Materials in geeigneter Nährlösung anzustreben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in der durchgeführten Versuchsreihe das Verhalten pathologisch veränderter Pulmonalarterien im Organbad nicht wesentlich von dem gesunder Gefäße unterschied. Ein Grund dafür mag sein, dass angesichts des nicht übermäßig stark erhöhten mPAP der Arterien noch kein allzu ausgeprägtes vaskuläres Remodeling stattgefunden hatte, welches die Vasoreaktivität beeinflussen hätte können. Bosentan konnte die ET-1-induzierte Vasokonstriktion wirksam inhibieren, während gegenüber NE kein nennenswerter kontraktionshemmender Effekt bestand. Der signifikante Anstieg des vaskulären Tonus nach Zugabe von Bosentan ließ auf eine Hemmung der geringen basalen Aktivität von ET_B-Rezeptoren schließen, wodurch möglicherweise die im Vergleich zu gesunden Pulmonalgefäßen etwas abgeschwächte Wirkung des ET-1-Rezeptorantagonisten zu begründen ist. Vardenafil zeigte sich sowohl ET-1 als auch NE gegenüber als potenter Vasodilatator und erwies sich der Dualtherapie mit Bosentan als ebenbürtig. Analog zu früheren Versuchsreihen lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass Vardenafil in den folgenden Versuchsreihen voraussichtlich niedriger dosiert werden kann, um eine verstärkende Interaktion mit Bosentan sichtbar zu machen. Vorbehaltlich der oben aufgeführten Einschränkungen des Versuchsdesigns scheint die Kombinationstherapie aus Vardenafil und Bosentan zumindest gegenüber der isolierten Gabe Bosentans einen ausgeprägteren hämodynamischen Benefit zu erbringen. Die Gültigkeit dieser These sollte jedoch auch in Hinblick auf potenzielle Nebenwirkungen im klinischen Setting überprüft werden.

Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit humaner Pulmonalgefäße sind *in-vitro*-Untersuchungen von menschlichem Gefäßmaterial selten. Ein Großteil des aktuellen Wissensstandes zur Behandlung der PAH/PH beruht auf Kenntnissen, die durch klinische RCTs oder experimentelle Studien am Tiermodell erlangt wurden. Die vorliegende Versuchsreihe beinhaltet möglicherweise weltweit die erste funktionelle Organbad-Untersuchung an pathologisch veränderten Pulmonalarterien, welche im Rahmen einer Lungentransplantation entnommen wurden. Aufgrund der eingeschränkten Kalkulierbarkeit bezüglich der Verfügbarkeit von Gefäßmaterial sowie dem erhöhten Aufwand durch den Transport von München nach Regensburg konnte nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Patienten evaluiert werden; dennoch war diese Stichprobe ausreichend, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen therapeutischen Schemata feststellen zu können. Solche Untersuchungen am Organbad bieten einen bedeutenden Vorteil gegenüber *in-vivo*-Studien: sie ermöglichen die Beurteilung der Vasoaktivität unter Einfluss einzelner oder mehrerer Vasodilatatoren und -konstriktoren in einer simulierten physiologischen Umgebung und erlauben Rückschlüsse auf Wirkung und Dosierung der verwendeten Pharmaka, die sich im klinischen Setting nur schwer erheben lassen. Die Bedeutung experimenteller Organbad-Studien für die Behandlung der PAH hat folglich seit dem Beginn der medikamentösen Therapie durch den Einsatz von Epoprostenol vor mittlerweile mehr als 20 Jahren nicht abgenommen und ist auch in Zukunft für die weitere Erforschung des Krankheitsbildes nicht zu unterschätzen.

5. Zusammenfassung

Die medikamentöse Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) setzt sich aus unterschiedlichen Substanzklassen zusammen, insbesondere Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren. In einer *ex-vivo/in-vitro*-Versuchsreihe wurden die vasorelaxierenden Effekte einer Kombinationstherapie aus Vardenafil (PDE-5-Inhibitor) und Bosentan (ET-1-Antagonist) mit denen der Monotherapie verglichen. Ziel einer solchen Kombitherapie ist die Risikoreduktion für Nebenwirkungen und Toleranzentwicklung durch den Einsatz geringerer medikamentöser Einzeldosierungen, ohne insgesamt an Wirkung zu verlieren.

Als Versuchsmaterial dienten pathologisch veränderte Pulmonalarterien ($n=6$) von respiratorisch insuffizienten Patienten, bei welchen mangels medikamentöser Therapiealternativen die Indikation zur Lungentransplantation gestellt worden war. Die Entnahme der Pulmonalgefäße erfolgte im Rahmen der Transplantation im Klinikum München Großhadern. Im Organbad wurden schmale Segmente der Arterien in Vardenafil ($1E-5$ M) und/oder Bosentan ($1E-7$ M) inkubiert und mittels ET-1 und Noradrenalin (NE) zur Kontraktion gebracht. Es erfolgte die isometrische Messung der Kontraktionskräfte dieser Gefäße abhängig von der jeweiligen Präinkubation. Die Wahl der Medikamentenkonzentrationen ergab sich aus den Resultaten früherer Versuchsreihen, welche an den Pulmonalgefäßen lungengesunder Patienten durchgeführt worden waren, die sich am Universitätsklinikum Regensburg einer Lobektomie unterzogen hatten.

Bosentan allein bewirkte keinen signifikanten kontraktionshemmenden Effekt ($76,4 \pm 17,0\%$ vs $83,8 \pm 8,2\%$ in der unbehandelten Kontrollgruppe; $p=0,17$) und führte zu einem leichten Anstieg des Basaltonus ($p=0,01$). Vardenafil konnte die Vasokonstriktion deutlich vermindern ($46,0 \pm 14,0\%$; $p<0,01$). Eine signifikante Tendenz zeigte sich in der Senkung des Basaltonus durch Vardenafil ($p=0,08$). Die Kombination aus Vardenafil und Bosentan verringerte die kontraktile Gefäßreaktion auf Vasokonstriktorgabe deutlich ($48,4 \pm 14,0\%$), was sich sowohl gegenüber der Kontrolle ($p<0,01$) als auch Bosentan in Einzeladministration ($p=0,04$) als signifikant erwies.

Folglich zeigte die Kombinationstherapie aus PDE-5-Inhibitor und ET-1-Antagonist einen signifikanten Vorteil gegenüber der Bosentan-Monotherapie und konnte die maximale Gefäßkontraktion annähernd halbieren. Vardenafil erreichte in der verwendeten Konzentration sogar als Einzelgabe einen ähnlichen Effekt. Daraus lässt sich schließen, dass Vardenafil in weiteren Versuchen geringer dosiert werden kann, ohne die Kombinationswirkung zu verringern.

6. Anhang

6.1. Verzeichnis der Abkürzungen

6MWD	Sechs-Minuten-Gehdistanz
A.	Arteria
ALT	Alanin-Transferase
AST	Aspartat-Transferase
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CCB	Kalziumkanalblocker
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DLCO	Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nährmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAA	Exogen-allergische Alveolitis
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK-1/2	Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2
ET-1	Endothelin-1
FEV ₁	(exspiratorische) Einsekundenkapazität
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HI	Herzindex
IPF	idiopathische Lungenfibrose
KCl	Kaliumchlorid
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
NE	Noradrenalin (Norepinephrin)
NO	Stickstoffmonoxid

NSIP	Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie/Pneumopathie
NYHA	New York Heart Association
p.A.	analysenrein
PA/PV	Pulmonalarterie/ -vene
PAH/PH	Pulmonalarterielle/ Pulmonale Hypertonie
pO ₂ / pCO ₂	arterieller Sauerstoff-/ Kohlendioxid-Partialdruck
PCWP	Lungenkapillarenverschlussdruck, <i>Wedge</i> -Druck
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PKB	Proteinkinase B
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
RA/RV	Rechter Vorhof/ Ventrikel
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie
RHC	Rechtsherzkatheter
SNP	Natriumnitroprussid
TTE	Transthorakale Echokardiographie
V.	Vena
VC	Vitalkapazität
WHO-FC	Funktionelle WHO-Klasse
WU	Wood Unit

6.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

6.2.1. Abbildungen

Abbildung 1: Nizza-Klassifikation der PH/PAH.....	Seite 8
Abbildung 2: Endothelin-Signalweg.....	Seite 11
Abbildung 3: NO/cGMP-Signalweg.....	Seite 12
Abbildung 4: Fibrosierung und inflammatorische Infiltrate bei PH.....	Seite 14
Abbildung 5: Intimaverdickung mit luminaler okklusion.....	Seite 14
Abbildung 6: Plexiforme Läsion bei PH.....	Seite 14
Abbildung 7: Ansatzpunkte der PH/PAH-Therapie.....	Seite 20
Abbildung 8: Klingenblock zur Gefäßpräparation.....	Seite 27
Abbildung 9: Arteriensegment im Organbad.....	Seite 27
Abbildung 10: Organbad-Schema.....	Seite 28
Abbildung 11: Aufbau des Organbads im Forschungslabor.....	Seite 28
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve Vardenafil nach 24 h Lagerung.....	Seite 37
Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurve Vardenafil ohne Lagerung.....	Seite 38
Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve Vardenafil bei Arterie.....	Seite 38
Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurve Vardenafil gesamt.....	Seite 39
Abbildung 16: Basaltonus der humanen PA.....	Seite 42
Abbildung 17: Konzentrationsreihe ET-1/NE an humanen PA.....	Seite 43

6.2.2. Tabellen

Tabelle 1: Bosentan-Studien.....	Seite 18
Tabelle 2: Möglichkeiten und Limitationen des Organbads.....	Seite 27
Tabelle 3: Zusammensetzung der KH-Lösung.....	Seite 31
Tabelle 4: Zusammensetzung der Arbeitslösung.....	Seite 31
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Vasokonstriktoren/-dilatatoren.....	Seite 31
Tabelle 6: Übersicht der inkludierten Patienten.....	Seite 40
Tabelle 7: Vergleich der p-Werte von Mono- und Kombitherapie.....	Seite 42

7. Literaturverzeichnis

1. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25 Suppl):D34-41.
2. Voswinckel R, Hoeper MM, Kramm T, Ghofrani HA. Rechtsherzversagen bei chronischer pulmonaler Hypertonie und akuter Lungenembolie. *Internist (Berl)* 2012; 53(5):545–56.
3. Preston IR, Klinger JR, Houtchess J, Nelson D, Farber HW, Hill NS. Acute and chronic effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2005; 99(12):1501–10.
4. Valerio CJ, Coghlan JG. Bosentan in the treatment of pulmonary arterial hypertension with the focus on the mildly symptomatic patient. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5:607–19.
5. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996; 334(5):296–301.
6. Channick RN. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol* 2013; 111(8 Suppl):16C-20C.
7. Rosenfeldt FL, He GW, Buxton BF, Angus JA. Pharmacology of coronary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg* 1999; 67(3):878–88.
8. Kwapiszewska G, Hoffmann J, Kovacs G, Stacher E, Olschewski A, Olschewski H. Pulmonary (arterielle) Hypertonie. *Pneumologie* 2016; 70(10):630–7.
9. Galie N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A et al. 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 Respir J* 2015; 46(4):903–75.

10. Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 352(9129):719–25.
11. Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(5):1008–14.
12. Frost AE, Farber HW, Barst RJ, Miller DP, Elliott CG, McGoon MD. Demographics and outcomes of patients diagnosed with pulmonary hypertension with pulmonary capillary wedge pressures 16 to 18 mm Hg: insights from the REVEAL Registry. *Chest* 2013; 143(1):185–95.
13. Sun X-G, Hansen JE, Oudiz RJ, Wasserman K. Pulmonary function in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(6):1028–35.
14. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):13S-24S.
15. Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J* 1995; 9(12):1196–204.
16. Davie NJ, Schermuly RT, Weissmann N, Grimminger F, Ghofrani HA. The science of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future studies. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 Suppl 2:38–49.
17. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* 2003; 278(50):49929–35.
18. Davenport AP, O'Reilly G, Kuc RE. Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type. *Br J Pharmacol* 1995; 114(6):1110–6.
19. Seferian A, Simonneau G. Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *Eur Respir Rev* 2013; 22(129):217–26.
20. Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B et al. The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling. *PLoS One* 2013; 8(8):e73399.

21. Gao Y, Chen T, Raj JU. Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 54(4):451–60.
22. Ghosh S, Gupta M, Xu W, Mavrakis DA, Janocha AJ, Comhair SAA et al. Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthesis in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 310(11):L1199-205.
23. Wharton J, Strange JW, Moller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(1):105–13.
24. Burger CD, D'Albini L, Raspa S, Pruett JA. The evolution of prostacyclins in pulmonary arterial hypertension: from classical treatment to modern management. *Am J Manag Care* 2016; 22(1 Suppl):S3-15.
25. Lang IM, Gaine SP. Recent advances in targeting the prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2015; 24(138):630–41.
26. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(6):1925–32.
27. Christman Brian W., McPherson Charles D., Newman John H., King Gayle A., Bernard Gordon R., Groves Bertron M., Loyd James E. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327:70-5.
28. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(3):261–72.
29. Nickel N, Golpon H, Greer M, Knudsen L, Olsson K, Westerkamp V et al. The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2012; 39(3):589–96.
30. Humbert M, Sitbon O, Yaïci A, Montani D, O'Callaghan DS, Jaïs X et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2010; 36(3):549–55.

31. Hoeper MM, Markevych I, Spiekerkoetter E, Welte T, Niedermeyer J. Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005; 26(5):858–63.
32. Baldi F, Fuso L, Arrighi E, Valente S. Optimal management of pulmonary arterial hypertension: prognostic indicators to determine treatment course. *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10:825–39.
33. Montani D, Chaumais M-C, Savale L, Natali D, Price LC, Jais X et al. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *Adv Ther* 2009; 26(9):813–25.
34. Barst RJ, Rubin LJ, McGoon MD, Caldwell EJ, Long WA, Levy PS. Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med* 1994; 121(6):409–15.
35. Barst Robyn J., Rubin Lewis J., Long Walker A., McGoon Michael D., Rich Stuart, Badesch David B., Groves Bertron M., Tapson Victor F., Bourge Robert C., Brundage Bruce H., Koerner Spencer K., Langleben David, Keller Cesar A., Murali Srinivas, Uretsky Barry F., Clayton Linda M., Jöbsis Maria M., Blackburn Shelmer D. Jr., Shortino Denise, Crow James W. A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 1996;334:296-301.
36. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002; 347(5):322–9.
37. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(6):800–4.
38. Farber HW, Miller DP, Meltzer LA, McGoon MD. Treatment of patients with pulmonary arterial hypertension at the time of death or deterioration to functional class IV: insights from the REVEAL Registry. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:1114–1122.

39. Sharma K. Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Rev Respir Med* 2016; 10(1):1–3.
40. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galie N et al. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2015; 373:2522–33.
41. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: A randomised placebocontrolled study. *The Lancet* 2001; 358(9288):1119–23.
42. Simonneau G, Galie N, Jansa P, Meyer GMB, Al-Hiti H, Kusic-Pajic A et al. Long-term results from the EARLY study of bosentan in WHO functional class II pulmonary arterial hypertension patients. *Int J Cardiol* 2014; 172(2):332–9.
43. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* (1985) 1995; 79(6):2122–31.
44. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346(12):896–903.
45. Galiè N, Rubin LJ, Hoeper MM, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer GM et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): A double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* 2008; 371(9630):2093–100.
46. Wei A, Gu Z, Li J, Liu X, Wu X, Han Y et al. Clinical Adverse Effects of Endothelin Receptor Antagonists: Insights From the Meta-Analysis of 4894 Patients From 24 Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trials. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(11):e003896.
47. Jing Z-C, Jiang X, Wu B-X, Xu X-Q, Wu Y, Ma C-R et al. Vardenafil treatment for patients with pulmonary arterial hypertension: a multicentre, open-label study. *Heart* 2009; 95(18):1531–6.
48. Blount MA, Beasley A, Zoraghı R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH et al. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol* 2004; 66(1):144–52.

49. Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem Int* 2004; 45(6):859–63.
50. Gopal VK, Francis SH, Corbin JD. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *Eur J Biochem* 2001; 268(11):3304–12.
51. Jing Z-C, Yu Z-X, Shen J-Y, Wu B-X, Xu K-F, Zhu X-Y et al. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(12):1723–9.
52. Ried M, Potzger T, Neu R, Sziklavari Z, Szoke T, Liebold A et al. Combination of sildenafil and bosentan for pulmonary hypertension in a human ex vivo model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2014; 28(1):45–51.
53. Ried M, Neu R, Lehle K, Großer C, Szöke T, Lang G et al. Superior vasodilation of human pulmonary vessels by vardenafil compared with tadalafil and sildenafil: additive effects of bosentan. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2017.
54. Giard A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333(4):214–21.
55. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW et al. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(3):398–405.
56. Hall SM, Davie N, Klein N, Haworth SG. Endothelin receptor expression in idiopathic pulmonary arterial hypertension: effect of bosentan and epoprostenol treatment. *Eur Respir J* 2011; 38(4):851–60.
57. He GW, Angus JA, Rosenfeldt FL. Reactivity of the canine isolated internal mammary artery, saphenous vein, and coronary artery to constrictor and dilator substances: relevance to coronary bypass graft surgery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(1):12–22.
58. Hussain A, Bennett RT, Chaudhry MA, Qadri SS, Cowen M, Morice AH et al. Characterization of optimal resting tension in human pulmonary arteries. *World J Cardiol* 2016; 8(9):553–8.

59. Milara J, Escriva J, Ortiz JL, Juan G, Artigues E, Morcillo E et al. Vascular effects of sildenafil in patients with pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: an ex vivo/in vitro study. *Eur Respir J* 2016; 47(6):1737–49.
60. Ranney Re. A myograph for measurement of the isometric tensions developed by extracted muscle fibers. *J Appl Physiol* 1954; 6(8):513–6.
61. Hoenicka M, Lehle K, Jacobs VR, Schmid FX, Birnbaum DE. Properties of the human umbilical vein as a living scaffold for a tissue-engineered vessel graft. *Tissue Eng* 2007; 13(1):219–29.
62. Hoenicka M, Keyser A, Rupprecht L, Puehler T, Hirt S, Schmid C. Endothelium-dependent vasoconstriction in isolated vessel grafts: a novel mechanism of vasospasm? *Ann Thorac Surg* 2011; 92(4):1299–306.
63. McKenzie C, Alapati VR, MacDonald A, Shaw AM. Mechanisms involved in the regulation of bovine pulmonary vascular tone by the 5-HT1B receptor. *Br J Pharmacol* 2010; 159(1):188–200.
64. Toque HA, Teixeira CE, Priviero FBM, Morganti RP, Antunes E, Nucci G de. 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.
65. Karasu-Minareci E, Ozbudak IH, Ozbilim G, Sadan G. Acute effects of vardenafil on pulmonary artery responsiveness in pulmonary hypertension. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012:718279.
66. Sumner MJ, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* 1992; 107(3):858–60.
67. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97(8):752–6.
68. Murakoshi N, Miyauchi T, Kakinuma Y, Ohuchi T, Goto K, Yanagisawa M et al. Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in

vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice. Circulation 2002; 106(15):1991–8.

69. Opitz CF, Ewert R. Dual ET(A)/ET(B) vs. selective ET(A) endothelin receptor antagonism in patients with pulmonary hypertension. Eur J Clin Invest 2006; 36 Suppl 3:1–9.
70. Langleben D, Dupuis J, Langleben I, Hirsch AM, Baron M, Senécal J-L et al. Etiology-specific endothelin-1 clearance in human precapillary pulmonary hypertension. Chest 2006; 129(3):689–95.
71. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schäfers H-J. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. Circulation 2002; 105(9):1034–6.
72. Bagnall A, Webb D. Are selective endothelin A receptor antagonists better than mixed antagonists? J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38 Suppl 2:S43-6.
73. Ohnishi M, Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Kinoshita M. Comparison of the acute effects of a selective endothelin ETA and a mixed ETA/ETB receptor antagonist in heart failure. Cardiovasc Res 1998; 39(3):617–24.
74. Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Ohnishi M, Maeda K, Hisanaga T et al. Comparison of the effects of selective endothelin ETA and ETB receptor antagonists in congestive heart failure. J Am Coll Cardiol 1997; 30(5):1385–92.
75. Lammers S, Scott D, Hunter K, Tan W, Shandas R, Stenmark KR. Mechanics and function of the pulmonary vasculature: implications for pulmonary vascular disease and right ventricular function. Compr Physiol 2012; 2(1):295–319.
76. Newman JH, Brittain EL, Robbins IM, Hemnes AR. Effect of acute arteriolar vasodilation on capacitance and resistance in pulmonary arterial hypertension. Chest 2015; 147(4):1080–5.
77. Cremona G, Higenbottam TW, Bower EA, Wood AM, Stewart S. Hemodynamic effects of basal and stimulated release of endogenous nitric oxide in isolated human lungs. Circulation 1999; 100(12):1316–21.
78. Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293(4):H2072-9.

79. Meoli DF, White RJ. Endothelin-1 induces pulmonary but not aortic smooth muscle cell migration by activating ERK1/2 MAP kinase. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88(8):830–9.
80. Teixeira CE, Priviero FBM, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(2):654–61.
81. Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(3):930–8.
82. Sandqvist AM, Henrohn D, Schneede J, Hedeland M, Egeröd HC, Bondesson UG et al. High inter-individual variability of vardenafil pharmacokinetics in patients with pulmonary hypertension. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69(2):197–207.
83. Henrohn D, Sandqvist A, Hedeland M, Egeröd H, Bondesson U, Wikström G. Acute haemodynamic response in relation to plasma vardenafil concentrations in patients with pulmonary hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 74(6):990–8.
84. Burgess G, Hoogkamer H, Collings L, Dingemanse J. Mutual pharmacokinetic interactions between steady-state bosentan and sildenafil. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64(1):43–50.
85. Amin A, Mohamadifar A, Taghavi S, Naderi N, Sadeghi H. Lower Doses of Bosentan in Combination With Sildenafil Might be Beneficial in Pulmonary Arterial Hypertension. *Res Cardiovasc Med* 2015; 4(3):e26487.
86. Monfredi O, Heward E, Griffiths L, Condliffe R, Mahadevan VS. Effect of dual pulmonary vasodilator therapy in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease: a retrospective analysis. *Open Heart* 2016; 3(1):e000399.

8. Danksagung

Sämtliche Versuche zur vorliegenden Promotionsarbeit wurden im Forschungslabor der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg durchgeführt.

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir die Erstellung meiner Promotionsarbeit ermöglicht haben. Mein Betreuer, Herr PD Dr. Michael Ried, unterstützte mich jederzeit mit nützlichen Hinweisen und großem Engagement und trug so maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Herr Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann stand mir als Doktorvater regelmäßig für konstruktive Gespräche zur Verfügung. Eine bessere Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit hätte ich mir nicht wünschen können.

Ohne die Kooperation der Abteilung für Thoraxchirurgie des Klinikums Großhadern unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Rudolf Hatz wäre die Durchführung dieser Versuchsreihe nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Dr. Laura Klotz und Frau Corinna Mendel hervorheben, die meine ständigen Ansprechpartnerinnen für die Organisation der Entnahme und Abholung der Gefäßproben waren. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle die Metzgereien Hirth (Donaustauf), Höcherl (Falkenstein) und Reichl (Barbing) erwähnen, denen ich für die unentgeltliche Bereitstellung der Rindervenen danken will.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei Frau Katrin Bielenberg und Herrn PD Dr. Markus Hönicka bedanken, die mir die praktische Durchführung der Versuche sowie deren Auswertung beigebracht und mit ihrer kompetenten Hilfe erheblich erleichtert haben.

9. Selbständigkeitserklärung

Ich, Christian Thomas Stadlbauer, geboren am 23.06.1993 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

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

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift des Promovenden