

**THERAPEUTISCHER EFFEKT DES
GUANYLATZYKLAESTIMULATORS BAY 63-2521 IM MODELL DER
MONOCROTALIN - INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE DER
RATTE**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Christina Kaulen

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Rainer

und

dem Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ralph Schermuly

**THERAPEUTISCHER EFFEKT DES
GUANYLATZYKLAESTIMULATORIS BAY 63-2521 IM MODELL DER
MONOCROTALIN - INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE DER
RATTE**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

eingereicht von

Christina Kaulen
Tierärztin aus Mönchengladbach

Giessen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan : Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Rainer
Prof. Dr. R. Schermuly

Tag der Disputation: 25.06.2009

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.

Christina Kaulen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pulmonaler Hochdruck	1
1.2	Einteilung der pulmonalen Hypertonie	3
1.3	Modelle des pulmonalen Hochdruckes	4
1.4	Guanylatzyklase und Stickstoffmonoxid	8
1.5	BAY 63-2521	14
1.6	Ziel	14
2	MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Versuchstiere	15
2.1.2	Verbrauchsmaterial	16
2.1.3	Geräte und Maschinen für die Tierpräparation	17
2.1.4	Injektionslösungen und Substanzen	18
2.1.5	Gefäßmorphometrie / Histologie	19
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Histologie	20
2.2	Methoden	23
2.2.1	Versuchsanordnung	23
2.2.2	Monocrotalin	24
2.2.3	BAY 63-2521	24
2.2.4	Hämodynamische Messungen	25
2.2.4.1	Vorbereitung	25
2.2.4.2	Präparation	25
2.2.4.3	Messung	26
2.2.5	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	28
2.2.5.1	Elastica - Kernechtrot – Färbung	29
2.2.5.2	Immunhistochemische Färbungen	29
2.2.5.2.1	Immunhistochemische Doppelfärbung (Muskularisierungsgrad)	29
2.2.5.2.2	Immunhistochemische Färbung der sGC	31

2.2.5.3	Morphometrie	31
2.2.5.3.1	Mittlere Wandstärke	31
2.2.5.3.2	Muskularisierungsgrad	32
2.2.6	Statistik	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Überlebensrate	34
3.2	Nebenwirkungen	35
3.3	Gewicht	35
3.4	systolischer arterieller Druck	36
3.5	rechtsventrikulärer systolischer Druck	37
3.6	Total Pulmonary Resistance	38
3.7	Herzratio	40
3.8	Morphometrie	41
3.8.1	Wandstärke	41
3.8.2	Muskularisierungsgrad	44
3.9	Expression von sGC in humanen und Rattenlungen	46
4	DISKUSSION	48
4.1	Stickstoffmonoxid	48
4.2	NO und oxidativer Stress	49
4.3	Tiermodell	54
4.4	Klinische Perspektive	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	SUMMARY	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	60

Abbildungsverzeichnis

Blutkreislauf	2
Pathomechanismus des Gefäßremodellings	6
RVSP-Verlauf nach MCT-Gabe	7
Signaltransduktionsweg NO/sGC	9
Strukturformel BAY 63-2521	14
Versuchsaufbau	23
Druckkurve des RVSP	27
Überlebensrate	34
Gewichtsverlauf	36
systolischer arterieller Druck	37
rechtsventrikulärer systolischer Druck	38
Total Pulmonary Resistance	39
Herzratio	40
Kernecht-Rot-Färbung	41
Wandstärke, kleine Gefäße	42
Wandstärke, mittelgroße Gefäße	43
Wandstärke, große Gefäße	43
Immundoppelfärbung	44
Muskularisierungsgrad	45
sGC-Expression, Rattenlungen	46
sGC-Expression, humane Lungen	47
Signaltransduktionsweg NO	50
Oxidierte und reduzierte Form der sGC	51

Abkürzungen

A.	lat. arteria (Arterie)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
GC	Guanylatzyklase
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CO	Kohlenstoffmonoxid
cm	Zentimeter
d	lat. dies (Tag)
EDRF	endothelial derived growth factor
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	lat. hora (Stunde)
IGF 1	Insulin-like Growth Factor 1
IHC	Immunhistochemie
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
KDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
M	molar
M.	lat. musculus (Muskel)
MCT	Monocrotalin
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mPAP	mittlerer pulmonalerarterieller Druck
MW	Mittelwert
n	number (Anzahl)
1N HCl	1 normale Salzsäure
N.	lat. Nervus (Nerv)
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NYHA	New York Heart Association
°C	Grad Celsius
p.	lat. post (nach)
PAP	pulmonalerarterieller Druck, pulmonary arterial pressure
PBS	gepufferte Kochsalzlösung, phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck, positive end-expiratory pressure
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PH	pulmonale Hypertonie
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)
RVSP	right ventricular systolic pressure (rechtsventrikulärer systolischer Druck)
s.	siehe
s.c.	subkutan
SAP	systemisch arterieller Druck, systemic arterial pressure
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error mean (Standardfehler)
SGC	soluble (lösliche) Guanylatzyklase

sma	smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)
SPH	sekundäre pulmonale Hypertonie
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
V.	lat. vena (Vene)
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP	Beatmungsdruck, Ventilation pressure
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Pulmonaler Hochdruck

Global liegen die Lungenkrankheiten bezüglich Sterblichkeit, Inzidenz, Prävalenz und Kosten direkt an zweiter Stelle hinter den kardiovaskulären Krankheiten. In einigen Ländern, z. B. Großbritannien, sind sie bereits die führende Todesursache (World Health Report, 1998). Nach Schätzungen der WHO werden 2020 von den 68 Millionen Todesfällen weltweit 11,9 Millionen durch Lungenkrankheiten verursacht sein, davon 4,7 Millionen durch COPD, 2,5 Millionen durch Lungenentzündungen, 2,4 Millionen durch Tuberkulose und 2,3 Millionen durch Lungenkrebs (Murray CJL, Lopez AD, The Global Burden of Disease, 1996).

Viele dieser Erkrankungen der Lunge, aber auch Erkrankungen des Herzens gehen mit einem Bluthochdruck in der Lunge einher. Diese pulmonale Hypertonie kann auch ohne erkennbare Ursache entstehen (idiopathische PH) und führt bei den Betroffenen zu Atemnot, Husten, blauen Lippen und Wasseransammlungen in den Beinen. Häufig werden die ersten Anzeichen, Luftnot bei Belastung und schnelle Ermüdung, kaum wahrgenommen, durch die anfangs unspezifischen Symptome erfolgt eine Diagnose meist sehr spät.

Die mittlere Überlebenszeit liegt nach Diagnose bei nur 2,8 Jahren, sofern keine Behandlung erfolgt (D'Alonzo et al., 1991). Betroffen sind 30 - 50 Menschen pro Million (Peacock, 2003).

Die pulmonale Hypertonie ist seit mehr als 100 Jahren bekannt, geriet jedoch lange Zeit in Vergessenheit, da weder diagnostische noch therapeutische Möglichkeiten vorhanden waren und die Erkrankung in der Regel im Rahmen einer Obduktion diagnostiziert werden musste.

In den sechziger Jahren trat die pulmonale Hypertonie wieder in den Mittelpunkt des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses, der Grund war ein Anstieg der Erkrankungshäufigkeit durch die Einnahme von Appetitzüglern.

Erst durch die Entwicklung der Ultraschalldiagnostik und der Doppler-Echokardiographie wurde es möglich, den Blutdruck im Lungenkreislauf zu bestimmen und so nicht-invasive Diagnostik zu betreiben.

Das Kreislaufsystem wird in einen großen und einen kleinen Kreislauf unterteilt. Das sauerstoffreiche, arterielle Blut fließt im großen Kreislauf vom linken Herzen durch den Körper und versorgt die Organe mit Sauerstoff. Es gelangt als sauerstoffarmes, venöses Blut zum rechten Herzen. Von hier wird es im kleinen Kreislauf in die Lunge gepumpt, nimmt Sauerstoff auf und fließt zurück in das linke Herz. Erhöht sich der Druck im kleinen Kreislauf über einen bestimmten Wert, liegt ein pulmonaler Hochdruck vor.

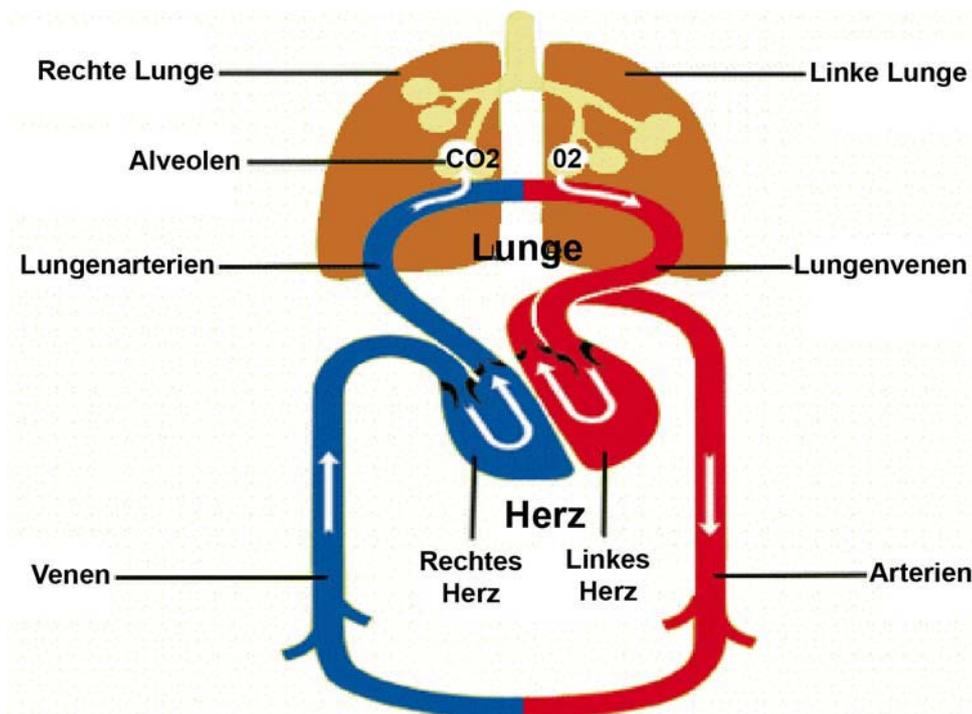


Abbildung 1: Darstellung des Blutkreislaufes

Definiert wird die pulmonale Hypertonie durch eine chronische Erhöhung des mittleren Druckes (mittlerer pulmonalarterieller Druck, mPAP) im kleinen Kreislauf über 25 mmHg in Ruhe und über 30 mmHg bei Belastung (Rubin, 1997).

Bei einem mPAP von 24 - 45 mmHg handelt es sich um eine milde PH, bei einem mPAP über 45 mmHg hingegen um eine schwere PH (Voelkel und Tudor, 1999).

Pulmonale Hypertonien gehen einher mit einer Erhöhung des pulmonalen Vasotonus, proliferativen Lungengefäßveränderungen und einer Hypertrophie des rechten Herzens, durch die erhöhte Nachlast entsteht ein Cor pulmonale nach WHO - Definition.

Die mit der Erkrankung einhergehende Gefäßwanddickenzunahme erfolgt durch Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, dabei sind alle Gefäßwandschichten an diesen Umbauprozessen beteiligt, die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt.

Die strukturellen und funktionellen Veränderungen der Gefäßwände im Laufe der Erkrankung werden als pulmonalvaskuläres Remodeling bezeichnet. Durch den chronischen Druckanstieg verdickt sich die Gefäßwand, um dem steigenden Druck standzuhalten. Dafür werden zusätzliche glatte Muskelzellen benötigt, die jedoch zu einer Verminderung des Innendurchmessers und zu einer eingeschränkten Möglichkeit der Vasodilatation führen. Der pulmonalvaskuläre Widerstand erhöht sich und resultiert in einem anhaltenden Lungenhochdruck. Die Zunahme der glatten Muskelzellen breitet sich nach distal aus und erreicht auch kleine, physiologisch nicht muskularisierte Pulmonalarterien, man spricht dann von einer de-novo-Muskularisierung (Humbert et al., 2004).

Die Patienten leiden unter fortschreitender Luftnot bei Belastung, rascher Ermüdung und erliegen bei fortschreitender Erkrankung schließlich dem Tod durch Rechtsherzversagen.

1.2 Einteilung der pulmonalen Hypertonie

Die erste Einteilung der pulmonalen Hypertonie erfolgte 1973 durch die WHO. Sie unterschied die primäre pulmonale Hypertonie, die ohne erkennbare Ursache auftritt, von der sekundären pulmonalen Hypertonie mit bekannter Ursache.

2003 wurde die klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie auf der Weltkonferenz in Venedig modifiziert und die pulmonale Hypertonie in fünf Gruppen eingeteilt:

1. Die Pulmonalarterielle Hypertonie (PH).

Sie wird weiter unterteilt in eine idiopathische PH, die ohne erkennbare Ursache entsteht, eine familiäre PH, eine PH assoziiert mit bestimmten Erkrankungen (APAH; angeborene Shunts, Kollagenosen, portale Hypertonie, HIV-assoziiert, durch Medikamente/Toxine, andere

Erkrankungen), eine PH mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung (z.B. pulmonale veno-okklusive Erkrankung, pulmonale kapilläre Hämangiomatose) und eine persistierende PAH des Neugeborenen.

2. Die pulmonale Hypertonie bei Linksherzversagen.
3. Pulmonale Hypertonien bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/oder Hypoxämie.
4. Pulmonale Hypertonie infolge chronisch thrombotischer und/oder embolischer Krankheiten.
5. Gemischte Gruppe: PH bei Sarkoidose, Histiozytose, Lymphangiomatose, Schistosomiasis oder durch Kompression der Lungengefäße.

1.3 Modelle des pulmonalen Hochdruckes

Ein Studium der Vorgänge bei der pulmonalen Hypertonie ist meist nur im Tiermodell möglich, da die Patienten anfangs symptomfrei sind. Es existieren das Monocrotalinmodell der Ratte und das Modell der Hypoxie-induzierten PH von Maus und Ratte. Das Hypoxiemodell bleibt klinisch und pathohistologisch sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte im Schweregrad der Ausprägung hinter dem Monocrotalinmodell der Ratte zurück. Es fehlen die erhöhte Sterblichkeitsrate und die ausgeprägten proliferativen Gefäßveränderungen. Nach Van Suylen et al., 1998, kommt es eher zu vasokonstriktiven Veränderungen und zu keinem konzentrischen Remodelling der Gefäßwände, die Umbauprozesse der Gefäßwände sind nach Verbringen in Raumluft zum Teil reversibel.

Eine pulmonale Hypertonie durch Monocrotalin bei der Maus zu erzeugen ist bisher nicht gelungen. Eine Verabreichung des aktiven Metaboliten Dehydromonocrotalin führte lediglich zu akut entzündlichen und ödematösen Lungenveränderungen,

später zu leichter Fibrose des Lungenparenchyms (Dumitrascu et al., 2008).

Die Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie der Ratte ruft ein mit der (idiopathischen) PH des Menschen vergleichbares Krankheitsbild hervor und ist gut reproduzierbar, deshalb wurde es für die vorliegende Arbeit gewählt.

Monocrotalin ist ein Pyrrolizidin-Alkaloid aus *Crotalaria* (Familie der Leguminosae), durch das in vielen Teilen der Welt sporadische Vergiftungsfälle auftreten. Es stellt ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar (Environmental Health Criteria 80 : Pyrrolizidine Alkaloids, WHO 1988) mit speziespezifischen Auswirkungen.

Nach Aufnahme werden die Pyrrolizidinalkaloide durch mischfunktionelle Oxidasen (Cytochrom-P450 Enzyme) in der Leber metabolisiert, es entstehen reaktive alkylierende pyrrolische Dehydro-Alkaloide, es erfolgt also durch die Leber eine Bioaktivierung (Toxifizierung). Die Metaboliten gelangen in die Blutbahn und induzieren in der Lunge initiale Endothelschäden, die zu einer Erhöhung der Permeabilität, Thrombozytenaggregation und verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen führen. Entzündungszellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, es kommt zur Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten sowie zur verstärkten Bildung von extrazellulärer Matrix. Die Muskularisierung und Umstrukturierung der Gefäßwände nimmt zu und erhält sich selbst aufrecht, dieser Vorgang wird als `Remodelling` bezeichnet (s. Abbildung 2).

Endothelschädigung durch MCT



Permeabilitätserhöhung

Thrombocytenaggregation

Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen



Migration und Proliferation

von glatten Muskelzellen



Produktion von Kollagen, Wachstumsfaktoren

durch die glatten Muskelzellen



überschießende `Heilungs`-Prozesse

autonome Veränderungen



Muskularisierung

Gefäßremodeling

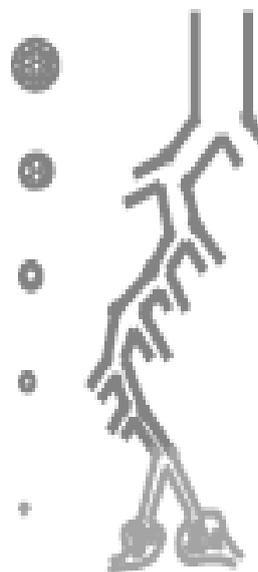


Abbildung 2: Darstellung des Pathomechanismus des Gefäß-Remodellings nach Monocrotalininjektion

In der Leber entstehen je nach Spezies ausgeprägt Nekrosen, Hyperplasie, Zirrhose und Fibrose, in der Niere Glomerulopathien. Sekundär zeigen sich Veränderungen am Zentralnervensystem durch den leberbedingten Ammoniakanstieg (Environmental Health Criteria 80 : Pyrrolizinine Alkaloids, WHO 1988).

Die aktiven Metaboliten haben sehr kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) und werden innerhalb von 24 Stunden fast vollständig über die Nieren ausgeschieden. Nach 24 Stunden können weder in Geweben noch in Körperflüssigkeiten verbliebene Produkte nachgewiesen werden (Hayaschi et.al., 1967). Durch die antimitotische Wirkung der aktiven Pyrrole entstehen große atypische Typ II Alveolarzellen mit stark vergrößerten Kernen (Wilson & Segall, 1990). Meyrick und Reid zeigten 1979, dass es bereits drei Tage nach dem toxischen Stimulus zu einem Auftreten von Muskelfasern in physiologischerweise nicht muskularisierten Lungenarterien kommt.

Die Frage, woher die neuen Muskelzellen stammen, wird unterschiedlich beantwortet. Perizyten sind in der Lage, sich in Fibroblasten, glatte Muskelzellen und makrophagenähnliche Zellen umzuwandeln (Reid et al., 1986), aber auch die Fibroblasten der Adventitia und des Interstitiums können rekrutiert werden (Stenmark et al, 2006).

Hall und Mitarbeiter zeigten 2000, dass sich in der menschlichen Embryonalentwicklung die glatten Muskelzellen unter anderem auch aus Endothelzellen entwickeln. Die Bedeutung zirkulierender Vorläuferzellen für die Neuentstehung glatter Muskelzellen wird je nach Arbeitsgruppe unterschiedlich diskutiert (Hayashida et al., 2005; Raoul et al., 2007).

In den Wochen nach der toxischen Schädigung entwickeln die Tiere klinische Anzeichen von Rechtsherzinsuffizienz: Dyspnoe, Zyanose und Ödeme. In den Pulmonalarterien und -arteriolen verdickt sich die Media progressiv, das rechte Herz hypertrophiert durch die steigende Druckbelastung, es kommt zur Dilatation und Dekompensation, es folgt der Tod durch Rechtsherzversagen.

Der pulmonalarterielle Druck zeigt ab dem 8. Tag nach der Monocrotalininjektion einen kontinuierlichen Anstieg (Ghodsi & Will, 1981), ab der dritten Woche nach Injektion liegt eine voll etablierte pulmonale Hypertension vor.

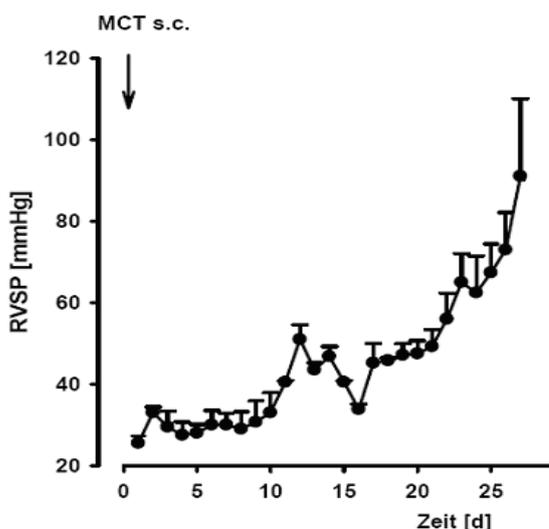


Abbildung 3: Darstellung des rechtsventrikulären Druckverlaufes durch kontinuierliche telemetrische Messung nach Monocrotaliningabe, aus: Schermuly et al, 2005.

Da das aktive Alkaloid innerhalb der ersten 24 Stunden nahezu vollständig ausgeschieden wird, die Gefäßveränderungen sich jedoch nur langsam entwickeln, ist eine Gefäßveränderung aufgrund der durch den toxischen Stimulus angestoßenen biologischen Pathomechanismen wahrscheinlich.

Langleben und Reid zeigten 1985 eine Verringerung der Gefäßveränderungen durch die Gabe von Methylprednisolon in geringen Dosen über 21 Tage nach dem toxischen Stimulus. Die durch Monocrotalin getriggerten Veränderungen scheinen sich also selbst aufrecht zu erhalten.

An der Modulation des vaskulären Remodellings sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Peptiden, Zytokinen und reaktiven Sauerstoffverbindungen sowie kleine Moleküle wie Stickstoffmonoxid (NO) als Gegenspieler beteiligt.

Stimulierend auf die Proliferation glatter Muskelzellen wirken unter anderem Insulin-like Growth Factor (IGF) 1 und 2, Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Insulin, Heparin, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Serotonin und Leukotriene. Hemmend wirken Prostaglandine, Interferone, Tumornekrosefaktor- α , Kohlenstoffmonoxid und NO.

Auf die Kollagensynthese wirken IGF 1 und 2, PDGF, Angiotensin II ebenfalls stimulierend, Prostaglandine, Interferone, ANP und NO hemmen die Kollagensynthese.

1.4 Guanylatzyklase und NO

Die amerikanischen Pharmakologen Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad erhielten 1965 den Nobelpreis für ihre Arbeiten über die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) im Herz-Kreislaufsystem.

NO spielt eine wichtige Rolle bei der Relaxation glatter Muskelzellen über die Guanylatzyklase (GC). Die GC aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen, diese führen zu einer Senkung der Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma und einer

Desensibilisierung des kontraktiven Aktin-Myosin-Systems, es resultiert eine Vaso- und Bronchodilatation (Abbildung 4).

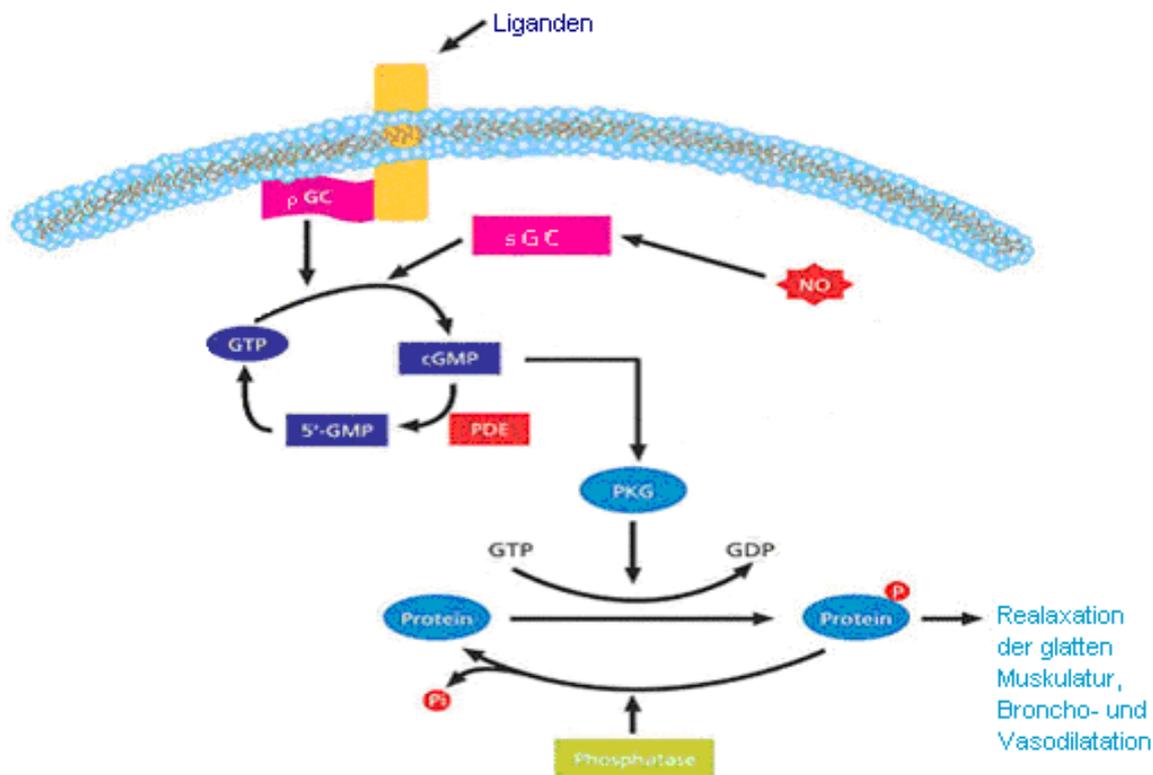


Abbildung 4: Darstellung des Signaltransduktionsweges der sGC

Die Guanylatzyklase kommt in eukaryotischen Zellen in zwei Enzymformen vor (Kimura und Murad, 1974), als lösliche Guanylatzyklase (sGC) und membrangebundene und damit partikuläre Guanylatzyklase (pGC), und katalysiert die Hydrolyse von Guanosin-5'-Phosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und Pyrophosphat.

Die lösliche Guanylatzyklase konnte aus mehreren Geweben isoliert werden, am besten lässt sich das Enzym aus bovinem Lungengewebe isolieren. Das isolierte Enzym ist ein Heterodimer, das aus einer α 1-Untereinheit und einer β 1-Untereinheit besteht. Während für die β 1-Untereinheit einheitlich ein Molekulargewicht von 70 kDa angegeben wird, differiert das Gewicht der α 1-Untereinheit je nach Arbeitsgruppe zwischen 73 und 80 kDa (Gerzer et al., 1981;

Stone und Marletta, 1994; Burstyn et al., 1995; Tomita et al., 1997). Die α 1- und β 1-Untereinheit sind ubiquitär exprimiert.

In der Rattenniere und in humanem fetalen Gehirn wurden weitere Untereinheiten gefunden (Yuen et al., 1990; Harteneck et al., 1991), die mit 82 kDa größere α 2-Untereinheit und die kleinere β 2-Untereinheit mit 76 kDa. Die α 2-Untereinheit kommt außer im fetalen Gehirn auch in der humanen Plazenta und bei der Ratte in Niere, Gefäßen und Spinalganglien vor. Die β 2-Untereinheit kommt in der Rattenniere und in der Rattenleber vor, in humanem Gewebe wurde sie bisher nicht nachgewiesen.

Von Giulli et al. wurden 1992 die α 3- und die β 3-Untereinheit aus humanem Gewebe isoliert, die aber eher der α 1- und der β 1-Untereinheit der Ratte entsprechen als unterschiedliche Isoformen darstellen (Koesling und Friebe, 1999).

Alle Untereinheiten besitzen zwei katalytische Domänen im Bereich des C-Terminus. Die β 2-Untereinheit besitzt im Bereich des C-Terminus 86 zusätzliche Aminosäuren.

Die N-terminale Region der Untereinheiten variiert, allerdings ist ein Bereich von 100 Aminosäuren innerhalb der α - und β - Untereinheiten hoch konserviert und unterscheidet sich nur zwischen α - und β -Untereinheiten.

Expressionsexperimente konnten zeigen, daß für ein aktives Enzym eine α - und eine β -Untereinheit notwendig sind (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991).

Die aus der Lunge isolierte lösliche Guanylatzyklase ist ein Heterodimer aus α 1- und β 1-Untereinheit. Sie wird durch NO bis 400-fach stimuliert und enthält eine prosthetische Häm-Gruppe (Gerzer et al., 1981), als Kofaktor wird Mg^{2+} oder Mn^{2+} benötigt. Die spezifische Aktivität liegt bei 25 bis 40 μ Mol cGMP pro Minute und Milligramm (Stone und Marletta, 1995).

Behrends et al. identifizierten 1995 eine inaktive splice-Variante der α 2-Untereinheit, die mit der β 2-Untereinheit dimerisieren kann. Es könnte sich bei dieser enzymatisch nicht aktiven Isoform um einen dominant negativen Regulator der sGC-Aktivität handeln, die inaktive Variante konnte nicht in allen Geweben nachgewiesen werden (Behrends et al, 1995).

Über die biologische Bedeutung der β 2-Untereinheit ist bisher wenig bekannt.

Die Aktivierung der sGC erfolgt außer durch NO (Stone und Marletta, 1994) in geringerem Maße durch CO (Stone und Marletta, 1994), über den eisenfreien

Häm-Vorläufer Protoporphyrin IX, indem es die Konformation des NO-Häm-Komplexes nachahmt (Ignarro et al., 1984), und über den synthetischen Aktivator YC-1 (Friebe et al., 1996).

Durch NO bildet sich ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex, durch die Bindung von CO ein sechsfach koordinierter Komplex. In beiden Fällen resultiert eine Konformationsänderung, die zur Aktivierung der sGC führt. Die geringere Aktivierung der sGC durch CO erklärt sich durch die hohe Diffusionsrate und die geringere Konformationsänderung im Häm-Komplex.

Durch die Konformationsänderung im Bereich des Häm-Komplexes am N-Terminus kommt es unter Freisetzung von Pyrophosphat zur Bildung von cGMP aus GTP im katalytischen Zentrum am C-Terminus (Hobbs, 1997), cGMP führt über Proteinkinasen zur Phosphorylierung von Enzymen und so zu einer Vaso- und Bronchodilatation in der Lunge.

NO ist der stärkste Aktivator der sGC. NO war bis in die 70-er Jahre hauptsächlich als Umwelt- und Zellgift bekannt. Erst danach wurde die Rolle von NO bei der zellulären Signaltransduktion aufgeklärt. Arnold et al. zeigten 1977, daß NO durch eine Aktivierung der sGC zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. Die 1980 von Furchgott und Zawadzki EDRF (Endotheliumderived Relaxing Factor) benannte Verbindung wurde 1987 von Palmer et al. als endogen produziertes NO identifiziert und 1992 von der Zeitschrift Science zum Molekül des Jahres gewählt.

NO ist ein farbloses Gasradikal, das in Wasser nur gering löslich und mäßig reaktionsfreudig ist, es ist an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Regulation des Blutdruckes, wirkt im zentralen und peripheren Nervensystem als Neurotransmitter (Bult et al., 1990; Bredt und Snyder, 1994) und ist an Abwehr- und Entzündungsprozessen beteiligt (Moncada, 1993; Wang und Hakanson, 1995).

Unter physiologischen Bedingungen produziert der Körper enzymatisch und nicht-enzymatisch NO.

Die nicht-enzymatische Produktion findet vor allem im Magen und an der Hautoberfläche statt, aber auch im ischämischen Herzen und bei Harnwegsinfekten (Weitzberg und Lundberg, 1998). Unter sauren und reduzierenden Bedingungen wird dabei aus anorganischem Nitrit NO freigesetzt.

Bei der enzymatischen Produktion ist das Substrat die Aminosäure L-Arginin, die zu Citrullin reduziert wird, dabei entsteht NO (Marletta et al., 1988; Moncada et al., 1989).

Beteiligt sind mehrere Coenzyme und prosthetische Gruppen: Häm, FAD, FMN, NADPH+H⁺, Tetrahydrobiopterin (Nathan und Xie, 1994).

Bisher konnten drei NO-produzierende Enzyme identifiziert werden. Diese als NO-Synthetasen (NOS) bezeichneten Isoformen unterscheiden sich in Struktur, Funktion und Lokalisation. Alle drei Enzyme besitzen eine N-terminale Oxygenasedomäne und eine C-terminale Reduktionsdomäne. Die Reduktionsdomäne liefert Reduktionsäquivalente für das Häm in der Oxygenasedomäne. In der Reduktionsdomäne finden sich Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (Nakane et al., 1993; Förstermann et al. 1994).

Alle Isoformen bilden jeweils aus zwei Monomeren ein Dimer, das durch zwei Calmodulinmonomere zu einem Tetramer wird (Marletta, 1994).

Bis 1995 wurden die NOS eingeteilt nach dem Zelltyp, aus dem erstmalig die Isolation der jeweiligen NOS-mRNA erfolgte: nNOS (neuronal), eNOS (endothelial) und iNOS (induzierbar). Da die verschiedenen NOS-Formen dann auch in anderen Zelltypen gefunden wurden, wurde eine neutrale, zelltypunabhängige Nomenklatur eingeführt: NOS-1 (nNOS), NOS-2 (iNOS) und NOS-3 (eNOS) (Förstermann und Kleinert, 1995).

NOS-1, die im Kleinhirn der Ratte entdeckt wurde (Schmidt und Murad, 1991), und NOS-3, die vor allem im Gefäßendothel vorkommt (Förstermann und Dun, 1996), liegen in relativ konstanten Konzentrationen vor und werden deshalb als konstitutive Formen bezeichnet. NOS-2, die zunächst in Makrophagen gefunden wurde (MacMicking et al., 1997), tritt hingegen hauptsächlich durch Induktion auf, z. B. bei der Immunabwehr. Sie wird durch Zytokine, z. B. Interferon, oder Bakterienbestandteile, z. B. Lipopolysaccharide, induziert.

NOS-2 produziert als high-output-Enzym NO in hohen antibakteriellen Konzentrationen (Xie und Nathan, 1994).

NOS-1 und NOS-3 sind low-output-Enzyme und produzieren NO in geringen Mengen, das hauptsächlich der Signaltransduktion dient (Xie und Nathan, 1994).

Alle drei NOS-Formen benötigen zur vollen Aktivität Ca^{2+} -bindendes Calmodulin (Bredt und Snyder, 1990; Hayashi et al., 1999), dabei benötigen die konstitutiven Formen höhere Ca^{2+} -Konzentrationen als NOS-2 (Schmidt et al., 1992; Xie und Nathan, 1994).

Das Gen für die NOS-1 liegt auf Chromosom 12, das Gen für NOS-3 auf Chromosom 7. Beide Formen verfügen über eine Phosphorylierungsstelle, über die die NOS-Aktivität reguliert werden kann, z. B. durch cAMP-abhängige Proteinkinasen (Zocher et al., 1997). NOS-3 ist N-terminal in der Plasmamembran der Endothelzellen verankert.

Das Gen für NOS-2 liegt auf Chromosom 17 (Lowenstein et al., 1992).

Das von NOS 1-3 produzierte NO aktiviert die sGC zur Bildung von cGMP, das wiederum die Proteinkinase G zur Phosphorylierung von Proteinen aktiviert und in einer Vaso- und Bronchodilatation resultiert.

Der cGMP-Abbau erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDE). Es werden drei Gruppen unterschieden. Nicht-selektive PDE sind PDE 1-3, 10 und 11, sie hydrolisieren sowohl cGMP als auch cAMP. PDE 5,6 und 9a bauen spezifisch cGMP ab, dabei hat PDE 9a die höchste Affinität zu cGMP (Andreeva et al., 2001), PDE 4, 7 und 8 bauen selektiv cAMP ab.

Die Aktivität der PDE wird sowohl über die Substrat-Konzentration reguliert als auch über den Anstieg von cGMP und cAMP, Ca^{2+} , Calmodulin und über Rückkopplungs-Phosphorylierung durch cAMP-/cGMP-abhängige Proteinkinasen (Murthy, 2001).

1.5 BAY 63-2521

BAY 63-2521 (Methyl-4,6-diamino-2-(1-(2-fluorobenzyl)-1 H-pyrazolol(3,4-b)pyridin-3-yl)pyrimidin-5-ylmethylcarbamate) ist ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase. Er ist oral verfügbar und wurde von der Firma Bayer als kristalline Reinsubstanz zur Verfügung gestellt.

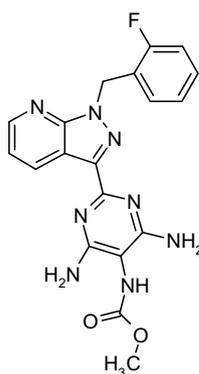


Abbildung 5: Strukturformel von BAY 63-2521. Die Halbwertszeit beträgt 10 -12 Stunden. BAY 63-2521 stimuliert die lösliche Guanylatzyklase häm-abhängig aber NO-unabhängig.

1.6 Ziel

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die therapeutische Wirkung des Guanylatzyklase-Aktivators BAY 63-2521 auf die verschiedenen pathophysiologischen und pathohistologischen Aspekte der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte untersucht werden. Es wurde außerdem die Expression der sGC immunhistochemisch in Lungen Monocrotalin-behandelter Ratten sowie in Lungenschnitten von Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie und COPD dargestellt.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Verwendet wurden männliche Ratten (*Rattus norvegicus*) des Auszuchtstammes Sprague-Dawley (Farbe albino).

Bereits 1925 entwickelte Robert W. Dawley diesen Stamm aus einer Kreuzung weiblicher Wistar-Ratten und männlicher Hybridratten (Hooded).

Zuchtbetrieb und Lieferant der Tiere ist Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, die Sprague-Dawley Ratte wird bei dieser Firma unter der Handelsbezeichnung CD[®] - Ratte geführt. Sie ist ein eingetragenes Warenzeichen. Die Ratten hatten bei Anlieferung ein Gewicht von 300-350 g mit einem Alter von etwa 8 Wochen.

Für die Dauer des Versuches wurden die Ratten im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Rhönklinik Gießen gehalten, jeweils 4 - 5 Ratten in einem Käfig. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit Altromin[®] Standarddiätfutter ad libitum.

Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall betrug ca. 12 Stunden pro Tag, die Umgebungstemperatur im Mittel 25°C.

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

Der für die Versuche geltende Tierversuchsantrag kann unter dem Aktenzeichen GI 20/ 12 Nr. 34/ 2004, Kenn- Nr. 211 eingesehen werden.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bindfaden		Coats GmbH Kenzingen, Deutschland
Combi-Stopper		Braun Melsungen, Deutschland
Dreiwegehahn	Discofix [®]	Braun Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe	SensiClean [®]	Ansell Surbiton Surrey, UK
Einmalspritzen 1 ml, 2 ml	Inject Luer [®]	Braun Melsungen, Deutschland
Kanülen 26 G (0,9 mm x 25 mm)	BD Microlance 3 [®]	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore [®]	3M St. Paul, MN, USA
Mulltupfer, 20 x 20 cm		Beese Barbüttel, Deutschland
Operationsbesteck		Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland
Perfusor-Leitung 150 cm		Braun Melsungen, Deutschland
Rattenimmobilisator	Broom Rodent Restrainer [®]	Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Trachealtubus	BD Microlance 3 15 G, gekürzt auf 1,5 cm	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland
Venenverweilkanüle 22 G und 20 G	Vasocan Braunüle [®]	Braun Melsungen, Deutschland
Wärmeunterlage	Thermo-Lux [®]	Witte und Suttor Murrhardt, Deutschland
Zellstofftupfer 5 x 4 cm	Purzellin [®]	Lohmann und Rauscher Rengsdorf, Deutschland

Zellulose - Handtücher

Tork

Mannheim, Deutschland

Zellulose - Unterlage

2.1.3 Geräte und Maschinen für die Tierpräparation

Beatmungspumpe

SAR-830/P Ventilator[®]IITH Inc. Life Science
Woodland Hills, CA, USA

Blutanalysegerät ABL 330

Radiometer

Copenhagen, Dänemark

Blutanalysegerät OSM2

Hemoximeter[®]

Radiometer

Copenhagen, Dänemark

Computer mit Monitor

Druckwandler

Combitrans Monitoring Set

Braun

Mod. II for arterial blood
pressure measurement

Melsungen, Deutschland

PET-Schläuche mit
versch.

Durchmessern

Schleuse

Intradyn[®]

Braun

Einführungsbesteck mit
venös hämostatischem
Ventil 5F

Melsungen, Deutschland

2.1.4 Injektionslösungen und Substanzen

Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml	Antisedan [®]	Pfizer Karlsruhe, Deutschland
Atropinsulfat 0,5 mg/ml		Braun Melsungen, Deutschland
Beatmungsgas	50 % O ₂ , 50 % N ₂	Air Liquid Siegen, Deutschland
Enrofloxacin Orale Lösung	Baytril 2,5 % [®]	Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland
Heparin	Liquemin N 25000 [®]	Roche Basel, Schweiz
Hydroxyethylstärke	HAES [®]	Fresenius Kabi Bad Homburg, Deutschland
Isofluran	Forene [®]	Abbott Wiesbach, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin [®]	Pharmacia Erlangen, Deutschland
Kochsalzlösung, physiolog.		Baxter S. A. München, Deutschland
Lidocainhydrochlorid 2%	Xylocain [®]	Astra Zeneca Wedel, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid	Domitor [®]	Pfizer Karlsruhe, Deutschland
Monocrotalin	Crotaline [®]	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Natronlauge 1 N		Merck Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1 N		Merck Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Gefäßmorphometrie/ Histologie

Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makros		Leica Microsystems,
Muskularisierungsgrad und Wandstärke		speziell entwickelt von Herrn Christoph Frank
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom, vollautomatisch	RM2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop, Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Vakuumgewebe- infiltrationsautomat	TP1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Anti-alpha-smooth muscle Actin, Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human	Verdünnung 1 : 1000	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von-Willebrand-faktor polyclonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1 : 1000	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Anti-guanylate cyclase β 1 subunit, soluble Rabbit anti-rat	Verdünnung 1 : 200	Cayman Chemical Company Michigan, USA

2.1.7 Histologie

Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
DAB Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Deckgläser, versch. Größen		R. Langenbrink Emmendingen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Eindeckmedium, xylol - löslich Ethanol, 70 %, 95 %, 99,6 %, vergällt Formaldehyd säurefrei	Pertex®	Merck Darmstadt, Deutschland Medite GmbH Burgdorf, Deutschland Fischer Saarbrücken, Deutschland Roth Karlsruhe, Deutschland

Histostain SP (AEC)		SF, USA
Isopropanol 99,8 %		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogen - phosphat		Merck Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot		Chroma Münster, Deutschland
Aluminiumsulfat		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methanol, reinst		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Methylgrün		Feather, Japan über Medizin AG Köln, Deutschland
Counterstain		Roth Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen S 35		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Natriumchlorid		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Normal Goat Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Normal Horse Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Normal Rabbit Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Parafilm		American National Can Menasha, Wisc. USA
Paraffineinbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Pikrinsäure		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
wässrig, gesättigt		

Resorcin Fuchsin		Chroma Münster, Deutschland
Rotihistol		Roth Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Digest All 2 [®]	Zytomed Berlin, Deutschland
Universal - Einbettkassetten mit Deckel		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Urinbecher mit Deckel 100ml		
Vectastain Elite ABC Kits anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector VIP Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%		Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol		Roth Karlsruhe, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsanordnung

Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Die gesunden Kontrolltiere erhielten eine einmalige NaCl-Injektion subkutan in den Nacken an Tag 1, die hämodynamische Messung erfolgte an Tag 35.

Die 21-Tage-Kontrolltiere erhielten an Tag 1 eine subkutane Monocrotalininjektion, die hämodynamische Messung erfolgte nach 21 Tagen.

Eine weitere Kontrollgruppe erhielt nach einmaliger Monocrotalin-Injektion an Tag 1 von Tag 21 bis Tag 35 täglich eine orale Gabe 2%-iger Methylcellulose, die dem Volumen der BAY 63-2521 Gabe der Therapiegruppe entsprach. Die hämodynamische Messung erfolgte an Tag 35.

Die Tiere der Therapiegruppe erhielten nach der einmaligen Monocrotalin-Injektion an Tag 1 von Tag 21 bis Tag 35 täglich eine orale Gabe von 10 mg/kg BAY 63-2521. Die hämodynamische Messung erfolgte ebenfalls an Tag 35.

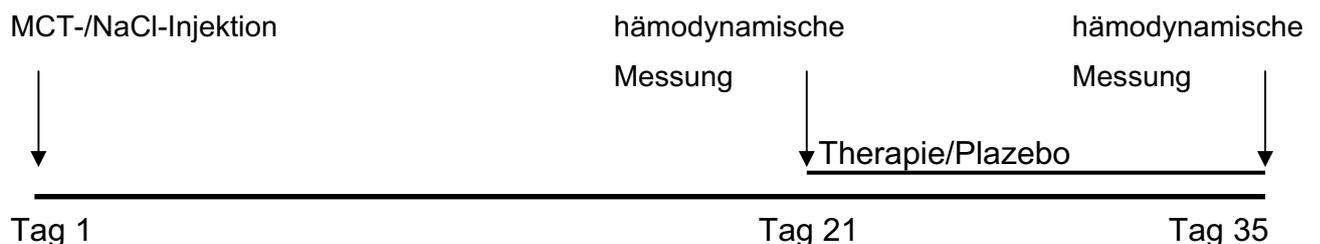


Abbildung 6: Darstellung des Versuchsaufbaues

2.2.2 Monocrotalin

250 mg kristallines Monocrotalin wurden in 3 ml 1 N Salzsäure gelöst und mit 2 ml 1 N Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 gebracht.

Die Ratten wurden in einem Glasgefäß mit einem isoflurangetränkten Tupfer zur Immobilisation gebracht, gewogen und erhielten eine subkutane Injektion von 60 mg/Kg in den Nacken. Die gesunden Kontrolltiere erhielten in gleicher Weise eine Injektion mit NaCl.

Von Tag 2 bis Tag 15 erhielten die Tiere kontinuierlich Baytril® als 2,5 %ige orale Lösung in einer Konzentration von 2 ml auf 500 ml über das Trinkwasser. Dadurch sollten entzündliche Lungenprozesse und opportunistische Begleitinfektionen verhindert werden.

2.2.3 BAY 63-2521

BAY 63-2521 wurde von der Firma Bayer als kristalline Reinsubstanz zur Verfügung gestellt. 5 g wurden in 1 ml 2%iger Methylcelluloselösung gelöst.

Die Ratten erhielten täglich ein Volumen von 2 ml/Kg oral und damit eine Dosis von 10 mg/Kg.

Die Tiere wurden dazu mit einem mit Isofluran getränkten Tupfer in einem Glasgefäß bis zur Immobilisation anbetäubt und die Suspension mit einer gebogenen Knopfkanüle direkt in die Speiseröhre eingegeben.

Die Kontrollgruppe erhielt eine tägliche orale Gabe von Methylcellulose mit dem gleichen Volumen.

2.2.4 Hämodynamische Messungen

2.2.4.1 Vorbereitung

Die Tiere wurden in einer Fixierungsröhre fixiert und erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/Kg Ketamin mit 100 µm/Kg Medetomidin.

Nach Verlust des Bewusstseins wurde der Verlust des Schmerzempfindens anhand des Corneal- und Lidreflexes, der Muskelrelaxation und der Reaktion auf mehrmaliges Kneifen in den Zwischenzehenbereich überprüft. Die Tiere wurden auf einer 40°C warmen Heizplatte in Rückenlage fixiert. Um vagovagale Reflexe während der Manipulation zu verhindern, wurden 260 µg/Kg Atropinsulfat intramuskulär injiziert.

Zur Aufzeichnung des Beatmungsdruckes und der Blutdrücke wurde das Programm Labtech Pro[®] (Labtech Notebook Runtime Version 9.02) gestartet. Die Druckaufnehmer und Schläuche wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Ausgangswerte für den systolischen arteriellen Druck, den rechtsventrikulären und den Beatmungsdruck auf 0 mmHg am Druckwandler eingestellt.

2.2.4.2 Präparation

Nachdem das Fell im Halsbereich der Tiere mit Braunollösung befeuchtet wurde, so dass später keine Haare in das Operationsfeld gelangten, wurde ventral ein Stück Haut in einer Größe von ca. 1 x 2 cm mit einer Schere entfernt. Das Gewebe wurde stumpf mit Schere und Pinzette präpariert, die freigelegte Trachea mit einer untergelegten Pinzette vorgelagert und mit einer kleinen Schere waagrecht eingeschnitten. Nach Start der Beatmungspumpe wurde der Beatmungstubus in die Trachea eingeführt und mit einem Bindfaden fixiert. Die Beatmung erfolgte mit einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugsvolumen von 3 ml. Der positiv-endexpiratorische Druck betrug 1 cm Wassersäule um ein Kollabieren der Alveolen in der mechanischen Expiration zu verhindern.

Die rechte Vena jugularis wurde stumpf freipräpariert und mit einer Pinzette von Geweberesten befreit. Anschließend wurden zwei Bindfäden untergelegt. Mit dem cranialen Bindfaden wurde die V. jugularis ligiert und mit Klebestreifen fixiert, so dass die Vene gespannt wurde. Caudal der Ligatur wurde die Vene inzidiert und die Öffnung mit einer spitzen Pinzette aufgehalten. Über einen biegsamen Führungsdraht wurden Schleuse und Mandrin eingeführt und mit dem caudalen Bindfaden fixiert, Mandrin und Führungsdraht wurden herausgezogen.

Die linke Arteria carotis wurde unter der Muskulatur freigelegt, von den benachbarten Anteilen des Nervus vagus befreit und ebenfalls zwei Bindfäden untergelegt. Die Arterie wurde durch den cranialen Bindfaden ligiert und gespannt. Caudal wurde die Arterie mit einem Arterienklipp ligiert und zwischen den Ligaturen eingeschnitten. Eine 22G Braunüle ohne Nadel wurde mit einem flexiblen Führungsdraht eingeführt, anschließend wurde der Führungsdraht entfernt und der an die Braunüle angeschlossene Dreiwegehahn geschlossen. Der Arterienklipp wurde entfernt und die Braunüle vollständig in die Arterie geschoben. Der caudale Bindfaden wurde anschließend zugezogen und am Dreiwegehahn befestigt um ein Herausrutschen der Braunüle zu verhindern.

2.2.4.3 Messung

Nachdem der arterielle und der venöse Zugang mit jeweils 250 µl Heparin, 1 : 20 mit NaCl verdünnt, gespült wurden, wurde zunächst der arterielle Druckmesser luftblasenfrei angeschlossen. An den venösen Druckabnehmer wurde der Rechtsherzkatheter angeschlossen und über die venöse Schleuse in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die Lage des Katheters konnte dabei durch die kontinuierliche Druckmessung überprüft werden. Liegt die Katheterspitze in der V. jugularis oder im rechten Vorhof zeigt sich eine typisch dreigipflige atemverschiebliche Druckkurve. Befindet sich der Katheter innerhalb des rechten Ventrikels erscheint hingegen die pulsatile Druckkurve des rechten Ventrikels mit systolischen Spitzenwerten von 20 – 25 mmHg bei gesunden Ratten.

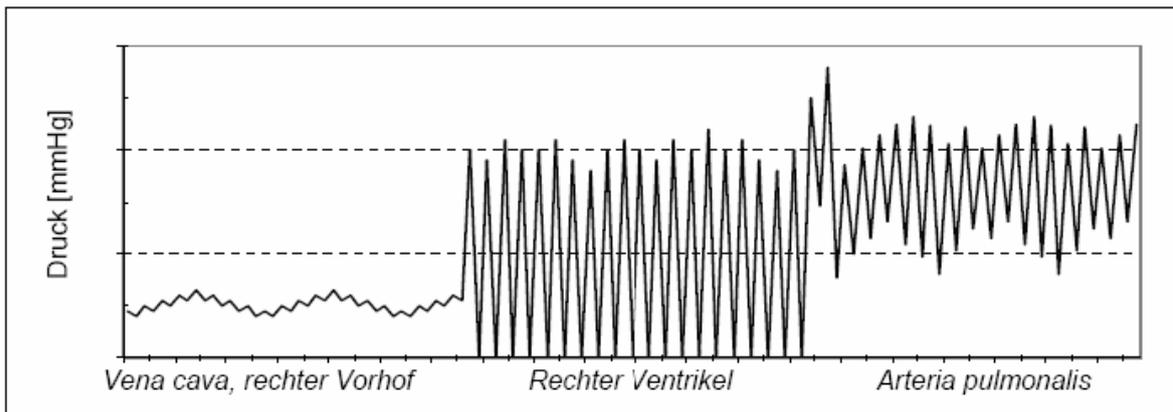


Abbildung 7: Druckkurve bei unterschiedlicher Lage des Katheters

Der Ventilationsdruck, der arterielle und der rechtsventrikuläre Druck wurden als analoge Signale durch die mit destilliertem Wasser gefüllten Druckaufnehmer registriert. Es folgte eine Verstärkung der Signale und eine Umwandlung in digitale Signale im PC. Die Aufzeichnung erfolgte durch das Programm Labtech Pro[®].

Die auf Herzhöhe angebrachten Druckaufnehmer wurden gegen den Luftdruck kalibriert und die gemessenen Werte für zehn bis zwanzig Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und gespeichert.

Nach Abschluss der Messungen wurden 400 µl arterielles Blut aus der A. carotis und 400 µl gemischtvenöses Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Die Blutproben wurden luftfrei verschlossen, auf Eis zwischengelagert und mit einem ABL 330 gemessen. Ermittelt wurden pH, pO₂ und pCO₂. Hämoglobin und O₂-Sättigung wurden mit einem OSM 2 Hemoximeter gemessen.

Aus der gemessenen arteriellen und venösen Sauerstoffsättigung und der O₂-Aufnahme konnte anschließend nach dem Fick'schen Prinzip das Herzzeitvolumen errechnet werden (Schmidt und Thews, 1995):

$$\text{HZV} = \text{Sauerstoffaufnahme} / \text{arterielle O}_2\text{-Sättigung} - \text{venöse O}_2\text{-Sättigung}$$

Zur Entnahme der Lunge wurde ein medianer Hautschnitt vom Präparationsgebiet bis zum Ende des Sternums geführt. Am Processus xiphoideus wurde die

Muskulatur durchtrennt und der Brustbeinfortsatz mit einer Klemme erfaßt und hoch gezogen, so dass das Zwerchfell gespannt wurde. Die Thoraxhöhle wurde durch Einschneiden und Herunterziehen des Zwerchfells eröffnet und das Sternum in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden mit Darmklemmen nach außen gespreizt und mit Klebeband fixiert.

Die A. pulmonalis wurde inzidiert und ein mit Kochsalz gefüllter Schlauch eingeführt. Zum Abfluß der Spüllösung wurde der linke Ventrikel angeschnitten.

Die Lunge wurde mit einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Anschließend wurde der rechte Lungenhilus mit einem Bindfaden ligiert und der rechte Lungenflügel entnommen. Er wurde für molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C verwahrt.

Die linke Lungenhälfte wurde über die A. pulmonalis mit Zambonis Fixativ, bestehend aus 2%igem Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 15% Pikrinsäure (Zamboni et al., 1967), für 5 Minuten mit einem Druck von 22 cm Wassersäule gespült, entnommen und 24 Stunden in Zambonis Fixativ aufbewahrt. Anschließend wurde die Lungenhälfte in 0,1 M PBS verbracht und bis zur Verwendung in der Histologie bei 4°C aufbewahrt.

Das Herz wurde ebenfalls entnommen, die Vorhöfe auf Klappenebene abgeschnitten und der rechte Ventrikel am Septum entlang abgetrennt. Der rechte Ventrikel und der linke Ventrikel mit Septum wurden zwei Wochen bei Raumtemperatur getrocknet und das Verhältnis des Trockengewichtes des rechten Ventrikels zum Trockengewicht des linken Ventrikels plus Septum als Index der Rechtsherzhypertrophie bestimmt.

2.2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die in Puffer eingebetteten Lungenhälften wurden mit einem Trimmmesser parallel zur Zwerchfellfläche in drei Scheiben von 3-5 mm Dicke geschnitten. Die Lungenscheiben wurden einzeln in Einbettkassetten überführt und über Nacht in einem Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert (Modell TP 1050 der Firma Leica). Anschließend wurden sie in Paraffin gegossen.

Die fertigen Paraffinblöcke wurden anschließend auf einer -5 °C kalten Kühlplatte gekühlt und 3 µm dicke Lungenschnitte erstellt. Die Schnitte wurden zur Entfaltung in ein 40°C warmes Wasserbad überführt und auf Objektträger gezogen. Nach 24 Stunden in einem Wärmeschrank mit einer Temperatur von 37°C konnten die Schnitte zu weiteren Analysen gefärbt werden.

Das humane Lungengewebe wurde durch Herrn Dr. Walter Klepetko, Universität Wien, zur Verfügung gestellt und in ca. walnußgroßen Stücken in einer 3,5 %igen Formaldehydlösung 24 Stunden fixiert. Es wurden schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten oder ihrer nächsten Verwandten eingeholt.

2.2.5.1 Elastica-Kernechtrot-Färbung

Die Lungenschnitte wurden entparaffinisiert und rehydriert und anschließend 16 Stunden in Resorcin-Fuchsin gefärbt. Nach Abspülen in destilliertem Wasser wurde mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat für 10 Minuten gegengefärbt und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und mit harzigem Medium (Pertex[®]) eingedeckt.

2.2.5.2 Immunhistochemischer Nachweis

2.2.5.2.1 Immunhistochemische Doppelfärbung (Muskularisierungsgrad)

Zwischen den Schritten wurde bei allen immunhistochemischen Färbungen mit 1 x PBS für 3 x 5 Minuten gewaschen. Nur nach der Blockierung unspezifischer Bindungen mit Serum erfolgte keine Waschung.

Die Antikörper wurden mit Histopuffer verdünnt:

PBS mit 3% bovinem Serumalbumin und 0,2% Triton X 100.

Die Schnitte wurden vor den Färbungen entparaffiniert und rehydriert, nach der Färbung dehydriert und mit harzigem Medium (Pertex[®]) eingedeckt.

15 Minuten	Block endogener Peroxidasen	20 ml 30% H ₂ O ₂ + 190 ml MetOH
10 Minuten	proteolytische Demaskierung	Trypsin Digest All [®] 1:3
45 Minuten	Block unspezifischer Bindungen mit Serum	Normal Horse Serum, Normal Goat Serum, Histopuffer; 1:1:2
30 Minuten	anti-alpha smooth muscle actin	1:1000-Verdünnung mit Histopuffer
20 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	Vectastain ABC Elite Kit horse anti-mouse
20 Minuten	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
ca. 1 Minute	Vector VIP [®]	violettes Chromogen
15 Minuten	Avidin-Reagenz	Block endogenen Avidins
15 Minuten	Biotin-Reagenz	Block endogenen Biotins
30 Minuten	anti-von Willebrand Faktor	1:1000-Verdünnung mit Histopuffer
20 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	Vectastain ABC Elite Kit goat anti-rabbit
20 Minuten	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
15 Sekunden	Vector DAB [®]	braunes Chromogen
1 Minute	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne

2.2.5.2.2 Immunhistochemische Färbung der sGC

15 Minuten	Block endogener Peroxidasen	20 ml 30% H ₂ O ₂ in 190 ml MetOH
10 Minuten	proteolytische Demaskierung	Trypsin Digest All [®] 1:3
45 Minuten	Block unspezifischer Bindungen mit Serum	Normal Horse Serum, Normal Goat Serum, Histopuffer; 1:1:2
30 Minuten	anti-sGC-β1	1:200-Verdünnung mit Histopuffer
20 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	Vectastain ABC Elite Kit horse anti-mouse
20 Minuten	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
ca. 1 Minute	AEC	braunes Chromogen
15 Minuten	Avidin-Reagenz	Block endogenen Avidins
15 Minuten	Biotin-Reagenz	Block endogenen Biotins
1 Minute	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne

2.2.5.3 Morphometrie

Für die morphometrischen Analysen wurde das Analysesystem Leica Q Win Standard Analyzing Software der Firma Leica verwendet.

Die Schnitte wurden ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen analysiert.

2.2.5.3.1 Mittlere Wandstärke

Zur Bestimmung der mittleren Wandstärke wurden die Schnitte mit Elastica-Kernechtrot gefärbt.

Pro Tier wurden 80-100 intrapulmonale Gefäße in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Gefäße wurden anhand ihres externen Querdurchmessers in Kategorien eingeteilt. Ca. 40 Gefäße pro Tier wurden in der Größenkategorie 20 - 50 µm ausgezählt, 30 - 40 Gefäße in der Kategorie 51 - 100 µm und 10 - 20 Gefäße in der Kategorie über 101 µm.

Die Mediadicke wurde definiert als der mittlere Abstand zwischen Lamina elastica interna und Lamina elastica externa, der pro Gefäß aus 3-4 Messungen ermittelt wurde.

Die mittlere Wandstärke wurde als Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers des jeweiligen Gefäßes angegeben:

Mittlere Wandstärke (%) = $(2 \times \text{Mediadicke} / \text{externer Gefäßdurchmesser}) \times 100$

2.2.5.3.2 Muskularisierungsgrad

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden die Schnitte mit immunhistochemischer Doppelfärbung gegen smooth muscle alpha actin und von Willebrand Faktor (Faktor VIII) gefärbt.

Pro Tier wurden 100 intrapulmonale Gefäße mit einem externen Gefäßdurchmesser von 25 bis 50 µm bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Bei jedem Gefäß wurde der Muskularisierungsgrad anhand des Anteils violetter (= anti - alpha smooth muscle actin positiver) Gefäßwandbereiche ermittelt. Mit Hilfe einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung durch eine von Leica speziell angefertigte Software wurden die Gefäße als voll, partiell oder nicht muskularisiert kategorisiert:

nicht muskularisiert : Anteil der smooth muscle alpha actin positiven Bereiche in der Gefäßwand $\leq 4\%$

partiell muskularisiert : Anteil der smooth muscle alpha actin positiven Bereiche in der Gefäßwand $\leq 75\%$

voll muskularisiert : Anteil der smooth muscle alpha actin positiven Bereiche in der Gefäßwand > 75 %

Neben der Wandstärke und dem Muskularisierungsgrad wurden Außendurchmesser, Innendurchmesser und Lumenfläche ermittelt und automatisch nach jeder Gefäßmessung in Excel überführt.

2.2.6 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch Varianzanalyse und dem Student-Newman-Keuls post-hoc Test für multiple Vergleiche ermittelt, ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Überlebensrate

Von den 10 Tieren der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Therapiegruppe verstarb keines, die Überlebensrate war 100 %.

Von der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe verstarben drei Tiere, zwei an Tag 25, eines an Tag 30 nach Monocrotalininjektion. Die Überlebensrate betrug somit nur 70 % (s. Abb. 8).

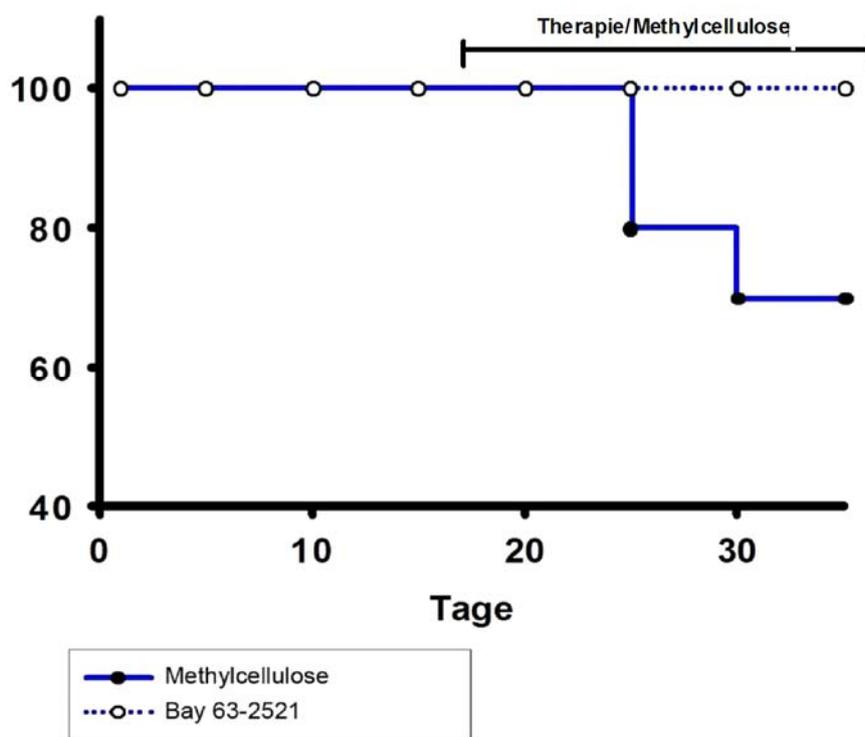


Abbildung 8: Darstellung der Überlebensrate der mit BAY 63-2521 behandelten Tiere (10 mg/Kg) im Vergleich zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe. Die Therapie erfolgte von Tag 21 bis Tag 35 nach Monocrotalininjektion und erzielte eine Überlebensrate von 100 %.

Während die Tiere der Therapiegruppe nur geringe Anzeichen einer Erkrankung zeigten (verminderter Pflgetrieb, leicht gestäubtes Fell), entwickelten die Tiere der Kontrollgruppe deutliche Anzeichen einer pulmonalen Hypertonie. Sie zeigten pumpende Atmung, Zyanose der Schleimhäute, Gesichtsoedeme und ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden (Apathie, gekauerte Haltung).

In der Sektion zeigten 2 der Tiere aus der Kontrollgruppe einen gering- bis mittelgradigen Thoraxerguß, alle Tiere der Kontrollgruppe wiesen ein hypertrophes und dilatiertes rechtes Herz auf, auch die Pulmonalarterie zeigte sich dilatiert, die V. cava cranialis und die V. jugularis waren stark gestaut, ebenso die Leber.

3.2 Nebenwirkungen

Unter der Behandlung mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 traten keinerlei Nebenwirkungen auf. Auch in der Sektion der Tiere konnten keine aus der Behandlung resultierenden pathologischen Befunde festgestellt werden.

3.3 Gewicht

Die Tiere der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Therapiegruppe wogen zu Beginn des Versuches im Mittel 430 g.

Das gemittelte Gewicht stieg bis zum 15. Tag auf ca. 444 g, bei Versuchsende wogen die Tiere im Mittel 438 g.

Die Tiere der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe nahmen bis zum 15. Tag nach MCT-Injektion ebenfalls zu, im Mittel von 435 g auf 448 g, hatten bei Versuchsende aber nur noch ein gemitteltes Gewicht von ca. 425 g.

Die Tiere der Methylcellulose-Kontrollgruppe nahmen folglich im Mittel 2,29 % ihres Körpergewichtes zum Zeitpunkt der Monocrotalininjektion ab, die Tiere der Therapiegruppe nahmen im Schnitt 1,86 % des Ausgangsgewichtes zu.

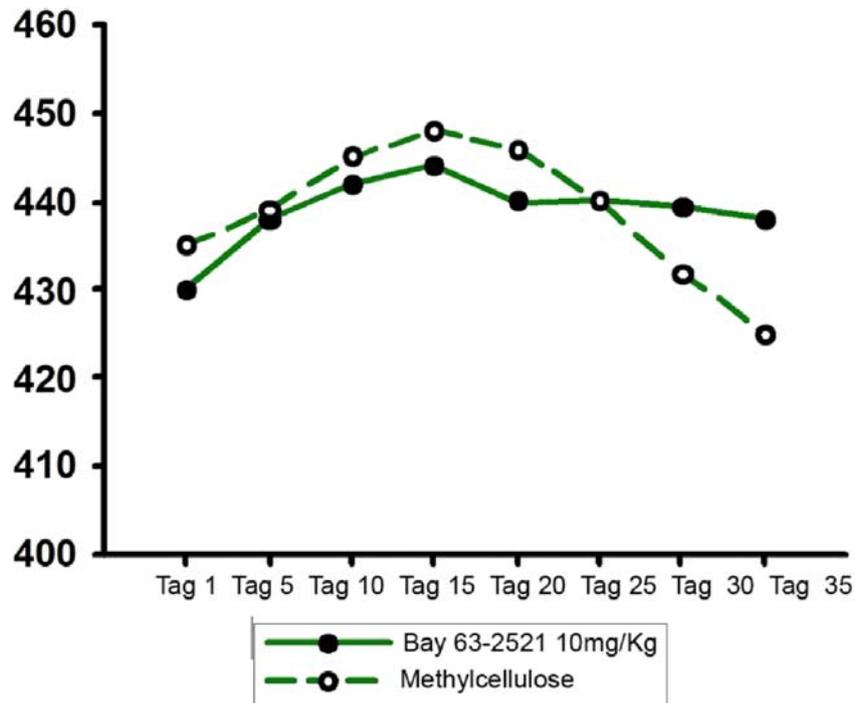


Abbildung 9: Darstellung des Gewichtsverlaufes der Tiere unter Therapie mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 im Vergleich zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe.

3.4 Systemisch - arterieller Druck

Der mittlere systemisch - arterielle Druck betrug in der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Gruppe im Mittel 112 ± 2 mmHg und unterschied sich damit nicht signifikant von den anderen Gruppen.

Die mit Methylcellulose behandelte Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Druck von 105 ± 6 mmHg, die Tiere drei Wochen nach MCT-Injektion einen Druck von 112 ± 4 mmHg. Die gesunde Kontrollgruppe zeigte im Mittel einen Druck von 121 ± 7 mmHg.

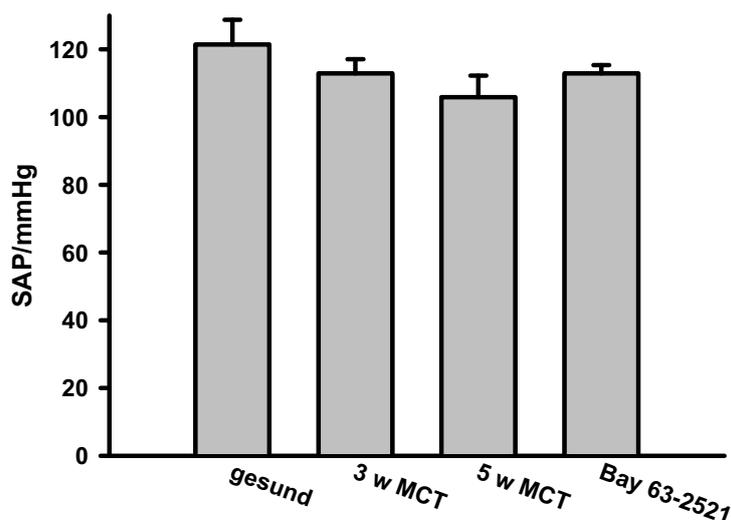


Abbildung 10: Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes bei gesunden Tieren, Tieren der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe, Tieren 21 Tage nach MCT-Injektion und Tieren der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Therapiegruppe. Die Werte der verschiedenen Gruppen zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede.

3.5 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Der Druck in der rechten Herzkammer wurde invasiv unter standardisierter Narkose gemessen, dazu wurde ein flüssigkeitsgefüllter Katheter über die rechte Jugularvene in die rechte Herzkammer geschoben und der Druck über 10 Minuten aufgezeichnet.

In gesunden Kontrollen betrug der Mittelwert des rechtsventrikulären systolischen Druckes $25,8 \pm 1,9$ mmHg.

Drei Wochen nach der Monocrotalininjektion lag der Druck bei $51,7 \pm 5,4$ mmHg.

Die Methylcellulose-Kontrollgruppe erreichte fünf Wochen nach Monocrotalininjektion einen über das dreifache gegenüber den Werten gesunder Tiere erhöhten mittleren Druck von $84,1 \pm 0,6$ mmHg, es lag eine schwere pulmonale Hypertonie vor.

Der Druck der mit BAY 63-2521 behandelten Gruppe lag fünf Wochen nach Monocrotalininjektion hingegen nur bei $55,4 \pm 2,5$ mmHg. Ein signifikanter Unterschied zu der drei Wochen-Gruppe bestand nicht mehr.

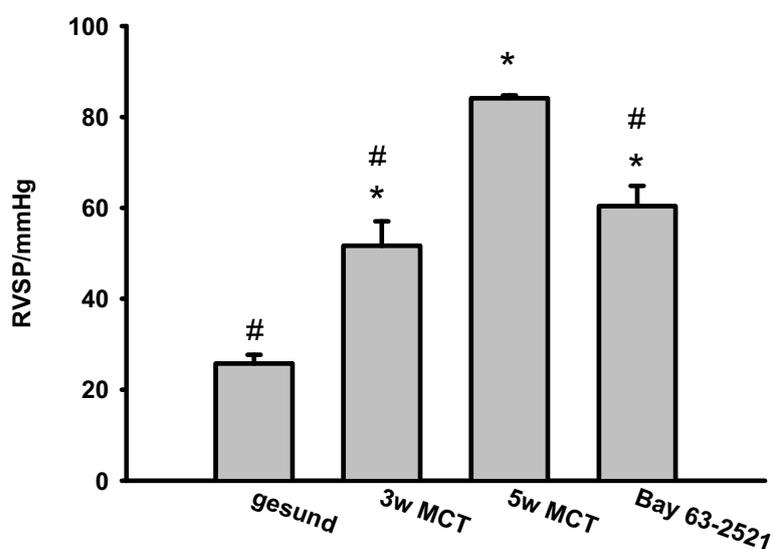


Abbildung 11: Darstellung des invasiv gemessenen rechtsventrikulären systolischen Druckes in den verschiedenen Gruppen (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

3.6 Pulmonal vaskulärer Widerstand

Der Gesamtwiderstand der Lunge (engl. total pulmonary resistance, TPR) errechnete sich aus RVSP und dem Herzzeitvolumen pro 100 g Körpergewicht. Die gesunden Tiere wiesen einen TPR von $0,91 \pm 0,05$ mmHg min/ml/100g auf, drei Wochen nach Monocrotalininjektion stieg der TPR korrelierend mit der Erhöhung des rechtsventrikulären Druckes auf $3,6 \pm 0,4$ mmHg min/ml/100g und

die Tiere der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe zeigten fünf Wochen nach Monocrotalininjektion einen TPR von $6,1 \pm 0,6$ mmHg min/ml/100g.

Die Tiere der mit 10 mg/Kg BAY 63-2521 behandelten Therapiegruppe wiesen einen TPR von $4,2 \pm 0,1$ mmHg min/ml/100g auf und zeigten damit eine signifikante Reduktion gegenüber den Tieren der Methylcellulose- Kontrollgruppe.

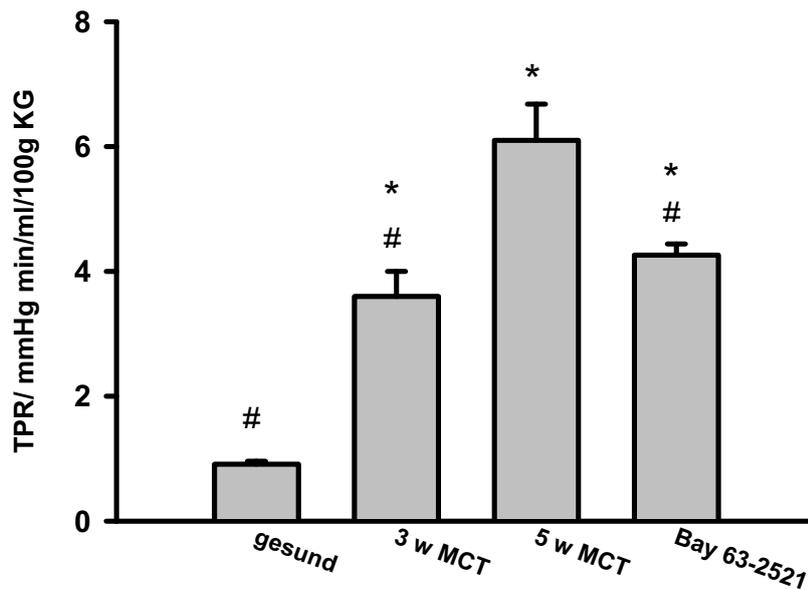


Abbildung 12: Darstellung des pulmonal vaskulären Widerstandes in den verschiedenen Gruppen. Die Tiere der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Therapiegruppe zeigten eine signifikante Reduktion des TPR gegenüber der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

3.7 Herzratio

Im Verlauf der Erkrankung entwickelten die monocrotalinbehandelten Tiere durch die erhöhte Druckbelastung des rechten Ventrikels eine Rechtsherzhypertrophie. Um die Hypertrophie quantifizieren zu können, wurde das Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zu dem linken Ventrikel plus Septum bestimmt.

Das Verhältnis betrug bei den gesunden Tieren $0,28 \pm 0,01$. Die Kontrollgruppen entwickelten drei Wochen nach der Monocrotalininjektion ein Verhältnis von $0,4 \pm 0,03$, nach fünf Wochen zeigten die mit Methylcellulose behandelten Tiere eine Ratio von $0,59 \pm 0,03$.

Die mit BAY 63-2521 behandelte Therapiegruppe wies mit $0,42 \pm 0,04$ hingegen eine signifikante Reduktion des Verhältnisses auf, korrelierend mit den niedrigen rechtsventrikulären Drücken.

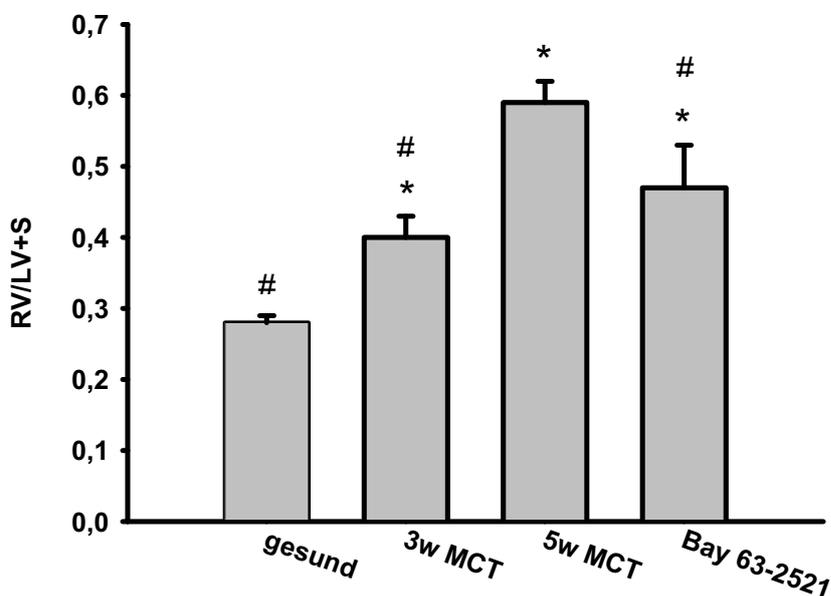


Abbildung 13: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum als Maß für die Rechtsherzhypertrophie (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

Nach Behandlung mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 machte die mittlere Wandstärke nur noch $22,8 \pm 0,9$ % des externen Gefäßdurchmessers aus und zeigte somit eine signifikante Reduktion gegenüber der Werte der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe.

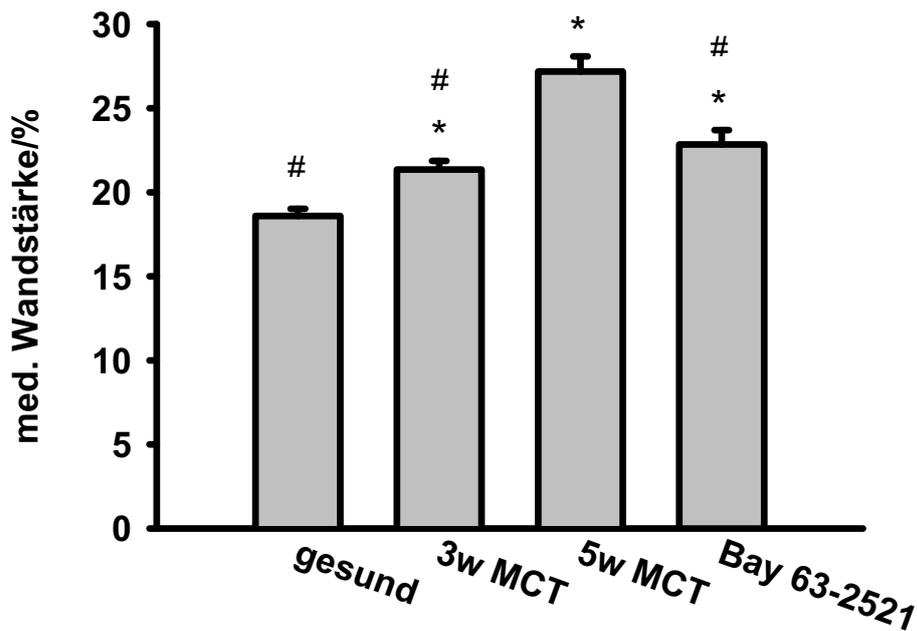


Abbildung 15: Darstellung der Wandstärke der kleinen ($< 50 \mu\text{m}$) pulmonalen Gefäße in Prozent des externen Gefäßdurchmessers (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

In den mittelgroßen Pulmonalarterien (51 - 100 μm Durchmesser) sank die mittlere Wandstärke nach Therapie mit BAY 63-2521 ebenfalls. Fünf Wochen nach Monocrotalininjektion zeigten die Ratten nach Therapie mit 10 mg/Kg BAY 63-2521 nur noch eine mittlere Wandstärke von $20,3 \pm 0,6$ % im Gegensatz zu $23,9 \pm 0,9$ % in der Methylcellulose-Kontrollgruppe, der Unterschied war signifikant.

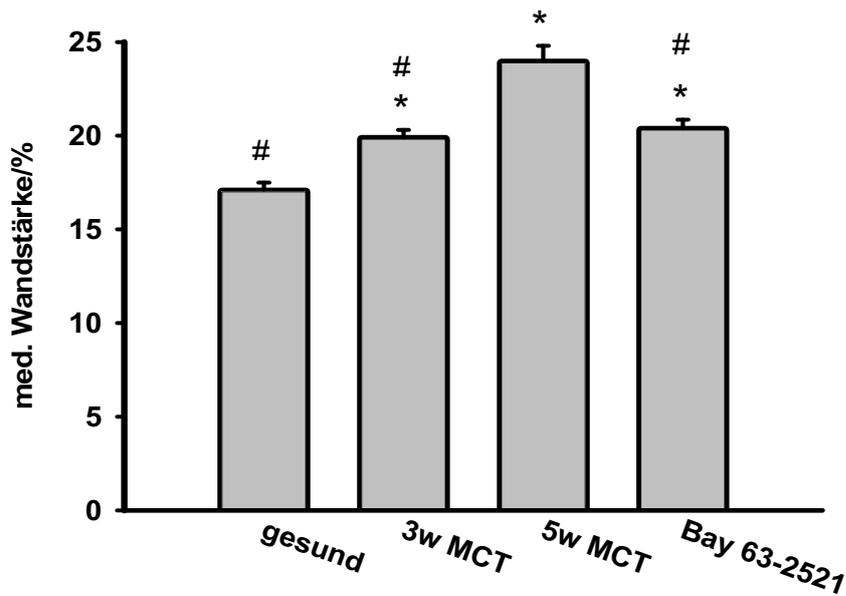


Abbildung 16: Darstellung der Wandstärke der mittelgroßen (50 - 100 µm) pulmonalen Gefäße in Prozent des externen Gefäßdurchmessers (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

Der Effekt war in den großen Pulmonalarterien (> 100 µm Durchmesser) weniger deutlich zu beobachten, allerdings spielen sich die Vorgänge des Remodellings vor allem in den kleineren Pulmonalgefäßen ab.

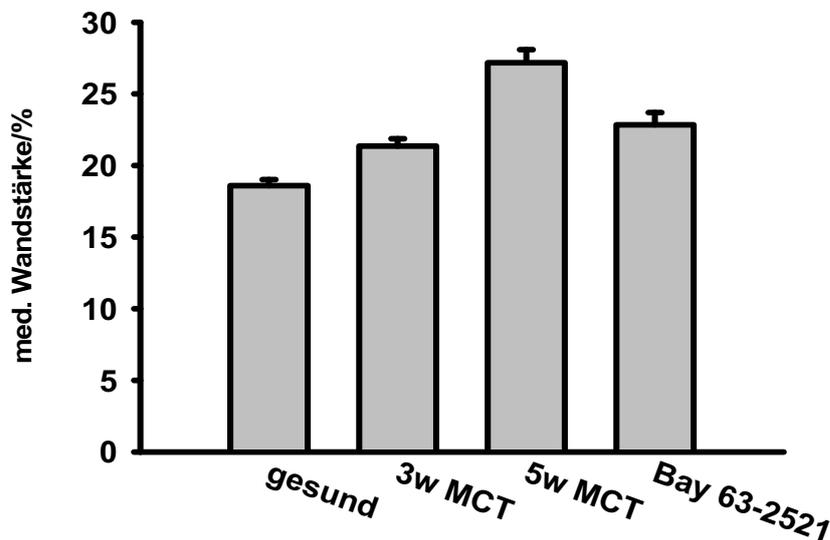


Abbildung 17: Darstellung der Wandstärke der großen (> 100 µm) pulmonalen Gefäße in Prozent des externen Gefäßdurchmessers.

3.8.2 Muskularisierungsgrad

Die Lungenschnitte wurden immunhistochemisch doppelgefärbt. Die immunhistochemische Peroxidase-Färbung gegen das alpha-actin der glatten Muskelzellen wurde mit einem violetten Chromogen entwickelt (Vector VIP[®]), die gegen den endothelialen von Willebrand Faktor wurde mit einem braunen Chromogen entwickelt (Vector DAP[®]). So konnte der Muskularisierungsgrad der einzelnen Gruppen sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Im Verlauf der Erkrankung nach Monocrotalininjektion fand eine verstärkte Muskularisierung der arteriellen Lungengefäße statt.

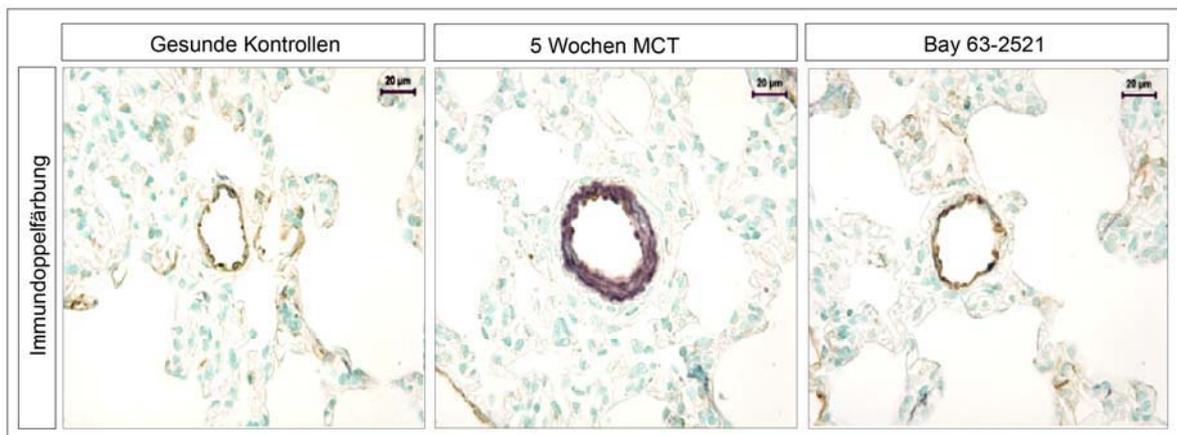


Abbildung 18: Darstellung der immunhistochemisch doppelgefärbten Gefäße gegen vWF (braune Färbung) und alpha-actin (violett) in den verschiedenen Gruppen.

Untersucht wurde der Muskularisierungsgrad der kleinen Lungengefäße zwischen 25 und 50 µm. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines der Firma Leica entwickelten Computerprogrammes, mit dem der Anteil der Braunfärbung (= alpha-actin/glatte Muskulatur) an der Gefäßwand bestimmt wurde. Pro Tier wurden jeweils 100 periphere Lungenarterien morphometrisch analysiert.

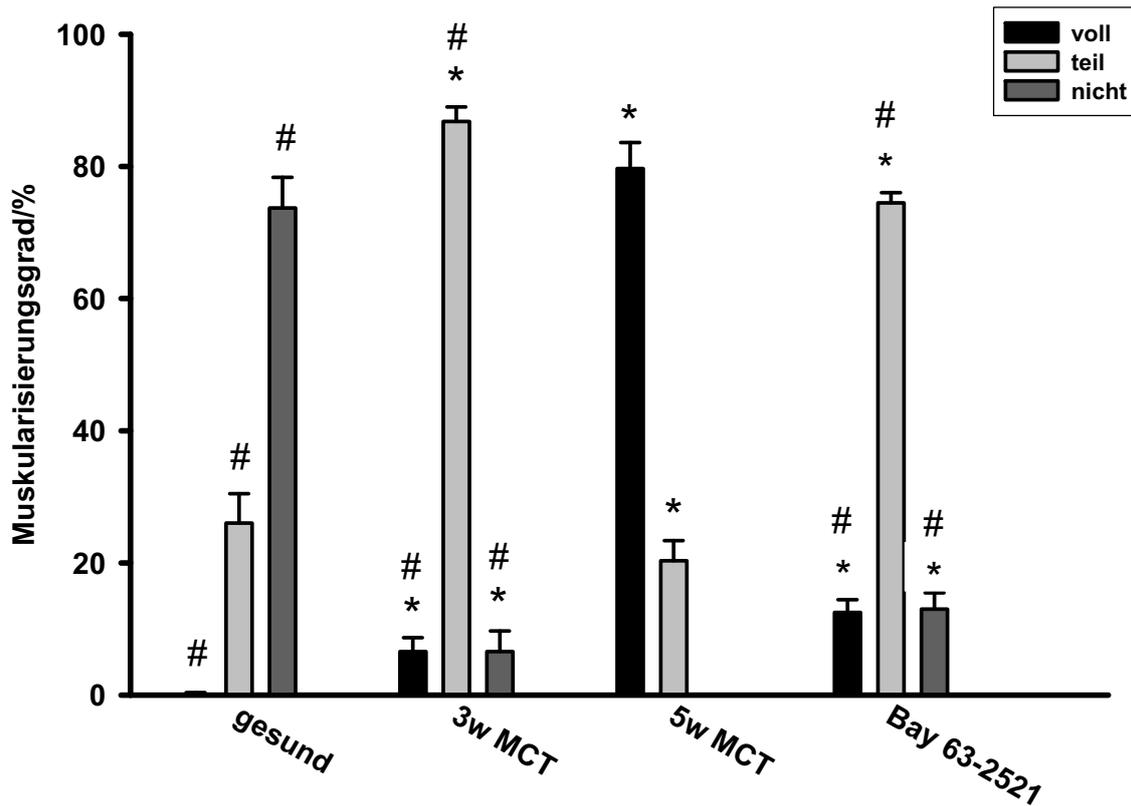


Abbildung 19: Darstellung des prozentualen Anteils nicht, voll und teil muskularisierter Gefäße in den einzelnen Gruppen. Pro Tier wurden jeweils 100 pulmonale Gefäße mit einem Durchmesser von 25 - 50 μm morphometrisch analysiert.
(* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 5 w MCT).

Die gesunden Kontrolltiere zeigten in über 2/3 der Gefäße keine Muskularisierung ($73,2 \pm 4,6$ %), zu $26,0 \pm 4,5$ % teil muskularisierte Gefäße und nur $0,2 \pm 0,18$ % voll muskularisierte Gefäße.

Der Anteil der nicht muskularisierten Gefäße nahm im Verlauf der Erkrankung stark ab. Die Tiere zeigten drei Wochen nach der Monocrotalininjektion einen viel geringeren Anteil nicht muskularisierter Gefäße ($6,6 \pm 2,1$ %), der Anteil der teil muskularisierten Gefäße betrug $86,8 \pm 2,2$ %, der der voll muskularisierten Gefäße hingegen $6,6 \pm 3,1$ %. Die Tiere der Methylcellulose-Kontrollgruppe wiesen fünf Wochen nach Monocrotalininjektion keine nicht muskularisierten Gefäße mehr auf,

der Anteil der teil muskularisierten Gefäße lag bei $20,3 \pm 3,0 \%$, die voll muskularisierten Gefäße überwogen mit $79,7 \pm 3,9 \%$.

Die Therapie mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils der voll muskularisierten Gefäße.

Fünf Wochen nach Monocrotalininjektion zeigten die behandelten Tiere $12,5 \pm 1,9 \%$ voll muskularisierte Gefäße, $74,5 \pm 1,5 \%$ teil muskularisierte Gefäße und wieder einen Anteil nicht muskularisierter Gefäße ($13,0 \pm 2,5 \%$).

3.9 Expression der sGC in humanen Lungen und Rattenlungen

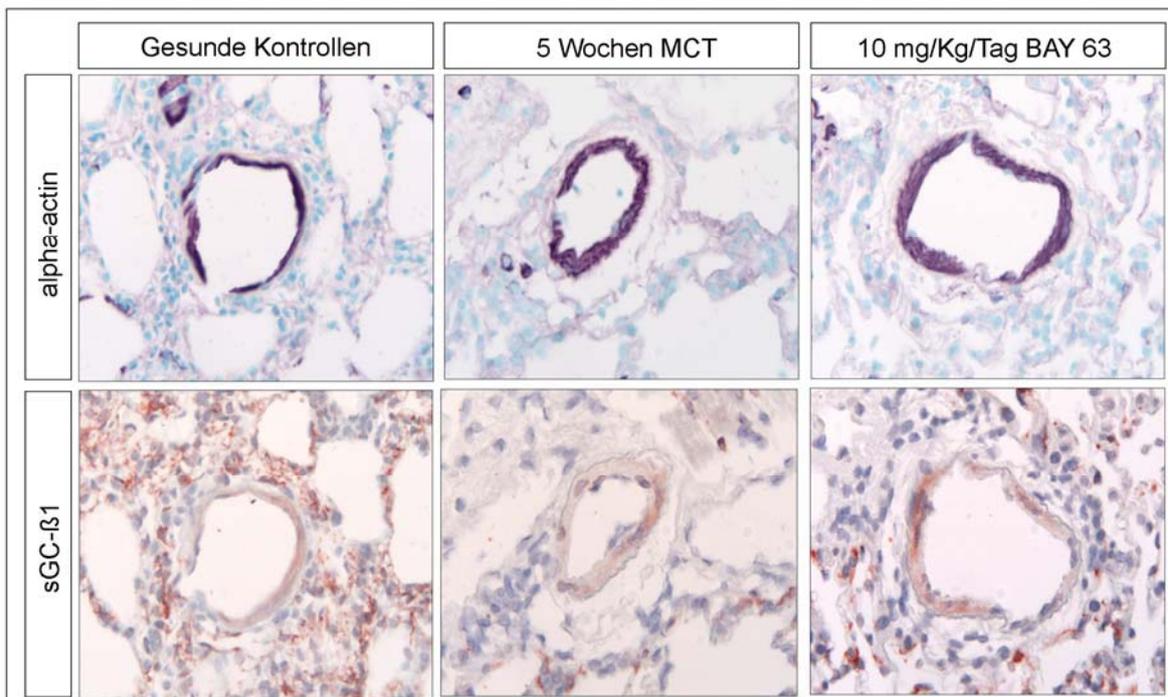


Abbildung 20: Darstellung der immunohistochemischen Färbungen von anti alpha actin (obere Reihe) und anti sGC-β1 (untere Reihe) in gesunden Ratten, fünf Wochen nach MCT-Injektion und nach Therapie mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521.

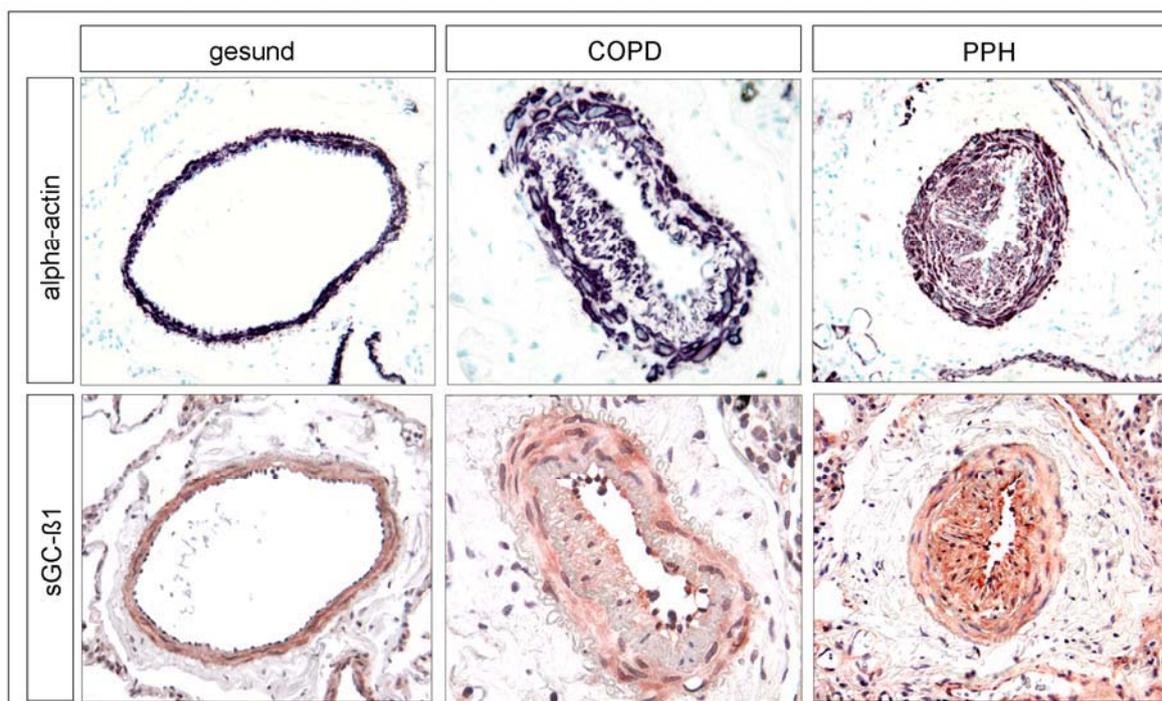


Abbildung 21: Darstellung der immunhistochemischen Färbungen von anti alpha actin (obere Reihe) und anti sGC- β 1 (untere Reihe) in gesunden Spenderlungen, COPD- und PPH-Patienten.

Es wurden Serienschnitte der Lungen gesunder, mit 10 mg/Kg BAY 63-2521 behandelter und mit Methylcellulose behandelter Tiere erstellt. Zwei Folgeschnitte jeder Gruppe wurden zum einen mit einem Antikörper gegen smooth muscle alpha actin, zum anderen mit einem Antikörper gegen die β 1-Untereinheit der sGC nach den oben angegebenen Protokollen gefärbt. Ebenso wurde mit humanen Lungenschnitten von gesunden Spendern, PAH- und COPD-Patienten verfahren. Die violette Färbung entstand durch Entwicklung des alpha actin Antikörpers mit VIP, die Braunfärbung durch die AEC - Entwicklung des sGC- β 1 Antikörpers. Es zeigte sich sowohl in den humanen Lungen als auch in den Rattenlungen eine deutliche Expression der sGC in den Bereichen der glatten Gefäßmuskulatur.

4 DISKUSSION

4.1 Stickstoffmonoxid

Die NO-Signalkaskade ist bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts bei Herz-Kreislaufkrankungen ein therapeutischer Angriffspunkt, zum Beispiel durch den NO - Donator Glyceroltrinitrat, ohne dass der Wirkungsmechanismus bekannt war. Auch in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie stellt NO schon seit langem einen Hauptangriffspunkt dar.

Die lokale NO-Produktion von Endo- und Epithel reguliert die Lungendurchblutung in Abhängigkeit von der Ventilation um ein optimales Ventilations-Perfusions-Verhältnis zu schaffen (Ghofrani et al., 2004; Grimminger et al., 1995; Ide et al., 1999), in PAH-Patienten scheint diese endotheliale NO-Synthese herunterreguliert zu sein (Giaid und Saleh, 1995).

Die direkte Inhalation von NO ist zwar in der Lage, den pulmonalarteriellen Druck zu verringern und den Gasaustausch zu verbessern, allerdings limitiert die kurze Halbwertszeit des Moleküls und der Reboundeffekt die Effizienz dieser Verabreichungsmethode (Ichinose et al., 2004), zudem zeigen sich starke individuelle Schwankungen in der körperlichen Antwort auf inhaliertes NO.

Eine bessere Möglichkeit in den NO-Signalweg einzugreifen ist deshalb die Verstärkung des endogenen NO-Signals, so hemmt beispielsweise der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil (Viagra[®]) den Abbau von cGMP und imitiert so die NO-Wirkung (Ghofrani et al., 2004).

Andere Behandlungsstrategien basieren auf einer systemischen Vasodilatation, wodurch der Blutdruck im Lungen- und Körperkreislauf gleichermaßen gesenkt wird. Diese nicht pulmonal-selektiven Vasodilatoren können jedoch zu einem lebensbedrohenden Blutdruckabfall führen, zudem können sie in Fällen von bereits fortgeschrittener proliferativer Vaskulopathie den intrapulmonalen Gasaustausch und das Herzzeitvolumen verschlechtern (Rubin, 1997).

Die immunhistochemischen Färbungen haben gezeigt, dass sGC- β 1 sowohl in der vaskulären glatten Muskulatur der Rattenlunge als auch in der humanen Lunge exprimiert wird.

Schermuly et al. zeigten 2008 eine Hochregulation der sGC sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in humanen IPAH-Lungen gegenüber Lungen gesunder Spender. Gleiche Ergebnisse fanden sich im Gewebe von Rattenlungen nach Monocrotalininjektion und Li et al. zeigten 1999 eine erhöhte sGC-Expression nach Hypoxie in der Rattenlunge.

Somit bietet die lösliche Guanylatzyklase einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie.

4.2 NO und oxidativer Stress

NO besitzt potente vasodilatative Eigenschaften, dennoch wird die Rolle von NO bei der pulmonalen Hypertonie unterschiedlich diskutiert.

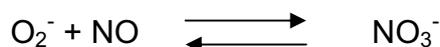
Einige Autoren gehen von einer verminderten NO-Synthese bei Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie aus, so zeigten Giaid et al. 1995 eine verminderte Expression der eNOS im Lungengewebe von PH-Patienten und damit einen resultierenden geringen NO-Gehalt in den betroffenen Lungen.

Pulamsetti et al. zeigten 2005 eine verstärkte Expression des endogenen NOS-Inhibitors ADMA in Lungen von PAH-Patienten. Liu et al. zeigten 2006 eine Senkung des rechtsventrikulären Druckes nach eNOS-Gentherapie.

Doch selbst wenn die NO-Synthese nicht beeinträchtigt ist, ist die Bioverfügbarkeit des synthetisierten NO fraglich. Bowers et al. zeigten 2003, dass sich eine an PH erkrankte Lunge unter oxidativem Stress befindet.

Oxidativer Stress ist durch das vermehrte Auftreten von reaktiven Oxidantien (ROS, reactive oxygen species) charakterisiert, gleichzeitig kann die Synthese antioxidantisch wirkender Enzyme vermindert sein. Zu den ROS gehören u. a. Superoxide und Hydrogenperoxide, sie schädigen das Gewebe direkt oder über die Oxidation wichtiger Moleküle (Lipide, DNS, Transkriptionsfaktoren).

Da das Superoxid (O_2^-) mit NO zu Nitrat (NO_3^-) reagiert



kann folglich selbst bei einer genügenden Bereitstellung von NO der Nutzen für das Gewebe unter oxidativem Stress gering sein.

Die Wirkung von BAY 63-2521 ist jedoch NO-unabhängig (Schermuly et al., 2008), der positive Nutzen für den Patienten ist also unabhängig von seiner körpereigenen Bereitstellung von NO.

Damit ist BAY 63-2521 den vielgenutzten PDE 5 - Hemmern überlegen. Während PDE 5 - Hemmer wie Sildenafil lediglich als „Restlichtverstärker“ die durch das körpereigen gebildete NO angestoßene Signalkette verstärken indem der cGMP - Abbau verhindert wird, kann BAY 63-2521 die Kaskade NO-unabhängig anstoßen. Eine Kombination beider Substanzen wäre somit eine ideale Möglichkeit in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie.

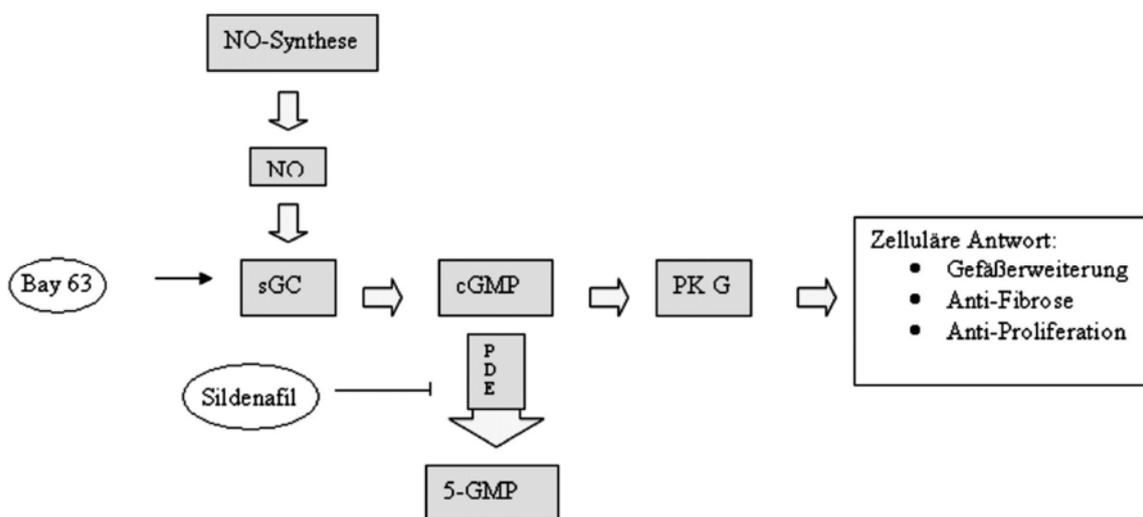


Abbildung 22: Signaltransduktionsweg von NO im kardiovaskulären System.

Sildenafil hemmt den Abbau von cGMP durch die Phosphodiesterase, BAY 63-2521 stimuliert die cGMP-Bildung durch die Guanylatzyklase. Beide Stoffe imitieren so die NO-Wirkung.

Evgenov et al. zeigten 2006, dass die sGC sowohl in der oxidierten als auch in der reduzierten Form vorliegen kann (s. Abb.23). In der oxidierten Form beinhaltet die Häm-Gruppe der sGC ein dreiwertiges Eisenmolekül.

Es wird vermutet, dass die sGC unter oxidativem Stress in die oxidierte Form übergeht, da unter oxidativem Stress auch eine Lipidperoxidation bekannt ist (Fahrahmand, 2004; Cracowski, 2001).

Auch werden unter hypoxischen Bedingungen vermehrt ROS produziert (Weissmann et al., 2006).

Abhängig davon, ob eine Substanz auch nach Oxidation oder Entfernung der Häm-Gruppe der sGC ihre Wirkung behält, werden die häm-abhängigen Stimulatoren von den häm-unabhängigen Aktivatoren der sGC unterschieden. Die erste Gruppe beinhaltet YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543, A-350619 und CFM-1571. Diese Substanzen synergieren mit NO und verlieren ihre Wirkung nach Oxidation oder Entfernung der Häm-Gruppe der sGC. Die zweite Gruppe beinhaltet Substanzen wie BAY 58-2667 und HMR-1766, die weder NO noch Häm benötigen (Evgenov et al., 2006).

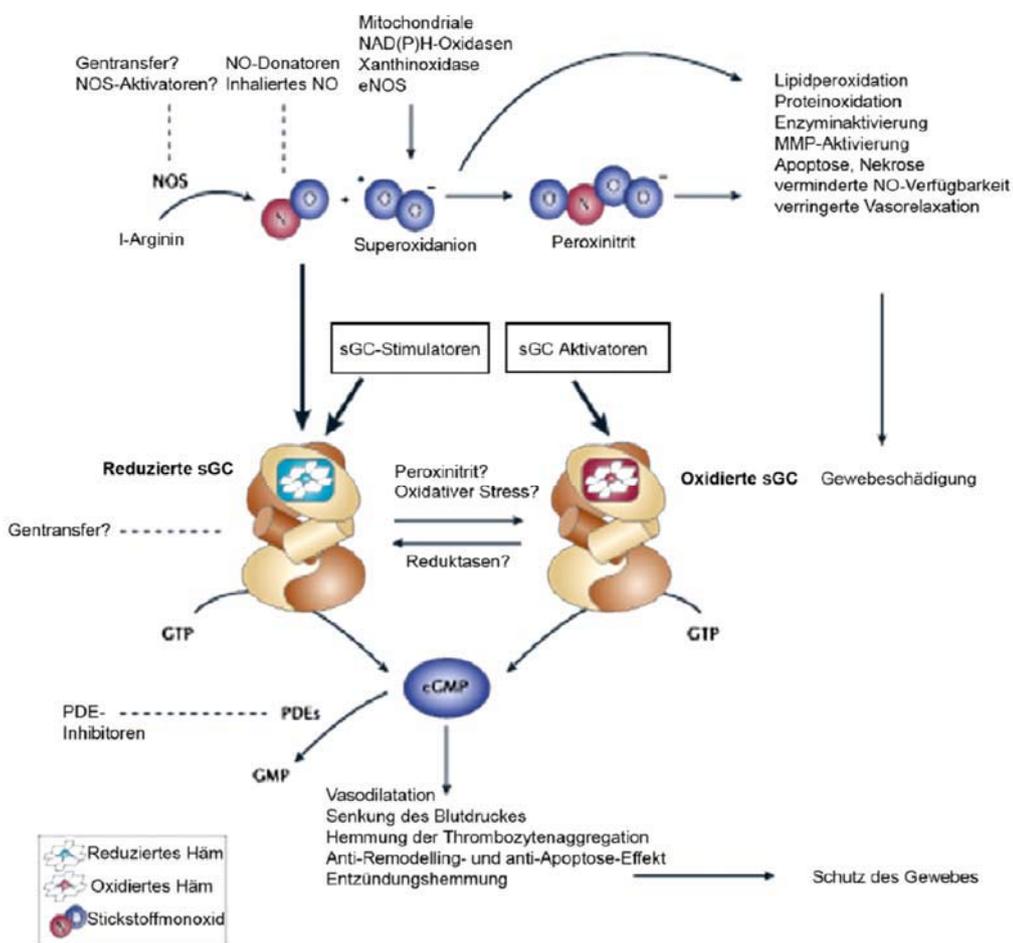


Abbildung 23: Darstellung der reduzierten und der oxidierten Form der sGC.

Nach Oxidierung der sGC, z. B. durch ODQ, kann BAY 63-2521 im Gegensatz zu sGC-Aktivatoren wie BAY 58-2667 die sGC nicht mehr stimulieren. Modifiziert nach Evgenov et al., 2006.

In vitro zeigten Schermuly et al. 2008, dass BAY 63-2521 dosisabhängig (0,1 μ M - 100 μ M) zu einer 2-60 -fachen Stimulation der sGC führt. Die NO freisetzende Substanz DEA/NO führte alleine zu einer 25-fachen Stimulation der sGC, in Kombination mit BAY 63-2521 bis zu einer 112-fachen Stimulation.

Die Stimulation der sGC durch BAY 63-2521 konnte nahezu vollständig durch den sGC-Hemmer ODQ blockiert werden. ODQ oxidiert die prosthetische Häm-Gruppe der sGC, folglich ist BAY 63-2521 ein NO-unabhängiger, aber häm-abhängiger Stimulator der sGC und gehört so in die Gruppe der häm-abhängigen sGC-Stimulatoren.

Bisher ist die Frage unbeantwortet, ob die sGC bei der pulmonalen Hypertonie tatsächlich in der oxidierten Form vorliegt, unabhängig davon ist die Wirkung von BAY 63-2521 jedoch deutlich. BAY 63-2521 war in der Lage, den chronischen pulmonalen Hochdruck im Monocrotalinmodell der Ratte zu senken. Der rechtsventrikuläre Druck sank unter Therapie mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 signifikant gegenüber der mit Methylcellulose behandelten Gruppe. Während die Kontrollgruppe fünf Wochen nach der Monocrotalininjektion einen mittleren Druck von $84,1 \pm 0,6$ mmHg aufwies, zeigte die Therapiegruppe einen signifikant niedrigeren rechtsventrikulären Druck von $55,4 \pm 2,5$ mmHg. Der Unterschied zur Kontrollgruppe drei Wochen nach Monocrotalininjektion war damit nicht mehr signifikant.

Das Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zu linkem Ventrikel plus Septum wurde als Indikator für eine Hypertrophie des rechten Herzens herangezogen und war in der Therapiegruppe signifikant niedriger gegenüber der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe. Übereinstimmend mit den niedrigen rechtsventrikulären Drücken war auch hier der Unterschied zu der Kontrollgruppe nur drei Wochen nach MCT-Injektion nicht mehr signifikant.

Die Überlebensrate und der Gewichtsverlauf bestätigten die gute Verfassung der therapierten Tiere.

100 % der mit 10 mg/Kg/Tag BAY 63-2521 behandelten Tiere überlebten, im Gegensatz zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe, die eine Mortalität von 30 % aufwies.

Im Monocrotalinmodell zeigt sich mit zunehmender Ausprägung der Krankheitssymptome eine Gewichtsabnahme. So reduzierte sich das mittlere Gewicht in der Kontrollgruppe im Vergleich zu Versuchsbeginn um über 2 %, obwohl sich die Tiere in der Wachstumsphase befanden. Die Therapiegruppe zeigte keine Gewichtsreduktion, das Gewicht war bei Versuchende sogar 1,8 % höher als zu Versuchbeginn.

Zusammenfassend lässt sich in Anlehnung an die WHO - Klassifikation (s.u.) die Verbesserung des klinischen Zustandes der Tiere um 1-2 Klassen einordnen.

Da sich der mittlere systemisch-arterielle Druck in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterschied, hat BAY 63-2521 folglich keine systemisch vasodilatative Wirkung. Die Verringerung des rechtsventrikulären Druckes ging nicht auf eine Senkung des pulmonalen Widerstandes durch eine allgemeine Vasodilatation sondern auf den direkten Effekt von BAY 63-2521 auf die Gefäßwände der Lunge zurück.

Das „reverse Remodelling“ zeigte sich in der Histomorphometrie. Sowohl der Muskularisierungsgrad als auch die Wandstärke der pulmonalen Gefäße unterschieden sich in der Therapiegruppe signifikant von der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe.

Die Wandstärke verringerte sich in den durch das Remodeling am stärksten betroffenen kleinen und mittelgroßen Gefäßen und unterschied sich nicht mehr signifikant von den Tieren nur drei Wochen nach Monocrotalininjektion.

Auch der Anteil nicht muskularisierter Gefäße stieg unter Therapie signifikant, der Anteil der voll muskularisierten Gefäße sank.

Da der Widerstand der Lunge u.a. aus Vasokonstriktion und Remodelling resultiert, sank auch der totale pulmonale Widerstand unter Therapie mit BAY 63-2521 deutlich.

Korrelierend mit den guten Ergebnissen im Monocrotalinmodell der Ratte zeigten Schermuly et al. 2008, dass auch in den hämodynamischen Messungen am Ganztier bei unter chronischer Hypoxie gehaltenen Mäusen vergleichbare Ergebnisse. Auch hier wies der systemisch-arterielle Druck keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Kontrolltieren auf, aber in einer Dosierung von 10 mg/Kg/Tag von Tag 21 bis 35 senkte BAY 63-2521 den rechtsventrikulären Druck signifikant.

Die kontinuierlichen telemetrischen Messungen des rechtsventrikulären Druckes an wachen Mäusen unter chronischer Hypoxie zeigten ebenso eine Drucksenkung nach Therapie mit BAY 63-2521, die Herzfrequenz änderte sich dabei nicht.

Die Genexpression von TGF- β und ANF stieg unter der chronischen Hypoxie an und sank unter Therapie. TGF- β ist ein proliferationsfördernder Faktor (Clark et al., 1997), der sowohl beim Remodelling der pulmonalen Gefäße als auch bei der Rechtsherzvergrößerung eine Rolle spielt. ANF wirkt diuretisch und wird von den Herzohren bei erhöhter Volumenbelastung ausgeschüttet. Die Abnahme beider Faktoren spiegelt die deutlich verbesserte körperliche Situation unter Therapie wider.

4.3 Tiermodell

Unter den bestehenden Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie ist das Monocrotalinmodell der Ratte am ehesten geeignet, den klinischen Verlauf der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen zu imitieren. Ratten zeigen 4 Wochen nach Monocrotalininjektion eine pulmonale Hypertonie der Klasse II - III nach NYHA -Einteilung für die PH des Menschen:

Klasse I	keine Limitierung der normalen körperlichen Aktivität
Klasse II	keine Beschwerden in Ruhe, normale körperliche Aktivität führt zu Dyspnoe oder Ermüdung
Klasse III	keine Beschwerden in Ruhe, aber schon leichteste körperliche Aktivität führt zu Beschwerden
Klasse IV	Beschwerden schon in Ruhe möglich, Unfähigkeit zu körperlicher Aktivität

6 Wochen nach Monocrotalininjektion zeigen die Tiere auch bei Ruhe deutliche Zeichen von Dyspnoe, jegliche Bewegung wird vermieden (NYHA IV). Periphere Ödeme und Zyanose treten als Anzeichen von Rechtsherzinsuffizienz auf, 50 % der Tiere versterben zu diesem Zeitpunkt. Der rechtsventrikuläre Druck erreicht zum Teil Werte über 100 mmHg, viele Tiere entwickeln Thoraxergüsse.

Die pathognomonischen Gefäßveränderungen im Verlauf der pulmonalen Hypertonie des Menschen spiegelt das Monocrotalinmodell hingegen nicht wider. Während im MCT-Modell der Ratte die Endothelschäden und die nachfolgende Permeabilitätserhöhung den initiierenden Mechanismus darstellen (Valdivia, 1967; Sugita, 1983; Wilson, 1989; Tanaka, 1996), steht bei der humanen PAH die Dysfunktion der Endothelzellen im Vordergrund (Voelkel, Tuder, 1995).

Eine Fragmentierung der internen elastischen Lamina im MCT-Modell durch veränderte Elastin- und Kollagensynthese (Todorovich-Hunter, 1988, 1992) sieht man in der humanen PAH hauptsächlich im Zusammenhang mit kongenitalen Herzerkrankungen (Rabinovitch, 1986).

Entzündungen finden sich sowohl im MCT-Modell als auch bei der menschlichen PAH vorwiegend perivaskulär, darüber hinaus bei der Ratte interstitiell (Wilson, 1989; Stenmark, 1985), beim Menschen im Bereich der plexiformen Läsionen (Caslin, 1990; Tuder, 1994; Dorfmueller, 2003), die bisher in keinem gängigen Tiermodell gefunden wurden. Die Entzündungen sind vorwiegend mononukleär, bei der Ratte findet sich zudem eine Mastzellhyperplasie (Miyata, 2000; Valdivia, 1967). Eine Thrombosierung findet sich bei beiden Erkrankungen, bei der Ratte zeigen sich intravaskuläre Thromben (Allen, 1970; Lalich, 1977; Hayashi, 1984). Roth (1988) und Schultze (1998) zeigten eine Verminderung der MCT-PAH bei plättchendefizienten Ratten. Bei der humanen IPAH zeigen sich zirkulierende Plättchenaggregate (Lopes, 1993), Wagenvoort zeigte 1993 in situ Thrombosen in PH Läsionen.

Cor pulmonale, Neo-Muskularisierung peripherer Arterien und Mediahypertrophie (Meyrick & Reid 1980) sind sowohl im MCT-Modell als auch bei der humanen PAH pathognomonisch.

Die PH des Menschen ist im Gegensatz zu der in diesem Modell erzeugten PH der Ratte überwiegend nicht toxininduziert. Trotzdem ist zu berücksichtigen, dass im Monocrotalinmodell das Toxin nur den initiierenden Anstoß darstellt, das Monocrotalin ist nach 24 Stunden nahezu vollständig ausgeschieden (Hayashi et al., 1967), die Erkrankung erhält sich in einem fortschreitenden Prozess selbst aufrecht. Weiterhin bestehen im Rattenmodell keine Möglichkeiten, Pathomechanismen durch speziell genveränderte Tiere zu charakterisieren, wie dies bei Mäusen möglich ist.

Das Monocrotalinmodell der Ratte wurde für die vorliegende Arbeit gewählt, weil es eine leicht induzierbare, schwere und gut reproduzierbare pulmonale Hypertonie hervorruft, die mit der pulmonalen Hypertonie des Menschen viele pathohistologische und pathophysiologische Gemeinsamkeiten aufweist.

Entscheidend für den Versuchsverlauf und die spätere Aussagekraft der Ergebnisse war der Zeitpunkt des Therapiebeginns innerhalb des Monocrotalinmodelles. Es wird der präventive Ansatz, bei dem die Therapie mit der Schädigung (Verabreichung des Monocrotalins) beginnt, von einem kurativen Ansatz unterschieden. Der kurative Ansatz sieht eine Therapie nach bereits eingetretener Erkrankung vor. In der Literatur finden sich eine Vielzahl verschiedener Zeitpunkte des Therapiebeginns zur Überprüfung der Wirkung verschiedenster Substanzen im Monocrotalinmodell, der häufigste Zeitpunkt liegt zwischen 14 und 21 Tagen nach Monocrotalininjektion.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Therapie mit BAY 63-2521 21 Tage nach Monocrotalingabe begonnen. Zu diesem Zeitpunkt liegen bereits Symptome eines pulmonalen Hochdruckes vor, histopathologisch sind Veränderungen an den pulmonalen Gefäßen bereits erkennbar.

Es liegt also ein kurativer Ansatz vor, der mit der Situation des humanen Patienten, bei dem die Therapie ebenfalls erst nach Auftreten erster Symptome beginnt, gut vergleichbar ist.

4.4 Klinische Perspektive

Ghofrani et al. stellten auf der Internationalen cGMP-Konferenz 2007 eine Studie vor, die die Sicherheit, die Tolerabilität und den möglichen therapeutischen Nutzen von BAY 63-2521 an PH-Patienten untersuchte.

19 Männer und Frauen zwischen 18 und 80 Jahren mit einer diagnostizierten PAH, einer chronisch thromboembolischen PH oder einer PH durch eine interstitielle Lungenerkrankung nahmen teil.

Bay 63-2521 wurde in einer Lösung von 0,5 mg/ml nach einer Nüchternphase von mindestens 8 Stunden oral eingenommen.

Im ersten Teil der Studie wurde BAY 63-2521 in stündlich steigender Dosierung bis zu einer Dosis von 5 mg eingenommen. Bis zu einer Dosis von 2,5 mg wurde BAY 63-2521 gut vertragen, es zeigten sich lediglich vier milde Nebenwirkungen, die vorüber gingen, bei einer Dosis von 5 mg zeigte ein Proband einen asymptomatischen Blutdruckabfall. Es zeigten sich weder Veränderungen der Vitalzeichen noch der Blutgase.

Im zweiten Teil der Studie wurde der Effekt von 1 und 2,5 mg BAY 63-2521 hinsichtlich der Pharmakodynamik untersucht.

Die Effekte von BAY 63-2521 waren hinsichtlich der Reduktion von PAP, TPR und Cardiac Index inhaliertem NO signifikant überlegen, es fanden sich bis auf den PAP (signifikante Reduktion gegenüber inhaliertem NO nur in der 2,5 mg Gruppe) keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosierungen.

BAY 63-2521 stellt somit eine neue Behandlungsmöglichkeit der PH mit einem hohen Sicherheitsprofil und großem Potenzial dar. Der Beginn von Phase-III-Studien in der Indikation Lungenhochdruck ist für 2008 vorgesehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes, Umbauprozesse der Pulmonalarterien und Entwicklung eines Cor pulmonale. Sie stellt eine schwere, lebensbedrohliche Erkrankung dar, die die Lebensqualität der Betroffenen stark einschränkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BAY 63-2521 als Aktivator der löslichen Guanylatzyklase in der Lage ist, die pulmonale Hypertonie im Monocrotalinmodell der Ratte zu stoppen und zum Teil rückgängig zu machen.

Die Therapie begann 21 Tage nach der Monocrotalininjektion, bei Vorliegen manifester Symptome einer pulmonalen Hypertonie. Die zweiwöchige Behandlung mit 10 mg/Kg BAY 63-2521 resultierte in einer 100 %-igen Überlebensrate, im Gegensatz zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe mit nur 70%.

Die rechtsventrikulären Drücke sanken auf Werte, die sich nicht mehr von Werten nur drei Wochen nach Monocrotalininjektion unterschieden, ebenso verhielten sich die Werte der Herzratio als Index einer Rechtsherzhypertrophie.

Dabei unterschieden sich die systemisch-arteriellen Drücke der behandelten Tiere nicht signifikant von den Werten gesunder Tiere, eine rein vasodilatative Wirkung von BAY 63-2521 kann damit ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde die Expression der löslichen Guanylatzyklase in der glatten Gefäßmuskulatur von Rattenlungen und in Lungen gesunder und an COPD und PPH erkrankter Patienten gezeigt.

6 SUMMARY

Severe pulmonary hypertension is a disabling disease with high mortality characterized by sustained elevation in pulmonary artery pressure, pulmonary vascular remodeling due to proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) associated with progressive right heart hypertrophy.

NO - cGMP pathway plays a central role in regulation of the vascular tone, PASMCs proliferation and cardiomyocyte hypertrophy. In this context, we investigated the impact of soluble guanylate cyclase (sGC) stimulator BAY 63-2521 on hemodynamics and remodeling in experimental pulmonary hypertension.

This study showed that BAY 63-2521 was able to reverse structural changes and disease progression induced by monocrotaline injection in rats.

Treatment of rats with BAY 63-2521 was initiated 21 days after MCT administration, after pulmonary hypertension was established. Two weeks of treatment with BAY 63-2521 resulted in a 100% survival compared to 70% survival in methyl cellulose-treated rats. Pathological changes in right ventricular pressure and right heart hypertrophy were significantly decreased after two weeks of treatment with BAY 63-2521 down to values comparable with those of rats three weeks after monocrotaline-injection.

Systemic arterial pressure did not change significantly in any of the animal groups investigated, thereby ruling out mere vasodilative properties of BAY 63-2521.

The vascular remodeling was determined by the degree of muscularization and the medial wall thickness. The treated group exhibited regeneration of the arterial walls.

The present study describes the reversal of hemodynamic and structural changes associated with monocrotaline-induced experimental pulmonary hypertension by activation of sGC.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen JR, Carstens LA (1970) *Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats* Exp Mol Pathol. 1970 Oct;13(2):159-71

Andreeva SG, Dikkes P, Epstein PM, Rosenberg PA (2001) *Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain* J Neurosci. 2001 Nov 15;21(22):9068-76

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations* Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Aug;74(8):3203-7

Behrends S (1995) *A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein* J Biol Chem. 1995 Sep 8;270(36):21109-13

Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, Voelkel NF (2004) *Oxidative stress in severe pulmonary hypertension* Am J Respir Crit Care Med. 2004 Mar 15;169(6):764-9

Bredt DS, Snyder SH (1994) *Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium* Neuron. 1994 Aug;13(2):301-13

Bredt DS, Snyder SH (1990) *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme* Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Jan;87(2):682-5

Buechler WA (1991) *Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits* Biochem Biophys Res Commun. 1991 Jan 15;174(1):351-7

Bult H (1990) *Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter* Nature. 1990 May 24;345(6273):346-7

Burstyn JN, Yu AE, Dierks EA, Hawkins BK, Dawson JH (1995) *Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II)sGC and Fe(II)sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme* Biochemistry. 1995 May 2;34(17):5896-903

Caslin AW, Heath D, Madden B, Yacoub M, Gosney JR, Smith P (1990) *The histopathology of 36 cases of plexogenic pulmonary arteriopathy* Histopathology 1990; 16(1):9-19

Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson (1997) *TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event* J Cell Physiol. 1997 Jan;170(1):69-80

Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G, Pepin JL, Bessard J, Schwebel C, Stanke-Labesque F, Pison C (2001) *Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension* Am J Respir Crit Care Med. 2001 Sep 15;164(6):1038-42

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT (1991) *Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry* Ann Intern Med. 1991 Sep 1;115(5):343-9

Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003) *Inflammation in pulmonary arterial hypertension* Eur Respir J 2003; 22(2):358-63

Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, Ghofrani HA, Samidurai A, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2008) *Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury* BMC Pulm Med. 2008 Dec 17;8(1):25

Evgenov, O. V., P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. Schmidt, and J. P. Stasch (2006) *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential* Nat.Rev.Drug Discov. 5:755-768

Farahmand F, Hill MF, Singal PK (2004) *Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale* Mol Cell Biochem. 2004 May;260(1-2):21-9

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions* Hypertension. 1994 Jun;23(6 Pt 2):1121-31

Förstermann U, Dun N (1996) *Immunohistochemical localization of nitric oxide synthases* Methods Enzymol. 1996;268:510-5

Förstermann U, Kleinert H (1995) *Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1995 Oct;352(4):351-64

Friebe A (1996) *Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme* EMBO J. 1996 Dec 16;15(24):6863-8

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine* Nature. 1980 Nov 27;288(5789):373-6

Gerzer R (1981) *Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung* Eur J Biochem 1981 Jun 1;116(3):479-86

Gerzer R (1981) *Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper* FEBS Lett. 1981 Sep 14;132(1):71-4

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

Ghofrani, H. A., J. Pepke-Zaba, J. A. Barbera, R. Channick, A. M. Keogh, M. A. Gomez-Sanchez, M. Kneussl, and F. Grimminger (2004) *Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension* J.Am.Coll.Cardiol. 43:68S-72S

Giaid, A. and D. Saleh (1995) *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension* N.Engl.J.Med. 333:214-221

Giulli G (1992) *Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain* FEBS Lett. 1992 Jun 8;304(1):83-8

Grimminger, F., R. Spriestersbach, N. Weissmann, D. Walmrath, and W. Seeger (1995) *Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs* J.Appl.Physiol 78:1509-1515

Hall SM, Gorenflo M, Reader J, Lawson D, Haworth SG (2000) *Neonatal pulmonary hypertension prevents reorganisation of the pulmonary arterial smooth muscle cytoskeleton after birth* J Anat. 2000 Apr;196 (Pt 3):391-403

Harteneck C (1991) *Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits* FEBS Lett. 1990 Oct 15;272(1-2):221-3

Harteneck C (1991) *Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme* FEBS Lett. 1991 Nov 4;292(1-2):217-22

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

Hayashi Y, Kokubo T, Takahashi M, Furukawa F, Otsuka H, Hashimoto K (1984) *Correlative morphological and biochemical studies on monocrotaline-induced pulmonary alterations in rats* Toxicol Lett. 1984 Apr;21(1):65-71

Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y (1999) *Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases* J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):20597-602

Hayashida K, Fujita J, Miyake Y, Kawada H, Ando K, Ogawa S, Fukuda K (2005) *Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension* Chest. 2005 May;127(5):1793-8

Hobbs AJ (1996) Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system
Methods Enzymol. 1996;269:134-48

Hobbs AJ (1997) *Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling* Trends
Pharmacol Sci. 1997 Dec;18(12):484-91

Humbert P (1991) *Preparation of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by immunoaffinity chromatography* Methods Enzymol 1991;195:384-91

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. (2004) *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension* J Am Coll Cardiol. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S-24

Ichinose F, Roberts JD Jr, Zapol WM (2004) *Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential* Circulation. 2004 Jun 29;109(25):3106-11

Ide, H., H. Nakano, T. Ogasa, S. Osanai, K. Kikuchi, and J. Iwamoto (1999) *Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide* J.Appl.Physiol 87:1629-1636

Ignarro LJ (1984) *Guanylate cyclase from bovine lung. Evidence that enzyme activation by phenylhydrazine is mediated by iron-phenyl hemoprotein complexes* J Biol Chem. 1984 May 10;259(9):5923-31

Ignarro LJ (1984) *Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins* J Biol Chem. 1984 May 25;259(10):6201-7

Kimura H, Murad F (1974) *Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart.* J Biol Chem 1974 Nov 10;249(21):6910-6

- Koesling D, Friebe A (1999) *Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation* Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1999;135:41-65
- Kondo S (1994) *The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes* Biochem Biophys Res Commun. 1993 Dec 30;197(3):1431-7
- Lalich JL, Johnson WD, Racznik TJ, Shumaker RC (1977) *Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats* Arch Pathol Lab Med. 1977 Feb;101(2):69-73
- Langleben D, Reid LM (1985) *Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy* Lab Invest. 1985 Mar; 52(3):298-303
- Li, D., N. Zhou, and R. A. Johns (1999) *Soluble guanylate cyclase gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia* Am.J.Physiol 277:L841-L847
- Liu L, Liu H, Visner G, Fletcher BS (2006) *Sleeping Beauty-mediated eNOS gene therapy attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats* FASEB J. 2006 Dec;20(14):2594-6
- Lopes AA, Maeda NY, Almeida A, Jaeger R, Ebaid M, Chamone DF (1993) *Circulating platelet aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension* Angiology 1993; 44(9):701-706
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH (1992) *Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme* Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):6711-5
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) *Nitric oxide and macrophage function* Annu Rev Immunol. 1997;15:323-50
- Marletta MA (1988) *Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents* Chem Res Toxicol. 1988 Sep-Oct;1(5):249-57

Marletta MA (1994) *Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis* Cell. 1994 Sep 23;78(6):927-30

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

Meyrick B, Reid L (1980) *Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression* Am J Pathol. 1980 Jul;100(1):151-78

Miyata M, Dakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R (2000) *Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration* Int Arch Allergy Immunol 2000; 121(3):246-252

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1989) *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication* Biochem Pharmacol. 1989 Jun 1;38(11):1709-15

Murthy KS (2001) *Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle* Biochem J. 2001 Nov 15;360(Pt 1):199-208

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor* Nature. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6

Peacock WF, Allegra J, Ander D, Collins S, Diercks D, Emerman C, Kirk JD, Starling RC, Silver M, Summers R. *Management of acute decompensated heart failure in the emergency department* Congest Heart Fail. 2003 Sep-Oct;Suppl 1:3-18

Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, Aigner C, Fink L, Moyal JP, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT

(2005) *Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension* FASEB J. 2005 Jul;19(9):1175-7.

Rabinovitch M, Bothwell T, Hayakawa BN (1986) *Pulmonary artery endothelial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension: a correlation of light with scanning electron microscopy and transmission electron microscopy* Lab Invest 1986; 55:632-653

Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S, Vainchenker W, Adnot S, Eddahibi S, Maitre B (2007) *Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice* Respir Res. 2007 Jan 30;8:8

Roth RA, Ganey PE (1988) *Platelets and the puzzles of pulmonary pyrrolizidine poisoning* Toxicol Appl Pharmacol. May;93(3):463-71

Rubin LJ (1997) *Current concepts: primary pulmonary hypertension* N Engl J Med 1997;336: 111-17

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2005) *Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition* J Clin Invest. 2005 Oct;115(10):2691-4

Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F (2008) *Expression and Function of Soluble Guanylate Cyclase in Pulmonary Arterial Hypertension* Eur Respir J. 2008 Jun 11.

Schmidt HH, Murad F (1991) *Purification and characterization of a human NO synthase* Biochem Biophys Res Commun. 1991 Dec 31;181(3):1372-7

- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Förstermann U, Murad F (1992) *Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases* Cell Calcium. 1992 Jun-Jul;13(6-7):427-34
- Schultze AE, Roth RA (1998) *Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system* J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 1998 Oct-Dec;1(4):271-346
- 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, Fagan KA, Frid MG *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms* Circ Res. 2006 Sep 29; 99(7):675-91
- Stone JR, Marletta MA (1994) *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states* Biochemistry. 1994 May 10;33(18):5636-40
- Stone JR, Marletta MA (1995) *The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane* Biochemistry. 1995 Dec 19;34(50):16397-403
- Stone JR, Marletta MA (1995) *Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase* Biochemistry. 1995 Nov 14;34(45):14668-74
- Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT (1983) *Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats* J Appl Physiol. 1983 Feb;54(2):371-4
- Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD (1996) *The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling* J Clin Invest 1996; Vol 98 No 2, July 1996 434-442

Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M (1988) *Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study* Lab Invest. 1988 Feb;58(2):184-95

Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCreedy L, Keeley FW, Rabinovitch M (1992) *Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease* Am Rev Respir Dis. 1992 Jul;146(1):213-23

Tomita T (1997) *Purification of bovine soluble guanylate cyclase and ADP-ribosylation on its small subunit by bacterial toxins* J Biochem (Tokyo). 1997 Sep;122(3):531-6

Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994) *Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension* Am J Pathol 1994; 144:275-285

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

Van Suylen RJ, Smits JFM, Daemen MJAP (1998) *Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline induced pulmonary hypertension* Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1423-1428

Voelkel NF, Tuder RM (1995) *Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension* Eur Respir J 1995; 8:2129-2138

Voelkel NF, Tuder RM *Severe pulmonary hypertensive diseases: a perspective* Eur Respir J. 1999 Dec;14(6):1246-50

Wagenvoort CA, Mulder PG (1993) *Thrombotic lesions in primary plexogenic arteriopathy. Similar pathogenesis or complication?* Chest 1993; 103(3):844-849

Wang ZY, Hakanson R (1995) *Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation*
Br J Pharmacol. 1995 Nov;116(5):2447-50

Weissmann N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Hänze J, Goyal P, Grimminger F,
Seeger W (2006) *Hypoxic pulmonary vasoconstriction--triggered by an increase in
reactive oxygen species* Novartis Found Symp.
2006;272:196-208; discussion 208-17

Weitzberg E, Lundberg JO (1998) *Nonenzymatic nitric oxide production in humans*
Nitric Oxide. 1998;2(1):1-7

Wilson DW, Segall, HJ (1990) *Changes in type II cell populations in monocrotaline
pneumotoxicity* Am J Pathol 1990 Jun; 136(6):1293-9

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

Xie Q, Nathan C (1994) *The high-output nitric oxide pathway: role and regulation*
J Leukoc Biol. 1994 Nov;56(5):576-82

Yuen PS (1990) *A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat
kidney* Biochemistry. 1990 Dec 11;29(49):10872-8

Zamboni I, De Martino C, (1967) *Buffered picric acid-formaldehyde: a new, rapid
fixative for electron microscopy* J Cell Biol 1967; 35: 148A

Zoche M, Beyermann M, Koch KW (1997) *Introduction of a phosphate at serine741
of the calmodulin-binding domain of the neuronal nitric oxide synthase (NOS-I)
prevents binding of calmodulin* Biol Chem. 1997 Aug;378(8):851-7

