

Effekt der selektiven Hemmung der
induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in
einem experimentellen Model der
Pulmonalen Hypertonie

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christoffer Krug
aus Köln

Gießen 2008

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter:

Prof. Dr.rer nat. Ralph Theo Schermuly

Gutachter:

Priv.Doiz. Dr.med. Rosengarten

Tag der Disputation:

30.10.2008

Für meine Mutter

Monika

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Definition und Klassifikation der PH	3
1.2	Pathophysiologie und Pathogenese der Pulmonalen Hypertonie	5
1.2.1	Histologische Veränderungen	5
1.2.2	Pathophysiologie der Pulmonalen Hypertonie	6
1.3	Stickstoffmonoxid (NO)	7
1.3.1	Synthese von NO	8
1.3.2	Signaltransduktion und Stoffwechsel von NO	9
1.3.3	Wirkungen von endothelial freigesetztem NO	10
1.3.4	Direkte und indirekte Effekte von NO	11
1.4	Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)	12
1.4.1	Einteilung der NO-Synthasen	14
1.4.2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	14
1.4.3	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	15
1.4.4	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	16
1.5	Das Modell der Monocrotalin induzierten Pulmonalen Hypertonie der Ratte	17
1.6	Rolle von NO in der pulmonalen Hypertonie und Aktivität von NOS in MCT induzierter PAH	21
1.7	Inhibitoren der NO-Synthase	22
1.7.1	Endogene Hemmstoffe der NO-Synthase	22
1.7.2	Entwicklung und Einteilung der Hemmstoffe von NO-Synthasen	22
1.7.3	L-NIL	25
1.8	Ziel dieser Arbeit	27
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	MATERIAL	28
2.1.1	Tierversuchsgenehmigung	28
2.1.2	Versuchstiere	28
2.1.3	Antikörper	29
2.1.4	Chemikalien	30
2.1.5	Medikamente und Inhibitoren	31
2.1.6	Geräte	32
2.1.7	Verwendete Verbrauchsmaterialien	33
2.1.8	Lösungen und Puffer	34

Kapitel		Seite
2.2	METHODEN	35
2.2.1	Versuchsaufbau	36
2.2.2	Monocrotalin-Behandlung	37
2.2.3	Gewichts-, Trinkwasser- und Futterbilanzierung	37
2.2.4	L-NIL-Therapie	37
2.2.5	Hämodynamische Messungen	38
2.2.6	Blutgasanalyse, O ² -Sättigung, Hb-Bestimmung	39
2.2.8	Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie	40
2.2.9	Berechnung des Herzzeitvolumens	40
2.2.10	Histologie	40
2.2.11	Immunoblot (Western Blot)	41
2.2.12	Herstellen der Proteinextrakte	42
2.2.13	Proteinmengenbestimmung (Bradford-Test)	42
2.2.14	Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung	43
2.2.15	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
2.2.16	Western Blot	45
2.2.17	Immunologischer Proteinnachweis	46
2.2.18	Statistische Auswertung	47
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Übersicht	48
3.2	Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung von iNOS in MCT-behandeltem Lungengewebe	49
3.3	Ergebnisse der Futter-, Wasser-, und Gewichtsbilanzierung während des Versuchs	50
3.3.1	Trinkwasser- und Medikamentenbilanzierung	50
3.3.2	Futterbilanzierung und Gewichtsentwicklung	51
3.4	Hämodynamikmessungen	52
3.4.1	Wirkung von MCT und L-NIL-Behandlung auf den systolischen rechtsventrikulären Druck (RVPSys)	53
3.4.2	Systemisch-arterieller Blutdruck (SAP) in den Versuchsgruppen	54
3.4.3	Bestimmung der Herzratio als Maß der Rechtsherzhypertrophie	55
3.4.4	Herzzeitvolumen (HZV) bezogen auf das Körpergewicht	56
3.4.5	Pulmonal vaskulärer Widerstand (PVRI)	57
3.4.6	Systemisch vaskulärer Widerstand (SVRI)	58
3.4.7	Venöse und arterielle O ² -Sättigung	58
3.5	Histologie	60
3.6	Western Blot	62
3.6.1	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	62

Kapitel		Seite
3.6.2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	63
3.6.3	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	64
4.	DISKUSSION	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG	74
6.	SUMMARY	75
7.	LITERATURVERZEICHNIS	76
8.	ERKLÄRUNG	95
10.	DANKSAGUNG	96

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung		Seite
Abb.1	Die von NOS katalysierte Reaktion und Kofaktoren	8
Abb.2	Signaltransduktion durch NO	9
Abb.3	Funktionen von NO im Gefäßsystem	10
Abb.4	Direkte und indirekte Effekte von NO	11
Abb.5	Struktur der drei NOS-Isoformen	13
Abb.6	Pathophysiologie des Monocrotalin vermittelten Gefäßremodeling	20
Abb.7	Strukturformel von L-NIL	26
Abb.8	Versuchsaufbau	36
Abb.9	Anordnung der Materialien in der Blotting-Einheit	46
Abb.10a	Repräsentativer Western Blot für iNOS	49
Abb.10b	Grafische Darstellung der Western Blot-Quantifizierung nach densitometrischer Auswertung	49
Abb.11	Durchschnittliche Aufnahme von L-N6-(1-iminoethyl)-lysin (L-NIL) aus dem angebotenen Trinkwasser	50
Abb.12	Durchschnittliche Futteraufnahme der Versuchstiere	51
Abb.13	Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung	52
Abb.14	Rechtsventrikulärer Druck (RVP sys)	53
Abb.15	Darstellung der arteriell gemessenen systemischen Drücke	54
Abb.16	Grafische Darstellung der Herzratio	55
Abb.17	Darstellung des Cardiac Index (CI)	56
Abb.18	Physiologische Profile der Versuchsgruppen	57
Abb.19	Darstellung der mittleren Werte des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVRI)	57
Abb.20	Darstellung der mittleren Werte des systemisch vaskulären Widerstandes (SVRI)	58

Abbildung		Seite
Abb.21	Venöse Sauerstoffsättigung im Blut (SvO ²)	59
Abb.22	Arterielle Sauerstoffpartialdrücke (PaO ²)	59
Abb.23A	Kontroll-Lunge, HE-Färbung	61
Abb.23B	MCT-Gruppe, HE-Färbung	61
Abb.23C	L-NIL-Gruppe, HE-Färbung	61
Abb.24a	Western Blot iNOS	62
Abb.24b	Densitometrische Auswertung iNOS	62
Abb.25a	Western Blot mit eNOS Antikörpern	63
Abb.25b	Grafische Darstellung der Western Blot-Quantifizierung	63
Abb.26a	Repräsentativer Western Blot für nNOS	65
Abb.26b	Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung	65
Abb.27	Überblick Expression NOS-Isoformen im MCT-Model	68
Abb.28	Übersicht über die zum Funktionsverlust von eNOS führenden Vorgänge	70

TABELLEN

Tabelle		Seite
Tab.1	Überarbeitete WHO-Klassifikation der PH von 2003	4
Tab.2	Molekulargewicht (MG) und Gen-Lokus der einzelnen NOS-Isoformen	14
Tab.3	Übersicht über einige übliche selektive NOS-Inhibitoren	24
Tab.4	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	29
Tab.5	Verwendete Chemikalien	30
Tab.6	Verwendete Medikamente und Inhibitoren	31
Tab.7	Verwendete Geräte	32

Tabelle		Seite
Tab.8	Verwendete Gebrauchsmaterialien	33
Tab.9	Verwendete Lösungen	34
Tab.10	Hämatoxillin-Eosin – Färbeprotokoll	41
Tab.11	Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE	44

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat
BH4	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
ECM	extracellular matrix (extrazelluläre Matrix)
EDRF	endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin-Adenin-dinucleotid
FPAH	familiäre pulmonalarterielle Hypertonie
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HIV	human immuno-deficiency Virus
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL-1β	Interleukin-1-Beta
i.m.	intramuscular
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L-NMMA	NG, monomethyl-L-Arginin
L-NIL	N6-(1iminoethyl)-L-lysin-dihydrochlorid
LV	linker Ventrikel
M	molar

MCT	Monocrotalin
Mg	Miligramm
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
O ²⁻	Superoxid-Anion
ONNO ⁻	Peroxynitrit-Anion
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck
PH	pulmonale Hypertonie
PO ²	Sauerstoffpartialdruck
PVRI	pulmonal venous resistance index
ROS	reactive oxygen species (reaktiver Sauerstoffverbindungen)
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Verhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)
RVSP	right venricular systolic pressure
S	Septum (des Herzen)
SaO ²	arterielle Sauerstoffsättigung
s.c.	subcutan
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SAP	systemic arterial Pressure
SEM	standard error mean (Standardfehler)
SvO ²	venöse Sauerstoffsättigung
SVRI	systemic vascular resistance index
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Erkrankung der Lungengefäße. Sie ist gekennzeichnet durch eine progressive Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und der Entwicklung einer rechtsventrikulären Hypertrophie die rasch zum Rechtsherzversagen und Tod der Patienten führt (Rubin et al. 1997, Runo et al. 2003).

Die Geschichte der Erforschung der pulmonalen Hypertonie reicht zurück bis ins vorletzte Jahrhundert. Im Jahr 1891 autopsierte der deutsche Arzt Ernst von Romberg einen Patienten, der zu Lebzeiten an zunehmender Zyanose, Kurzatmigkeit und den Begleiterscheinungen schweren Rechtsherzversagens litt und an diesem verstarb. In seiner Veröffentlichung „Ueber Sklerose der Lungenarterie“ berichtete Romberg als Erster von einem Fall pulmonal vaskulärer Sklerose, ohne jedoch weitere Ursachen für diese pathologische Veränderung ausmachen zu können.

Im Verlauf der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurde weiter intensiv nach der Ätiologie dieser pulmonalen Sklerose geforscht. Über 50 Jahre vergingen bis nähere histopathologische Untersuchungen den Zusammenhang der pulmonalen Gefäß-Läsionen und der stets begleitenden rechtsventrikulären Hypertrophie aufdecken konnten (Pietra,1990).

Die Weiterentwicklung der Herzkathetertechnik durch Cournand und Richards (1940) eröffnete vollkommen neue Möglichkeiten in der Kardiopulmonalen Medizin. Auf diese Weise konnten mittels Druckmessungen erstmals wichtige neue Informationen über physiologische und pathophysiologische Vorgänge in der Lunge gesammelt werden (Richards, 1956; Cournand, 1956).

Der Begriff „primäre pulmonale Hypertonie“ für den Zustand einer isolierten pulmonal vaskulären Druckerhöhung mit Gefäßläsionen unklarer Ursache wurde 1951 erstmals durch Dresdale et al. benutzt. Wood postulierte 1958 nach Experimenten mit intravenös verabreichtem Acetylcholin, dass ein „vasokonstriktiver Faktor“ verantwortlich für die Krankheitsentstehung sein müsse.

Die Einführung einer als Appetit-Zügler verkauften Substanz (Aminorex-Fumarat) im November 1965 führte zu einer plötzlichen Häufung an Fällen von Pulmonaler

Hypertonie von epidemischen Ausmaßen (Rich et al.2000). Dieser Ausbruch brachte die Pulmonale Hypertonie weiter ins öffentliche Interesse und führte 1973 mit zur ersten von der World Health Organisation einberufenen Experten-Konferenz zur PH in Genf auf der vor allem histopathologische Kriterien in eine erste Klassifikation der PH einbezogen wurden (Hatano et al.1975).

Mit der Einrichtung eines nationalen Registers in den USA für Patienten mit PH im Jahr 1981 und der damit verbundenen Sammlung weiterer Daten wurde zunehmend deutlich, dass eine Vielzahl von Erkrankungen (z.B. HIV-Infektionen, portale Hypertension und Bindegewebserkrankungen) pathologische und klinische Ähnlichkeiten mit PPH aufwiesen (Rich et al. 1987).

Weitere große Konferenzen folgten 1998 und 2003 und trugen maßgeblich zur Strukturierung und somit besseren Erforschung der multifaktoriellen Ursachen der PH bei. Neuere Entwicklungen auf dem Bereich der Erforschung der PH umfassten unter anderem die Entdeckung eines Gens, das für eine familiäre Form der PH codiert (Morse et al. 1997). Sie ermöglichten durch neue zur Verfügung stehende Techniken der Molekularbiologie die weitere Erforschung der Pathogenese der PH auf Molekularebene sowie die Verbesserung bestehender und die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten.

Obwohl in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte, sowohl im Verständnis der Pathophysiologie der PH, als auch in der symptomatischen Behandlung gemacht wurden, gibt es bisher noch keine Möglichkeiten diese verheerende Erkrankung zu heilen (Humbert und Morell et al. 2004, Humbert et al. 2004).

Mit einer Inzidenz von nur 1-2 Fällen auf eine Million Menschen ist die IPAH im Vergleich zu anderen kardiopulmonalen Erkrankungen zwar seltener, zeigt aber mit einer mittleren Überlebensrate von 2,8 Jahren ab Diagnosestellung eine außerordentlich schlechte Prognose für die Patienten (D'Alonzo et al. 1991).

Mit der Einführung einer standardisierten Therapie mit Kalziumantagonisten zu Beginn der 80er Jahre (Rich et al. 1992) und der Zulassung von Prostacyclin zur Langzeittherapie sowie der klinischen Anwendung von Phosphodiesterase-Inhibitoren wie Sildenafil

(Schermuly et al. 2004) konnte zwar die Lebenserwartung für einen Teil der Patienten verbessert werden, der rasche und häufig tödliche Verlauf der Krankheit stellt jedoch nach wie vor eine Herausforderung zur Entwicklung weiterer Therapeutika dar.

1.1 Definition und Klassifikation der PAH

Die PAH ist definiert als eine anhaltende Erhöhung des pulmonal arteriellen Drucks (PAP) auf über 25 mmHg in Ruhe, beziehungsweise 30 mmHg unter Belastung mit einem mittleren pulmonal-kapillären- und linksventrikulär- enddiastolischen Druck von weniger als 15 mmHg (Gaine et al. 1998).

Eine Vielzahl von Ursachen können zum Krankheitsbild der Pulmonalen Hypertonie führen. Daher bestand die Notwendigkeit einer aetiologischen Klassifikation dieser Krankheit, woraufhin zunächst die primäre (PPH) von der sekundären Pulmonalen Hypertonie (SPH) unterschieden wurde. Unter die Definition der primären PH wurden zunächst alle Formen der PH ohne erkennbare Ätiologie zusammengefaßt, während die sekundäre Form der PH bestimmte Erkrankungen die eine PH zur Folge haben können umfaßte.

Beim zweiten WHO Treffen zur PH 1998 in Evian wurde zum ersten Mal eine klinische Einteilung aller PH-Typen in fünf Gruppen vorgenommen: 1) Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), 2) Pulmonal-venöse Hypertension (PVH), 3) Hypoxie-assoziierte PH, 4) PAH durch chronische thromboembolische Erkrankungen und 5) andere Erkrankungen (u.a. inflammatorischer Ursache), die die pulmonalen Gefäße betreffen. Seit 1998 konnten weitere wichtige Fortschritte im Verständnis und im Bereich der Therapieansätze für PH gemacht werden. Auf der PH-Konferenz in Venedig 2003 erfolgte daher eine Überarbeitung der WHO-Klassifikation von 1998 in welche wesentliche neue klinische Erkenntnisse einfließen und eine genauere Einteilung der verschiedenen pathologischen Ursachen der PH ermöglichte. Der Begriff der primären pulmonalen Hypertonie wurde durch den der idiopathischen PAH (IPAH) ersetzt. Eine Übersicht über die 2003 überarbeitete WHO-Klassifikation gibt Tabelle1.

1. pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

- idiopathisch (IPAH)
- familiär (FPAH)
- assoziiert mit anderen Krankheiten (APAH):
 - Kollagenosen,
 - kongenitale systemisch-pulmonale-shunts
 - portale Hypertension
 - HIV-Infektion
 - Medikamente und Toxine
 - andere Erkrankungen (Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherstörungen, M.Gaucher, myeloproliferative Erkrankungen u.a.)
- PH mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung
 - pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
 - pulmonal-kapilläre Hämangiomatose (PCH)
- persistierende PH des Neugeborenen

2. pulmonale Hypertension bei Linksherzerkrankungen

- atriale oder ventrikuläre Linksherzerkrankung
- Linksherzerkrankung mit Klappenbeteiligung

3. pulmonale Hypertension assoziiert mit Erkrankungen der Lunge und / oder Hypoxämie

- chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
- interstitielle Lungenerkrankungen
- Schlafapnoen
- Störungen durch alveoläre Hypoventilation
- chronischer Aufenthalt in großer Höhe
- Entwicklungsstörungen

4. pulmonale Hypertonie durch chronisch thrombotische und / oder embolische Krankheiten

- thromboembolische Obstruktion proximaler Lungenarterien
- thromboembolische Obstruktion distaler Lungenarterien
- nicht-thrombotische Lungenembolien (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)

5. Verschiedene: Sarkoidose, Histiozytose, Lymphangiomatose, Kompression von Lungengefäßen (z.B. Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

Tab.1 Überarbeitete WHO-Klassifikation der PH von 2003 (aus : Simonneau et al).

1.2 Pathophysiologie und Pathogenese der Pulmonalen Hypertonie

1.2.1 Histologische Veränderungen

Bereits 1970 führten Wagenvoort und Wagenvoort systematische Studien zur histologischen Untersuchung der Gefäßläsionen bei pulmonaler Hypertonie durch. Eine Reihe von histologischen Veränderungen die für die Pulmonale Hypertonie charakteristisch sind konnten seitdem beschrieben werden.

Ein Kennzeichen von schwerer PAH ist die Ausbildung einer, als Neointima bezeichneten Schicht von Myofibroblasten und Extrazellulärer Matrix (ECM) zwischen Endothel und der inneren Lamina Elastica (Humbert und Morell et al. 2004). Bereits diese Veränderungen führen zu Störungen in der Elastizität der Gefäßwand und tragen maßgeblich zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes bei. Durch die häufig beobachtete Muskularisierung von ursprünglich nicht-muskularisierten kleinen peripheren Lungenarterien wird der erhöhte Gefäßtonus weiter verstärkt.

Eine weitere für die PH typische Veränderung ist die Ausbildung ungeordneter Endothelzellproliferationen, welche zur Entstehung sogenannter plexiformer Läsionen führen und in vielen Fällen von PAH beschrieben wurden (Rubin et al. 1997, Cool et al.1999). Plexiforme Läsionen sind fokale Proliferationen von Endothelkanälen, gesäumt von Myofibroblasten, glatten Muskelzellen und Bindegewebsmatrix (Pietra et al. 1990). Von Endothelzellen innerhalb dieser Läsionen ist bekannt, dass sie den vascular endothelium growth factor (VEGF) und seine Rezeptoren exprimieren (Rubin et al. 1997, Cool et al.1999).

Das Fortschreiten der Pulmonalen Hypertonie ist typischerweise gekennzeichnet durch die Hypertrophie der Tunica Media, welche sich zum einen aus der Zunahme an Bindegewebe in dieser Gefäßschicht, zum anderen aus der Hypertrophie und Hyperplasie der dort angesiedelten glatten Muskelfasern ergibt. Eine vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Fibroblasten führt schließlich auch zur Verdickung der Adventitia der Gefäße,welche in fast allen Formen der PH gefunden werden kann.

1.2.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie

Im wesentlichen tragen Vasokonstriktion, Remodelling der Gefäße und Thrombosen in situ bei der PAH zur Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands bei (Rubin et al. 1997). Obwohl die Ursachen der PAH vielfältig sind, kommt der Gefäßobstruktion durch Proliferation und Remodelling in der Pathogenese der PAH die größte Bedeutung zu (Jeffery und Morell, 2002).

Die Zerstörung des Endothels, welches eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der gesunden Gefäßfunktion spielt und die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion führen zur gestörten Sekretion zahlreicher Mediatoren. Unter diesen sind vor allem überschüssend sezernierte vaskuläre Wachstumsfaktoren (vascular endothelium growth factor, VEGF) für die beschriebene Hypertrophie glatter pulmonaler Gefäßmuskelzellen verantwortlich (Rubin et al. 1997, Cool et al.1999). Die Gesamtheit der überschießenden Umbauprozesse ,welche schließlich zur Vasokonstriktion der Gefäße führen, wird als „Remodeling“ bezeichnet (siehe auch Abb.6 in Kapitel 1.5). Remodeling betrifft sowohl die Intima als auch die Media und Adventitia der Gefäßwand und führt so zu erniedrigter Compliance und erhöhtem pulmonalen Gefäßwiderstand (Stenmark et al. 1997).

Verletzungen des Endothels führen jedoch nicht nur zu Proliferationen und Hypertrophie der Gefäßwand, sie beeinflussen auch maßgeblich die Synthese von endothelialen vasodilatorischen Substanzen wie NO und Prostacyclin bei gleichzeitiger Überexpression von vasokonstriktorisches Stoffen wie z.B. Endothelin-1 (ET-1) (Giaid und Saleh, 1995; Giaid et al. 1993)

Endothelin-1, das einen starken vasokonstriktorisches Effekt besitzt und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert, wird vom Endothel gebildet und bindet an zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Es vermittelt eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen, wie zum Beispiel Herzhypertrophie und Remodeling beim Herzinfarkt oder bei der Entstehung von Artherosklerose (Kedzierski et al. 2001). Erhöhte Endothelin-1 Spiegel konnten bei Patienten mit PAH nachgewiesen werden (Cacoub et al. 1997). Zu den vasodilatorischen Substanzen gehört:

Prostazyklin, das ebenfalls von Endothelzellen sezerniert wird. Es bewirkt cAMP-vermittelt eine Gefäßweitstellung und hemmt Thrombozytenaggregation sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Bei Patienten mit PAH konnte eine verminderte Konzentration an Prostazyklin-Metaboliten im Urin festgestellt werden (Christman et al. 1992).

Vasodilatorisch wirkt insbesondere **Stickstoffmonoxid (NO)**, über das im Folgenden noch genauer berichtet werden wird, und welches eine zentrale Rolle in der Regulation des pulmonalvaskulären Gefäßtonus spielt.

Zahlreiche andere Faktoren führen zu einer weiteren Beeinflussung dieses Ungleichgewichts zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatierenden Substanzen, welches eine wesentliche Ursache für erhöhten Gefäßtonus und chronisches Remodeling darstellt (Schermyly et al. 2004; Budhiraja et al. 2004). Zu diesen gehören Zytokine, Hypoxie, freie Radikale und virale Infektionen.

Thrombotische Läsionen und Dysfunktion der Thrombozyten stellen einen weiteren wichtigen Faktor in der Pathogenese der PH dar. Thrombozyten speichern und sezernieren zahlreiche Stoffe die mit Vasokonstriktion und Remodeling in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen: Thromboxan A₂, Serotonin, Platelet derived growth factor (PDGF), TGF- β und VEGF (Humbert und Morell et al. 2004). In wie weit jedoch Thrombose und Thrombozyten-Dysfunktion Ursache oder Konsequenz der Erkrankungen darstellen, ist noch unklar (Herve et al. 2001).

1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Furchtgott und Zawadski beschrieben 1980 als erste die Existenz eines endothelial derived relaxing factor (EDRF). Dieser Faktor wurde nach Acetylcholinstimulation von Endothelzellen abgegeben und führte zur Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen und somit zur Dilatation von Gefäßen (Furchtgott et Zawadski, 1980).

7 Jahre später bewiesen drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander, dass Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel freigesetzt wurde und exakt die Wirkung des EDRF nachahmte (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987).

NO ist ein stabiles farbloses Gas mit mittlerer Löslichkeit in Wasser und einer

Halbwertszeit von 0,1-10 sec in gelöstem Zustand. Es ist ein allgegenwärtiger Botenstoff der von verschiedenen Zellarten produziert wird und als autokriner oder parakriner Mediator wirkt. So reguliert NO den Blutdruck und die Thrombozytenaggregation, wirkt als Regulator von Immunreaktionen und ist ein Neurotransmitter sowohl auf peripher als auch auf zentralvenöser Ebene (Moncada et al. 1991, Christopherson und Bredt 1997, Marin and Rodriguez-Martinez 1997, Bogdan 2001). NO vermittelt tiefgreifende biologische Effekte im kardiovaskulären Bereich sowie im Nerven- und Immunsystem (Calver et al. 1993, Davies et al, 1995). NO wird von folgenden Zellen in der Lunge synthetisiert: Makrophagen, Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen, Mastzellen und Epithelzellen (Typ II Alveolarzellen) (Gaston et al. 1994).

1.3.1 Synthese von NO

NO wird von einer Gruppe von Enzymen produziert, die Stickstoffmonoxid-Synthasen (Nitric Oxide Synthase = NOS) genannt werden. Diese sind dimere, Haem enthaltende Enzyme, bestehend aus einem Oxygenase-Bereich und einem Reduktase-Bereich mit Bindungsstellen für bestimmte Cofaktoren. NO-Synthasen katalysieren die Produktion von NO und L-Citrullin aus endogenem L-Arginin, Sauerstoff und NADPH.

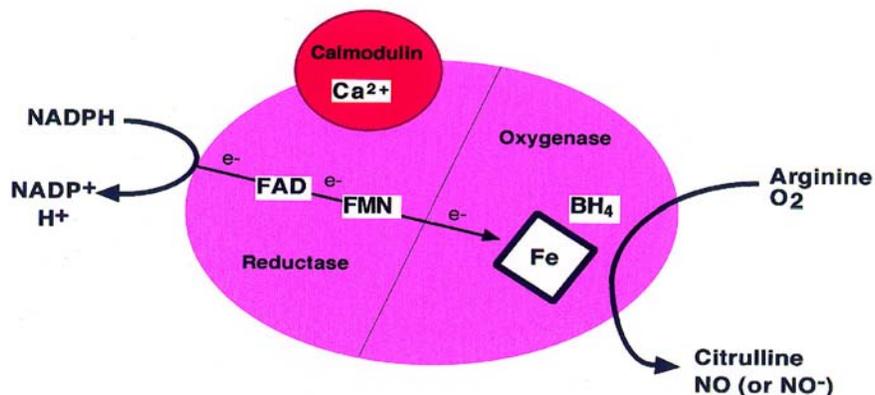


Abb.1 Die von NOS katalysierte Reaktion und Kofaktoren

NADPH gibt Elektronen (e⁻) an die Reduktaseseite von NOS ab. FAD und FMN fungieren als Redox-Überträger und transportieren die Elektronen in den Oxygenase-Bereich. Hier kommt es zur Reaktion mit Eisen (Fe) aus Haem und BH₄ mit Arginin und Sauerstoff, wodurch Citrullin und NO entstehen. Unter bestimmten Umständen kann es anstatt dessen auch zur Synthese von NO⁻ kommen. Der Elektronenfluss durch den Reduktase-Bereich ist abhängig von der Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes. (Aus: Alderton et al.2001)

Cofaktoren dieser Reaktion sind Calmodulin, Haem, Tetrahydrobiopterin (BH4) Flavinmononukleotide (FMN) und Flavinadenindinukleotide (FAD) (Janssens et al. 1992, Knowles und Moncada 1994, Alderton et al. 2001). Eine Übersicht über die von NOS katalysierte Reaktion gibt Abb.1. NO-Synthasen verfügen weiterhin über die Möglichkeit unter bestimmten Bedingungen Superoxid zu produzieren. Dies geschieht unter anderem bei Mangel an L-Arginin (Pou et al. 1992).

1.3.2 Signaltransduktion und Stoffwechsel von NO

NO reagiert mit prosthetischen Eisen- oder Thiolgruppen von Proteinen, welche auf diese Weise aktiviert oder gehemmt werden können. Eine der bekanntesten Reaktionen von NO ist die Dilatation aller Blutgefäße durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase, einem heterodimeren Molekül in glatten Muskelzellen, das die Konversion von Guanosintriphosphat in cGMP katalysiert (siehe Abb.2).

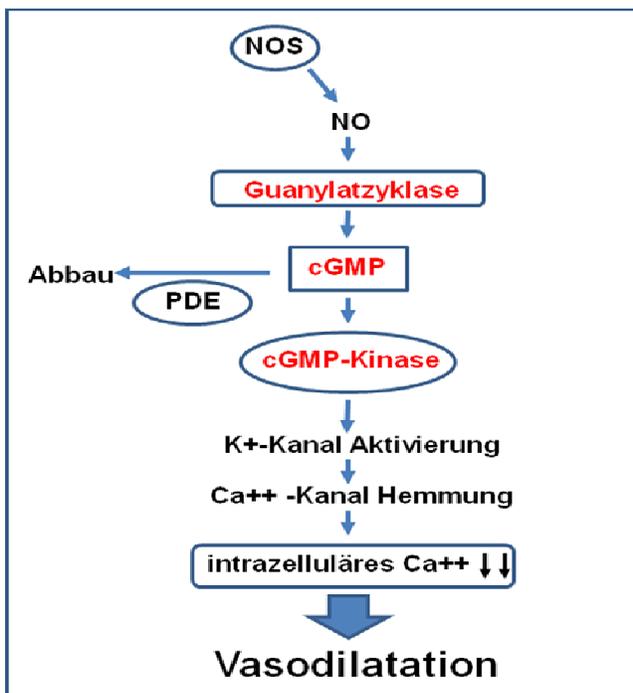


Abb.2 Signaltransduktion durch NO

NO aktiviert lösliche, membrangebundene Guanylatzyklasen, die wiederum zyklisches Guanosyl-Monophosphat (cGMP) synthetisieren. Diese aktivieren die cGMP-Kinase, welche durch Kalium-Kanal Aktivierung und Calcium-Kanal Hemmung eine Verminderung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration bewirkt. Dieser Effekt von NO wird limitiert durch den von Phosphodiesterasen (PDE) induzierten Abbau des cGMP (modifiziert nach: Ghofrani et al. 2004).

Diese Substanz dient als second messenger und triggert weitere zelluläre Mechanismen, die zur Erniedrigung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und zu Relaxierung der glatten Muskulatur der Gefäße und Atemwege führen. (Furlong et al. 1987, Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987, Pohl und Busse 1989).

NO besitzt keinen spezifischen Rezeptor. Als kleines, gasförmiges Molekül diffundiert es durch Zellmembranen und moduliert die Zellfunktionen durch Bindung an zelluläre Proteine.

1.3.3 Wirkungen von endothelial freigesetztem NO

Im wesentlichen werden dem durch eNOS produzierten NO außer der beschriebenen Vasodilatation verschiedene vasoprotektive Funktionen zugesprochen. NO hemmt die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion an die Gefäßwand, darüber hinaus hemmt es die Abgabe von platelet derived growth Faktor (PDGF) der die Proliferation glatter Muskelzellen bewirkt (Radomski et al. 1987; Alheid et al. 1987). Die Leukozytenadhäsion wird von NO ebenso reguliert wie die Angiogenese und der Knochenstoffwechsel. Durch Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Unterdrückung des Einbaus von Lipoproteinen in die Gefäßwand wird NO außerdem eine Anti-Arterogene Wirkung zugesprochen.

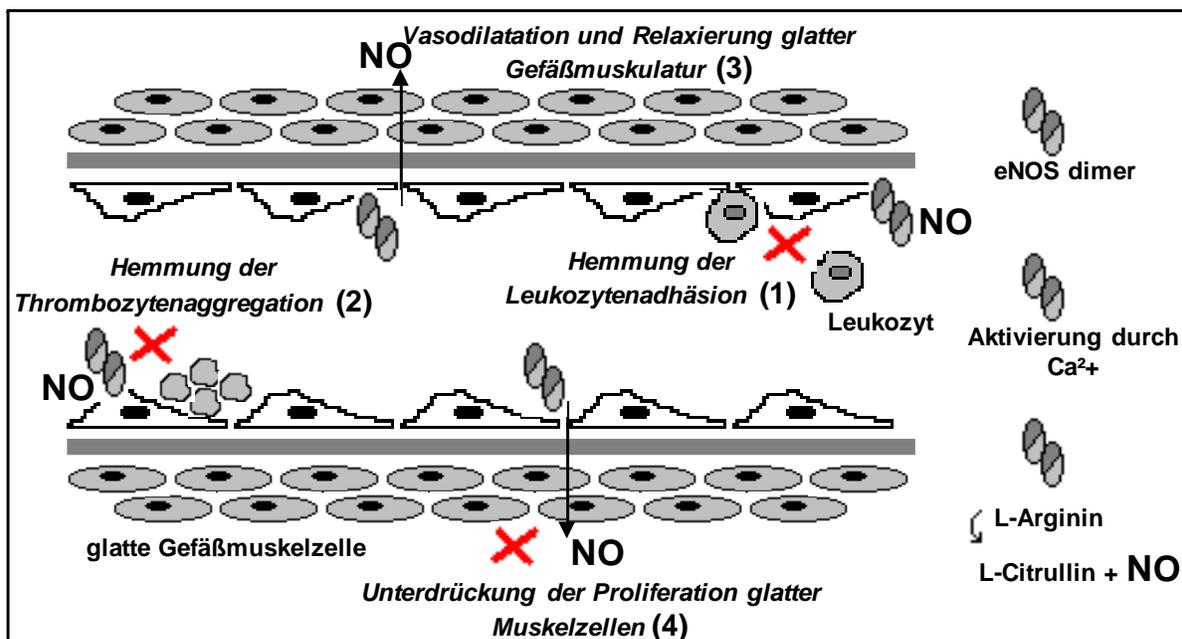


Abb. 3 Funktionen von NO im Gefäßsystem. Endotheliales NO hat die Fähigkeit die Adhäsion (1) von Leukozyten und die Aggregation von Thrombozyten (2) zu hemmen. Außerdem reguliert NO den Gefäßtonus durch Relaxierung glatter Gefäßmuskelzellen (3) und vermag die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu unterdrücken (4).

Diese vielseitigen Funktionen geben endotheliale NO einen erheblichen Einfluss auf die Integrität und Funktion der Gefäße.

1.3.4 Direkte und indirekte Effekte von NO

Die Reaktionswege von NO und die daraus vermittelten Wirkungen können in direkte und indirekte Effekte eingeteilt werden. In der direkten Interaktion reagiert NO unmittelbar mit den Molekülen zur Vermittlung biologischer Funktionen.

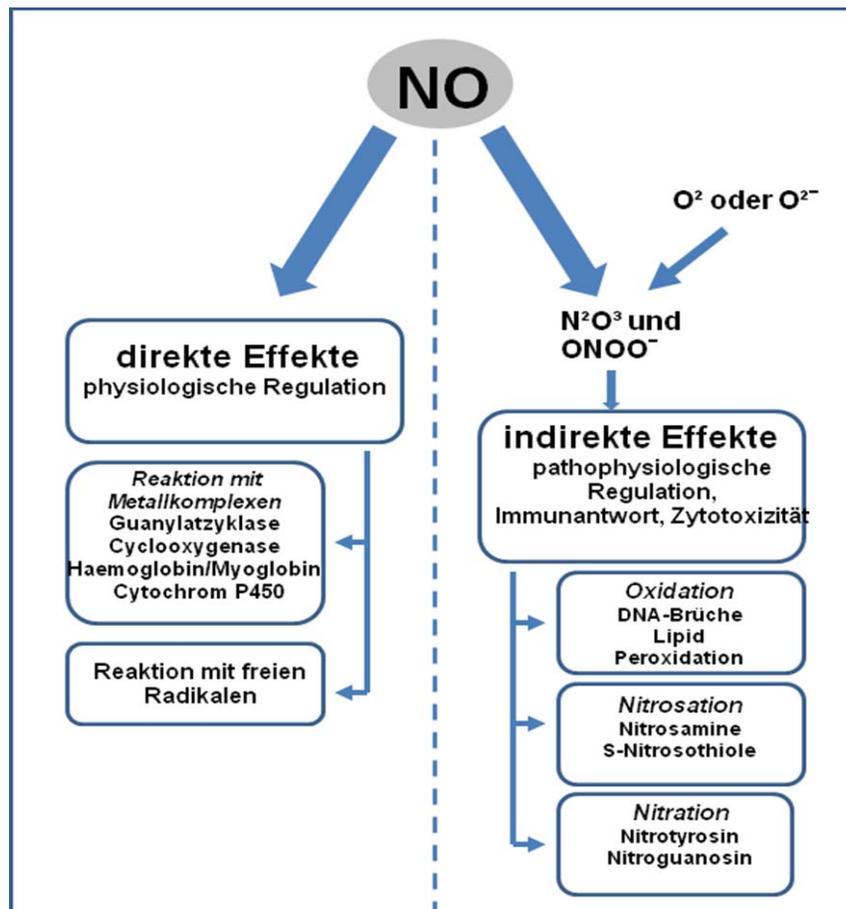


Abb. 4 Direkte und indirekte Effekte von NO (modifiziert nach Grisham et al. 1999)

NO reagiert in physiologischen Konzentrationen mit Proteinen die, strukturell Metallkomplexe enthalten. Dies geschieht in vivo insbesondere mit eisenhaltigen Proteinen wie Hämoglobin (Wink et al. 1997). NO reagiert außerdem mit freien Radikalen wie zum Beispiel Lipid-Radikalen und hemmt so die Peroxidation von Lipiden.

Indirekte Effekte vermittelt NO durch oxidativen und nitrosativen Stress unter anderem durch die Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge. Dies führt unter anderem zur Beschädigung von DNA, Lipidperoxidation und Bildung neuer, ihrerseits auch schädigender Substanzen.

Andererseits reagiert NO indirekt mit Molekülen wie Sauerstoff oder Superoxid wodurch Stoffe wie Peroxynitrit (ONNO^-) entstehen, welche dann ihrerseits mit dem Zielmolekül reagieren können (Grisham et al. 1999).

Miranda et al. (2000) fanden heraus, dass im physiologischen Zustand und in physiologischen NO-Konzentrationen der direkte Weg der NO-Signaltransduktion vorrangig ist, während bei entzündlichen Zuständen, in denen iNOS exprimiert wird und große Mengen NO produziert werden, vor allem die indirekten Effekte von NO dominieren (siehe Abb.4).

NO kann mit molekularem Sauerstoff (O_2) und Superoxid-Anionen (O_2^-) reagieren. Auf diese Weise entstehen sogenannte Reactive Nitric Oxide Species (RNOS), wie zum Beispiel Dinitrogen Trioxid (N_2O_3) und Peroxynitrit (ONNO^-), welche durch Reaktion mit anderen Molekülen die indirekten Effekte von NO vermitteln.

Beide Substanzen führen zu zwei Formen von chemischem Stress: nitrosativem Stress durch RNOS (Dinitrogen-Trioxid, N_2O_3 ; Peroxynitrit, ONNO^- und Nitroxyl, NO^-) und oxidativem Stress durch ROS (Reactive Oxygen Species: O_2 und H_2O_2). Peroxynitrit wirkt als starkes Oxidans und führt zu Lipid-Peroxidation und DNA-Brüchen (Pryor und Squadrito 1995, Beckmann und Koppenol 1996, Wink et al. 1997). Das bei höheren NO-Konzentrationen gebildete Peroxynitrit hemmt unterschiedliche Komplexe der Atmungskette und stört die mitochondriale Respiration (Lizasoain et al. 1996). Von diesen indirekten Effekten wird angenommen, dass sie zu einem wesentlichen Teil die schädlichen und zytotoxischen Effekte von NO in Entzündungszuständen vermitteln (Grisham et al. 1999, Miranda et al. 2000).

1.4 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)

Es existieren drei Isoformen von NOS: neuronale NOS (nNOS oder NOS1), induzierbare NOS (iNOS oder NOS2) und endotheliale NOS (eNOS oder NOS3). Diese Namen reflektieren jedoch nur den Gewebetyp in dem die Enzyme zum ersten Mal beschrieben wurden. Mittlerweile ist bekannt, dass jede Isoform in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert wird (Fischman et al. 1999).

Alle drei Isoformen ähneln sich in Struktur und katalytischen Mechanismen. Ihnen ist

gemeinsam, dass sie nur in einer dimeren Form aktiv sind und sie eine Anzahl bestimmter Kofaktoren benötigen.

Drei Bereiche sind für die katalytische Aktivität der NO-Synthasen notwendig (siehe Abb.5). Vom C-Terminalen Ende ausgehend sind hier: ein Reduktase-Bereich, (der die FAD und FMN Bindungsstellen enthält und Elektronen von NADPH auf den Oxygenase-Bereich transferiert), eine Calmodulin-bindende Stelle und ein Oxygenase-Bereich. Letztere enthält die Bindungsstellen für Haem, BH₄ und Arginin und katalysiert die Konversion von L-Arginin in L-Citrullin.

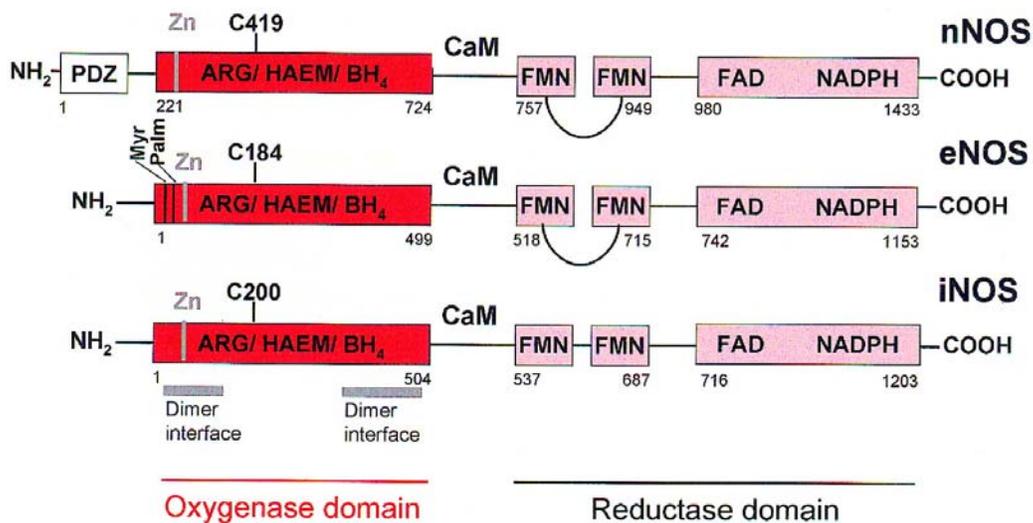


Abb. 5 Struktur der drei NOS-Isoformen. Dargestellt sind Oxygenase- und Reduktase-Bereiche der Isoformen (als Rechtecke mit Nummer der Aminosäure-Endung), der Cysteinrest, welcher die Haem- und die Calmodulin-Bindungsstelle verbindet, die Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstelle von eNOS, die Lokalisierung der Zink-verbindenden Cysteinreste sowie die durch graue Balken gekennzeichneten Dimer-Kopplungsstellen (aus: Alderton et al.2001).

Die Aktivität aller NOS Isoformen ist darüber hinaus abhängig von der Bindung an Calmodulin. Dieser Cofaktor kann als Sensor der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration gesehen werden und entfaltet seine Wirkung bei erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln. Die Wirkung von Calmodulin unterscheidet sich jedoch in den einzelnen Isoformen von NOS.

1.4.1 Einteilung der NO-Synthasen

Die drei Isoformen der NO-Synthase werden in zwei funktionelle Gruppen eingeteilt: die Gruppe der konstitutiven, Ca²⁺ abhängigen NO-Synthasen : eNOS und nNOS sowie die der induzierbaren, Ca²⁺ unabhängigen iNOS. Trotz der aufgeführten Gemeinsamkeiten und der sehr ähnlichen Molekularstruktur (Fischman et al.,1999, Förstermann et al. 1991) gibt es einige wichtige Unterschiede zwischen den einzelnen NO-Synthasen.

NOS	MG (kDa)	Gen-Lokus
nNOS	161	12q24.2-12q24.3
iNOS	131	17cen-q11.2
eNOS	133	7q35-7q36

Tab. 2 Molekulargewicht (MG) und Gen-Lokus der einzelnen NOS-Isoformen
(modifiziert nach Alderton et al. 2001)

1.4.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die Wirkungen der ersten frühen NO-Medikamente, wie die des Nitroglyzerins, waren bereits mit der Funktion der endothelialen NO-Synthase verbunden.

eNOS konnte als erstes in Endothelzellen identifiziert werden (Förstermann et al. 1991). Durch immunhistochemische Nachweise ließen sich jedoch zahlreiche weitere Zelltypen mit eNOS-Expression nachweisen. Dazu gehören unter anderem Thrombozyten, glatte Muskelzellen, Herz-Myozyten, Knochenmarkszellen und Nervenzellen.

Obwohl eNOS im Wesentlichen als ein durch Bindung des Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviertes Enzym gilt, wurden zahlreiche Faktoren gefunden, die die Aktivität und basale Expression des Enzyms beeinflussen können. Zu diesen gehören Hypoxie (Hoffman et al. 2001, Le Cras et al. 1996), "Shear stress" durch Blutströmung über das Gefäßendothel (Uematsu et al. 1995, Malek et al. 1999) und Hormone wie z.B. Östrogen (Ruelmann et al. 2000).

Durch Myristoylierung und Palmitoylierung des eNOS-Moleküls ist dieses Enzym membrangebunden (Hemmens und Mayer, 1998) und dort in den Caveolae lokalisiert. In der Oxygenase-Domäne von eNOS existiert eine Bindungsstelle für das in den Caveolae lokalisierte Caveolin-1. Erhöhte Ca²⁺ Konzentrationen führen zur Bindung von

Calmodulin, welches Caveolin-1 ersetzt, und so eNOS aktiviert (Kone, 1999).

eNOS ist ein Dimer dessen Untereinheiten eine Größe von je etwa 133 kDa haben (Marletta, 1994). Zur Dimer-Bildung kommt es durch die Bindung von Haem und der anschließenden Bindung von BH₄, wodurch die dimere Struktur stabilisiert wird (Klatt et al. 1996). Diese Stabilisierung ist außerdem abhängig von Zink-Ionen, die für die Unversehrtheit der BH₄-Bindungsstelle sorgen (Rayman et al. 1998).

Bei Mangel an BH₄ kann das eNOS Dimer O²⁻ produzieren, wohingegen die Sättigung mit BH₄ zur ausschließlichen Produktion von NO führt (Andrew et Mayer, 1999).

Die physiologischen Konzentrationen des von eNOS produzierten NO liegen in der picomolaren Größenordnung und werden zur Signaltransduktion nur in kurzen Schüben produziert (Anggard, 1994).

1.4.3 Neuronale NO-Synthase (nNOS)

nNOS hat ein Molekulargewicht von ca. 161 kDa. Aufgrund seiner Ca²⁺ Abhängigkeit wird nNOS zusammen mit eNOS zur Gruppe der konstitutiven NO-Synthasen gezählt. Diese Isoform wurde zunächst im Kleinhirn von Ratten und Schweinen isoliert. Sie wird im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert und spielt hier als Neuromodulator eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie Verhalten und Erinnerung. Im peripheren Nervensystem übernimmt NO die Funktion eines Neurotransmitters und ist unter anderem an der Regulation von gastrointestinaler Motilität, Kontrolle glatter Muskulatur sowie neuroendokrinen Prozessen beteiligt. Zahlreiche neurologische Störungen konnten auf eine pathologisch veränderte nNOS-Expression zurückgeführt werden (Yun et Dawson, 1997). Die nNOS-Expression ist jedoch nicht nur auf das Nervensystem beschränkt, sondern konnte in zahlreichen anderen, nicht-neuronalen Zellen, nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Skelettmuskulatur und die Lunge.

Wie bei eNOS liegt auch bei der neuronalen NO-Synthase die Menge des produzierten NO im picomolaren Bereich. Die dominierende Form der Aktivierung ist auch hier die Bindung von Calmodulin mit nachfolgender kurzer Abgabe von NO. Jedoch können (wie bei eNOS) bestimmte physiologische und pathophysiologische Stimuli wie „shear stress“ und Nervenverletzung die Expression zusätzlich beeinflussen.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Isoformen besitzt nNOS am aminoterminalen Ende eine PDZ-Bindungsstelle zur Interaktion mit zahlreichen anderen, auch membrangebundenen Proteinen. Im Nervengewebe wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor getriggert, an den nNOS mit der PDZ-Stelle bindet. Im Skelettmuskel geschieht dies durch Bindung an das Sarkolemm wo nNOS durch Membrandepolarisierung aktiviert wird.

1.4.4 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Unter den NOS-Isoformen hat die induzierbare NO-Synthase eine Sonderstellung. Sie bindet bereits bei sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen sehr eng an Calmodulin, so dass die Aktivität von iNOS als weitgehend Ca^{2+} unabhängig angesehen wird und hauptsächlich durch Transkription aber auch durch Mechanismen, welche mit der Verfügbarkeit von Cofaktoren und Substraten, Translation u.ä. zusammenhängen, moduliert wird. iNOS-Expression erfolgt neben zahlreichen anderen Geweben im Körper auch in der Lunge (Guo et al. 1995).

Obwohl heute klar ist, dass alle drei Isoformen zusätzlich durch bestimmte Stimuli induziert werden können, wird iNOS als induzierbare NO-Synthase bezeichnet, da sie als erstes in Makrophagen gefunden wurde und ihre NO Produktion durch bestimmte Faktoren induzierbar ist (Lyons et al. 1992, Xie et al. 1992, Bogdan 2001). Diese Induktion der Expression kann in zahlreichen Zelltypen im Rahmen von Entzündungen durch Stimuli wie Cytokine (IL-1, IFN- γ oder TNF- α) oder bakterielles Endotoxin erfolgen (Kleinert et al. 2000, Alderton et al. 2001). Auf diese Weise vermag iNOS über einen längeren Zeitraum wesentlich höhere NO-Konzentrationen (im nanomolaren Bereich) zu produzieren, als eNOS und nNOS (Kleinert et al. 2000).

Eine der am besten beschriebenen Funktionen von iNOS ist seine Rolle in der Makrophagen vermittelten Abwehr von infektiösen Substanzen (Fang et al. 1997).

Die Synthese von NO durch iNOS in aktivierten Makrophagen führt zur unspezifischen Zytotoxizität gegen Bakterien, Protozoen und Tumorzellen (Hibbs et al. 1988). Dabei spielen zahlreiche Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die mit NO reagieren und toxische Verbindungen bilden, eine wichtige Rolle. Die von der NADPH-Oxidase von Phagozyten produzierten Superoxide reagieren schnell mit NO und bilden auf diese

Weise Peroxynitrit und verschiedene andere toxische Abfallprodukte (Fang et al. 1997). Reaktive Stickstoff-Zwischenprodukte können neben DNA-Veränderungen auch Proteine durch Nitrosylierung von Cystein und Tyrosinresten modifizieren und dadurch Stoffwechsellenzyme und Membrantransporter beeinflussen, was zytotoxische Effekte bewirkt.

Die Überproduktion von NO durch iNOS konnte in verschiedenen Erkrankungen beobachtet werden. Im septischen Schock führt dieser Zustand zu ausgeprägtem Blutdruckabfall und Multiorganversagen. In zahlreichen weiteren entzündlichen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Asthma bronchiale ist durch iNOS produziertes NO präsent.

Aufgrund seiner Rollen als Immunmediator und Effektormolekül spielt durch iNOS produziertes NO bei Entzündungen sowohl eine positive als auch negative Rolle (Kolb und Kolb-Bachofen, 1998). Man nimmt an, dass von eNOS produziertes NO in der frühen Phase der Entzündung durch Vasodilatation und Hemmung der Leukozyten-Aktivierung und Thrombozytenaggregation (Kubes et al. 1998) einen positiven und begrenzenden Effekt auf den Verlauf der Entzündung hat. Durch iNOS produziertes NO hingegen trägt zu zahlreichen Merkmalen der chronischen Entzündung bei (Moilanen et al. 1999). Dies konnte auch in menschlichen Alveolarmakrophagen von Patienten mit kryptogener fibrosierender Alveolitis gezeigt werden (Saleh et al. 1997).

1.5 Das Modell der Monocrotalin induzierten experimentellen pulmonalen Hypertonie der Ratte

Es existieren verschiedene Modelle zur experimentellen Induktion einer PAH bei Ratten: die dauerhafte Exposition zu Hypoxie, die Verwendung von Fawn-Hooded Ratten mit anlagebedingten Thrombozytenspeicherstörungen und die Behandlung mit Monocrotalin (MCT). Letzteres Modell wurde bereits in zahlreichen Studien angewendet, da durch Monocrotalin verschiedene pathologische Veränderungen induziert werden und diese den Veränderungen bei der menschlichen pulmonalarteriellen Hypertonie sehr ähnlich sind (Huxtable et al. 1978).

Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid, das aus den Samen der Pflanze *Crotalaria spectabilis* isoliert werden kann. Von dieser Substanz ist bekannt, dass sie in

Säugetieren eine Reihe von toxischen Wirkungen entwickelt (Kay et al. 1966): Neben portaler Hypertension, Tumoren unterschiedlicher Zellen und venösen Verschlusskrankheiten der Leber und schweren Leberschäden, und Lungenödem induzieren die in der Leber verstoffwechselten Metabolite von Monocrotalin (Dehydromonocrotalin und Dehydroretronecin) auch eine selektive Verletzung des Lungengefäßendothels mit Ausbildung einer Vaskulitis (Wilson et al. 1992) und gut dokumentierten histopathologischen Veränderungen des pulmonalen Gefäßendothels (Kay et al. 1969, Butler et al. 1970, Smith et al. 1977, Meyrick et al. 1980). Die darauf folgende vermehrte Muskularisierung und Hypertrophie der Tunica Media in pulmonalen Arterien führt zu erhöhtem Gefäßwiderstand und erhöhtem pulmonal arteriellem Druck (Mathew et al. 1997; Mitani et al. 1997), welcher in Abhängigkeit der MCT Dosis und dem Alter der Tiere (Hislop and Reid, 1974) im weiteren Verlauf zur Ausbildung einer rechtsventrikulären Hypertrophie führt und letale Folgen hat. (Werchan et al. 1989, Kay et al. 1966, Hill et al. 1989). Charakteristisch für Pyrrolizidinalkaloide und ihre Metaboliten ist ihre kurze Halbwertszeit. Bereits nach 24 Stunden sind diese verstoffwechselt, renal ausgeschieden und im Gewebe oder in Körperflüssigkeiten nicht mehr nachweisbar (Hayashi et al. 1967).

Bereits eine einmalige Injektion von MCT induziert in Ratten eine schnell voranschreitende pulmonale Hypertonie. Histologische Charakteristika der MCT induzierten PAH sind endotheliale Schäden, Verdickung der Media von Widerstandsgefäßen, sowie subendotheliale Verdickungen und Fragmentierung von elastischen Fasern in pulmonalen Hauptarterien. Meyrick und Reid (1979) konnten zeigen, dass bereits 3 Tage nach Monocrotalin-Applikation eine zunehmende Muskularisierung ursprünglich nicht muskularisierter Lungenarterien stattfindet.

Diese Veränderungen konnten auch in den verschiedenen menschlichen Formen der pulmonalen Hypertonie beobachtet werden (Meyrick et al. 1980, Mathew. et al. 1990).

Die Schäden die durch MCT am Gefäßsystem verursacht werden, verlaufen schrittweise:

Eine Woche nach MCT-Injektion lassen sich bei den behandelten Ratten bereits Endothelschäden sowie perivaskuläre und subendotheliale Ödeme nachweisen. Der

pulmonalarterielle Druck nimmt ab der ersten Woche kontinuierlich zu (Ghodsi und Will, 1981). Bis zur 2. Woche nach MCT-Behandlung sind inflammatorische und haemorrhagische Reaktionen voll ausgebildet, die in den folgenden Wochen in chronische Umbauprozesse übergehen. Ab Beginn der zweiten Woche läßt sich eine beginnende Rechtsherzhypertrophie nachweisen. Umso ausgeprägter sind diese Veränderungen 4 bis 6 Wochen nach Behandlung mit MCT (Molteni und Ward et al. 1984, Rajamma et al. 1997). Die stetig zunehmende Druckbelastung des rechten Ventrikels führt nach dem Stadium der kontinuierlichen Hypertrophie zur exzentrischen Dilatation und Dekompensierung mit Rechtsherzversagen.

Inflammatorische Mechanismen spielen eine bedeutende Rolle bei einigen ursächlichen Krankheiten der menschlichen PAH wie zum Beispiel Bindegewebserkrankungen und HIV-Infektion. Entzündung zeigt sich in diesen humanen Formen vorwiegend perivaskulär und im Bereich von plexiformen Läsionen (Dorfmueller et al. 2003). Im Modell der Monocrotalin-Induzierten PAH bei Ratten zeigen sich sowohl die gleichen perivaskulären Entzündungsmuster sowie eine vermehrt interstitielle Entzündung (Wilson 1989, Stenmark 1985) als auch eine zusätzliche Mastzellhyperplasie (Valdivia, 1967).

Die besondere Rolle der Entzündungskomponente in diesem Modell führte zu verschiedenen Studien zur Immunsuppression (Dorfmueller et al. 2003) und Antizytokin-Therapien (Voelkel et al. 1994) in welchen untersucht wurde, inwiefern Entzündungsprozesse bei der Entstehung und Entwicklung von PAH-typischen Läsionen beim Menschen eine Rolle spielen. Lupus Erythematoses Patienten mit PAH konnten so von immunsuppressiver Therapie profitieren.

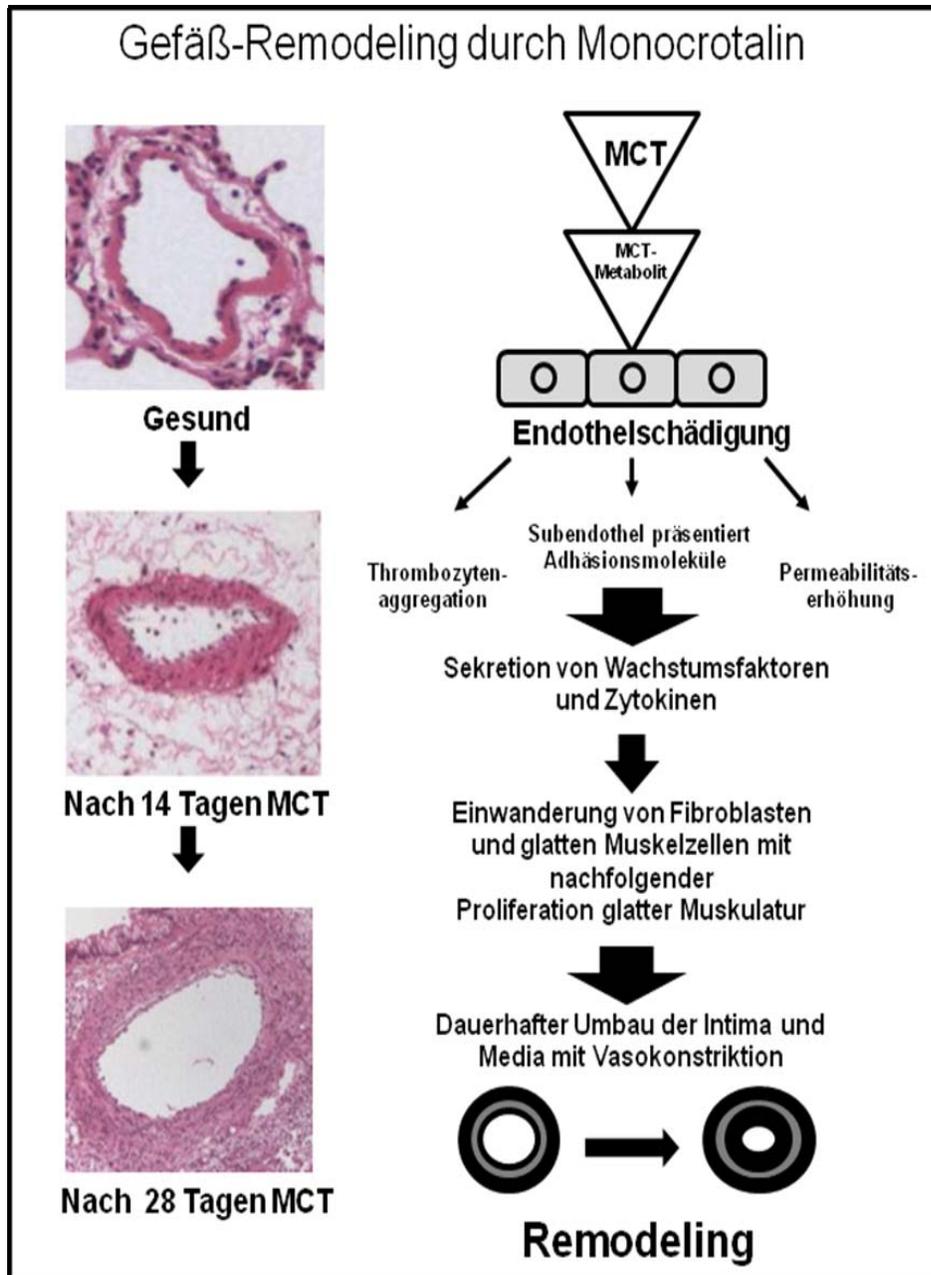


Abb. 6 Pathophysiologie des Monocrotalin vermittelten Gefäßremodeling

Monocrotalin wird nach Injektion in der Leber zu aktiven Metaboliten verstoffwechselt. Diese bewirken im Endothel von Lungengefäßen Schädigungen. Diese endotheliale Dysfunktion ist durch Permeabilitätserhöhung, Präsentation von Adhäsionsmolekülen und vermehrte Thrombozytenaggregation gekennzeichnet. Daraus resultiert die vermehrte Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie Zytokinen, welche die Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten fördern. Das progressive Fortschreiten dieser Prozesse führt zum chronischen Umbau von Intima und Media, was wiederum zu Gefäßobliteration und Vasokonstriktion führt.

1.6 Rolle von NO in der pulmonalen Hypertonie und Aktivität von NOS in MCT induzierter PAH

Die integrale Rolle von Stickstoffmonoxid in der Entwicklung einer Pulmonalen Hypertonie wird durch zahlreiche Studien zum Stoffwechsel von NO sowohl bei Patienten mit PH, als auch in experimentellen Modellen der PH verdeutlicht. Cella et al. wiesen 2001 verringerte Plasma NO-Spiegel bei Patienten mit schwerer PAH im Vergleich zu gesunden Patienten nach. Kaneko et al. (1998) konnten zeigen, dass die erniedrigten Stoffwechselprodukte von NO in Bronchiallavageflüssigkeit bei Patienten mit PH direkt mit der Schwere und dem Ausmaß der Erkrankung korrelierten.

Unklarheiten bestehen jedoch weiterhin hinsichtlich der Expression der NO-produzierenden endothelialen NO-Synthase bei pulmonaler Hypertonie. Beim Menschen konnten Giaid et al. (1995) bei Untersuchungen an Lungengefäßgewebe von Patienten mit PH eine verringerte Expression von eNOS nachweisen. Xue und Johns (1995) berichteten hingegen von erhöhtem eNOS Immunostaining, Tudor et al. (1999) von unveränderten Befunden im eNOS-Immunostaining.

Ebenfalls widersprüchlich sind Aussagen über die Aktivität der NOS in experimentellen Modellen der PH:

Während die Aktivität der NOS-Isoformen in anderen Modellen experimentell induzierter Pulmonaler Hypertonie, vor allem im Hypoxie-Modell (in dem in den meisten Studien die hoch-Regulation von eNOS nachgewiesen werden konnte, Resta et al. 1997) untersucht wurden, gibt es kontroverse Ergebnisse über die Expression der einzelnen NOS-Isoformen im MCT-Modell der PAH. Insbesondere bestehen noch Unklarheiten wie sich das Verhältnis zwischen eNOS-Genexpression und NO-Produktion und Aktivität in den einzelnen Formen der PAH verändert.

In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von eNOS im Modell der MCT induzierten pulmonalen Hypertonie erniedrigt ist (Kanno et al. 2001, Tyler et al. 1999, Hironaka et al. 2003). Wie bereits zuvor ausgeführt, kann NO unter bestimmten Bedingungen auch als pathogener Mediator wirksam werden. Vor allem dann, wenn es in großer Menge nach inflammatorischer Stimulation von iNOS

oder Überstimulation von nNOS und eNOS produziert wird. Zwischenstoffe wie Peroxynitrit stehen im Verdacht die Funktion der eNOS zu stören. Insbesondere Methionin und Cystein-Residuen an Proteinen sind sehr anfällig für Oxidationen durch Peroxynitrit.

Zou et al. (2002) zeigten, dass bei Diabetes Mellitus Peroxynitrit die Herauslösung von Zink aus dem Zink-Thiolat-Kluster von eNOS bewirkt und so zum sogenannten „uncoupling“ des Enzyms führt. Durch die Reduktion der Thiole dissoziieren die eNOS Dimere in Monomere. Diese Modifizierung von eNOS resultiert in erniedrigter NO-Bioaktivität und erhöhter endothelialer O_2^- Produktion, welches wiederum mit NO reagiert und weiteres Peroxynitrit bildet (Zou et al. 2004).

Die vermehrte Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS) durch iNOS wird in Zusammenhang mit einem Funktionsverlust der endothelialen NO-Synthase gebracht.

Die genaue Rolle von iNOS in der MCT-induzierten PH ist weiterhin unklar. Es liegt daher nah, durch den Einsatz von selektiven iNOS-Inhibitoren eine mögliche iNOS-eNOS Interaktion weiter zu untersuchen.

1.7 Inhibitoren der NO-Synthase

1.7.1 Endogene Hemmstoffe der NO-Synthase

Protein-Methyltransferasen (PRMT) stellen durch Methylierung von Proteinen endogene Inhibitoren der NO-Synthasen dar. N-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) sind endogen synthetisierte, unspezifische NOS-Inhibitoren und sie werden ebenfalls endogen durch Dimethylarginin-diethylaminohydrolasen (DDAH) abgebaut. NO vermag die Aktivität der DDAH zu hemmen und so weitere NO-Produktion durch Hemmung des Abbaus von ADMA zu blockieren (Vallance und Leiper, 2004).

1.7.2 Entwicklung und Einteilung der Hemmstoffe von NO-Synthasen

Substanzen welche die biologische Aktivität von NOS hemmen, können nach ihren Wirkmechanismen in 6 Gruppen eingeteilt werden:

- 1) Substanzen, die die Aufnahme von L-Arginin in die Zellen verhindern

- 2) Stoffe die den Nachschub an benötigten Kofaktoren für die Oxidation von L-Arginin hemmen
- 3) BH₄-Synthese- Inhibitoren und Calmodulin-Antagonisten
- 4) Inhibitoren des Elektronenflusses durch NADPH, Flavine und Substanzen die mit der Haem-Bindungsstelle interagieren
- 5) NOS-Expressions-Hemmer
- 6) Wirkstoffe die die Bindung des Substrats an NOS verhindern

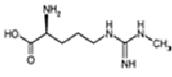
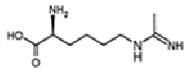
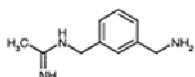
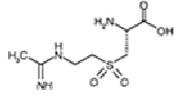
Hemmstoffe der Dimer-Bildung der NOS stellen einen weiteren Mechanismus zur Hemmung dar. Die Primärsequenzen der menschlichen NOS-Isoformen ähneln sich nur zu 50 %. Eine zukünftige Herausforderung zur Entwicklung neuer selektiver NOS-Inhibitoren stellt daher die Kristall-Struktur mit dem katalytischen Zentrum dar, da es eine große strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Isoformen aufweist.

Die am besten erforschten Substanzen zur Hemmung der NOS sind jene, die mit der Bindung des Substrats (L-Arginin) an das Enzym interferieren (Hobbs et al. 1999).

Die ersten NOS-Inhibitoren waren modifizierte Analoga des Substrats L-Arginin, wie der Prototyp der NOS-Inhibitoren Ng-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und dessen Methylester-Prodrug L-NAME. Beide wurden genutzt um zahlreiche physiologische Wirkungen und Stoffwechselwege von NO zu identifizieren und seine Rolle in pathophysiologischen Prozessen zu untersuchen.

Da die drei NOS-Isoformen verschiedene physiologische Funktionen erfüllen und unterschiedlichen regulatorischen und dysregulatorischen Einflüssen unterworfen sind, bestand eine besondere Notwendigkeit darin, Isoform-selektive NOS – Inhibitoren zu entwickeln. Einige NOS-Inhibitoren stellten sich jedoch, trotz guter Selektivität, nach in vivo Experimenten aufgrund von schlechter Zell-Permeabilität, ungenügender Bioverfügbarkeit oder toxischen Nebenwirkungen zur Pharmakotherapie als wenig verwendbar heraus (Alderton et al. 2001; Salerno et al. 2002).

Die Selektivität eines NOS-Inhibitors kann über die initiale Bindungsaffinität (K_i), den IC₅₀-Wert (μM) oder in fold ausgedrückt werden. Eine Übersicht über häufig genutzte NOS-Inhibitoren und den Grad ihrer Selektivität gibt Tab 3.

	L-NNMA	L-NIL	Aminoguanidin	1400 W	GW 273629
					
Selektivität (-fach)					
iNOS vs eNOS	0,5	49	11	>4000	>125
iNOS vs nNOS	0,7	23	5,5	32	78

Tab.3 Übersicht über einige übliche selektive NOS-Inhibitoren mit der entsprechenden Maßzahl ihrer Selektivität auf menschliche NOS-Isoformen.

(Daten nach Young et al. und Alderton et al. aus Experimenten unter definierten Bedingungen: 30 µM L-Arginin bei 37°C über 15 Minuten nach 15 Minuten Vor-Inkubation mit dem Inhibitor. Bei der Interpretation der Werte muss berücksichtigt werden, dass Studien an gereinigten Enzymen nicht immer mit in vivo Konditionen vergleichbar sind und die angegebenen Daten aus zwei unterschiedlichen Studien stammen).

Petros et al. beschrieben 1991 als erste Fallbeispiele über die Verabreichung von NOS-Inhibitoren an Menschen. Die Behandlung mit L-NNMA und L-NAME führte zur Verbesserung der Hämodynamik nach erfolgloser konventioneller Therapie von Patienten im septischen Schock (Petros et al. 1991). Weitere prospektive Studien mit dieser Substanz zeigten jedoch eine höhere Mortalität im behandelten Kollektiv (Feihl et al. 2001). Nicht selektive NOS-Inhibitoren wurden in klinischen Studien unter anderem Patienten mit Asthma bronchiale verabreicht (Taylor et al. 1998), sowie Patienten im Kardiogenen Schock (Cotter et al. 2003).

Spezifische Inhibition von iNOS konnte durch Amidin-Abkömmlinge wie 1400 W erreicht werden, der von Garvey et al. (1997) identifiziert wurde, sowie Aminoguanidin, die Gruppe der Acetamidin-Inhibitoren (L-NIL und L-NIO) und die neueren hochspezifischen GW274150 und GW273629 (Alderton et al. 2005). Diese neueren Hemmstoffe konkurrieren allesamt mit Arginin, bieten keine akute Toxizität und eignen sich daher gut für Tierstudien, mit Ausnahme von 1400 W. 1400 W zeigte eine akute Toxizität in

höherer Dosierung, was den sicheren therapeutischen Nutzen beim Menschen in Frage stellt (Thomsen et al.1997).

Studien mit pharmakologischen Inhibitoren der NOS Isoenzyme und mit NOS-Isoform knock out Mäusen haben gezeigt, dass die Hemmung einzelner NOS-Isoformen von therapeutischem Nutzen sein kann, aber gleichzeitig auch schädigende Nebenwirkungen haben kann. Für eine Langzeitbehandlung darf ein Wirkstoff eNOS nicht blockieren, da dies Erkrankungen wie Artherosklerose und schlechte kardiovaskuläre Effekte nach sich ziehen würde. Bei zahlreichen anderen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, Asthma bronchiale, Multiple Sklerose, Glaukom, Krebserkrankungen und Morbus Parkinson könnte die selektive Hemmung von nNOS und iNOS eine vielversprechende Therapiemöglichkeit darstellen (Neufeld, 2004; Bishop und Anderson, 2005).

1.7.3 L-NIL

L-NIL ist ein selektiver iNOS–Inhibitor der bereits in zahlreichen Versuchen verwendet wurde um Vasokonstriktion und Vasodilatation in der Lunge in verschiedenen PH-Modellen zu untersuchen und dessen Kinetik und Selektivität gegenüber anderen NOS-Isoformen vielfach untersucht wurde (Moore et al. 1994; Wolff et al. 1998).

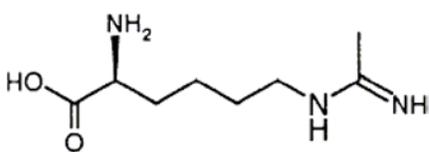


Abb.7 Strukturformel von L-NIL

L-NIL, das höhere Homolog von L-NIO, gehört zur Gruppe der L-Arginin-Analoga. Moore et al. konnten für L-NIL IC₅₀-Werte (also die Konzentration des Inhibitors bei 50% Inhibierung) für iNOS von 3,3 µM und für nNOS von 92 µM bei 60 µM L-Arginin nachweisen. Alderton et al. ermittelten eine 49-fache Selektivität der Hemmung von iNOS verglichen mit eNOS und eine 23-fache Selektivität von iNOS über nNOS (siehe Tab.3).

Vorteilhaft für die Versuchsreihe ist, dass L-NIL eine gute orale Bio-Verfügbarkeit bei

Verabreichung im Trinkwasser zeigt. In Versuchen mit radioaktiv markiertem L-N6-(1-Iminoethyl)Lysine-5-Tetrazole-Amid konnte eine orale Bioverfügbarkeit von 48% nachgewiesen werden, beim Stoffwechsel der Substanz entstanden keine toxischen Metabolite (Zhang et al. 2004). Fletcher et al. (1998) zeigten in Experimenten in einem Osteoarthritis-Model der Ratte, dass die Verabreichung von L-NIL zu keiner Erhöhung des Blutdrucks führte. Eine Eigenschaft die diese Substanz um so interessanter für Versuche mit hämodynamischen Messungen macht.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es existieren widersprüchliche Ergebnisse zur Aktivität der einzelnen NOS-Isoformen im MCT-Model der pulmonalen Hypertonie.

In dieser Arbeit sollte daher

- zunächst die Expression der endothelialen-, der induzierbaren- und der neuronalen NO-Synthase im MCT-Model der PH durch Western-Blot-Analyse untersucht werden.
- durch den Einsatz eines selektiven iNOS-Inhibitors die Wirkung einer spezifischen iNOS Hemmung auf die Hämodynamik von Ratten mit pulmonaler Hypertonie untersucht werden.
- der Einfluss einer selektiven iNOS-Hemmung auf die Expression der anderen NOS-Isoformen untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tierversuchsgenehmigung

Der Antrag auf Genehmigung des Versuchsvorhabens wurde gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes (Genehmigungspflicht bei Wirbeltierversuchen) von der zuständigen Tierschutzkommission überprüft und vom Regierungspräsidium genehmigt. Der für die Versuche gestellte Antrag kann unter dem Aktenzeichen GI20/10 Nr. 18/2005 eingesehen werden.

2.1.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche, weiße Ratten des Sprague-Dawley Aufzuchtstammes der Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland im Gewichtsbereich zw. 280 g und 330 g verwendet. Die Tiere wurden in Feinstreu, (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) in Edelstahlkäfigen mit Plexiglasboden bei Raumtemperatur von 20-24° C gehalten und erhielten die Extruded Global Rodent Diet (pelletiertes Trockenfutter der Firma Harland Tekland, Madison, USA) sowie Leitungswasser ad libitum.

Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II der Universität Gießen. Zu Beginn der Versuche erfolgte die Haltung in Käfigen zu 4-5 Tieren, dann je nach Versuchsgruppe in Einzelkäfigen. Es wurden ausschließlich Tiere für die Versuche verwendet, die eine normales Futteraufnahme- und Putzverhalten sowie keine Anzeichen für Krankheiten zeigten.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller / Katalog Nr.	Tier	Spezifität	Verdünnung
Primär-Antikörper				
Maus MK [6c5] für GADPH	Abcam Cambridge,UK ab8245	Maus	h,r, m	1:5000
Anti iNOS PK	BD Biosciences.San Jose, CA, USA 610333	Hase	Hase	1:1000
Anti eNOS PK	BD Biosciences.San Jose, CA, USA 610298	Hase	Hase	1:3000
Anti nNOS PK	Abcam,Cambridge,UK / ab5588	Hase	H,r,m	1:1500
Sekundär-Antikörper				
Anti Maus IgG Peroxidasegekoppelt für GADPH	Sigma,Steinheim,Deutschland / A9044	Hase	m	1:50000
Anti Hase IgG Peroxidasegekoppelt	Sigma,Steinheim,Deutschland / A9169	Ziege	Hase	1:40000

Tab.4 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper MK=Monoklonal; PK=Polyklonal; h=human; r= Ratte; m=Maus

2.1.4 Chemikalien

Substanz	Handelsname/Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid 30 %		Fluka, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.		
Bis-Acrylamid		Sigma, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol		Sigma, Steinheim, Deutschland
Bromophenol blau		Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycine		Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol		Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol 95%		Riedel de Haen, Steinheim, Deutschland
Methanol		Fluka, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin	TEMED	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin	BSA	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver		Roth, Mannheim, Deutschland
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat	Tween-20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris-Base		Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris-HCl		Sigma, Steinheim, Deutschland
2-Propanolol		Fluka, Steinheim, Deutschland
t-Octylphenoxy-polyethoxy-ethanol	Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol, 70%, 96%, 99,6%		Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol 99,8%		Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Formaldehyd, säurefrei >37%		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Roth, Karlsruhe, Deutschland

Eindeckmedium	Pertex	Medite, Burgdorf, Deutschland
Paraffin	Paraplast Plus	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin	Eosin-y-alkoholisch	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tab.5 Verwendete Chemikalien

2.1.5 Medikamente und Inhibitoren

Substanz	Handelsname/Bezeichnung	Hersteller
Atropinsulfat 0,5 mg/ml		Braun, Melsungen, Deutschland
Beatmungsgas	Gasgemisch 50 % O ² , 50% N ²	Air Liquid, Siegen, Deutschland
Enrofloxacin	Baytril 2,5 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Heparin-Natrium	Liquemin N 25.000	Roche, Basel, Schweiz
Isotone Kochsalzlösung 0,9%		Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Isofluran	Forene	Abbot, Wiesbaden, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100mg/ml	Ketavet	Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Deutschland
Lidocainhydrochlorid 2%	Xylocain	Astar Zeneca, Wedel, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml	Domitor	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat 8,4 %		
Monocrotalin	Crotaline	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natronlauge 1N (1mol/l)		Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1 N (1mol/l)		Merck, Darmstadt, Deutschland
Protein-Inhibitor	Complete Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
N6-(1iminoethyl)-L-lysine- dihydrochlorid	L-NIL	Cayman Chemicals, USA

Tab. 6 Verwendete Medikamente und Inhibitoren

2.1.6 Geräte

Gerät	Handelsname/Bezeichnung	Hersteller
Western-Blot -Einheit		Kreutz Labortechnik
Elektrophorese Einheit	Minigel Twin	Biometra, Göttingen, Deutschland
Glasplatten	Zur Gelherstellung	Biometra, Göttingen, Deutschland
Klemmen für Glasplatten		Biometra, Göttingen, Deutschland
Dichtungsgummies		Biometra, Göttingen, Deutschland
	BioDoc Analyze Transluminator und Programm	Biometra, Göttingen, Deutschland
Beatmungsgerät	SAR-830 P Ventilator	IITH Inc. Life Sciences, Wodland Hills, CA, USA
Blutgase-Analysegerät	ABL 500	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Blutanalysegerät	Hemoximeter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod.II for arterial Blood Pressure Measurement	Braun, Melsungen, Deutschland
Druckkonverter	Transbridge 4M	WPI, Sarasota, FL, USA
PET-Schläuche verschiedener Größen		
Trachealtubus	Aus Microlance 3 15G, gekürzt auf 1,5 cm	Becton Dickinson, Deutschland
Ratten-Immobilisator	Broome Rodent Restrainer	Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
Wärmeunterlage	Thermo-Lux	Witte und Suttor, Murrhardt, Deutschland
Parafilm		American National Can, Menasha, WS, USA
Rotationsmikrotom	RM 2165	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinausgußstation	EG 1140H	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Objekträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

Stereomikroskop	DMLA	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Heizbad	HCL TM 130-6	HCL-BioTech, Bovenden, Deutschland
Homogenisator	Heidolph Diax 900	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kältezentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborwaage	SAC S1	Scaltec, Göttingen, Deutschland
pH-Messgerät	Inolab pH-Level 1	Fa. WTW, Deutschland
verschiedene Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßschüttler	Vortex -Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Zentrifuge	Mikro 12-24	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Wippschüttler WT 17		Biometra, Göttingen, Deutschland

Tab. 7 Verwendete Geräte

2.1.7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Handelsname/Bezeichnung	Hersteller
Combi-Stopper		Braun, Melsungen, Deutschland
Dreiwegehahn	Connecta Plus 3	Ohmeda-Datex, GE- Healthcare, München
Desinfektionsmittel	Braunoderm	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe		Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 1ml, 2ml		Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle 26 G (0,9 mm x 26 mm)	BD Mikrolance 3	Becton- Dickinson, Deutschland
Venenverweilkanüle 20 G und 22 G	Vasocan Braunüle	Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Reaktionsgefäße 0,2-2 ml		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen 15ml und 50 ml		Falcon, Fort Worth, USA
Zentrifugiergefäße		Falcon, Fort Worth, USA
Universal-Einbettkassetten mit Deckel		Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Western Blot		
Gel-Lade-Pipettenspitzen	Loading Tips	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Blotting Membran	Biotrace NT	Pall, New York, USA
Chemoluminescence-Kit	ECL plus western blotting detection system	Amersham Biosciences, New Jersey, USA
Gel-Blotting-Papier 580 x 580 mm		Schleicher & Schüll, Einbeck, Deutschland
Röntgenfilm 18 x 24 cm	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, New Jersey, USA
Farb-Marker für Molekülgrößen	Full range Rainbow™ recombinant molecular weight marker	Amersham Biosciences, New Jersey, USA
	Bio Rad Dye	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland

Tab. 8 Verwendete Gebrauchsmaterialien

2.1.8 Lösungen und Puffer

Die aufgeführten Lösungen wurden mit deionisiertem und ultrafiltriertem Wasser angesetzt.

Lösung	Zusammensetzung
1x TBST Waschpuffer	1,8 g EDTA, 2,24 g Tris base, 8,85 g NaCl, 1 ml Tween 20 mit Aqua dest. auf 1L
1 x Lysis Buffer	100 µl 1,5 M NaCl 100 µl 0,6 M Na ₃ N 10 µl 10% Triton X 50 µl 1M Tris (pH 7,6) 10 µl 1M CaCl ₂

	1 Tablette Protease inhibitor cocktail mit Aqua dest. auf 1ml
5 x Laemmli Buffer	1 ml β -Mercaptoethanol (0,02%) 1,8 ml Aqua dest. 2,5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml Glycerol 2 ml SDS (20 %) 0,2 ml 1% Bromophenol Blau
1 x Running Buffer	14,4 g Glycine 3 g Tris base 10 ml 10% SDS Auf 1 L mit Aqua Dest.
Blockierlösung	5 g Magermilchpulver in 100 ml 1 x TBST
Transfer buffer	6 g Tris base 3 g Glycine 200 ml Methanol auf 1 L mit Aqua dest.
Stripping Buffer	12,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,7 ml β -Mercaptoethanol, 20 ml SDS (10%)
APS	100 mg Ammoniumpersulfat in 1 ml Aqua dest.
30 % Acrylamid	Acrylamid 29,2 g Bis-Acrylamid 0,8 g

Tab. 9 Verwendete Lösungen

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau

Der experimentelle Aufbau setzte sich aus drei Tiergruppen zusammen: Einer gesunden Kontrollgruppe, der erkrankten MCT-Gruppe und der therapierten L-NIL-Gruppe. Jeder Gruppe wurden 10 Tiere zugeteilt. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte dann zu festgelegten Zeitpunkten (siehe Abb.9) die Verabreichung von Monocrotalin, Placebo bzw. L-NIL. Nach Ablauf von 28 Tagen wurden die Tiere dann den Hämodynamik-Experimenten zugeführt und Proben für Western-Blot Analysen und Histologie gesammelt.

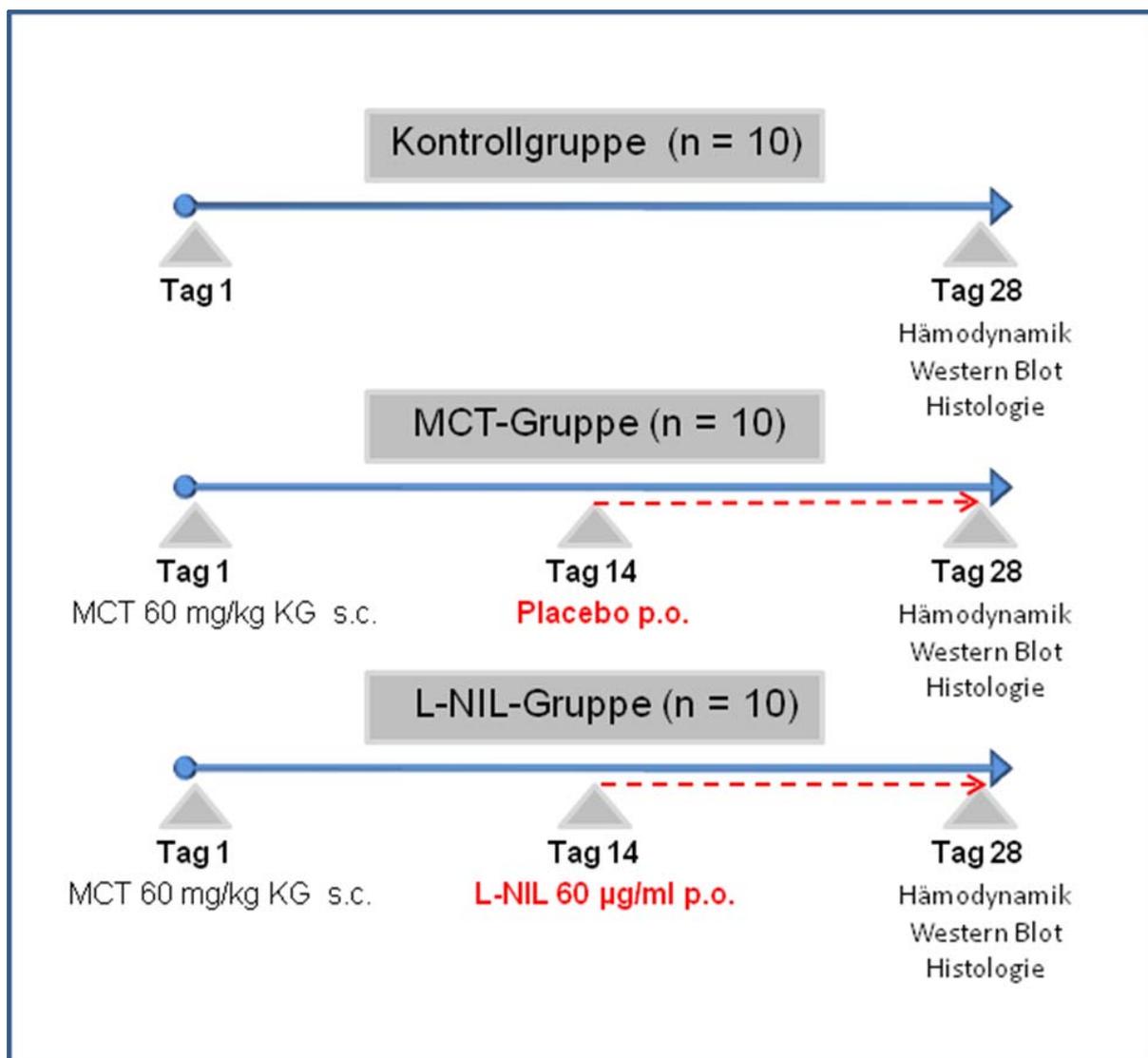


Abb. 8 Versuchsaufbau Dargestellt ist die Einteilung der Versuchsgruppen und der zeitliche Ablauf der Monocrotalin, Placebo und L-NIL Applikationen in den jeweiligen Gruppen.

2.2.2 Monocrotalin Behandlung

Zunächst erhielten die Ratten der MCT- und der L-NIL-Gruppe eine Kurznarkose mit Isofluran. Hierzu wurden die Tiere kurz in einen Glasbehälter gesetzt in dem sich ein mit Isofluran getränkter Tupfer befand. Nachdem jedes Tier gewogen wurde, erfolgte die gewichtsadaptierte subcutane Injektion einer MCT-Lösung (60mg/ kg KG) in den Nacken. Zur Herstellung dieser Injektionslösung wurde kristallines Monocrotalin zunächst in 3 ml 1 N HCl gelöst und dann der pH-Wert mit etwa 2 ml 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 gepuffert. Gesunde Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen einer wirkstofffreien 0,9%igen Kochsalzlösung als s.c. Injektion.

Zur Infektprophylaxe erhielten die Tiere über eine Zeitspanne von 14 Tagen kontinuierlich Enrofloxacin 2,5 % (Baytril, Konzentration 2 ml / 500 ml) in das Trinkwasser.

2.2.3 Gewichts-, Trinkwasser- und Futterbilanzierung

Die Tiere aller drei Versuchsgruppen erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Futter und Wasseraufnahme wurde in jeder Gruppe täglich gemessen. Nach Ablauf jeweils einer Woche wurde das Gewicht der Tiere bestimmt.

2.2.4 L-NIL Therapie

Zwei Wochen nach der MCT-Injektion wurde bei den Tieren der L-NIL-Gruppe mit der Therapie begonnen. Hierzu wurden die Tiere in Einzelkäfige gebracht um ein genaueres Monitoring der täglichen Medikamentenaufnahme durchführen zu können. L-NIL-dihydrochlorid ist eine kristalline Substanz, diese wurde zu Herstellung einer Lösung die dem Trinkwasser zugesetzt werden konnte, unter Schütteln in Aqua dest. aufgelöst. Es wurden Aliquots dieser Lösung zubereitet und bei -20° Celsius gelagert. Täglich, zur gleichen Tageszeit erhielten die Tiere der L-NIL-Gruppe eine frische Trinklösung mit L-NIL in einer Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$. Weiterhin täglich wurde dann die aufgenommene Menge des Trinkwassers gemessen und daraus die Menge des getrunkenen Wirkstoffs berechnet.

2.2.5 Hämodynamische Messungen

Nach 28 Tagen erfolgten die hämodynamischen Messungen. Die Tiere erhielten hierzu zunächst eine Narkose, die individuell und gewichtsorientiert nach folgendem Schema erfolgte:

Medikament	Dosierung / Applikat.
Ketamin	50 mg/kg KG i.p.
Medetomidin	100 µg/kg KG i.p.
Atropin	250 µg/kg KG i.m.

Sobald die Tiere nicht mehr auf Schmerzreize reagierten, erfolgte die intramuskuläre Injektion von Atropin zur Reduzierung vasovagaler Reaktionen bei der Präparation im Halsbereich.

Nach Injektion von 1 ml Xylocain (2%) subcutan in den Hals erfolgte die Präparation des Tieres. Nach einem ca. 2 cm langen Hautschnitt von der Mandibula bis zum Manubrium sternii wurde zunächst das Platysma und Fettgewebe entfernt bis sich die Zungenmuskulatur darstellte. Diese wurde stumpf präpariert um Blutungen zu vermeiden. Die Trachea sowie die prätrachealen Gefäße wurden dargestellt und mit einer gebogenen Pinzette unterfahren, so dass eine lockere Ligatur um den unteren Teil der Trachea gelegt werden konnte. Es erfolgte die Tracheotomie mit anschließender Intubation. Durch Anziehen der Ligatur gelang die Fixierung des Tubus.

Die Beatmung erfolgte mit einem Gasgemisch aus 50% O² und 50 % N bei einer Frequenz von 60-70 Beatmungen/Minute und einem Tidal-Volumen von 0,83 ml/100 g KG. Der PEEP wurde auf 1 cm Wassersäule eingestellt.

Im Anschluß erfolgte die Präparation der Vena jugularis sinistra durch Erweitern des medialen Hautschnittes. Nach stumpfer Freipräparation wurde die Vene rostral ligiert und caudal abgeklemmt. Nach leichtem Anspannen der Vene wurde diese im mittleren Abschnitt durch einen kleinen Schnitt geöffnet. Mittels Seldinger Technik wurde der zuvor mit NaCl 0,9 % entlüftete Polyethylenkatheter (0,4 x 0,8 mm, Portex,

Hythe, England) an den bereits der flüssigkeitsgefüllte Drucküberträger angeschlossen wurde, eingeführt. Nachdem der Katheter mittels Fadenschlinge fixiert wurde, konnte nach Abnahme der Gefäßklemme der Katheter über der Vena Cava cranialis bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben werden (Swan und Ganz et al. 1970). Über die abgeleiteten Druckkurven konnte beim Verschieben des Katheters die richtige Positionierung überprüft werden. Der Katheter konnte auf diese Weise bei typischer pulsatilem Druckkurve mit systolischen Werten von 20–25 mmHg (gesunde Tiere) im rechten Ventrikel liegend erkannt werden. Mit der unteren Ligatur wurde der Katheter fixiert.

Zur Antikoagulation wurden 0,5 ml Heparin mit 1,5 ml NaCl 0,9 % über den Katheter intravenös appliziert. Es erfolgte die Zuwendung zur rechten Seite. Bei der Präparation der Arteria carotis communis dextra wurde ähnlich verfahren. Nach Freipräparation der Arterie zwischen Zungenbeinmuskeln und M. Sternomastoideus erfolgte das Legen einer zunächst lockeren rostralen und caudalen Ligatur sowie einer zusätzlichen Klemme unterhalb der unteren Ligatur. Die rostrale Ligatur wurde zugezogen. Jetzt ließ sich die A. carotis oberhalb der Klemme inzidieren und der Katheter ca. 2 cm bis zum Arcus aortae vorschieben. Es ließen sich nun Druckkurven für VP, RVP und SVP über eine Zeitspanne von bis zu 45 Minuten ableiten und mit einem Programm aufzeichnen (Labtech Pro).

2.2.6 Blutgasanalyse, O₂-Sättigung, Hb-Bestimmung

Nach Abschluß der Druckmessungen erfolgte die Blutentnahme von jeweils 1 ml venösem Blut aus dem rechten Ventrikel und arteriellem Blut aus der A. Carotis welches kurz auf Eis gelagert wurde. Die Messung von pO₂, pCO₂ und pH erfolgten dann 30 Minuten später mit dem ABL 330. Die Messung von Hämoglobin und O₂-Sättigung erfolgten mit dem OSM 2 Hemoximeter.

2.2.7 Lungenentnahme

Nach Beendigung der Druckmessungen wurde mit einem T-förmigen Schnitt der Thorax eröffnet und über einen weiteren Schnitt in das rechte Atrium eine Kanüle in das Herz eingeführt. Über diesen wurde die Lunge mit NaCl 0,9 % Lösung von Blut freigespült. Anschließend wurde die Lunge entfernt und direkt mit der Schere grob

zerstückelt und in Eppendorf-Gefäße gegeben. Diese wurden zum Transport in flüssigen Stickstoff gegeben und dann bei -80°C eingefroren.

2.2.8 Bestimmung der Herzratio

Durch die Berechnung der Herzratio erhält man einen Parameter für das Ausmaß der rechtsventrikulären Hypertrophie.

Zur Bestimmung der Herzratio wurde das Herz aus der Ratte entfernt. Herzohren, Vorhöfe und Anhängsel großer Gefäße wurden abgeschnitten und das Herz entlang des Septums in rechten und linken Ventrikel getrennt. Das Septum entfiel dabei auf die linke Herzhälfte (LV+S). Beide Stücke wurden auf Objektträger gelegt und trockneten für zwei Wochen an der Luft bei RT. Die Herzstücke wurden daraufhin gewogen und das Gewicht des rechten Ventrikels durch das des linken Ventrikels mit Septum dividiert.

$$\text{Herzratio} = \text{RV} / \text{LV} + \text{S}$$

2.2.9 Berechnung des Herzzeitvolumens

Die Berechnung des Herzzeitvolumens (HZV) erfolgte nach dem Fick'schen Prinzip. Mit der unten aufgeführten Formel läßt sich bei Vorliegen der Werte für venöse und arterielle Sauerstoffsättigung und Menge der O_2 -Aufnahme das Herzzeitvolumen aus der arteriovenösen Sauerstoffkonzentrationsdifferenz berechnen.

$$\text{HZV} = \text{VO}_2 / \text{CaO}_2 - \text{CvO}_2$$

(VO_2 =aufgenommene Sauerstoffmenge; CaO_2 =Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut; CvO_2 = Sauerstoffkonzentration im venösen Mischblut)

2.2.10 Histologie

Zur histologischen Untersuchung wurde die linke Lunge verwendet. Nach Öffnung des Thorax und Entnahme der rechten Lunge (für Western Blot Analysen) erfolgte die Perfusion mit 3 % Para-Formaldehyd mit einem Druck von 20 cm Wassersäule. Die Lunge wurde entnommen und für 24 h in 3 % Para-Formaldehyd gelagert. Nach 24 h wurde das Para-Formaldehyd gegen 0,1 M PBS-Puffer ersetzt und bei 4° gelagert. Nach weiteren 24 h erfolgt die Entwässerung. Die Lungen wurden dann in Paraffin

Blöcke eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger gelegt. Über Nacht erfolgt eine Inkubation im Wärmeschrank bei 36 ° C.

Die Färbung der Schnitte mit Hämatoxyllin und Eosin (H&E) wurde nach dem untenstehenden Protokoll durchgeführt.

Färbedauer / min.:	Reagenz:
10	Rotihistol
10	Rotihistol
5	Rotihistol
5	Ethanol absolut 99,6%
5	Ethanol absolut 99,6%
5	Ethanol 96%
5	Ethanol 70%
2	Aqua dest.
20	Hämalaun nach Mayer, sauer
5	H ₂ O==> fließend
1	Ethanol 96%
4	Eosin-y-alkoholisch
abspülen	Aqua dest.
2	Ethanol 96%
2	Ethanol 96%
5	Ethanol 99,6%
5	Isopropylalkohol 99,8%
5	Rotihistol
5	Rotihistol
5	Xylol
	Eindecken mit Pertex

Tab.10 Hämatoxyllin-Eosin - Färbeprotokoll

2.2.11 Immuno Blot (Western Blot)

Beim Immuno- oder Western Blot handelt es sich um eine Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen durch Einsatz spezifischer Antikörper die das gesuchte Protein erkennen und deren Bindungen mit einer Enzymreaktion nachweisbar gemacht werden können.

Dafür werden Proteingemische zunächst mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Elektro-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und so immobilisiert. Auf diese Weise fixiert, können die Proteine auf der Membran nachweisbar gemacht werden.

2.2.12 Herstellen der Proteinextrakte

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Lungenteile wurden in Eppendorfgefäßen zu jeweils 100 mg abgewogen. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysispuffer und Proteinaseinhibitor Cocktail.

Mit einer kleinen Schere wurden die Lungenstücke im Gefäß grob zerstückelt und anschließend mit Hilfe des Homogenisators weiter mechanisch zerkleinert bis das gesamte Gewebe feinflockig im Lysepuffer vorlag. Dieser Arbeitsschritt wurde auf Eis durchgeführt um zu hohe Temperaturen beim homogenisieren zu vermeiden. Das Homogenat wurde dann in der Kältezentrifuge bei 12000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand ab pipetiert, in 100µl Portionen aufgeteilt und bei -80° Celsius eingefroren.

2.2.13 Proteinmengenbestimmung (Bradford-Test)

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinmengen erfolgte photometrisch nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Ein auf dieser Methode beruhendes Verfahren ist der Bio-Rad Proteinassay (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland). Bei der Bindung von „Coomassie brilliant blue g.250“ an Proteine erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Vor der spektrophotometrischen Messung wurden 5-10 µl Probe mit Aqua dest. auf 400 µl verdünnt und mit 100 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

Unter Verwendung von Standards aus Rinderserumalbumin wurde eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.2.14 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Auf dieser Proteinmengenbestimmung basierend wurden die Proteinkonzentrationen der Proben einander angeglichen und zur Bestätigung ein Western Blot für das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt.

GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, wurde als Haushaltsgen gewählt, weil die Expression von β -Actin bei PAH verändert ist.

2.2.15 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970) dient der Auftrennung eines Proteingemisches nach Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Hierzu wurden die Proben zunächst mit SDS versetzt und für 10 Minuten in ein 95° Celsius heißes Wasserbad gestellt. Die dadurch erfolgende Denaturierung der Proteine führt zum Aufbrechen ihrer Tertiärstruktur. Durch die Zugabe von SDS (im Probenpuffer), das stark an Proteine bindet, wird erreicht, dass diese eine gleich negative Ladung erhalten. Bei der darauf folgenden Elektrophorese können die Proteine nun unabhängig von ihrer Ausgangsladung je nach Molekulargewicht aufgetrennt werden, da größere Moleküle langsamer zur Anode wandern als kleinere.

Das zur Auftrennung verwendete Gel setzte sich im oberen 1/3 aus einem Sammelgel und in den unteren 2/3 aus einem Trenngel zusammen. Für die Auftrennung von NO-Synthasen, die ein Molekulargewicht zwischen 130 und 160 kD besitzen, eignen sich am besten 7,5% ige Gele.

Zur Herstellung der Gele wurden zwei zuvor mit Ethanol gereinigte Glasplatten mit Abdichtungen versehen und mit Klammern zusammengehalten. Es erfolgte das Einfüllen von 4,6 ml der 7,5 % igen unteren Trenngellösung, bestehend aus 7,5 % Acrylamid, 10% SDS (Natriumdodecylsulfat) und 1,5 M Tris pH 8,8 (unterer Puffer). Zur Aushärtung des Gels wurden kurz vor dem Guss 75 μ l einer 10 % Ammoniumpersulfatlösung (APS) als Reaktionsstarter sowie 10 μ l TEMED als Beschleuniger zugesetzt. Um eine gerade Oberfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten und um die Verdampfung, die durch die

Hitzeentwicklung beim Polymerisierungsprozess entsteht zu vermeiden, wurde sofort 1,5 ml Propanol über das aushärtende Trenngel pipetiert.

Nach Aushärten des Trenngels und Auswaschen des Propanols mit Aqua dest. wurde das 4 % Sammelgel, bestehend aus 4 % Acrylamid, 10 % SDS und 0,5 M Tris pH 6,8 (oberer Puffer) sowie 10 µl TEMED und 75 µl APS pipettiert. Direkt im Anschluß daran wurde ein Plastikkamm eingeführt, so daß 10 gleich große Taschen für die Proteinlösungen und die Markersubstanz entstanden. Nach dem Aushärten wurden Kämmen und Gummidichtungen entfernt, jeweils zwei Gele in die Elektrophoreseeinheit geklemmt (Model Minigel Twin, Fa. Biometra) und mit Laufpuffer, modifiziert nach Lämmli (siehe verwendete Lösungen im Kapitel Materialien) überschichtet.

Reagens	Sammelgel	Trenngel	
		7,5 %	10 %
	4%	7,5 %	10 %
Acrylamid	1,34 ml	3,3 ml	4,3 ml
Aqua dest.	6,0 ml	6,4 ml	5,4 ml
Upper Buffer	2,5 ml	*	*
Lower Buffer	*	3,3 ml	3,3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
SDS 10%	100 µl	130 µl	130 µl
APS 10%	75 µl	75 µl	75 µl

Tab.11 Gelzusammensetzung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zu 80 µl Probe wurden 20 µl eines reduzierenden 5x Probenpuffers nach Lämmli gegeben und zur Denaturierung für 10 Minuten auf 95° Celsius im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 1 Minute bei 7000/min zentrifugiert um Präzipitate und Kondenswasser abzusetzen.

Die erste Geltasche wurde mit 10µl eines Markers (Rainbow Molecular Weight Marker, Fa .Amersham) befüllt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus individuell gereinigten und gefärbten Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte durch die sich die Größe des gesuchten Proteins durch farbliche Zuordnung ermitteln läßt. Der Marker detektiert so die Größen 14,3 K; 20,1 K;30 K; 45 K; 66 K; 97 K und 220 K.

In die weiteren Taschen wurden jeweils je nach Versuch zwischen 100 -150 µg der Probe für NO-Synthasen und 15 µg des Probengemisches für die GADPH-Kontrollen

pipetiert. Es erfolgte die Elektrophorese bei 100 V für 10 Minuten durch den Bereich des Sammelgels und danach im Bereich des Trenngels bei 130 V bis zur vollständigen Auftrennung.

Für unterschiedliche Proteine wurden verschiedene Gele und Laufzeiten gewählt:

- a) Für nNOS, eNOS und iNOS mit einem Molekulargewicht von über 120 kD wurden 7,5% Gele bei einer Laufzeit von 1,5 Stunden verwendet
- b) Für GAPDH mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kD, wurde ein 10 % Gel verwendet und die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V für 50 Minuten durchgeführt.

2.2.16 Western Blot

Nach der denaturierenden SDS-PAGE sind die Proteine aufgetrennt und werden durch Elektro-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Darauf können einzelne Proteine durch die Bindung mit spezifischen Antikörpern in einer Immunreaktion sichtbar gemacht werden.

Das Gel wurde aus der Elektrophoreseeinheit entnommen, die Glasplatten entfernt, und kurz in Blotpuffer gelegt. Die Nitrozellulosemembranen und Whatmanpapiere wurden ebenfalls kurz in Blotpuffer eingelegt.

Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde ein „Blotting Sandwich“ nach dem in Abb.10 dargestellten Schema in der Blotting Einheit zurechtgelegt.

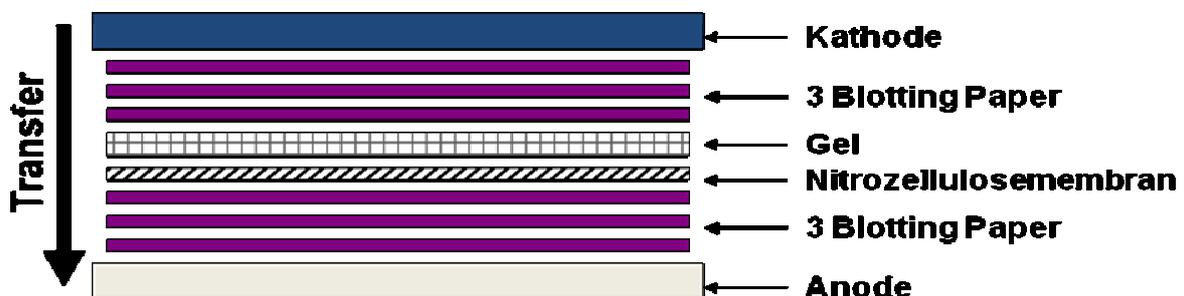


Abb.9 Anordnung der Materialien in der Blotting-Einheit

Beim Auflegen des Gels auf die Nitrozellulosemembran wurde besonders darauf geachtet Luftblasenbildung zu vermeiden, da diese den Proteintransfer stören können. Durch Abrollen wurden Luftblasen entfernt. Der Transfer von NO-Synthasen erfolgte bei 120 mA für 1h und 45 Minuten, die Übertragung des Proteins GAPDH erfolgt bei 100 mA für 1h. Die SDS-beladenen negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und binden dabei fest an der Nitrozellulosemembran wo sie dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können.

2.2.17 Immunologischer Proteinnachweis

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgt der immunologische Nachweis durch spezielle Antikörper. Der erste Antikörper kann dabei spezifisch an das gesuchte Protein binden. An den ersten Antikörper bindet dann wiederum der zweite, an eine Peroxidase gekoppelte Antikörper.

Hierzu wurden die Membranen zur Absättigung zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in eine Blockierlösung (5% Magermilchpulver in TBST) gegeben und geschwenkt, um die unspezifische Bindung von Proteinen zu blockieren und dadurch Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Diese erfolgte bei den NO-Synthasen bei 4° Celsius über Nacht in einer Lösung aus Blockierlösung und jeweiligem Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tab.4 im Kapitel Material). Für die GAPDH-Kontrollen wurde eine Inkubation mit monoklonalen Maus-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50000 in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der 1. Inkubation erfolgte dann innerhalb von 30 Minuten ein 3 maliges Waschen mit TBST-Lösung. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung siehe Tab.4.) wurde anschließend für 1h bei RT durchgeführt. Daran schloß sich ein weiterer 3 mal 15 Minuten dauernder Waschvorgang mit TBST-Waschlösung an.

Zur Entwicklung der Membranen wurden diese in eine 40:1 Mischung aus Entwickler/Verstärker gegeben (8ml Lösung A, 200µl Lösung B ; ECL Plus-Kit, Fa. Amersham, Braunschweig) und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die ablaufende Reaktion zwischen der an den zweiten Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase und dem im ECL-Entwicklungs-Kit enthaltenden Lumigen PS-3 Acridan führt zur einer Chemiluminescence Reaktion deren Lichtemission einer bestimmten Wellenlänge auf einem Röntgenfilm abgebildet werden kann.

Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Membranen aus der Entwicklungslösung genommen und nach kurzem Abtropfen mit einer transparenten Plastikfolie bedeckt. Luftblasen wurden durch Ausstreichen entfernt. Auf die Membranen wurde dann ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm, Fa. Amersham, Braunschweig) gelegt und diese mit Klebestreifen in einer Röntgenkassette fixiert. Um gute Verhältnisse von Auflösung und Sensitivität zu erreichen, wurden die Filme dann mit unterschiedlichen Zeiten (15 sec, 30 sec, 1 min, 3min und 5 min) belichtet. Die Filme wurden daraufhin mit üblichen phototechnischen Methoden entwickelt (Entwickler und Fixierer: Fa.Kodak, Paris, Frankreich).

Die Quantifizierung der Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit einer entsprechenden Auswertungs-Software.

2.2.18 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit angegebenen Daten sind Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden durch eine einfaktorielle Anova Varianzanalyse ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht

Leitthema dieser Dissertationsschrift ist die Untersuchung der NO-Synthase-Isoformen in pulmonalen Gefäßendothelzellen im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie. Die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wurde durch Anwendung des selektiv wirksamen, oral verfügbaren iNOS-Inhibitors L-NIL untersucht.

Zunächst erfolgte im Western Blot Verfahren eine Charakterisierung der Proteinkonzentration der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in MCT behandeltem Lungengewebe. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse erfolgte die selektive Inhibierung von iNOS durch L-NIL. Die Wirksamkeit von L-NIL auf hämodynamische Pathologika im MCT-Model wurde mit Hämodynamik Experimenten evaluiert. Im Versuchsverlauf erfolgte die Untersuchung der Auswirkung einer iNOS-Inhibition auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch erneute Proteinkonzentrationsbestimmungen mit der Western Blot Methode. Abschließend erfolgte mikroskopisch die histo-morphologische Darstellung von Gefäßen an Lungenpräparaten.

3.2 Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung von iNOS in MCT-behandeltem Lungengewebe

In dieser Dissertationsschrift sollte zunächst untersucht werden, welche Rolle die induzierbare NO-Synthase (iNOS) im Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie spielt. Grundlage weiterer Versuche war daher zunächst die Charakterisierung und Quantifizierung der iNOS Expression in MCT-behandeltem Lungengewebe mittels Western Blot Verfahren.

Abb.10a

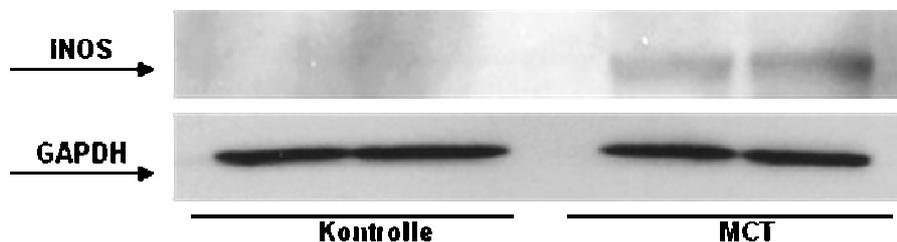


Abb.10b

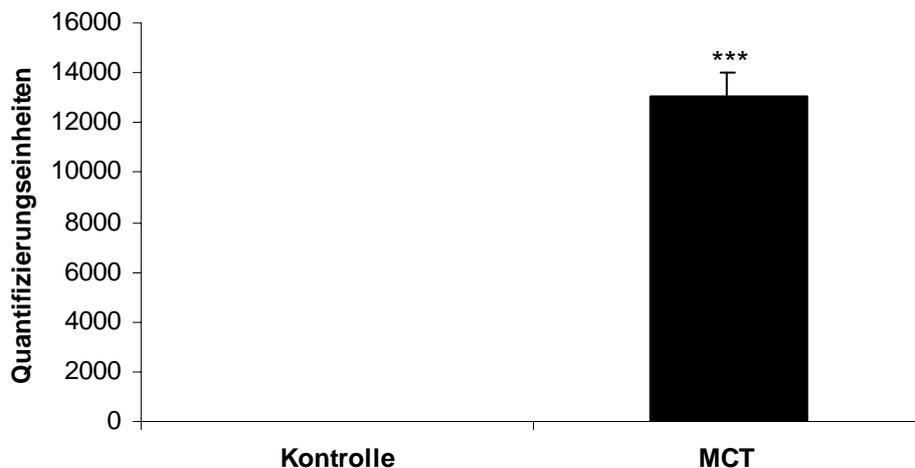


Abb. 11a Repräsentativer Western Blot für iNOS aus Lungenhomogenaten aus der Kontrollgruppe und der MCT-Gruppe nach 4 Wochen Versuchsdauer. Jeweils 40 µl der Proben (Lungenhomogenat) wurden mit Hilfe eines 7,5 % SDS Gels elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit anti iNOS Antikörpern und peroxidasekonjugiertem IgG Kaninchen Antikörper als zweitem Antikörper erfolgte die Entwicklung mit dem ECL System, Expositionsdauer 6 Minuten. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus 6 einzelnen Experimenten.

Abb.11b Grafische Darstellung der Western Blot-Quantifizierung nach densitometrischer Auswertung. Dargestellt sind Mittelwerte (± SEM) in Quantifizierungseinheiten. Repräsentative Darstellung für n = 6 Blots in jeder Gruppe. ***P<0,001 vs Kontrolle

Zur Untersuchung kamen Lungengewebeproben von Ratten, die eine einmalige Injektion mit MCT erhalten hatten und deren Proben nach 28 Tagen entnommen wurden. Abbildung 11a zeigt einen repräsentativen Blot aus 6 Einzelexperimenten in MCT-Proben zeigten sich deutliche Banden bei einer erwarteten Molekülgröße von 130 kDa. Wie in der grafischen Darstellung (Abb. 11b) erkennbar, zeigte sich eine signifikante iNOS Anreicherung in MCT-Proben, während in Kontroll-Proben kein iNOS-Signal detektiert werden konnte.

3.3 Ergebnisse der Futter, Wasser und Gewichtsbilanzierung während des Versuchs.

3.3.1 Trinkwasser und Medikamenten- Bilanzierung

Zur Überwachung der kontinuierlichen Aufnahme von L-NIL, welches den Tieren in gelöster Form in einer Konzentration von 60 µg / ml täglich frisch im Trinkwasser angeboten wurde, erfolgten tägliche Messungen der Trinkwassermenge. Hieraus

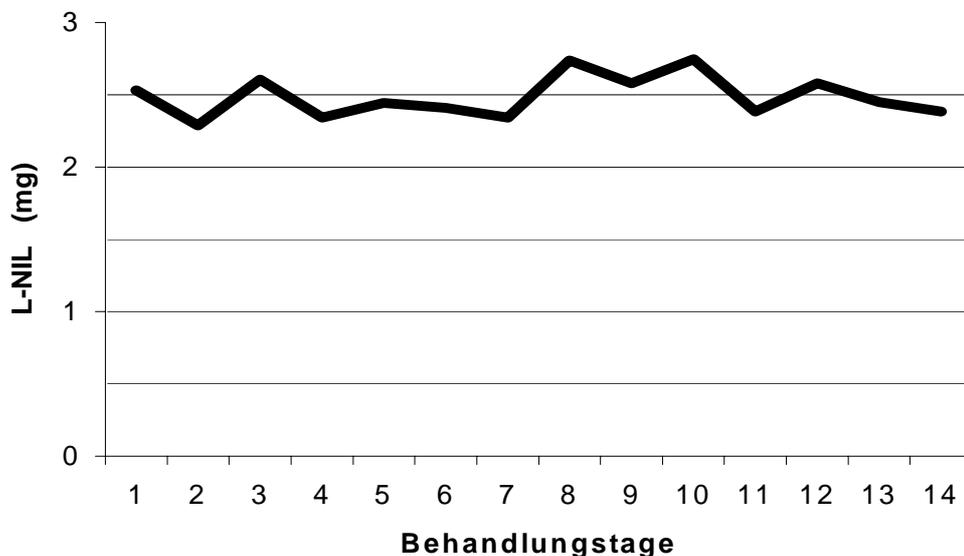


Abb. 11 Durchschnittliche Aufnahme von L-N6-(1-iminoethyl)-lysin (L-NIL) aus dem angebotenen Trinkwasser (Konzentration 60 µg / ml) während 14 Behandlungstagen. (Dargestellt sind Mittelwerte, n = 10)

konnte die aufgenommene Wirkstoffmenge für jedes einzelne Tier berechnet werden. Es zeigte sich, dass die behandelten Tiere täglich eine Trinkwassermenge zwischen

maximal 50 ml und minimal 36 ml tranken und auf diese Weise über 14 Tage im Mittel täglich eine L-NIL Menge von 2,49 mg ($\pm 0,11$) aufnahmen (siehe Abb.12).

3.3.2 Futterbilanzierung und Gewichtsentwicklung

Der Futterverbrauch der Tiere wurde täglich gemessen (siehe Abb. 13). Es zeigte sich, analog zur Gewichtsentwicklung (Abb.14), dass bis zur zweiten Versuchswoche keine bedeutenden Unterschiede im Fressverhalten zu beobachten waren. Ab der zweiten Versuchswoche zeigten sich die Tiere der unbehandelten MCT-Gruppe in deutlich reduziertem Allgemeinzustand und bis Versuchsende mit signifikanter kontinuierlicher Abnahme der Futteraufnahme.

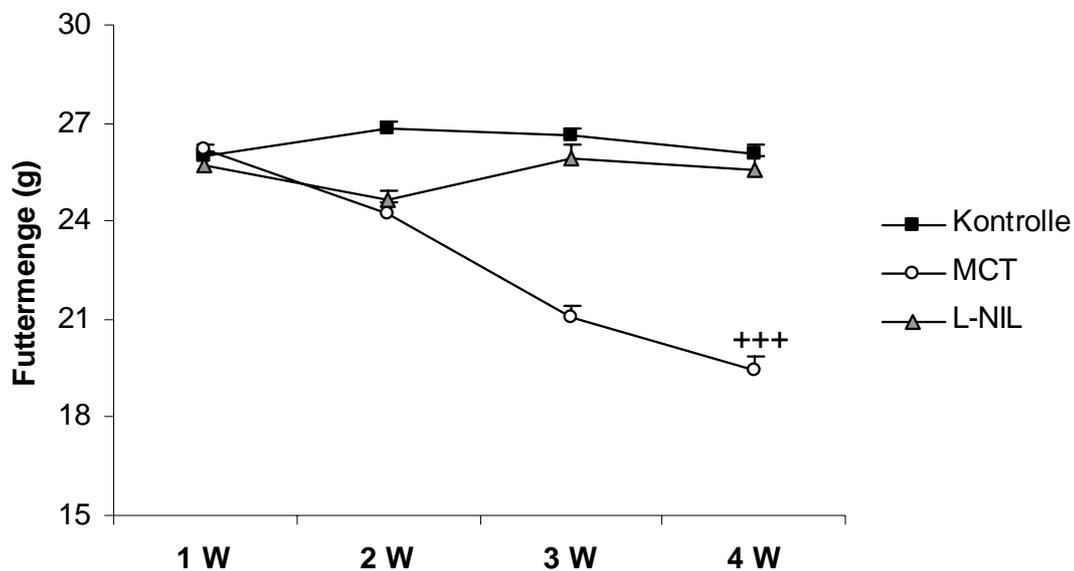


Abb. 12 Durchschnittliche Futteraufnahme der Versuchstiere der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle), der Monocrotalin-Gruppe (MCT) und der mit L-N6-(1-iminoethyl)-lysin behandelten Gruppe (L-NIL) ab Versuchsbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte aus täglichen Messungen über einen Zeitraum von 28 Tagen (\pm SEM); +++P<0,001 vs Kontroll-Gruppe.

Während der Versuche zeigte sich bei den Tieren die eine MCT-Injektion erhalten hatten eine Verschlechterung der äußeren Erscheinung, vor allem ab dem 9.Tag nach Injektion. Tiere die keine L-NIL- Behandlung erhalten hatten zeigten einen zunehmend schlechteren Allgemeinzustand, was sich auch in der Gewichtsentwicklung widerspiegelte (Abb.14). Tiere die nur eine MCT-Injektion

ohne Behandlung erhielten, nahmen bis zum 7.Tag nur sehr wenig Gewicht zu und verloren ab dem 14. Tag schnell an Gewicht. Am 27. Versuchstag verstarben zwei Tiere aus der MCT-Gruppe frühzeitig. Unter L-NIL Behandlung schienen sich die Tiere hingegen rasch von den anfänglichen Schwächesymptomen zu erholen. In der therapierten Gruppe verstarb kein Tier und die Gewichtszunahme war stetig und signifikant besser als in der unbehandelten MCT-Gruppe ($P < 0,001$ vs MCT).

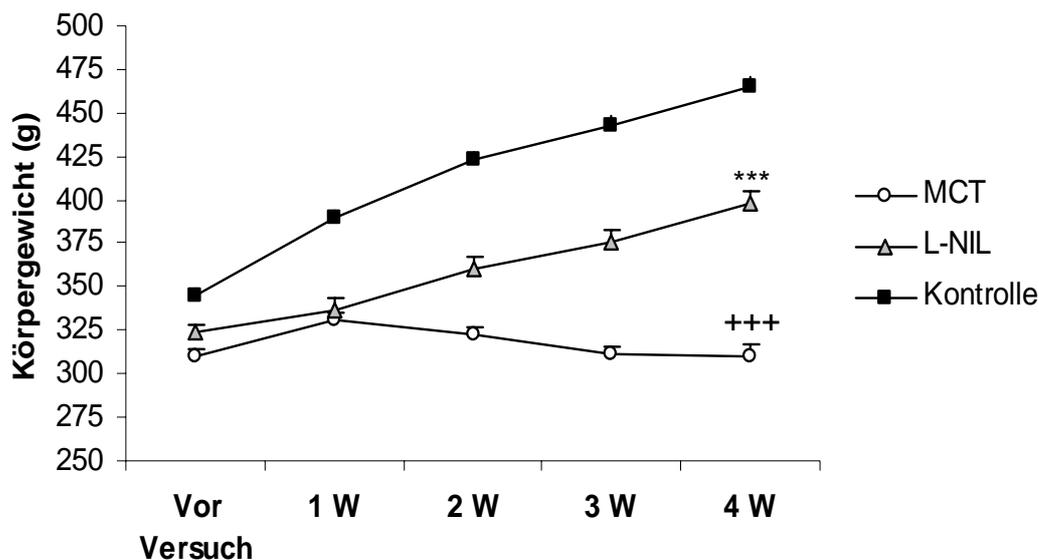


Abb. 13 Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung während der Versuche von Tieren der unbehandelten MCT-Gruppe (MCT), der behandelten L-NIL-Gruppe (L-NIL) und der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *** $P < 0,001$ vs. MCT-Gruppe; +++ $P < 0,001$ vs Kontrolle.

3.4 Hämodynamikmessungen

3.4.1 Wirkung von MCT und L-NIL-Behandlung auf den systolischen rechtsventrikulären Druck (RVPsys)

Nach 28 Tagen wurden zunächst an den Tieren der gesunden Kontrollgruppe ($n = 10$) und den Tieren die eine einmalige subcutane MCT-Injektion (60 mg/kg KG) erhalten hatten ($n=8$) Hämodynamikmessungen vorgenommen. Hierzu wurde mit flüssigkeitsgefüllten Kathetern, die über die rechte Jugularvene in den rechten Herzventrikel geschoben wurden, der rechtsventrikuläre Druck aufgezeichnet.

Hierbei ließ sich feststellen, dass der systolische rechtsventrikuläre Druck (RVPsys) bei den Tieren die eine MCT-Injektion erhalten hatten signifikant erhöht war. Während Tiere der gesunden Kontrollgruppe im Mittel einen RVPsys von $25,75 \pm 1,92$ mmHg aufwiesen, hatten MCT-behandelte Tiere im Durchschnitt dreifach höhere Werte von $76,72 \pm 5,18$ mmHg ($P < 0,001$ vs Kontrolle).

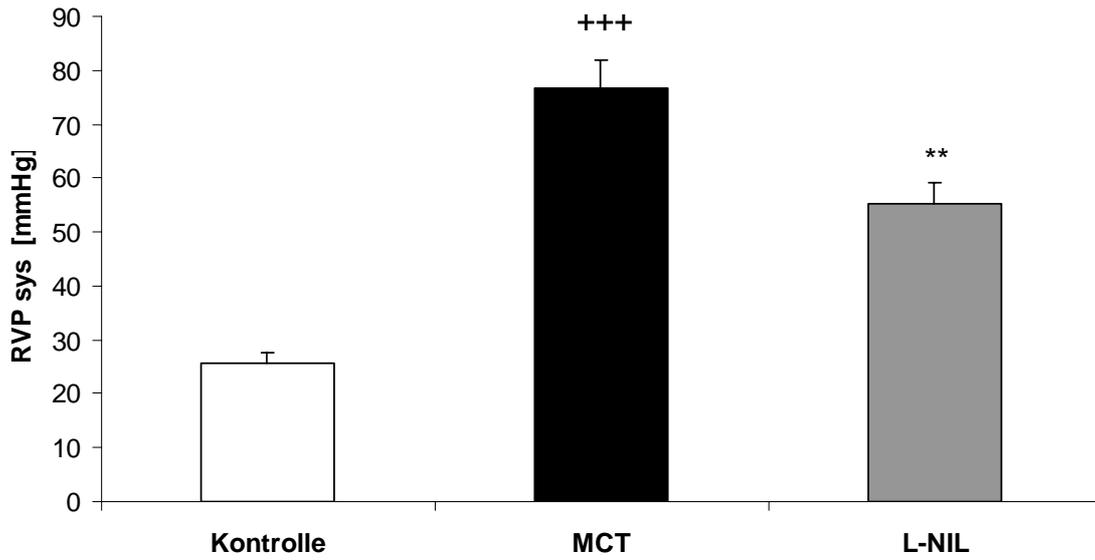


Abb. 14 Graphische Darstellung der an Gesunden (Kontrolle, n=10), MCT-behandelten Tieren (MCT, n=8) und mit L-NIL behandelten Tieren (L-NIL, n=10) mittels Rechtsherzkatheter am 28. Tag gemessenen systolischen Drücke im rechten Ventrikel (RVP sys) Tiere der L-NIL-Gruppe erhielten vom 14. bis zum 28. Tag eine L-NIL Dosis von 2,49 mg / Tag im Trinkwasser. (Mittelwerte \pm SEM; ** $P < 0,01$ vs. MCT; +++ $P < 0,001$ vs Kontrolle)

Bei Tieren der L-NIL behandelten Gruppe zeigten sich in den Versuchen hingegen signifikant niedrigere Drücke. Der rechtsventrikuläre Druck konnte in der L-NIL-Gruppe bei $55,4 \pm 3,7$ mmHg gemessen werden ($p < 0,01$ vs. MCT).

Somit konnte durch die 14 tägige Therapie mit L-NIL ein rasches Fortschreiten der pulmonalen Hypertonie verhindert werden. Die Erniedrigung des rechtsventrikulären Drucks korrelierte außerdem mit der verminderten Rechtsherzhypertrophie in der L-NIL Gruppe.

3.4.2 Systemischer arterieller Blutdruck (SAP) in den Versuchsgruppen

Die systemisch arteriellen Blutdrücke wurden mit Hilfe eines in die A .Carotis eingeführten Katheters über einen Druckaufnehmer aufgezeichnet und anschließend statistisch ausgewertet.

Es konnte bei den Tieren die eine MCT-Injektion erhalten hatten, eine signifikante Erniedrigung des SAP festgestellt werden. Die Differenz zur gesunden Kontrollgruppe betrug im Mittel 38,2 mmHg. Gesunde Tiere wiesen einen SAP von $121,4 \pm 7,3$ mmHg auf, wohingegen bei MCT-behandelten Tiere am 28.Tag nach Injektion nur Werte um $83,2 \pm 3,5$ mmHg gemessen werden konnten ($P < 0,001$ vs Kontrolle). Nach L-NIL-Therapie zeigten sich keine signifikanten Änderungen des SVP bei den behandelten Tieren ($81,1 \pm 4,3$ mmHg) im Vergleich zur MCT-Gruppe.

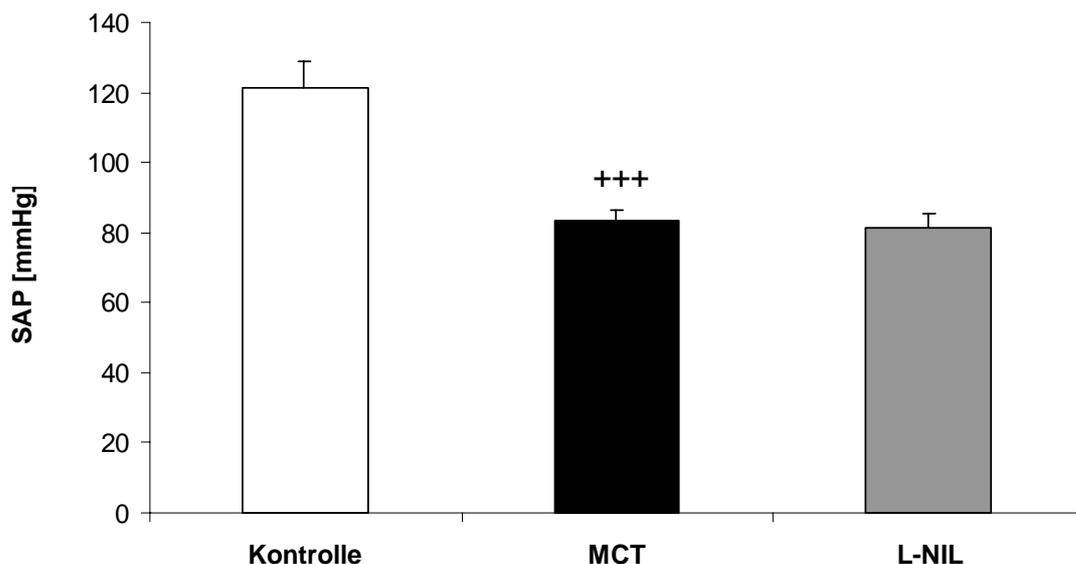


Abb. 15 Darstellung der arteriell gemessenen systemischen Drücke von Tieren der gesunden Kontrollgruppe (n=10), Tieren der MCT-behandelten Gruppe (n=8) und der L-NIL-Gruppe (n=10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; +++P<0,001 vs Kontrolle.

3.4.3 Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie

Durch die Bestimmung der Herzratio, dem Quotienten aus dem Trockengewicht des rechten und des linken Ventrikels+Septum (RV\LV+S) konnte ein Parameter für das Ausmaß der rechtsventrikulären Hypertrophie berechnet werden. Es zeigte sich, dass bei den gesunden Tieren Werte um $0,28 \pm 0,01$ vorlagen. Die Monocrotalin-behandelten Tiere entwickelten aufgrund der ansteigenden pulmonalen Drücke im Verlauf des Versuchs eine schwere Rechtsherzhypertrophie. Dementsprechend zeigte sich in der MCT-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Herzratio, die im Vergleich zur Kontrollgruppe um mehr als das doppelte größer war ($0,61 \pm 0,03$).

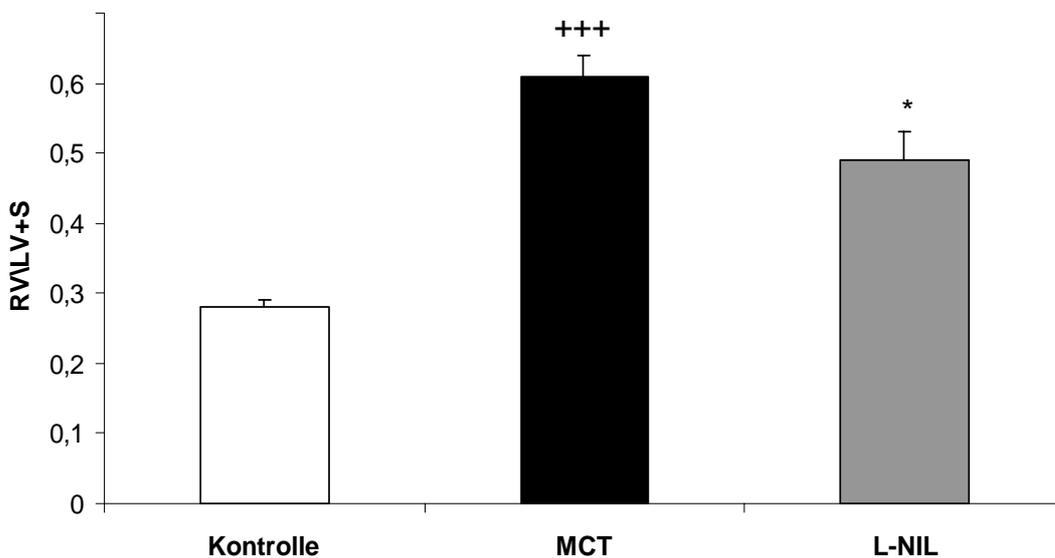


Abb. 16 Grafische Darstellung der Herzratio

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der aus dem Quotienten des Gewichtes von rechtem Ventrikel (RV) und linkem Ventrikel mit Septum (LV+S) errechneten Ratio (RV\LV+S). (Kontrollgruppe n=10; MCT-Gruppe n=8, L-NIL-Gruppe n=10); * $p < 0,05$ vs. MCT; +++ $P < 0,001$ vs Kontrolle.

Durch eine 14-tägige Therapie mit L-NIL konnte das Fortschreiten einer MCT-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie zumindest verzögert werden. Nach L-NIL Behandlung zeigte sich der rechte Ventrikel makroskopisch zarter. Die Bestimmung der Herzratio mit $0,49 \pm 0,04$ zeigt eine signifikante Reduktion der rechtsventrikulären Muskularisierung gegenüber der MCT-Gruppe ($p < 0,05$ L-NIL vs.

MCT). Diese Ergebnisse korrelieren mit den ebenfalls signifikant erniedrigten pulmonalen Drücken der Therapie-Gruppe.

3.4.4 Herzzeitvolumen (HZV) bezogen auf das Körpergewicht

Nach Berechnung des Herzzeitvolumens (HZV) nach dem Fick'schen Prinzip erfolgte die Berechnung des Cardiac Index (CI) nach der bereits beschriebenen Formel (s. Material und Methoden).

Die gesunde Kontrollgruppe zeigte hierbei Werte um $28,6 \pm 1,9$ ml / min 100 g KG. Im Vergleich dazu zeigten Tiere der MCT-Gruppe signifikant niedrigere Werte. Am 28. Tag nach MCT betrug der CI bei diesen $14,9 \pm 1,6$ ml / min 100 g KG.

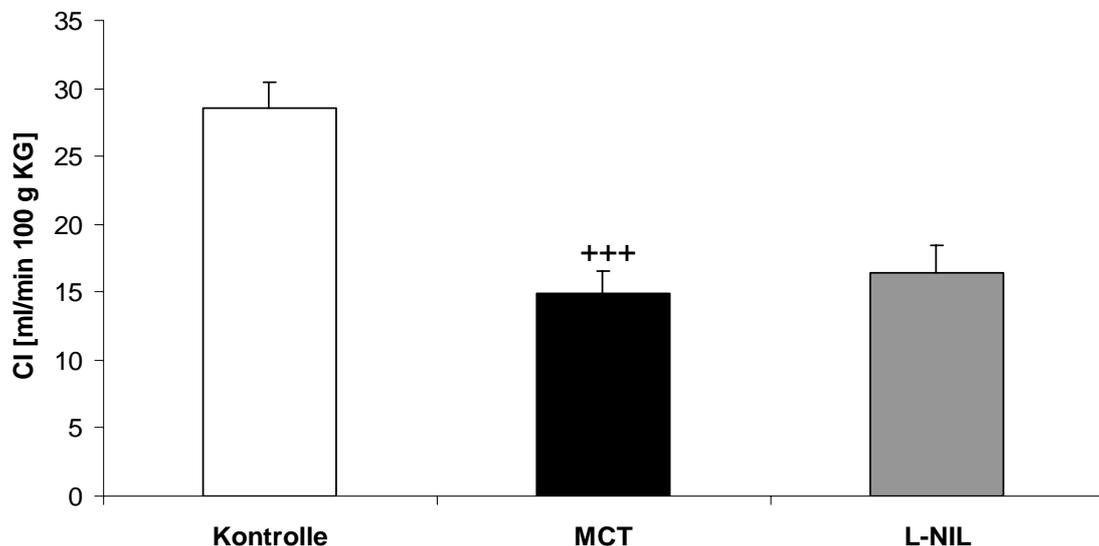


Abb. 17 Darstellung des Cardiac Index (CI) der einzelnen Gruppen. Der Cardiac Index entspricht dem Herzzeitvolumen (HZV) in ml / min in Bezug auf 100 g Körpergewicht (KG). Die Berechnung des Herzzeitvolumens erfolgte nach dem Fick'schen Prinzip. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (+++ $P < 0,001$ vs Kontrolle).

Die zwei-wöchige Therapie mit L-NIL führte bei den Tieren der behandelten Gruppe zu einer Erhöhung des CI auf $16,4 \pm 2,0$ ml / min 100 g KG. Abb.19 zeigt die einzelnen Parameter im Überblick. Das HZV konnte durch L-NIL im Vergleich zur MCT-Gruppe im Mittel um $12,3$ ml / min gesteigert werden.

Gruppe	KG (g)	CI	HZV	RV/LV+S
Kontrolle	458,4 ± 6,1	29,8 ± 2,1	136,1 ± 9,4	0,28 ± 0,01
MCT	328,7 ± 12,9	14,9 ± 1,6	51,1 ± 4,4	0,61 ± 0,03
L-NIL	395,4 ± 8,3	16,3 ± 2,0	63,9 ± 8,3	0,49 ± 0,04

Abb. 18 Physiologische Profile der Versuchsgruppen

Angegebene Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung, KG: Körpergewicht, CI: cardiac index; HZV: Herzzeitvolumen,

3.4.5 PVRI

Bei der unbehandelten Kontrollgruppe konnten Werte um $0,91 \pm 0,05$ erhoben werden. MCT-behandelte Tiere zeigten im Vergleich dazu Werte, die um mehr als das fünf-fache höher waren ($5,55 \pm 0,67$).

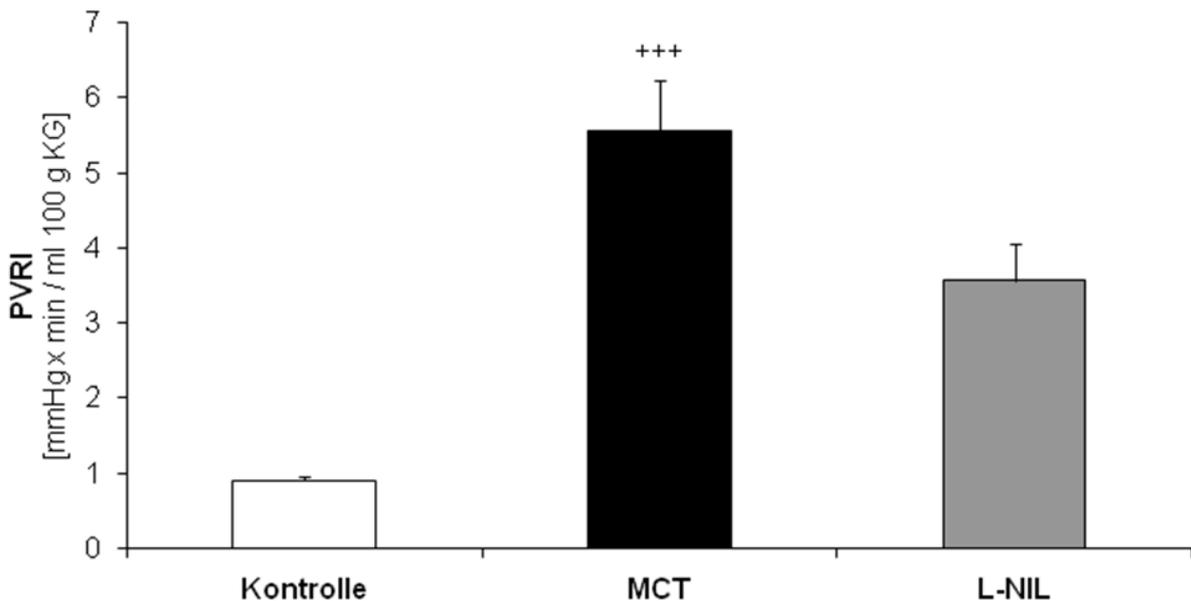


Abb.19 Darstellung der mittleren Werte (±SEM) des Pulmonalvenösen Widerstands (PVRI). +++P<0,001 vs Kontrollgruppe

Eine 14-tägige L-NIL-Behandlung führte zu einer Verringerung des PVRI im Vergleich zur unbehandelten MCT-Gruppe. (P = 0,14 vs MCT). Werte der L-NIL Gruppe lagen im Mittel bei $3,57 \pm 0,49$.

3.4.6 SVRI

Gesunde Tiere zeigten einen SVRI von $4,3 \pm 0,3$. Bei MCT-behandelten Tiere lag der SVRI im Mittel signifikant höher bei $6,2 \pm 0,8$. Tiere der L-NIL-Gruppe zeigten nur unwesentlich unterschiedliche Werte im Vergleich zur MCT-Gruppe: Der SVRI betrug hier im Mittel: $5,8 \pm 0,6$.

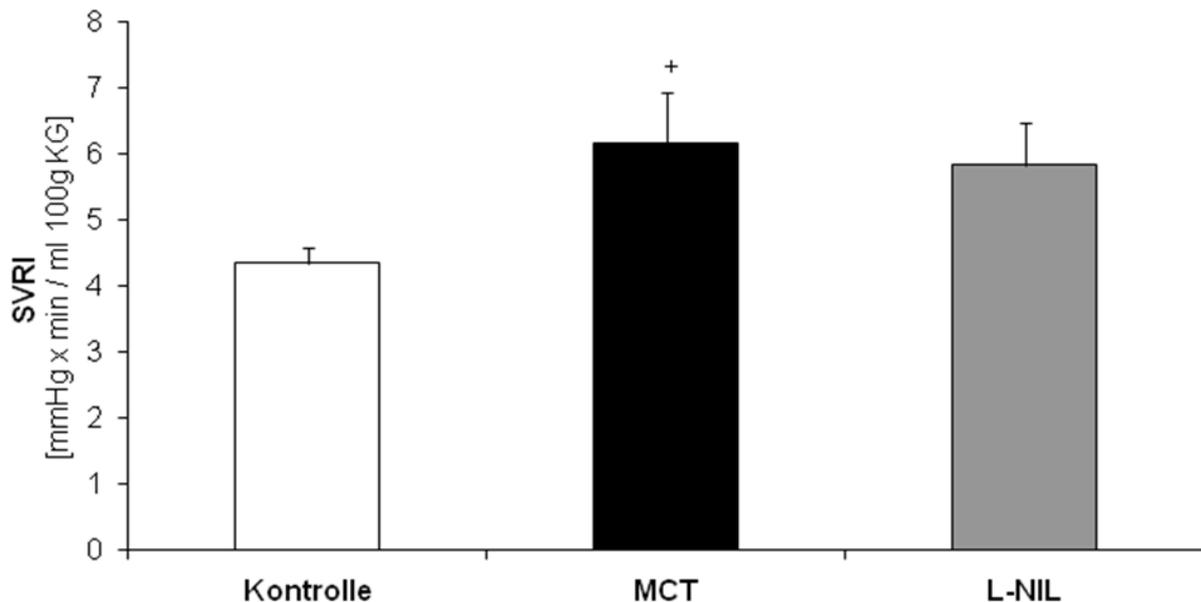


Abb. 19 Darstellung des SVRI (in mmHg min \ ml 100 g KG) (Mittelwerte \pm SEM)
+P<0,05 vs Kontroll-Gruppe

3.4.7 Venöse und arterielle O₂-Sättigung

Aus Blutproben, die während der Hämodynamik-Versuche entnommen wurden, erfolgten Blutgasanalysen zur Bestimmung der venösen und arteriellen Sauerstoffsättigung. Sowohl die venösen als auch arteriellen Sauerstoffkonzentrationen der MCT-Gruppe zeigten sich deutlich niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Gesunde Tiere hatten im Mittel eine arteriellen Sauerstoffpartialdruck von $205,0 \pm 12,0$ mmHg und eine venöse Sauerstoffsättigung von $70,0 \pm 0,2$ %. In der MCT Gruppe zeigten sich für beide Parameter deutlich niedrigere Werte: Der arterielle Sauerstoffpartialdruck betrug im Mittel bei nicht-therapierten Tieren $143,3 \pm 15,4$ mmHg und die venöse O₂-Sättigung $35,5 \pm 1,4$ %. Durch 14 tägige Therapie mit L-NIL konnte in dieser Versuchsgruppe mess-technisch

eine zumindest diskrete Verbesserung beider Werte erreicht werden. In der L-NIL-Gruppe konnte ein mittlerer arterieller Sauerstoffpartialdruck von $190,0 \pm 28,9$ mmHg, sowie eine venöse O_2 -Sättigung von $40,2 \pm 5,3$ % gemessen werden (siehe Abb. 22 und 23).

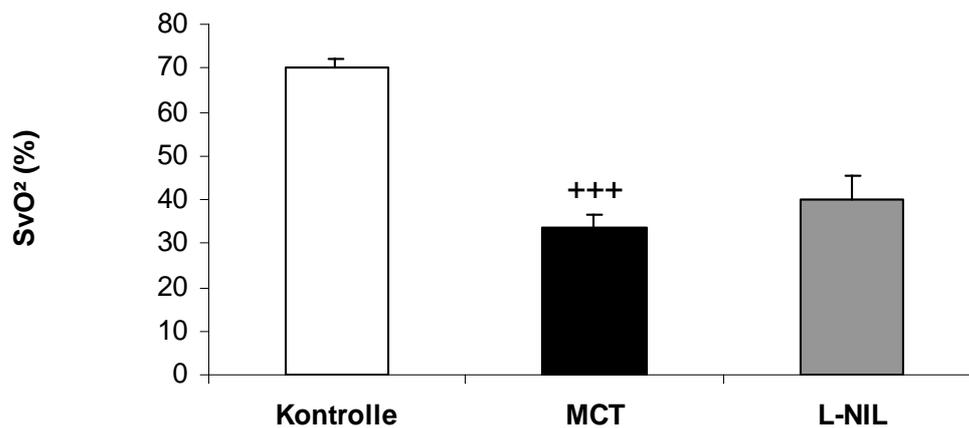


Abb. 21 Venöse Sauerstoffsättigung im Blut (SvO₂). +++P<0,001 vs Kontrolle

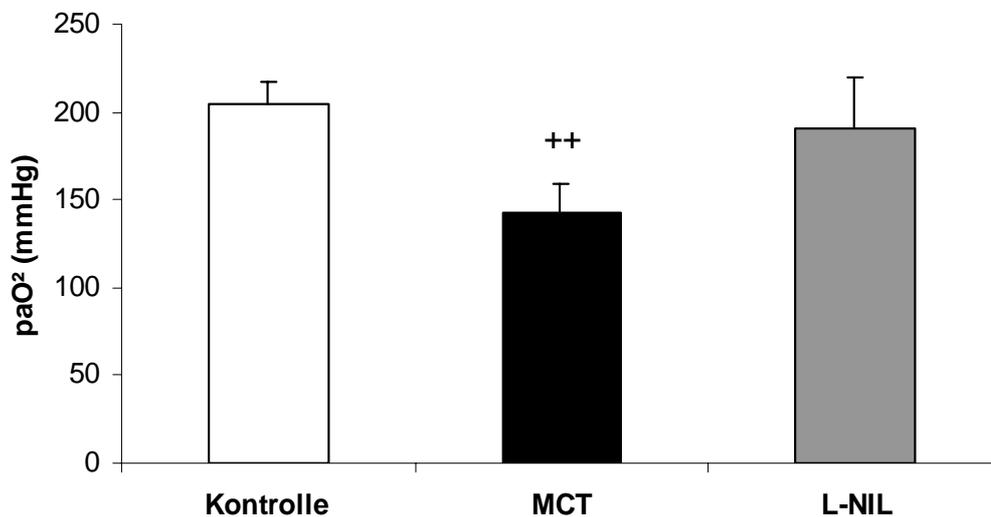


Abb. 22 Arterielle Sauerstoffpartialdrücke (PaO₂); ++P<0,01 vs Kontrolle.

3.5. Histologie

Nach der Fixation der Rattenlungengewebe und dem Einbetten in Paraffin wurden Schnitte angefertigt und nach gängigem Schema mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Bei Lungengewebe, das 28 Tage nach MCT-Behandlung entnommen wurde, dominierten die für MCT charakteristischen chronische Umbauprozesse wie Hypertrophien der Tunica Media und Endothelläsionen sowie subendotheliale Verdickungen und Fragmentierungen von elastischen Fasern in pulmonalen Arterien. Kontroll-Lungen zeigten gesunde Gefäßverhältnisse mit zartem Endothel und wiesen eine normal proportionierte Media und Adventitia auf.

Lungen der L-NIL-Gruppe zeigten eine geringere Media-Hypertrophie. Deutlich erkennbar waren jedoch auch hier Entzündungsvorgänge am Endothel. Diese waren dem typischen histologischen Bild einer 14 Tage nach MCT-Behandlung untersuchten Rattenlunge sehr ähnlich.

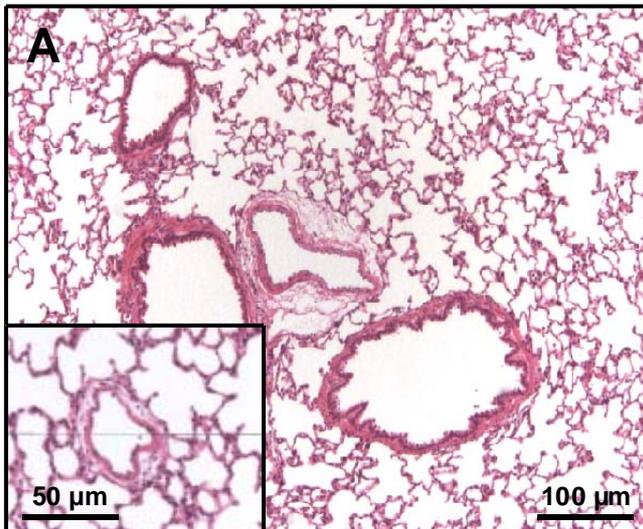


Abb. 23A: Kontroll-Lunge, HE-Färbung.

Dargestellt sind repräsentative Bilder einer gesunden Rattenlunge aus der Kontrollgruppe
Großes Bild: Bronchioli mit begleitender peribronchialer Arterie

Kleines Bild: Kleine intrapulmonale Arterie

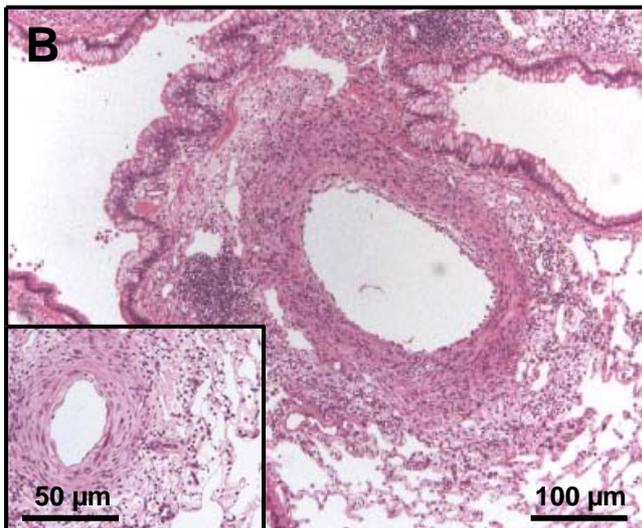


Abb. 23B: MCT-Gruppe, HE-Färbung

28 Tage nach MCT-Injektion

Großes Bild: Bronchiolus mit peribronchialer Arterie. Deutliche Verdickung der Media.

Kleines Bild: Verdickte Media in peripheren intrapulmonalen Arterien

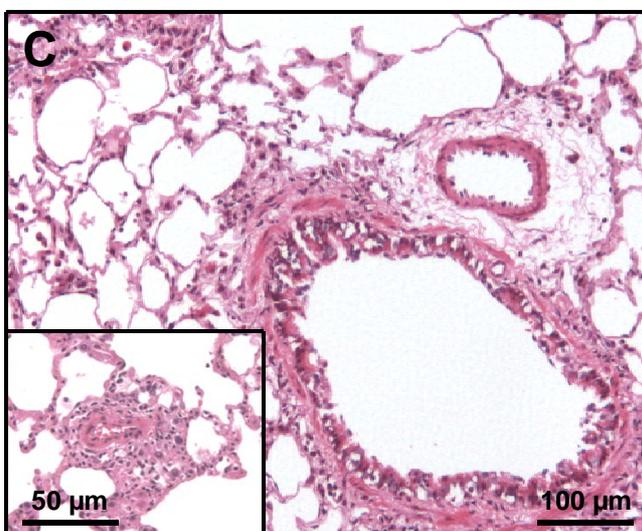


Abb. 23C: L-NIL-Gruppe, HE-Färbung

Z. n. 14-tägiger Behandlung mit L-NIL

Großes Bild: Bronchiolus mit peribronchialer Arterie, diese zeigt entzündliche Veränderungen die denen nach 14 Tagen nach MCT-Gabe gleichen.

Kleines Bild: intrapulmonale Arterie

3.6. Western Blot

3.6.1 Einfluss von L-NIL auf die Expression von iNOS

Wie auch schon im Vorversuch nachgewiesen, konnte in den gesunden Kontrollproben kein detektierbares Signal für iNOS nachgewiesen werden. In den Lungenproben der MCT-behandelten Tiere zeigte sich ein deutliches Signal, welches mit iNOS-spezifischen Antikörpern bei einer Molekülgröße von 130 kDa detektiert werden konnte.

Abb. 24a

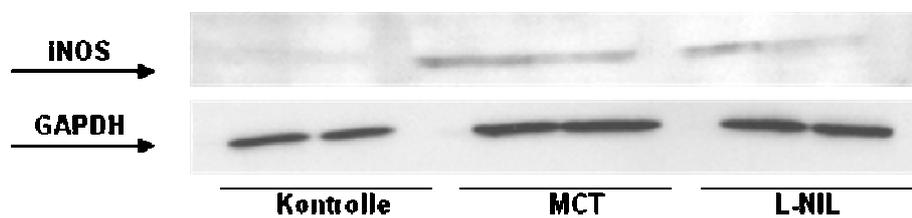


Abb. 24b

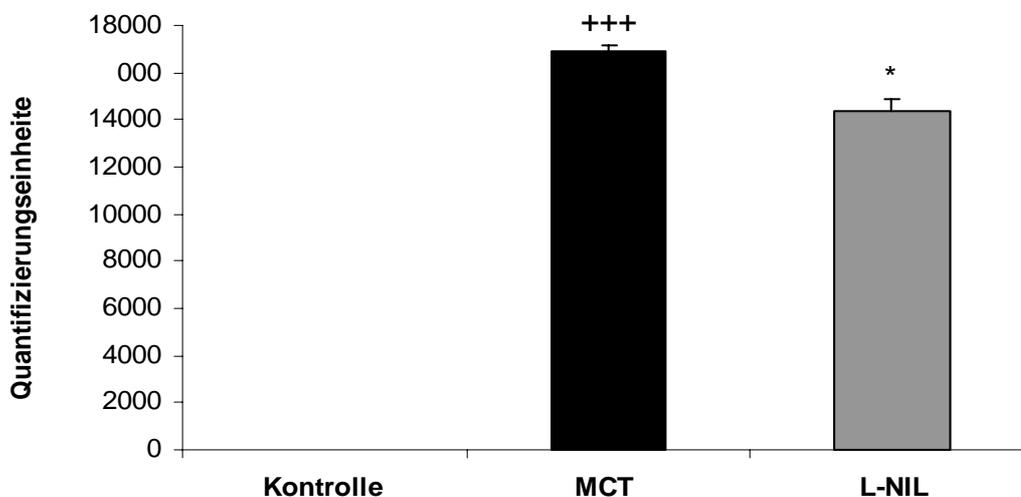


Abb.24a Western Blot mit Homogenaten aus Lungengewebe der Kontroll-Gruppe, der MCT-Gruppe und der therapierten L-NIL-Gruppe. Die Proben wurden mit Anti-iNOS Antikörpern inkubiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus 4 separaten Experimenten. Darunter Banden von Kontrollproben mit GAPDH-Antikörpern.

Abb.24b Grafische Darstellung der Western Blot-Quantifizierung nach densitometrischer Auswertung. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SEM) in Quantifizierungseinheiten +++ P < 0,001 vs Kontrolle; *P < 0,05 vs MCT

In der L-NIL-Gruppe zeigte sich die Expression im Vergleich zur MCT-Gruppe signifikant verringert. Es blieb zwar in allen Experimenten ein iNOS-Signal darstellbar, jedoch konnte in 4 einzelnen Experimenten nach densitometrischer Auswertung gezeigt werden, dass die Intensität des Signals in Proben L-NIL behandelter Tiere signifikant niedriger war als in der MCT-Gruppe (siehe Abb. 26a und 26b, $P < 0,05$ vs MCT).

3.6.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

In den am 28. Versuchstag entnommenen Proben zeigte sich bei den Tieren die eine MCT-Behandlung erhalten hatten eine signifikant niedrigere eNOS-Expression verglichen mit Werten der gesunden Kontrollgruppe.

Abb. 25a

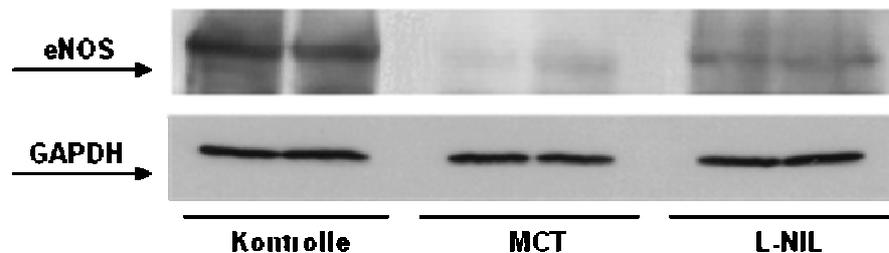


Abb. 25b

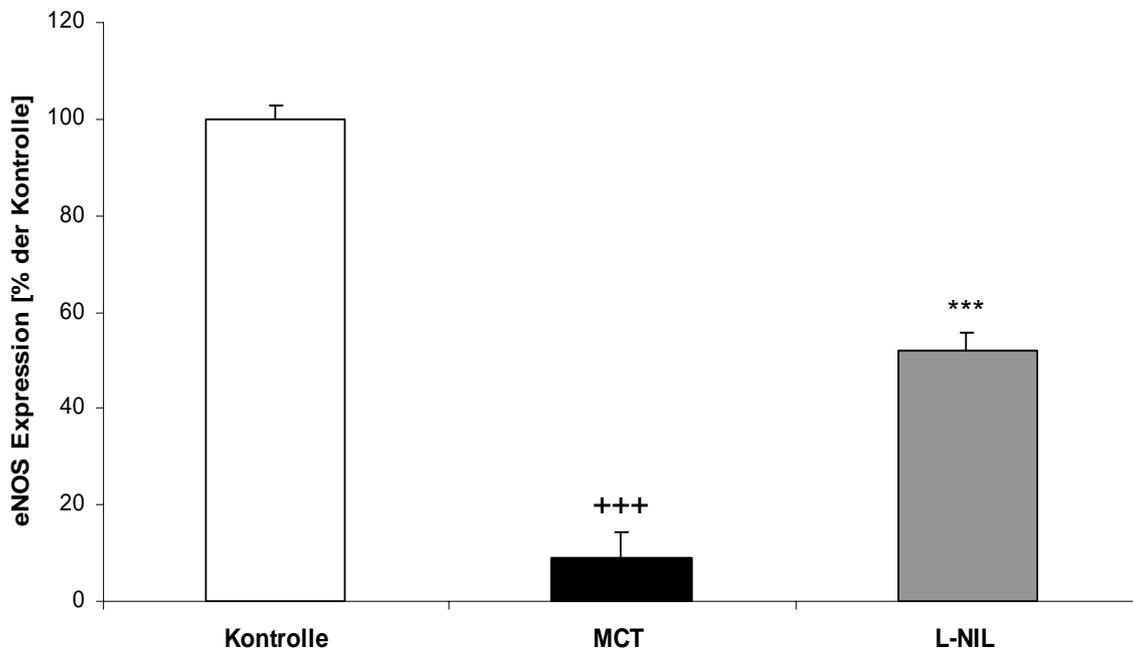


Abb. 25a Western Blot mit eNOS Antikörpern an Proben der Kontroll-Gruppe, der nicht behandelten MCT-Gruppe sowie der 14 Tage mit L-NIL behandelten L-NIL-Gruppe. Je 40 µg Probe wurden auf einem 7,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit anti-eNOS

Antikörpern inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein peroxidase-konjugierter IgG-Antikörper eingesetzt. Die Entwicklung erfolgt mit dem ECL-System. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild aus 4 einzelnen Experimenten nach einer Expositionsdauer von 6 Minuten.

Abb. 25b Grafische Darstellung der Western Blot-Quantifizierung nach densitometrischer Auswertung. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SEM) in % der Kontrollproben. Repräsentative Darstellung für $n = 4$ Blots in jeder Gruppe. +++ $P < 0,001$ vs Kontrolle; *** $P < 0,001$ vs MCT

In den Proben aus der Kontrollgruppe waren im Western Blot intensive Signale bei 130 kDa zu detektieren, wohingegen sich bei allen MCT-behandelten Proben nur schwache Banden detektieren ließen. Wie in Abb.27a und b deutlich zu sehen ist, zeigten die sichtbar gemachten Signale von Proben der MCT-Gruppe nach der densitometrischen Auswertung nur $8,9 \pm 5,6$ % der in den Kontrollproben gefundenen Intensität. ($P < 0,001$ vs Kontrolle).

Die Inkubierung mit Anti-eNOS-Antikörpern führte bei Western Blots aus Proben der 14 Tage mit L-NIL behandelten Tiere zur Detektierung signifikant stärkerer Signale als in der unbehandelten MCT-Gruppe. Bereits mit bloßem Auge sichtbar zeigten sich deutliche Banden bei 130 kDa (siehe Abb.27a). Durch densitometrische Auswertung konnte diese Beobachtung bestätigt werden: In Proben der L-NIL-Gruppe konnte mit $52,2 \pm 3,5$ % eine um 43,2 % höhere Intensität als in der unbehandelten MCT-Gruppe nachgewiesen werden (jeweils gemessen an Kontrolle=100 %).

3.6.3 Neuronale NO-Synthase (nNOS)

Die Western Blot Analyse für die dritte NOS-Isoform, die neuronale NO-Synthase (nNOS) erbrachte gut detektierbare Signale bei einer erwarteten Molekülgröße von 160 kDa (Siehe Abb.28a). In Proben der MCT-Gruppe ließen sich mit $71,5 \pm 3,8$ % signifikant geringere Signalintensitäten für nNOS nachweisen als in der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle= 100 % ; $P < 0,05$ vs Kontrolle).

Abb. 26a

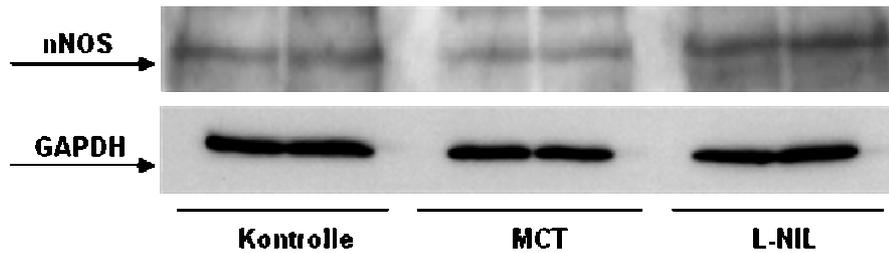


Abb. 26b

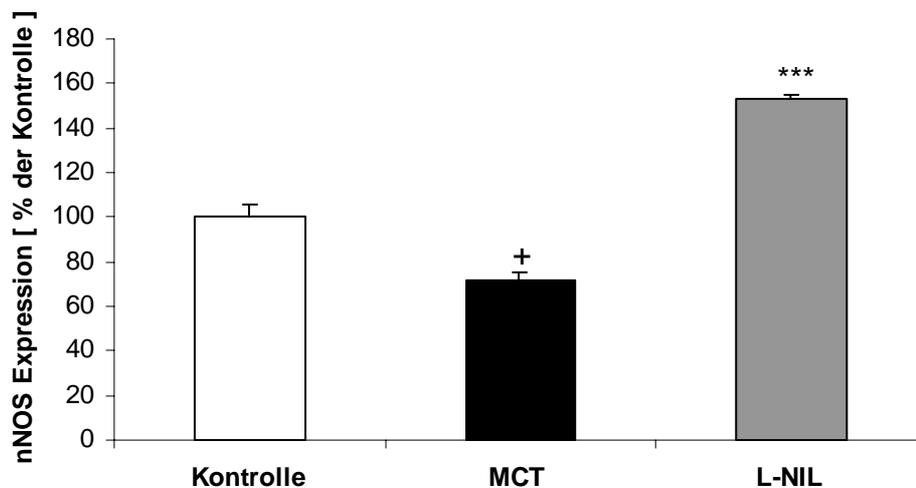


Abb. 26a Repräsentativer Western Blot für nNOS aus Lungenhomogenaten aus der Kontrollgruppe, der MCT-Gruppe und der 14 Tage behandelten L-NIL-Gruppe. Entsprechende Banden zeigten sich nach Inkubation mit Antikörpern gegen nNOS auf erwarteter Höhe bei 160 kDa.

Abb. 26b Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der Immunoblots für nNOS. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SEM) in Prozent der Kontrollwerte. $n = 4$ Blots für jede Gruppe. + $P < 0,05$ vs Kontrolle; *** $P < 0,001$ vs MCT.

Nach 28 Tagen MCT war also eine 28,45 %-ige Verringerung der nNOS zu verzeichnen.

Bemerkenswert war das Ergebnis der Western Blot Analyse von Proben der 14-tägig behandelten L-NIL-Gruppe. Wie in Abb. 28a zu sehen, zeigten sich hier deutlich kräftigere Banden als in den Kontrollproben. Die densitometrische Auswertung ergab in 4 einzelnen Experimenten eine signifikante Signalerhöhung ($153,0 \pm 1,5$ %) von über 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P < 0,001$ vs Kontrolle).

4. Diskussion

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwerwiegende, in Ihrem Verlauf häufig tödlich endende Erkrankung. Charakteristisch für die PAH sind eine anhaltende Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und typische Umbauprozesse der Pulmonalarterien, die als Remodeling bezeichnet werden. Rechtsherzversagen ist die Folge dieser Veränderungen.

In der vorliegenden Studie kam das Monocrotalin-Model der Ratte zu experimentellen Induktion einer pulmonalen Hypertonie zur Anwendung. Dieses Model ist ein seit langem etabliertes Tier-Model zur Untersuchung pathologischer Veränderungen der PH. Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen ist das MCT-Model durch eine drastischere Entwicklung der PH mit konzentrischen Gefäßveränderungen gekennzeichnet, welche den histologischen Veränderungen bei menschlicher PAH sehr ähnlich sind. Die MCT-Sensitivität, insbesondere der Beginn und das Ausmaß der toxischen Effekte kann sich jedoch auch innerhalb eines Zuchtstamms von Tier zu Tier unterscheiden (Hardziyenka et al. 2006). Mit der Therapie der Tiere wurde daher erst 14 Tage nach Verabreichung von MCT begonnen, um gewährleisten zu können, dass entsprechende Veränderungen eingetreten sind.

Um die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie zu untersuchen, wurde in dieser Studie der selektive iNOS-Inhibitor L-NIL eingesetzt. L-NIL zeichnet sich durch eine gute orale Bioverfügbarkeit aus und bietet somit die Möglichkeit zur Therapie im Trinkwasser. Die Substanz zeigt im Gegensatz zu anderen selektiven Inhibitoren keine Toxizität und eine gute Gewebegängigkeit (Zhang et al. 2004).

Hansel et al. (2003) berichteten, dass die orale Verabreichung von SC-51 (N-iminoethyl-L-lysin-5-tetrazolamid), einem Prodrug von L-NIL, die Menge von ausgeatmetem NO bei freiwilligen Gesunden und an Asthma bronchiale erkrankten Patienten signifikant senkte. Trotz der starken Senkung der expiratorischen NO-Konzentrationen zeigte sich in dieser Studie keine Veränderung des forcierten expiratorischen Volumens (FEV1), was Hansel et al. darauf zurückführten, dass iNOS keine endogene bronchodilatorische Funktion in den Atemwegen erfüllt. Umso wichtiger ist, dass eine Einzeldosis dieses Inhibitors von den Probanden gut, ohne

Effekt auf Herzfrequenz, Blutdruck und Atemwegsobstruktion übertragen wurde. L-NIL zeigte keine negativen Effekte auf hämatologische oder Blut-biochemische Parameter. L-NIL zeigte eine lange Eliminations-Halbwertszeit, ein weiterer Indikator der diese Substanz in hohem Maße für die tägliche, einmalige orale Verabreichung qualifiziert.

Weitere Anwendung fand L-NIL bisher vor allem bei Experimenten mit inflammatorischer Komponente. Bei LPS-behandelten Ratten konnten durch L-NIL erhöhte NO-Konzentrationen in der Ausatemluft um 83% gesenkt werden. Im Modell der LPS-stimulierten isolierten Lunge konnte durch L-NIL die durch Acetylcholin und Bradykinin erhöhten pulmonal-arteriellen Drücke gesenkt werden (Fischer et al. 1999).

Studien mit nichtselektiven NOS-Inhibitoren wie L-NMMA zeigten bei experimenteller intravenöser Verabreichung bei Tieren und Menschen die sofortige Entwicklung einer arteriellen Hypertonie (Sander et al. 1999), was im wesentlichen auf die starke Hemmung von eNOS mit nachfolgender erheblicher Vasokonstriktion zurückzuführen ist. Die spezifische Hemmung einzelner NO-Synthasen ohne vor allem schädigende kardiale und vaskuläre Nebenwirkungen zu erreichen, stellt angesichts der vielfältigen Funktionen des von den NOS-Isoformen synthetisierten NO eine Herausforderung dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden dass durch die 14-tägige orale Verabreichung von L-NIL eine signifikante Reduktion des rechtsventrikulären Druckes im Vergleich zur MCT-Gruppe erreicht werden konnte. Der systemische arterielle Blutdruck wurde von L-NIL im Vergleich zur gesunden Gruppe gesenkt. Im Mittel zeigte sich hinsichtlich des SAP kein Unterschied zur MCT-Gruppe. Somit konnte durch die 14-tägige Therapie mit L-NIL ein rasches Fortschreiten der pulmonalen Hypertonie verhindert werden. Die Erniedrigung des rechtsventrikulären Drucks korrelierte mit der verminderten Rechtsherzhypertrophie in der L-NIL Gruppe.

Die bedeutende Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) in der Regulation des pulmonalvaskulären Gefäßtonus ist seit langem bekannt. Über die Aktivität und die gegenseitige Interaktion der einzelnen NOS-Isoformen bei Pulmonaler Hypertonie wird weiterhin diskutiert.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von eNOS im Gewebe von Lunge (Kanno et al. 2001, Tyler et al. 1999, Hironaka et al. 2003) und Aorta (Comini et al. 1996) von MCT-behandelten Ratten reduziert ist. Nakazawa et al. (1999) fanden jedoch im Lungengewebe von MCT-behandelten Ratten verminderte NO-Spiegel und eine erhöhte mRNA-Expression und führten diese Dissoziation zwischen eNOS Expression und NO-Produktion auf die Hemmung des rezeptorvermittelten Ca²⁺-Metabolismus, bzw. die Verminderung der Ca²⁺-Sensitivität von eNOS zurück. Auch Park et al. (1997) beschrieben eine erhöhte Expression der eNOS bei PAH.

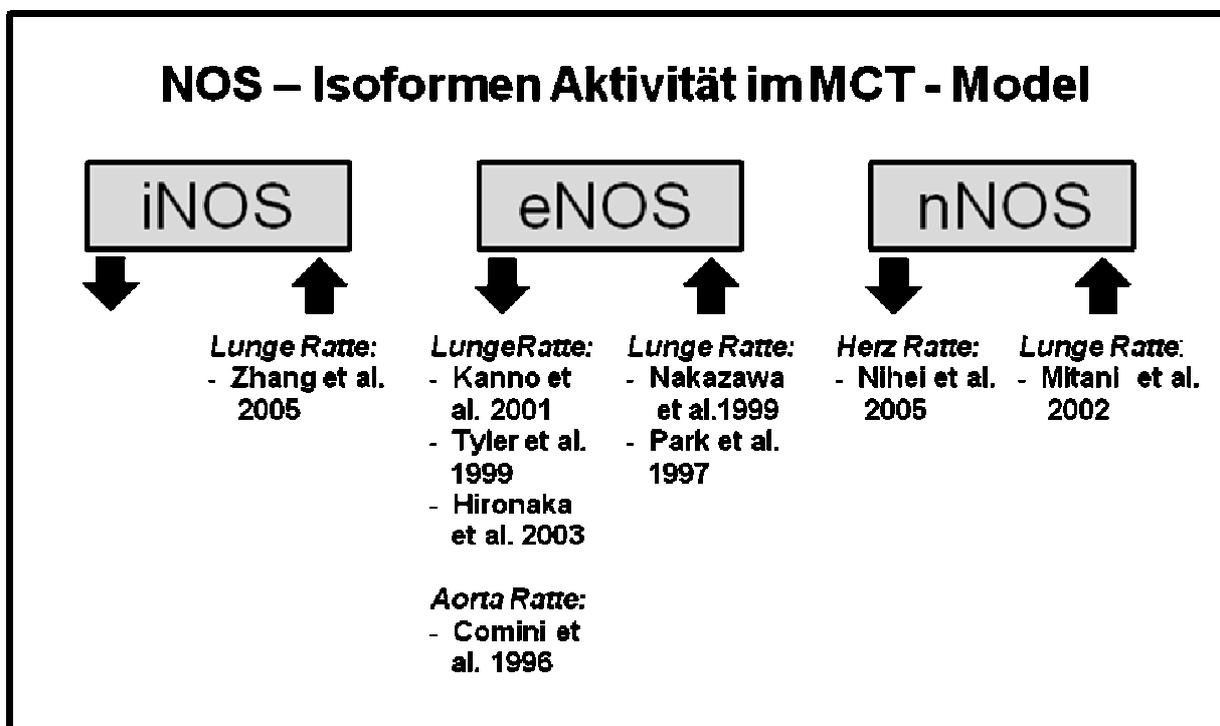


Abb. 27 Überblick über bisherige Forschungsergebnisse über die Aktivität (Protein und mRNA-Ebene) der NOS-Isoformen im MCT-Model. Wie aus der Grafik ersichtlich wurden bisher für die Isoenzyme widersprüchliche Ergebnisse gefunden.

Im Modell der durch chronische Hypoxie induzierten PAH der Ratte konnte in zahlreichen Studien eine verstärkte Aktivität sowohl von eNOS (Resta et al. 1997, Tyler et al. 1999, Le Cras et al. 1998, Palmer et al. 1998, Shaul et al. 1995, Xue and Johns, 1996) als auch von iNOS (Shaul et al. 1995, Grilli et al. 2003) nachgewiesen werden. Zhang et al. fanden 2005 eine erhöhte iNOS-Expression in Lungen von MCT

behandelten Ratten. Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich eine signifikant erhöhte iNOS Expression nachweisen.

Im Western-Blot konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der iNOS auf Proteinebene im Gewebe von Lungengefäßen nach Behandlung mit L-NIL nachgewiesen werden. Korrespondierend zu den Ergebnissen von Zhang et al. (2005) führte in dieser Arbeit die Stimulation durch MCT ebenfalls zu einer stark erhöhten Expression von iNOS im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe in deren Proben das Enzym nicht detektierbar war.

Eine verminderte eNOS-Aktivität im MCT-Model wurde bereits zuvor von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben (Kanno et al. 2001, Tyler et al. 1999, Hironaka et al. 2003). Erstaunlicherweise zeigte die Behandlung mit L-NIL eine deutliche Wirkung auf die Expression von eNOS. Die 14-tägige Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor hatte zu einer 43 %-igen Steigerung der eNOS-Expression im Western Blot geführt.

Diese Ergebnisse lassen sich durch zwei mögliche Zusammenhänge erklären:

1997 zeigten Zhang et al., dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IFN-gamma zur verminderten Gen-Expression von eNOS in pulmonalarteriellen Endothelzellen führen können. Die durch Monocrotalin induzierten Veränderungen sind in ihrer Frühphase von entzündlichem Charakter. Die endotheliale Schädigung durch die aktiven MCT-Metabolite ist gefolgt von einer mononukleären Infiltration in die perivaskulären Regionen (Nishimura et al. 2001). Es ist bekannt, dass die Expression von iNOS durch Zytokine stimuliert werden kann (Kanno et al. 1994, Kleinert et al. 2000).

Voelkel et al. (1994) behandelten Ratten mit MCT-induzierter pulmonaler Hypertonie mit IL-1-Rezeptor-Antagonisten und konnten so eine Reduktion der pulmonalen Hypertension erreichen.

Wie Pelletier et al. (1999) in einem Modell experimenteller Osteoarthritis durch die selektive Hemmung von iNOS mit L-NIL eindrucksvoll zeigten, konnte durch die Anwendung von L-NIL eine messbar verringerte Produktion von katabolischen und proinflammatorischen Faktoren wie MMP, IL-1 β und Peroxynitrit erreicht werden.

Interessanterweise haben einige Patienten mit schwerer PAH mit systemischem Lupus Erythematoses von einer immunsuppressiven Therapie profitiert, was die

Relevanz von Entzündungsvorgängen bei einem Teil der Patienten mit PAH weiter unterstreicht (Dorfmueller et al. 2003).

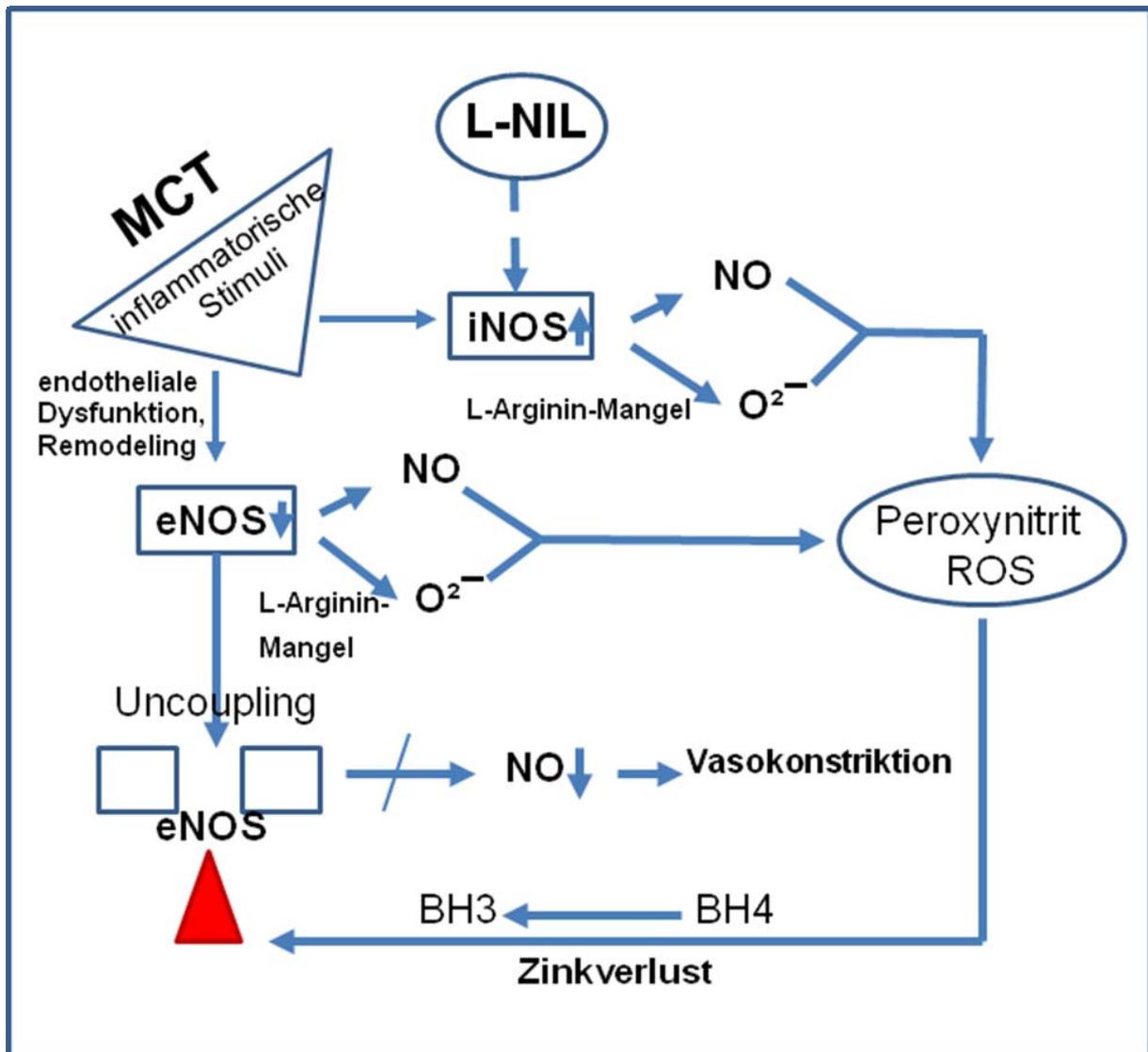


Abb.28 Übersicht über die zum Funktionsverlust von eNOS führenden Vorgänge. Die durch MCT induzierte Verletzung des Endothels führt zu chronischen Umbauprozessen und der Sekretion inflammatorischer Zytokine (IFN-gamma, IL1 β u.a.) dies resultiert in einer verringerten Expression von eNOS und einer Induktion von iNOS. iNOS-Überexpression führt zur vermehrten Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS) bzw. Peroxynitrit aus NO und O²⁻, insbesondere bei Mangel des Substrats L-Arginin. Peroxynitrit führt zur Oxidation von Tetrahydrobiopterin (BH₄) und zum Verlust von Zink an eNOS und führt so zum uncoupling des Enzyms mit Funktionsverlust und konsekutiv verringerter endothelialer NO-Produktion. Folge ist eine vermehrte Vasokonstriktion an pulmonalen Gefäßen. L-NIL hemmt selektiv iNOS und könnte so dem zum Funktionsverlust von eNOS führenden Ablauf entgegen wirken.

Eine zweite Erklärung für die durch L-NIL verbesserte Expression von eNOS könnte in einer iNOS-eNOS-Interaktion begründet sein, in der die Bildung von Reactive oxygen Species (ROS) eine Rolle spielt.

Bereits sehr früh nach der Entdeckung von NO als Botenstoff bei physiologischen Reaktionen (z.B. im Gefäßsystem oder ZNS) wurde klar, dass dieses freie Radikal auch als zytotoxisches Effektormolekül oder pathogener Mediator wirksam werden kann. Vor allem dann wenn es in großer Menge nach inflammatorischer Stimulation von iNOS oder Überstimulation von nNOS und eNOS produziert wird. Diese Pathogenität wird jedoch nicht durch NO selbst, sondern durch sekundäre Zwischenstoffe wie Peroxynitrit (ONNO^-) und Stickstoffdioxid (NO_2^-) vermittelt. Peroxynitrit entsteht bei der Reaktion von NO mit Superoxid (O_2^-).

Xia und Johns (1997) fanden in Makrophagen die Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS) durch iNOS. Diese Bildung von O_2^- findet an der Reduktase-Domäne des Enzyms verstärkt bei Mangel an L-Arginin statt. Xia et al. (1998) postulierten daher das iNOS ROS und NO parallel zu produzieren vermag, je nach Verfügbarkeit des Substrats.

Kuzkaya und Weissmann et al. (2003) konnten hingegen an isolierten aortalen Endothelzellen zeigen, dass Peroxynitrit Tetrahydrobiopterin zu dem Trihydrobiopterin-Radikal oxidiert und auf diese Weise zum uncoupling von eNOS führt. Tetrahydrobiopterinergabe konnte die funktionslose eNOS wieder stabilisieren.

Milstien und Katusic (1999) und Landmesser et al. (2003) kamen zu gleichen Ergebnissen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, im Kontext mit den aufgeführten bisher vorhandenen Ergebnissen unterstützt die Theorie das eNOS unter bestimmten Konditionen einen Funktionsverlust erfährt und das dieser, wie bereits beschrieben, in engem Zusammenhang mit der Überexpression von iNOS steht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass die Expression der endothelialen NO-Synthase durch die selektive Hemmung von iNOS, zum Teil wiederhergestellt werden kann.

Ein unphysiologisches Ungleichgewicht zwischen der Produktion von NO durch eNOS und die überschüssende Generierung von ROS durch vor allem iNOS könnte eine wichtige Rolle bei der Progression der Pulmonalen Hypertonie spielen. Es

wurde berichtet dass NO, sofern es lokal in höherer Konzentration vorliegt als Superoxid, Lipidperoxidationen unterbrechen kann (Rubbo et al. 1994). NO verringert die Aktivierung und Anlagerung von Entzündungszellen und reduziert die Bildung von Superoxid und H_2O_2 in aktivierten Neutrophilen (Forslund und Sundqvist, 1995).

Sobald jedoch erhöhte Superoxidspiegel die Konzentration von NO übersteigen, stimuliert NO die Peroxidation von Lipiden und die Schädigung des Endothels durch die Verwandlung von Superoxid in das hochreaktive Peroxynitrit.

Zytoprotektive Effekte von NO sind also in hohem Maße vom Konzentrationsverhältnis zwischen NO und ROS abhängig. Es ist daher möglich, dass unter den beschriebenen Umständen eine Überexpression von iNOS dieses Verhältnis ungünstig verändert, mit folglich vermehrter Zytotoxizität.

L-NIL-Anwendung führte im Versuch zu verbesserter Hämodynamik. Zum einen könnte dies durch eine Verminderung inflammatorischer Prozesse durch Hemmung von iNOS begründet sein, zum anderen durch das Aufhalten oder zumindest die Verlangsamung des Remodeling an pulmonalen Gefäßen.

Eine Hemmung von iNOS könnte eine Reduktion der Peroxynitrit-Bildung zur Folge haben und so die Menge an gefäßerweiterndem NO erhöhen.

Für die neuronale NO-Synthase (nNOS) ergaben sich in dieser Arbeit folgende Ergebnisse: Nach MCT-Stimulation war eine 28 %-ige Reduktion der Aktivität von nNOS zu beobachten. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der von Nihei et al. (2005) in einem MCT-Modell der rechtsventrikulären Hypertrophie der Ratte gefundenen reduzierten nNOS-Expression. Mitani et al. (2002) fanden allerdings nach MCT-Stimulation im Lungengefäßgewebe eine erhöhte nNOS Expression. Umso interessanter ist vor diesem Hintergrund die in dieser Arbeit auf Proteinebene beobachtete signifikante Erhöhung (um 50 %) der nNOS-Expression nach 14-tägiger Behandlung mit L-NIL.

nNOS wird zwar in afferenten Nervenfasern der Lunge und im Bronchialepithel exprimiert (Schmidt et al. 1994) und spielt eine Rolle in der Regulation des systemischen Gefäßtonus (Ollerstam et al. 1997), jedoch konnten Fagan et al. (1999) in einem Hypoxie-Modell mit nNOS-defizienten Mäusen nachweisen, dass nNOS keinen Einfluß auf die Regulation des pulmonalen Gefäßtonus hatte. Wesentlichen Einfluß zeigte nur durch eNOS und iNOS produziertes NO. Inwiefern nNOS im MCT-

Model unter Einfluß einer iNOS-Überexpression ähnlichen uncoupling-Mechanismen wie eNOS unterworfen ist, bleibt zu klären.

Es muß berücksichtigt werden, dass die Ursachen für die Entwicklung der PH im MCT-Model multifaktoriell sind. Die Hemmung von iNOS stellt somit keine alleinige Therapiestrategie dar. Die Wirkung von L-NIL auf die Hämodynamik ist im Vergleich zu anderen im Modell der MCT induzierten PH erforschten Substanzen wie Prostacyclin oder Phosphodiesterase-Inhibitoren schwächer. Dies kann zum einen trotz der Selektivität von L-NIL an einer nicht auszuschließenden Mit-Hemmung von eNOS liegen, zum anderen an verschiedenen vasokonstriktiven Faktoren, (wie zum Beispiel Endothelin-1), die in MCT-induzierter PH als erhöht beschrieben wurden (Frasch et al. 1999) und auf die L-NIL keinen Einfluss nimmt. Die Kombination einer selektiven iNOS Hemmung mit antiproliferativ wirksamen Substanzen könnte daher erfolgversprechend sein.

Die Verabreichung von L-NIL als wiederholte Injektion oder Infusion wurde bereits zuvor beschrieben (Resta et al. 1999, Schwartz et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal die dauerhafte perorale *in vivo* Anwendung von L-NIL zur therapeutischen, selektiven, und somit wesentlich praktikableren iNOS-Hemmung beschrieben. Die Verabreichung im Trinkwasser stellt aufgrund schwankenden Wasserkonsums zwar ein mögliches Problem dar, insbesondere bei Erkrankungen die mit reduzierter Trinkleistung einhergehen (z.B. bei Hypoxie), in dieser Studie konnte jedoch eine kontinuierliche Flüssigkeitsaufnahme beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die selektive Hemmung von iNOS im Model der Monocrotalin induzierten Pulmonalen Hypertonie einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung dieser häufig letal endenden Erkrankung darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

Die Rolle der verschiedenen Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) in der Pathogenese der Pulmonalen Hypertonie wird kontrovers diskutiert. Insbesondere die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS oder NOS2) ist wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen in einem etablierten experimentellen Modell der Pulmonalen Hypertonie durch Injektion des Alkaloids Monocrotalin in der Ratte. In diesem klinisch relevanten Modell der PH konnte eine signifikant erhöhte Expression der iNOS beobachtet werden. Durch Einsatz des oral verfügbaren selektiven iNOS Inhibitors L-N6-(iminoethyl)-lysin (L-NIL) sollte dessen therapeutischer Nutzen und die Wirkung einer spezifischen iNOS Hemmung untersucht werden. Ratten erhielten 14 Tage nach s.c. Injektion von 60 mg/Kg MCT entweder Placebo oder L-NIL im Trinkwasser über einen Zeitraum von 14 Tagen. Tiere der Therapie-Gruppe zeigten eine signifikante Reduktion des rechtsventrikulären Drucks ($p < 0,01$ vs MCT) und der Herzratio als Ausdruck einer verminderten Rechtsherzhypertrophie ($p < 0,05$ vs MCT). Interessanterweise konnte durch 14-tägige Behandlung mit L-NIL die zunächst durch MCT erniedrigte Expression von eNOS um 43 % erhöht werden ($p < 0,01$ vs MCT). Western Blot Analysen der neuronalen NO-Synthase zeigten eine stark vermehrte Expression nach L-NIL Therapie. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die iNOS, eine entscheidende Rolle in der Progression der Erkrankung spielt. Zum ersten Mal erfolgte die kontinuierliche und perorale *in vivo* Anwendung eines selektiven iNOS Inhibitors in diesem Tiermodell. Die in dieser Studie gezeigte, partielle Wiederherstellung der durch MCT eingeschränkten eNOS Expression durch selektive iNOS Hemmung legt nahe, dass spezifische iNOS-Hemmung einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Pulmonalen Hypertonie darstellen könnte.

6. Summary

The role of the nitric oxide system including the different nitric oxide synthases in pulmonary hypertension is unclear and conflicting data have been presented. In this study we characterized the expression of the different nitric oxide synthase (NOS) isoforms in an established model of experimental pulmonary hypertension induced by injection of the alkaloid monocrotaline in rats. Significant elevation of the expression of inducible NOS (iNOS or NOS2) was noted 4 weeks after injection of 60mg/kg MCT. In order to identify a possible therapeutic potential of selective iNOS inhibition, the isoform selective iNOS Inhibitor L-NIL (L-N6-(iminoethyl)-lysine) was administered orally to rats 14 days after s.c. injection of MCT for the duration of 14 days. Rats that underwent treatment with L-NIL showed significant reduction of right ventricular systolic pressure ($p < 0,01$ vs MCT) and right to left ventricle plus septum ratio ($p < 0,05$ vs MCT) as marker of right heart hypertrophy as compared to placebo treated animals. Interestingly, expression of the endothelial NOS (eNOS or NOS3) was partially restored after L-NIL therapy as compared to reduced NOS3 expression in the MCT group ($p < 0,01$ vs MCT). Western blot analysis of neuronal NO-Synthase (nNOS or NOS1) showed a significant increase in the expression upon treatment with L-NIL. The results of this study indicate that NOS2 plays an important role in the progression of MCT induced PH. For the first time, selective inhibition of NOS2 was performed *in vivo* by continuous oral administration of L-NIL. The partial restoration of impaired NOS3 expression by selective inhibition of NOS2 in this study could point to a new therapeutic approach for the treatment of pulmonary hypertension.

7. Literaturverzeichnis

Alderton WK , Cooper CE and Knowles RG (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

Alheid U, Frölich JC, Förstermann U. (1987) Endothelium derived relaxing factor from cultured human cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 1987; 47:561-571.

Andrew PJ, Mayer B (1999): Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res* 1999;43:521-531

Anggard, E. (1994) Nitric Oxide : mediator, murderer and medicine. *Lancet* 343:1199-1206

Bishop A and Anderson JE (2005): NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* 208: 193-205.

Bogdan C (2001): Nitric Oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916

Butler WH (1970): An ultrastructural study of the pulmonary lesion induced by pyrrole derivation of the pyrrolizidine alkaloids. *J Pathol* 102:15-19.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Budhiraja R, Tuder RM and Hassoun PM (2004) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109:159-165.

Calver A, Collier J, Vallance P (1993): Nitric oxide and Cardiovascular control. *Exp Physiol* 1993:78:303-326.

Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P and Gandjbakhch I (1996): Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 33:196-200.

Cella G, Bellotto F, Tona F, Sbarai A, Mazzaro G, Motta G and Fareed J (2001): Plasma Markers of Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Chest* 120:1226-1230.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. (1992): An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Eng J Med* 1992;159:1925-32.

Christopherson KS and Brecht DS (1997): Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100:2424-2429.

Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnolotti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S, Ferrari R. (1996) Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 28(11):2241-8.

Cool CD, Stewart JS, Wehara P, et al. (1999): Three dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell specific markers. Evidence for a dynamic and heterogenous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1999; 155:411-9.

Cournand AF. Control of the pulmonary circulation in man with some remarks on methodology. *Nobel lecture, December 11, 1956.* In: Nobel lectures, physiology or medicine. *Amsterdam:Elsevier Publishing;1964.*

Cotter G, Caluski E, Milo O, Blatt A, Salah A, Hendler A, Krakover R, Golick A and Vered Z (2003):LINCS: L-NAME (a NO-synthase inhibitor) in the treatment of refractory cardiogenic shock: a prospective randomized study. *Eur Heart J* 24: 1287-1295.

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO (1995) Clinical biology of nitric oxide . *Br J Surg* 1995;82:1598-1610

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT et al. (1991): Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115(5):343-349.

Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*;22:358-363.

Dresdale D.T., Schultz M., Michtom RJ (1951): Primary pulmonary hypertension: clinical and haemodynamic study. *Am J Med* 1951; 11:686-705.

Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris Jr. KG, Huang PL, McMurtry IF, and Rodman DR (1999): Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L472-L478

Fang, FC (1997): Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity *J. Clin. Invest.* 1997 99: 2818-2825.

Nathan, C (1997) *J. Clin. Invest.* 99:2417

Feihl F, Waeber B and Liaudet L (2001): Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 91:179-213.

Fischer LG, Horstman DJ, Hahnenkamp K, Kechner NE, Rich GF (1999): Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. *Anesthesiology* 1999; 91:1724-1732.

Fischman, TO, Hruza, A, Niu, XD, Fossetta JD, Lunn, CA, Dolphin, E., Prongay AJ, Reichert P, Lundell DJ, Narula, SK and Weber, PC (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active site conservation. *Nat Struct Biol* 6, 233-242

Fletcher DS, Widmer WR, Luell S, Christen A, Orevillo C, Shah S, Visco D (1998): Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. *J Pharm Exp Therap* 1998, 284: 714-728

Forslund T and Sundqvist T (1995): Nitric Oxide reduces hydrogen peroxide production from human polymorphonuclear neutrophils. *Eur J Clin Invest* 25:9-14.

Frasch HF, Marshall C, and Marshall BE (1999): Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L304-L310

Förstermann, U. Pollock, JS, Schmidt, HHHW, Hellerm and Murad F (1991) Calmodulin dependent endothelium derived relaxing factor/ nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl. Acad Sci Usa* 88, 1788-1729

Furchtgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of the endothelial Cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980:288:373-376.

Gaine SP, Rubin LJ (1998): Primary pulmonary hypertension 15. *Lancet* 1998 August 29;352 (9129):719-25.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJR and Knowles RG (1997) 1400 W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 4959-4963.

Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS (1994): The biology of nitric oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; 149:538-551.

Ghodsi F, Will JA (1981) Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication *Am J Physiol* 1981; 240:H149-H155

Ghofrani HA et al. (2004) : Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:68-72.

Giaid A, Saleh D (1995): Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lung of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333:214-21.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. (1993): Expression of Endothelin 1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Eng J Med* 1993;328;1732-9.

Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Speranza L, Cataldi A, Centurione L, Taccardi AA, Di Napoli P, De Caterina R, Barbacane R, Conti P, Felaco M (2003): Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Sep;228(8):935-42.

Grisham MB, Jourd'Heuil D and Wink DA (1999) Nitric Oxide I. Physiological Chemistry of NO and it's metabolites: implications in Inflammation. *Am J Physiol* 276:G315-G321.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB and Erzurum SC (1995) "Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo " *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92 1995 7809-13

Hallinan EA, Tsymbalov S, Finnegan PM, Moore WM, Jerome GM, Currie MG, Pitzele B S (1998): Acetamidine lysine derivative, N-(5(S)-amino-6,7-dihydroxyheptyl)ethanimidamide dihydrochloride: a highly selective inhibitor of human inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1998, 41:775-777

Hardziyenka M, Campian ME, de Bruin R, Michel MC, Tan HL (2006) Sequence of echocardiographic changes during the development of right ventricular failure in rats. *J Am Soc Echocardiogr* Vol 19, 10: 1272-1279

Hansel TT, Kharitonov SA, Donnelly LE, Erin EM, Currie MG, Moore WM, Manning PT, Recker DP and Barnes PJ (2003): A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB, J* 17: 1298-1300.

Hatano S, Strasser T, eds. (1975): Primary Pulmonary Hypertension. Report on a WHO Meeting. Geneva *World Health Organization*, 1975;7-45.

Hayashi Y, Lalich JJ (1967) Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;124(2):392-396

Hemmens B and Mayer B (1998): Bindung von Palmytoin ist ein reversibler Prozess zur Lokalisierung an der Membran 1998, *Meth.Mol Biol.* 100:1

Herve P, Humbert M, Sitbon O, et al. (2001): Pathobiology of pulmonary hypertension: the role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med* 2001;22:451-8.

Hibbs JBJ, Taintor RR, Vavrin Z and Rachlin EM (1988): Nitric Oxide a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94.

Hill NS, Jederlinic P, Gagnon J (1989): Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline injected rats. *J. Appl. Physiol.* 66:1642-1648

Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O (2003): Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats.

Cardiovasc Res. 2003 Dec 1;60(3):692-9.

Hislop A and Reid L (1997): Arterial changes in *Crotalaria spectabilis*-induced pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 82: 1493–1498.

Hobbs AJ, Higgs A and Moncada S (1999): Inhibition of Nitric Oxide Synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol., Toxicol.* 1999. 39: 191-220.

Hoffman A, Gloe T Pohl U (2001): Hypoxia induced upregulation of eNOS gene expression is redox sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol* 2001 188:33-44.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. (2004) : Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J AM Coll Cardiol* 2004; 43: Suppl.12, 13S-24S.

Humbert M, Sitbon O, Simmonneau G (2004): Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1425-1436

Huxtable R, Ciaramitaro D and Eisenstein D (1978): The Effect of a Pyrrolizidine Alkaloid, Monocrotaline, and a Pyrrole, Dehydroretronecin, on the Biochemical Functions of the Pulmonary Endothelium. *Molecular Pharmacology*, 14, 1189-1203.

Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ (1986): Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237:893-900

Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous, Bloch DB and Bloch KD (1992): Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:14519-14522.

Jeffery TK, Morell NW (2002): Molecular and cellular basis of pulmonary vascular

remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;45:173-202.

Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, Thomassen MJ and Erzurum SC (1998): Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *Am J. Respir. Crit Care Med.* 158:917.

Kanno K, Hirata Y, Imai T, Iwashina M and Marumo F (1994): "Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells" *Am. J. Physiol.* 267 1994 2318-24.

Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Billiar TR, Ho C (2001): Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation* 21;104(8):945-50.

Kay JM and Heath D (1966): Observation on the pulmonary arteries and heart weight of rats fed on *Crotalaria spectabilis* seeds. *J Pathol Bacteriol* 92:385-394, 1966.

Kay JM, Smith P, Heath D (1969): Electron microscopy of *Crotalaria* pulmonary hypertension. *Thorax* 24:511-526.

Kedzierksi RM and Yanagisawa M (2001): Endothelin System: The double edged Sword in Health and Disease. *Ann Rev. Pharm and Tox*, 41:851-876.

Klatt P, Pfeiffer S, List BM et al. (1996): Characterization of the heme-deficient neuronal nitric oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 1996; 271:7336-7342.

Knowles RG and Moncada S (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258.

Kolb, H and Kolb-Bachofen V (1998): Nitric Oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today* 19:556-561.

Kone, BC (1999): Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol.* 19:230-241

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991): Nitric Oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:4651-5.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG and Dikalov S (2003): Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide. *J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 25, 22546-22554*

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 680-685.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE and Harrison DG (2003): Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest; 111(8): 1201–1209.*

Le Cras TD, Xue C, Rengasmy A, Johns RA (1996): Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J. Physiol* 1996; 270 L164-L170.

Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, Morris KG, McMurty IF, Johns RA, Abman SH (1998): Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase and preproendothelin-1 expression in the adult rat lung. *Chest.* 1998 Jul;114(1 Suppl):35S-36S.

Lizasoain U, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S (1996): Nitric Oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314:877-880.

Lyons CR, Orloff GJ and Cunningham JM (1992): Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267:6370-6374.

Malek AM, Izumo S, Alper SL (1999): Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery* 1999; 45:334-344.

Marin J and Rodriguez-Martinez MA (1997): Role of nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Therapeut* 75:111-134.

Marletta AM (1994): "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis " *Cell* 78 1994 927-30.

Mathew R, Gloster ES, Sundararajan T, Thompson CI, Zeballos GA (1997): Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.

J Appl Physiol 82: 1493-1498

Mathew R, Guzowski DE, Gloster ES (1990): Effects of Verapamil on monocrotaline induced pulmonary artery hypertension and endothelial dysfunction in rats. *Exp Lung Res* 1990;16:627-644.

Meyrick B, Reid L (1979) Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. *Am J Pathol* 1979; 94:37-50.

Meyrick B, Gamble W, Reid L (1980): Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980; 239:H629-H702.

Milstien S and Katusic Z (1999): Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 263, Issue 3, Pages 681-684.*

Miranda UM, Espey MG, Jourd'Heuil D, Grisham MB, Fukuto JM, Feelisch M and Wink DA (2000): The chemical biology of nitric oxide. *In : Nitric Oxide: Biology and pathobiology, pp. 41-56, Eds. LJ Ignarro, Academic Press, San Diego*

Mitani Y, Mutlu A, Russel JC, Brindley DN, DeAlmeida J and Rabinovitch M (2002): Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol 93: 1770-1778.*

Moilanen E, Whittle BJR, Moncada S (1999): Nitric Oxide as a factor in inflammation. *In Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, eds. JIGallin R Snyderman. Philadelphia, PA:Lippcott-Rave 1999.*

Molteni A, Ward FW et al. (1984): Monocrotaline-Induced pulmonary endothelial dysfunction in Rats. *Proc of Society for experimental biology and Medicine 176, 88-94.*

Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG (1994): L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem. 1994 Nov 11 ; 37(23):3886-8.*

Morse JH, Jones AC, Barst RJ et al. (1997): Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to Chromosome 2 q 31-32. *Circulation 1997;95:2603-6.*

Nakazawa H, Hori M, Ozaki H, Karaki H (1999): Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol. 1999 Nov;128(5):1098-104.*

Neufeld AH (2004): Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma. *Brain research Bulletin* 62: 455-459.

Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Veve I, Pearl RG, Kao PN (2001): 40-O-(2-Hydroxyethyl)-rapamycin attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats. *Am J Resp Crit Care Med* 2001;163:498-502.

Ollerstam A, Pittner J, Persson AE and Throup C (1997): Increased blood pressure in rats after long term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 99:2212-2218.

Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987): Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.

Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA.(1998): Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol.* ;274(2 Pt 1):L212-9.

Park HK, Park SJ, Kim CS, Paek YW, Lee JU, Lee WJ (1997): Enhanced Gene-expression of Renin-Angiotensin-System, TGF β 1, Endothelin-1 and nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, 1997;272:H806-H813.

Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J (1999): Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol.* 1999 Sep;26(9):2002-14.

Petros A, Bennet D and Vallance P (1991): Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 338: 1557-1558.

Pietra GG. The histopathology of primary pulmonary hypertension. *In: Fishman*

AP, editor. The Pulmonary Circulation: Normal and Abnormal. Mechanisms, Management and the National Registry. Philadelphia, PA: University of Pennsylvania Press, 1990:459-72.

Pietra GG, Capron F et al. (2004): Pathologic Assessment of Vasculopathies in Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:25-32.

Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM (1992): Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992: 267:24173-24176.

Pryor WA and Squadrito GL (1995): The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268:L699-L722

Beckmann JS and Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996,271,1424-1437.

Hislop A, Reid L (1974): Arterial changes in *Crotalaria spectabilis*-induced pulmonary hypertension in rats. *Br J Exp Pathol.* 1974 Apr;55(2):153–163.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987): The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148:1482-1489.

Rajamma M, Gloster E, et al. (1997): Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 82(5):1493-1498.

Rao CV (2004): Nitric Oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research* 555:107-119

Rayman CS, Li H, MrtasekP, Kral V, Masters BS, Poulos TL (1998): Crystal Structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 1998; 95:939-950.

Resta TC, Gonzales RJ, Dail WG , Sanders TC and Walker BR (1997): Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 272:H806-H813

Resta TC, O'Donoghue TL, Earley S, Chicoine LG and Walker BR (1999): Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronic hypoxic rats. *Am J Lung Cell Mol Physiol* 276, L122-L130.

Richards DW. *Nobel Lecture: the contributions of right heart catheterization to physiology and medicine with some observations of the pathophysiology of pulmonary heart disease. In: Nobel lectures: physiology or medicine. Amsterdam: Elsevier Publishing;1964.*

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. (1987): Primary Pulmonary Hypertension: a national prospective study. *Ann Intern Med* 1987;107:216-228.

Rich S, Kaufmann E, Levy PS. (1992): The Effect of high doses of calcium channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992;327:76-81.

Rich S, Rubin L, Walker AM, Schneeweiss S, Abenhaim L (2000): Anorexigens and pulmonary hypertension in the United States Results from the surveillance of north American pulmonary hypertension. *Chest* 2000; 117:870-874.

Romberg E (1891): Ueber sklerose der Lungenarterie. *Dtsch Archiv Klin Med* 1891; 48: 197-206

Rubin LJ (1997): Primary pulmonary hypertension. *N.Engl J Med* 1997;336:111-7

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Teller R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M and Freeman BA (1994): Nitric Oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid

peroxidation. *J Biol Chem* 269:26066-26075.

Ruelmann DO, Mann GE (2000): Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Curr Med Chem* 2000;7:533-541.

Runo JR, Loyd JE (2003): Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003;361:1533-44

Saleh D, Barnes PJ and Giaid A (1997): Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1763-1769.

Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G and Siracusa MA (2002): Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* 8:177-200

Sander M, Chavoshan B, Victor RG (1999): A Large Blood Pressure–Raising Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition in Humans, *Hypertension*. 1999;33:937-942.

Schermuly RT, Kreisselmeier KP, et al. (2004): Antiremodeling effects of Iloprost and the Dual selective Phosphodiesterase Inhibitor Tolafentrine in chronic Experimental Pulmonary Hypertension. *Circ Res*. 2004; 94:1101-1108.

Schmidt HHHW and Walter U (1994): "NO at work. " *Cell* 78 1994 919-25

Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB and Blantz RC (1997): Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 100:439-448.

Shaul PW, North AJ, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Nisen PA, Lowenstein CJ, Snyder SH, Star RA (1995): Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and

type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 Aug;13(2):167-74.

Smith P, Heath D (1978): Evagination of vascular smooth muscle cells during the early stages of Crotalaria pulmonary hypertension. *J Pathol* 124:177-183.

Stenmark KR, Morganroth ML, Remigio LK, Voelkel NF, Murphy RC, Henson PM, Mathias MM, Reeves JT (1985): Alveolar inflammation and arachnidonate metabolism in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1985; 248:H859-H866.

Stenmark KR and Mecham RP (1997): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu.Rev.Physiol* 59:89.

Swan HJ, Ganz W, Forrester J, Marcus H, Diamond G, Chonette D (1970): Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Eng J Med*, 1970;283:447-51.

Taylor BS, Alarcon LH and Billiar TR (1998): Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function. *Biochemistry (Moscow)* 63, 766-781

Taylor DA, McGrath JL, Orr LM, Barnes PJ and O'Connor BJ (1998): Effect of endogenous nitric oxide inhibition on airway responsiveness to histamine and adenosin-5'-monophosphate in asthma. *Thorax* 53: 483-489

Titheradge MA (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochem. Biophys. Acta* 1411: 437-455

Thomsen LL, Scott JM, Topley P, Knowles RG, Keerie AJ and Frend AJ (1997): Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400 W, a novel inhibitor. *Cancer Res.* 57, 3300-3304.

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D and Voelkel

NF (1999): Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respirat. Crit Care Med.* 159:1925

Tyler RC, Muramatsu M, Abman SH, Stelzner TJ, Rodman DM, Bloch KD and McMurtry IF (1999): Variable Expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 276:L297-L303.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP et al. (1995) : Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995; 269:C1371-1378.

Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J (1967): Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Pathol* 1967; 84(1):64-76

Vallance P and Leiper J (2004): Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1023-1030.

Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, Arend WP (1994): Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11: 664-675.

Wagenvoort CA, Wagenvoort H (1970): Primary pulmonary hypertension: a pathologic study of the lung vessels in 156 classically diagnosed cases. *Circulation* 1970;42:1163-1184.

Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH (1989): Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 256: H1328-H1336.

Wilson DW, Segall HJ, Pan CW, Dunston SK (1989): Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 38:57-80

Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE, and Morin D (1992): Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22: 307–325.

Wink, D. A., J. A. Cook, S. Kim, Y. Vodovotz, R. Pacelli, M. C. Kirshna, A. Russo, J. B. Mitchell, D. Jourdeuil, A. M. Miles, and M. B. Grisham (1997): Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates. *J. Biol. Chem.* 272: 11147–11151.

Wolff DJ, Lubeskie A, Gauld DS, Neulander MJ (1998): Inactivation of nitric oxide synthases and cellular nitric oxide formation by N6-iminoethyl-L-Lysine and N5-iminoethyl-L-ornithine. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jun5;350(2-3):325-34

Wood P (1958): Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. *Br Heart J* 1958; 21:557-570

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T and Nathan C (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228.

Xia Y and Zweier JL (1997): Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 6954-6958*

Xia Y, Roman LJ[¶], Masters BSS[¶] and Zweier JL (1998): Inducible Nitric-oxide Synthase Generates Superoxide from the Reductase Domain. *J Biol Chem, Vol. 273, Issue 35, 22635-22639.*

Xue C und Johns RA (1995): Endothelial nitric oxides synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 333:1642.

Xue C, Johns RA (1996) : Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally

with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat. *Hypertension*. 1996 Nov;28(5):743-53.

Young RJ, Beams RM, Carter K, Clark HA, Coe DM, Chambers CL, Davies PI, Dawson J, Drysdale MJ, Franzman KW et al. (2000): Inhibition of inducible nitric oxide synthase by acetamidine derivatives of hetero-substituted lysine and homolysine. *Bioorg.Med.Chem.Lett*. 10,597-600.

Yun HY, Dawson, TM (1997): Nitric Oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 2, 300-310.

Zhang J, Patel JM, LI YD, Block ER (1997): Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res Commun Pathol Pharmacol*, 1997 Apr;96(1):71-87.

Zhang JY, Wang Y, Milton MN, Kraus L, Breau AP, Paulson SK (2004): Disposition and Pharmacokinetics of L-N6-(1-Iminoethyl)Lysine-5-Tetrazole-Amide, a Selective iNOS Inhibitor in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 93, NO.5

Zhang TT, Bing CUI, De-zai DAI, Wei SU (2005): CPU 86017, p-chlorobenzyltetrahydroberberine chloride, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing endothelin pathway1. *Acta Pharmacologica Sinica* ; 26 (11): 1309-1316.

Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002): Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin. Invest*. 109:817-826.

Zou MH Cohen RA, Ullrich V (2004): Peroxynitrite and Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Endothelium*, Volume 11, 2: 89 – 97.

8. Erklärung

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Christoffer Krug

10. Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle ganz herzlich gedankt.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly für die Vergabe des Themas, seine Hilfe und seine unmittelbare Unterstützung und Geduld bei der Entstehung dieser Arbeit.

Fr. Dr. Soni Pulamsetti danke ich ganz besonders für ihre geduldige Betreuung, sowie Anleitung und Einweisung in die Labortechniken und die Thematik.

Fr. Dr. Eva Dony danke ich für ihre fachliche Unterstützung und Einweisung

Meinem guten Freund und Kollegen Alexander Rühlmann danke ich sehr für seine Unterstützung und fortwährende Ermutigung während der gesamten Arbeit.

Dr. Arun Samidurai danke ich für seine Beratung im Labor.

Meinen Eltern und Großeltern gilt großer Dank, besonders für ihre Unterstützung und ihre stetige, liebevolle Begeisterung für alles was ich tue.

Linda, mein Herz: Dir gilt der größte Dank, für dein Verständnis, deine Zuversicht und deine große Liebe.