

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

UNTERSUCHUNG DER PHARMAKOLOGISCHEN WIRKUNG VON
PHOSPHODIESTERASE-HEMMERN UND ENDOTHELIN-REZEPTOR-
ANTAGONISTEN AN HUMANEN PULMONALGEFÄSSEN
IN EINEM EX-VIVO-ORGANBADMODELL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Englert

2021

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

UNTERSUCHUNG DER PHARMAKOLOGISCHEN WIRKUNG VON
PHOSPHODIESTERASE-HEMMERN UND ENDOTHELIN-REZEPTOR-
ANTAGONISTEN AN HUMANEN PULMONALGEFÄSSEN
IN EINEM EX-VIVO-ORGANBADMODELL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Englert

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schulz
Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2022

Abkürzungsverzeichnis:.....	5
1 Theoretische Einführung in das Themengebiet.....	8
2 Grundlagen des Themengebietes	9
2.1 Pulmonal arterielle Hypertonie	9
2.1.1 Krankheitsbild der pulmonal arteriellen Hypertonie	10
2.1.2 Pathogenese der Erkrankung	10
2.1.3 Diagnostik der pulmonal arteriellen Hypertonie	13
2.1.4 Therapie der Krankheit	15
2.2 Prinzip der Vasodilatation	17
2.3 Prinzip der Vasokonstriktion	17
2.4 Hintergrundinformationen zu den untersuchten Medikamenten.....	18
2.4.1 Endothelin	18
2.4.2 Endothelinrezeptorantagonisten	19
2.4.2.1 Bosentan.....	19
2.4.2.2 Macitentan.....	20
2.4.2.3 ACT-132577.....	20
2.4.3 Phosphodiesterase-Hemmer	20
2.4.3.1 Unterschiede zwischen Vardenafil, Sildenafil und Tadalafil.....	20
2.4.3.1 Vardenafil.....	21
3 Aufgabenstellung der Dissertation	22
4 Material und Methoden der Versuch	23
4.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	23
4.2 Versuchsutensilien.....	24
4.2.1 Verwendete Materialien	24
4.2.2 Verwendete Geräte.....	27
4.2.3 Verwendete Software.....	27
4.2.4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	28
4.3 Versuchsablauf	31
5 Auswertung der Daten.....	36
6 Statistische Analyse zu den Versuchen	37
7 Ergebnisse der Versuchsreihen	38
7.1 Kombination Vardenafil und Bosentan.....	48
7.1.1 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M.....	48
7.1.2 Kombination Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M.....	49
7.1.3 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten	51
7.1.4 Kombination Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten	52
7.2 Kombination Vardenafil und Macitentan	54
7.2.1 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M.....	54
7.2.2 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-7 M.....	55
7.2.3 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten	57
7.2.4 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 3E-8 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten	58

7.3	Kombination Vardenafil und ACT-132577.....	60
7.3.1	Kombination Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-8 M.....	60
7.3.2	Kombination Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-7 M.....	61
8	Diskussion und Limitationen.....	63
8.1	Diskussion der Ergebnisse	63
8.2	Limitationen der Dissertation	75
9	Zusammenfassung.....	75
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	78
11	Referenzen.....	79
12	Eidesstattliche Erklärung.....	87
13	Danksagung.....	88
14	Lebenslauf.....	89

Abkürzungsverzeichnis:

°	Grad
♂	männlich
♀	weiblich
µl	Mikroliter
6MWT	Sechs-Minuten Gehstest
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
BNP	Brain-Type Natiuretisches Peptid
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Type II
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Herzindex
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cm	Zentimeter
CMR	kardiale Magnetresonanztomographie
DAG	1,2-Diacylglycerol
d	digit = kleinster Ziffernschritt
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ET	Endothelin
etc.	et cetera
ERA	Endothelinrezeptorantagonist
EU	Europäische Union
FGF	Fibroblast Growth Factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HTC	Herz-Thorax-Chirurgie
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.v.	intravenös
KH	Krebs-Henseleit
KHK	Koronare Herzkrankheit
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
LTX	Lungentransplantation/ lungentransplantiert
m	Meter
m ²	Quadratmeter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mN	Millinewton
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NA [^]	Noradrenalin = Norepinephrin
NO	Stickstoffmonoxid
NSIP	nicht spezifische interstitielle Pneumonie
NT-proBNP	N-terminales pro Brain-Type Natriuretisches Peptid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p	Partialdruck
PA	Pulmonalarterie
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PAPm	mittlerer pulmonal-arterieller Druck
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor

PV	Pulmonalvene
PVR	pulmonal vaskulärer Widerstand
pred.	vorhergesagt
RA	rechter Vorhof
RAP	rechter Vorhofdruck
rer. nat.	Doktor der Naturwissenschaften
REVEAL	Register to Evaluate Early and Lung-Term PAH Disease Management
RHK	Rechtsherzkatheter
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SvO ₂	gemischt-venöse Sauerstoffsättigung
TGF-β	Transforming Growth Factor β
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VO ₂	Sauerstoffaufnahme
VE/VCO ₂	Atemäquivalent für Kohlendioxid
WHO	World Health Organization
WHO FC	World Health Organization Functional Class

1 Theoretische Einführung in das Themengebiet

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine progressive Erkrankung, bei der ein erhöhter Gesamtwiderstand und insbesondere ein erhöhter Druck in den Lungenarterien zu einer Reihe von medizinischen Problemen führen. Die vermehrte Druckbelastung im Lungenkreislauf bewirkt eine stärkere Belastung des rechten Ventrikels und das resultierende Rechtsherzversagen macht die PAH zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung, welche bis zum Tod führen kann [1]. Aufgrund der genannten Problematik gibt es zahlreiche Studien, die sich mit der Behandlung und Ursachenforschung dieser Erkrankung beschäftigen. Größtenteils handelt es sich hierbei um klinisch-pharmakologische Studien [2]. Bisher sind vor allem konservative Maßnahmen wie Gewichtsreduzierung und vermehrte Bewegung, generelle blutdruck- und vorlastsenkende Medikamente sowie Medikamente, die günstig auf die Vasodilatation wirken, etabliert. Eine besondere Rolle spielen hierbei Phosphodiesterase5-Hemmer (PDE5-Hemmer) und Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERA). Beide wurden bisher oft in Monotherapie angewandt [3]. In einigen Studien wurde die Medikamentenwirkung prospektiv verfolgt und Verbesserungen der Symptomatik gezeigt, welche anhand des Sechs-Minuten Gehstest (6MWT) gemessen wurden. Eine Grundlagenforschung an humanen Pulmonalgefäßen existiert bisher nicht [2]. Insgesamt sind direkte Vergleiche zwischen Therapieoptionen ausstehend und die Durchführung von weiteren randomisierten Langzeitstudien ist für die Verbesserung der Qualität der PAH-Forschung sinnvoll [4].

Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es, die Wirkung der genannten Medikamentengruppen an humanen Pulmonalarterien (PA) in einem etablierten Organbadmodell zu untersuchen und speziell die Kombination der beiden Rezeptorblocker näher zu evaluieren. Die Wirkung der Vasodilantien soll direkt an humanen Lungengefäßen untersucht werden und mögliche Vorteile einer Kombinationstherapie geprüft werden. Hierzu wird die Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit humaner Pulmonalgefäße unter Medikamenteneinfluss untersucht. Zum Vergleich dienen sowohl physiologische, d.h. vaskulär gesunde Pulmonalgefäße von Patienten nach einer Lobektomie in Regensburg, als auch pathologische Pulmonalgefäße von lungentransplantierten (LTX) Patienten mit einer Endstadium Lungenerkrankung aus München. In ersten Ergebnissen dieser Ex-vivo und In-vitro-Organbadversuche an humanen Pulmonalgefäßen konnte unsere

Arbeitsgruppe bereits eine bessere Wirkung durch die Kombination von zwei Wirkstoffgruppen zeigen [5,6,7]. Vorangegangene Versuche des Forschungsteams unter der Leitung von Professor Hofmann aus Regensburg legten dar, dass Vardenafil im Vergleich zu anderen PDE5-Hemmern den besten vasodilatatorischen Effekt auf humane Pulmonalgefäße hatte [6]. Deshalb befasst sich diese Arbeit mit der Kombination von Vardenafil und den ERA Bosentan, Macitentan und dem Macitentan Metaboliten ACT-132577. In vorherigen Versuchen wurde bereits angefangen nach Medikamenten und der Dosis zu forschen, mit denen die bestmögliche Vasodilatation zu erzielen ist [5,6,7]. So lehnt sich diese Arbeit an vorangegangene Versuche an und untersucht gezielt den Medikamenteneinfluss an humanen PA. Ziel ist es, bei einer möglichst niedrigen Konzentration den besten vasodilatatorischen Effekt zu erreichen. In Erweiterung soll eine Zusammenstellung von klinischen Informationen über die Patienten dazu dienen, auf mögliche Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und der Wirkung der Medikamente zu schließen.

2 Grundlagen des Themengebietes

2.1 Pulmonal arterielle Hypertonie

Die PAH ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, bei der ein zunehmender vaskulärer Widerstand zu einem progredienten Rechtsherzversagen und schließlich bis zum Tod führen kann [1]. Die PAH wird durch einen Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (PAPm) auf ≥ 25 mmHG in Ruhe definiert. Dieser wird mittels Rechtsherzkatheter (RHK)-Untersuchung gemessen. Normalerweise beträgt der PAPm 14 ± 3 mmHg in Ruhe und gilt bis zu einer oberen Normgrenze von 20 mmHg als physiologisch [3]. Die Inzidenz der PAH beträgt circa 2 - 7 Patienten bezogen auf eine Million Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz beträgt 11 - 26 pro eine Million Erwachsene [2]. Generell geht die PAH bei einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 22 - 38 % unbehandelt mit einer schlechten Überlebensprognose einher [8]. Die funktionelle World Health Organization (WHO)-Klassifikation unterscheidet vier Krankheitsstadien, in Abhängigkeit der körperlichen Belastbarkeit der Patienten. (Klasse I: Keine Einschränkung, Klasse II: Leichte Einschränkung, Klasse III: Starke Einschränkung, Klasse IV: Unfähigkeit zur Ausübung jeglicher körperlicher Tätigkeit,

Atemnot und Müdigkeit besteht bereits in Ruhe) [8]. Höhere WHO-Klasseneinteilungen gehen einher mit einer höheren Sterblichkeitsrate [9].

2.1.1 Krankheitsbild der pulmonal arteriellen Hypertonie

Die Symptome der PAH sind unspezifisch und können durch verursachende oder assoziierte Erkrankungen geprägt sein. Hierbei kann es zu Kurzatmigkeit, Müdigkeit, Schwäche, Husten, Synkopen und Angina Pectoris kommen. Symptome in Ruhe treten nur in fortgeschrittenen Stadien auf [3,10]. Patienten mit PAH können unter Hypoxie bei Belastung oder auch in Ruhe leiden [11]. Eine signifikante Dilatation der PA kann bis zu einer Dissektion oder Ruptur der Arterien führen und schließlich eine Herztamponade verursachen [10]. Zu den körperlichen Befunden zählen linksparasternale Pulsationen, eine akzentuierte Pulmonaliskomponente des zweiten Herztons oder ein dritter Herzton. Außerdem kann es zu einem erhöhten Jugularvenendruck, Hepatomegalie, Aszites und zu peripheren Ödemen kommen [3,10].

2.1.2 Pathogenese der Erkrankung

Spezifisch für die PAH ist eine pathogenetische Trias aus Vasokonstriktion, arteriellen Thromben und Umbau pulmonaler Gefäße, ursächlich durch eine Proliferation von glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen bedingt [9,10]. Die Gefäßveränderungen durch die PAH können in sechs Klassen eingeteilt werden, welche angeben, ob der stattgefundene Umbau der Arterien durch einen chirurgischen Eingriff reversibel ist. Hierbei sind die pathologischen Veränderungen in den Klassen I - III grundsätzlich reversibel und ab Klasse IV persistierend. Bei milder Hypertonie erkennt man in Klasse I eine Verdickung der muskulären Arterien und das Auftreten von glatten Muskelzellen in der Wand von pulmonalen Arteriolen. Ab Stufe II treten eine Intimaproliferation und weitere Mediahypertrophie auf, wie in Abbildung 1 veranschaulicht wird. In Stufe III schreitet die Fibrosierung der Intima weiter fort. Ab der irreversiblen Klasse IV kommt es zu plexiformen Läsionen der Arterien. Durch diese Läsionen entstehen kleine, verschachtelte Nebenpassagen für den Blutfluss. Diese Gefäßdefekte sind charakterisiert durch irreguläre, dilatative, dünne Wandschichten und führen zu verstärkter Obstruktion des normalen pulmonalen

Blutflusses [13]. Laut einer Studie traten bei Frauen 2,8-mal häufiger plexiforme Läsionen auf als bei Männern [14]. In Klasse V finden sich Rupturen der erweiterten Gefäßläsionen und es kommt zu parenchymalen Blutungen und Hämosiderose. Nekrosen und fibrinöser Umbau der Arterien und Arteriolen sind in Klasse VI zu beobachten [13]. Am Gefäßumbau ist unter anderem die Hyperproliferation verschiedener Zelltypen beteiligt. Angeregt wird dieser Prozess durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie dem „platelet-derived growth factor“ (PDGF), dem „fibroblast growth factor“ (FGF) und dem „transforming growth factor β “ (TGF- β). Zudem wird der Gefäßumbau durch die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und Thrombozyten beeinflusst [15]. Gemäß einer Studie, die 62 erkrankte Lungengefäße und 28 normotensive Kontrollgefäße untersuchte, gab es eine 94%ige Übereinstimmung zwischen pathologischen Befunden und der klinischen Diagnose. Die Wandschichten der Intima und Media der PAH-Gefäße waren im Verhältnis signifikant breiter als die Wandschichten der Gefäße der Kontrollgruppe. Die verbreiterte Wanddicke der Media korrelierte mit gemessenem PAPm und pulmonalem vaskulärem Widerstand (PVR). Bei Betrachtung der Adventitia konnte keine entsprechende Korrelation zwischen der Gefäßwanddicke und hämodynamischen Parametern gefunden werden. Zwischen der Anzahl der plexiformen Gefäßläsionen und dem PAPm ließ sich ebenfalls keine Korrelation darstellen [14].

Experimentelle Arbeiten und Studien an Patienten wiesen darauf hin, dass Entzündungsreaktionen eine Rolle bei der Entstehung der PAH spielten [16,17]. Bei der histologischen Untersuchung von PAH-Gefäßen traten perivaskuläre und interstitielle Entzündungsinfiltrate in pathologischen PAH-Gefäßen auf. Dabei korrelierte der Grad der perivaskulären Entzündung mit der fraktionellen Intima- plus Mediadicke und der fraktionellen Adventitiadicke. Außerdem zeigte sich ein Trend in Richtung einer Korrelation mit dem PAPm [14]. In den für PAH typischen plexiformen Gefäßläsionen befand sich eine Vielzahl an mononuklearen Zellen, vor allem T-Zellen und Makrophagen, aber auch B-Zellen [18]. Zudem wies das Lungengewebe von PAH-Patienten erhöhte Konzentrationen von verschiedenen Interleukinen (1 β , 2, 4, 6, 8, 10 und 12p70), dem Tumornekrosefaktor α und Chemokinen auf [2,19].

In einer histologischen Untersuchung konnten zudem arterielle Thromben in circa 50 % der PAH-Lungen entdeckt werden [14]. Eine Veranschaulichung befindet sich in Abbildung 2.

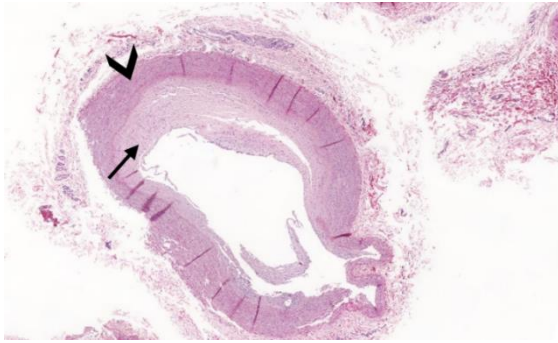


Abbildung 1: Verdickung der Intima (Pfeil) und Media (Pfeilspitze) einer PA (HE Färbung)

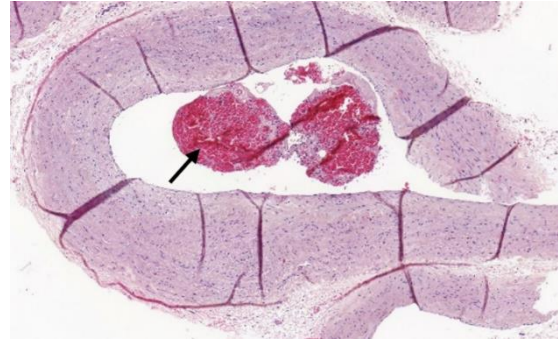


Abbildung 2: Thrombus in einer PA (Pfeil) (HE-Färbung)

In erkrankten Gefäßen lag ein ungleiches Angebot an vasoaktiven Mediatoren vor, vasokonstriktorische Mediatoren überwogen gegenüber den vasodilatatorischen. Es existierte eine Überexpression an PDE5, verbunden mit einer geringeren Stimulierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC). Dies resultiert in einem cyclischen Guanodinmonophosphat (cGMP)-Mangel, der zu einer verminderten Relaxation der Gefäße führte. Außerdem war das vasodilatatorisch wirkende Stickstoffmonoxid (NO) vermindert, welches über eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol relaxierend auf die Gefäße wirkt. [8,20]. Dieser NO-Mangel führt außerdem zu einer verminderten Cyclooxygenasen-Aktivierung und damit zusätzlich zu einem reduzierten Prostazyklin-Spiegel [8,21]. Eine Reduktion der Prostazykline senkt die Adenosinmonophosphat-(cAMP)-Konzentration in den Zellen und resultiert deswegen ebenfalls in einer verminderten Vasodilatation. Anstelle eines vasodilatatorischen Einflusses präsentierte sich ein Überschuss an vasokonstriktorischem Endothelin (ET)-1, welches eine große Rolle in der Progression von pulmonalen vaskulären Erkrankungen spielt [2,8,22]. Das durch Endothelschädigung entstehende Ungleichgewicht an vasodilatatorischen und vasokonstriktorischem Faktoren war maßgeblich an der Fortschreitung der Krankheit beteiligt [15].

Die Gefäßveränderungen durch PAH werden durch eine Vielzahl an Faktoren getriggert. Dabei ist anzunehmen, dass der Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Typ II (BMPR2), der vor allem auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert ist, als einer der Hauptregulatoren wirkt. Laut eines Reviews waren bis zu 70 % der an familiärer PAH erkrankten Patienten und bis zu 30 % der an idiopathischer PAH

erkrankten Patienten Träger von BMPR2-Mutationen [16]. Anhand einer Untersuchung von 115 Mutationsträgern und 267 Patienten ohne Mutation stellte man fest, dass sowohl Männer als auch Frauen mit Mutation bei PAH-Diagnose signifikant jünger waren und zum Diagnosezeitpunkt eine schlechtere Hämodynamik aufzeigten [23]. Im Vergleich zu Patienten ohne BMPR2-Mutation konnte bei Patienten mit BMPR2-Mutation ein stärkerer Umbau der Intima gefunden werden [14]. Bei Mutationsträgern wurden außerdem höhere PAPm-Werte festgestellt [14,23]. Es konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Überlebenszeit und Zeitpunkt bis zu einer LTX festgestellt werden. Der ähnliche zeitliche Krankheitsverlauf bei früherer Diagnose impliziert den früheren Tod der Mutationsträger [23].

2.1.3 Diagnostik der pulmonal arteriellen Hypertonie

Ein frühzeitiges Erkennen der PAH ist für ein besseres Überleben der Patienten wichtig, da ein frühzeitiger gezielter Therapiebeginn zu verminderter Rechtsherzbelastung führen kann und somit die Prognose verbessert [24,25]. Die REVEAL (Registry to Evaluate Early and Long-Term PAH Disease Management) Studie zeigte, dass 21 % der untersuchten Patienten schon über zwei Jahre vor Diagnosestellung Symptome aufzeigten und sich zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in der WHO Functional Class (WHO FC) III oder IV befanden, welche mit schlechter Prognose assoziiert sind [25,26]. Screening Methoden sind bisher nur für Hochrisiko-Patienten etabliert, sodass eine frühe Diagnose mit Achtsamkeit des medizinischen Personals zusammenhängt. Bei Risikopatienten ist eine gute klinische Einschätzung für den Ausschluss der PAH relevant. Ebenso sollten Lungenfunktionstests durchgeführt werden, Kohlenmonoxidwerte überprüft und eine Herzechographie angefertigt werden [25]. Die Diagnosestellung der PAH erfordert einen auf Symptomen und Befunden basierenden klinischen Verdacht sowie die Durchführung weiterer Untersuchungen, welche die Diagnose und den Schweregrad der Erkrankung belegen. Dies erfordert eine multidisziplinäre Zusammenarbeit und Erfahrung in den Bereichen der Kardiologie, Pulmologie und Radiologie [3].

Für eine regelmäßige Beurteilung der PAH-Patienten ist eine umfassende Untersuchung notwendig, da es keinen alleinigen ausreichenden Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes gibt. Aufgrund umfassender Untersuchungen

erfolgt eine Einteilung der Patienten nach geringem, intermediärem oder hohem Risiko [3,27]. Zusammen mit weiteren Faktoren korreliert dieses Risiko mit klinischer Verschlechterung und Sterblichkeit [3]. Eine Risikostratifizierung der PAH in drei Gruppen ist in Abbildung 3 dargestellt.

Prognoseparameter	Geringes Risiko	Intermediäres Risiko	Hohes Risiko
geschätzte 1-Jahres-Mortalität	< 5 %	5-10 %	> 10 %
Klinische Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz	Nicht vorliegend	Nicht vorliegend	Vorliegend
Progression der Symptome	Nein	Langsam	Schnell
Synkope	Nein	Gelegentliche Synkopen	Wiederholte Synkopen
WHO FC	I, II	III	IV
6MWT	> 440 m	165 – 440 m	< 165 m
Kardiopulmonaler Belastungstest (Spiroergometrie)	Höchstwert VO ₂ > 15 ml/min/kg (> 65 % pred.) VE/VCO ₂ -Slope < 36	Höchstwert VO ₂ 11 - 15 ml/min/kg (35 - 65% pred.) VE/VCO ₂ -Slope 36 - 44,9	Höchstwert VO ₂ < 11 ml/min/kg (< 35 % pred.) VE/VCO ₂ -Slope ≥ 45
BNP/NTproBNP-Plasmaspiegel	BNP < 50 ng/l NTproBNP < 300 ng/ml	BNP 50 - 300 ng/l NTproBNP 300 - 400 ng/ml	BNP > 300 ng/l NTproBNP > 1400 ng/ml
Bildgebung (Echokardiographie, CMR)	RA-Fläche 18 cm ² Kein Perikarderguss	RA-Fläche 18 – 26 cm ² Kein oder minimaler Perikarderguss	RA-Fläche >26 cm ² Perikarderguss
Hämodynamik	RAP < 8 mmHg CI ≥ 2,5 l/min/m ² SvO ₂ > 65 %	RAP 8 – 14 mmHg CI 2,0 - 2,4 l/min/m ² SvO ₂ 60 - 65 %	RAP > 14 mmHg CI < 2,0 l/min/m ² SvO ₂ < 60 %

Abbildung 3: Risikostratifizierung bei PAH (niedriges, intermediäres und hohes Risiko) [3]

Generell dient die RHK-Untersuchung zur Diagnosebestätigung sowie zur Einteilung des Schweregrades der hämodynamischen Beeinträchtigung. Mittels Herzkatheteruntersuchung kann eine Vasoreagibilitätstestung des pulmonalen Kreislaufes durchgeführt werden, welche für eine weitere Therapieplanung essentiell ist [3].

Der 6MWT ist ein kosten-günstiger, leicht durchführbarer Test, der an vielen Zentren für eine prognostische Informationsgewinnung angewandt wird. Bei den Ergebnissen müssen beeinflussende Faktoren wie Geschlecht, Alter, Gewicht, Komorbiditäten, Motivation etc. mitberücksichtigt werden. In Zusammenschau mit dem Borg-Dyspnoe-Score können absolute Werte hinweisend sein [10]. Jedoch hat eine Metaanalyse über 22 randomisierte Studien gezeigt, dass Verbesserungen im 6MWT nicht signifikant ein verbessertes klinisches Outcome widerspiegeln. Schlechte Reproduzierbarkeit und Standardisierung erschweren direkte Assoziationen zwischen Ergebnissen des 6MWT und der Vorhersage des klinischen Outcomes [28].

Zur Einschätzung der Überlebensrate und zur Verlaufskontrolle dient vor allem die WHO FC. Eine Verschlechterung der WHO FC ist ein wichtiger Parameter zur Erkennung der Fortschreitung der Erkrankung und sollte zu weiterer Diagnostik führen [10,29].

2.1.4 Therapie der Krankheit

Wesentliches Ziel der PAH-Therapie ist das Erlangen eines geringen Risikostatus und einer Zurückstufung des Patienten in WHO FC II [9,10]. Ein geringeres Risikoprofil geht einher mit erhöhter Belastbarkeit und Lebensqualität der Patienten sowie einer verbesserten Funktion des rechten Ventrikels. Diese ist mit einem geringeren Sterblichkeitsrisiko assoziiert [10].

Die bisherigen Therapieoptionen der PAH beinhalten die Gabe von Vasodilantien und Calcium (Ca^{2+})-Antagonisten sowie supportive und präventive Therapien mit Antikoagulantien, Diuretika und Sauerstoff (O_2). Diuretika und O_2 werden vor allem zur Symptomlinderung bei peripheren Ödemen und Dyspnoe eingesetzt [10,30,31]. Patienten, die positiv auf eine Vasoreagibilitätstestung mit NO reagieren (signifikante Senkung des PAPm während Ca^{2+} -Antagonisten-Applikation bei RHK-Untersuchung. [32]), erhalten eine symptom- und lebenserwartungs-verbessernde Therapie mit

hochdosierten Ca²⁺-Kanal-Blockern und Antikoagulantien [10,31]. Jedoch sprachen weniger als 10 % der PAH-Patienten langfristig gut auf eine Ca²⁺-Antagonisten-Therapie an [33]. Ca²⁺-Antagonisten führen bei sehr hoher Dosierung zu unselektiver Gefäßdilatation und pulmonaler Drucksenkung. Aktuelle Richtlinien empfehlen die Gabe von Nifedipin (120-240 mg/d), Diltiazem (240-720mg/d) oder Amlodipin (10-20 mg/d) [32].

Eine Epoprostenol-Verabreichung mittels Dauerkatheter erzielte bei Patienten mit schwerer PAH (New York Heart Association (NYHA) Klasse III und IV) hämodynamische Verbesserungen und Verbesserungen im 6MWT [31,34]. Aus Kostengründen wurde das Prostanoid jedoch weitgehend von Iloprost abgelöst [32].

Zu den zugelassenen Vasodilantien der spezifischen PAH-Therapie in WHO FC II und III zählen verschiedene ERA (Ambrisentan, Bosentan und Macitentan) und PDE-Hemmer (Vardenafil, Tadalafil und Sildenafil) [3,8]. Als neue Wirkstoffgruppe gelten Stimulatoren der sGC. So führt das seit 2014 zugelassene Riociguat über eine Stimulation und Stabilisierung des NO-sGC-cGMP-Weges zu einer Vasodilatation [32,34,35].

Das Therapiekonzept besteht aus drei wesentlichen Schritten. Zuerst werden generelle Maßnahmen wie die Steigerung des Aktivitätslevels und die Vermeidung von Schwangerschaft und Infektionen sowie supportive Maßnahmen (Gabe von oralen Antikoagulantien, O₂ und Diuretika) angewandt. Es gilt hierbei die Empfehlung einer Pneumokokken- und Influenza-Impfung sowie eine psychosoziale Betreuung [10]. Bei einem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) < 60 mmHg sollte eine supportive O₂-Langzeittherapie zur Senkung der hypoxischen pulmonal-arteriellen Vasokonstriktion und des pulmonal-arteriellen Drucks angewandt werden [32]. Der zweite Schritt beinhaltet hochdosierte Ca²⁺-Kanal-Blocker bei Respondern des Vasoreagibilitätstests oder weitere zugelassene PAH-Medikamente entsprechend des jeweiligen Risikoprofils. Schritt drei bezieht sich auf das inadäquate Ansprechen auf vorangegangene Therapien und beinhaltet verschiedene Kombinationstherapien zugelassener Medikamente sowie die Aussicht auf eine LTX [10].

2.2 Prinzip der Vasodilatation

Eine Vasodilatation entsteht durch mechanisch oder metabolisch bedingte Hyperpolarisierung der Gefäßmuskelzellen. Zu den lokal-metabolischen Mediatoren zählen Wasserstoff (H^+)-Ione, Laktat, Kalium-Ione, Kohlendioxid (CO_2), Adenosin und Adenosindiphosphat (ADP), die bei Bedarf vasodilatierend und damit durchblutungssteigernd wirken. Bei erhöhter Blutströmung führt gesteigerte Schubspannung im Endothel zur mechanischen Freisetzung von vasodilatierenden Stoffen wie NO und Prostazyklin. So ist das Gefäßendothel selbst an einer lokal chemischen Regulation der Durchblutung beteiligt [36,37]. Sowohl die mechanische Belastung als auch die Bindung von vasodilatierenden Substanzen an die Endothelzellmembran erhöhen die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen. Das einströmende Ca^{2+} aktiviert eine NO-Synthase, welche das kurzlebige NO von der Aminosäure Arginin abspaltet [36]. NO diffundiert aus der Endothelzelle in die Gefäßmuskelzelle und aktiviert dort die sGC, welche die Umwandlung von Guanosin triphosphat (GTP) zu dem intrazellulären second messenger cGMP katalysiert. Das cGMP aktiviert die Proteinkinase G [21,38]. Diese phosphoryliert die Ca^{2+} -ATPase in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Daraus resultieren eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol, eine geringere Sensitivität des kontraktilen Apparates und eine durch MLCP bedingte Dephosphorylierung von Myosin-Leichtketten. Dadurch relaxiert die glatte Muskulatur [20,39]. Prostazyklin wird mithilfe der Zyklooxygenase aus Arachidonsäure synthetisiert. Es aktiviert die Adenylatzyklase und führt über erhöhte cAMP-Konzentration der Zelle zur Relaxierung der Gefäßmuskulatur [21,36].

2.3 Prinzip der Vasokonstriktion

Mechanische, elektrische oder chemische Reize führen über Kontraktion der Gefäßmuskelzellen zu einer aktiven Verengung von Gefäßen. Dabei führen vasoaktive Substanzen zur rezeptorvermittelten Diffusion von Ca^{2+} in die Zelle und lösen eine Kontraktion aus oder es kommt über eine Depolarisation der Zelle durch geöffnete spannungsabhängige Ionenkanäle zu einer Kontraktion. Durch die Depolarisation der Zelle öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Ca^{2+} -Ione diffundieren aus dem endoplasmatischen Retikulum und der extrazellulären Matrix in das Zytosol [37]. Bei

Ca²⁺-Konzentrationen von über 10⁻⁷ mol/l führt eine reversible Bindung von vier Ca²⁺-Ionen an Calmodulin zur Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), welche die regulatorische leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Der nun aktive Myosinkopf kann den Querbrückenzyklus durchlaufen und kontrahieren [20,37,39]. Nicht phosphorylierte leichte Ketten des Myosins verhindern die Kontraktion [39]. Bei der Bindung von vasokonstriktorisches Mediatoren an Rezeptoren werden Ca²⁺-Kanäle über second messenger aktiviert. So wirkt beispielsweise Noradrenalin (NA) über einen entsprechenden Rezeptor und aktiviert das G_q-Protein. Dieses aktiviert die Phospholipase C und setzt Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) frei. Das freigesetzte IP3 wirkt auf den IP3-Rezeptor im sarkoplasmatischem Retikulum und führt über Ca²⁺-Freisetzung zur Aktivierung der MLCK [38]. DAG verstärkt den kontrahierenden Effekt, in dem es die Proteinkinase C aktiviert, welche die MLCP hemmt [36,39].

2.4 Hintergrundinformationen zu den untersuchten Medikamenten

Im Folgenden wird näher auf die Eigenschaften und auf die Hintergrundinformationen zu ET, den ERA und verschiedene PDE-Hemmer eingegangen. Außerdem werden Vorversuche unseres Forschungslabors aufgeführt, die das Kontraktionsverhalten von Pulmonalgefäßen untersucht haben.

2.4.1 Endothelin

ET sind Peptidhormone, die aus 21 Aminosäuren bestehen [41,42]. ET wirkt als potenter Vasokonstriktor, stimuliert die Zellproliferation sowie Entzündungs- und Fibrosereaktionen [12,31]. Außerdem wirkt ET als Wachstumsfaktor auf die Gefäßmuskulatur, Fibroblasten und Kardiomyozyten und beeinflusst den kardiovaskulären Umbau, der bei der PAH eine Rolle spielt [8,41]. Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen (ET-1, ET-2 und ET-3), wobei ET-1 die häufigste Form im menschlichen Körper ist und so den stärksten vasokonstriktorisches Einfluss hat. Nach einer Zellstimulation wird Präproendothelin gebildet, welches in Proendothelin umgewandelt wird und dann durch das ET-Konversions-Enzym in ET transformiert wird. ET kann dann an Endothelinrezeptoren (ER) binden [41].

Hier unterscheidet man ER Typ-A und B (ER_A und ER_B). Die ER_A binden hauptsächlich ET-1 und sind vor allem auf der glatten Muskulatur und einiger anderer Zellen exprimiert, nicht aber auf Endothelzellen [38,41,42,43]. Die ER_B finden sich auch auf Endothelzellen und binden alle ET-Isoformen [38,41,43]. Eine Kopplung beider Rezeptoren an die Phospholipase C führt über Bildung von IP₃ und DAG zum Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. So haben beide Rezeptoren vasokonstriktorische Eigenschaften [38,41]. An Endothelzellen führt eine Stimulation der ER_B über freigesetztes NO und Prostazyklin zu einer vasodilatatorischen Komponente, die jedoch durch direkte Vasokonstriktion bei längerer ET-1 Freisetzung in den Hintergrund gerät [36,38,41].

2.4.2 Endothelinrezeptorantagonisten

2.4.2.1 Bosentan

Bosentan ist ein unselektiver ER_A und ER_B, dessen Affinität zu ER_A 10-fach höher ist [41,43]. Seit 2002 ist Bosentan als erster klinisch zugelassener ERA erhältlich. Bosentan fungiert als Induktor der abbauenden Enzyme CYP2C9/3A4 und beschleunigt so seinen eigenen Abbau während der Therapie. Außerdem führt die Induktion des P-Gp-Transportproteins im Darm zu einer reduzierten oralen Bioverfügbarkeit [8]. Als Kontraindikationen zählen Schwangerschaft und vorbekannte Lebererkrankungen, da der ERA dosisabhängig den Gallentransport der Leber hemmt. Bosentan-Verabreichung führte zu signifikant schlechterer Leberfunktion verglichen mit Placebo-Gabe [44,45]. Kopfschmerzen und Flush waren häufige unerwünschte Nebenwirkungen [41]. Eine Metaanalyse besagte, dass Bosentan nicht mit signifikanten Veränderungen der Mortalität in Verbindung gebracht werden konnte [45]. Ebenso konnte kein gehäuftes Auftreten von Adverse-Events festgestellt werden [44,45]. Gemäß verschiedenen Metaanalysen konnte Bosentan vorteilhaft zur Behandlung der PAH eingesetzt werden [2,45]. Bei vorangegangenen Organbadversuchen im Herz-Thorax-Chirurgie (HTC)-Labor der Universität Regensburg konnte nachgewiesen werden, dass Bosentan-Gabe zu einer kleinen, aber nicht signifikanten Verringerung des Basaltonus führte, die maximale Kontraktion durch ET-1 der Pulmonalvenen (PV) verminderte und die der PA fast komplett senkte [7].

2.4.2.2 Macitentan

Das seit 2014 zugelassene Macitentan blockiert vor allem den ER_A [32]. Als Weiterentwicklung von Bosentan präsentiert sich Macitentan deutlich lipophiler und damit gewebeängiger als die bekannten ERA Bosentan und Ambrisentan. Im Gegensatz zu Bosentan zeigte sich eine zweifach längere Wirkdauer [46]. Durch eine verbesserte, langsamere Rezeptor-Dissoziationskinetik ist die ER-Inhibition länger anhaltend als bei anderen ERA. Deshalb ist anzunehmen, dass Macitentan eine effektivere ET-1 Blockade bewirkt [47]. Trotz ähnlicher chemischer Struktur wie Bosentan, erwies sich Macitentan in mehreren Studien als weniger leberschädigend [44,48]. Laut der SERAPHIN-Studie (Untersuchung der Wirkung von Macitentan 3mg/d, 10mg/d, und Placebo im 1:1:1 Verhältnis) traten bei Macitentan-Gabe, verglichen mit Placebo-Applikation, vermehrt Kopfschmerzen, virale Infektionen des Respirationstraktes und Bronchitis als Nebenwirkungen auf [49].

2.4.2.3 ACT-132577

In-vivo wird Macitentan in einen pharmakologisch aktiven Hauptmetaboliten ACT-132577 verstoffwechselt [46]. ACT-132577 wird auch Aprocitentan genannt und ist ebenfalls ein ERA. Eine Phase-2-Studie zur Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit von ACT-132577 bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurde erst im Mai 2017 abgeschlossen. Eine Phase-3-Studie befinden sich aktuell in Durchführung [50].

2.4.3 Phosphodiesterase-Hemmer

2.4.3.1 Unterschiede zwischen Vardenafil, Sildenafil und Tadalafil

Zu den Hemmstoffen der PDE5 zählen Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil. Sildenafil und Vardenafil variieren nur minimal in ihrer Struktur und haben deshalb ähnliche pharmakologische Eigenschaften [41]. Die Unterschiede in der Struktur bestehen zum einen in einer Ethyl-Gruppe am Piperazinring bei Vardenafil und stattdessen in einer Methylgruppe bei Sildenafil, zum anderen variiert das heterozyklische Ringsystem der beiden PDE5-Hemmer leicht [51,52]. Die Struktur von Tadalafil unterscheidet sich

wesentlich von der anderer PDE5-Hemmer und deshalb weist Tadalafil Unterschiede in manchen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften auf [41,52]. Vardenafil und Sildenafil haben im Vergleich zur PDE-1 eine 100-fache, im Vergleich zur PDE6 eine 10 - 15-fache und verglichen mit anderen Isoformen eine > 1000-fache Selektivität für die PDE5, woraus sich das spezifische Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum ergibt. Die Wirkung auf die PDE6 kann bei Vardenafil und Sildenafil zu Störungen des Phototransduktionsprozesses der Retina führen und somit einen negativen Einfluss auf das Farbsehen haben. Tadalafil ist unter In-vitro-Bedingungen noch spezifischer für die PDE5 [38]. Allen PDE5-Hemmern gemein ist eine verstärkte Wirkung der NO-vermittelten Vasodilatation. Daraus ergeben sich Nebenwirkungen, die mit Blutdruckabfällen zusammenhängen, Schwindel, Flush, Dyspepsie und eine verstopfte Nase. Kontraindiziert ist die Gabe von organischen Nitraten und NO-Donatoren, da diese die Wirkung der PDE5-Inhibitoren weiter verstärken [32,41].

2.4.3.2 Vardenafil

Vardenafil wird schnell im Gastrointestinaltrakt absorbiert und hat somit beim Menschen nur eine orale Bioverfügbarkeit von geschätzten 15 % [53]. Es besitzt eine Halbwertszeit von circa vier h und eine maximale Plasmakonzentration von circa 60 min. Studien zur Bindungsaffinität an verschiedenen Rezeptoren, wie Alpha- oder Betarezeptoren, cholinerge, histaminerge und serotonerge Rezeptoren haben gezeigt, dass Vardenafil selektiv an PDE-Rezeptoren bindet und so klinisch relevante Rezeptor-Interaktionen auszuschließen sind [32,53]. Vardenafil hat ähnliche pharmakologische Eigenschaften und eine ähnliche chemische Struktur wie Sildenafil. Im Vergleich zu Tadalafil variiert Vardenafil in manchen pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften [41,54].

Bisher wird Vardenafil nur als Off-label-Medikation zur Therapie der PAH eingesetzt. In der Behandlung von Erektile Dysfunktion ist Vardenafil jedoch bereits etabliert, sodass Sicherheit und Nebenwirkungen bekannt sind. Das Nebenwirkungsspektrum beinhaltet unter anderem eine NO-induzierte Vasodilatation, einen erniedrigten Blutdruck und Schwindel, und ist vergleichbar mit dem Nebenwirkungsspektrum der anderen PDE5-Inhibitoren [2,55,56].

In vorherigen Organbadversuchen der Herz-Thorax-Chirurgie (HTC) Universität Regensburg hat sich gezeigt, dass Vardenafil im Vergleich zu Sildenafil und Tadalafil das potenteste Vasodilatans an mit NE vorkontrahierten PA war [6]. Deswegen konzentriert sich diese Arbeit auf die Kombination eines ERA mit dem PDE5-Hemmer Vardenafil. Außerdem führte Vardenafil zu signifikanter Vasodilatation der PV. Vardenafil hatte in den bisherigen Versuchen keinen relevanten Einfluss auf den Basaltonus der Gefäße, verminderte aber effektiv die vasokonstriktorische Wirkung von NE auf humane PV und PA [6].

3 Aufgabenstellung der Dissertation

Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung des Vasodilatationsvermögens von ERA und Vardenafil in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen an humanen Pulmonalgefäßen. Therapien mit den entsprechenden Medikamenten sind bereits etabliert, weitere Untersuchungen in einem Organbadmodell sollen die Medikamentenwirkung tiefgreifend untersuchen. Möglicherweise variieren Medikamenten-Interaktionen in pathologischen Gefäßen aufgrund von Veränderungen endothelialer Rezeptoren und Gefäßstrukturen. Veränderungen der Quantität und Qualität von Rezeptoren könnten zudem zu einem unterschiedlichen Ansprechen auf verschiedene Wirkstoffe führen. Eine Modifikation der Wanddicke könnte zu einer Beeinflussung der maximalen Vasokonstriktion und Vasodilatation führen. Deshalb soll die Betrachtung von pathologischen Gefäßen Hinweise darauf liefern, ob die untersuchten Medikamente auch an lungenerkrankten Patienten Wirkung zeigen. Die Promotionsarbeit dient der Verdeutlichung, ob die Wirkstoffe eine ebenso gute Wirkung an potenziell veränderten Rezeptoren zeigen, wie an den Rezeptoren von gesunden Gefäßen. Wirkungsunterschiede zu pathologischen Gefäßen unter In-vitro-Bedingungen könnten auch Rückschlüsse darauf liefern, ob je nach Fortschreiten der Erkrankung eine andere Dosierung In-vivo für den gewünschten Effekt notwendig wären. Im Hinblick auf diese Aspekte wurden gesunde und erkrankte Gefäße untersucht und die Ergebnisse gegenübergestellt. Pathologische Veränderungen im Kontraktionsverhalten sind vorwiegend bei PA zu erwarten. Dies beruht unter anderem darauf, dass das arterielle Blutsystem verantwortlich für einen erhöhten vaskulären Widerstand ist und somit maßgeblich

einen erhöhten Blutdruck bedingt [7]. Deshalb bezieht sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit auf die Analyse von PA und nicht auf PV.

4 Material und Methoden

4.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Zur Durchführung der Experimente wurden folgende Lungengefäße verwendet:

- 23 Gefäße von Patienten nach elektiver Lobektomie im Uniklinikum Regensburg
- 4 Gefäße von Patienten nach elektiver Lobektomie im Uniklinikum Ulm
- 12 Gefäße von Patienten nach elektiver Lobektomie im Klinikum Barmherzige Brüder Regensburg
- 26 Gefäße von Patienten nach LTX im Klinikum Großhadern, München

Die Gefäße von LTX-Patienten wurden als pathologisch klassifiziert, da von einer Grunderkrankung ihrer Lungengefäße auszugehen war. Die entnommenen Gefäße nach Lobektomie wurden als physiologisch definiert, da die Lobektomie nicht aufgrund einer vaskulären Erkrankung erfolgte, sondern diese meist aufgrund einer Malignomerkrankung indiziert war. Im Zeitraum zwischen April 2015 und September 2018 wurden PA und PV mit einer Länge von bis zu 3 cm und einem Durchmesser von maximal 1 cm nach der jeweiligen Operation aus dem entfernten Lungenlappen frei präpariert. Die PA wurden für die Organbadversuche verwendet und deren Ergebnisse in der Auswertung betrachtet. Sowohl PA als auch PV wurden für histologische Untersuchungen aufbewahrt. Beim Präparieren sollte der Operateur besonders vorsichtig sein und Verletzungen des Gefäßendothels vermeiden. Um keine Vasospasmen zu provozieren, sollte keine erhöhte Zug- und Druckspannung auf die Gefäße ausgeübt werden. Als Vorsichtsmaßnahme wurde das präparierte Segmentstück mit einer Pinzette nur endständig oder, falls vorhanden, an Klammernähten angefasst und in den entsprechenden Behälter gelegt. Die Venen- und Arteriensegmente aus Regensburg wurden in heparinisiertem Patientenblut in einem kleinen Gefäß gelagert und zeitnah an das Forschungslabor der HTC übermittelt. Die Gefäße aus München wurden gekühlt (4°C -8°C) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Medium) gelagert und ebenfalls in das

Forschungslabor des Uniklinikums Regensburg gebracht. Wenn der Versuch nicht unmittelbar begonnen wurde, lagerten dort alle Gefäße bis zum Start des Versuches in dem DMEM-Medium bei Kühlschranktemperatur. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, startete die Versuchsdurchführung aller Versuche innerhalb von 18 h nach Organentnahme.

Bei allen Patienten lagen zum Zeitpunkt des OP-Beginns die Einwilligung einer Gefäßentnahme aus dem entfernten Lungenlappen sowie die rechtliche Abklärung durch die Ethikkommission vor. Eine Entnahme der Lungengefäße führte zu keinerlei Risikoerhöhung oder Steigerung der Komplikationsrate des Patienten. Die durchgeführten Versuche sowie die Entnahme der Gefäße standen im Einklang mit dem aktuellen ethischen Standard und den Deklarationen von Helsinki (1964) inklusive deren neuzeitigen Erweiterungen. Als Ausschlusskriterien für die Entnahme von Gefäßsegmenten galten bekannte infektiöse Erkrankungen wie Hepatitis C oder HIV sowie präoperative Chemo- oder Radiotherapie und das Vorhandensein von zentralen Tumoren mit Infiltration in pulmonale Gefäße. Eingeschlossen in die Versuche wurden nur Gefäße von volljährigen Patienten, die bei vollem Bewusstsein zu einer schriftlichen Einwilligung fähig waren. Diese Eingangskriterien entsprachen denen anderer Versuchsreihen, die durch unser Forschungslabor durchgeführt wurden [6,7].

4.2 Versuchsutensilien

4.2.1 Verwendete Materialien

Zur Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 1 dargestellten Materialien verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Materialien

Materialien	Name	Firma	Stadt	Land
Eppendorfcups	1,5 ml, braun	VWR	München	Deutschland
Eppendorfcups	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	VWR	München	Deutschland

Materialien	Name	Firma	Stadt	Land
Einmalhandschuhe	VersaTouch Nitrile	Ansell	Brüssel	Belgien
Einmalmesspipetten	5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand	Wertheim	Deutschland
Eisschrank -20°C	Liebherr MedLine	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Eisschrank -80°C	HERA freeze	Thermo Scientific	Dreieich	Deutschland
Gefäße 25 ml steril	Sarstedt #60.9922.115	Sarstedt AG	Nümbrecht	Deutschland
Gefäße 25 ml unsteril	Sarstedt #60.9922.113	Sarstedt AG	Nümbrecht	Deutschland
Kanister 10 L	Weithals mit Ablasshahn	VWR	München	Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Comfort	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Magnetrührer	Ika Vibramax-VXR	Ika	Staufen	Deutschland
Messerblock		Physikalisch-Mechanische Werkstatt	Uni Regensburg	Deutschland
Milli Q-Anlage	Dest	Millipore	Wertheim	Deutschland
Petrischale	NUNC #169558	Nunc	Wiesbaden	Deutschland
Pinzette		FST Instruments	Heidelberg	Deutschland
Pipetboy		Integra Bioscience	Fernwald	Deutschland
Pipette Eppendorf Reference	0,5-10 µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf	Deutschland

Materialien	Name	Firma	Stadt	Land
Pipette Eppendorf Research	2-20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf	Wesseling- Berzdorf	Deutschland
Pipettenspitzen	10, 200, 300, 1250	Greiner Bio One	Frickenhausen	Deutschland
Rack	Racks, Mikro- zentrifugen- röhrchen,	VWR	München	Deutschland
Rasierklingen	Astra	Astra	Sankt Petersburg	Russland
Skalpell	No 22	Feather	Osaka	Japan
Sterilisator	WTB Binder		Tuttlingen	Deutschland
Vortex Genie	Heidolph		Schwabach	Deutschland
Waage	Precisa 310M (maximal 400 g, d=1 mg)	Precisa	Dietikon	Tschechien
Waage	Sartorius BP221S (maximal 220 g, d=1 mg)	Sartorius,	Göttingen	Deutschland
Wägeschalen, medium	VWR #611-9172	VWR	München	Deutschland
Wärmeblock	Stuart Scientific	Chelmsford	Chelmsford, Essex	Großbritannien
Zentrifugen- röhrchen, PP 50 ml		GreinerBioOne	Frickenhausen	Deutschland

4.2.2 Verwendete Geräte

Siehe Tabelle 2 für eine Übersicht über die verwendeten Geräte.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Name	Firma	Stadt	Land
Computer	Dell	Dell	Frankfurt am Main	Deutschland
Gas 5 % CO ₂ + 95 % O ₂	Carbogen 50 L	Fa. Linde	München	Deutschland
Organbad	IOA-5300	FMI GmbH	Seeheim/ Oberbeerbach	Deutschland

4.2.3 Verwendete Software

Siehe Tabelle 3 für eine Übersicht über die verwendete Software.

Tabelle 3: Verwendete Software

Software	Firma/ Autor
Amon 32	FMI GmbH
Bemon	FMI GmbH
Cygwin 64	https://cygwin.com
Excel	Microsoft
tsv.pl	markus.hoenicka@uniklinik-ulm.de

4.2.4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Zu Beginn des Versuches und während kurzen Pausen im Versuchsablauf wurden die Reagenzien korrekt dosiert und vorbereitet. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien.

Für die Herstellung der Krebs-Henseleit (KH)-Stammlösung benötigte man 690,0 g Natriumchlorid, 35,0 g Kaliumchlorid (KCL), 29,6 g Magnesiumsulfat und 16,6 g Natriumdihydrogenphosphat. Die Reagenzien wurden in knapp 10 L zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest) gelöst und anschließend wurde das Volumen auf 10 L aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung in 1 L-Flaschen aufgeteilt und autoklaviert. Die Stammlösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Aus der KH-Stammlösung ließ sich der Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer herstellen. Dazu benötigte man 14 g Natriumhydrogencarbonat, 1000 ml KH-Stammlösung, 10,9 g D(+)-Glucose-Monohydrat und 12 ml Calciumchlorid (1M). Das Ganze wurde auf 10 L Millipore-Wasser aufgefüllt und gut vermischt, bis die Lösung homogen war. Zu Beginn des Versuches wurde ein mit Puffer gefülltes Behältnis an die Organbadapparatur angeschlossen.

Um ET-1 in den richtigen Konzentrationen zu erhalten, stellte man eine Stammlösung mit der Konzentration von $1E-4$ M her. Dazu löste man 0,1 mg ET-1 in 400 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Stammlösung wurde aliquotiert (70 μ l) und übrige Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren und waren 14 Tage haltbar. Durch serielle Verdünnung mit DMSO aus der Stammlösung stellte man für den Versuch die benötigte Konzentrationsreihe von $1E-11$ M bis $1E-8$ M her. Während des Versuches wurden jeweils 5 μ l ET-1 aus der Konzentrationsreihe in das Organbad pipettiert.

Die NE-Stammlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt. NE wurde bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Zur Herstellung einer Stammlösung ($1E-3$ M) gab man 169 μ l NE zu 831 μ l Bisulfit-Puffer (0,5 %), welcher für jeden Versuch erneut aus 10 mg Natrium-Metabisulfit und 20 ml Aqua bidest hergestellt wurde. Aus der Stammlösung ($1E-3$ M) stellte man mittels serieller Verdünnung mit 0,5 % Bisulfit-Puffer eine Verdünnungsreihe bis $1E-6$ M NE her. Die Proben wurden auch während des Versuches lichtgeschützt und gekühlt aufbewahrt. Um die gewünschten finalen Konzentrationen von $1E-8$ M bis $1E-5$ M NE in den Organbädern zu erhalten, gab man jeweils 50 μ l NE in die Organbäder.

Die Vardenafil-Stammlösung hatte eine Konzentration von 5 mM und wurde durch Lösung von 1 mg Vardenafil in 0,356 ml DMSO hergestellt. Anschließend wurde aliquotiert (70 µl). Die Aliquots konnten für 8 Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden. Im Versuch wurde 1 µl der Lösung in die entsprechenden Organbäder (5 ml) gegeben, was einer finalen Konzentration von 1E-6 M Vardenafil entsprach, bzw 10 µl für eine Vardenafil-Konzentration von 1E-5 M.

Die 3 mM Bosentan-Stammlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt, dazu löste man 1 mg Bosentan in 57,9 µl Aqua bidest. Um den ERA vollständig zu lösen, erwärmte man die Mischung in einem Inkubator 5 min lang bei 50 °C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 100 µl der Lösung mit 200 µl KH auf 1 mM verdünnt und dies dann seriell mit KH auf eine Konzentration von 1E-5 M weiterverdünnt. Während des Versuches wurden für eine finale Bosentan Konzentration von 1E-7 M im Organbad je 50 µl in die entsprechenden Organbäder gegeben.

Für die Herstellung der 1E-2 M Macitentan Aliquots benötigte man 12 mg Macitentan, die in 2 ml DMSO zugegeben wurden. Diese Aliquots wurden bei 4 °C gelagert. Für die Versuche wurde die 1E-2 M Stammlösung mit DMSO zunächst im Verhältnis 1:10 auf eine Konzentration von 1E-3 M und dann auf 1E-4 M verdünnt. Um eine Macitentan-Konzentration von 1E-7 M zu erhalten, gab man 5 µl in jedes Organbad. Für eine finale Macitentan-Konzentration von 1E-8 M wurde die Stammlösung seriell weiter auf 1E-5 M verdünnt und je 5 µl in die jeweiligen Organbäder gegeben. Um eine finale Konzentration von 3E-7 M zu erhalten verdünnte man die 1E-4 M-Lösung im Verhältnis 30:70 mit DMSO und gab 5 µl in die entsprechenden Organbäder.

ACT-132577 Aliquots wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 1E-2 M und wurde aus 11 mg ACT-132577 in 2 ml DMSO hergestellt. Für den Versuch wurde die Stammlösung seriell bis zu einer Konzentration von 1E-4 M bzw. 1E-5 M verdünnt. Für eine finale Konzentration von 1E-7 M wurden 5 µl der Konzentration 1E-4 M in das jeweilige Organbad gegeben. Um eine finale Konzentration von 1E-8 M zu erreichen, wurden 5 µl der Konzentration 1E-5 M verwendet. Für eine finale Konzentration von 3E-7 M verdünnte man 1E-4 M noch einmal im Verhältnis 30:70 und gab 5 µl der Lösung in das entsprechende Organbad.

Das Transportmedium wurde auf Vorrat im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Der pH-Wert des Mediums betrug 7,3 – 7,4. Zur Herstellung benötigte man 500 ml DMEM,

5 ml L-Glutamin, 500 µl Gentamicin, 10000 µl Amphotericin B, 10 ml FKS (2 %) und 2,9 g Hepes. Die Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend in 10 ml Aliquots aufgeteilt.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien	Name	Firma	Ort	Land
ACT-132577		Actelion	Allschwill	Schweiz
Ambrisentan		Cayman	Ann Arbor, Michigan	USA
Amphotericin B	#15290026	Invitrogen	Darmstadt	Deutschland
Bosentan	Ro 47-0203/001	Actelion	Allschwill	Schweiz
Calciumchlorid 1,0 M	#21114	Fluka	Buch	Schweiz
D(+)-Glucose-Monohydrat	#1083428	Merck	Darmstadt	Deutschland
DMEM Medium	#D-5546	Sigma	St.Louis, Missouri	USA
Endothelin	ALX-155-001-PC01	Alexis	Läufelfingen	Schweiz
FKS	Sigma #12138C	Sigma	St.Louis, Missouri	USA
Gentamycin [10000 U/ml]	Sigma #G1397	Sigma	St.Louis, Missouri	USA
Hepes	Sigma #H-3375	Sigma	St.Louis, Missouri	USA
Kaliumchlorid	Roth #HN02.2	Roth	Karlsruhe	Deutschland
L-Glutamin	Sigma #G-8415	Sigma	Madison, Wisconsin	USA

Reagenzien	Name	Firma	Ort	Land
Macitentan	ACT-064992	Fa Actelion	Allschwill	Schweiz
Natriumhydrogen-carbonat	Merck	Merck	Darmstadt	Deutschland
Norepinephrin	PZN-0073016	Aventis	Frankfurt am Main	Deutschland
Paraformaldehyd	#1004005	Merck	Darmstadt	Deutschland
Vardenafil	Sellekchem #S2515	Selleckchem	München	Deutschland

4.3 Versuchsablauf

Die humanen Pulmonalgefäße wurden in einem etablierten Organbad (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5) auf die Wirkung von verschiedenen Vasodilantien untersucht [6,7]. In der Organbadapparatur ließen sich die Gefäße auf Kraftunterschiede bei Medikamentenapplikation unter annähernd physiologischen Gegebenheiten untersuchen. Die Organbadapparatur bestand aus acht einzelnen Organbädern, sodass es möglich war, acht Gefäßringe zeitgleich zu untersuchen. Die im DMEM-Medium gelagerten PA wurden zu Beginn des Versuches mit einem Messerblock (siehe Abbildung 6) in acht Ringe von je 2 mm Breite geschnitten (siehe Abbildung 7). Diese spannte man zwischen zwei Metallhäkchen ein, das untere Häkchen war dabei fixiert und das obere Häkchen frei beweglich und mit einem Kraftmesser verbunden. Durch die Fixierung zwischen den Haken konnte die Kontraktionskraft der Gefäßringe als isometrische Messung beurteilt werden. Änderungen der Kraftverhältnisse der Gefäße können bei konstanter Kraft pro Querschnittsfläche als Spannungsänderungen durch die Vasodilatoren betrachtet werden. Die auf die Haken wirkenden Kräfte wurden mit einem Transducer in mN gemessen und mithilfe des Programms Bemon aufgezeichnet (siehe Abbildung 8 zur besseren Veranschaulichung der Aufzeichnung mit dem Programm Bemon) und am Bildschirm des Computers widergespiegelt. Das Organbad war mit

Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer gefüllt, welcher zur Simulation der Verhältnisse im Körper auf 37° C erwärmt wurde. Außerdem wurden die Organbäder mit einer Carbogengas-Mischung (5 % CO₂ und 95 % O₂) permanent belüftet, so dass ein physiologischer pH-Wert von circa 7,4 herrschte. Zur besseren Veranschaulichung siehe nachfolgende Grafiken.

Um keine verfälschten Ergebnisse zu erlangen, sollten bei dem Versuch keine randständigen Gefäßringe verwendet werden, welche einer erhöhten Belastung und Verletzungsgefahr beim Heraus-Präparieren aus dem Lungenlappen ausgesetzt waren. Außerdem achtete man darauf, möglichst gleich große Gefäßringe zu verwenden. Beim Einspannen in die Kraftmesser des Organbades sollten alle Ringe eine Grundspannung mit einer Kraft von circa 18 mN haben. In vorgeschriebenen, regelmäßigen Abständen wurden die Organbäder gewaschen, um restliche Überstände wie beispielsweise Blut von den Gefäßen zu entfernen. Je nach Zustand des Gefäßes erfolgte die erste 150 mM KCl-Gabe nach 45 – 90 min, um die Gefäße zur Kontraktion zu bringen. Dabei wurde die maximal erreichbare Kontraktionskraft durch Depolarisation gemessen. Eine adäquate Kontraktion fungierte hierbei als Kontrolle, wie aktiv und gesund der kontraktile Apparat des Gefäßringes war. Eine insuffiziente Kontraktion führte zum Ausschluss des Versuches in der Auswertung, um eine fehlende Kontraktion nicht den untersuchten Rezeptoren zuzuschreiben. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden die Organbäder geleert, das restliche KCl aus dem Bad entfernt und anschließend wurde das Organbad wieder mit der Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Pufferlösung gefüllt. Durch das regelmäßige Herauswaschen von KCl entspannten sich die Gefäße wieder. Zunächst wurde zweimal alle 5 min gewaschen, später nach 10 min, dann nach 15 min und anschließend im 30-Minutentakt. Zwischen den Waschsritten wurde die Gefäßspannung mittels eines Kraftreglers nachjustiert. So wurde ein zu starkes Abfallen des Gefäßtonus unter 17 mN verhindert und verstärkt krampfende Gefäße konnten wieder entspannen. Durch regelmäßige, leichte Erhöhung der Kraft, war festzustellen, ob die Kontraktionskraft der Gefäßringe schon ausgereizt war oder ob die Gefäße noch zu weiterer Kontraktion fähig waren. Nachdem es zu keinem weiteren Verlust des Gefäßtonus kam und dieser sich bestenfalls bei einer Kontraktionskraft von 18/19 mN einpendelte, wurde erneut 150 mM KCl hinzugegeben. Die zweite KCl-Gabe erfolgte frühestens nach 220 min, meist aber erst zwischen 300 – 400 min

Versuchslaufzeit. In der folgenden 10-minütigen Inkubationszeit kontrahierten die Arterien erneut. Anschließend wurden die Organbäder wieder geleert und mit Puffer gefüllt. Nach regelmäßigem Waschen entspannten sich die Gefäße, bis sich ein konstanter Basaltonus einpendelte. Die Kraftwerte der Gefäße vor der zweiten KCl-Applikation und der Maximalwert der Kontraktion unter KCl-Gabe waren für die Versuchsauswertung von Bedeutung. Die maximale Kontraktionsfähigkeit der Arterien unter KCl-Gabe konnte somit in Relation zur Kontraktion durch ET-1 und NE gesetzt werden. Ab der zweiten KCl-Verabreichung erfolgte kein Nachjustieren der Gefäßspannung mehr und die Gefäße pendelten sich von selbst auf einen bestimmten Basaltonus ein. Eine anschließende Medikamentengabe erfolgte nach dem Einpendeln auf einen konstanten Basaltonus. Eine Paarung je nach Kontraktionskraft von schwächeren und stärkeren Arterien erfolgte anhand der maximalen Kraft während der Inkubationszeit nach der zweiten KCl-Applikation. So diente ein Paar als Kontrolle, ein weiteres Paar wurde auf einen PDE5-Hemmer untersucht, ein Paar auf den ERA und das letzte Paar erhielt eine Kombination der beiden Medikamente in vorhergesehener Konzentration. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit testete man die kontrahierende Wirkung von ET-1 unter Medikamenteneinfluss, indem man schrittweise die ET-1-Konzentration erhöhte und die zunehmende Spannung beobachtete. Dabei wurde ET-1 in den Konzentrationen $1\text{E-}11\text{ M}$, $3\text{E-}11\text{ M}$, $1\text{E-}10\text{ M}$, $3\text{E-}10\text{ M}$, $1\text{E-}9\text{ M}$, $3\text{E-}9\text{ M}$ und $1\text{E-}8\text{ M}$ gegeben. Die jeweils nächsthöhere ET-1-Konzentration wurde gegeben, sobald sich in der Kraftkurve aller Gefäßringe ein Plateau einstellte. Dies geschah in der Regel nach 3 – 15 min. Auch hier waren die Maximalwerte zwischen den einzelnen ET-1-Gaben entscheidend bei der weiteren Auswertung. Im nächsten Schritt wurde NE in bestimmten Dosierschemen zu den Bädern hinzugegeben und wiederum die Zunahme der Spannung der Gefäße beobachtet. NE wurde in den Konzentrationen $1\text{E-}8\text{ M}$, $3\text{E-}8\text{ M}$, $1\text{E-}7\text{ M}$, $3\text{E-}7\text{ M}$, $1\text{E-}6\text{ M}$, $3\text{E-}6\text{ M}$ und $1\text{E-}5\text{ M}$ hinzugefügt. Auch hier wurde die nächsthöhere Konzentration nach Erreichen des Spannungsplateaus gegeben, ebenfalls meist nach 3 – 15 min. Analog zu der ET-1-Applikation wurden die Maximalwerte zwischen den einzelnen NE-Gaben ausgewertet. Die Auswertung erfolgte anhand der verschiedenen Basal- und Maximalwerte der Kraft, die die Gefäße im Laufe des Versuches erreichten. Diese Werte wurden mit dem Programm Bemon aufgezeichnet. Für die Auswertung benutzte man das Programm Amon32, mit dem man die Basal- und Maximalwerte der Kraft der einzelnen Gefäßringe bestimmen konnte. Die

Konvertierung der Daten erfolgte in einem in der Sprache „Perl“ geschriebenen Programm namens „tsv.pl“. Für die Ausführung dieses Perl-Programmes wurde der Perl-Interpreter des Cygwin-Projektes genutzt, welcher eine Unix-ähnliche Arbeitsumgebung für Windows darstellt. Anschließend wurde mit Hilfe des „Cygwin64 Terminals“ eine txt-Datei erstellt werden, welche in Excel übertragbar und dort auswertbar war.



Abbildung 4: Organbad

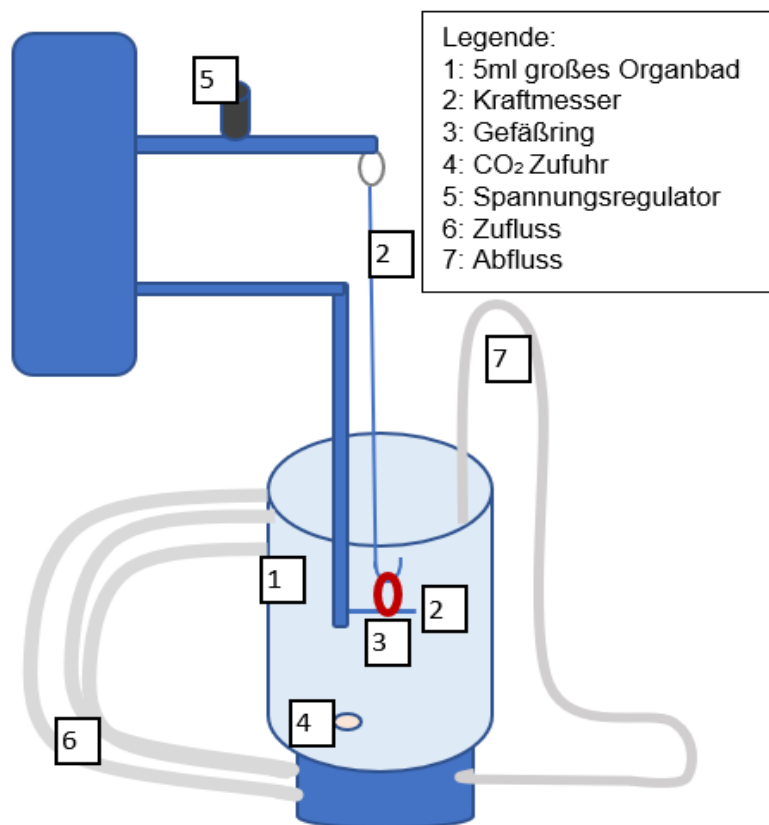


Abbildung 5: Skizze des Organbades

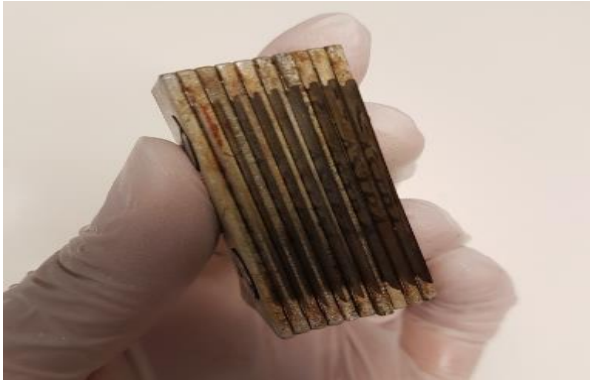


Abbildung 6: Messerblock, der zum Schneiden der Gefäßringe verwendet wurde

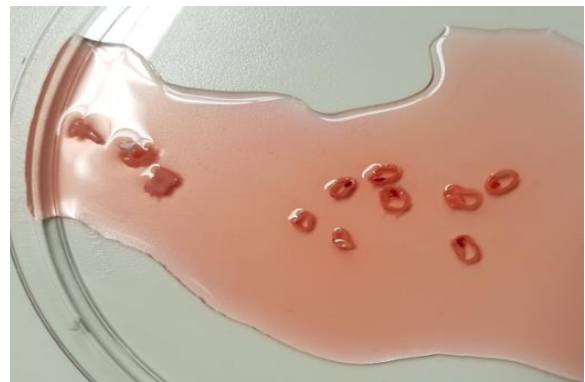


Abbildung 7: Geschnittene Gefäßringe, gelagert in einer mit DMEM gefüllten Petrischale

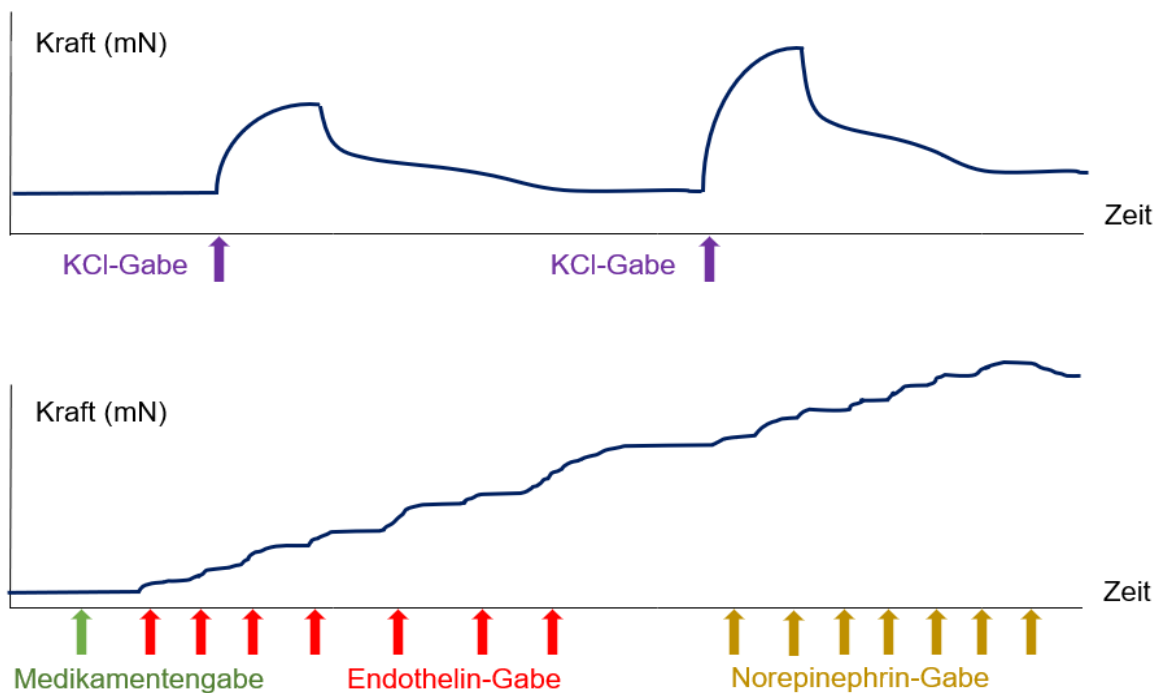


Abbildung 8: Skizze des Kraftverlaufes der Gefäßringe während des Versuches

5 Auswertung der Daten

Für die Auswertung des Kontraktionsverhaltens eines Gefäßringes wurden der Basalwert vor der zweiten KCl-Gabe und der Maximalwert der zweiten KCl-Applikation abgelesen. Aus dieser Differenz wurde die maximale Kontraktionskraft jedes Rings berechnet, welche durch KCl induziert wurde. Anschließend wurde mit dem Basalwert vor und nach der Medikamentenverabreichung berechnet, ob die Änderungen des Basaltonus nach Gabe des Vasodilatans statistische Signifikanz erreichten. Änderungen des Basaltonus waren für die Ergebnisbeurteilung relevant. Zum einen wiesen relaxierende Einflüsse auf eine endogene Kontraktion hin. Wirkte ein Medikament basal relaxierend, war von einer endogenen ET-Freisetzung auszugehen. Dies könnte die ET-1-Dosis-Wirkungskurven verschieben, da die wirksame ET-Konzentration höher wäre als die berechnete. Zum anderen könnten direkte Effekte der Inhibitoren auftreten, die beispielsweise nicht mit der Hemmung des ERA in Verbindung stehen. Trat keiner der beiden genannten Effekte auf, waren die nachfolgenden Messungen verlässlich. In vergangenen Versuchen unseres Forschungslabors wurde bereits gezeigt, dass Vardenafil und Bosentan nicht zu einer signifikanten Reduzierung des Basaltonus der Gefäße führten. In den durchgeführten Versuchen ist folglich auch von keiner signifikanten Reduzierung des Basaltonus auszugehen [5,6,7].

Für jedes Versuchsprotokoll wurden die Ergebnisse der Versuche von fünf bis sieben PA unterschiedlicher Patienten eruiert. Von den Versuchsreihen ausgeschlossen wurden Versuche, bei denen die Gefäße nach ET-1- und NE-Verabreichung nicht stärker als vier mN kontrahierten oder bei denen der Gefäßtonus nach dem Auswaschen von vasokonstriktorischem KCl nicht wieder auf einen konstanten Basaltonus absank. Die Anzahl an deshalb nicht berücksichtigten Gefäßen wurde dokumentiert und im Ergebnisteil aufgeführt. Bei aufgetretenen Pipettierfehlern wurden die Versuche nicht in der Auswertung verwendet. Diese Eingangskriterien lehnten sich an vorherige Versuche unseres Forschungslabors an [7].

Für die Ermittlung der Kontraktion nach ET-1- und NE-Applikation wurde nach jeder Vasokonstriktoren-Gabe die Differenz zwischen maximaler Kraft und Basaltonus vor der ersten ET-1-Gabe berechnet. Um vergleichbare Werte zwischen allen Gefäßringen zu erzielen wurde die maximale Kontraktion in Relation zu der maximalen Kontraktion

durch KCl gesetzt. Aus den Ergebnissen einer Versuchsreihe wurden entsprechende Mittelwerte (MW) gebildet und die Standardabweichung (SD) berechnet.

6 Statistische Analyse zu den Versuchen

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software „R“ (Version 3.1.3 und Version 3.2.2; Zusatzpakete „nlme“-mixed model-Analysen und „multcomp“ Tukey-Post-Hoc Tests). Zur Auswertung der Basalwerte wurden bei jedem Versuch die Werte vor und nach Zugabe des Inhibitors verglichen. Es lagen dementsprechend gepaarte Daten vor. Die Annahme einer Normalverteilung der Daten konnte durch den Shapiro-Wilk-Test und durch die QQ-Plots nicht bestätigt werden.

Die folgende Nullhypothese (H₀) wurde aufgestellt und anhand des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests überprüft:

H₀: PDE5-Inhibitoren und ERA zeigen keine Wirkung auf die PA.

Anhand der Messergebnisse wurde H₀ entweder angenommen oder verworfen. Konnte H₀ nicht angenommen werden, so wurde von der gegensätzlichen Hypothese (H₁) ausgegangen.

H₁: PDE5-Inhibitoren und ERA zeigen eine Wirkung auf die PA.

Die übrigen erhobenen Daten wurden als statistisches Modell analysiert. Hierbei galt zu zeigen, ob die Faktoren (PDE5-Hemmer, ERA, Kombination oder Kontrolle) einen signifikanten Einfluss auf die Messgröße (Vasodilatationsverhalten der PA) hatten.

Bei der Auswertung der ET-1- und NE-Dosis-Wirkungskurven, bei denen nacheinander mehrere Konzentrationen der Vasokonstriktoren untersucht wurden, handelte es sich um Messwiederholungen. Hier wurde nach jeder Vasokonstriktoren-Dosis analysiert, welche Behandlungen (PDE5-Hemmer, ERA, Kombination und Kontrolle) Abweichungen im Vasodilatationsvermögen nach Vasokonstriktoren-Gabe zeigen. Mixed-Model-Analysen, die aus mathematischen Gründen weniger empfindlich auf die Datenverteilung reagieren, dienten hier zur statistischen Analyse.

Bei jeder Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Faktoren „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ signifikanten Einfluss auf die Messwerte, d.h. auf die relative Kraft der Gefäßringe, hatten. Der Faktor „Behandlung“ beschrieb die Ausprägungen Kontrolle, ERA, Vardenafil sowie die Kombination des ERA und Vardenafil. Diese entsprachen den untersuchten Substanzen in den einzelnen Versuchsreihen. Der Faktor „Vasokonstriktor“ bezeichnete die Konzentrationen der Vasokonstriktoren ET-1 und NE. Lag der p-Wert des Faktors „Behandlung“ unter 0.05 waren die Unterschiede signifikant und es war von entscheidender Bedeutung, welche der Substanzen anwesend waren (Kontrolle, ERA, Vardenafil oder die Kombination). Befand sich der p-Wert oberhalb des Signifikanzniveaus, machte es keinen Unterschied, welche der Substanzen anwesend war. Dementsprechend verhielten sich dann alle Kraftwerte gemäß der Kontrolle. Diese Kraftwerte waren demnach allein abhängig von der Konzentration der Vasokonstriktoren, die in die Organbäder gegeben wurden. Lag der p-Wert des Faktors „Vasokonstriktor“ unterhalb von 0.05, war es von signifikantem Unterschied, welche Konzentration des Vasokonstriktors ET-1 oder NE verwendet wurde. In allen Versuchsreihen traf dies zu. Außerdem wurde das Verhältnis „Behandlung“: „Vasokonstriktor“ angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ zeigte an, dass die beiden Faktoren miteinander interagierten. Zeigte diese Analyse einen signifikanten Einfluss, konnte mittels des Tukey-post-hoc-Tests analysiert werden, welche der MW der Behandlung sich signifikant voneinander unterschieden. Eine Interaktion bestand beispielsweise, wenn der Faktor „Behandlung“ nur in hohen Konzentrationen des Vasokonstriktors einen Effekt hatte und nicht bei niedrigen. Folglich musste in diesem Fall bei jeder einzelnen Konzentration der Vasokonstriktoren überprüft werden, ob der Faktor „Behandlung“ einen signifikanten Effekt zeigte.

Das Alpha-Niveau wurde auf 5 % festgelegt. Dies bedeutet, dass bei einem p-Wert < 0.05 davon auszugehen war, dass der zu beobachtende Unterschied nicht zufällig, sondern aufgrund der Wirkung der Vasodilantien entstanden ist.

7 Ergebnisse der Versuchsreihen

Insgesamt wurden 39 „physiologische“ und 26 „pathologische“ Lungengefäße im Zeitraum zwischen April 2015 und September 2018 nach dem etablierten Studienprotokoll untersucht. Als physiologische PA wurden Gefäße bezeichnet, die in

Regensburg oder Ulm aus Lungen entnommen wurden und von vaskulär gesunden Patienten stammten. Pathologische PA stammten aus den explantierten Lungen von Patienten mit strukturellen, vaskulären Erkrankungen, die aufgrund einer Lungenerkrankung in München, Großhadern, eine LTX erhielten. Die folgende Tabelle 5 gibt einen Überblick über die wichtigsten klinischen Daten zu den Patienten, deren PA für die Versuche verwendet wurden. So werden Geschlecht, Alter, Primärindikation, welche Lunge verwendet wurde, Vorerkrankungen und Informationen über das Rauchverhalten aufgezeigt. Die Primärindikation zur Lobektomie mit physiologischen Gefäßen war zu 97,4 % eine maligne Erkrankung, wie beispielsweise Lungenmalignomerkrankungen oder Tumormetastasen in der Lunge. Die Primärindikation zur LTX variierte zwischen den Patienten, teilweise waren zwei Krankheitsbilder ursächlich für eine Transplantation. Unter „Sonstige“ wurden Lymphangioliomyomatose, Sklerodermie und Silikose zusammengefasst.

Tabelle 5: Patientenbezogene Daten

Patientenbezogene Daten	Physiologische PA (39; 100%)	Pathologische PA (26; 100%)
Geschlecht (♂/♀)	28; 71,8 % / 11; 28,2 %	11; 42,3 % / 15; 57,7 %
Alter (MW ± SD) [Jahre]	70,1 ± 6,2	60,4 ± 6,2
Untersuchte Lunge		
Pulmo dexter	26; 66,7 %	19; 73,1 %
Pulmo sinister	13; 33,3 %	21; 80,8 %
Lobus superior	23; 59,0 %	Unbekannt
Lobus medius	1; 2,6 %	Unbekannt
Lobus inferior	16; 41,0 %	Unbekannt

Patientenbezogene Daten	Physiologische PA (39; 100%)	Pathologische PA (26; 100%)
Primärindikation		
Karzinom	38; 97,4 %	0; 0 %
Fibrose	1; 2,6 %	14; 53,8 %
Emphysem	0; 0 %	2; 7,7 %
NSIP	0; 0 %	6; 23,1 %
Allergische Alveolitis	0; 0 %	6; 23,1 %
COPD	0; 0 %	8; 30,8 %
Pulmonale Hypertonie	0; 0 %	2; 7,7 %
Sonstige	0; 0 %	3; 11,5 %
Rauchverhalten		
Raucher	25; 64,1 %	16; 61,5 %
Packyears (pro Patient)	44,9 ± 21,0	23,1 ± 18,7
Vorerkrankungen		
Arterielle Hypertonie	25; 61,5 %	12; 46,2 %
Erwiesene PAH (MW ± SD aller PAPm) [mmHg]	0; 0 %	3; 11,5 % (21,1 ± 3,9)
COPD	10; 25,6 %	8; 30,8 %
KHK	9; 23,1 %	3; 11,5 %

Tabelle 6 gibt einen grundlegenden Überblick über die Ergebnisse der Organbadversuche. Mittels grüner Hinterlegung werden in jeder Versuchsreihe signifikante Unterschiede dargestellt, die bei ET-1-, bzw. NE-Gabe auftraten. Bei den einzelnen untersuchten ET-1- und NE-Konzentrationen ist der p-Wert angegeben, der verdeutlicht, wie signifikant die Unterschiede waren. Nicht signifikante Unterschiede werden in der Tabelle durch eine rote Hinterlegung gekennzeichnet. In der folgenden Tabelle steht „Var“ für Vardenafil, „Mac“ für Macitentan, „Bos“ für Bosentan, „ACT“ für „ACT-132577“, „Kombi“ für Kombination und „Ktrl“ für Kontrolle.

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse

Kurven		ET-1-Kurve						NE-Kurve							
Versuch		1E-11M	3E-11M	1E-10 M	3E-10 M	1E-9 M	3E-9 M	1E-8 M	1E-8 M	3E-8 M	1E-7 M	3E-7 M	1E-6 M	3E-6M	1E-5 M
Var 1 E-6 M - Bos 1E-7 M	Ktrl-Bos						0,01956	0,00743	0,00413	0,00347	0,00538	0,01825	0,03160	0,0299	0,0354
	Var-Ktrl														
	Ktrl-Kombi						0,00117	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Var-Bos							0,019	0,01538	0,02467					
	Kombi-Bos														
	Var-Kombi							0,00453	0,00206	0,00167	0,00158	0,00185	0,0447	0,00715	0,0104
Var 1E-5 M - Bos 1E-7 M	Ktrl-Bos				0,0207			0,00241	<0,001	<0,001	0,00249				
	Var-Ktrl									0,017	0,00114	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Ktrl-Kombi							<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Var-Bos														
	Kombi-Bos										0,02932	0,0088	0,0062	0,00598	0,00179
	Var-Kombi								0,033	0,0141	0,00114				

Kurve		ET-1-Kurve						NE-Kurve								
Versuch		1E-11M	3E-11M	1E-10 M	3E-10 M	1E-9 M	3E-9 M	1E-8 M	1E-8 M	3E-8 M	1E-7 M	3E-7 M	1E-6 M	3E-6M	1E-5 M	
PAH Var 1E-6 M – Bos 1E-7 M	Ktrl-Bos						0,00172	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<1E-4	<0,001	0,00236	0,0115	
	Var-Ktrl										0,0058	0,00138	0,00188	0,00353	0,0164	
	Ktrl-Kombi						<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<1E-4	<0,001	0,00130	0,0103	
	Var-Bos							0,00151	0,00313	0,0334						
	Kombi-Bos															
	Var-Kombi							0,02971	0,00282	0,17695	0,0356					
PAH Var 1E-5 M - Bos 1E-7 M	Ktrl-Bos						0,02376	0,01904	0,0369							
	Var-Ktrl									0,0254	0,00606	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
	Ktrl-Kombi						0,00186	0,00201	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,00131	
	Var-Bos											0,00658	0,00378	0,00446	0,00762	
	Kombi-Bos										0,04489	0,00441	0,00191	0,0043	0,00869	0,01764
	Var-Kombi															

Kurve		ET-1-Kurve						NE-Kurve							
Versuch		1E-11M	3E-11M	1E-10 M	3E-10 M	1E-9 M	3E-9 M	1E-8 M	1E-8 M	3E-8 M	1E-7 M	3E-7 M	1E-6 M	3E-6M	1E-5 M
Var 1E-6 – Mac 1E-8 M	Ktrl-Mac					0,00267	0,01961	0,04120							
	Var-Ktrl														
	Ktrl-Kombi					0,00310	0,00791	0,00211	0,00445	0,00166	0,00118	<0,001	<0,001	0,00137	<0,001
	Var - Mac					0,00434	0,00722								
	Kombi-Mac											0,0211	0,0157	0,01810	0,0196
	Var-Kombi					0,00505	0,00253	0,00333	0,00587	0,00871	0,01651	0,0289	0,0425		0,0303
Var 1E-6 M – Mac 1E-7 M	Ktrl-Mac					<0,001	<1E-5	<1E-6	<1E-7	<1E-6	<0,001	<0,001	0,00425	0,0154	0,00780
	Var-Ktrl														
	Ktrl-Kombi					<0,001	<1E-5	<1E-6	<1E-7	1E-6	<0,001	<0,001	0,00364	0,0118	0,00549
	Var-Mac					0,0159	<1E-5	<1E-6	<1E-7	<1E-6	<0,001	0,00683	0,03311		0,04196
	Kombi-Mac														
	Var-Kombi					0,0178	1,36E-5	<1E-6	<1E-7	1,37E-6	<0,001	0,00610	0,02779		0,03117

Kurve		ET-1-Kurve						NE-Kurve							
Versuch		1E-11M	3E-11M	1E-10 M	3E-10 M	1E-9 M	3E-9 M	1E-8 M	1E-8 M	3E-8 M	1E-7 M	3E-7 M	1E-6 M	3E-6M	1E-5 M
PAH Var 1E-6 M – Mac 1E-8 M	Ktrl-Mac					0,0273	0,0186	0,0177	0,0157	0,0096	0,0018	0,0012	0,0011	0,0012	<0,001
	Var-Ktrl														
	Ktrl-Kombi													0,0381	0,0335
	Var - Mac						0,0401	0,0196	0,0153	0,0104	0,0028	0,0059	0,0165	0,0305	0,0483
	Kombi-Mac														
	Var-Kombi														
PAH Var 1E-6 M – Mac 3E-8 M	Ktrl-Mac						0,00363	<0,001	<1E-4	<1E-4	<0,001	0,0118			
	Var-Ktrl														
	Ktrl-Kombi						0,00629	<0,001	<1E-4	<1E-4	0,00243				
	Var - Mac						0,03577	<0,001	<1E-4	<1E-4	<0,001				
	Kombi-Mac														
	Var-Kombi							<0,001	0,000171	0,000789	0,01182				

Kurve		ET-1-Kurve						NE-Kurve							
Versuch		1E-11M	3E-11M	1E-10 M	3E-10 M	1E-9 M	3E-9 M	1E-8 M	1E-8 M	3E-8 M	1E-7 M	3E-7 M	1E-6 M	3E-6 M	1E-5 M
Var 1E-6 M - ACT 1E-8 M	Ktrl- ACT				0,0214										
	Var- Ktrl														
	Ktrl- Kombi				<0,001										
	Var- ACT														
	Kombi- ACT														
	Var- Kombi					0,026									
Var 1E-6 M - ACT 1E-7 M	Ktrl- ACT				0,0178	0,00107	0,00312	0,0131							
	Var- Ktrl														
	Ktrl- Kombi					<0,001	0,00655								
	Var- ACT				0,0202	0,00144	0,01202								
	Kombi- ACT														
	Var- Kombi					0,00121	0,02432								

In den Organbadversuchen hemmten alle untersuchten ERA die Kontraktion signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dies verdeutlichte ein gutes Ansprechen der ERA sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Gefäßen.

Bei den physiologischen PA zeigte Vardenafil nur in der Konzentration 1E-5 M eine signifikant stärkere Hemmung der Kontraktion im Vergleich zur Kontrolle. Bei den pathologischen Gefäßen war auch in der Konzentration 1E-6 M Vardenafil teilweise ein signifikanter Vorteil gegenüber der Kontrolle feststellbar.

Bei physiologischen PA präsentierten sich signifikante Unterschiede zwischen alleiniger Macitentan 1E-7 M- und 1E-8 M- bzw. Bosentan 1E-7 M-Gabe im Vergleich zu alleiniger Gabe von Vardenafil 1E-6 M. Unterschiede zwischen Bosentan 1E-7 M und Vardenafil 1E-5 M waren bei physiologischen Gefäßen nicht signifikant. Die alleinige ACT-132577 1E-7 M-Gabe wies signifikante Unterschiede zur alleinigen Gabe von Vardenafil 1E-6 M auf, während niedriger dosiertes ACT-132577 (1E-8 M) nicht zu signifikanten Unterschieden gegenüber Vardenafil führte. Bei pathologischen PA waren die Unterschiede zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe bei einer Macitentan-Konzentration von 1E-8 M und 3E-8 M und bei Bosentan 1E-7 M signifikant. Im Gegensatz zu physiologischen Gefäßen konnten bei pathologischen PA auch bei einer Bosentan 1E-7 M-Gabe signifikante Unterschiede zu alleiniger Gabe von Vardenafil 1E-5 M festgestellt werden.

Die Kombination eines ERA mit Vardenafil dilatierte die PA signifikant stärker als die Kontrolle. Signifikante Vorteile einer Kombinationsapplikation im Vergleich zur alleinigen ERA-Gabe lagen jedoch bei pathologischen Gefäßen nur unter Vardenafil 1E-5 M- und Bosentan 1E-7 M-Einfluss vor sowie bei physiologischen Gefäßen bei Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M und Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M. Gegenüber alleiniger Vardenafil-Gabe präsentierte die Kombination in allen Versuchsreihen eine stärkere Vasodilatation, außer bei den Versuchen Macitentan 1E-8 M mit Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M mit Vardenafil 1E-5 M bei den pathologischen PA.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen genauer dargelegt. Eine Grafik zu jedem Versuch verdeutlicht den Kurvenverlauf des untersuchten Medikamentes.

7.1 Kombination Vardenafil und Bosentan

7.1.1 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M

Abbildung 9 zeigt die Grafik zu der Versuchsreihe mit Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M. Für die Auswertung wurden sechs Versuche berücksichtigt, bei denen „Behandlung“ ($p < 0,0001$) sowie die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße hatten. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p < 0,0001$). Ein Versuch wurde nicht berücksichtigt, da dieser aufgrund einer mangelnden Kontraktion abgebrochen wurde.

Bosentan 1E-6 M hatte einen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion zwischen ET-1 3E-9 M und NE 1E-5 M im Vergleich zur Kontrolle. Verglichen mit alleiniger Vardenafil-Gabe war bei alleiniger Bosentan-Gabe zwischen einer ET-1-Konzentration von 1E-8 M und einer NE-Konzentration von 3E-8 M eine signifikant größere Vasodilatation zu beobachten. Auch die Kombination zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu alleiniger Vardenafil-Gabe zwischen ET-1 3E-9 M und NE 1E-5 M. Vardenafil hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch ET-1 bzw. die durch NE induzierte Kontraktion. In Relation zur vorherigen Kontraktion durch KCl kontrahierten die Gefäße der Kontrollgruppe bei der letzten ET-1-Applikation (1E-8 M) am stärksten ($0,0531 \pm 0,439$), am zweit stärksten die Gefäße der Vardenafil-Gruppe ($0,478 \pm 0,402$) und am dritt-stärksten die der Kombinationsgruppe ($0,210 \pm 0,220$). Am schwächsten war die relative Kontraktion durch alleinige Bosentan-Verabreichung ($0,092 \pm 0,123$).

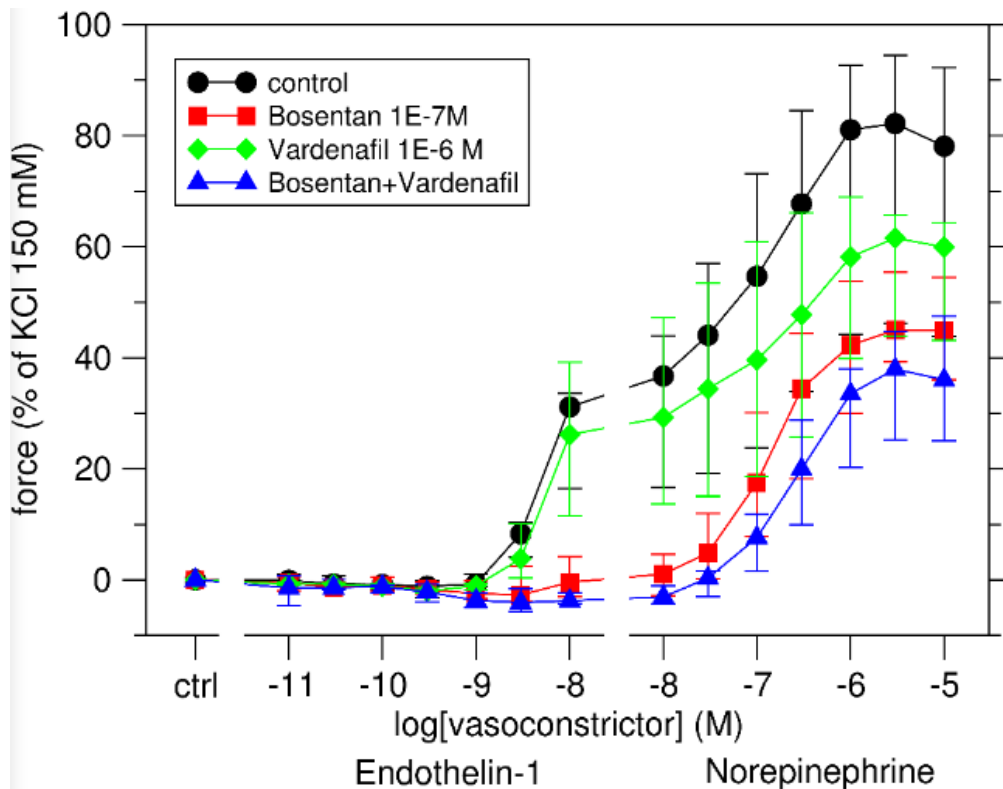


Abbildung 9: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

7.1.2 Kombination Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M

In der Auswertung der Versuchsreihe Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M wurden sechs Versuche berücksichtigt, siehe Abbildung 10. Bei den Versuchen hatten die Behandlung mit den untersuchten Substanzen ($p < 0,0001$) und die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p < 2E-4$). Zwei weitere Versuche wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt. In einem der beiden Versuche war die Kontraktion der PA nicht ausreichend, in dem anderen Versuch konnte die Kontraktion durch KCl nicht durch Auswaschen unterbunden werden.

Verglichen mit der Kontrolle hatte Bosentan einen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion bei einer ET-1-Konzentration von $3E-10$ M und zwischen ET-1 $1E-8$ M bis NE $1E-7$ M. Ebenfalls zeigte eine alleinige Bosentan-Gabe gegenüber der Kombination einen signifikanten Unterschied zwischen NE $1E-7$ M und NE $1E-5$ M.

Die Kombination war signifikant unterschiedlich zur Kontrolle zwischen ET-1 1E-8 M und NE 1E-5 M. In der Versuchsreihe zeigte die Kombination einen signifikanten Vorteil gegenüber einzelner Vasodilatantien-Gabe. Dabei war die Hemmung der Kontraktion signifikant größer zwischen NE 1E-7 M und NE 1E-5 M verglichen mit alleiniger Bosentan-Gabe und signifikant größer zwischen NE 1E-8 M und NE 1E-7 M verglichen mit alleiniger Vardenafil-Gabe. Vardenafil hatte keinen signifikanten Einfluss auf die durch ET-1 induzierte Kontraktion. Die Kontraktion durch NE konnte Vardenafil ab NE 1E-7 M signifikant inhibieren im Vergleich zur Kontrolle. In Relation zur Kontraktion durch KCl kontrahierten die Gefäße der Kontrollgruppe bei der letzten ET-1-Gabe (1E-8 M) am stärksten ($0,744 \pm 0,602$), am zweit-stärksten die der Vardenafil-Gruppe ($0,465 \pm 0,498$) und am dritt-stärksten die der Bosentan-Gruppe ($0,090 \pm 0,115$). Am schwächsten zeigte sich die relative Kontraktion durch eine kombinierte Medikamentenverabreichung ($0,070 \pm 0,079$).

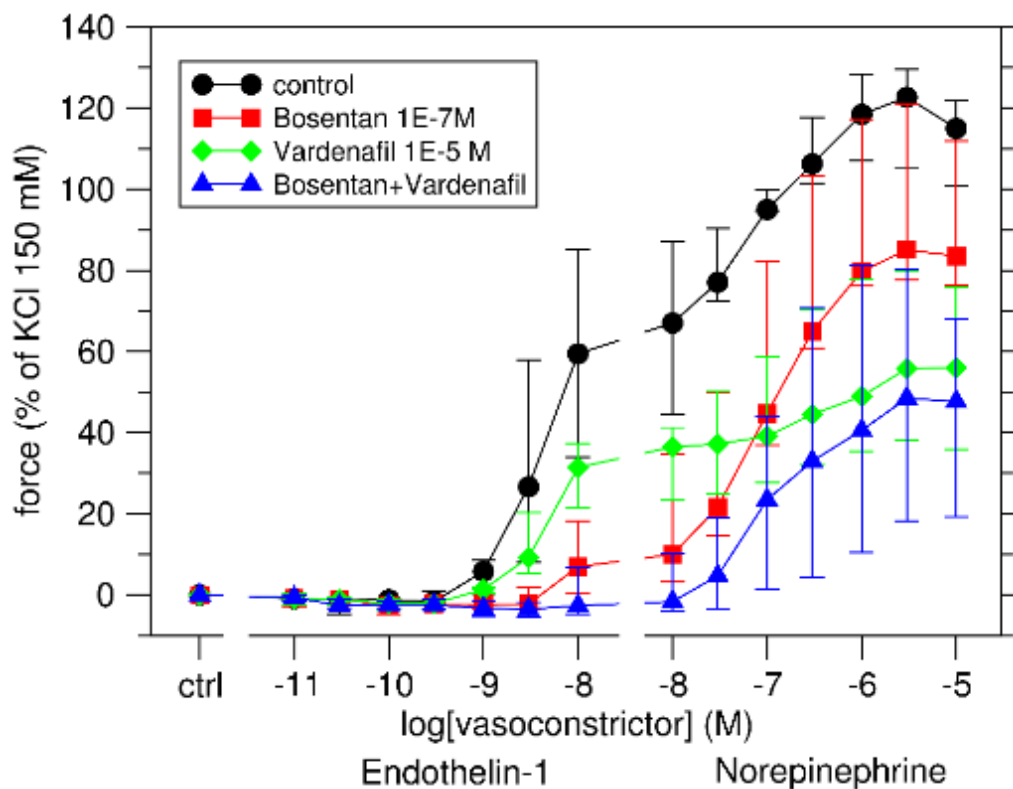


Abbildung 10: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-5 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

7.1.3 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten

Die nachfolgende Abbildung 11 veranschaulicht die Ergebnisse der Versuche mit Vardenafil 1E-6 M und Bosentan 1E-7 M. In die Auswertung wurden vier Versuche mit einer 20-minütigen KCl-Inkubationszeit und fünf Versuche mit einer 10-minütigen KCl-Inkubationszeit eingeschlossen. Bei fehlendem Einfluss der Inkubationszeit konnten die Ergebnisse dieser Versuche gemeinsam betrachtet werden. Die statistische Analyse zeigte, dass der Einfluss der Dauer der KCl-Inkubationszeit nicht signifikant war ($p = 0,84$). Sechs weitere Versuche wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da entweder abgestorbene Gefäßringe verwendet oder Fehler bei der Durchführung des Versuches dokumentiert wurden. Bei der Versuchsreihe hatten die Behandlung mit den Substanzen ($p < 0,0001$) und die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p < 0,0001$).

Ab einer Konzentration von ET-1 3E-9 M hatten Bosentan ($p = 0,00172$) und die Kombination ($p < 0,001$) einen stärker vasodilatierenden Einfluss auf die Gefäße als die Kontrolle. Vardenafil 1E-6 M hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion durch ET-1, ab einer NE-Konzentration von 1E-7 M hemmte Vardenafil die durch NE induzierte Kontraktion signifikant ($p = 0,0058$). Bei NE 1E-6 M betrug die Kraft unter Vardenafil-Einfluss 78 % der Kontrolle. Die Kontrollkurve stieg sichtbar ab ET-1 1E-9 M an, in Anwesenheit von Bosentan war erst ab ET-1 1E-8 M ein Anstieg der Kurve zu erkennen. Im Bereich der ET-1-Kurve war kein Unterschied zwischen der Bosentan-Kurve und der Kombinationskurve zu erkennen. Während der NE-Konzentrationsreihe stiegen die Bosentan- und die Kombinationskurve an, ohne jedoch die Werte der Kontrolle zu erreichen. Beide Kurven unterschieden sich bei allen untersuchten NE-Konzentrationen signifikant von der Kontrollkurve. Bei NE 1E-6 M erreichte die Bosentan-Kurve 75 % der Kontrolle. Die Kombinationskurve erreichte hier 65 % der Kontrolle. Bosentan und die Kombination unterschieden sich auch während der NE-Konzentrationsreihe nicht signifikant voneinander. Die Vardenafil-Kurve unterschied sich von der Bosentan-Kurve signifikant ab ET-1 1E-8 M ($p < 0,001$). Von der Kombinationskurve unterschied sie sich bereits ab ET-1 3E-9 M signifikant

($p = 0,02971$). Ab NE $1E-7$ M unterschieden sich die Bosentan- und die Kombinationskurve nicht mehr von der Vardenafil-Kurve.

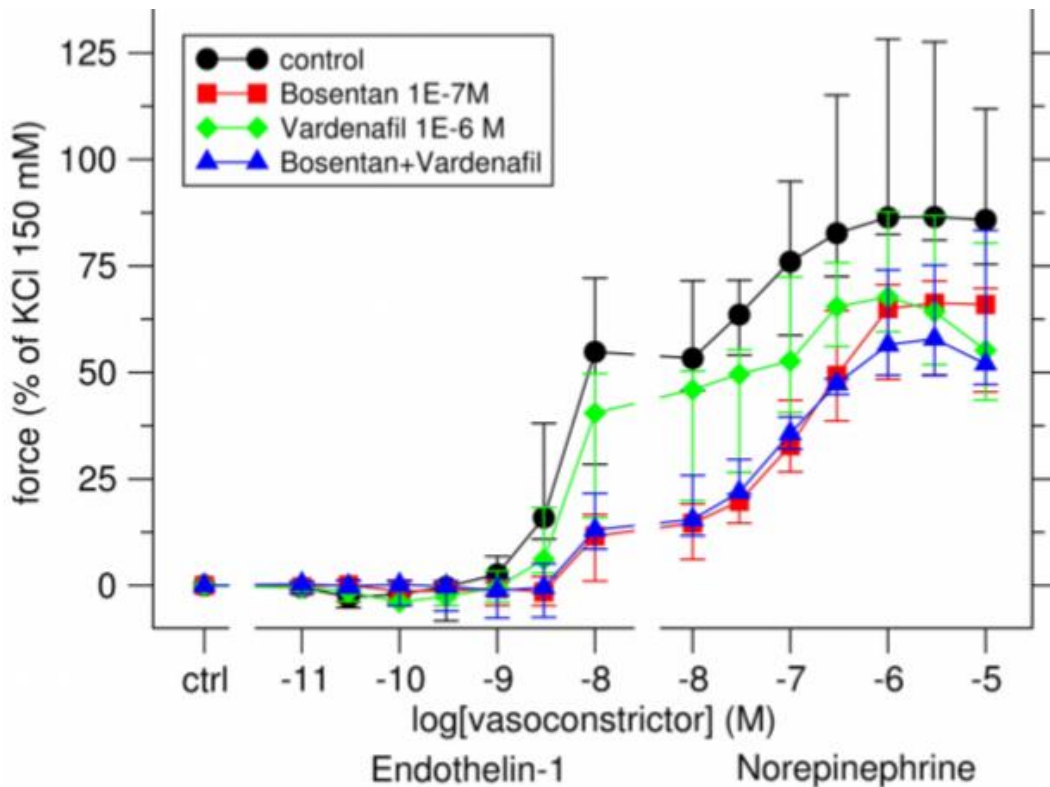


Abbildung 11: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil $1E-6$ M, Bosentan $1E-7$ M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen

7.1.4 Kombination Vardenafil $1E-5$ M und Bosentan $1E-7$ M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten

Nachfolgende Abbildung 12 zeigt die graphische Darstellung der Auswertung der Versuche mit Vardenafil $1E-5$ M und Bosentan $1E-7$ M. Es wurden sechs Versuche in die Auswertung eingeschlossen. Sechs weitere Versuche wurden ausgeschlossen, da sie nicht den Eingangskriterien entsprachen. Bei der Versuchsreihe hatten die Behandlung mit den Medikamenten ($p < 0,0001$) und die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p = 0,0062$).

Bei einer ET-1-Konzentration von 1E-9 M zeigten sich erstmals signifikante Unterschiede bei Bosentan-Gabe ($p = 0,02376$) und Kombinationsgabe ($p = 0,00186$) verglichen mit der Kontrolle. Die Unterschiede zwischen alleiniger Bosentan-Gabe und der Kontrolle blieben bis zu ET-1 1E-8 M signifikant, die der Kombination bis zu NE 1E-5 M. Vardenafil hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktion durch ET-1. Ab einer NE-Konzentration von 1E-8 M wies Vardenafil signifikante Unterschiede ($p = 0,0254$) zur Kontrolle auf. Die Kombination überwog ab einer NE-Konzentration von 3E-8 M gegenüber alleiniger Bosentan-Applikation ($p = 0,04489$). Ab NE 3E-7 M existierten signifikante Unterschiede zwischen alleiniger Bosentan- und Vardenafil-Gabe ($p = 0,00658$).

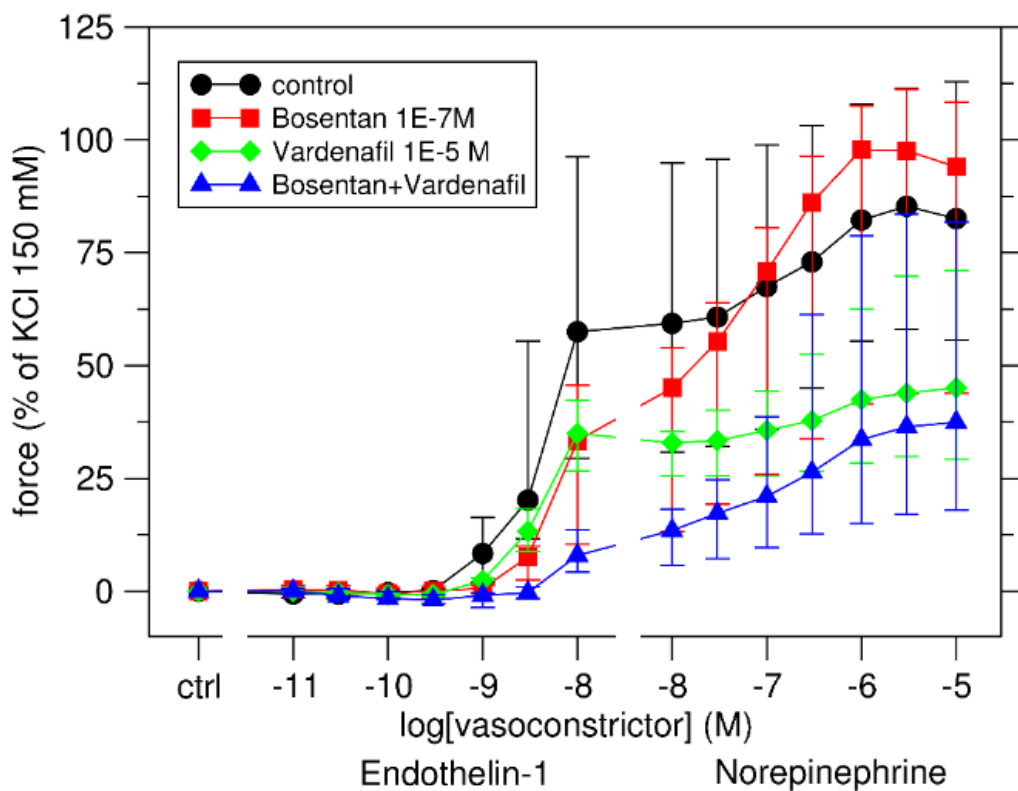


Abbildung 12: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-5 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen

7.2 Kombination Vardenafil und Macitentan

7.2.1 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M

Für die Auswertung der Versuchsreihe Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M wurden sieben Versuche berücksichtigt (siehe Abbildung 13). Die Faktoren „Behandlung“ ($p = 0,0033$) und „Vasokonstriktor“ ($p < 0,0001$) hatten hierbei einen aussagekräftigen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p < 0,0001$). Vier Versuche wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da in einem Fall eine unzureichende Kontraktion vorlag, bei zwei Gefäßen der Basaltonus instabil war und bei dem vierten Gefäß nur sieben Gefäßringe zur Verfügung standen, wovon ein Ring ein stark untypisches Verhalten zeigte.

Macitentan 1E-8 M zeigte signifikante Unterschiede zur Kontrolle im Bereich von ET-1 1E-9 M und ET-1 1E-8 M. Auch gegenüber alleiniger Vardenafil-Gabe dilatierte Macitentan 1E-8 M die Gefäße signifikant stärker zwischen ET-1 1E-9 M und ET-1 3E-9 M. Die Kombination von Macitentan und Vardenafil war signifikant unterschiedlich zur Kontrolle zwischen ET-1 1E-9 M und NE 1E-5 M. Im Bereich zwischen ET-1 1E-9 M und NE 1E-6 M sowie bei NE 1E-5 M inhibierte die Kombination die Kontraktion signifikant stärker als eine alleinige Vardenafil-Gabe. Auch im Vergleich zur alleinigen Macitentan-Gabe wies die Kombination signifikante Vorteile im Bereich zwischen NE 3E-7 M und NE 1E-5 M auf. Vardenafil hatte weder signifikanten Einfluss auf die durch ET-1 verursachte Kontraktion noch auf die durch NE verursachte Kontraktion. In Relation zur vorherigen Kontraktion durch KCl kontrahierten die Gefäße der Kontrollgruppe bei der letzten ET-1-Gabe (1E-8 M) am stärksten ($0,912 \pm 0,373$), am zweitstärksten die der Vardenafil-Gruppe ($0,894 \pm 0,200$), und am drittstärksten die der Macitentan-Gruppe ($0,503 \pm 0,502$). Am schwächsten war die relative Kontraktion durch die kombinierte Medikamentenapplikation ($0,365 \pm 0,432$).

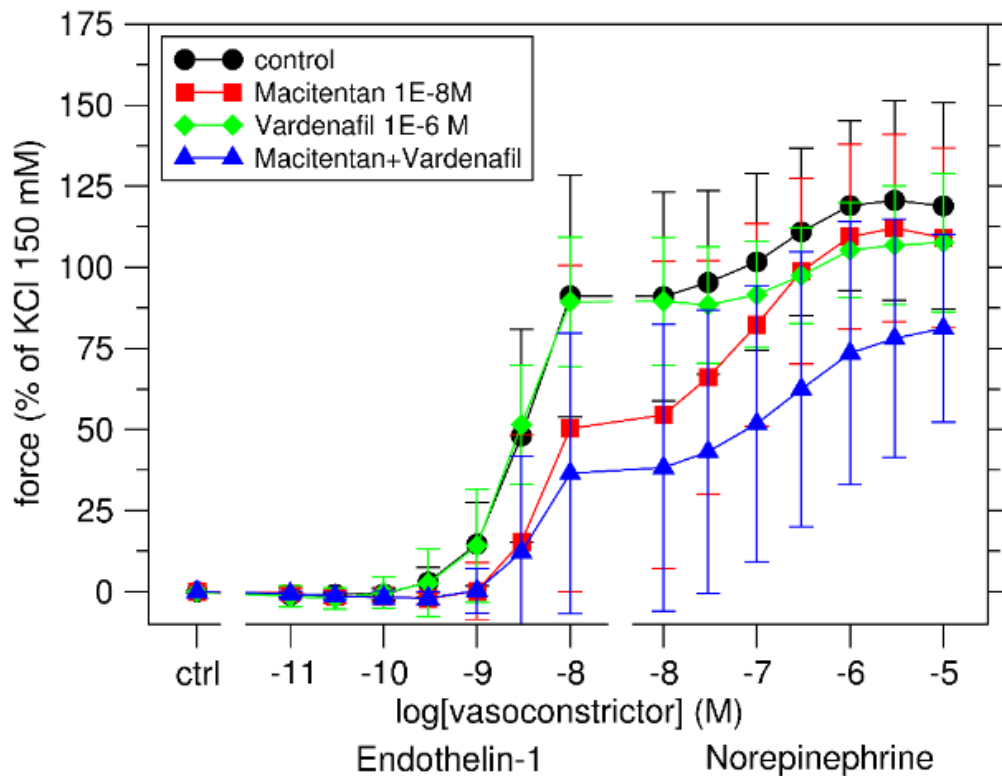


Abbildung 13: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

7.2.2 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-7 M

Für die Auswertung der Versuchsreihe Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-7 M wurden sechs Versuche berücksichtigt (siehe Abbildung 14). Bei den Versuchen hatten die Behandlung mit den Medikamenten ($p < 0,0001$) sowie die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p < 0,0001$).

Macitentan 1E-7 M zeigte im Bereich zwischen einer ET-1-Konzentration von 1E-9 M und einer NE-Konzentration von 1E-5 M signifikante Unterschiede im Kontraktionsverhalten verglichen mit der Kontrolle. Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen alleiniger Macitentan 1E-7 M-Gabe zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe im Bereich zwischen ET-1 1E-9 M und NE 1E-6 M, sowie bei NE 1E-5 M. Die Kombination von Macitentan 1E-7 M und Vardenafil 1E-6 M war ebenfalls signifikant unterschiedlich zur Kontrolle im Bereich zwischen einer ET-1-Konzentration

von 1E-9 M und einer NE-Konzentration von 1E-5 M. Außerdem zeigte sich die Kombination signifikant unterschiedlich zu alleiniger Vardenafil-Gabe zwischen ET-1 1E-9 M und NE 1E-6 M sowie bei NE 1E-5 M. Vardenafil hatte weder signifikanten Einfluss auf die durch ET-1 induzierte Kontraktion noch auf die durch NE induzierte Kontraktion. In Relation zur Kontraktion durch KCl, kontrahierten die Gefäße der Kontrollgruppe bei der letzten ET-1-Verabreichung (ET-1 1E-8 M) am stärksten ($0,666 \pm 0,323$), am zweitstärksten die der Vardenafil-Gruppe ($0,627 \pm 0,213$) und am drittstärksten die der Kombination (Macitentan + Vardenafil) ($-0,006 \pm 0,107$). Am schwächsten war die relative Kontraktion durch alleinige Macitentan-Gabe ($-0,027 \pm 0,123$).

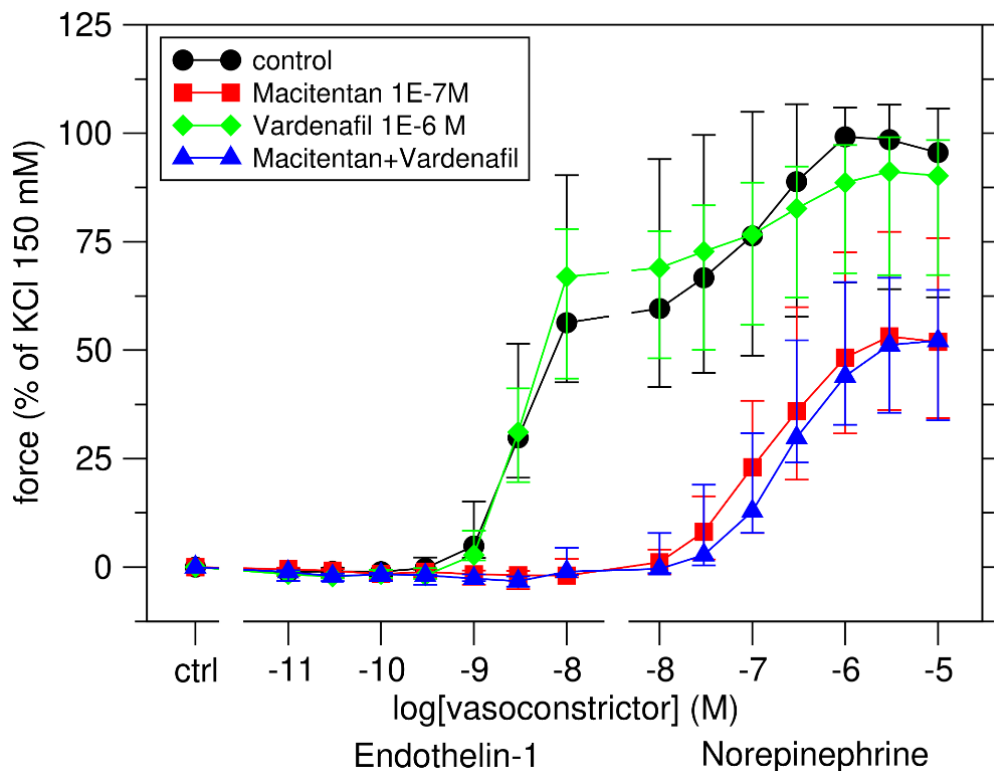


Abbildung 14: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

7.2.3 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten

Es wurden fünf Versuche für die Auswertung der Versuche mit der Kombination von Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 1E-8 M an lungentransplantierten Gefäßen verwendet, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung 15 dargestellt werden. Ein weiterer Versuch wurde aus der Auswertung genommen, da die relativen Daten stark auffällig waren. Bei abnormal geringem Kontraktionsverhalten nach KCI-Applikation und außergewöhnlich starker Kontraktion nach ET-1 und NE-Gabe, war auf einen Fehler unklarer Ursache zu schließen. Bei den eingeschlossenen Versuchen hatten die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) und die Behandlung mit den entsprechenden Medikamenten ($p < 0,0033$) signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand keine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p = 1,0$).

Macitentan hatte einen sichtbar hemmenden Einfluss auf die durch ET-1-induzierte Kontraktion. Die Kurve in Anwesenheit von Macitentan unterschied sich ab ET-1 1E-9 M von der Kontrollkurve und ab ET-1 3E-9 M von der Kurve in Anwesenheit von Vardenafil. Die Kombination von Macitentan und Vardenafil unterscheidet sich nur zwischen NE 3E-6 M und NE 1E-5 M von der Kontrolle. Es sind weder signifikante Unterschiede zwischen der Kombination zu alleiniger Macitentan-Gabe noch zu alleiniger Vardenafil-Gabe aufgetreten. Der Verlauf der Kurven von Kontrolle und Vardenafil entsprach dem bekannten Verlauf von Gefäßen der Nicht-LTX Patienten. Vardenafil 1E-6 M war an keiner Stelle der Kurve signifikant unterschiedlich zur Kontrollkurve.

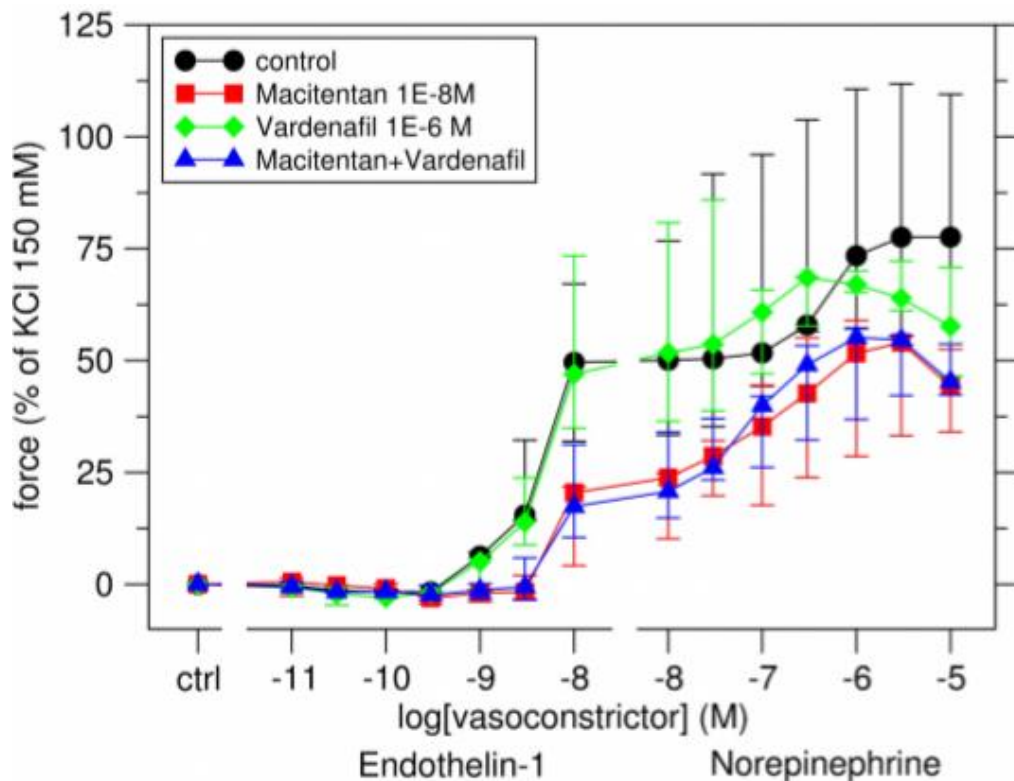


Abbildung 15: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen

7.2.4 Kombination Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 3E-8 M bei Gefäßen von lungentransplantierten Patienten

Die Kombinationswirkung von Vardenafil 1E-6 M und Macitentan 3E-8 M bei Lungengefäßen von LTX-Patienten wurde in sechs Versuchen getestet, deren Ergebnisse gesamtheitlich in der Auswertung berücksichtigt wurden. Abbildung 16 zeigt die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße unter entsprechendem Medikamenteneinfluss. In der Versuchsreihe lag ein signifikanter Einfluss auf das Kontraktionsverhalten durch die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) und durch die Behandlung mit den Medikamenten ($p < 0,0001$) vor. Es bestand keine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p = 0,0531$).

Macitentan hatte einen deutlichen hemmenden Einfluss auf die ET-1-Kurve, der signifikant war im Bereich von ET-1 3E-9 M bis NE 3E-7 M. Die Kurve in Anwesenheit von Macitentan unterschied sich außerdem signifikant von der Kurve in Anwesenheit

von Vardenafil. Dieser Unterschied war signifikant im Bereich zwischen ET-1 $3E-9$ M und NE $1E-7$ M. Der Verlauf der Kurve der Kontrolle und Vardenafil entsprach den bekannten Verläufen von Nicht-LTX-Patienten. Die Kurve in Anwesenheit von Vardenafil unterschied sich an keinem Punkt signifikant von der Kontrollkurve. Vardenafil konnte folglich weder die durch ET-1 noch die durch NE induzierte Kontraktion signifikant hemmen. Die Kombination unterschied sich signifikant von der Kontrollkurve im Bereich ET-1 $3E-9$ M bis NE $1E-7$ M. Außerdem war die Kombination signifikant unterschiedlich zur Kurve in Anwesenheit von Vardenafil in einem Bereich zwischen ET-1 $1E-8$ M und NE $1E-7$ M. Die Kombinationskurve lag in weiten Abschnitten über der Kurve in Anwesenheit einer alleinigen Macitentan-Applikation; die Kurven unterschieden sich jedoch an keinem Punkt signifikant voneinander.

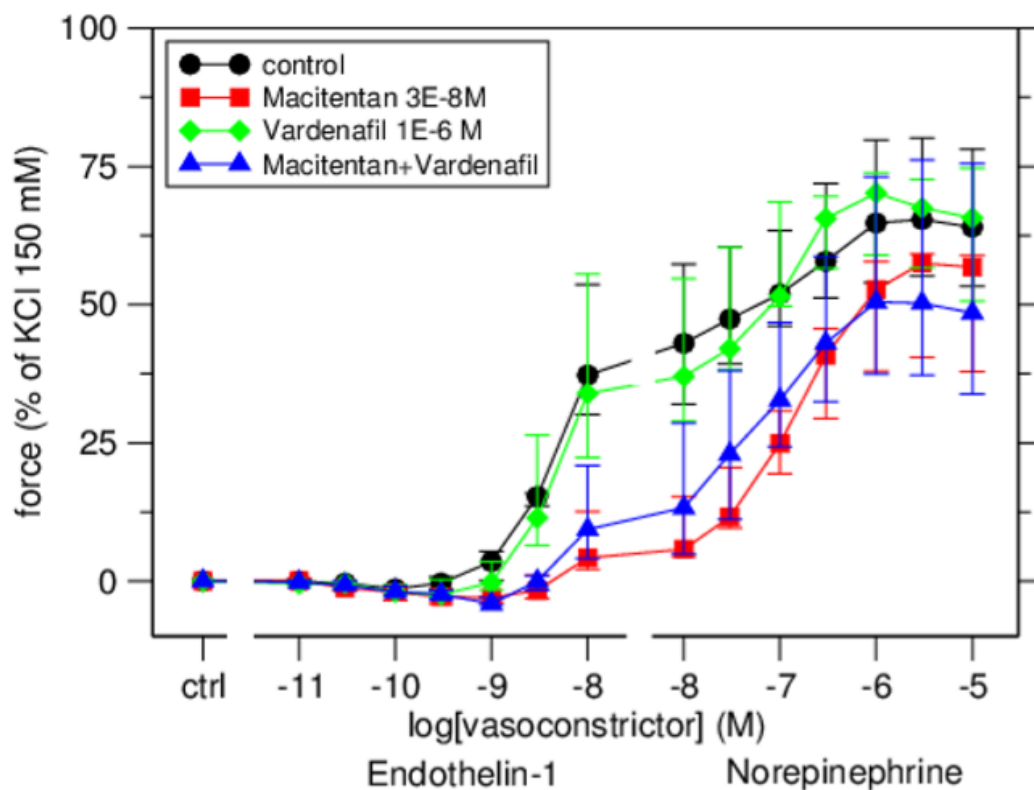


Abbildung 16: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil $1E-6$ M, Macitentan $1E-8$ M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen

7.3 Kombination Vardenafil und ACT-132577

7.3.1 Kombination Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-8 M

Für die Auswertung der Versuchsreihe Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-8 M wurden sechs Versuche berücksichtigt (siehe Abbildung 17), keine weiteren Versuche mussten ausgeschlossen werden. Die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) hatten signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Der Faktor „Behandlung“ ($p = 0,155$) hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten. In Bezug auf die Kontraktion der Gefäßringe war es nicht entscheidend, welche Substrate hinzugegeben wurden. Die Kraftwerte waren dementsprechend nur abhängig von der Konzentration der Vasokonstriktoren. Die Kraftwerte nach Substratgabe verhielten sich wie die Kontrolle ohne ERA- und Vardenafil-Zugabe. Es bestand keine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p = 1,0$). Die statistische Analyse stimmt mit der Abbildung 17 überein, die einzelnen Kurven verlaufen nahezu deckungsgleich.

Nur bei einer ET-1-Konzentration von 3E-10 M zeigte ACT-132577 signifikante Unterschiede bezüglich der Kontraktionskraft im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0214$). Auch die Kombination mit Vardenafil und dem ERA war bei einer ET-1-Konzentration von 3E-10 M signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ($p < 0,001$). Die kombinierte Medikamentengabe zeigte signifikante Unterschiede gegenüber alleiniger Vardenafil-Gabe bei einer ET-1-Konzentration von 1E-9 M ($p = 0,026$). Bei anschließender NE-Verabreichung waren keinerlei signifikante Unterschiede im Kontraktionsverhalten zu erkennen, weder bei alleiniger ERA-Gabe noch bei der Kombination. Vardenafil verursachte keine signifikant stärkere Vasodilatation bei durch ET-1-kontrahierten Gefäßen als die Kontrolle. Auch nach NE-Gabe waren keine signifikanten Unterschiede bei Vardenafil-Gabe im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Zwischen alleiniger ACT-132577 1E-8 M-Gabe und Vardenafil 1E-6 M-Gabe waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

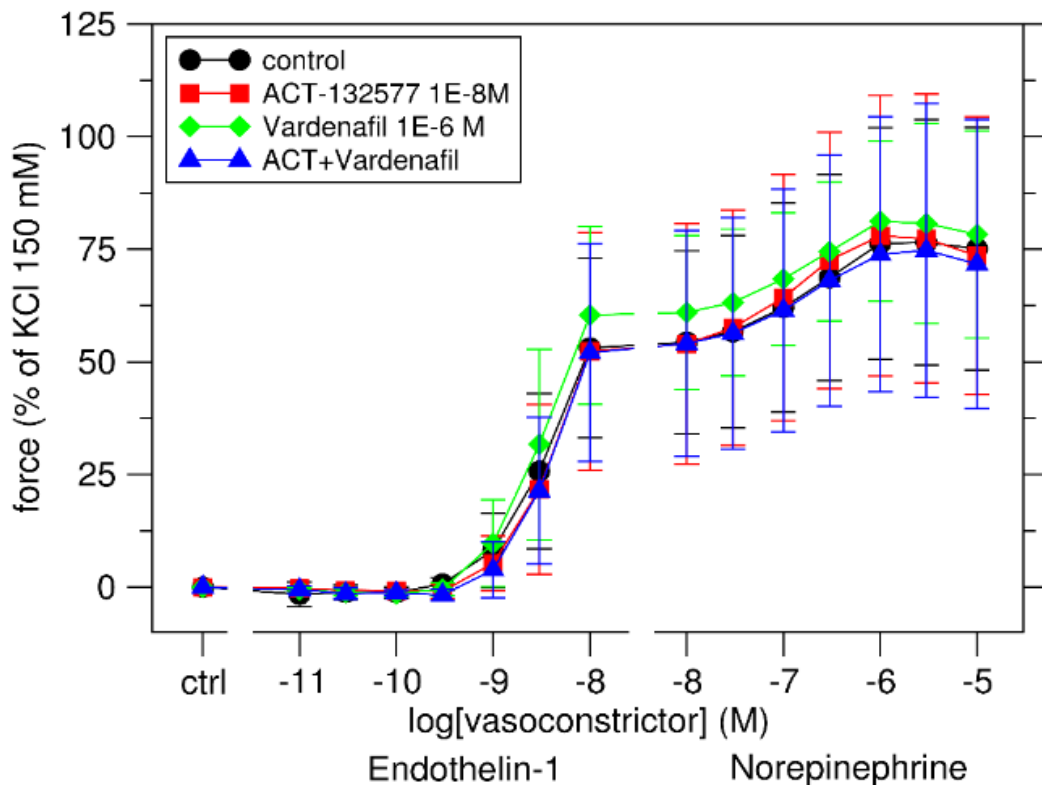


Abbildung 17: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, ACT-132577 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

7.3.2 Kombination Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-7 M

Abbildung 18 zeigt die Auswertung der Versuche mit Vardenafil 1E-6 M und ACT-132577 1E-7 M. In die Versuchsreihe wurden acht Versuche eingeschlossen. Ein weiterer Versuch wurde aufgrund eines Programmfehlers nicht in die Auswertung einbezogen. Bei den Versuchen hatten die verwendeten Vasokonstriktoren ($p < 0,0001$) und die Behandlung mit den entsprechenden Medikamenten ($p < 0,0001$) einen signifikanten Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Es bestand keine signifikante Interaktion zwischen „Behandlung“ und „Vasokonstriktor“ ($p = 0,8105$).

Die Ergebnisse zeigten, dass ACT-132577 1E-7 M die durch ET-1-induzierte Kontraktion deutlich hemmte. Unterschiede zwischen ACT-132577 1E-7 M und der Kontrollkurve lagen im Bereich zwischen ET-1 3E-10 M bis ET-1 1E-8 M vor. Außerdem war die Kombinationskurve signifikant unterschiedlich zur Kontrollkurve bei ET-1 1E-9 M und ET-1 3E-9 M. Die Kombinationskurve lag knapp oberhalb der

alleinigen ERA-Kurve. Jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant verglichen mit alleiniger ACT-132577-Gabe. Signifikante Unterschiede der Kombinationskurve im Vergleich zur Vardenafil-Kurve lagen bei ET-1 1E-9 M und ET-1 3E-9 M vor. Vardenafil 1E-6 M hatte keinen hemmenden Einfluss auf die ET-1-Kurve und auch bei der NE-Kurve waren die Unterschiede zur Kontrolle nicht signifikant. Alleinige ACT-132577 1E-7 M-Gabe dilatierte die PA signifikant stärker im Bereich zwischen ET-1 3E-10 M und ET-1 3E-9 M im Vergleich zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe.

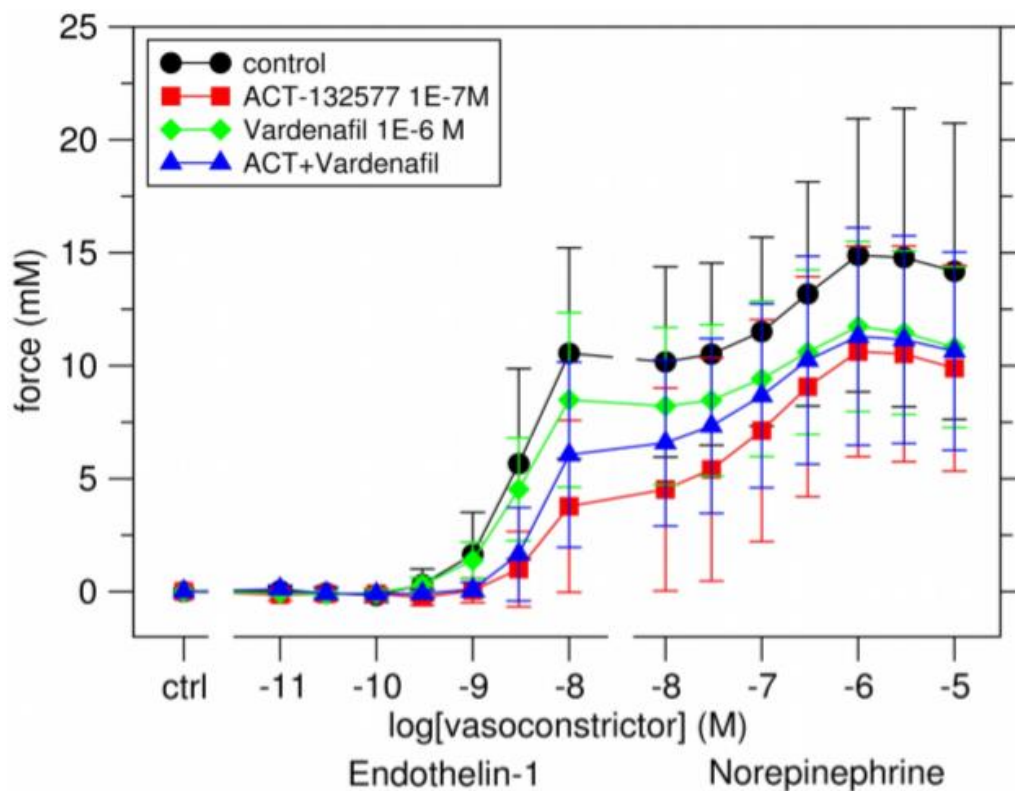


Abbildung 18: Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, ACT132577 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl

8 Diskussion und Limitationen

8.1 Diskussion der Ergebnisse

Diese Promotionsarbeit untersuchte die Wirkung von ERA und Vardenafil an humanen Pulmonalgefäßen in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen. Es galt zu zeigen, inwiefern die untersuchten Vasodilantien Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Arterien hatten und ob eine mögliche Kombinationsgabe zu verbesserter Relaxation der Gefäße führte.

Diese Arbeit ist die erste Analyse von humanen Pulmonalgefäßen, die zur Untersuchung der Medikamente speziell auf an PAH erkrankte Gefäße einging. Die lungengesunden PA wurden nicht aufgrund einer vaskulären Erkrankung entnommen, sondern wegen einer Karzinomerkrankung aus der Peripherie des Lungenlappens. Im Gegensatz zu den pathologischen Gefäßen lag keine vaskuläre Lungenerkrankung im Endstadium vor, die eine Transplantation zwingend notwendig gemacht hätte. Somit wurde nicht von einer Veränderung der Gefäße ausgegangen und die PA konnten als physiologisch klassifiziert werden. Im Kontrast dazu wurden PA untersucht, welche von LTX-Patienten mit terminalen Lungenerkrankungen stammten und somit als vaskulär pathologisch betrachtet wurden.

Die Ergebnisse der Promotionsarbeit bestätigten, dass die ERA Bosentan, Macitentan und ACT-132577 potente Antagonisten der durch ET-1-bedingten Vasokonstriktion an physiologischen Lungengefäßen waren. Auch bei pathologischen Gefäßen reduzierten Macitentan und Bosentan die Vasokonstriktion. Vardenafil, einer der potentesten PDE5-Inhibitoren in bisherigen Studien, wirkte in manchen Versuchen weniger vasodilatierend als in anderen Versuchen. Dies wirft die Frage auf, inwiefern die Wirkung von Vardenafil bei den einzelnen Patienten variierte und ebenfalls, ob Unterschiede in der Wirksamkeit In-vivo bestehen. [6,7].

Bei den pathologischen PA fällt in der Versuchsreihe mit Bosentan $1E-7$ M und Vardenafil $1E-6$ M auf, dass im Vergleich zur Versuchsreihe mit höher dosiertem Vardenafil der Kurvenverlauf von Bosentan eher erwartungsgemäß verlief. Die Bosentan-Kurve lag im NE-Bereich etwas unterhalb der Kontrolle, im Gegensatz zu etwas oberhalb der Kontrolle in der Serie mit höher dosiertem Vardenafil. Eine stärkere Vasodilatation als die der Kontrolle entspricht nicht den Erwartungen, da eine Hemmung der durch NE-induzierten Kontraktion prinzipiell nicht durch einen ERA

verursacht wird. Möglicherweise resultierte die stattgefundenene Vasodilatation in diesem Bereich durch eine überschießende vasodilatierende Reaktion nach vorheriger ET-Gabe. Bei analogen Versuchen an physiologischen Gefäßen entwickelten sich die Kurvenverläufe von Bosentan erwartungsgemäß und ähnlich zu der Bosentan-Kurve im Versuch mit niedriger dosiertem Vardenafil. Da die Wirkung von Bosentan unabhängig von der Vardenafil-Dosierung ist, waren ähnliche Kurvenverläufe in den Versuchsreihen mit Bosentan zu erwarten. Bei einer kombinierten Gabe von Bosentan $1E-7$ M und Vardenafil $1E-6$ M zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf zwischen physiologischen und pathologischen PA. Ab ET-1 $3E-9$ M zeigten sich in beiden Kombinationskurven signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle. Dies impliziert die Wirksamkeit der Medikamente sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Medikamenten. Die angenommene Wirksamkeit einer kombinierten Medikamentengabe bestätigte sich ebenfalls bei den Kombinationskurven von Bosentan $1E-7$ M und Vardenafil $1E-5$ M. Hier präsentierte sich kein grundsätzlicher Unterschied zwischen physiologischen und pathologischen Gefäßen und somit kann davon ausgegangen werden, dass vaskuläre Pathologien nicht zu einem unterschiedlichen Ansprechen führen.

Die Kurve von Macitentan $1E-8$ M verlief im ET-1-Bereich bei physiologischen und pathologischen Gefäßen ähnlich. In beiden Fällen implizierte eine signifikante Kontraktionshemmung ab ET-1 $1E-9$ M die Wirksamkeit von Macitentan. Durch die ERA-Gabe wurde die Kontraktion der Gefäßringe bei physiologischen Gefäßen deutlich stärker gehemmt als bei pathologischen. Bei ET-1 $1E-9$ M betrug die Kontraktionskraft bei den physiologischen Gefäßen 1 % der Kontrolle und bei den pathologischen Gefäßen sogar 102 %. Bei ET-1 $3E-9$ M betrug die Kraft bei den physiologischen Gefäßen 32 % der Kontrolle und bei den pathologischen Gefäßen noch 104 %. Bei ET-1 $1E-8$ M betrug die Kraft bei den physiologischen Gefäßen 55 % der Kontrolle und bei den pathologischen Gefäßen noch 78 %. Dies zeigte zwar, dass die ERA-Gabe zu einer Wirkung führte, jedoch war ein intaktes Gefäßendothel womöglich ursächlich für die wesentlich stärkere Kontraktionshemmung an physiologischen Gefäßen. Diese Annahme wurde ebenfalls dadurch bestärkt, dass bei physiologischen Gefäßen die kombinierte Gabe von Macitentan $1E-8$ M mit Vardenafil $1E-6$ M gegenüber den beiden Einzelsubstanzen signifikante Unterschiede zeigte, während diese bei pathologischen Gefäßen in derselben Dosierung nicht festgestellt

werden konnten. In der höher dosierten Macitentan-Konzentration ($1\text{E-}7\text{ M}$) war die Kombination mit Vardenafil an physiologischen PA nicht mehr signifikant unterschiedlich zu alleiniger Macitentan-Gabe. Signifikante Unterschiede waren nur gegenüber alleiniger Vardenafil-Gabe festzustellen. Bei pathologischen Gefäßen traten signifikante Unterschiede der Kombination gegenüber den Einzelsubstanzen lediglich bei der Kombination Macitentan $3\text{E-}8\text{ M}$ und Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ gegenüber alleiniger Vardenafil-Gabe auf. Hier trat ein Wirkeffekt erst in der höheren Konzentration auf, was wiederum auf ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Ansprechen zwischen physiologischen und pathologischen Gefäßen in den untersuchten Macitentan-Dosierungen hindeutete.

Diese Resultate zeigten, dass die untersuchten Wirkstoffe nicht nur an physiologischen, sondern auch an pathologischen PA wirksam waren. Jedoch war die Kontraktionshemmung an pathologischen Gefäßen, insbesondere in den Versuchsreihen mit Macitentan, teils weniger stark ausgeprägt und trat teilweise erst in höheren Konzentrationen auf.

ACT-132577 $1\text{E-}8\text{ M}$ und ACT-132577 $1\text{E-}7\text{ M}$ wurden bislang nur an physiologischen Gefäßen getestet. Effekte von ACT-132577 konnten nur in höherer Konzentration beobachtet werden. So waren in der Konzentration $1\text{E-}7\text{ M}$ signifikante Unterschiede des ERA zur Kontrolle zu finden. Ein fehlender Effekt des Faktors „Behandlung“ bei ACT-132577 $1\text{E-}8\text{ M}$ -Gabe zeigte zum einen, dass die geringer dosierte ACT-132577-Konzentration zu niedrig war. Zum anderen war die untersuchte Vardenafil-Konzentration grenzwertig, nur in einem Teil der Versuche konnten Effekte dargestellt werden. In Relation zu vorheriger Kontraktion durch KCl konnte die Kontraktion der Gefäße in höherer ACT-132577-Konzentration ($1\text{E-}7\text{ M}$) besser verringert werden als durch niedrigere Konzentration ($1\text{E-}8\text{ M}$). So konnte beispielsweise die maximale Kontraktion bei ET-1 $1\text{E-}8\text{ M}$ mittels höherer ACT-132577-Konzentration stärker gehemmt werden als durch niedrigere. Bei ET-1 $1\text{E-}8\text{ M}$ betrug die Kraft unter ACT-132577 $1\text{E-}7\text{ M}$ -Einfluss 47 % der Kontrolle, bei ACT-132577 $1\text{E-}8\text{ M}$ jedoch noch 99 % der Kontrolle. In Kombination von ACT-132577 $1\text{E-}7\text{ M}$ mit Vardenafil betrug die Kraft bei ET-1-Gabe 61 % der Kontrolle, im Vergleich dazu in der Kombination mit niedriger dosiertem ERA noch 98 %. Außerdem zeigten sich in der höheren ACT-132577-Dosierung ($1\text{E-}7\text{ M}$) signifikante Unterschiede zwischen alleiniger ERA-Gabe und alleiniger Vardenafil-Gabe. Diese Unterschiede

waren bei der Gabe von ACT-132577 $1\text{E-}8\text{ M}$ nicht festzustellen. Dies zeigte, dass die Effekte von ACT-132577 in höherer Konzentration die Effekte geringerer Konzentration übertrafen. Aus den In-vitro-Versuchen lässt sich demnach schlussfolgern, dass ACT-132577 ausreichend hoch dosiert werden muss, wenn der ERA zusätzlich zur Wirkverstärkung von Vardenafil gegeben werden soll. Außergewöhnlich bei der ACT-132577 $1\text{E-}7\text{ M}$ -Konzentration war, dass im Mittel die Kombination von ACT-132577 $1\text{E-}7\text{ M}$ mit Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ eine geringere Hemmwirkung verursachte als der alleinige ERA. In einem Teil der Einzelversuche war die Hemmung der Kontraktion durch kombinierte Medikamentengabe geringer, in den übrigen Fällen hingegen geringfügig stärker. Möglicherweise könnte eine histologische Betrachtung auch in diesem Fall Hinweise auf das beobachtete unterschiedliche Ansprechen liefern. Es ist unklar, ob die Hemmwirkung der Kombination deshalb geringer war, weil die maximale Hemmung der Kontraktion schon durch alleinige ERA-Gabe ausgereizt wurde und durch weitere Vardenafil-Gabe nicht mehr verstärkt werden konnte. Ohne Betrachtung der Rezeptorverteilung und der morphologischen Struktur der PA ist dies nicht eindeutig zu erklären.

Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ zeigte im Kurvenverlauf bei physiologischen PA keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle in den Versuchen mit Bosentan, Macitentan und ACT-132577. Bei den pathologischen Gefäßen galt dasselbe in der Versuchsreihe mit Macitentan. In der Versuchsreihe mit Bosentan variierte der Kurvenverlauf jedoch etwas. Es waren teilweise signifikante Unterschiede von Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ zur Kontrolle zu erkennen. Sowohl bei physiologischen PA als auch bei pathologischen PA zeigten sich nach Vardenafil $1\text{E-}5\text{ M}$ -Gabe signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Demgemäß präsentierte sich ein vergleichbarer Kurvenverlauf bei physiologischen und pathologischen Gefäßen. Somit ist anzunehmen, dass Vardenafil nicht nur an lungengesunden Gefäßen Wirkung zeigen kann, sondern auch an erkrankten PA. Bezüglich der pathologischen Gefäße galt einerseits, dass Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ keine signifikante Vasodilatation gegenüber der Kontrolle in den Versuchen mit Macitentan zeigte. Andererseits konnte Vardenafil $1\text{E-}6\text{ M}$ die Kontraktion ab einer NE-Konzentration von $1\text{E-}7\text{ M}$ in den Experimenten mit Bosentan an pathologischen PA signifikant hemmen. Diese Unterschiede im Vasodilatationsvermögen von Vardenafil sind möglicherweise durch Vorerkrankungen einiger Patienten bedingt. Histologische Untersuchungen des Rezeptorstatus könnten weitere Hinweise auf

unterschiedliches Ansprechen auf Vardenafil liefern und finden derzeit in unserem Forschungslabor statt. Um eine gewünschte Vasodilatation zu erreichen, sind unter Ex-vivo-Konditionen unter Umständen höhere Vardenafil-Konzentrationen nötig als in-vivo. Wie zu erwarten zeigte Vardenafil 1E-5 M einen stärker vasodilatierenden Effekt als Vardenafil 1E-6 M. So betrug bei den physiologischen Gefäßen beispielsweise bei NE 1E-5 M-Gabe die Kraft unter Vardenafil 1E-5 M-Einfluss 58 % der Kontrolle in der Versuchsreihe mit Bosentan 1E-7 M. In der Versuchsreihe mit niedrigerer Vardenafil-Konzentration betrug die Kraft noch 88 % der Kontrolle. Bezüglich einer kombinierten Gabe mit einem ERA war Vardenafil nur von Vorteil, wenn ausreichend hoch dosiert. In den Versuchen stellte sich dies als schwierig dar, da die therapeutische Breite in den Organbädern sehr schmal war (keine bis fast nicht sichtbare Inhibition der Kontraktion). Vorteile einer Kombination eines ERA mit Vardenafil gegenüber alleiniger ERA-Gabe zeigten sich bei pathologischen Gefäßen nur in höherer Vardenafil-Konzentration (Vardenafil 1E-5 M und Bosentan 1E-7 M). Nach Zugabe von Vardenafil 1E-6 M verbesserten sich die Effekte von Bosentan 1E-7 M, wenn überhaupt, nur wenig. Bei analogem Versuch mit physiologischen Gefäßen trat ein ähnlicher Kurvenverlauf auf. Jedoch war bei pathologischen PA bei einer NE-Konzentration von 1E-6 M ein geringfügig stärkerer Effekt von Vardenafil zu erkennen.

In den vorherigen Versuchen präsentierte sich Vardenafil als das stärkste Vasodilatans, verglichen mit anderen PDE5-Inhibitoren [6]. Deshalb wurde der Fokus auf Untersuchungen mit Vardenafil gelegt, obwohl Vardenafil bisher nur als off-label Therapieoption zur Behandlung der PAH zugelassen ist. Vardenafil ist jedoch hinsichtlich der Behandlung von erektiler Dysfunktion umfassend erforscht, sodass Nebenwirkungen bekannt sind und sich als vergleichbar zu denen anderer PDE5-Inhibitoren erweisen [55]. So wurde eine tägliche Vardenafil-Einnahme von 5 mg bis 10 mg suffizient toleriert [57]. Bisher existieren keine Studien, in denen die verschiedenen PDE5-Inhibitoren anhand ihrer Wirkung bezüglich PAH direkt miteinander verglichen werden. Des Weiteren gibt es nur wenige Studien, die verschiedene ERA mit verschiedenen PDE5-Inhibitoren vergleichen [56]. Die Datenlage bezüglich einer Kombinationstherapie zeigt vor allem positive Effekte hinsichtlich des 6MWTs und einer reduzierten klinischen Verschlechterung. Ein systematischer Vergleich zwischen Monotherapien und Kombinationstherapien aller

derzeit angewandten Medikamente kann in Zukunft noch weiter ausgearbeitet werden. Der optimale Beginn einer Kombinationstherapie sowie die effektivste Kombination sind ebenso noch ausstehend wie eine langfristige Studie mit Überleben als festgelegten Endpunkt [4,58,59,60,61]. Aufgrund der mangelnden Datenlage sind unsere vergangenen Studien ein wesentlicher Indikator bezüglich der Frage, welcher PDE5-Inhibitor der effektivste zu sein scheint. Die Literatur zeigt, dass die beobachteten günstigen Veränderungen von hämodynamischen Parametern und des Borg-Dyspnoe-Scores durch Vardenafil vergleichbar zu den Effekten von Tadalafil und Sildenafil waren. Bisher wurde ein verbessertes klinisches Outcome nur nach Vardenafil-Einnahme belegt. Bei anderen PDE5-Inhibitoren wurde dies nur nach vorheriger Gabe von ERA oder bei einer Kombinationstherapie nachgewiesen [62]. Ferner zeigte sich Vardenafil um das zwanzig-fache potenter in der Inhibition von aufgereinigter PDE5 als Sildenafil [49]. Diese Anhaltspunkte implizieren, dass es wert ist, die Wirkung von Vardenafil tiefgreifend zu untersuchen.

Die Variabilität von Vardenafil in den bisherigen Versuchen macht weitere Versuche notwendig, um eine finale Aussage über die Wirkung des Vasodilatans treffen zu können. Ein mangelndes Ansprechen auf Vardenafil vermag mit reduzierter NO-Ausschüttung zusammenhängen, welche durch endotheliale Dysfunktion bedingt wird und zu niedrigerer Konzentration des PDE5-Substrats cGMP führt. Wenn dieser Mechanismus in Zukunft fachlich gestützt wird, könnten somit Medikamente, die auf den cGMP-Signalweg abzielen zur Vasodilatation bei PAH-Patienten angewendet werden [62]. Ein potenzieller Verlust an ETR_B bedingter Vasodilatation kann ebenfalls dazu führen, dass Kombinationseffekte zwischen ERA und Vardenafil erschwert beurteilt werden können [63]. Wie zuvor in anderen Studien belegt, variierte Vardenafil in pharmakokinetischen Eigenschaften zwischen den Patienten, die an pulmonaler Hypertension leiden [64]. Zudem wurden Unterschiede nach oraler Vardenafil-Gabe in der systemischen Exposition zwischen einzelnen und innerhalb einzelner Patienten festgestellt [54].

Die Literatur gibt Hinweise auf Interaktionen zwischen PDE5-Inhibitoren und ERA bei der Einnahme von Patienten. So hat die Kombinationsgabe mit Bosentan zu einer Medikamenteninteraktion mit Vardenafil geführt und dessen Plasmakonzentration vermindert [64]. Auch in Kombination mit anderen PDE5-Inhibitoren wurden Medikamenteninteraktionen mit Bosentan beobachtet. Die maximale

Plasmakonzentration von Sildenafil wurde ebenfalls verringert, was womöglich an präsystemischem Metabolismus in Zusammenhang mit CYP3A4-Interaktionen liegen kann [65]. Intrazelluläre Konzentrationen von Bosentan und Ambrisentan wurden ebenfalls durch PDE5-Gabe gesenkt, wobei jedoch deren Effekte nicht gesenkt wurden [66]. Gleichzeitig wurde in Studien auch eine Senkung der Plasmakonzentration von Sildenafil und eine Erhöhung von Bosentan bei kombinierter Gabe beobachtet [67]. Da diese Zusammenhänge noch nicht endgültig geklärt werden können, dient diese Arbeit zur Untersuchung der Medikamenteninteraktion und Kombinationseffekte in Ex-vivo und In-vitro Bedingungen.

Die Wirkungsunterschieden der getesteten Medikamente am Gefäßendothel könnten durch vorherige Medikamenteneinnahme oder durch Begleiterkrankungen der Patienten entstanden sein. Diese führten womöglich zu Veränderungen der Rezeptoren an den Gefäßen und trugen so möglicherweise zu einem veränderten Ansprechen auf die Vasodilantien bei. Um mögliche Auffälligkeiten zu entdecken wurden patientenbezogene Daten aus der Gruppe der lungengesunden Patienten gesammelt und denen von LTX-Patienten gegenübergestellt. Auffällig hierbei war, dass die lungengesunden Patienten (70,1 Jahre + 6,2) im Mittel etwas älter waren als die LTX-Patienten (60,4 Jahre + 6,2). Diese Unterschiede resultierten möglicherweise daher, dass Lungenkrebserkrankungen, die zu 97,4% ursächlich für die Lobektomien waren, vor allem in höherem Lebensalter auftreten. Das mittlere Erkrankungsalter an Lungenkrebs lag 2014 bei Frauen in Deutschland bei 69 Jahren und bei 70 Jahren bei Männern [68]. Dies korrelierte mit dem mittleren Alter der Patienten bei Lobektomie. Im Gegensatz dazu waren zwischen 2012 und 2014 in Deutschland die Patienten, die eine LTX erhielten, im Mittel 54 Jahre alt [69]. Es ist fraglich, ob der um circa 10 Jahre höher liegende Altersdurchschnitt der lungengesunden Patienten zu signifikanten Unterschieden im Ansprechen auf die Vasodilantien führte. Letztendlich handelte es sich in beiden Gruppen um Patienten fortgeschrittenen Alters, sodass die Gefäße altersbedingt zu vergleichen seien sollten. Die Geschlechterverteilung war ebenfalls unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. In der Gruppe der physiologischen PA waren Männer mit 71,8 % deutlich häufiger vertreten als in der Gruppe der pathologischen PA (42,3 %). Der höhere Anteil an Männern, welche eine Lobektomie aufgrund einer Lungenkarzinomerkrankung erhielten, mag womöglich mit einem höheren Anteil an Zigarettenrauchern dieser Bevölkerungsgruppe zusammenhängen

[68]. Jedoch wurde bezüglich der Unterschiede der Geschlechterverteilung nicht von einer bedeutsamen Relevanz ausgegangen. Da als Primärindikation für eine Lobektomie fast ausschließlich eine maligne Lungenerkrankung ausschlaggebend war, handelte es sich diesbezüglich um eine homogene Gruppe. Für eine LTX führten verschiedene Erkrankungen zu einer Indikationsstellung. Ein Teil der Patienten war an NSIP, allergischer Alveolitis, COPD oder sonstigen Lungenerkrankungen wie Sklerodermie, Silikose oder Lymphangiomeiomyomatose erkrankt. In fortgeschrittenem Krankheitsstadium resultieren diese Erkrankungen in einer Fibrose oder einem Emphysem der Lunge. Nur wenn eine Fibrose oder ein Emphysem als Hauptindikation in den Arztbriefen aufgeführt wurde, wurden diese als Primärindikation in Tabelle 5 zusätzlich zu der primären Erkrankung aufgeführt. Der Anteil der Raucher war bei den LTX-Patienten etwas geringer (61,5 %) als bei den Patienten nach Lobektomie (64,1 %). Außerdem war die Anzahl an Packyears je Patient, insofern diese dokumentiert wurden, durchschnittlich deutlich höher bei den Patienten nach Lobektomie (44,9 packyears) als bei Patienten nach LTX (18,7 packyears). Der höhere Anteil an Rauchern und der ausgeprägtere Nikotinkonsum erhöhen das Risiko eine Lungenkarzinomerkrankung mit erforderlicher operativer Intervention zu entwickeln [68]. In beiden Gruppen wies ein Teil der Patienten Vorerkrankungen auf. Bluthochdruck war in beiden Gruppen unter den verglichenen Vorerkrankungen am häufigsten ausgeprägt. Außerdem traten COPD in unterschiedlichen Stadien und KHK auf. Nur bei wenigen LTX-Patienten konnte eine manifeste PAH festgestellt werden. Bei den physiologischen PA wurde keine PAH diagnostiziert. Allerdings ist eine RHK-Untersuchung vor einer Lobektomie nicht standardmäßig durchzuführen und somit wurde bei keinem der Patienten der PAPm zur Diagnose einer PAH bestimmt.

Wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben, war ein stressfreies Herauspräparieren der Gefäße essenziell, um das Endothel der Gefäße nicht zu schädigen. Die Präparation der Gefäße war operateur- und assistenten-abhängig. Schlecht präparierte Gefäße, die zu viel Zug und Spannung ausgesetzt waren, konnten durch Endothelschädigung zu fehlerhaften Resultaten führen. Dieser Einflussfaktor wurde minimiert, indem keine randständigen Gefäßringe verwendet wurden. Durch Kommunikation mit dem Operationspersonal wurde auf die Notwendigkeit einer sauberen Präparation hingewiesen. Ebenso wurde bei der Versuchsdurchführung sorgfältig gearbeitet und die Gefäße wurden mit Vorsicht

behandelt. Außerdem erforderten die durchgeführten Versuche Sorgfalt und Genauigkeit beim Pipettieren der verschiedenen Reagenzien und der Herstellung von Verdünnungen. Fehler bei der Versuchsdurchführung kamen als mögliche Ursache für fehlerhafte Ergebnisse in Betracht. Bei der Auswertung wurde deshalb der MW von zwei Gefäßringen betrachtet, um Fehler durch potenziell Ergebnis-verfälschende Einflüsse zu lindern. Die Literatur weist auf Heterogenität und Variation der kontraktilen Kräfte zwischen distalen und proximalen Lungengefäßen hin. So haben glatte Muskelzellen von intralobulären PA höhere Ca^{2+} -Konzentrationen und damit auch höhere Membranpotentiale exprimiert als proximale PA [70]. Deshalb wurde nicht nur auf eine sorgfältige Präparation, sondern auch auf eine einheitliche Entnahme von segmentalen PA geachtet. Des Weiteren wurde ein physiologischer pH von 7,4 angestrebt, da variierende pH-Werte verantwortlich für ungleichartige vasokonstriktorische Reaktion durch NE sind [70].

An den PA wurde zunächst die Kontraktionshemmung nach ET-1-Gabe untersucht und anschließend die Vasodilatation nach NE-Gabe. Bevor die NE-Reihe begonnen wurde, achtete man insbesondere darauf, dass sich die Gefäße nach der höchsten ET-1-Dosis nicht mehr weiter kontrahierten und sich ein Spannungsplateau einstellte. Dies ermöglichte eine bessere Separation der Hemmwirkung an ETR von der Wirkung der Medikamente an den adrenergen Rezeptoren. Auch zwischen den unterschiedlichen Dosierungen wurde Wert auf das Erreichen eines Spannungsplateaus gelegt. So konnte ein Nachlassen der Kontraktion der richtigen Dosierung zugeschrieben werden und nicht der nächsthöheren Vasodilatantien-Dosierung.

Um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden und zu wahrheitsgemäßen Ergebnissen zu gelangen, war die ordnungsgemäße Durchführung und Sorgfalt in allen Bereichen wichtig. Wie in anderen experimentellen Arbeiten bestand jedoch auch bei dieser Arbeit die Gefahr, dass sich Fehler einschlichen und unbemerkt fortgeführt wurden. Um die Auswirkungen von potenziellen Fehlerquellen möglichst gering zu halten, empfahl sich eine möglichst große Anzahl an Versuchen mit Lungengefäßen verschiedener Patienten. Die Ergebnisse dieser Arbeit entstanden aus 5 - 7 Gefäßen pro Versuchsprotokoll. Zur Verifizierung und Festigung der Resultate käme die wiederholte Versuchsdurchführung mit weiteren PA in Betracht.

Die Übertragung der Ergebnisse unter Ex-vivo- und In-vitro-Konditionen auf In-vivo-Bedingungen ist kritisch zu betrachten. Gefäße, die unter den Versuchsbedingungen kein adäquates Kontraktionsverhalten aufwiesen, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Durch das Herausfallen von nicht kontrahierenden Gefäßen aus der Auswertung, kann eine Überschätzung der Effekte der Medikamente auftreten. Die Anzahl der nicht-kontraktionsfähigen Gefäßringe war bei pathologischen Gefäßen insgesamt höher als bei den physiologischen Gefäßen. Von den 39 pathologischen PA, die sich für die Organbadversuche eigneten, konnten nur 26 in der Auswertung berücksichtigt werden. Die PA der anderen 13 Patienten mussten aufgrund ihres inadäquaten Kontraktionsverhaltens unter Versuchsbedingungen von der Auswertung ausgeschlossen werden. Von den physiologischen Gefäßen konnten 39 PA ausgewertet und 8 Gefäße nicht berücksichtigt werden. Prozentual blieben dementsprechend mehr Versuche an pathologischen Gefäßen als an physiologischen Gefäßen unberücksichtigt (33 % gegenüber 17 %). Außerdem wurden keine Versuche in die Auswertung eingeschlossen, bei denen Pipettierfehler vorlagen, welche schon während der Versuchsdurchführung bemerkt und dokumentiert wurden. Die Anzahl an verfügbaren, zu untersuchenden pathologischen PA im gegebenen Zeitraum war abhängig von der Anzahl an LTX im Klinikum Großhadern. In Zukunft wäre eine größere Anzahl an Gefäßen notwendig, um die beobachtete Variabilität zwischen den einzelnen Patienten, vor allem in Bezug auf das Ansprechen auf Vardenafil, genauer darzustellen.

Abgesehen von unseren Studien waren bislang Ex-vivo und In-vitro-Untersuchungen an PA zur Wirksamkeit von Medikamenten bei PAH ausstehend. Die bereits zur Therapie verschriebenen Medikamente wurden bisher weitgehend in Tierversuchen oder in klinischen Studien getestet [2]. Im Folgenden demonstriert eine Auswahl an Studien das Ansprechen und die Wirkungsweise von PDE5-Hemmern und ERA in Bezug auf die PAH-Therapie. In klinischen Studien implizieren Anzeichen eines Versagens des rechten Ventrikels eine schlechtere Prognose [56]. Veränderungen in der WHO FC, dem CI, der SvO₂ und NT-proBNP sind von großer prognostischer Bedeutung und haben Auswirkung auf das Überleben der Patienten [9,10,29].

Eine Untersuchung der Vasoreagibilität und hämodynamischen Parametern durch orale Vardenafil-Applikation (n = 20) und nach vorheriger i.v. Adenosin-Gabe (n = 18) zeigte eine signifikante Senkung des PAPm und PVR durch Vardenafil [70]. Die

Beobachtung von hämodynamischen Parametern nach NO-Gabe und PDE5-Hemmer-Verabreichung im RHK zeigte bei mit Vardenafil behandelten Patienten eine signifikante pulmonale Vasorelaxation mit maximalen Effekten zwischen 40 und 45 min [71]. In einer randomisierten Doppelblindstudie wurde die Wirkung von Vardenafil anhand von 66 PAH-Patienten untersucht. (zwei Drittel der Patienten erhielten 5 mg/d Vardenafil über vier Wochen und anschließend zweimal 5 mg/d über acht Wochen; ein Drittel der Patienten erhielt eine Placebo-Gabe). Hierbei führte Vardenafil zu signifikanten Verbesserungen im 6MWT und CI. Ebenso wurden der PAPm und PVR gesenkt [57].

Bosentan-Therapie bei PAH führte gemäß Metaanalysen im Vergleich zu Placebo-Gabe zu signifikanten Verbesserungen im 6MWT [45,72]. Verbesserungen im 6MWT um durchschnittlich 11,2 m im Gegensatz zu einer Reduktion von 7,9 m nach Placebo-Gabe wurden in der EARLY-Studie demonstriert [25]. Ebenso zeigten die Patienten, die Bosentan anstelle von Placebo erhielten eine deutlich geringere Tendenz zu klinischer Verschlechterung [45,72,73]. Der PAPm konnte ebenfalls signifikant gesenkt werden [45]. Auch in weiteren Studien demonstrierte die Literatur Verbesserungen im 6MWT von 44 m ($p < 0,001$), Borg-Dyspnoe-Index, WHO FC und Zeit bis zur klinischen Verschlechterung nach Bosentan-Gabe (62,5 mg 2/d über vier Wochen und anschließend 125 mg 2/d oder 250 mg 2/d über mindestens zwölf Wochen) im Vergleich zu Placebo-Gabe [73].

Gemäß der SERAPHIN-Studie führte Macitentan im Vergleich zu Placebo zu einem verbesserten PVR, geringerem PAPm und niedrigeren NT-proBNP-Werten [49]. Das Risiko einer Krankenhauseinweisung nach mittlerer Macitentan-Applikation von 115 Wochen wurde je nach Dosierung um 18 - 32 % gesenkt. Das Risiko eines Krankenhausaufenthaltes aufgrund von PAH konnte um 42 - 51 % reduziert werden. Die Morbidität und Mortalität verglichen mit Placebo wurde bei Vormedikation gegen PAH um bis zu 38 % reduziert. Verglichen mit alleiniger Vormedikation führte die zusätzliche Gabe von Macitentan zu Verbesserungen der WHO FC, der kardiopulmonalen Hämodynamik und der gesundheitsbezogenen Lebensqualität [73]. Durch die Berücksichtigung der vorherigen Therapie und der anschließenden Macitentan-Verabreichung gab die SERAPHIN-Studie Hinweise auf die Effektivität einer Kombinationstherapie mit PDE-Hemmern [74]. Eine weitere Studie mit dem Endpunkt „Studienabbruch bei klinischer Verschlechterung“, „Notwendigkeit einer

Lungentransplantation“ oder „Versterben des Patienten“, signalisiert eine signifikant reduzierte Morbidität und Mortalität bei PAH-Patienten nach Macitentan-Gabe (3 mg/d oder 10 mg/d) im Vergleich zu Placebo [75,76].

Bisher existieren keine klinischen Studien, die die Wirkung von ACT-132577 zur Behandlung der PAH untersucht haben.

Die Studien geben Rückschlüsse auf das Ansprechen von PDE5-Hemmern und ERA zur Behandlung der PAH. Ähnliche Ergebnisse in unterschiedlichen Studien verdeutlichen die Wirksamkeit der untersuchten Medikamente. Die Organbadversuche an Ex-vivo- und In-vitro-PA erforschen die Wirksamkeit der PAH-Therapie bezüglich tiefgreifender Aspekte. Dosierungen und Wirkstoffkombinationen können genauer untersucht werden und zu einem besseren Therapiekonzept für PAH-Patienten beitragen. Weitere Ex-vivo- und In-vitro-Organbadversuche sind notwendig, um die Medikamentenwirkung in unterschiedlichen Dosierungen noch genauer zu untersuchen. In einer weiteren Dissertation einer Kollegin unseres Forschungsteams wurden einige der auch im Organbad untersuchten PA und PV derselben Lungenlappen für histologische Untersuchungen verwendet. Dabei wurde ein Augenmerk auf die Rezeptorverteilung und histologischen Unterschiede zwischen lungengesunden und -pathologischen Gefäßen gelegt. Die genaue Betrachtung der Rezeptordichte und pathologischen Auffälligkeiten sind interessante Ansatzpunkte für weitere Rückschlüsse auf die spezifische Medikamentenwirkung. Die Kombinationstherapie von Medikamenten, die an verschiedenen Rezeptoren angreifen, sollte schwerpunktmäßig bei zukünftigen Forschungsprojekten untersucht werden. Durch die Verwendung niedriger dosierter Medikamente in einer Kombinationstherapie lassen sich Nebenwirkungen minimieren und trotzdem die gewünschten Behandlungsergebnisse erzielen. Geringere Dosierungen verbessern die Toleranz der Medikamente und deren Effektivität. Neue Wirkstoffklassen sollten ebenfalls in Mono- und Kombinationstherapie im Organbad getestet werden und eignen sich potenziell ebenfalls als optionale PAH-Therapie. So wird als neu zugelassenes Vasodilatans die Wirkung von Riociguat in kommenden Versuchen in unserem Labor getestet und dient möglicherweise zur Erweiterung des Therapiespektrums [77,78,79].

8.2 Limitationen der Dissertation

Nicht bei allen Patienten, die eine LTX erhielten und deren Gefäße für die Versuche verwendet wurden, war eine schwerwiegende PAH dokumentiert. Bei einigen Patienten lag der PAPm nur in erhöhtem Bereich (zwischen 20 mmHg - 24 mmHg), womit definitionsgemäß noch keine PAH vorlag [2]. Andere Patienten wurden aufgrund von anderen schweren Lungenerkrankungen transplantiert und nicht primär aufgrund einer PAH. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass sich die Gefäßeigenschaften, morphologische Struktur und Rezeptorverteilung zwischen pathologischen und lungengesunden Gefäßen unterscheiden. Obwohl nicht bei allen Patienten die Kriterien für eine PAH zutrafen, wurde damit trotzdem ein akkurates Modell pathologischer Gefäße in den Versuchen wiedergespiegelt. Infolgedessen wird erwartet, dass sich die Resultate dieser Studie auf die Medikamentenwirkung bei Endstadium-Lungenerkrankungen und auch bei PAH projizieren lassen.

9 Zusammenfassung

Die PAH gilt als lebensbedrohliche Erkrankung und ist definiert durch den Anstieg des PAPm auf ≥ 25 mmHG in Ruhe. Die obere Normgrenze physiologischer Werte liegt bei 20 mmHG [1,3]. Als pathogenetische Trias sind eine Vasokonstriktion, arterielle Thromben und ein Umbau pulmonaler Gefäße maßgeblich [8]. Resultierend ist eine Verdickung der muskulären Arterien, Intimaproliferation, -fibrosierung und Mediahypertrophie. In späteren Stadien treten plexiforme Läsionen der Arterien auf [13]. Ein frühes Erkennen der PAH ist von prognostischer Relevanz, da ein frühzeitiger, gezielter Therapiebeginn zu verminderter Rechtsherzbelastung führen kann [24,25]. Therapeutisch wurden bisher oft PDE5-Inhibitoren und ERA in Monotherapie angewandt [3]. Bisher wurde die Wirkung dieser beiden Medikamentengruppen prospektiv verfolgt und beispielsweise eine Verbesserung der Symptomatik anhand des 6MWT dargelegt [2].

Ex-vivo- und In-vitro-Studien zu den beiden Medikamentenklassen sind jedoch noch ausstehend. So strebte es diese Arbeit an, die Kombinationstherapie von PDE5-Hemmern und ERA gegenüber einer Monotherapie tiefgreifender zu vergleichen. Dabei wurde Vardenafil als PDE5-Hemmer gewählt und Kombinationen mit den ERA Bosentan, Macitentan und dem Macitentan-Metaboliten ACT-132577

betrachtet. Die Medikamentenwirkung an humanen PA wurde in einem etablierten Organbadmodell untersucht und insbesondere die Kombination von Wirkstoffklassen analysiert. Als Vergleich dienten sowohl klinisch unauffällige Lungengefäße von Patienten nach einer Lobektomie in Regensburg bzw. Ulm als auch pathologische Lungengefäße von LTX-Patienten aus Großhadern, München. Insgesamt wurden 39 physiologische und 26 pathologische Lungengefäße berücksichtigt. Zu diesem Zweck wurde die Relaxationsfähigkeit von PA durch Vasodilantien nach vorheriger Vasokonstriktoren-Gabe untersucht. Bei annähernd physiologischen Begebenheiten wurden Lungengefäße hinsichtlich Kraftunterschiede und Vasodilationsvermögen bei entsprechender Medikamentenapplikation untersucht. Nach etabliertem Schema wurden ET-1- und anschließend NE-Konzentrationsreihen in die Organbäder appliziert. Die hierdurch induzierte Kontraktion der Gefäßringe wurde als Kraftverlauf aufgezeichnet. Dabei wurde beobachtet, inwiefern die zu untersuchenden, vorher hinzugegebenen Vasodilantien zu einer Hemmung dieser Kontraktion führen konnten. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde initial jeweils eine maximal erreichbare Kontraktion durch KCl ermittelt und diese in Relation zu den im Versuchsverlauf ermittelten Kraftwerten gesetzt.

Es konnte sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Gefäßen ein signifikanter Vorteil im Kontraktionsverhalten aller ERA gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Bei den physiologischen Gefäßen war Vardenafil gegenüber der Kontrolle nur in der Konzentration $1E-5$ M signifikant vorteilhaft. Teilweise konnte bei pathologischen Gefäßen bei einer Vardenafil-Konzentration von $1E-6$ M ebenfalls ein signifikanter Vorteil gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

Außerdem zeigte die Kombination eines ERA mit Vardenafil bei physiologischen und bei pathologischen PA eine signifikant bessere Vasodilatation gegenüber der Kontrolle. Ein signifikanter Vorteil der Kombinationsgabe im Vergleich zu alleiniger ERA-Gabe lag bei pathologischen Gefäßen nur bei dem Versuch Vardenafil $1E-5$ M und Bosentan $1E-7$ M vor. Bei den physiologischen Gefäßen zeigte sich der signifikante Vorteil nur unter Vardenafil $1E-6$ M und Macitentan $1E-8$ M-Einfluss. Die Kombination war in allen Versuchsreihen signifikant besser als alleinige

Vardenafil-Gabe, mit Ausnahme der pathologischen PA bei den Versuchen mit 1E-8 M Macitentan und 1E-6 M Vardenafil sowie Bosentan 1E-7 M und Vardenafil 1E-5 M.

Die physiologischen PA zeigten signifikante Unterschiede bei alleiniger Macitentan 1E-8 M- und 1E-7 M- bzw. Bosentan 1E-7 M-Gabe im Vergleich zu alleiniger Gabe von Vardenafil 1E-6 M. Unterschiede zwischen alleiniger Bosentan 1E-7 M- und Vardenafil 1E-5 M-Gabe waren bei physiologischen Gefäßen nicht signifikant. Bei pathologischen Gefäßen traten bei den Macitentan Konzentrationen 1E-8 M und 3E-8 M und bei Bosentan 1E-7 M signifikante Unterschiede zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe auf. Außerdem wurden bei den pathologischen Gefäßen signifikante Unterschiede zwischen alleiniger Bosentan 1E-7 M und Vardenafil 1E-5 M-Gabe festgestellt. Bei ACT-132577 1E-8 M traten keine signifikanten Unterschiede zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe auf. Die Unterschiede des ERA zu alleiniger Vardenafil 1E-6 M-Gabe waren nur bei einer ACT-132577-Konzentration von 1E-7 M signifikant.

Positive Effekte der untersuchten Vasodilantien wurden ebenfalls in klinischen Studien detektiert. Dementsprechend wird auch in der Literatur durch Verbesserungen bezüglich des 6MWT, PVR, WHO FC und durch prolongierte Zeit bis zu klinischer Verschlechterung bei ERA- oder Vardenafil-Gabe auf die Wirksamkeit dieser Vasodilatoren hinsichtlich einer PAH-Therapie hingewiesen [2,10,24,43,45,49,57,74].

Die Organbadversuche und Studien zeigen, dass allgemein von einer positiven Wirkung der untersuchten Medikamente auszugehen ist. Ein bestmöglicher Therapieeffekt bei möglichst geringer Nebenwirkungsrate ist wünschenswert, um ein optimales Therapiekonzept für PAH-Patienten zu gewährleisten. Unter Ex-vivo- und In-vitro-Bedingungen wurde vor allem die Wirksamkeit der ERA dargestellt und zumindest in den bisher gewählten Dosierungen und Kombinationen konnte kein eindeutiger Vorteil einer Kombinationstherapie bewiesen werden. Folglich sind weitere Organbadversuche mit weiteren Medikamentenkonzentrationen und in alternativen Kombinationen notwendig, um eindeutige Therapievorteile in einem experimentellen Versuchsaufbau zu beweisen.

10 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1:	Verdickung der Intima (Pfeil) und Media (Pfeilspitze) einer PA (HE Färbung)	12
Abbildung 2:	Thrombus in einer PA (Pfeil) (HE-Färbung)	12
Abbildung 3:	Risikostratifizierung bei PAH (niedriges, intermediäres und hohes Risiko) [3]	14
Abbildung 4:	Organbad	34
Abbildung 5:	Skizze des Organbades	34
Abbildung 6:	Messerblock, der zum Schneiden der Gefäßringe verwendet wurde	35
Abbildung 7:	Geschnittene Gefäßringe, gelagert in einer mit DMEN gefüllten Petrischale	35
Abbildung 8:	Skizze des Kraftverlaufes der Gefäßringe während des Versuches	35
Abbildung 9:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	49
Abbildung 10:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-5 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	50
Abbildung 11:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen.....	52
Abbildung 12:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-5 M, Bosentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen.....	53
Abbildung 13:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	55
Abbildung 14:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	56
Abbildung 15:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen.....	58
Abbildung 16:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, Macitentan 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl bei pathologischen Gefäßen.....	59
Abbildung 17:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, ACT-132577 1E-8 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	61
Abbildung 18:	Grafik der Kontraktion der Gefäßringe durch Vardenafil 1E-6 M, ACT132577 1E-7 M und in Kombination in Relation zur Kontraktion durch KCl	62

Tabelle 1: Verwendete Materialien	24
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 3: Verwendete Software.....	27
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 5: Patientenbezogene Daten	39
Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse.....	42

11 Referenzen

Die Abbildungen 1 und 2 wurden freundlicher Weise von Jeremy Benstetter aus unserem Forschungsteam zur Verfügung gestellt.

1. Lajoie AC, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: recent accomplishments and future challenges. *Pulm Circ.* 2017 Apr-Jun;7(2):312-325. doi: 10.1177/2045893217710639. Epub 2017 May 30. PMID: 28597774; PMCID: PMC5467950.
2. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ.* 2018 Mar 14;360:j5492. doi: 10.1136/bmj.j5492. PMID: 29540357; PMCID: PMC6889979.
3. Rosenkranz S, Baldus S, Grünig E, Hoepfer M, Klose H, Opitz C. DKG [2016] ESC Pocketguidelines: Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie, Version 2015;1–47.
4. Schlueter M, Beaudet A, Davies E, Gurung B, Karabis A. Evidence synthesis in pulmonary arterial hypertension: a systematic review and critical appraisal. *BMC Pulm Med.* 2020 Jul 28;20(1):202. doi: 10.1186/s12890-020-01241-4 . PMID: 32723397 ; PMCID: PMC7388228.
5. Hoenicka M, Golovchenko S, Englert L, Spaeth M, Shoshiashvili L, Großer C, Hofmann HS, Ried M. Combination Therapy of Pulmonary Arterial Hypertension with Vardenafil and Macitentan Assessed in a Human Ex Vivo Model. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019 Jun;33(3):287-295. doi: 10.1007/s10557-019-06868-y. PMID: 30826900.
6. Ried M, Neu R, Lehle K, Großer C, Szöke T, Lang G, Hofmann HS, Hoenicka M. Superior vasodilation of human pulmonary vessels by vardenafil compared with tadalafil and sildenafil: additive effects of bosentan. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017 Aug 1;25(2):254-259. doi: 10.1093/icvts/ivx108. PMID: 28486684.

7. Ried M, Potzger T, Neu R, Sziklavari Z, Szöke T, Liebold A, Hofmann HS, Hoenicka M. Combination of sildenafil and bosentan for pulmonary hypertension in a human ex vivo model. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2014 Feb;28(1):45-51. doi: 10.1007/s10557-013-6499-0. PMID: 24193244.
8. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H. *Pharmakologie und Toxikologie.* 1st ed. Stuttgart: Thieme; 2011. 841 p. [Duale Reihe]. ger. doi:10.1055/b-002-23574
9. Nickel N, Golpon H, Greer M, Knudsen L, Olsson K, Westerkamp V, Welte T, Hoepfer MM. The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2012 Mar;39(3):589-96. doi: 10.1183/09031936.00092311. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21885392.
10. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoepfer M. 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 Oct;46(4):903-75. doi: 10.1183/13993003.01032-2015. Epub 2015 Aug 29. Erratum in: *Eur Respir J.* 2015 Dec;46(6):1855-6. PMID: 26318161.
11. Khirfan G, Naal T, Abuhalimeh B, Newman J, Heresi GA, Dweik RA, Tonelli AR. Hypoxemia in patients with idiopathic or heritable pulmonary arterial hypertension. *PLoS One.* 2018 Jan 29;13(1):e0191869. doi: 10.1371/journal.pone.0191869. PMID: 29377954; PMCID: PMC5788375.
12. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2004 Oct 14;351(16):1655-65. doi: 10.1056/NEJMra035488. PMID: 15483284.
13. Rubin R, Strayer DS, editors. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic foundations of medicine.* 5th ed. Philadelphia, Pa.: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 1341 p. eng. ISBN-13 : 978-0781795166.
14. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tudor RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Aug 1;186(3):261-72. doi: 10.1164/rccm.201201-0164OC. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22679007; PMCID: PMC3886716.
15. Sommer N, Richter MJ, Tello K, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA, Gall H. Update pulmonalerterielle Hypertonie : Definitionen, Diagnose, Therapie [Update pulmonary arterial hypertension : Definitions, diagnosis, therapy]. *Internist (Berl).* 2017 Sep;58(9):937-957. German. doi: 10.1007/s00108-017-0301-5. PMID: 28819824.
16. Groth A, Vrugt B, Brock M, Speich R, Ulrich S, Huber LC. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respir Res.* 2014 Apr 16;15(1):47. doi: 10.1186/1465-9921-15-47. PMID: 24739042; PMCID: PMC4002553.

17. Tuder RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell Tissue Res.* 2017 Mar;367(3):643-649. doi: 10.1007/s00441-016-2539-y. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28025704; PMCID: PMC5408737.
18. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tuder RM. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol.* 1997 Apr;28(4):434-42. doi: 10.1016/s0046-8177(97)90032-0. PMID: 9104943.
19. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 May;151(5):1628-31. doi: 10.1164/ajrccm.151.5.7735624. PMID: 7735624.
20. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Alzheimer C, editors. *Physiologie.* 6th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2013. 848 p. ger. ISBN: 978-3-437-41357-5,
21. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int.* 2007 Feb;71(4):290-7. doi: 10.1038/sj.ki.5002058. Epub 2007 Jan 3. PMID: 17200681.
22. Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A, Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):62S-67S. doi: 10.1016/j.jacc.2004.02.042. PMID: 15194180.
23. Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, Sitbon O, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Absence of influence of gender and BMPR2 mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2010 Jun 10;11(1):73. doi: 10.1186/1465-9921-11-73. PMID: 20534176; PMCID: PMC2898773.
24. Galiè N, Rubin Lj, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, Chiossi E, Kusic-Pajic A, Simonneau G. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2008 Jun 21;371(9630):2093-100. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60919-8. PMID: 18572079.
25. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D42-50. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.032. PMID: 24355641.
26. Brown LM, Chen H, Halpern S, Taichman D, McGoon MD, Farber HW, Frost AE, Liou TG, Turner M, Feldkircher K, Miller DP, Elliott CG. Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest.* 2011 Jul;140(1):19-26. doi: 10.1378/chest.10-1166. Epub 2011 Mar 10. PMID: 21393391; PMCID: PMC3198486.

27. Galiè N, Channick RN, Frantz RP, Grünig E, Jing ZC, Moiseeva O, Preston IR, Pulido T, Safdar Z, Tamura Y, McLaughlin VV. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2019 Jan 24;53(1):1801889. doi: 10.1183/13993003.01889-2018 . PMID: 30545971 ; PMID: PMC6351343.
28. Savarese G, Paolillo S, Costanzo P, D'Amore C, Cecere M, Losco T, Musella F, Gargiulo P, Marciano C, Perrone-Filardi P. Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Sep 25;60(13):1192-201. doi: 10.1016/j.jacc.2012.01.083. PMID: 22995024.
29. Wronski SL, Mordin M, Kelley K, Anguiano RH, Classi P, Shen E, Manaker S. The Role of Noninvasive Endpoints in Predicting Long-Term Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung*. 2020 Feb;198(1):65-86. doi: 10.1007/s00408-019-00289-2 . Epub 2019 Nov 13. PMID: 31722043 ; PMID: PMC7012965.
30. Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1):111-5. doi: 10.1513/pats.200510-112JH. PMID: 16493158.
31. CHMP. Tracleer, INN- Bosentan [Internet]. 2005; [38 p.]. [cited 2018 Aug 19] Available from: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000401/WC500041457.pdf
32. Karow T, Pharmakologie und Toxikologie. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 25th ed. Pulheim: Karow; 2016. 1334 p.
33. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):3105-11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486. Epub 2005 Jun 6. PMID: 15939821.
34. Lan NSH, Massam BD, Kulkarni SS, Lang CC. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*. 2018 May 16;6(2):38. doi: 10.3390/diseases6020038 . PMID: 29772649 ; PMID: PMC6023499.
35. Lian TY, Jiang X, Jing ZC. Riociguat: a soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Apr 13;11:1195-1207. doi: 10.2147/DDDT.S117277. PMID: 28458514; PMID: PMC5402909.
36. Behrends JC. Physiologie. 3rd ed. Stuttgart: Thieme; [c] 2017. 831 p. [Duale Reihe]. ger.
37. Hämodynamische Prinzipien [Volumen, Druck, Strömung, Widerstand] [Internet]. [cited 2018 Aug 19]. Available from: <http://physiologie.cc/VII.1.htm#VasoC>
38. Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Baumann R, Brenner B, Gay R, Rothenburger A, editors. Physiologie. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2010. 944 p. ger.
39. Pfitzer G. (2014) Die glatte Muskulatur. In: Heinrich P., Müller M., Graeve L. (eds) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg. 807-817 p. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_64

40. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):951-8. doi: 10.1007/s00424-009-0763-y. Epub 2009 Dec 5. PMID: 19967386; PMCID: PMC3693979..
41. Forth W., Henschler D., Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 11th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2013. 1224 p.
42. Pan Y, Hu C, Chen PH, Gu YH, Qiao QY, Pan LH, Zhou DC, Gu HF, Fu SK, Jin HM. Association of oral endothelin receptor antagonists with risks of cardiovascular events and mortality: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017 Mar;73(3):267-278. doi: 10.1007/s00228-016-2171-5. Epub 2016 Dec 13. PMID: 27957707.
43. Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary artery hypertension. *Life Sci.* 2012 Oct 15;91(13-14):517-21. doi: 10.1016/j.lfs.2012.07.033. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22884806.
44. Wei A., Gu Z, Li J., Liu X., Wu X., Han Y., Pu J. 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]:1–16. doi:10.1161/JAHA.116.003896
45. Lee YH, Song GG. Meta-analysis of randomized controlled trials of bosentan for treatment of pulmonary arterial hypertension. *Korean J Intern Med.* 2013 Nov;28(6):701-7. doi: 10.3904/kjim.2013.28.6.701. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24307846; PMCID: PMC3846996.
46. Iglarz M, Binkert C, Morrison K, Fischli W, Gatfield J, Treiber A, Weller T, Bolli MH, Boss C, Buchmann S, Capeleto B, Hess P, Qiu C, Clozel M. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Dec;327(3):736-45. doi: 10.1124/jpet.108.142976. Epub 2008 Sep 9. PMID: 18780830.
47. Gatfield J, Mueller Grandjean C, Sasse T, Clozel M, Nayler O. Slow receptor dissociation kinetics differentiate macitentan from other endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One.* 2012;7(10):e47662. doi: 10.1371/journal.pone.0047662. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23077657; PMCID: PMC3471877.
48. Monaco TJ, Davila CD. Safety, efficacy, and clinical utility of macitentan in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther.* 2016 May 18;10:1675-82. doi: 10.2147/DDDT.S88612. PMID: 27274200; PMCID: PMC4876803.
49. Galiè N, Jansa P, Pulido T, Channick RN, Delcroix M, Ghofrani HA, Le Brun FO, Mehta S, Perchenet L, Rubin LJ, Sastry BKS, Simonneau G, Sitbon O, Souza R, Torbicki A. SERAPHIN haemodynamic substudy: the effect of the dual endothelin receptor antagonist macitentan on haemodynamic parameters and NT-proBNP levels and their association with disease progression in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2017 Apr 14;38(15):1147-1155. doi: 10.1093/eurheartj/ehx025. PMID: 28329315; PMCID: PMC5400052.
50. Idorsia gibt Kooperation mit Janssen Biotech bei Aprocitentan [ACT-132577] bekannt [Internet]. [cited 2018 Aug 19]. Available from: <https://www.idorsia.com/media/resources-in-german-details?newsId=2153596>

51. 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 Nov;45(6):859-63. doi: 10.1016/j.neuint.2004.03.016. PMID: 15312980.
52. Yamamura A, Fujitomi E, Ohara N, Tsukamoto K, Sato M, Yamamura H. Tadalafil induces antiproliferation, apoptosis, and phosphodiesterase type 5 downregulation in idiopathic pulmonary arterial hypertension in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2017 Sep 5;810:44-50. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.06.010. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28603047.
53. CHMP. Vivanza, INN-Vardenafil [Internet]. [cited 2018 Aug 19]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000488/WC500052774.pdf
54. Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol.* 2005 Sep;45(9):987-1003. doi: 10.1177/0091270005276847. PMID: 16100293.
55. Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 2009 Oct;30(20):2493-537. doi: 10.1093/eurheartj/ehp297. Epub 2009 Aug 27. Erratum in: *Eur Heart J.* 2011 Apr;32(8):926. PMID: 19713419.54.
56. Barnes H, Brown Z, Burns A, Williams T. Phosphodiesterase 5 inhibitors for pulmonary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1CD012621. doi:10.1002/14651858.CD012621.pub2 Cited in: PubMed; PMID 30701543.
57. Jing ZC, Yu ZX, Shen JY, Wu BX, Xu KF, Zhu XY, Pan L, Zhang ZL, Liu XQ, Zhang YS, Jiang X, Galiè N; Efficacy and Safety of Vardenafil in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension (EVALUATION) Study Group. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jun 15;183(12):1723-9. doi: 10.1164/rccm.201101-0093OC. Epub 2011 Mar 11. PMID: 21471085.
58. Bai Y, Sun L, Hu S, Wei Y. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Cardiology.* 2011;120(3):157-65. doi: 10.1159/000334431 . Epub 2011 Dec 29. PMID: 22212696 .
59. Griffin M, Trow TK. The evolving landscape of combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Ther Adv Respir Dis.* 2017 Feb;11(2):91-95. doi: 10.1177/1753465816677485 . Epub 2016 Nov 21. PMID: 27872176 ; PMCID: PMC5933637.

60. Kirtania L, Maiti R, Srinivasan A, Mishra A. Effect of Combination Therapy of Endothelin Receptor Antagonist and Phosphodiesterase-5 Inhibitor on Clinical Outcome and Pulmonary Haemodynamics in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Meta-Analysis. *Clin Drug Investig.* 2019 Nov;39(11):1031-1044. doi: 10.1007/s40261-019-00841-1 . PMID: 31420854 .
61. Lajoie AC, Lauzière G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2016 Apr;4(4):291-305. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00027-8 . Epub 2016 Feb 27. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2016 Jun;4(6):e34. PMID: 26935844 .
62. Guha M. First-in-class guanylate cyclase stimulator approved for PAH. *Nat Biotechnol.* 2013 Dec;31(12):1064. doi: 10.1038/nbt1213-1064b. PMID: 24316627.
63. Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *J Vasc Res.* 2007;44(5):375-81. doi: 10.1159/000102534. Epub 2007 May 8. PMID: 17495482.
64. Sandqvist AM, Henrohn D, Schneede J, Hedeland M, Egeröd HC, Bondesson UG, Wikström BG. High inter-individual variability of vardenafil pharmacokinetics in patients with pulmonary hypertension. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013 Feb;69(2):197-207. doi: 10.1007/s00228-012-1323-5. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22732766.
65. Paul GA, Gibbs JS, Boobis AR, Abbas A, Wilkins MR. Bosentan decreases the plasma concentration of sildenafil when coprescribed in pulmonary hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Jul;60(1):107-12. doi: 10.1111/j.1365-2125.2005.02383.x. PMID: 15963102; PMCID: PMC1884910.
66. Weiss J, Theile D, Spalwicz A, Burhenne J, Riedel KD, Haefeli WE. Influence of sildenafil and tadalafil on the enzyme- and transporter-inducing effects of bosentan and ambrisentan in LS180 cells. *Biochem Pharmacol.* 2013 Jan 15;85(2):265-73. doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.020. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23219525.
67. Burgess G, Hoogkamer H, Collings L, Dingemanse J. Mutual pharmacokinetic interactions between steady-state bosentan and sildenafil. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Jan;64(1):43-50. doi: 10.1007/s00228-007-0408-z. Epub 2007 Nov 27. PMID: 18040672.
68. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, [Internet]. Lang-version 1.0,2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL, [cited 06.03.2021]. Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>
69. Gottlieb J, Smits J, Schramm R, Langer F, Buhl R, Witt C, Strueber M, Reichenspurner H. Lung Transplantation in Germany Since the Introduction of the Lung Allocation Score. *Dtsch Arztebl Int.* 2017 Mar 17;114(11):179-185. doi: 10.3238/arztebl.2017.0179. PMID: 28382903; PMCID: PMC5387849.

70. Sandqvist A, Henrohn D, Egeröd H, Hedeland M, Wernroth L, Bondesson U, Schneede J, Wikström G. Acute vasodilator response to vardenafil and clinical outcome in patients with pulmonary hypertension. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015 Oct;71(10):1165-73. doi: 10.1007/s00228-015-1914-z. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26242227.
71. Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadaş B, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Oct 6;44(7):1488-96. doi: 10.1016/j.jacc.2004.06.060. PMID: 15464333.
72. Duo-Ji MM, Long ZW. Comparative efficacy and acceptability of endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension: A network meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2017 May 1;234:90-98. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.092. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28233631.
73. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2002 Mar 21;346(12):896-903. doi: 10.1056/NEJMoa012212. Erratum in: *N Engl J Med* 2002 Apr 18;346(16):1258. PMID: 11907289.
74. Channick RN, Delcroix M, Ghofrani HA, Hunsche E, Jansa P, Le Brun FO, Mehta S, Pulido T, Rubin LJ, Sastry BKS, Simonneau G, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Galiè N. Effect of macitentan on hospitalizations: results from the SERAPHIN trial. *JACC Heart Fail*. 2015 Jan;3(1):1-8. doi: 10.1016/j.jchf.2014.07.013. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25457902.
75. Jansa P, Pulido T. Macitentan in Pulmonary Arterial Hypertension: A Focus on Combination Therapy in the SERAPHIN Trial. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2018 Feb;18(1):1-11. doi: 10.1007/s40256-017-0260-1. PMID: 29280064; PMCID: PMC5772137.
76. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G; SERAPHIN Investigators. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29;369(9):809-18. doi: 10.1056/NEJMoa1213917. PMID: 23984728.
77. Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing ZC, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ; PATENT-1 Study Group. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013 Jul 25;369(4):330-40. doi: 10.1056/NEJMoa1209655 . PMID: 23883378 .

78. Hoeper MM, Al-Hiti H, Benza RL, Chang SA, Corris PA, Gibbs JSR, Grünig E, Jansa P, Klinger JR, Langleben D, McLaughlin VV, Meyer GMB, Ota-Arakaki J, Peacock AJ, Pulido T, Rosenkranz S, Vizza CD, Vonk-Noordegraaf A, White RJ, Chang M, Kleinjung F, Meier C, Paraschin K, Ghofrani HA, Simonneau G; REPLACE investigators. Switching to riociguat versus maintenance therapy with phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension (REPLACE): a multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2021 Jun;9(6):573-584. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30532-4. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33773120.
79. Hoeper MM, Simonneau G, Corris PA, Ghofrani HA, Klinger JR, Langleben D, Naeije R, Jansa P, Rosenkranz S, Scelsi L, Grünig E, Vizza CD, Chang M, Colorado P, Meier C, Busse D, Benza RL. RESPITE: switching to riociguat in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to phosphodiesterase-5 inhibitors. *Eur Respir J.* 2017 Sep 9;50(3):1602425. doi: 10.1183/13993003.02425-2016 . PMID: 28889107 ; PMCID: PMC5898946.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken (gilt ebenso für Werke aus elektronischen Datenbanken oder aus dem Internet) wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quelle und Einhaltung der Regeln wissenschaftlichen Zitierens kenntlich gemacht. Diese Versicherung umfasst auch in der Arbeit verwendete bildliche Darstellungen, Tabellen, Kartenskizzen und gelieferte Zeichnungen. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mir ist bewusst, dass Täuschungen nach der für mich gültigen Studien- und Prüfungsordnung geahndet werden.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ried und Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Mein besonderer Dank gilt insbesondere auch PD. Dr. rer. nat. Markus Hoenicka, der für die Statistik und die Planung der Versuche verantwortlich war und eine große Hilfe bei der Korrektur der Arbeit leistete.

Ich möchte insbesondere auch Jeremy Benstetter für die Bereitstellung der Abbildungen 1 und 2 aus dem Abschnitt Pathogenese danken. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Svitlana Golovchenko für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor bedanken. Des Weiteren möchte ich dem Lungentransplantation-Teams aus dem Klinikum Großhadern, München meinen Dank aussprechen und die gute Zusammenarbeit loben. Insbesondere gilt dieser Dank Corinna Mendel, die wesentlich für die hervorragende Koordination zwischen dem Klinikum und unserem Forschungsteam verantwortlich war. Ohne die Bereitstellung von Lungengefäßen nach Transplantation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt gilt deshalb mein Dank auch den Operateuren und dem Operationspersonal aus dem Klinikum Barmherzige Brüder, Regensburg und dem Universitätsklinikum Regensburg für die Entnahme und Übergabe der Lungenarterien.

Außerdem möchte ich Mirjam Späth meinen Dank äußern, die mich beim Abholen der Lungengefäße aus Großhadern unterstützt hat. Vielen Dank auch an Katrin Bielenberg, die bei Fragen zum Versuchsablauf eine große Hilfe war.

Curriculum Vitae

Leonie Englert

Anschrift	Schwandorfer Straße 7 93059 Regensburg
Kontakt	leonie.englert@gmail.com +49 157 50784100
Geburtsdatum	28.03.1995 in München
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	Deutsch



Klinische Ausbildung

12/2020-04/2021	Drittes PJ-Tertial, Innere Medizin Universitätsklinikum Regensburg
09/2020-12/2020	Zweites PJ-Tertial, Chirurgie Kantonspital Luzern, Spital
05/2020 - 09/2020	Erstes PJ-Tertial, Urologie Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg
03/2019	Famulatur, Allgemeinmedizin Dr. Scheuber-Maurer, Garmisch (30 Tage)
10/2018	Famulatur, Allgemein- und Viszeral-Chirurgie Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg (15 Tage)
03/2018	Famulatur, Allgemein- und Viszeral-Chirurgie Barmherzige Brüder Krankenhaus Regensburg (15 Tage)
05/2017 - 05/2018	Studentische Hilfskraft, Notaufnahme Universitätsklinikum Regensburg
08/2017 - 09/2017	Famulatur, Innere Medizin Green Acres Hospital Port Elizabeth, Südafrika (30 Tage)
03/2017 - 04/2017	Famulatur, Notaufnahme Universitätsklinikum Regensburg (30 Tage)
09/2013 - 11/2013	Pflegepraktikum Isar Klinikum München (3 Monate)

Studium

seit 10/2014	Studium der Humanmedizin Universität Regensburg - Drittes Staatsexamen 05/2021 - Zweites Staatsexamen 10/2019 - Erstes Staatsexamen 08/2016
06/2013	Allgemeine Hochschulreife, Theodolinden-Gymnasium, München

Promotion

01/2021	Co-Autorenschaft wissenschaftliches Paper <i>„Organ Bath Experiments on Human Pulmonary Vessels: Assessment of Drug Efficacy for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension“</i> veröffentlicht in der Fachzeitschrift „Pneumologie“
12/2020	Erstautorenschaft wissenschaftliches Paper <i>“Evaluation of the combination of endothelin receptor antagonists (ERA) and phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) in pathologic human pulmonary arteries in an ex-vivo organ bath model.”</i> Veröffentlicht in der Fachzeitschrift „Pulmonary Pharmacologic and therapeutics“
09/2019	Erster Platz der Posterpreissitzung und Teilnahme am DGT-Kongress DGT-Kongress (Deutsche Gesellschaft für Thoraxchirurgie), Salzburg
06/2019	Co-Autorenschaft wissenschaftliches Paper <i>“Combination Therapy of Pulmonary Arterial Hypertension with Vardenafil and Macitentan Assessed in a Human Ex Vivo Model”</i> veröffentlicht im Cardiovascular Drugs and Therapy Journal
eingereicht 08/2021	Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. <i>„Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von Phosphodiesterase-Hemmern und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten an humanen Pulmonalgefäßen in einem Ex-vivo-Organbadmodell“</i> Klinik für Herz-Thorax Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg Doktorvater: Prof. Dr. Hofmann, Betreuer: Prof. Dr. Ried

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	verhandlungssicher
Französisch	gute Kenntnisse in Wort und Schrift

Auslandsaufenthalte

1/2020-03/2022	Servicekraft auf der Amberger-Hütte in Gries im Sellrain, Österreich
12/2013-06/2014	Au-pair in Adelaide, Australien
09/2009-11/2009	Schüleraustausch in Nancy, Frankreich
01/2003-01/2006	Aufenthalt und Schulbildung in San Jose, Kalifornien, USA

Regensburg, 04.08.2021

Leonie Englert