

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

Untersuchung vasomodulierender Faktoren an humanen Pulmonalgefäßen mittels
konventioneller histologischer und immunhistochemischer Methoden

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mirjam Spaeth

2023

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

Untersuchung vasomodulierender Faktoren an humanen Pulmonalgefäßen mittels
konventioneller histologischer und immunhistochemischer Methoden

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mirjam Spaeth

2023

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Christian Schulz

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	7
2. Grundlagen des Themengebiets	8
2.1. Anatomische und physiologische Grundlagen	8
2.1.1. Physiologie des Lungenkreislaufs	8
2.1.2. Wandaufbau der Lungengefäße	8
2.2. Krankheitsbild der pulmonal arteriellen Hypertonie.....	10
2.2.1. Pathophysiologie der PAH	11
2.3. Gefäßveränderungen in den Pulmonalgefäßen durch PAH	12
2.4. Therapeutische Maßnahmen	14
2.4.1. Endothelin-1-Rezeptorantagonisten	16
2.4.2. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren.....	17
3. Arbeitshypothese	17
4. Material und Methoden	18
4.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	18
4.2. Aufarbeitung des Materials für die Histologie	19
4.3. Protokolle der histologischen Färbungen	20
4.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
4.3.2. Immunhistologische Färbungen	20
5. Auswertung der histologischen Untersuchungen	22
5.1. Deskriptive Histologie und Pathologie	22
5.2. Verteilung der Endothelinrezeptoren und der PDE-5.....	26
6. Studiendesign und –ziel.....	30
7. Ergebnisse	31
7.1. Ergebnisse der allgemeinen Histologie	31
7.1.1. Arterien	31

7.1.2. Venen	35
7.2. Ergebnisse der Immunhistologie.....	36
7.2.1. Verteilung der Endothelinrezeptoren.....	37
7.2.1.1. Endothelin-A-Rezeptoren	37
7.2.1.1.1. Arterien	37
7.2.1.1.2. Venen.....	37
7.3. Endothelin-B-Rezeptoren	38
7.3.1. Arterien	38
7.4. Verteilung der Phosphodieesterase 5.....	40
7.4.1. Arterien	40
7.4.2. Venen	40
7.5. Analyse der Patientendaten	41
8. Diskussion	44
9. Zusammenfassung	51
Abbildungsverzeichnis	54
Tabellenverzeichnis	56
Literatur	57
Eidesstattliche Erklärung	
Danksagung	
Lebenslauf.....	

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMI	Body-Mass-Index
°C	Grad Celsius
cGMP	Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nährmedium für tierische Zellen)
eNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ERA	Endothelinrezeptor-Antagonist
ETR	Endothelin-Rezeptoren
ETAR	Endothelin-A-Rezeptor
ETBR	Endothelin-B-Rezeptor
EtOH	Ethanol
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IRS	Immunreaktiver Score
LTX	Lungentransplantation
MEI	Membrana elastica interna
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	Mittlerer Pulmonal Arterieller Gefäßdruck
µl	Mikroliter
NO	Stickstoffmonoxid
NGS	Normal Goat Serum
OT	Objektträger
OP	Operation
PA	Pulmonalarterie
PAH	Pulmonal Arterielle Hypertonie

PAP	Pulmonal Arterieller Gefäßdruck
PASMC	Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE-5	Phosphodieesterase-5
PGI ₂	Prostazyklin
PP	Prozentsatz positiver Zellen
PV	Pulmonalvene
PVR	Gefäßwiderstand
SI	Staining intensity (Farbintensität)
SMC	Smooth muscle cells
SMA-Färbung	Smooth-Muscle-Actin-Färbung
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

1. Einleitung

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) wird durch einen dauerhaft erhöhten Pulmonalgefäßdruck definiert und stellt eine progressive, chronische Erkrankung des Lungenkreislaufes dar. [1] Die PAH beeinflusst den Blutfluss in den Pulmonalarterien und -venen sowie im rechten Ventrikel. [2] So kann sie zu Rechtsherzversagen und unbehandelt im Endstadium zum Tode führen. Trotz weitreichender Fortschritte der Therapieoptionen bleibt die PAH eine unheilbare Erkrankung, welche mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden ist. [1] Therapieoptionen basieren primär auf dem Einsatz von Vasodilatoren. Diese stellen eine sehr kostenintensive Behandlung dar, die Symptome lindern und die Hospitalisierungsrate senken kann. [2] Es sind weiterhin grundlegende Forschungen von Nöten, um weitere Ansätze für symptomatische und möglicherweise kurative Therapien zu etablieren. Die meisten aktuellen Forschungen basieren auf klinischen und pharmakologischen Studien. Grundlagenforschungen werden zumeist im Tiermodell durchgeführt, an humanen Pulmonalgefäßen existieren bisher kaum grundlegende bzw. experimentelle Forschungen. [2, 3]

Die Arbeitsgruppe der Abteilung für Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg (Leiter: Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann) beschäftigt sich seit Jahren damit Medikamentenkombinationen zu untersuchen, welche eine effektivere PAH Therapie möglich machen könnten. Hierfür wird die Kontraktilität von humanen Pulmonalgefäßen unter Einfluss verschiedener vasomodulierender Medikamente in einem ex-vivo–in-vitro Organbadmodell erforscht. Aktuelle Ergebnisse deuten auf Vorteile einer Kombinationstherapie hin. [4–6, 3]

Im Rahmen der Arbeitsgruppe sollen in dieser Dissertationsarbeit Umbauprozesse und die Verteilung vasomodulierender Rezeptoren an humanen Pulmonalgefäßen untersucht werden. Es werden vergleichend pathologische, bei einer Organtransplantation entnommene, Gefäße und Gefäße aus Lobektomiepräparaten untersucht. Ziel ist es dabei einerseits herauszufinden, ob bei fortgeschrittenen Lungenpathologien allgemein histopathologische Veränderungen im Gefäßsystem vorliegen, die mit einer PAH vereinbar sind. Und andererseits, ob sich eine Veränderung der Expression von vasomodulierenden Faktoren verzeichnen lässt, die Hinweise auf eine Optimierung der vasodilatierenden Medikation geben könnte.

2. Grundlagen des Themengebiets

2.1. Anatomische und physiologische Grundlagen

2.1.1. Physiologie des Lungenkreislaufs

Der menschliche Blutkreislauf besteht aus zwei getrennten Kreislaufsystemen. Dem großen Körperkreislauf und dem kleinen Lungenkreislauf. Während der von dem linken Herzen abgehende Körperkreislauf die Organe mit Sauerstoff versorgt, stellt der Lungenkreislauf den sauerstoffaufnehmenden Teil dar. Das rechte Herz pumpt Sauerstoff-armes und Kohlenstoffdioxid (CO₂)-reiches Blut zur Lunge. Dort wird das CO₂ abgegeben und das Blut mit Sauerstoff angereichert. Anschließend wird dieses Blut zum linken Herzen gepumpt und steht so wieder für die Versorgung des restlichen Körpers zur Verfügung. [7] Es werden zwei unterschiedliche Druckbereiche unterschieden, das Hochdruck- und das Niedrigdrucksystem. Dort herrschen im Mittel ca. 100 mmHg, bzw. ca. 10 - 15 mmHg. Zum Hochdrucksystem gehören alle Arterien des Körperkreislaufs, zum Niedrigdrucksystem alle Venen, sowie die Arterien des Lungenkreislaufs. [8] Die Lungenstrombahn zeichnet sich durch ein druckpassives Durchblutungsverhalten aus, welches durch das weitgehend fehlende Stützgewebe der Lungenkapillaren und die daraus resultierende ausgeprägte Dehnbarkeit begründet ist. Daraus folgt der niedrige Strömungswiderstand in den Lungengefäßen. [9]

2.1.2. Wandaufbau der Lungengefäße

Blutgefäße des menschlichen Körpers weisen abhängig von ihrer jeweiligen Aufgabe grundsätzlich den gleichen Aufbau auf. Bis zu Beginn des Kapillarbetts werden drei Schichten unterschieden. Tunica interna, media und externa. [7] Abb. 1 zeigt zur groben Orientierung eine schematische Darstellung einer muskulären Arterie.

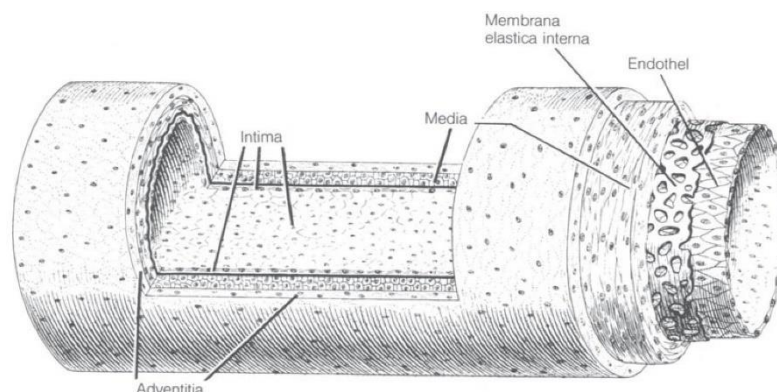


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer großen muskulären Arterie [10]

Die Tunica Intima, kurz Intima, definiert sich als die innerste Schicht zwischen Gefäßlumen und der Muskelschicht. Sie besteht physiologischer Weise aus einer Lage Endothelzellen, bindegewebigen subendothelialen Gewebe und ggf. einer Schicht aus elastischen Fasern (Tunica elastica interna). [11] Sie fungiert als Barriere zwischen Blut und Gefäßwand und reguliert den Transfer von Gasen bzw. Stoffen zwischen Blut und Gefäßwand. [7] Die glatte Oberfläche der Endothelzellen sorgt für gute Strömungsbedingungen, [9] treten Verletzungen auf kann es zu einer Gerinnselbildung im Gefäßlumen kommen. [7] Außerdem exprimieren Endothelzellen vasoaktives Stickstoffmonoxid, sowie zahlreiche Hormonrezeptoren. [9] Die Tunica Media, kurz Muskularis, schließt sich der Intima an. Sie besteht aus Muskel-, Kollagen- und elastischen Fasern. Je nach Lage und Funktion des Gefäßes in unterschiedlicher Zusammensetzung. [7] Die Aufgaben der Muskularis stellen Regulation des Muskeltonus sowie Abpufferung zusätzlicher Spannung, welche durch den Blutdruck und die Pulswelle entstehen können, dar. [7] Die Einbettung und Fixierung im umgebenden Gewebe stellt die Tunica externa, auch Adventitia, sicher. Durch vor allem längsgerichtete elastische- und Kollagenfasern kann Längsspannung, beispielsweise in Extremitäten, abgefangen werden. Bei größeren Gefäßen finden sich hier außerdem kleinere Blutgefäße, sogenannte Vasa vasorum, welche für die Versorgung der Gefäßwand zuständig sind. [7] Diesem Aufbau folgen sowohl Arterien als auch Venen, allerdings ergeben sich durch die grundsätzlich verschiedenen Aufgaben Unterschiede. [7] Generell erscheint die komplette Gefäßwand der Venen dünner und der Durchmesser im Allgemeinen größer als die der Arterien entsprechender Lage. Wie in Abb. 2 gut zu erkennen sind sowohl Intima als auch Muskularis bei den Venen geringer ausgeprägt. [10] Außerdem ist die Grenze zwischen Media und Adventitia wesentlich fließender, Muskelzellen und elastische Fasern ziehen durch das Gewebe der Tunica externa. [7] Bei Fixierung für histologische Präparate kontrahieren die Muskelfasern der Gefäße und lassen so das Lumen enger, die Muskularis dicker und das Endothel gewellt erscheinen. [10]

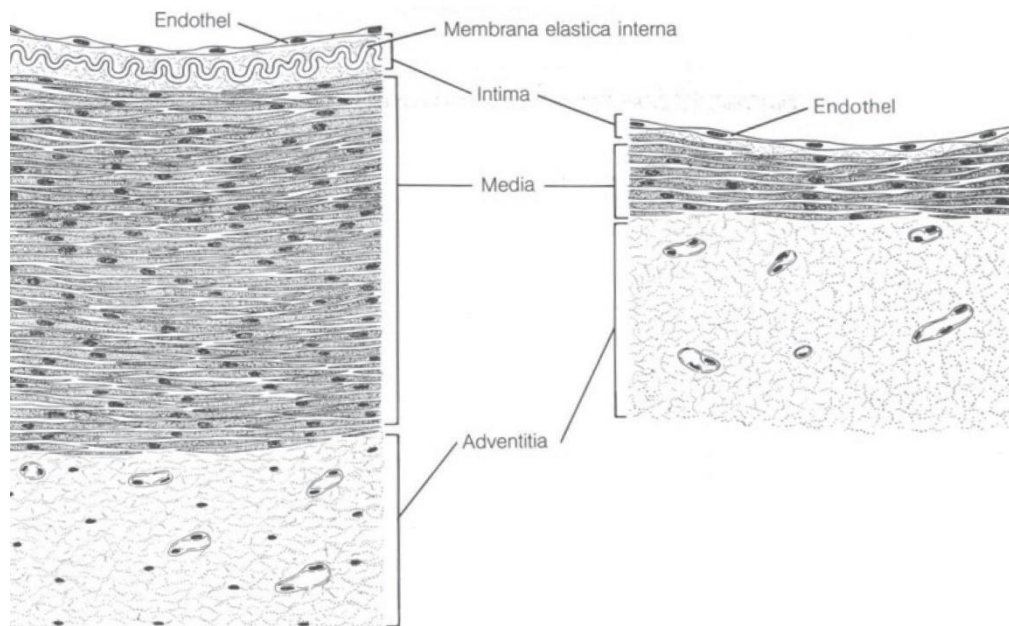


Abbildung 2: Vergleich des Wandaufbaus Arterien (links) vs. Venen (rechts) [10]

2.2. Krankheitsbild der pulmonal arteriellen Hypertonie

Weltweit leidet ca. ein Prozent der Weltbevölkerung an einer pulmonalen Hypertonie. [12] Die Datenlage zur Inzidenz der PAH ist allgemein spärlich, aber sie wird grob zwischen 2,0 bis 7,6/1.000.000 angegeben, die Prävalenz zwischen 11 - 26/1.000.000. [2] Bei Frauen liegt die Inzidenz etwa um das Vierfache höher, als bei Männern, allerdings sind die Überlebenschancen der Männer schlechter [2], vermutlich aufgrund eines häufigeren Vorkommens an assoziierten Begleiterkrankungen. [13] Eine Giessner Langzeit-Studie sammelte Daten zum Langzeitüberleben von über 2000 PH-Patienten und konnte für die PAH ein transplantationsfreies 5-Jahresüberleben von 59,4 % erheben. [14] Bei der PAH kommt es vor allem durch Umbauprozesse im präkapillären Gefäßsystem zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und somit zu einem verminderten Gasaustausch sowie einer die Prognose verschlechternden Rechtsherzinsuffizienz [15]. Zur Diagnosestellung muss ein mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP) von ≥ 20 mmHg durch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung bestätigt werden [16, 17]. Klinisch äußert sich die PAH im Anfangsstadium durch unspezifische Symptome, wie Belastungsdyspnoe, Ödeme und eine allgemein geminderte Leistungsfähigkeit. In späteren Stadien kommen dazu häufig Schwindel, Synkopen und Angina Pectoris [15, 18]. Laut der Rotterdam Studie von 2015 gibt es einige Faktoren, die mit dem Auftreten einer zumindest echokardiografisch nachweisbaren PH assoziiert sind. Ganz

grundlegend stehen fortgeschrittenes Alter, sowie spezielle Grunderkrankungen (COPD, Linksherzversagen, systemischer Bluthochdruck), aber auch ein erhöhter BMI mit einer PH in Verbindung. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen Patienten mit einem Alter > 83 Jahren und Jüngeren, sowie Patienten mit und ohne Begleiterkrankungen (COPD und Linksherzinsuffizienz) festgestellt werden. [19]

2.2.1. Pathophysiologie der PAH

Die Ursachen der PAH sind vielfältig und in ihren genauen Pathomechanismen bisher noch nicht vollständig verstanden [1,15]. Unabhängig von der zugrunde liegenden Ätiologie kommt es bei allen Formen der PAH zu ähnlichen pathologischen Veränderungen in den Pulmonalgefäßen [20], auf diese wird in Kapitel 2.3. genauer eingegangen. Ein Ungleichgewicht vasomodulierender Faktoren führt zu einem grundsätzlich erhöhten mPAP, wobei drei verschiedene Signalwege betroffen sind. Eine verminderte Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), eine geringere Produktion von Prostazyklin (PGI_2) und eine hochregulierte Expression von Endothelin-1 (ET-1) sind mitverantwortlich für den Druckanstieg in den Pulmonalgefäßen [21]. Stickstoffmonoxid (NO) sorgt physiologischer Weise für eine Vasodilatation, verhindert Gefäßthrombosierungen und die Aggregation von Thrombozyten und behindert das Wachstum der glatten Muskelzellen. [21] Zwei verschiedene Medikamentengruppen greifen an diesem Mechanismus an: Phosphodiesterase-5 (PDE-5) -Inhibitoren (z.B. Sildenafil und Tadalafil) und Guanylatcyclase-Stimulatoren (z.B. Riociguat). [21] Prostazykline werden in den Endothelzellen produziert. Sie weisen ebenfalls antithrombotische und antiinflammatorische Effekte auf, senken die Wachstumsaktivität der glatten Muskelzellen und hemmen die Plättchenaggregation. [21] Prostazyklinanaloga, wie Iloprost, oder Prostazyklinrezeptoragonisten, wie Selexipag, werden hier medikamentös eingesetzt. [21] Der dritte Signalweg stellt das ET-1-System dar. ET-1 ist ein Peptid, welches in der Membran der Endothelzellen exprimiert wird. Es bindet an zwei unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, den Endothelinrezeptor-A (ETAR) und -B (ETBR). Der ETAR wird an den glatten Muskelzellen exprimiert und vermittelt dort bei Aktivierung Vasokonstriktion, Wachstumsreize, Zellmigration und Fibrose. [21, 22] Der ETBR wird sowohl in glatten Muskel- als auch in Endothelzellen exprimiert. An der glatten Muskulatur führt er zu Vasokonstriktion, am Endothel zu NO- und Prostazyklin-Produktion, wodurch

Vasodilatation und Antiproliferative Effekte erzielt werden. [21, 22] ET-1-Antagonisten, wie Macicentan, Bosentan und Ambrisentan, nutzen diesen Signalweg als Angriffspunkt. [21] Eine Übersicht über die verschiedenen Signalwege und die entsprechenden Pharmaka gibt Abb. 3.

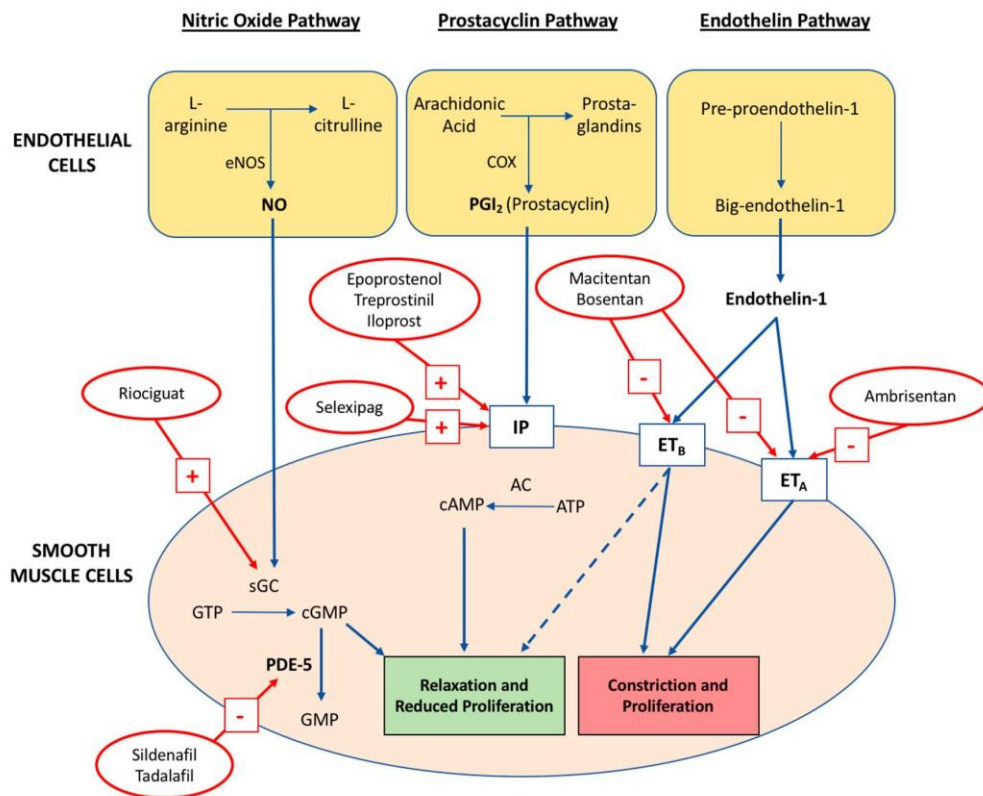


Abbildung 3: Ziel-Signalwege der PAH-Therapie [21]

2.3. Gefäßveränderungen in den Pulmonalgefäßen durch PAH

Der Einfluss des erhöhten Druckes wirkt sich auf alle Gefäße im Lungenkreislauf aus. Besonders betroffen sind dabei kleine muskuläre Arterien. [23] Dabei ist der Gefäßumbau einerseits bedingt durch den erhöhten Pulmonaldruck, führt aber wiederum auch zu einer weiteren Druckerhöhung. [11, 15] Laut einer Einteilung von Houser, Balis et al. können die histopathologischen Auffälligkeiten in vier Stadien eingeteilt werden. Im ersten und häufigsten Stadium treten Veränderungen in der Tunica Muscularis auf. Sowohl die Anzahl als auch der Durchmesser der einzelnen Muskelzellen nimmt zu und sorgt dadurch für eine Mediahypertrophie. Definiert wird das als Dickenzunahme zwischen Tunica elastica interna und externa. Ebenso zeigt sich in diesem Stadium häufig ein Einsprossen von glatten Muskelzellen bis in die distalen Arteriolen hinein. [20, 23] Stadium II wird durch die Hypertrophie der Intima

definiert. [23] Myofibroblasten und extrazelluläre Matrix wandern zwischen Endothel und Lamina elastica interna ein und führen zur Ausbildung einer „Neointima“. So entsteht eine teilweise sehr ausgeprägte Verdickung der Intima. [20] Bei einem langsamen Progress der Erkrankung schließt sich die Zunahme der Endothelzellen der Mediahypertrophie an. Steigt der Druck sehr schnell an, kann dieses Phänomen auch führend sein. [23] Stacher et. al beschreibt einen Anstieg der Intimadicke auf ca. das dreifache bei schwerwiegender PAH. [24] Houser beschreibt darüber hinaus einen möglichen Kontaktverlust zwischen Intima und Media. [23] Das dritte Stadium definiert sich durch ein weiteres Remodeling der Intima in Form einer Einwanderung von Kollagen- und elastischen Fasern. Diese Veränderungen weisen auf einen irreversiblen Gefäßschaden hin. Im Stadium IV zeigen sich als Zeichen eines fortgeschrittenen und schwerwiegenden Verlaufs der PAH sogenannte plexiforme Läsionen. Diese stellen eine stellenweise Obliteration des Gefäßlumens durch Einsprossung von Endothel- und Bindegewebszellen dar. Durch eine örtlich auftretende Nekrose der Gefäßwand entstehen Rupturen und damit Einblutungen ins umgebende Gewebe. Um den Blutfluss trotz der Fibrinverclottung des rupturierten Gefäßes aufrecht zu erhalten, sprossen Kapillaren und Fibroblasten ins Lumen ein und organisieren Kollateralkreisläufe. [23] Plexiforme Läsionen sind sehr typisch für die idiopathische PAH, können aber auch bei anderen Formen auftreten. [11] Generell werden beim Remodeling der Gefäßwand alle Zellen zur Hyperproliferation angeregt, verschiedene Wachstumsfaktoren sind daran beteiligt (z. B. der „platelet-derived growth factor“ (PDGF), der „fibroblast growth factor“ (FGF) und der „transforming growth factor β “ (TGF- β)). Zudem werden durch Entzündungsprozesse Zytokine und Chemokine ausgeschüttet und Thrombozyten aktiviert, was die Umbauprozesse zusätzlich unterstützt.[15] Häufig begleitet die Verdickung der Gefäßwand eine vermehrte Neovaskularisierung der Gefäße, mit einer Zunahme der Vasa Vasorum. [25] Das Auftreten und die Rolle des Remodelings in den Pulmonalvenen wurde früher häufig vernachlässigt, rückt aber zunehmend in den Focus neuerer Studien. [20]. Abb. 4 zeigt einige der typischen Pathologien.

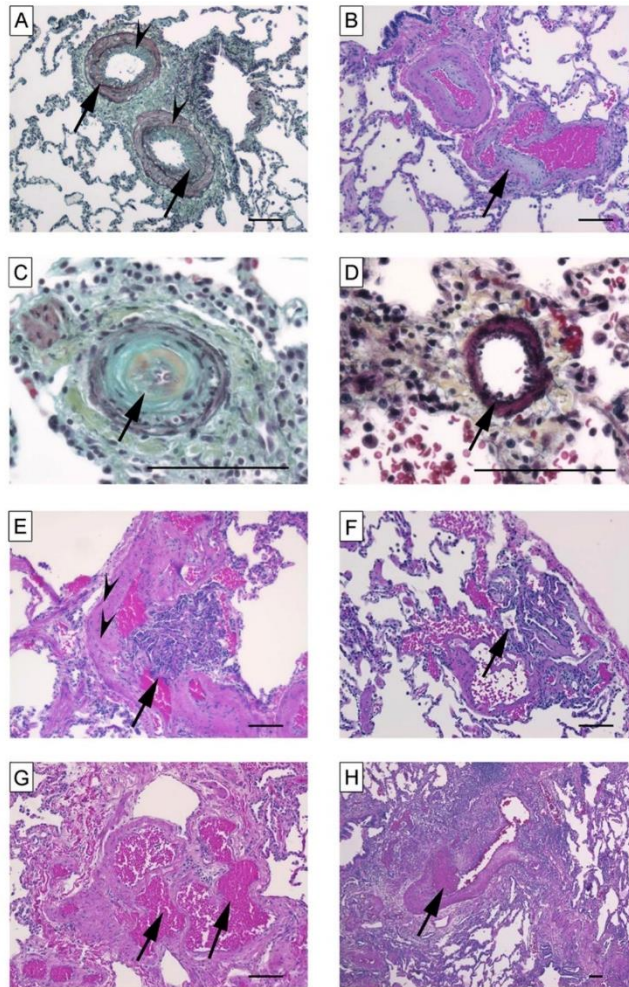


Abbildung 4: Verschiedene Histopathologien idiopathischer PAH , entnommen von Stacher et.al., 2012. [24]; Beschriftung aus dem Englischen übersetzt; (A) Verdickung von Intima (Pfeile) und Media (Pfeilspitzen) . (B) Exzentrische Intimaproliferation. (C) Konzentrische „zwiebelschalenartige“ Intimaproliferation (Pfeil). (D) Muskularisierung einer kleinen Arterie (Pfeil). (E) Plexiforme Läsion (Pfeil) unterhalb von einer muskulären Arterie (Pfeilspitze). (F) Subpleurale plexiforme Läsion (Pfeil). (G) Angiomatöse Läsion bestehend aus dilatierten Gefäßen (Pfeile). (H) Frischer Thrombus (Pfeil). Messbalken = 100 µm.

2.4. Therapeutische Maßnahmen

Abhängig von der Ätiologie der PAH, muss zunächst die zugrundeliegende Erkrankung behandelt werden. Alle weiteren Behandlungsmaßnahmen sind symptomatisch orientiert und abhängig von der Form der PAH, sowie des Bedarfs des Patienten. [26] Die Anpassung der körperlichen Belastung an die aktuelle Leistungsfähigkeit, Schwangerschaftsverhütung, die Prävention weiterer Infektionen (Influenza- und Pneumokokkenimpfung), sowie psychosoziale Betreuung der Patienten sind von großer Bedeutung [15]. Außerdem gelten eine Sauerstoffdauertherapie und ein Ausgleich des Wasserhaushaltes mittels Diuretikatherapie als wichtige supportive Therapie [27]. Da PAH Patienten zusätzlich sehr stark von einer Antikoagulation

profitieren, wird auch diese empfohlen. [28] Grundsätzlich handelt es sich bei der PAH um eine schwere, progrediente und unheilbare Erkrankung bei der die letzte Handlungsoption die Lungentransplantation darstellt [16] Bei der gezielten PAH-Therapie wird nach einem Stufenschema vorgegangen (s. Abb. 5).

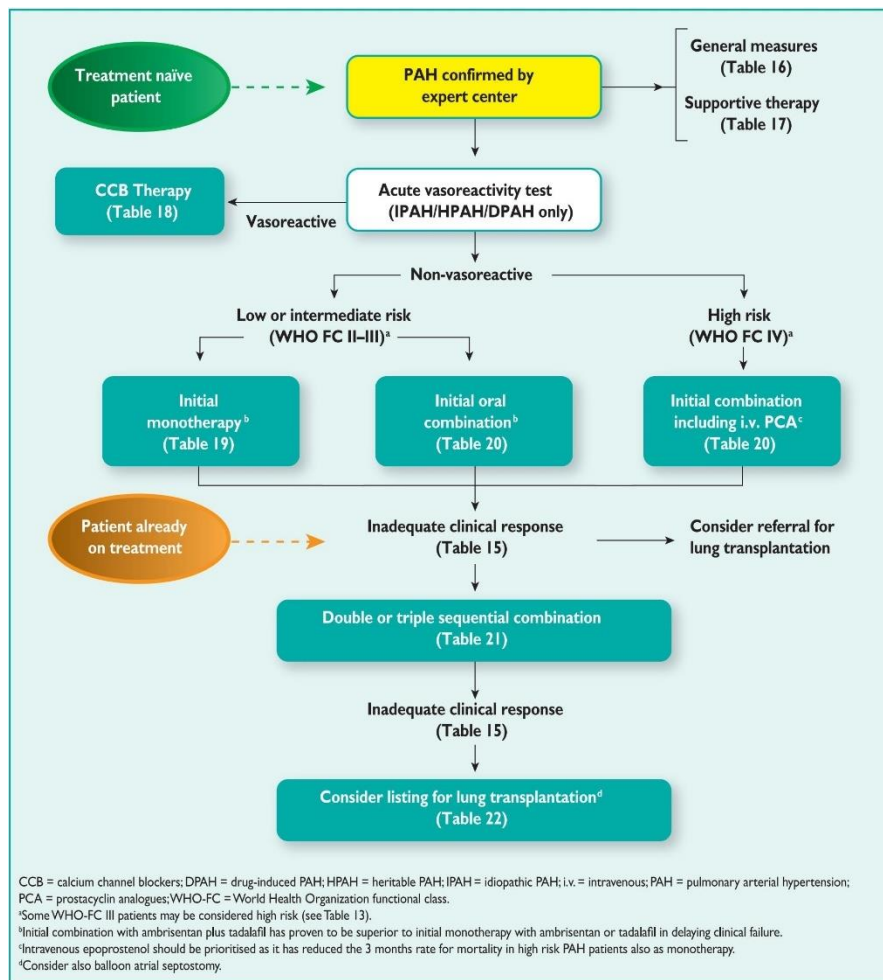


Abbildung 5: Stufenschema für PAH Therapie [16]

Ist die Behandlung mit Kalziumkanal-Antagonisten nicht möglich, wird abhängig vom Schweregrad der PAH initial mit einer oralen Mono- oder Kombinationstherapie aus ERAs und PDE-5-Inhibitoren begonnen. In schweren Fällen kommt die intravenöse Gabe von Prostazyklinanaloga hinzu [21]. Geschlechterspezifische Unterschiede im Ansprechen auf die unterschiedlichen Therapien wurden immer wieder diskutiert, konnten aber laut aktuellen Studien nicht bestätigt werden. [13]

Aktuell werden sehr selten Pharmaka eingesetzt, die die Proliferation von glatten Muskelzellen unterdrücken und somit das Remodeling verhindern sollen. Unter anderem aufgrund starker Nebenwirkungen und fehlender Studienlage [1]

2.4.1. Endothelin-1-Rezeptorantagonisten

Endothelin-1 ist ein 21 Aminosäuren-langes Peptid, welches hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch in glatten Muskelzellen produziert wird [29]. Es fungiert als starker Vasokonstriktor mit inflammatorischer, proliferativer und fibrotisierender Wirkung [30]. ET-1 besitzt eine relativ lange Halbwertszeit (vier bis sieben Minuten) und seine Expression wird durch Hypoxie, Ischämie und Scherkräfte stimuliert [29]. Es gibt zwei verschiedene Endothelinrezeptoren, Typ A und B. Der ETAR wird in glatten Muskelzellen, der ETBR hauptsächlich in Endothelzellen und zusätzlich in glatten Muskelzellen exprimiert [29]. Die Expressionsorte sind maßgeblich für die Wirkung des Endothelins an den Rezeptoren. Der ETAR vermittelt eine Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen und regt deren Proliferation an. Der ETBR kann an den glatten Muskelzellen und am Endothel sowohl Vasokonstriktion als auch Vasodilatation vermitteln. Dies geschieht durch Anregung der NO-Synthese und des Abbaus von ET-1 (s. Abb. 6) [30].

Grundsätzlich wäre somit davon auszugehen, dass eine selektive Blockade des ETAR therapeutisch von Vorteil ist, allerdings konnte in bisherigen Studien kein signifikanter Unterschied in der Wirkung bewiesen werden [31].

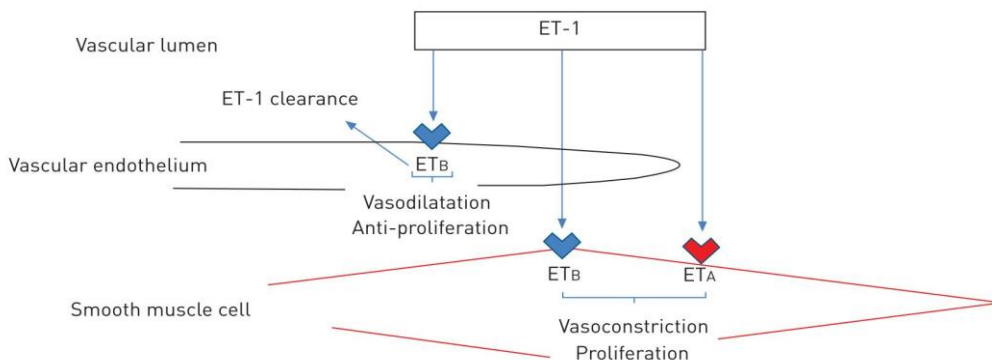


Abbildung 6: Wirkung und Lokalisation der Endothelinrezeptoren [32]

Bei der PAH kommt es bei fast allen Typen zu einer vermehrten ET-1 Produktion und so zu höheren systemischen ET-1 Spiegeln, wobei der genaue Pathomechanismus dahinter noch nicht ganz verstanden ist [21]. Die Antagonisierung dieses Systems ist ein vielversprechender Ansatzpunkt [33]. Bosentan und Macicentan, duale Antagonisten, und Ambrisentan, ein selektiver ETA-Rezeptorantagonist, werden aktuell eingesetzt [15].

2.4.2. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren

Die PDE-5 stellt ein intrazelluläres Enzym dar, welches spezifisch für das Corpus Cavernosum des Penis und für Lungengewebe ist. Es ist verantwortlich für den Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat [34]. cGMP stellt einen wichtigen Mediator zur Relaxation glatter Muskelzellen dar und führt so in den Pulmonalgefäßen zu einer Vasodilatation. Ein reduzierter Abbau bedingt eine verlängerte Wirkung des cGMP und so eine langanhaltendere Gefäßerweiterung. Des Weiteren wirken PDE-5-Inhibitoren antiinflammatorisch und antiproliferativ. Nach aktuellen Leitlinien werden Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil eingesetzt [16].

Vorhergehende Studien dieser Arbeitsgruppe, bei denen Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil in alleiniger Gabe und in Kombination mit Bosentan in einem ex-vivo-in vitro Organbadmodell untersucht wurden, zeigten, dass Vardenafil allein und in Kombination den größten Effekt bewirken konnte. [3, 5, 6]

3. Arbeitshypothese

Jährlich werden etwa 350 Lungen in Deutschland transplantiert. Bei etwa 5% der Patienten stellten vaskuläre Aspekte, wie eine primäre arterielle Hypertonie, die Indikation für die Organtransplantation dar. [12] Ein Objekt der Forschung meiner Arbeitsgruppe ist es unter anderem das Verhalten des Muskeltonus in noch vitalen humanen Pulmonalarterien, entnommen bei einer Lungentransplantation, in einem in-vitro Versuch zu untersuchen und zu analysieren. Das Verhalten in Reaktion auf gefäßverengende Mediatoren, wie Endothelin, ergab in dieser Gruppe einen deutlichen Unterschied im Vergleich zu Pulmonalarterien Lungengesunder (PA entnommen bei Lungenlappenresektionen im Rahmen der Therapie von Bronchialkarzinomen). [3, 5, 6] Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, ob sich auch rein morphologisch beim Vergleich dieser beiden Gruppen ein Unterschied verzeichnen lässt.

Aufgrund dieser Tatsache beschäftigt sich diese Arbeit damit, ob und inwiefern bei Pulmonalarterien und –venen lungentransplantierte Patienten Umbauprozesse im Pulmonalgefäßsystem auftreten und ob sich im Vergleich mit physiologischen humanen Gefäßen histopathologische Unterschiede erfassen lassen. Des Weiteren wurden Analysen hinsichtlich der Verteilung von vasomodulierenden Rezeptoren und Enzymen, welche aktuell die gängigen Targets für eine vasomodulierende Therapie darstellen, angestellt.

4. Material und Methoden

Objekt der Betrachtungen waren Segmentpulmonalarterien und –venen zweier verschiedener Patientengruppen. Die Studiengruppe stellten 14 Patienten dar, denen im Zeitraum Oktober 2016 bis März 2018 im Universitätsklinikum Großhadern, München eine Lunge transplantiert wurde. Die zweite Gruppe bestand aus 12 Patienten, bei denen im Universitätsklinikum Regensburg oder im Klinikum der Barmherzigen Brüder in Regensburg im Zeitraum April 2015 bis April 2016 elektiv eine Lungenlappenresektion aufgrund eines Bronchialkarzinoms durchgeführt wurde. Sie fungiert in dieser Studie als nicht-pathologische Kontrollgruppe. Patienten mit einer präoperativ diagnostizierten PH sowie Patienten unter 18 Jahren wurden aus dieser Gruppe ausgeschlossen. Ausnahme bildet ein Patient, der bei bestehender PAH einer Lobektomie unterzogen wurde und der in den Betrachtungen beispielhaft als Bindeglied zwischen beiden Gruppen fungiert. Präoperativ mussten alle teilnehmenden Patienten nach ausführlicher Aufklärung schriftlich eine Einverständniserklärung unterzeichnen. Es ergab sich für die Patienten kein erhöhtes perioperatives Risiko, keine verlängerte OP-Zeit oder eine aufwändigere OP-Methode. Alle Gefäße wurden zusätzlich in oben erwähnten Organbadversuch hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Gabe von Vardenafil und/oder Bosentan untersucht. Ein Ausschlusskriterium für diese Studie stellte ein Patientenalter < 18 Jahre, sowie für die Kontrollgruppe eine präoperativ diagnostizierte PH dar. Für alle Untersuchungen liegt eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg vor (Geschäftszeichen: 19-1555-101).

Alle lungentransplantierten Patienten wiesen unterschiedliche Grunderkrankungen auf. Deshalb konnte keine einheitliche Definition über die zugrundeliegende Pathologie gefasst werden und es wird im Folgenden von „pathologischen“ Gefäßen gesprochen. Im Allgemeinen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Druckbelastung im Pulmonalgefäßssystem präoperativ höher war, da mit dem terminalen Stadium vieler schwerwiegender Lungenerkrankungen eine pulmonale Hypertonie einhergeht.

4.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Entnahmeorte des Probenmaterials waren die Abteilung der Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Regensburg, die Klinik für Thoraxchirurgie im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg und das Transplantationszentrum im Universitätsklinikum Großhadern, München. Nach Entnahme des Lungenlappens bzw.

des Lungenflügels, wurden ca. 2 bis 5 cm der Segmentgefäße aus dem Lungenparenchym herauspräpariert. Der anschließende Transport in das Labor der Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg erfolgte bei Entnahme in Regensburg in heparinisiertem Patientenblut. Bei Entnahme in München wurden die Gefäße zur Erhaltung der physiologischen Funktion in eine Nährlösung (DMEM) gelegt und bei 4 °C transportiert. Zunächst wurden die Pulmonalgefäße in 2 mm dicke Ringe geschnitten und in Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, D) fixiert. Die Dauer der Fixierung variierte bei allen Präparaten, abhängig von dem OP-Datum und dem Entnahmezeitpunkt.

4.2. Aufarbeitung des Materials für die Histologie

Die Ringe wurden nach ausreichender Fixierung in der Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg in Paraffin eingebettet. Mit einem Paraffinmikrotom (Fa. Thermo Science; Rotationsmikrotom, HM 340 E) wurden 5 µm dicke Schnitte in Serie angefertigt und in ein Wasserbad, bei 40 °C, gelegt, um die Präparate zu strecken. Anschließend wurden sie auf Starfrost (Super Frost Plus Menzel GmbH; Braunschweig, D) Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank (Memmert, Schwabach, D) bei 55 °C getrocknet. Vor jeder Färbung wurden die Objektträger zweimal jeweils ca. 10 Minuten in Xylol (Merck, Darmstadt, D) entparaffinisiert und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe zur Rehydratisierung (2 x 100 %, 2 x 96 %, 2 x 70 %).

Zur allgemeinen Beurteilung der Gefäßpathologie wurden von jedem Schnitt eine Hämatoxylin-Eosin, eine Smooth-Muscle-Aktin-Resorcin-Kombinationsfärbung und eine CD31-Immunhistochemische Färbung angefertigt. Um die vasodilatierenden Faktoren zu beurteilen, wurden Endothelin-A- und Endothelin-B-Rezeptoren, sowie die Phosphodiesterase-5 immunhistochemisch angefärbt. Hierfür wurde die indirekte ABC-Methode verwendet. Zunächst wurde ein für das Targetprotein spezifischer Antikörper auf die Objektträger aufgebracht. Dieser bindet spezifisch an das Antigen der Probe. Danach werden alle ungebundenen Antikörper abgewaschen und im Anschluss ein Sekundärantikörper aufgebracht, der an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet. Der Sekundärantikörper ist ein biotinylierter Brückenantikörper. An diesen bindet im dritten Schritt der ABC-Komplex. Dabei handelt es sich um ein dreifach biotinyliertes Avidin, welches zusätzlich mit einem Enzym, in unserem Falle an die Meerrettich-Peroxidase (HRP), gekoppelt ist. Dieses Enzym wandelt im letzten

Schritt das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin in ein braunes Farbsubstrat um und macht so das detektierte Protein sichtbar. [35]

Die Färbungen wurden nach in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokollen durchgeführt. Beim Erlernen sowie der Ausführung der Schnittanfertigung und der Anfärbemethoden wurde ich von der Laborabteilung der Herz-Thoraxchirurgie, insbesondere von MTA Frau Katrin Bielenberg, unterstützt.

4.3. Protokolle der histologischen Färbungen

4.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der klassischen Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurde mit den Objektträgern genauso verfahren, wie oben beschrieben. Nach der absteigenden Alkoholreihe wurden sie in vollentsalztes Wasser überführt und drei Mal gewaschen. Die Mayers-Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt, D) wurde filtriert, um Rückstände von vorherigen Färbevorgängen zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten in Hämalaun-Lösung gegeben. Danach wurde mit VE-Wasser gewaschen, bis keine Farbwolken mehr sichtbar waren. Um eine Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde in 0,1 % HCl-Alkohol differenziert und danach erneut drei Mal mit VE-Wasser gewaschen. Dann wurden die Objektträger für drei Minuten in lauwarmes Leitungswasser geben, um die Zellkerne im basischen Milieu zu bläuen. Nach einmaligem Waschen mit VE-Wasser, wurden die Objektträger in die aufsteigende Alkoholreihe überführt (2 min 70 %, 2 min 96 %). Im Anschluss folgte die Eosinfärbung (Merck, Darmstadt, D) für acht Minuten, danach wurde in drei 96 % Alkoholportionen differenziert, um eine geringe Hintergrundfärbung zu erzielen. Dann folgte der Rest der aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 3 min 100 % EtOH) und zweimalig Xylol für 10 Minuten. Zum Schluss wurden die Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt, D) und Deckgläsern (24 x 60mm; VWR, Ismaning, D.) eingedeckt.

In der HE-Färbung stellen sich die Zellkerne blau, das Zytoplasma rosa, die Muskulatur pink und die Erythrozyten ziegelrot dar.

4.3.2. Immunhistologische Färbungen

Die Objektträger wurden wie oben beschrieben entparaffinisiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch zehn Minuten Inkubation mit 3 %-H₂O₂ (Merck; Darmstadt, D) blockiert. Da durch die Formalinfixierung Aldehydvernetzungen

entstehen und die Tertiärstruktur des Targetproteins verändert werden kann, muss vor dem Färben eine Antigendemaskierung durchgeführt werden, um das Antigen wieder für den Antikörper zugänglich zu machen [35]. Zum Aufschluss der Proteine wurden die Präparate für 20 Minuten bei 98 °C in einer Biologo-Kochlösung (Biozol; Eiching, D) gekocht, im Anschluss 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und danach in 0,005 %-PBS-T Puffer überführt. Um Fehlanfärbungen zu vermeiden wurden unspezifische Bindungen mit 0,1 % Normal Goat Serum (100 µl pro OT, 30 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer) geblockt. Der erste Antikörper (Verdünnung jeweils mit 0,05 % NGS) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, der zweite Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Der ABC - Komplex wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss zunächst zehn Minuten DAB in PBS-Puffer gelöst aufgetragen, danach für zwei Minuten DAB mit Urease. Die Farbreaktion wurde mit PBS-T abgestoppt. Zwischen allen Antikörperauftragungen wurde jeweils zwei Mal mit 2,5 ml PBS-T pro Objektträger gewaschen und zur Antikörper- bzw. Farbstoffauftragung jeweils 100 µl der Lösung verwendet. Anschließend wurden die Zellkerne mit Meyers Hämalaun gegengefärbt (30 Sekunden lang, danach bläuen der Kerne unter Leitungswasser). Bei der SMA-Färbung wurde etwas anders vorgegangen. Die Präparate wurden genauso entparaffinisiert, wie oben beschreiben. Allerdings folgte kein Hitzeaufschluss der Proteine, aufgrund der glatten Muskelzellen, welche durch eine Hitze-Denaturierung nicht mehr entsprechend detektiert werden hätten können. Die endogene Peroxidase wurden durch zehn Minuten Inkubation mit 3 %-H₂O₂ (Merck; Darmstadt, D) geblockt und im Anschluss die aufsteigende Alkoholreihe begonnen (2 x 96 %), danach wurden die Objektträger 20 Minuten bei 60 °C in Resorcinlösung gegeben, um die elastischen Fasern anzufärben. Zehn Minuten wurde im Anschluss abgekühlt und in mehreren 96 %-Ethanolportionen differenziert. Darauf folgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Der restliche Ablauf war identisch zu den anderen immunhistochemischen Färbungen.

Bei jeder Färbung wurden ein Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Tab. 1 und 2 geben einen Überblick über die jeweils verwendeten Primär- bzw. Sekundärantikörper.

Targetenzym/-rezeptor	Primärantikörper/ Verdünnung	Händler/ Verkäufer	Positiv- kontrolle
Endothelinrezeptor A	polyclonal rabbit anti-human ab117521, 1: 700	Abcam, Cambridge, UK	Atrium
Endothelinrezeptor B	monoclonal rabbit anti-human ab129102, 1: 2000	Abcam, Cambridge, UK	Lunge
Phosphodiesterase-5	polyclonal rabbit anti-human H- 120, 1: 200	Santa Cruz, Dallas, USA	Tonsille/ Lunge
α -SMA	monoclonal mouse anti-human 1A4, A2547, 1: 800	Sigma/Merck, Darmstadt, D.	Eigenkontrolle
CD-31	M0823	Dako	Eigenkontrolle

Tabelle 1: Primärantikörper

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

Tabelle 2: Sekundärantikörper

5. Auswertung der histologischen Untersuchungen

5.1. Deskriptive Histologie und Pathologie

Sowohl Arterien als auch Venen wurden nach dem gleichen Schema analysiert. Zur Beurteilung der allgemeinen Morphologie wurden von jedem Objektträger jeweils drei Ringe beurteilt und in jeweils einem Ausschnitt, in zehnfacher und zwanzigfacher Vergrößerung fotografiert. Hierbei wurde die HE-Färbung als Übersichtsaufnahme, die SMA-Resorcinfärbung zur Beurteilung der Intima- und Mediadicke und Morphologie bezüglich glatter Muskelzellen und elastischer Fasern und die CD31-Färbung zur Beurteilung der Endothelkontinuität verwendet. Bestimmte Aspekte wurden während des Mikroskopierens analysiert und in einer Microsoft-Excel-Tabelle festgehalten. Bei den untersuchten Aspekten handelt es sich um einige klassische histopathologischen Veränderungen bei PAH (s. Abschnitt 1.2.). Da unsere Schnitte nicht, wie in vielen anderen Studien, Lungenfensterausschnitte sind, sondern das isolierte Gefäß darstellen, können einige Pathologien nicht erfasst werden. Es wurde sich auf die Ausbildung einer Intimaverdickung und deren Ausmaß, das Auftreten atheromatöser Veränderungen, eine verstärkte Neovaskularisierung, Endothelkontinuität und das

Einsprossen von glatten Muskelzellen in Intima bzw. Adventitia beschränkt (s. Tab. 3). Andere Auffälligkeiten wurden fotografiert und in einer Excel-Tabelle festgehalten. Die histologischen Untersuchungen wurden an einem Leica Mikroskop (Leica DM RBE und Fluoreszenz; Leica, Wetzlar, D) mit Kamerasystem (Visitron Systems, Puchheim, D) durchgeführt.

Pathologische Veränderung	Intimaverdickung	Atheromatöse Veränderungen	Vasa Vasorum vermehrt	Einsprossung glatter Muskelzellen in Intima	Einsprossung glatter Muskelzellen in Adventitia	Endothel kontinuierlich
	Leicht	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Mittel	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
	Stark					

Tabelle 3: Allgemeinhistologisches Auswertungsschema

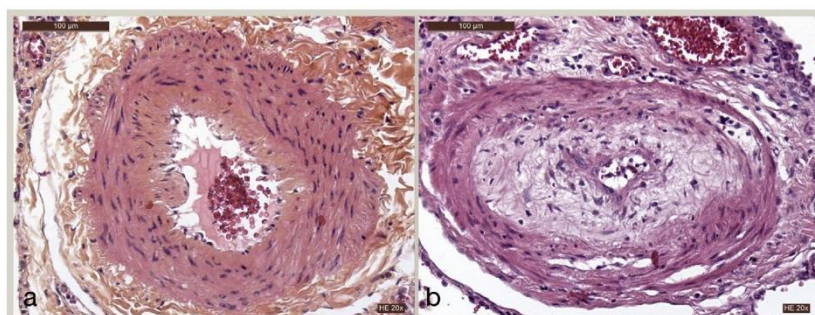


Abbildung 7: Histopathologische Veränderungen bei PAH: (a) Ausgeprägte Mediahypertrophie; (b) Konzentrische nicht-laminäre Fibrose mit lockererer Verbreiterung der Intima ("Neointima") (Entommen und modifiziert aus Ghigna und Dorfmueller 2019) [36]

Die Flächen von Intima und Media wurden durch das Programm CaseViewer (CaseViewer Version 2.3, 3DHitech) gemessen. Hierfür wurden von allen Präparaten jeweils die SMA-gefärbten OTs durch eine Kooperation mit dem pathologischen Institut Regensburg über einen Slide Scanner eingescannt und konnten so über die Mikroskopier-Software bearbeitet werden.

Es wurden pro Präparat jeweils drei Gefäßringe oder Gefäßanschnitte gemessen. Bei den vollständigen Ringen wurden jeweils Fläche und Umfang des Lumens, der Intima und Media gemessen und darauf Intima- und Mediafläche in mm² berechnet.

$$\text{Intimafläche} = \text{Intimagrenzfläche} - \text{Lumen}$$

$$\text{Mediafläche} = \text{Mediagrenzfläche} - \text{Intimagrenzfläche}$$

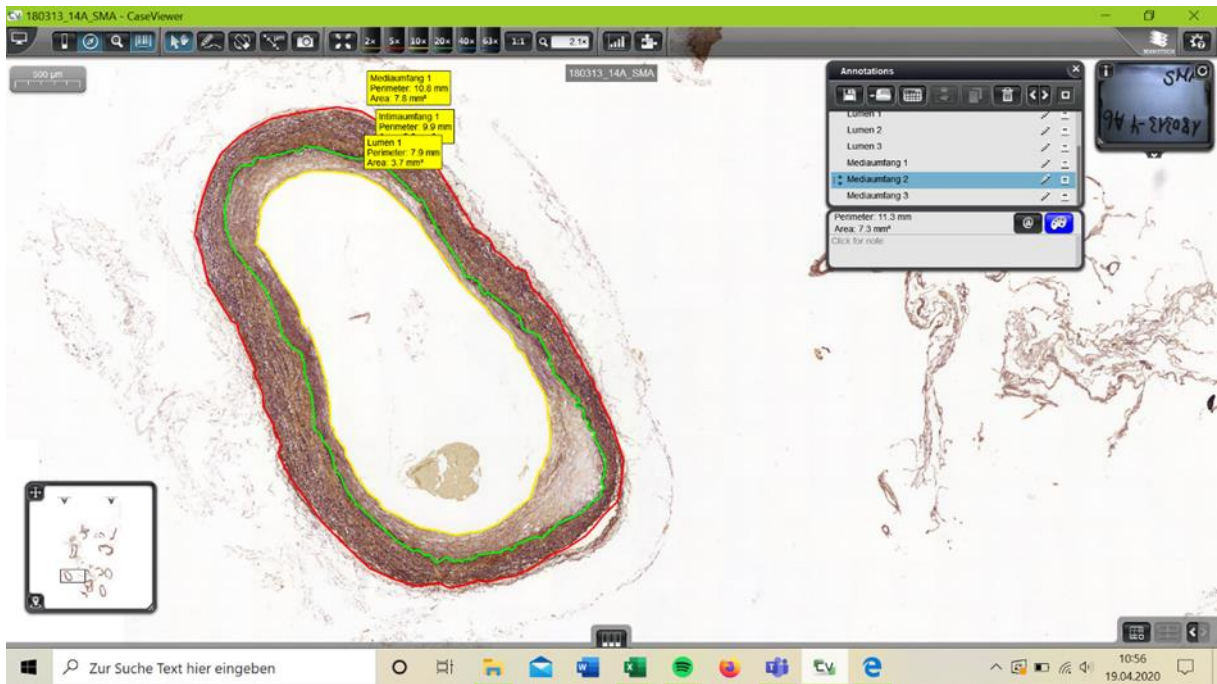


Abbildung 8: Messung der Schichtflächen via CaseViewer bei vollständigem Ring; gelb=Lumen, grün=Intimagrenze, rot=Mediagrenze



Abbildung 9: Messung der Schichtflächen via CaseViewer bei unvollständigem Ring; grün=Intimafläche, rot=Mediafläche

Bei unvollständigen Ringen wurden direkt die Fläche der vorhandenen Intima und Media berechnet, indem mit einem Messtool des CaseViewer direkt die Flächen umrandet und gemessen wurden. Um einen Vergleich der Ergebnisse zwischen den

einzelnen Gefäßen sowie zwischen Kontroll- und Studiengruppe möglich zu machen, wurden die Werte der jeweils bei drei verschiedenen Anschnitten gemessenen Schichten gemittelt.

Laut Dail und Hammar's Pulmonary Pathology kann die Intimadicke als prozentualer Anteil des inneren Gefäßinnendurchmesser gemessen werden, da dadurch ein Hinweis auf den Grad der luminalen Obstruktion gegeben werden kann. Die Mediadicke wird als Anteil des externen Durchmessers angegeben. Für eine genaue Messung sollten laut Dail und Hammar die Gefäßanschnitte optimaler Weise kreisförmig sein. [37] Abb. 10 zeigt die Vorgehensweise bei einem ovalen Gefäßanschnitt, hier soll entlang der kürzesten Intima und Media gemessen werden, jeweils anhand der durchquerten Wanddicken. Die Summe beider Messwerte (jeweils $I_1 + I_2$ oder $M_1 + M_2$) wird durch den inneren (ID) bzw. den äußeren (ED) Gefäßdurchmesser geteilt, um die prozentualen Anteile zu errechnen (medialer (%MT) bzw. intimaler (%IT) Dickenanteil. Die Berechnung soll anhand der Formeln, $\%MT = [(M_1 + M_2) / ED] \times 100$ und $\%IT = [(I_1 + I_2) / ID] \times 100$, erfolgen. [37]

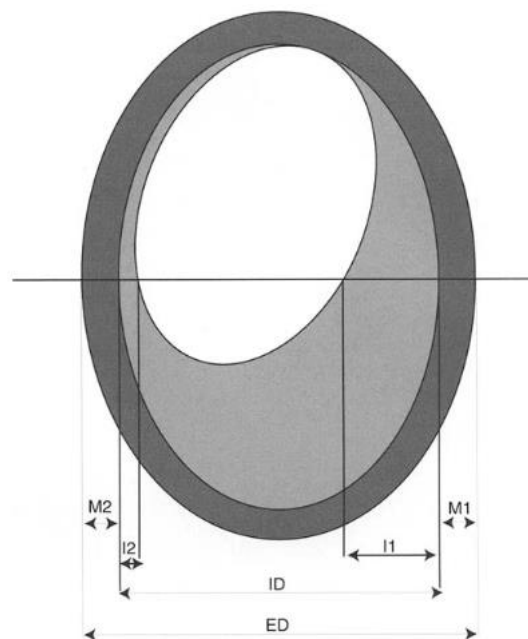


Abbildung 10: Gefäßwandabmessungen zur quantitativen Bewertung der medialen und intimalen Dicke nach Dail und Hammar ; $M_1 + M_2$ = mediale Dicke; $I_1 + I_2$ = intimale Dicke; ED = äußerer Gefäßdurchmesser; ID = innerer Gefäßdurchmesser. [37]

Eine anteilige Mediadicke von 3 % bis 7 % wird von Dail und Hammar als physiologisch beschrieben, bei einem Anteil größer als 7 % wird von einer Mediahypertrophie gesprochen. [37]

Da bei unseren Gefäßen sehr häufig nur Teile des Gefäßrings erfasst werden konnten (begründet durch die Entnahme der Gefäße im Rahmen eines laufenden Operationsprozesses), konnte diese Messmethode nicht bei allen Gefäßen angewandt werden. So wurden nur die kompletten Gefäßringe beispielhaft analysiert, um so einen groben Eindruck des Ausmaßes der Mediahypertrophie zu gewinnen. Um bei allen Gefäßen einen Eindruck von der Intimaproliferation zu gewinnen, wurde aus den gemittelten Schichtflächen das Verhältnis von Intimafläche zu Mediafläche bei jedem einzelnen Gefäß berechnet (Intimafläche/Mediafläche).

5.2. Verteilung der Endothelinrezeptoren und der PDE-5

Bei der Auswertung der Immunhistochemie wurde sich an dem Auswerteschema von Remmele und Stegner orientiert [38]. Es wird ein Immunreaktiver Score (IRS) bestimmt, indem die Farbintensität der Anfärbung (SI) beurteilt wird (Einteilung von 0 - 3) und der Anteil der positiven Zellen (PP, Einteilung nach Prozentsatz von 0 - 4) bestimmt wird. Der IRS ergibt sich aus dem Produkt von Farbintensität und dem Prozentsatz positiver Zellen ($SI \times PP = IRS$ (0 - 12)).

Zahlenwert	Farbintensität (SI)	Prozentsatz positiver Zellen (PP)
0	Negativ	Negativ
1	Schwach	< 10 %
2	Mäßig	10 – 50 %
3	Stark positiv	51 – 80 %
4		> 80 %

Tabelle 4: Einteilung zur Berechnung des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner [38]

Bei den Auswertungen dieser Arbeit wurden pro Färbung und Präparat (PDE-5, ETAR, ETBR) jeweils drei Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung fotografiert. Pro Gesichtsfeld wurde die Farbintensität von 0 - 3 bewertet, wobei auch Abstufungen in 0,5 - Schritten vorgenommen wurden, um die SI besser zu beschreiben. Die Zellen wurden manuell mit einer Zählfunktion des Programms ImageJ (Plugins > Analyse > CellCounter) gezählt: Positive Zellen des Endothels sind gekennzeichnet mit 1, Negative mit 4; Positive der Intima mit 2, Negative mit 5; Positive der Media mit 3, Negative mit 6. Durch Auszählen der positiven, als auch der negativen Zellen konnte

so der exakte Anteil der positiven Zellen ermittelt werden und ist so nachvollzieh- und reproduzierbar. Die Abb. 14 bis 16 mit den dazugehörigen Tab. 5 bis 7 stehen beispielhaft für die durchgeführten Auszählungen an einem Gesichtsfeld einer Pulmonalarterie. Insgesamt wurden die Auswertungen gemittelt (Mediane von SI und PP) und daraus ein endgültiger IRS berechnet. Abweichungen der Farbintensität zwischen „Kontroll-“ und Experimentalgruppe ergeben sich aus einer Änderung des DAB-Farbstoffes aufgrund von Lieferengpässen bei Sigma (Sigma; Missouri, USA), weswegen auf einen alternativen Farbstoff von Liquid DAB von DAKO (DAKO; Carpinteria, USA) umgestiegen werden musste. Daher wurden die jeweiligen Gruppen zunächst untereinander verglichen und dann erst die Zahlenwerte der Farbintensität.

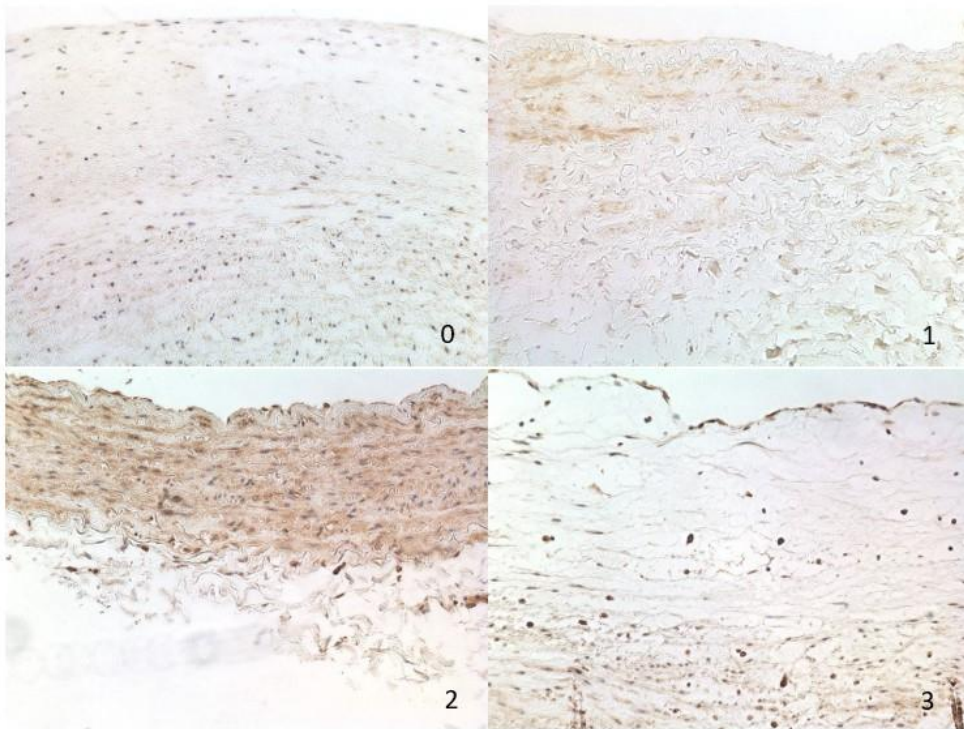


Abbildung 11: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbstärken der Intima (0 - 3); aus eigenem Bildmaterial

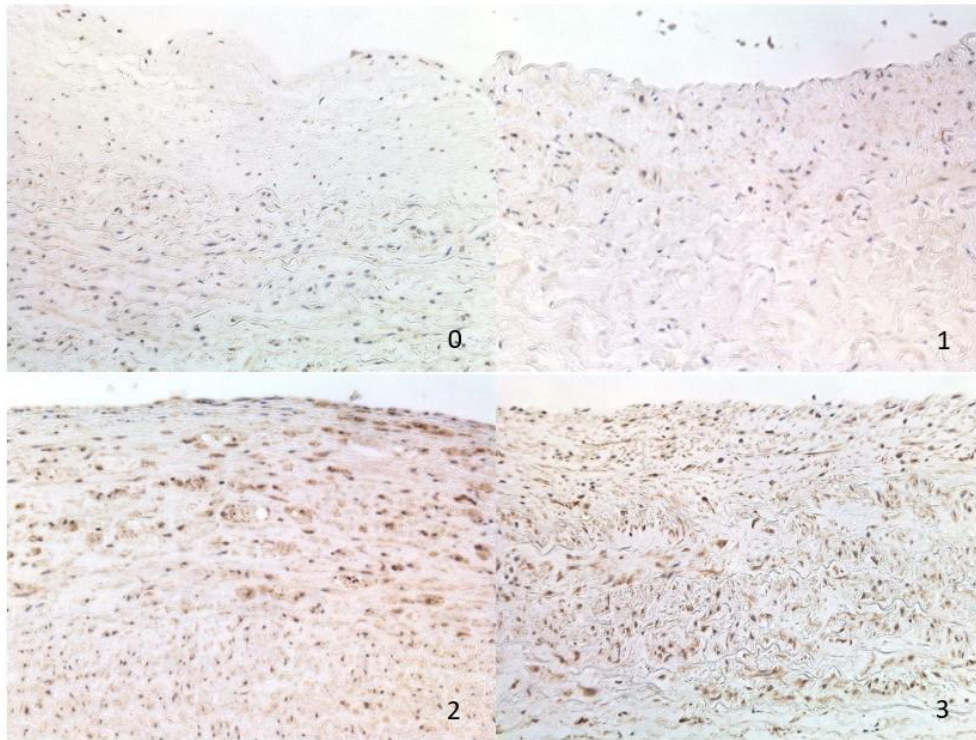


Abbildung 12: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbstärken der Neointima (0 - 3); aus eigenem Bildmaterial

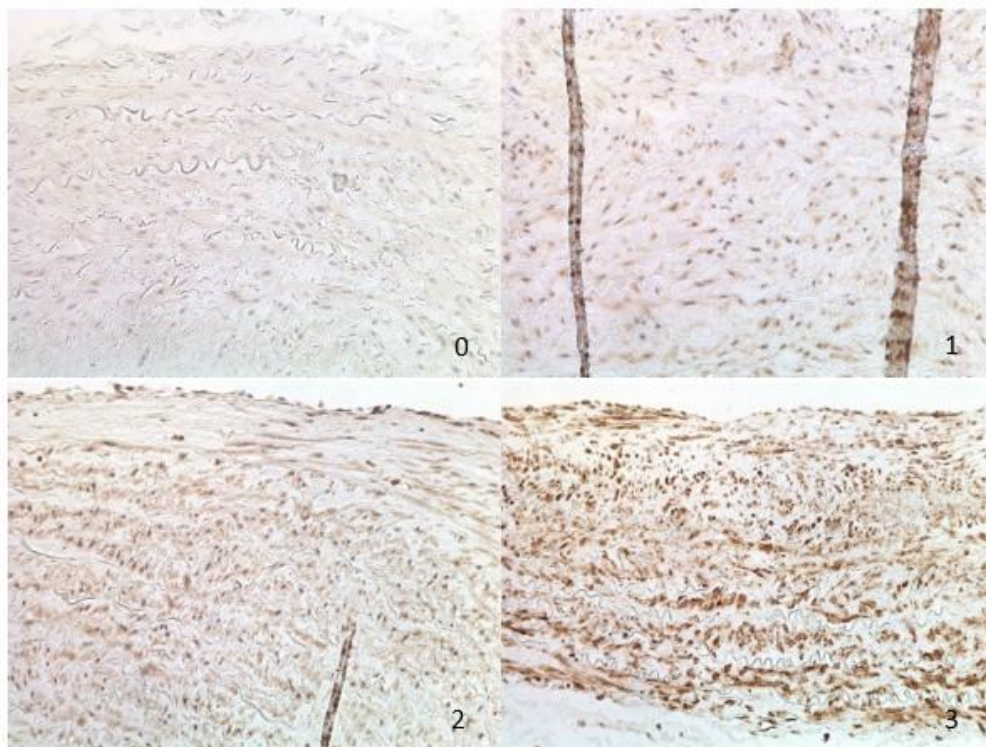


Abbildung 13: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbestärke der Media (0 - 3); aus eigenem Bildmaterial

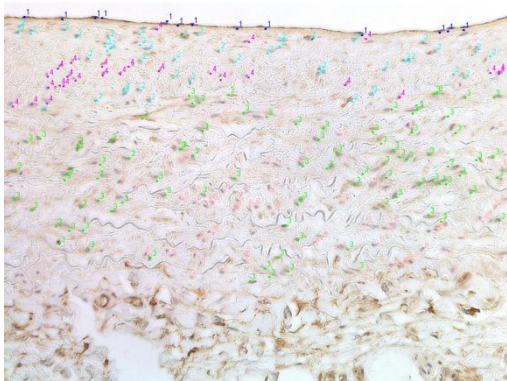


Abbildung 14: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für ETAR

Schicht	Endothel	Intima	Media
Anfärbestärke	2,5	1	1,5
Anteil positive Zellen	100 % = 4	62,5 % = 3	55 % = 3
IRS	2,5 x 4 = 10	1 x 3 = 3	1,5 x 3 = 4,5

Tabelle 5: 150720_1A ETAR Auswertung

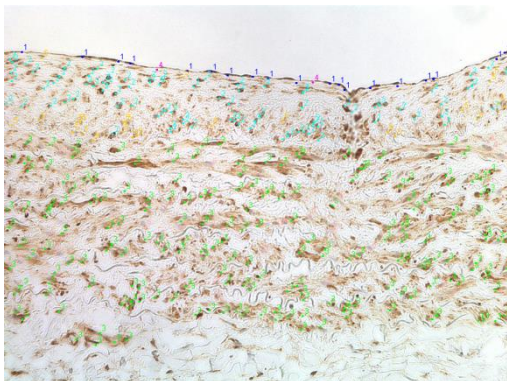


Abbildung 15: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für ETBR

Schicht	Endothel	Intima	Media
Anfärbestärke	3	2,5	2
Anteil positive Zellen	90 % = 4	80 % = 3	87 % = 4
IRS	3 x 4 = 12	2,5 x 3 = 7,5	2 x 4 = 8

Tabelle 6: 150720_1A ETBR Auswertung



Abbildung 16: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für PDE-5

Schicht	Endothel	Intima	Media
Anfärbestärke	2,5	1	1
Anteil positive Zellen	100 % = 4	60 % = 3	55 % = 3
IRS	2,5 x 4 = 10	1 x 3 = 3	1 x 3 = 3

Tabelle 7: 150720_1A PDE-5 Auswertung

6. Studiendesign und –ziel

Bei dieser experimentellen Studie wurden humane Pulmonalgefäße (Arterie und Vene) histologisch und immunhistochemisch untersucht. Es sollte zunächst rein deskriptiv der Aufbau der Pulmonalgefäße beschrieben und im Anschluss die Ergebnisse der Studien- und Kontrollgruppe verglichen werden. Zusätzlich wurden die Präparate hinsichtlich der Verteilung vasomodulierender Faktoren (ETAR, ETBR und PDE-5) verglichen. Die zentrale Fragestellung bei diesen Untersuchungen stellte hierbei die Veränderung des Gefäßaufbaus und der Rezeptorenverteilung dar bei dem Vergleich gesunder (Kontrollgruppe), bei einer Lobektomie im Rahmen der Bronchialkarzinomtherapie entnommener, und pathologischer (Studiengruppe) Pulmonalgefäße, welche im Zuge einer Lungentransplantation entnommen wurden. Die Lungentransplantation bedeutet bei vielen schwerwiegenden Lungenerkrankungen, wie Mukoviszidose, Lungenfibrose, COPD oder pulmonaler Hypertonie, die finale Therapieoption und bedingt so eine weit fortgeschrittene Lungenpathologie. [39]

Vorarbeiten und Parallelstudien unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hofmann der Abteilung Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Regensburg beschäftigten sich mit der Reagibilität von humanen Pulmonalgefäßen in einem ex - vivo – in - vitro -Modell, einem sogenannten Organbad. Auch hier wurden Gefäße von Bronchialkarzinompatienten und Lungentransplantationskandidaten analysiert. Sie wurden kurz nach der Entnahme, noch vital, in einem eine physiologische Umgebung simulierenden Organbad untersucht. Gemessen wurden Vasotonus und Kontraktion unter vasomodulierenden Substanzen, wie Noradrenalin und Endothelin, mit und ohne Einfluss von tonusregulierenden Medikamenten, wie Endothelinantagonisten und PDE-5 - Hemmern. Ziel dieser Studien ist es, an humanem Zielgewebe Hinweise für eine effizientere Therapie, bzw. Medikamentenkombination für pulmonalarterielle Hypertonie zu finden. [5, 3, 4] Ausführlich beschrieben wird diese Methodik im Rahmen der Dissertationsarbeit meiner Laborkollegin Leonie Englert. [6]

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich die beiden grundlegenden Fragen dieser Dissertationsarbeit.

1. Wie erscheinen die untersuchten Gefäße morphologisch und zeichnen sich Unterschiede zwischen „lungengesunden“ und „lungenpathologischen“ Pulmonalgefäßen ab?
2. Können durch immunhistochemische Methoden Unterschiede in der Expression vasomodulierender Strukturen erfasst werden?

7. Ergebnisse

7.1. Ergebnisse der allgemeinen Histologie

Die Analyse der zu untersuchenden Gefäße ergab anhand der kleinen Stichproben keine statistisch signifikanten Ergebnisse, im Folgenden werden die Unterschiede deshalb rein deskriptiv erläutert.

7.1.1. Arterien

Die arteriellen Gefäße der beiden Gruppen zeigten bei der allgemeinhistologischen Beurteilung vor Allem bei der Morphologie der Intima Unterschiede. Die Ausbildung eines subintimalen Gewebes („Neointima“) war bei der Studiengruppe bei 14/14 Gefäßen, also 100 %, bei den Kontrollgefäßen bei 10/12, also 85 %, vorhanden. Das Remodeling der pathologischen Gefäße war wesentlich stärker ausgeprägt, was zum einen anhand der Dicken der Intima, zum anderen anhand der neu eingewanderten glatten Muskelzellen erkennbar war. Des Weiteren zeigten sich die pathologischen Gefäße stärker vaskularisiert, mit teilweise ebenso veränderten Vasa Vasorum. Veränderung in der Adventita wurden durch das in der Studiengruppe vermehrte Auftreten glatter Muskelzellen in dieser Schicht erkennbar. Das Auftreten atheromatöser Veränderungen, sowie die Diskontinuität des Endothels zeigten im Vergleich beider Gruppen keinen Unterschied.

Eine Auswahl der erfassten Pathologien zeigen Abb. 17– 21.

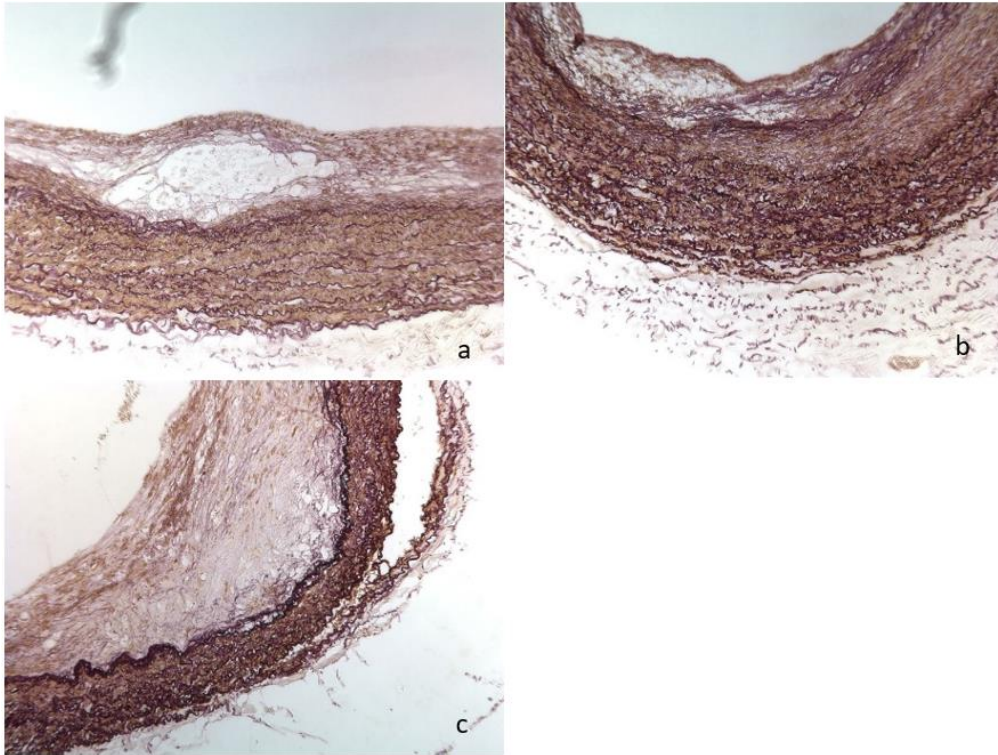


Abbildung 17: SMA-Elastica Färbung ;Atheromatöse Veränderungen von Pulmonalarterien unterschiedlicher Ausprägungen

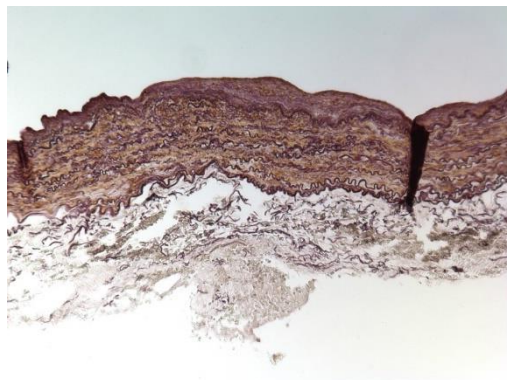


Abbildung 18: SMA-Elastica Färbung ; auch in der Intima einer Pulmonalarterie zeigt sich eine immunhistochemische Anfärbung, typisch für glatte Muskelzellen

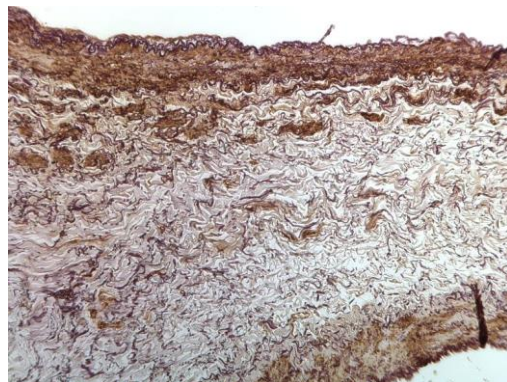


Abbildung 19: SMA-Elastica-Färbung; Einsprossung glatter Muskelzellen in das Adventitiagewebe einer Pulmonalarterie

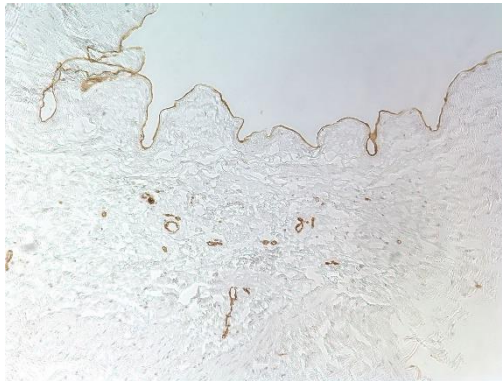


Abbildung 20: CD31-Färbung einer Pulmonalarterie mit Darstellung eines vermehrten Aufkommens von Vasa Vasorum

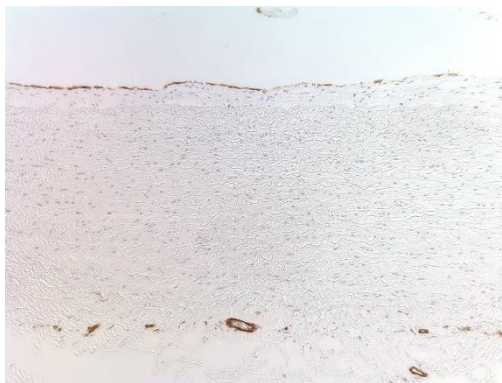


Abbildung 21: CD31-Färbung einer Pulmonalarterie mit Darstellung von Unterbrechungen des Endothels

Pathologien Pulmonalarterien	Kontrollgruppe	Studiengruppe
Intimaproliferation	10/12 = 83%	14/14 = 100%
Leicht	3	3
Mittel	7	9
Stark	0	2
Atheromatöse Veränderungen	3/12 = 25%	3/14 = 21%
Einsprossung SMC in Intima	6/12 = 50%	10/14 = 71%
Einsprossung SMC in Adventitia	0/12 = 0%	10/14 = 71%
Vermehrte VV	2/12 = 17%	6/14 = 43%
Kontinuierliches Endothel	5/12 = 42%	6/14 = 43%

Tabelle 8: Allgemeine Pathologien der Pulmonalarterien im Vergleich

Des Weiteren konnten bei sechs der pathologischen Gefäße ein intraluminaler Thrombus ($6/14 = 43\%$) sowie bei zwei der pathologischen Gefäße eine Aufsplitterung der inneren elastischen Gefäßschicht ($2/14 = 14\%$) beobachtet werden. (s. Abb. 22 und 23) Bei den physiologischen Gefäßen konnten keine Thromben (0%) und einmalig eine Aufsplitterung der Membrana elastica interna ($1/12 = 8\%$) beobachtet werden.

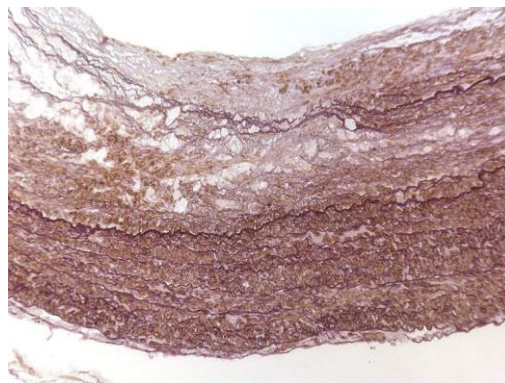


Abbildung 22: SMA-Elastica Färbung; Aufsplitterung der Membrana elastica interna bei einer Pulmonalarterie

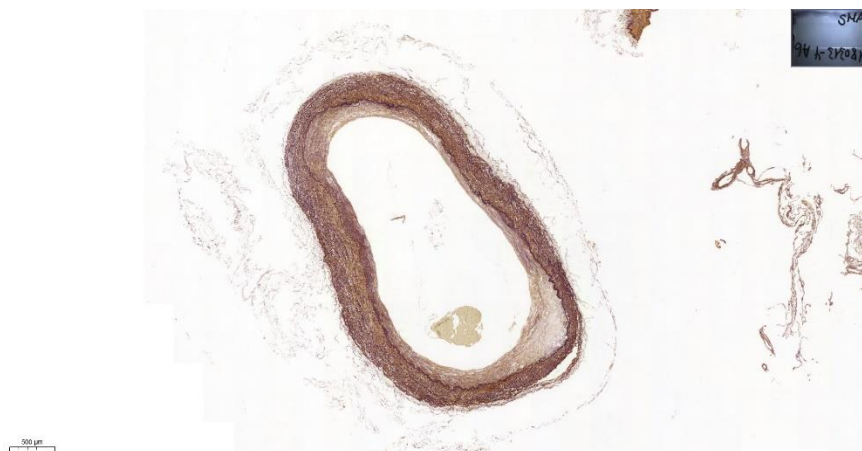


Abbildung 23: SMA-Elastica Färbung; Darstellung eines intraluminalen Thrombus bei einer Pulmonalarterie

Die Berechnung der Flächenverhältnisse der beiden Gruppen ergab bei den pathologischen Gefäßen im Median ein Intima/Media-Verhältnis von 0,33 und bei den physiologischen Kontrollgefäßen ein Verhältnis von 0,24. So kann rein rechnerisch ein Unterschied im Dickenzuwachs der Intima bei den pathologischen Gefäßen verzeichnet werden.

Berechnungen der anteiligen Mediadicke im Hinblick auf die Gesamtschichtdicke (die Adventitia eingeschlossen) waren aufgrund der nicht en-block-entnommenen Gefäße nicht sicher möglich. Als Anhalt für die Mediaproliferation wurde der Anteil der Media

zur Gesamtfläche (inklusive Lumenfläche) berechnet. Dies war jedoch nur bei einem Teil der Gefäße möglich, da bei vielen keine kompletten Gefäßringe und/ oder deformierte Anschnitte vorlagen. Alle untersuchten arteriellen Gefäße gaben nach der Methode von Dail und Hammar Hinweise auf eine Mediahypertrophie [37]. Im Median zeigte sich ein Prozentanteil der Media an der Gesamtfläche in der Kontrollgruppe von 29,9 % und in der Studiengruppe von 31,8 %.

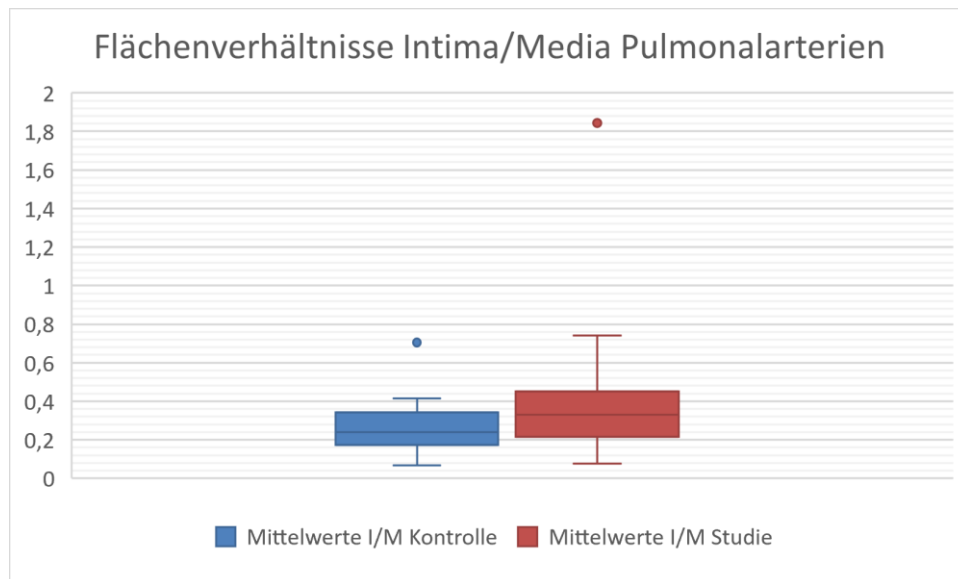


Abbildung 24: Flächenverhältnisse Intima/ Media der Pulmonalarterien im Vergleich Kontrolle vs. Studiengruppe

7.1.2. Venen

Die Betrachtung zugehöriger Pulmonalvenen stellte sich teils problematisch dar, da sich bei ca. der Hälfte der intraoperativ als Venen entnommenen Gefäße herausstellte, dass es sich um arterielle Gefäße handelte. Deshalb konnten hier nur sechs Venen der Kontrollgruppe und acht der Studiengruppe untersucht werden. Es ergab sich im Vergleich in der Morphologie der Intima, hinsichtlich der Dicke und des Ausbildens von subintimalem Gewebe ein Unterschied. Bei den gesunden Gefäßen kam ein solcher Umbau bei keinem der Gefäße, bei den pathologischen Gefäßen bei der Hälfte vor. Die anderen Analysemerkmale ergaben keine erwähnenswerten Unterschiede.

Pathologien Pulmonalvenen	Kontrollgruppe	Studiengruppe
Intimaproliferation	0/8 = 0%	3/6 = 50%
Leicht	0	1
Mittel	0	1
Stark	0	1
Atheromatöse Veränderungen	1/8 = 12,5%	1/6 = 17 %
Einsprossung SMC in Intima	1/8 = 12,5%	0/6 = 0%
Einsprossung SMC in Adventitia	5/8 = 62,5%	4/6 = 67%
Vermehrte VV	2/8 = 25%	1/6 = 17%
Kontinuierliches Endothel	2/8 = 25%	3/6 = 50%

Tabelle 9: Allgemeine Pathologien der Pulmonalvenen im Vergleich

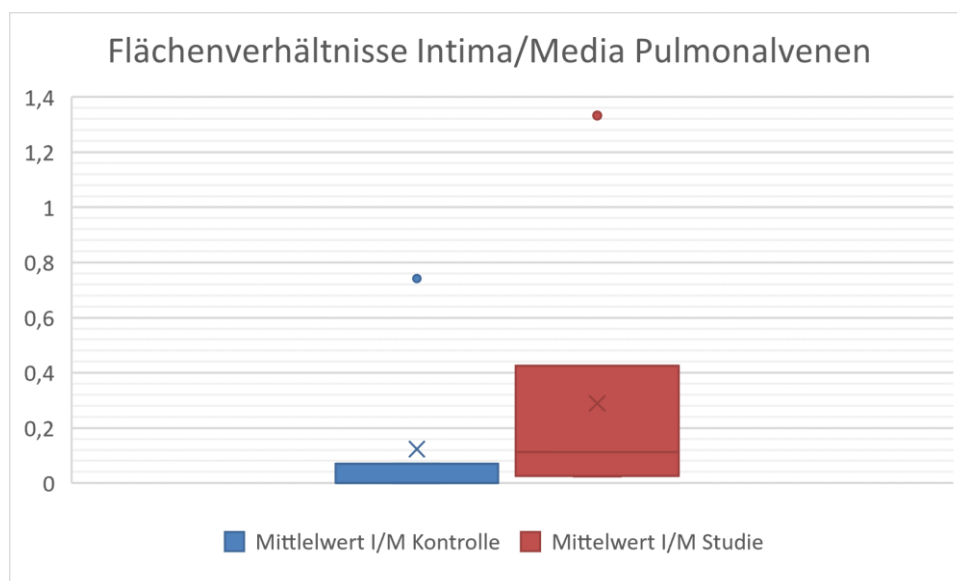


Abbildung 25: Flächenverhältnisse Intima/Media der Pulmonalvenen im Vergleich Kontrolle vs. Studiengruppe

7.2. Ergebnisse der Immunhistologie

Bei allen Untersuchungen im Folgenden wurden die Farbintensität der Gefäße von zwei verblindeten Untersuchern bewertet, um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Anschließend wurden im Fall unterschiedlicher Bewertungen der Mittelwert der Zahlenwerte gebildet und verwertet.

7.2.1. Verteilung der Endothelinrezeptoren

7.2.1.1. Endothelin-A-Rezeptoren

7.2.1.1.1. Arterien

Der Vergleich der Verteilung der Endothelin-A-Rezeptoren bei den Pulmonalarterien ergab in der Gesamtschau eine leicht verminderte Expression bei den pathologischen Gefäßen. Die Intima zeigte bei beiden Gruppen die stärkste Expression, aber auch die größte Varianz in den Anfärbewerten. Im Median erschien der IRS-Wert bei den pathologischen Gefäßen in der Intima auf 5,5 im Vergleich zu 8 bei der Studiengruppe am stärksten vermindert. Die Expression der ETAR in der Neointima kann durch den IRS-Median von 4,5 bei beiden Gruppen als unverändert gewertet werden. Wobei zu beachten ist, dass in der Kontrollgruppe nicht immer die Ausprägung einer Neointima zu verzeichnen war. Die Verminderung in der Media zeigte sich um ca. 1,3 IRS-Punkte im Median von 6,5 bei Kontroll- zu 5,375 bei der Studiengruppe. (s. Abb. 26 und 27; die horizontale innerhalb der Kastengrafik zeigt den Medianwert innerhalb des untersuchten Bereichs an, das Kreuz den Mittelwert)

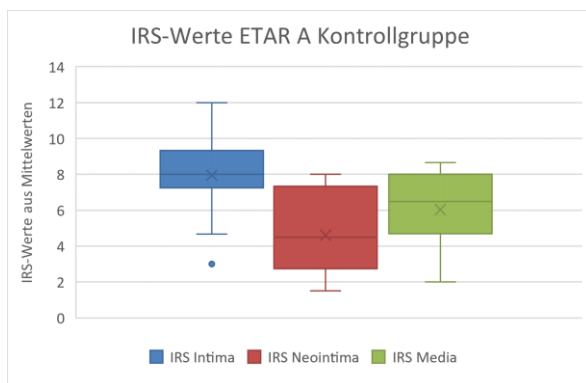


Abbildung 26: Mediane der IRS-Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe

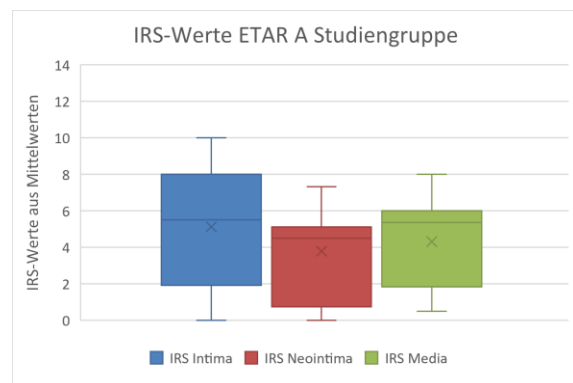


Abbildung 27: Mediane der IRS-Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe

7.2.1.1.2. Venen

Bei den entsprechenden Färbungen der Pulmonalvenen konnte eine verminderte Anfärbung der Intima verzeichnet werden. Der IRS der Kontrollgruppe ergab in der Intima eine Expression von 10,7, in der Studiengruppe 8. Die Anfärbung der Media erschien in beiden Gruppen sehr ähnlich, laut eines IRS von im Median 7 konnte eine dezent verminderte Expression in der Studiengruppe im Vergleich zu Kontrolle, mit einem IRS von 8, detektiert werden. Eine Neointima fand sich nur bei drei Gefäßen

der Studiengruppe, weswegen kein Vergleich möglich war. Der IRS ergab im Median 4, was im Vergleich zu den anderen Schichten, für eine schwächere Expression spricht. (s. Abb. 28 und 29)

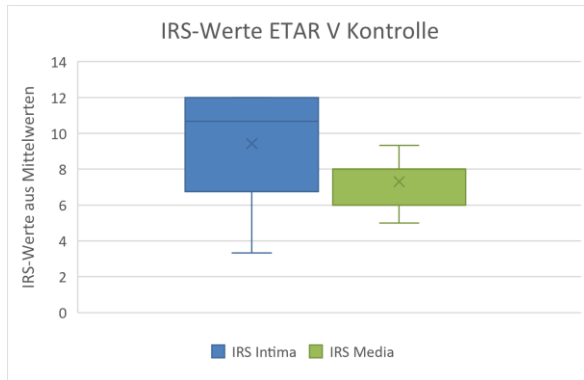


Abbildung 28 Mediane der IRS Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe

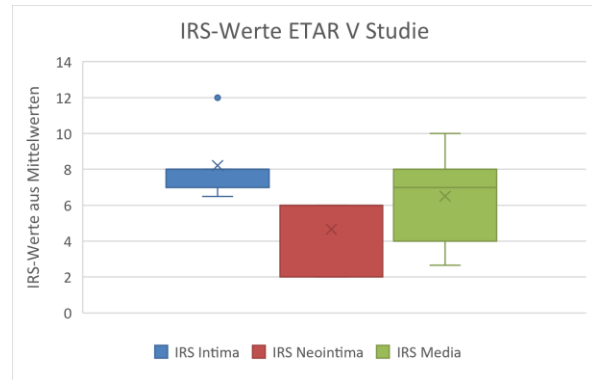


Abbildung 29: Mediane der IRS Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe

7.3. Endothelin-B-Rezeptoren

7.3.1. Arterien

Der Vergleich der Verteilung der Endothelin-B-Rezeptoren bei den Pulmonalarterien ergab im Median in Intima und Neointima kaum Unterschiede. Die IRS-Mediane beliefen sich bei der Intima in der Kontrollgruppe auf 9 im Vergleich zu 9,2 bei der Studiengruppe. Bei der Neointima ergaben die Mediane 8,3 in der Kontroll- und 8,7 bei der Studiengruppe. Nur die Expression von ETBR in der Media erschien bei den Studiengefäßen im Vergleich zur Kontrolle leicht vermindert. Die IRS-Mediane ergaben in der Kontrolle 9,7 in der Studie 8. (s. Abb. 30 und 31, die horizontale innerhalb der Kastengrafik zeigt den Medianwert innerhalb des untersuchten Bereichs an, das Kreuz den Mittelwert). Auffällig im Allgemeinen war eine größere Streuung in der Anfärbung der Intima der Studienkohorte. Bei der Anfärbung der Neointima gilt es zu beachten, dass nicht alle Kontrollgefäße eine Ausbildung neointimalen Gewebes aufwiesen und somit nicht beurteilt werden konnten.

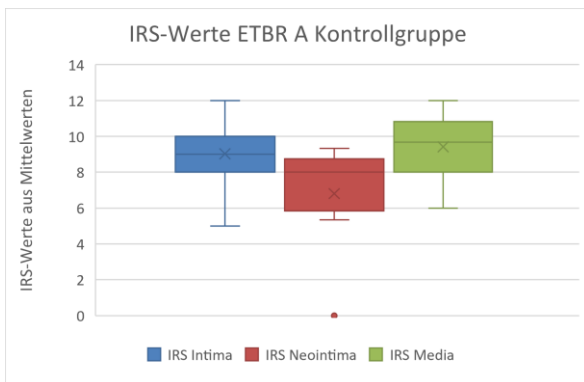


Abbildung 30: Mediane der IRS-Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe

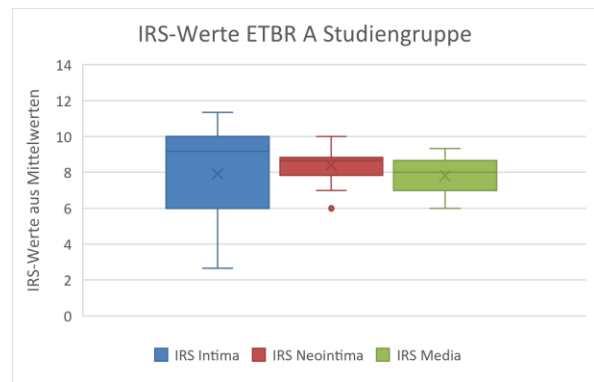


Abbildung 31: Mediane der IRS-Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe

7.3.1.1. Venen

Bei den Pulmonalvenen erschienen die IRS-Werte der ETBR-Färbung in der Intima im Median in der Studie um 3 IRS-Punkte, von 9 in der Kontrolle auf 12 in der Studie, erhöht. Die Anfärbung der Media erschien in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Der IRS der Media in der Kontrollgruppe wies einen Punktwert von 10,3 und in der Studiengruppe von 9 auf. Somit wurde rein rechnerisch eine dezente Verminderung detektiert. Eine Ausprägung neointimalen Gewebes konnte nur bei der Studiengruppe erfasst werden. Für die Neointima wurde ein IRS von 8 berechnet, die Anfärbung befand sich somit auf ähnlichem Niveau, wie der Median der Studiengruppe. Dabei gilt es zu beachten, dass nur bei drei von sieben Gefäßen eine Proliferation der Intima vorlag. (vgl. Abb. 32 und 33)

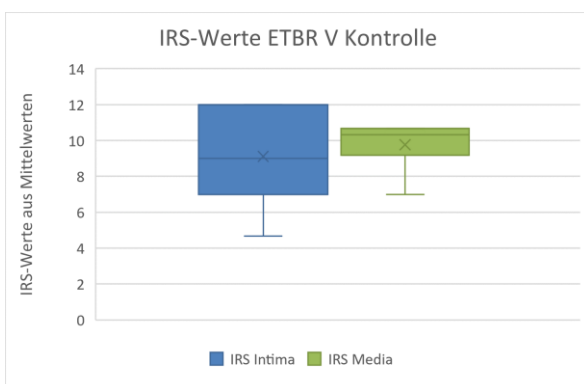


Abbildung 32: Mediane der IRS Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe

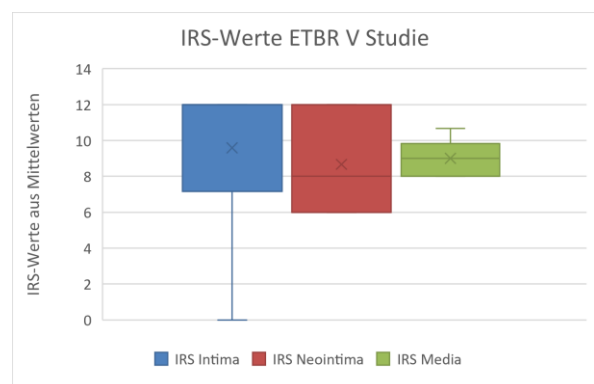


Abbildung 33: Mediane der IRS Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe

7.4. Verteilung der Phosphodiesterase 5

7.4.1. Arterien

Die Verteilung der Phosphodiesterase 5 erschien in Kontroll- und Studienkohorte sehr ähnlich. Die Intima wies in beiden Gruppen die stärkste Expression auf, Bei der Kontrolle einen IRS-Median von 4,75 gegenüber 5,25 bei der Studie. Neointima und Media färbten sich in beiden Gruppen auf ziemlich gleichem Niveau, Neointima 4,2 gegenüber 4,25 und Media 4,5 gegenüber 4,75. Generell zeigte sich die Anfärbung der PDE-5 schwächer als bei den Endothelinrezeptoren. Die Streuung der IRS-Werte zeigte sich bei der Kontrollgruppe tendenziell größer (s. Abb. 34 und 35, die horizontale innerhalb der Kastengrafik zeigt den Medianwert innerhalb des untersuchten Bereichs an, das Kreuz den Mittelwert). Bei der Anfärbung der Neointima gilt es zu beachten, dass nicht alle Kontrollgefäße eine Ausbildung neointimalen Gewebes aufwiesen und somit nicht beurteilt werden konnten.

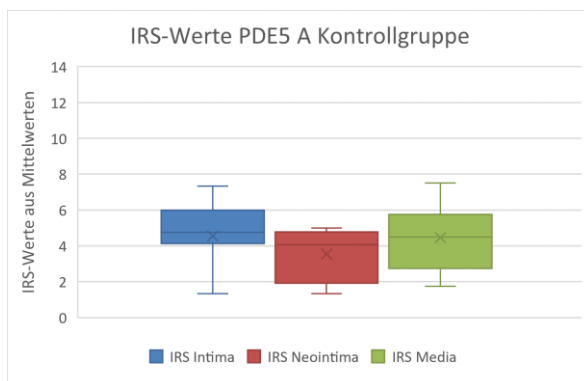


Abbildung 34: Mediane der IRS-Werte für die PDE-5-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe

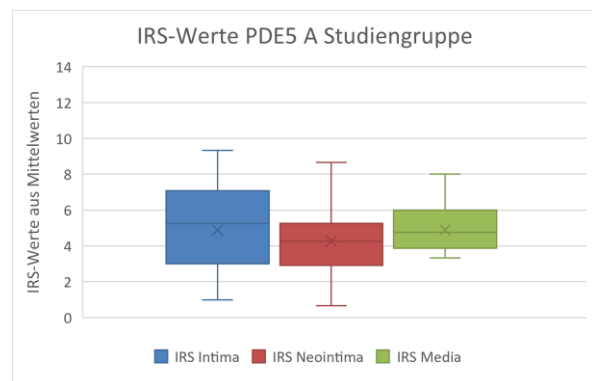


Abbildung 35: Mediane der IRS-Werte für die PDE-5-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe

7.4.2. Venen

Bei den Pulmonalvenen erschienen die IRS-Werte der PDE-5-Färbung in der Intima im Median in der Studie um ca. 3 IRS-Punkte erhöht, von 3,3 in der Kontrolle auf 6,0 in der Studie. Die Anfärbung der Media erschien in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Der IRS der Media in der Kontrollgruppe wies einen Punktwert von 4,0 und in der Studiengruppe von 4,5 auf. Eine Ausprägung neointimalen Gewebes konnte nur bei der Studiengruppe erfasst werden. Für die Neointima wurde ein IRS von 2 berechnet, die Anfärbung befand sich somit auf einem sehr niedrigen Niveau. Dabei

gilt es zu beachten, dass nur bei drei von sieben Gefäßen eine Proliferation der Intima vorlag (vgl. Abb. 36 und 37).

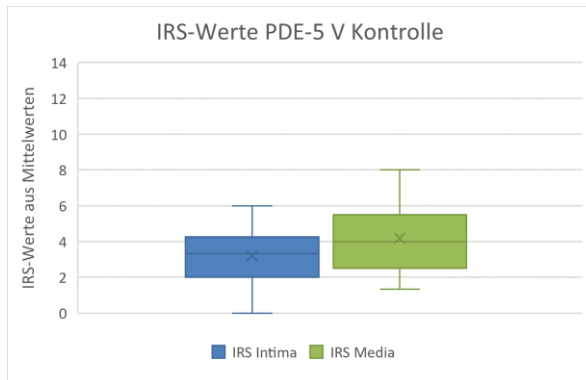


Abbildung 36: IRS-Wert-Mediane für die PDE-5-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe

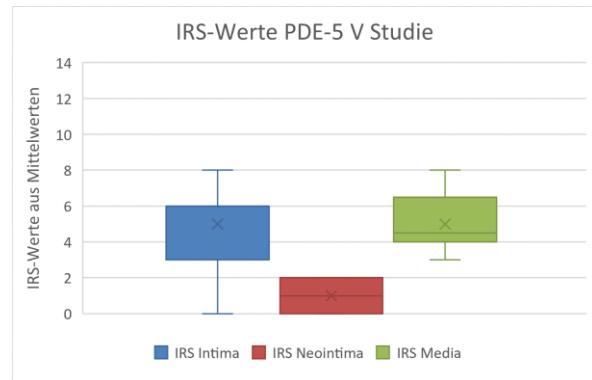


Abbildung 37: IRS-Wert-Mediane für die PDE-5-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe

7.5. Analyse der Patientendaten

Die Daten der verblindet untersuchten Patienten und Patientinnen wurden im Nachhinein von den Kliniken, in denen die Eingriffe durchgeführt wurden, akquiriert. Von Interesse erachteten wir dabei, die Alters- und Geschlechtsverteilung, die Primärdiagnosen für die Indikationsstellung der Transplantation bzw. Lobektomie und wenn vorhanden, den pulmonal arteriellen Druck. Bei drei Gefäßen war es leider nicht möglich im Nachhinein die entsprechenden Daten zu erhalten. Durch die Invasivität der Pulmonalgefäßdruckmessung, konnten wir nur bei drei von 14 Gefäßen eine Aussage darüber erhalten, ob der mPAP erhöht war, bei zwei Patienten war einen PAH bekannt, ein Patient wies einen grenzwertig erhöhten Druck von 21 mmHg auf. Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten war, wie in Abb. 38 dargestellt, bei der Studiengruppe 3/8, 27 % weiblich, 73 % männlich, und in der Kontrollgruppe 6/8, 43 % weiblich, 57 % männlich. Die Altersverteilung ergab in der Studiengruppe einen Mittelwert von 58,07 Jahren und in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von 70,82. Als Primärdiagnosen wies die Studiengruppe eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen auf (eine IPAH, zwei COPD, vier interstitielle Lungenerkrankungen (unterschiedliche Ätiologie), drei Lungenemphyseme, zwei Lungenfibrosen, eine Lymphangioliomyomatose). Bei der Kontrollgruppe wiesen 11 der 14 untersuchten Patienten eine maligne entzündliche Veränderung in der Lunge als Eingriffsursache auf, bei drei Gefäßen wurde die Ursache nicht gesichert, aufgrund des Studiendesigns

kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich auch bei diesen Gefäßen bei der Primärdiagnose um einen malignen Prozess handelte.

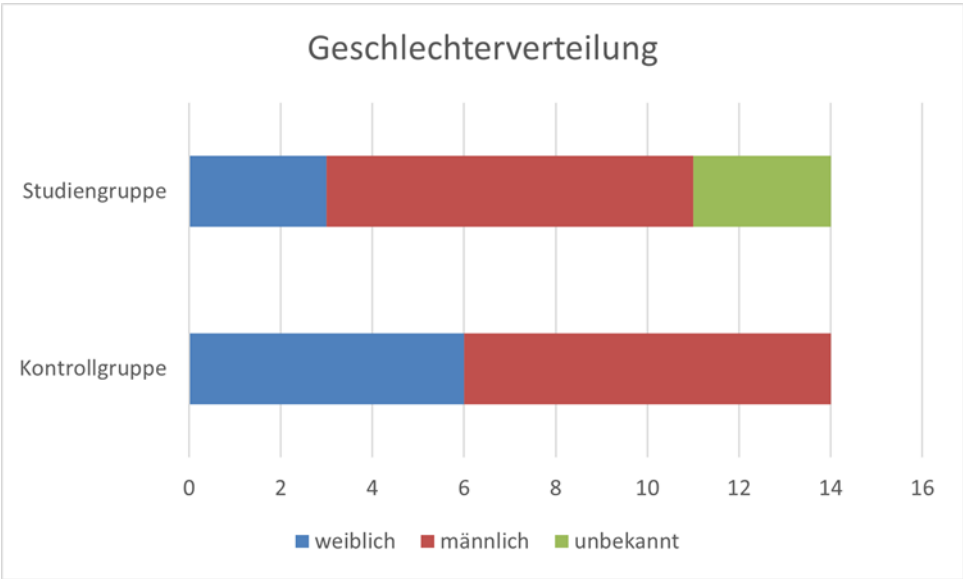


Abbildung 38: Überblick über die Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

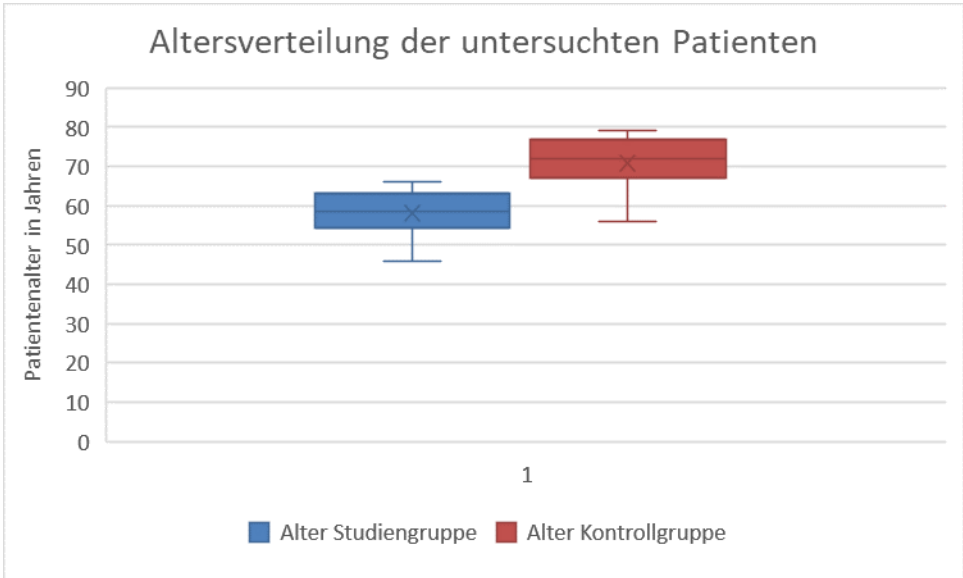


Abbildung 39: Altersverteilung der untersuchten Patientinnen und Patienten

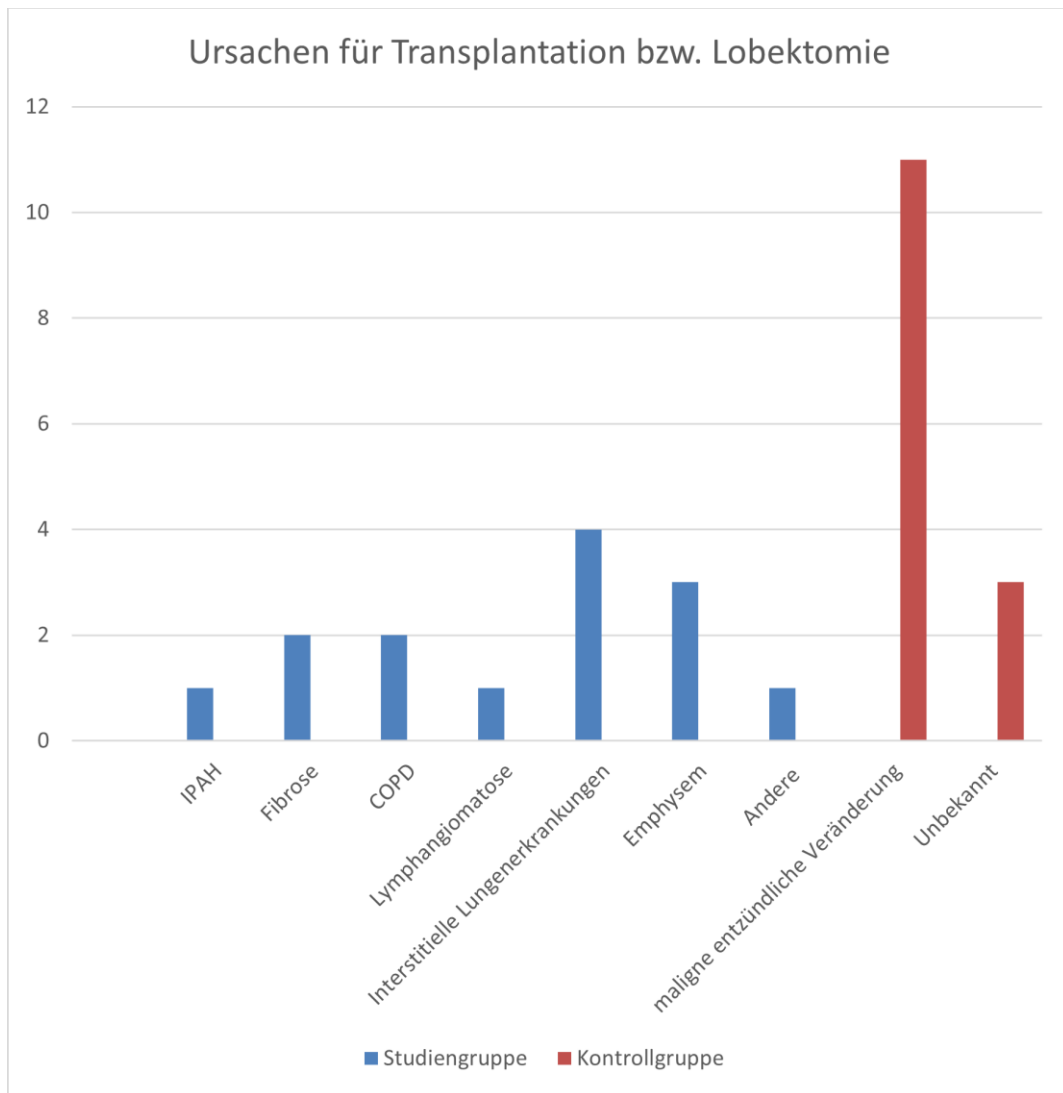


Abbildung 40: Überblick über die Ursachen für Transplantation bzw. Lobektomie

8. Diskussion

Diese Promotionsarbeit untersuchte, inwiefern sich fortgeschrittene Lungenpathologien auf die Morphologie der Lungengefäße auswirken können. Im speziellen, inwiefern sich im Vergleich zu lungengesunden Gefäßen, typische Pathologien der Pulmonal Arteriellen Hypertonie finden lassen. Außerdem wurde die Expression vasomodulierender Faktoren, wie ET-1-Rezeptoren und PDE-5, vergleichend zwischen diesen zwei Gruppen untersucht. Diese Arbeit ist eine der wenigen experimentellen Studien, bei der die Morphologie und die Expression vasomodulierender Faktoren bei fortgeschrittenen Lungenerkrankungen direkt an humanen Pulmonalgefäßen durchgeführt werden konnte. Bei den untersuchten Gefäßen lagen unterschiedliche Lungenerkrankung im Endstadium vor, die eine Lungentransplantation notwendig machten. Bei den Vergleichsgefäßen handelte es sich um Pulmonalarterien und -venen, die im Rahmen einer Lobektomie, aufgrund einer Karzinomerkrankung in der Peripherie des Lungenlappens, entnommen wurden. Da hier keine terminale vaskuläre Erkrankung vorlag, konnte von „vaskulär-gesunden“ Patienten gesprochen werden und diese als physiologische Kontrollgruppe eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Promotionsarbeit bestätigen, dass im Vergleich Unterschiede zwischen pathologischen und physiologischen Gefäßen zu verzeichnen waren.

Zunächst wurde die allgemeine, histologische Erscheinung bewertet. Hier zeigte sich bei den Pulmonalarterien insbesondere ein Unterschied in Häufigkeit und Ausprägung der Intimaproliferation und der Ausbildung neointimalen Gewebes. Dies ist eine typische Veränderung, die im Rahmen des Gefäßremodelings bei PAH auftritt [11. 20. 24, 37, 40] und das zweite Stadium der Stadieneinteilung nach Houser et al. definiert [23]. Die Analyse der Muskelschicht ergab bei allen untersuchten Gefäßen beider Gruppen eine Mediahypertrophie, was nach Houser et al. dem Stadium I entspricht. Hier konnte kein Unterschied detektiert werden. Auch Stacher et al. fanden in gesunden Gefäßen Anzeichen von PAH-Histopathologien [24], so könnten diese Beobachtungen auch im Rahmen des erhöhten Alters oder als Zufallsbefund bewertet werden. Atheromatöse Veränderungen wurden in beiden Gruppen etwa in gleichem Ausmaß detektiert. Zwar sind diese bei verschiedenen Formen der PH häufig [41, 37], jedoch sind atheromatöse Veränderungen auch ein Zeichen von Atherosklerose und somit eine verbreitete Alterserscheinung, welche nicht zwingend mit einem erhöhten Pulmonalgefäßdruck vergesellschaftet ist [23, 37]. Auch die Häufigkeit einer

diskontinuierlichen Endothelschicht ergab im Vergleich keinen Unterschied. Zwar wird der Kontaktverlust zwischen Intima und Media als mögliche PAH-Pathologie beschrieben [23], allerdings kann dieses Phänomen aufgrund eines häufigen Auftretens als Präparationsartefakt nicht hinreichend bewertet werden. [10] Des Weiteren zeigten sich die pathologischen Gefäße stärker vaskularisiert, mit teilweise ebenso veränderten Vasa Vasorum. Veränderung in der Adventita wurden durch das in der Studiengruppe vermehrte Auftreten glatter Muskelzellen in dieser Schicht erkennbar. Einzelne erfasste Pathologien, wie die Aufsplitterung der Membranae elasticae interna und die Darstellung von intraluminalen Thromben in fast der Hälfte der pathologischen Gefäße, geben zusätzlich Hinweise auf Gefäßveränderungen der pathologischen Gruppe. Das Auftreten intraarterieller Thromben wird häufig im Zusammenhang mit PAH erwähnt [11, 24], so könnte die Häufung in der Studiengruppe ein Hinweis auf erhöhten Pulmonaldruck darstellen. Die Aufsplitterung der MEI wird ebenfalls immer wieder beschrieben im Kontext mit PAH [42] und könnte auch ein Hinweis auf einen zunehmenden Gefäßumbau sein oder sich in das dritte Stadium der PAH laut Houser et al. [23] einordnen lassen.

Alles in allem konnten bei den arteriellen Gefäßen der Studiengruppe vornehmlich Veränderungen des zweiten Stadiums des Remodelings bei PH erfasst werden. Allerdings ließen sich auch Hinweise auf die Stadien I und II finden. Da plexiforme Läsionen sich jedoch nur punktuell in umgebauten Gefäßen finden lassen, kann dies nicht als Ausschluss dieser Pathologie und somit des vierten Remodelingstadiums gewertet werden. Es ist möglich, dass auch ohne den Nachweis einer plexiformen Läsion ein Gefäß im fortgeschrittenem, vierten Stadium vorliegt. [37] Damit bestätigt sich die Vermutung, dass fortgeschrittene Lungenerkrankungen Auswirkungen auf die Gefäßmorphologie haben können. Es fanden sich viele Parallelen zu den Veränderungen im Rahmen einer PAH. So lässt sich auch ohne diagnostizierte Pulmonaler Hypertonie, ein erhöhter Pulmonalgefäßdruck vermuten.

Die Veränderungen der zugehörigen Pulmonalvenen wurden ebenso bewertet, konnten jedoch aufgrund des mangelnden Materials, bedingt durch Verwechslungen im Operationsverlauf und versehentlicher Entnahme arteriellen Gewebes, nicht ausreichend bewertet werden. Exemplarisch lässt sich sagen, dass auch bei den venösen Gefäßen diverse Veränderungen, die im Zusammenhang mit Pulmonaler Hypertonie beschrieben werden, erfasst werden konnten. Beispielsweise war die Einsprossung von glatten Muskelzellen in die Bindegewebsschicht bei pathologischen

Venen vermehrt zu verzeichnen. Dabei konnte ein „nesterhaftes“ Auftreten beobachtet werden, welches bei arteriellen Gefäßen nicht in dem Maße auftrat. Des Weiteren konnte vereinzelt eine Ausbildung neointimalen Gewebes festgestellt werden, welches bei der Kontrollgruppe nicht erfasst werden konnte. Takahashi et al. bestätigten in tierexperimentellen Studien ebenso einen vaskulären Umbau der Lungenvenen nach der Hypoxieexposition, vor allem im Rahmen einer Mediahypertrophie. [43]

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Studie Auftreten und Verteilung von Endothelin-1-Rezeptoren durch immunhistochemische semiquantitative Analysen untersucht. Das häufige Auftreten von ET-1 in der Lunge macht eine Dysregulation des ET-Systems zu einer möglichen Ursache für die Entstehung und das Fortschreiten des erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstands sowie des Gefäßumbaus. [40] Endothelin-1 wird bei primärer Pulmonaler Hypertonie überexprimiert [40, 44], aber auch bei fast allen Formen der PAH konnte eine Überaktivierung des Endothelin-1-Systems im Rahmen einiger Studien nachgewiesen werden. [33, 45] Aktuelle Studien geben zunehmend Hinweis darauf, dass die Blockade von Endothelin-Rezeptoren Einfluss auf den Progress des Gefäßremodelings nehmen könnten. [46] Dies macht die genauere Kenntnis der Verteilung der Endothelin-Rezeptoren für eine optimierte Therapie der PAH so interessant. Grundsätzlich sind ETA-Rezeptoren in den glatten Muskelzellen der Lungengefäße zu finden und vermitteln Kontraktion sowie Proliferation der glatten Muskelzellen und Fibroblasten. [43] Allerdings belegten Hall et al., dass auch Endothelin-A-Rezeptoren im Endothelium von PAH-Patientengewebe nachgewiesen werden konnten. [44] Als ursächlich dafür, dass es zuvor nicht gelungen sei, pulmonale endotheliale ETA-Rezeptoren zu detektieren, vermuteten Hall et al. die Verwendung dicker Kryoschnitte (20 - 30 µm) und ungeeigneter Färbetechniken. [44]

Unsere Untersuchungen zeigten sowohl bei den pathologischen als auch bei den Kontrollgefäßen eine Expression des ETAR in Intima, Neointima und Media, was somit im Einklang der Erkenntnisse von Hall et al. [44] steht. Bei den arteriellen Gefäßen konnte im Allgemeinen eine leicht verminderte Expression des ETAR in Intima und Media erfasst werden, die Neointima zeigte sich auf gleichbleibendem Niveau. Dies lässt sich kontrovers diskutieren. Hall et al. untersuchten an humanem Gewebe von Kindern mit IPAH, dass sich die ETAR-Expression im Endothel schwächer als bei den gesunden Gefäßen und in der glatten Muskulatur der Media ähnlich dem Normalzustand darstellte. [44] Auch Yu et al. zeigten in einer Studie an isolierten glatten Muskelzellen von Patienten mit pulmonaler Hypertonie, dass die ETAR-

Expression tendenziell nahe an der von normalen Kontrollzellen blieb. Allerdings beschrieben sie, dass die ET-1-Rezeptorexpression bei PAH-Patienten im Allgemeinen stärker variierte als bei den Kontrollzellen. Ursächlich für die große Varianz der Rezeptorexpression werteten Yu et al. die verschiedenen Ätiologien der PAH. [47] Die Untersuchung der Gefäße von Lungenfibrose-Patienten ergab laut Yorikane et al. eine Abnahme von ETA-Rezeptoren. [48] Takahashi et al. untersuchten in einem Tiermodell an Pulmonalgefäßen von Ratten, dass eine Hypoxieexposition mit einem Anstieg der Zahl der ETA-Rezeptoren in der Media von pulmonalen Widerstandsarterien einherging. [49]

Bei den Pulmonalvenen konnte bei der Studiengruppe im Vergleich die Anfärbung der ETAR in Intima vermindert und in der Media auf gleichem Niveau dargestellt werden. Hier fehlt ein Vergleichswerk mit humanen Pulmonalvenen von PAH Patienten. Takahashi et al. konnten unter hypoxischen Bedingungen bei Pulmonalvenen von Ratten einen Anstieg von Endothelin-1-Rezeptoren feststellen. [43] Somit besteht hier ein Widerspruch diesen Ergebnissen, was sich, durch eine große Varianz an Grunderkrankungen begründen ließe. Des Weiteren gilt es auch zu beachten, dass es sich aufgrund der kleinen Kohorte bei unserer Studie um deskriptive und exemplarische Ergebnisse handelt.

ETB-Rezeptoren werden in Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und können entweder Relaxation oder Kontraktion verursachen. [43] Die semiquantitativen Analysen unserer Studie ergaben bei dem Vergleich der Verteilung der Endothelin-B-Rezeptoren bei den Pulmonalarterien im Median in Intima und Neointima kaum Unterschiede zur Kontrollgruppe. Nur die Expression von ETBR in der Media erschien bei den Studiengefäßen gegenüber der Kontrolle leicht vermindert. Hall et al. untersuchten an humanem Gewebe von Kindern mit IPAH, dass sich die ETB-Expression bei unbehandelten Kindern in der Intima leicht, aber nicht signifikant schwächer als bei normalen Kindern und in der Media deutlich erhöht zeigte [44]. Soma et al. beschrieben eine Zunahme von ETBR bei Pulmonalarterien in der Intima und Media unter Hypoxie, konnten jedoch keine statistisch signifikanten Daten erheben. [49] Yu et al. zeigten hingegen eine tendenziell verringerte Expression von ETBR in glatten Muskelzellen von PAH-Pulmonalarterien. Beschrieben jedoch auch eine große Varianz der Ergebnisse. [47] Somit lässt sich bei den Endothelin-B-Rezeptoren eine Einordnung unserer Ergebnisse nur schwer zielführend durchführen. Grundsätzlich gilt es der Veränderung der ETBR-Expression bei der Betrachtung

hinsichtlich neuer Therapieverfahren eine eher untergeordnete Rolle zuzusprechen. Zwar könnten die antiproliferative und vasodilatatorische Wirkung im Endothel durch eine vermehrte Expression verstärkt und damit möglicherweise Einfluss auf den Krankheitsverlauf der PAH genommen werden [49], jedoch zeigten diverse tierexperimentelle Studien, dass die selektive Blockade der ETAR wesentlich wirksamer erscheint und sogar die Entwicklung einer hypoxischen pulmonalen Hypertonie bei Ratten fast vollständig verhindern konnte [50, 49].

Die Betrachtung der zugehörigen Pulmonalvenen ergab eine vermehrte ETBR-Färbung in der Intima und eine Mediafärbung auf ähnlichem Niveau im Vergleich zwischen Studie und Kontrolle. Auch hier mangelt es an Vergleichsstudien, weswegen zwei tierexperimentelle Studien herangezogen werden, bei der die ETBR-Expression unter hypoxischen Bedingungen untersucht wurde. Soma et al. konnten keine signifikanten Änderungen in der Expression der ETBR verzeichnen. [49] Eine Studie von Takahashi et al. beschrieb hingegen eine verstärkte Immunreaktivität auf ETBR [43], was sich mit unseren Ergebnissen, zumindest hinsichtlich der Expression in der Intima, vereinbaren ließe. Genauere Angaben zur ETBR-Verteilung in Pulmonalvenen gibt es bis dato nicht.

Unserem Untersuchungsmaterial liegen verschiedene Erkrankungen zugrunde, trotzdem scheinen sich im Vergleich mit Arbeiten anderer Forschungen am ehesten Veränderungen im Sinne der Pulmonalen Hypertonie zu zeigen. Dennoch ist eine generelle Varianz möglich, da die ETR-Expression durch eine Vielzahl von Stimuli wie beispielsweise Zytokinen moduliert werden kann [48]. Im Allgemeinen gibt es bisher keine große Anzahl Studien an menschlichem Gewebe. Dort besteht weiterhin Forschungsbedarf, um deskriptive Studien zu ergänzen und mit größerem Patientenkollektiv statistisch signifikante Aussagen treffen zu können.

Des Weiteren wurde die Verteilung von Phosphodiesterase-5 in unseren Gefäßen untersucht. PDE-5 verantwortlich für den Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat [34]. cGMP ist ein wichtiger Mediator zur Relaxation glatter Muskelzellen und führt in den Pulmonalgefäßen zur Vasodilatation. Ein reduzierter Abbau bedingt eine verlängerte Wirkung des cGMP und so eine langanhaltendere Gefäßerweiterung. [16] Wharton et al. zeigten im Rahmen einer Studie, dass die PDE-5 in distalen PSMCs und umgebauten Lungenarterien exprimiert wird und untermalten außerdem, dass eine chronische PDE-5-Hemmung bei Patienten mit schwerer pulmonaler Hypertonie eine antiproliferative Wirkung haben könnte.[51] Dies

macht Expression und Verteilung der PDE-5 in Pulmonalgefäßen zu einem interessanten Forschungsobjekt hinsichtlich PAH-Therapien.

In unseren Untersuchungen erschien die Verteilung der PDE-5 in Kontroll- und Studienkohorte sehr ähnlich. Die Intima wies in beiden Gruppen die stärkste Expression auf, generell zeigte sich die Anfärbung der PDE-5 schwächer als bei den Endothelinrezeptoren. Die Streuung der IRS-Werte zeigte sich bei der Kontrollgruppe tendenziell größer. Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bisherigen Studien, bei denen bei erhöhtem Pulmonaldruck mehrfach eine erhöhte Expression von PDE-5 in Pulmonalarterien nachgewiesen werden konnte. [52, 53, 51] Generell wird die PDE-5 in der Literatur hauptsächlich als ein Enzym der glatten Muskulatur beschrieben [51, 54, 52], konnte bei uns aber auch im Endothel nachgewiesen werden.

Bei den Pulmonalvenen erschien die PDE-5-Färbung in der Intima im Median in der Studie erhöht und in der Media auf ähnlichem Niveau. Hierfür fanden sich keine Vergleichswerke, aber in Anlehnung an die Tendenzen der Pulmonalvenen bei PAH bei den Endothelinrezeptoren, wäre von einer ähnlichen Expression der Venen gegenüber den Arterien auszugehen. Daher müssten wir von einer verstärkten Expression ausgehen, die sich bei uns nur in der Intima verzeichnen ließ. Die naheliegendste Begründung für diese Abweichung von bisherigen Beobachtungen scheint die Vielfalt der Grunderkrankungen der lungentransplantierten Patienten zu sein. Zusätzlich wären Fehler in der Durchführung des Färbeprotokolls denkbar. Die Varianz der Konservierungsdauer in Formalin, bedingt durch die zeitlich versetzte Verfügbarkeit der Pulmonalgefäße, könnte zusätzlich Einfluss auf die Färbungsintensität genommen haben. Weitere Untersuchungen und größere Kohorten könnten hier weiter Aufschluss gewähren.

Der Vergleich der Patientendaten zeigte ein Verhältnis von weiblichen zu männlichen in der Studiengruppe von 3:8 und in der Kontrolle 6:8. Die Geschlechtsverteilung zu bewerten ist anhand der kleinen Kohorte schwer möglich. Grundsätzlich wäre bei einer PAH eine weibliche Prä-Dominanz zu erwarten [37], bei uns dominierten jedoch männliche Patienten. Die Altersverteilung ergab in der Studiengruppe einen Mittelwert von 58,07 Jahren und in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von 70,82. Zwischen 2012 und 2014 waren lungentransplantierte Patienten bei dem Eingriff im Schnitt 54 Jahre alt [12], das mittlere Erkrankungsalter an Lungenkrebs lag 2018 bei Frauen bei 69, bei Männern bei 70 Jahren [55]. Hiermit lassen sich unserer Patientendaten korrelieren.

Unsere Arbeit weist einige Limitationen auf. Wie schon im Ergebnisteil angemerkt, können unsere Daten keine statistisch signifikanten Aussagen generieren. Aufgrund des schwer erhältlichen Untersuchungsmaterials konnte im Rahmen dieser Arbeit keine ausreichend große Kohorte untersucht werden. Es handelt sich daher um deskriptive Beobachtungen. Außerdem ergaben sich durch die isolierte Entnahme der untersuchten Pulmonalgefäße Beschränkungen der Aussagekraft der gemessenen Schichtdicken. Da es sich nicht um En-Block Gefäße handelt, war es nicht möglich einen Vergleich mit Alveolarsepten oder Umgebungsgewebe anzustellen und die gemessene Dicke zu relativieren. Zusätzlich beschreiben schon Houser et. Al. in ihrem Pathology Atlas, dass die Analyse von Wandschichten durch die Variation der Schnittrichtung sowie Schnittartefakte beschränkt ist. [23] Des Weiteren erscheint die subjektive Bewertung der Anfärbestärke für die IRS-Wert-Bestimmung der Immunhistochemischen Färbungen fehleranfällig, da keine hundertprozentig objektivierbaren Vergleiche angestellt werden können. Außerdem erwies sich die händische Auszählung der positiv angefärbten Zellen als sehr arbeitsintensiv. Zwar war diese Methode ein Weg zur Objektivierung der Ergebnisse und eine Erweiterung der bisherigen Schätzung der Prozentwerte (vgl. Tab. 4: IRS-Berechnung nach Remmele und Stegner [38]), allerdings sehen wir hier eine weitere Optimierungsmöglichkeit. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird im Rahmen nachfolgender Promotionsarbeiten unserer Forschungsgruppe von den Doktoranden Jeremy Benstetter und Nina Käser ein automatisiertes Farbbewertungs- und Auszählungssystem entwickelt. Dies macht die Objektivierung und Auswertung ausreichend großen Patientenkollektiven möglich, um statistisch signifikante Daten zu erheben. Zudem ergab sich durch eine Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg die Möglichkeit alle Objektträger mit einem Slide Scanner zu digitalisieren. Somit können Fehlerquellen hinsichtlich Variationen der Belichtung der Objektträger beseitigt werden und die Bildqualität der Aufnahmen steigt im Vergleich zu den Bisherigen, welche mit einem traditionellen Durchlichtmikroskop erstellt wurden

In den letzten Jahrzehnten konnten viele Erkenntnisse hinsichtlich Ätiologie und Therapien der PAH gewonnen werden. [21] Die Bedeutung vasomodulierender Faktoren und der Einfluss erhöhter Pulmonaldrücke ist allerdings noch nicht weitreichend genug verstanden, um das Potential, vor allem auch hinsichtlich des Einflusses auf die Veränderungen der Gefäßstruktur, auszuschöpfen. Dabei ist

Klärung der Endothelin-Signalwege bei Lungengefäßerkrankungen und der Wechselwirkung mit den Prostazyklin-Signalwegen entscheiden für die Verbesserung der Therapie mit Arzneimitteln, hier ansetzen. [44] Es gibt viele Hinweise darauf, dass in tierexperimentellen Studien gerade die Blockade der ETAR vielversprechend ist, um den Gefäßumbau zu verhindern. [50]. Um dies zu bestätigen sind weiterhin Studien, vor allem an humanem Gewebe, von Nöten. Der steigende Wissensgewinn bezüglich der Bedeutung verschiedener Hormone, wie Östrogene, oder genetischer Veränderungen, wie beispielsweise Mutationen von Tyrosinkinase Inhibitoren oder BMPRII-Gen-Aktivatoren, sind darüber hinaus Ansätze, die die PAH-Forschung zu einem vielversprechenden Forschungsfeld machen. [21]

9. Zusammenfassung

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) wird durch einen dauerhaft erhöhten Pulmonalgefäßdruck definiert und stellt eine progressive, chronische Erkrankung des Lungenkreislaufes dar. [1] Die PAH beeinflusst den Blutfluss in den Pulmonalarterien und -venen sowie im rechten Ventrikel. [2] So kann sie zu Rechtsherzversagen und unbehandelt im Endstadium zum Tode führen. Trotz weitreichender Fortschritte der Therapieoptionen bleibt die pulmonal arterielle Hypertonie eine unheilbare Erkrankung, welche mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden ist und deren finale Therapieoption die Lungentransplantation darstellt. [1]

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, inwiefern sich fortgeschrittene Lungenpathologien auf die Morphologie der Lungengefäße und die Verteilung von vasomodulierenden Faktoren, wie Endothelin-1-Rezeptoren und Phosphodiesterase-5, im Sinne einer PAH auswirken können. Diese Arbeit ist eine der wenigen experimentellen Studien, bei der die Morphologie und die Expression vasomodulierender Faktoren bei fortgeschrittenen Lungenerkrankungen direkt an humanen Pulmonalgefäßen durchgeführt werden konnte.

Segmentpulmonalarterien und -venen zweier verschiedener Patientengruppen wurden vergleichend analysiert. Die Studiengruppe (n=14) stellten Gefäße dar, die bei einer Lungentransplantation im Rahmen schwerwiegender Lungenerkrankungen im Endstadium entnommen wurden. Als Kontrollgruppe dienten Gefäße, die bei einer Lobektomie im Rahmen eines Bronchialkarzinoms entnommen wurden (n=12). Da bei diesen Patienten keine fortgeschrittenen Lungenpathologien festgestellt wurden, konnten diese als „vaskulär-gesunde“ Kontrolle gegenübergestellt werden.

Für die morphologische Analyse wurden verschiedene Färbungen durchgeführt. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur allgemeinen Bewertung, eine immunhistochemische Kombinationsfärbung für Smooth-Muscle-Actin und die Elastica von Giesson-Färbung, zur Darstellung von Muskel- und elastischen Fasern, sowie eine immunhistochemische Anfärbung für CD31, ein typisches Oberflächenantigen für Endothelzellen. Die Untersuchungen zeigten, dass sich vor allem Unterschiede bei der Intimamorphologie der Pulmonalarterien, aber auch der Pulmonalvenen, ergaben. Im Speziellen ließ sich die Ausbildung neointimalen Gewebes, damit eine Verbreiterung der Intimaschicht, und eine pathologische Einsprossung glatter Muskelzellen beobachten. Zusätzlich konnten bei den pathologischen arteriellen Gefäßen vermehrt intraluminale Thromben erfasst werden. Andere typische PAH-Pathologien, wie Mediahypertrophie, atheromatöse Veränderungen oder Diskontinuitäten im Endothel konnten in beiden Gruppen etwa gleich häufig nachgewiesen werden. Diese Pathologien sprechen für Veränderungen, wie sie auch bei einer PAH auftreten und könnten für einen erhöhten Pulmonalgefäßdruck in den pathologischen Gefäßen sprechen. Zur Bewertung der Verteilung der vasomodulierenden Faktoren wurden immunhistochemische Anfärbungen jeweils speziell für Endothelin-A- oder Endothelin-B-Rezeptoren bzw. Phosphodiesterase 5 durchgeführt. Die Analyse der ETAR ergab bei den arteriellen Gefäßen eine leicht verminderte Expression des ETAR in Intima und Media. Bei den Pulmonalvenen war dieser Trend nur in der Intimaschicht beobachtet werden. Vergleichend mit bisherigen Studienergebnissen ergaben sich hier Parallelen zur PAH, was wiederum für einen erhöhten Pulmonalgefäßdruck in den Studiengefäßen sprechen könnte. Die Analyse der ETBR ergab bei der Expression in der Media der arteriellen Gefäße der pathologischen Gefäße eine dezente Verminderung, ansonsten erschienen die Verteilung der Rezeptoren sehr ähnlich. Dies sind kontrovers diskutierbare Ergebnisse, welche sich jedoch auch in bisherigen Studien widerspiegeln, weswegen hier ein großer Forschungsbedarf besteht, um einen einheitlichen Trend zu definieren. Bisher gibt es allerdings Hinweise darauf, dass hinsichtlich vielversprechender Therapieoptionen vor allem der ETAR im Fokus steht, weswegen der weitere Forschungsbedarf vermehrt im weiteren Verständnis der ETAR-Veränderung unter erhöhtem pulmonalarteriellen Druck liegt. [21].

Untersuchungen der PDE-5 ergaben kaum Unterschiede in der Expression der Vergleichsgruppen, hier wäre eine vermehrte Expression in der Muskelschicht zu

erwarten gewesen [51]. Um dies weiter ergründen, sind weitere Forschungen mit entsprechend großer Kohorte wünschenswert.

Alles in allem ergab unsere Studie Hinweise darauf, dass sich bei der Analyse humaner Pulmonalgefäße mit fortgeschrittenen Lungenpathologien Unterschiede zu der „gefäßgesunden“ Vergleichsgruppe verzeichnen ließen. Es fanden sich Zeichen typischer PAH-Pathologien. Darüber hinaus zeigten sich Veränderungen in Rezeptoren und Enzymen, welche eine Rolle in der Pathophysiologie der PAH spielen. Daher stellt die morphologische Bewertung und die Analyse vasomodulierender Faktoren immernoch ein interessantes und vielversprechendes Feld dar. Es sind weitere Forschungen nötig sind, um ein breiteres Verständnis für die Pathologie und Therapieoptionen zu gewinnen, welche nicht nur symptomatisch wirken, sondern auch den Krankheitsprogress beeinflussen könnten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer großen muskulären Arterie.....	8
Abbildung 2: Vergleich des Wandaufbaus Arterien (links) vs. Venen (rechts).....	10
Abbildung 3: Ziel-Signalwege der PAH-Therapie.....	12
Abbildung 4: Verschiedene Histopathologien idiopathischer PAH.....	14
Abbildung 5: Stufenschema für PAH Therapie.....	15
Abbildung 6: Wirkung und Lokalisation der Endothelinrezeptoren.....	16
Abbildung 7: Histopathologische Veränderungen bei PAH: (a) Ausgeprägte Mediahypertrophie; (b) Konzentrische nicht-laminäre Fibrose mit lockerer Verbreiterung der Intima ("Neointima").....	23
Abbildung 8: Messung der Schichtflächen via CaseViewer bei vollständigem Ring.....	24
Abbildung 9: Messung der Schichtflächen via CaseViewer bei unvollständigem Ring.....	24
Abbildung 10: Gefäßwandabmessungen zur quantitativen Bewertung der medialen und intimalen Dicke nach Dail und Hammar.....	25
Abbildung 11: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbstärken der Intima (0 - 3).....	27
Abbildung 12: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbstärken der Neointima (0 - 3).....	28
Abbildung 13: Vergleichsbilder zur Bestimmung der Anfärbstärke der Media (0 - 3).....	28
Abbildung 14: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für ETAR.....	29
Abbildung 15: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für ETBR.....	29
Abbildung 16: 150720_1A ausgezählter Ausschnitt für PDE-5.....	29
Abbildung 17: SMA-Elastica Färbung ;Atheromatöse Veränderungen von Pulmonalarterien unterschiedlicher Ausprägungen.....	32
Abbildung 18: SMA-Elastica Färbung ; auch in der Intima einer Pulmonalarterie zeigt sich eine immunhistochemische Anfärbung, typisch für glatte Muskelzellen.....	32
Abbildung 19: SMA-Elastica-Färbung; Einsprossung glatter Muskelzellen in das Adventitiagewebe einer Pulmonalarterie.....	32
Abbildung 20: CD31-Färbung einer Pulmonalarterie mit Darstellung eines vermehrten Aufkommens von Vasa Vasorum.....	33
Abbildung 21: CD31-Färbung einer Pulmonalarterie mit Darstellung von Unterbrechungen des Endothels.....	33
Abbildung 22: SMA-Elastica Färbung; Aufsplitterung der Membrana elastica interna bei einer Pulmonalarterie.....	34
Abbildung 23: SMA-Elastica Färbung; Darstellung eines intraluminalen Thrombus bei einer Pulmonalarterie.....	34

Abbildung 24: Flächenverhältnisse Intima/ Media der Pulmonalarterien im Vergleich Kontrolle vs. Studiengruppe	35
Abbildung 25: Flächenverhältnisse Intima/Media der Pulmonalvenen im Vergleich Kontrolle vs. Studiengruppe	36
Abbildung 26: Mediane der IRS-Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe.....	37
Abbildung 27: Mediane der IRS-Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe.....	37
Abbildung 28 Mediane der IRS Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe.....	38
Abbildung 29: Mediane der IRS Werte für die ETAR-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe.....	38
Abbildung 30: Mediane der IRS-Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe.....	39
Abbildung 31: Mediane der IRS-Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe.....	39
Abbildung 32: Mediane der IRS Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe.....	39
Abbildung 33: Mediane der IRS Werte für die ETBR-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe.....	39
Abbildung 34: Mediane der IRS-Werte für die PDE-5-Färbung der Pulmonalarterien der Kontrollgruppe.....	40
Abbildung 35: Mediane der IRS-Werte für die PDE-5-Färbung der Pulmonalarterien der Studiengruppe.....	40
Abbildung 36: IRS-Wert-Mediane für die PDE-5-Färbung der Pulmonalvenen der Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 37: IRS-Wert-Mediane für die PDE-5-Färbung der Pulmonalvenen der Studiengruppe	41
Abbildung 38: Überblick über die Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs....	42
Abbildung 39: Altersverteilung der untersuchten Patientinnen und Patienten	42
Abbildung 40: Überblick über die Ursachen für Transplantation bzw. Lobektomie....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primärantikörper.....	22
Tabelle 2:	Sekundärantikörper.....	22
Tabelle 3:	Allgemeinhistologisches Auswertungsschema	23
Tabelle 4:	Einteilung zur Berechnung des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner	26
Tabelle 5:	150720_1A ETAR Auswertung.....	29
Tabelle 6:	150720_1A ETBR Auswertung.....	29
Tabelle 7:	150720_1A PDE-5 Auswertung.....	29
Tabelle 8:	Allgemeine Pathologien der Pulmonalarterien im Vergleich	33
Tabelle 9:	Allgemeine Pathologien der Pulmonalvenen im Vergleich.....	36

Literatur

1. Ming-xing Li, MSc, De-qi Jiang, MD, Yan Wang, MSc, Qing-zhuang Chen, MSc, Yan-jiao Ma, MSc, Shan-shan Yu, MD, and Yong Wang, MD. Signal Mechanisms of Vascular Remodeling in the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2016; Volume 67, Number 2, February 2016
2. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ (Clinical research ed.)* 2018; 360: j5492
3. Ried M, Potzger T, Neu R, et al. Combination of sildenafil and bosentan for pulmonary hypertension in a human ex vivo model. *Cardiovascular drugs and therapy* 2014; 28: 45–51
4. Hoenicka M, Golovchenko S, Englert L, et al. Combination Therapy of Pulmonary Arterial Hypertension with Vardenafil and Macitentan Assessed in a Human Ex Vivo Model. *Cardiovascular drugs and therapy* 2019; 33: 287–295
5. Ried M, Neu R, Lehle K, et al. Superior vasodilation of human pulmonary vessels by vardenafil compared with tadalafil and sildenafil: additive effects of bosentan. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2017; 25: 254–259
6. Englert L. Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von Phosphodiesterase-Hemmern und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten an humanen Pulmonalgefäßen in einem Ex-Vivo-Organbadmodell, 2022
7. Schiebler, TH (Hrsg.). *Anatomie*. Berlin: Springer Medizin, 2005
8. Schwegler JS, Lucius R. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Stuttgart, New York: Thieme, 2022
9. Brandes, R, Lang, F, Schmidt, RF (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer, 2020
10. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer, 1996
11. Tudor RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell and tissue research* 2017; 367: 643–649
12. Gottlieb J, Smits J, Schramm R, et al. Lung Transplantation in Germany Since the Introduction of the Lung Allocation Score. *Deutsches Arzteblatt international* 2017; 114: 179–185

13. Kjellström B, Nisell M, Kylhammar D, et al. Sex-specific differences and survival in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension 2008–2016. *ERJ Open Res* 2019; 5: 75–2019
14. Gall H, Felix JF, Schneck FK, et al. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2017; 36: 957–967
15. Sommer N, Richter MJ, Tello K, et al. Update pulmonalerterielle Hypertonie : Definitionen, Diagnose, Therapie. *Der Internist* 2017; 58: 937–957
16. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 2016; 37: 67–119
17. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2019; 53
18. Sysol JR, Machado RF. Classification and pathophysiology of pulmonary hypertension. *Cont Cardiol Educ* 2018; 4: 2–12
19. Moreira EM, Gall H, Leening MJG, et al. Prevalence of Pulmonary Hypertension in the General Population: The Rotterdam Study. *PloS one* 2015; 10: e0130072
20. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D4-12
21. Lan NSH, Massam BD, Kulkarni SS, Lang CC. *Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. Diseases (Basel, Switzerland)* 2018; 6
22. Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free radical biology & medicine* 2012; 52: 1970–1986
23. Houser S, Balis UJ, Mark EJ. *Lung pathology. Totowa N.J.: Humana Press, 2005*
24. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 186: 261–272

25. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 13S-24S
26. Hoeper MM, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Deutsches Arzteblatt international* 2017; 114: 73–84
27. Rosenkranz S, Baldus S, Grünig E, Klose H, Opitz C, Hoeper MM. Kommentar zu den 2015 ESC/ERS-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Kardiologie* 2016; 10: 211–221
28. Fuster. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis; 1984
29. Levin Ellis Robert. Endothelins. *Chemical Engineering Science* 1995; 50: iii–v
30. Raja SG. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension: an overview. *Cardiovascular therapeutics* 2010; 28: e65-71
31. Casserly B, Klinger J. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *DDDT* 2008: 265
32. Seferian A, Simonneau G. Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2013; 22: 217–226
33. Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research* 2004; 61: 227–237
34. Fukumoto Y. *Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension*. Singapur: Springer, 2017
35. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. München: Urban & Fischer Verlag, 2000
36. Ghigna M-R, Dorfmueller P. Pulmonary vascular disease and pulmonary hypertension. *Diagnostic Histopathology* 2019; 25: 304–312
37. Tomaszewski JF. *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*. Dordrecht: Springer, 2009
38. Remmele W, Stegner HE. *Der Pathologe* 8: Springer, 1987
39. Kotsimbos T, Williams TJ, Anderson GP. Update on lung transplantation: programmes, patients and prospects. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2012; 21: 271–305
40. Chester AH, Yacoub MH. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Global cardiology science & practice* 2014; 2014: 62–78

41. Ruffenach G, Hong J, Vaillancourt M, Medzikovic L, Eghbali M. Pulmonary hypertension secondary to pulmonary fibrosis: clinical data, histopathology and molecular insights. *Respiratory research* 2020; 21: 303
42. Aiello VD, Gutierrez PS, Chaves MJF, Lopes AAB, Higuchi ML, Ramires JAF. Morphology of the internal elastic lamina in arteries from pulmonary hypertensive patients: a confocal laser microscopy study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2003; 16: 411–416
43. Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Upregulation of ET-1 and its receptors and remodeling in small pulmonary veins under hypoxic conditions. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2001; 280: L1104-14
44. S.M. Hall*, N. Davie, N. Klein* and S.G. Haworth*, ". Endothelin receptor expression in idiopathic pulmonary arterial hypertension: effect of bosentan and epoprostenol treatment 2011
45. Giaid Adel, Yanagisawa Masashi, Langleben David, et al. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension
46. Rubin Lewis J., Badesch David B., Barst Robyn J., et al. Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England Journal of Medicine* 2002
47. Yu J, Taylor L, Wilson J, Comhair S, Erzurum S, Polgar P. Altered expression and signal transduction of endothelin-1 receptors in heritable and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Journal of cellular physiology* 2013; 228: 322–329
48. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, du Bois RM, Black CM. Increased Levels of Endothelin-1 and Differential Endothelin Type A and B Receptor Expression in Scleroderma-Associated Fibrotic Lung Disease. *American Journal of Pathology* 1997; 151: 831–841
49. Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1999; 20: 620–630
50. Bonvallet ST, Zamora MR, Hasunuma K, et al. BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *The American journal of physiology* 1994; 266: H1327-31

51. Wharton J, Strange JW, Møller GMO, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 172: 105–113
52. Maclean MR, Johnston ED, Mcculloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997; 283: 619–624
53. Black SM, Sanchez LS, Mata-Greenwood E, Bekker JM, Steinhorn RH, Fineman JR. sGC and PDE5 are elevated in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension.
<https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/ajplung.2001.281.5.L1051> (letzter Zugriff am: 13.06.2022)
54. Sebkhi A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 107: 3230–3235
55. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms - Langversion 2.01 2022

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.

Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich bei meiner Dissertationsarbeit unterstützt und begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ried und Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann für die engagierte, verlässliche und umfassende Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Svitlana Golovchenko für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor bedanken. Mein großer Dank gilt darüber hinaus dem gesamten Labor-Team von Frau Prof. Dr. Karla Lehle. Herzlichen Dank für die hervorragende kollegiale Unterstützung, insbesondere bei Anfertigung der Schnitte und Durchführung der Färbungen durch Frau Katrin Bielenberg. Ohne die gute Einarbeitung und die ständige Bereitschaft, Fragen zu beantworten, wäre das Gelingen meiner Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich dem Lungentransplantation-Team aus dem Klinikum Großhadern, München meinen Dank für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Proben aussprechen. Ganz besonders möchte ich Corinna Mendel danken, die wesentlich für die reibungslose Koordination zwischen dem Klinikum und unserem Forschungsteam verantwortlich war. Mein Dank gilt ebenfalls den Operateuren und dem Operationspersonal aus dem Klinikum Barmherzige Brüder, Regensburg und dem Universitätsklinikum Regensburg für die Entnahme und Übergabe der Lungengefäße. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Leonie Englert bedanken, die mich sowohl bei der Abholung der Proben als auch als hervorragende Laborkollegin und Freundin unterstützt hat.

Nicht zuletzt und ganz besonders gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden. Ihr alle habt auf unterschiedliche Weise mein Studium und diese Promotion erst möglich gemacht. Danke, dass ihr mich stetig daran erinnert habt, dass ich mich auf dem richtigen Weg befinde.