# Therapeutische Effekte von Iloprost und dem PDE 3/4-Inhibitor Tolafentrin im Modell der Monocrotalininduzierten chronischen pulmonalen Hypertonie der Ratte

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

> vorgelegt von Kreißelmeier, Klaus-Peter aus Pinneberg

> > Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen Leiter: Herr Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. R.T. Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 07.04.2011

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.

Klaus-Peter Kreißelmeier

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation	1
1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie	2
1.3 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	5
1.4 Therapie der pulmonalen Hypertonie	7
1.4.1 Basistherapie	7
1.4.2 Synthetisches Prostazyklin und Prostazyklinanaloga	8
1.4.3 Inhalative Therapie	9
1.4.4 Endothelinrezeptorantagonisten	9
1.4.5 Phosphodiesterase 5-Inhibitoren	10
1.4.6 Einschränkungen der Therapieoptionen und Kombinationstherapie	11
1.5 Tiermodell der pulmonalen Hypertonie	12
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2 Material und Methoden 2.1 Material	<b>15</b> 15
2 Material und Methoden 2.1 Material 2.1.1 Versuchstiere	15 15 15
<ul> <li>2 Material und Methoden</li> <li>2.1 Material</li> <li>2.1.1 Versuchstiere</li> <li>2.1.2 Pharmaka und Substanzen</li> </ul>	15 15 15 15
<ul> <li>2 Material und Methoden</li> <li>2.1 Material</li> <li>2.1.1 Versuchstiere</li> <li>2.1.2 Pharmaka und Substanzen</li> <li>2.1.3 Geräte und Software</li> </ul>	15 15 15 15 17
<ul> <li>2 Material und Methoden.</li> <li>2.1 Material</li> <li>2.1.1 Versuchstiere</li> <li>2.1.2 Pharmaka und Substanzen</li> <li>2.1.3 Geräte und Software</li> <li>2.1.4 Verbrauchsmaterial</li> </ul>	15 15 15 15 17 18
<ul> <li>2 Material und Methoden</li></ul>	15 15 15 15 17 18 19
<ul> <li>2 Material und Methoden</li></ul>	15 15 15 17 17 18 19 20
<ul> <li>2 Material und Methoden</li></ul>	15 15 15 17 17 18 19 20 20
<ul> <li>2 Material und Methoden.</li> <li>2.1 Material</li></ul>	15 15 15 17 17 18 19 20 20 22
<ul> <li>2 Material und Methoden</li></ul>	15 15 15 17 17 18 19 20 20 22 23
<ul> <li>2 Material und Methoden</li> <li>2.1 Material</li></ul>	15 15 15 17 17 18 19 20 20 22 23 25

2.2.6 Probenentnahme und Organpräparation	26
2.2.7 Histologie	27
2.2.8 MMP Western Blot (Immunoblot)	29
2.2.9 Gelatinzymographie	31
2.2.10 Statistische Datenanalyse	32
3 Ergebnisse	
3.1 Monocrotalin-behandelte Ratten	33
3.2 Monocrotalin-behandelte Ratten mit intravenöser Kurzzeittherapie	46
3.3 Monocrotalin-behandelte Ratten mit i.vDauertherapie, Tag 14-28	47
3.4 Monocrotalin-behandelte Ratten mit i.vDauertherapie, Tag 28-42	61
4 Diskussion	75
4.1 Monocrotalin-Tiermodell	76
4.2 Dosisabhängige Effekte von Iloprost und Tolafentrin	79
4.3 Dauertherapien ab Tag 14 / Tag 28	83
5 Zusammenfassung	88
6 Summary	90
7 Literaturverzeichnis	91
Publikationsverzeichnis	109
Lebenslauf	110
Danksagung	111

# Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMV	Atemminutenvolumen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Herzindex, cardiac index
d	Tag (lat. dies)
d.h.	das heißt
ERA	Endothelinrezeptorantagonist
ET-1	Endothelin-1
ET <sub>a</sub>	Endothelinrezeptor Typ A
ET <sub>b</sub>	Endothelinrezeptor Typ B
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
FPAH	familiäre pulmonalarterielle Hypertonie
g	Gramm
H & E	Hämatoxylin und Eosin
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HMV	Herzminutenvolumen
HZV	Herzzeitvolumen
HPAH	heriditäre pulmonalarterielle Hypertonie
Ilo	Iloprost
i.p.	intraperitoneal

IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
Μ	molar
MCT	Monocrotalin
mg	Milligramm
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMP-2	Matrixmetalloproteinase 2
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
ml	Milliliter
n	Anzahl, number
Ν	normal
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
o.a.	oben angeführt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
$paO_2$	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	pulmonalarterieller Druck, pulmonary arterial pressure
PC	Personal Computer
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
$pO_2$	Sauerstoffpartialdruck
PDE	Phosphodiesterase

PEEP	positiv-endexspiratorischer Druck, positive end-exspiratory
	pressure
PH	pulmonale Hypertonie
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkemVentrikel plus Septum
RVP	rechtsventrikulärer Druck, right ventricular pressure
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck, right ventricular systolic
	pressure
S	Septum
s.	siehe
SAP	systemischer arterieller Druck, systemic arterial pressure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde
SEM	Standard Error Mean (Standardfehler)
$svO_2$	zentralvenöse Sauerstoffsättigung
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
Tola	Tolafentrin
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

## **1** Einleitung

## 1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation

Die Lungenstrombahn weist im Vergleich mit der Strombahn anderer Organe einige wesentliche Unterschiede auf. Generell sind die arteriellen und venösen Gefäßabschnitte in der pulmonalen Zirkulation kürzer und dünnwandiger als in den Körperkreislaufes. Zudem entsprechenden Blutgefäßen des besteht ein morphologischer Hauptunterschied darin, dass die typischen Arteriolen mit einer muskelstarken Media des Körperkreislaufes in der Lungenstrombahn fehlen. Stattdessen gehen die größeren muskularisierten Arterien in kleinere, partiell muskularisierte Blutgefäße über, die einen sehr niedrigen Perfusionswiderstand aufweisen. Insgesamt besteht somit im Lungengefäßsystem ein erheblich niedrigerer Gesamtströmungswiderstand und damit auch kleinere Drücke als im Körpergefäßsystem. Der Strömungswiderstand der pulmonalen Zirkulation beträgt nur  $\frac{1}{10}$  des Widerstandes des Körperkreislaufes. Die Lungenkapillaren bilden ein dichtes Netz um die Lungenalveolen, so dass, erleichtert durch die kurze Diffusionsstrecke, der Gasaustausch stattfinden kann. Die Lungenkapillaren besitzen eine große elastische Dehnbarkeit. Sie stellen den Hauptanteil der Compliance der pulmonalen Vaskulatur dar. Daraus resultiert das ausgeprägte druckpassive Durchblutungsverhalten der Lungenstrombahn. Bei Erhöhung des Blutflusses unter Belastung durch Erhöhung des Herzzeitvolumens kann hierdurch sowie durch Rekrutierung weiterer pulmonaler Blutgefäße das pulmonale Blutdruckniveau im Sinne einer passiven Vasodilatation konstant gehalten werden (Olschewski et al. 1999). Zudem kann eine aktive Vasodilatation erfolgen, vermittelt über verschiedene Mediatoren wie z. B. NO oder Prostazyklin. Ein wesentlicher Unterschied der Durchblutungsregulation ist die hypoxische Vasokonstriktion der pulmonalen Strombahn, die im Gegensatz zur hypoxischen Vasodilatation der meisten autonom regulierten Organe steht wie beispielsweise Herz, Gehirn und Nieren. Durch aktive Vasokonstriktion und aktive Vasodilatation kann der Tonus der pulmonalen Vaskulatur das ganze Spektrum von maximaler Vasokonstriktion bis hin zur maximalen Vasodilatation annehmen. Der physiologische Ruhetonus befindet sich dabei nahe der maximalen Vasodilatation.

Eine weitere Besonderheit in der Regulation des pulmonalen Vasotonus ist die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (von Euler-Liljestrand Mechanismus). Dies stellt einen physiologischen Mechanismus zur Optimierung der Anpassung der lokalen Perfusion der Lunge an die lokale Ventilation dar. In hypoxischen Lungenarealen findet eine Vasokonstriktion statt, um somit die Perfusion bevorzugt gut ventilierten Lungenarealen zum Gasaustausch zuzuführen. Physiologisch führt dieser Mechanismus nicht zum Anstieg des pulmonalarteriellen Druck, dazu kommt es erst bei generalisierter alveolärer Hypoxie.

## 1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist eine schwerwiegende Erkrankung mit schlechter Prognose (D'Alonzo et al. 1991). Eine pulmonale Hypertonie kann durch eine ganze Reihe von verschiedenen Ursachen bedingt sein. Bei der manifesten pulmonalen Hypertonie findet sich bereits in Ruhe ein mittlerer pulmonalarterieller Druck von mehr als 25 mmHg (Kovacs et al. 2009). In Abhängigkeit vom Schweregrad der pulmonalen Hypertonie zeigt sich klinisch bei den Patienten eine Belastungsdyspnoe bis hin zur Ruhedyspnoe. Einen wesentlichen Anpassungsmechanismus stellt hierbei die rechtsventrikuläre Adaptation dar. Zunächst führt die pulmonale Hypertonie zur konzentrischen Hypertrophie des rechten Ventrikels. Bei weiter progredienter Erkrankung kommt es dann jedoch auch zu einer Dilatation des Ventrikels. Schließlich kommt es durch verminderte Auswurfleistung des Ventrikels zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens. Neben strukturellen Veränderungen des Ventrikels kommt es auch zu Umbauprozessen der pulmonalen Strombahn, die zusammen mit begleitender Vasokonstriktion zu einer Abnahme des gesamten Gefäßquerschnittes führen und damit zu einer Abnahme der Compliance. Die Gefäßquerschnittsfläche wird weiter durch lokale Thrombosen kleiner Pulmonalarterien reduziert. Bei Thrombosen kleiner Blutgefäße mit einem Durchmesser unter 200 µm geht man von einer Entstehung im Rahmen von in-situ-Thrombosen und nicht durch embolische Ereignisse aus. Diese Thrombosen reduzieren nicht nur den Gefäßquerschnitt, sondern können auch weitere sekundäre Umbauprozesse nach sich ziehen, die das Gefäßlumen weiter einengen. Bei einigen Formen der pulmonalen Hypertonie finden sich typischerweise Thrombosen in solchen Blutgefäßen, die bereits von strukturellen Umbauprozessen betroffen sind. Dies kann möglicherweise Folge einer thrombogenen Dysfunktion des pathologisch veränderten Endothels sein, zum anderen könnte es durch Thrombosen zu sekundären Umbauprozessen kommen. Bei primär toxisch verursachten Formen der pulmonalen Hypertonie der Ratte, gehören die in-situ-Thrombosen zu den frühen Veränderungen im Rahmen der pulmonalen Hypertonie (Lalich et al. 1977, Gomez-Sanchez et al. 1989).

Durch die pulmonale Hypertonie kommt es zu verschiedenen Umbauprozessen der Pulmonalarterien, welche sich bei den kleinen und großen Pulmonalgefäßen unterscheiden. Die zentralen Blutgefäße sind dilatiert bis hin zu teilweise aneurysmatischen Erweiterungen, während die kleinen Pulmonalgefäße durch Umbauvorgänge eine progrediente Lumeneinengung erfahren. In diesem Zusammenhang bezieht sich der Begriff des "Remodeling" normalerweise auf diese Umbauprozesse der kleinen Lungengefäße. Im Normalfall besitzen die pulmonalen Blutgefäße bis zu einer Lumenweite von ca. 80 µm eine kontinuierliche Media. Distal davon finden sich dann nur noch partiell muskularisierte Blutgefäße, welche intermediäre Zellen aufweisen, die in ihren Eigenschaften zwischen Perizyten und glatten Muskelzellen angesiedelt sind. In der weiteren Peripherie befinden sich dann nur noch wenige Perizyten in den Blutgefäßen. Überwiegend handelt es sich beim Remodeling der pulmonalen Gefäßwand um drei charakteristische Prozesse. Hierbei kommt es zur Intimafibrose, zur Hypertrophie der Media sowie zu einer "De Novo Muskularisation". Bei der "De Novo Muskularisation" wachsen die glatten Muskelzellen der Media in zunächst längsgerichteten Zügen nach distal aus, so dass auch kleinere pulmonalarterielle Gefäße bis zu einem Durchmesser von 15 µm eine komplette Muscularis aufweisen können (Veyssier-Belot et al. 1999). Die glatten Muskelzellen bilden vermehrt extrazelluläre Matrix, zudem treten auch Veränderungen der Adventitia und der Intima auf. So kommt es auch in der Adventitia zu einer Aktivierung von Fibroblasten mit Zellproliferation und Migration der Zellen in die Gefäßwand. Auch diese Zellen produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix. Zu verschiedenen Veränderungen kommt es auch in der Intima. Hier scheint die Glycocalixschicht auf den Endothelzellen verändert zu sein, möglicherweise verbunden mit einer Reduktion von Heparansulfat, was per se einen Trigger für glattmuskuläres Wachstum darstellen könnte. Darüber hinaus scheint sich das Hämostaseprofil der Endothelzellen von der antikoagulatorischen Dominanz zur prokoagulatorischen Dominanz zu verschieben. Die Elastica interna ist zum Teil fragmentiert und weist Lücken auf, die ein Einwachsen von glatten Muskelzellen und Fibroblasten ermöglichen. Die Proliferation von Myofibroblasten an diesen Stellen ist das charakteristische Kennzeichen der Intimafibrose. Diese Myofibroblasten können sich von den ortständigen intermediären Zellen ableiten oder von eingewanderten glattmuskulären Zellen bzw. eingewanderten Fibroblasten. Das Remodeling der pulmonalen Gefäße wird auch durch eine Mediatordysbalance mitverursacht zwischen Vasokonstriktoren mit proliferativer Wirkung, Wachstumsfaktoren und Vasodilatatoren mit antiproliferativer Wirkung (Christman et al. 1992). Im Rahmen des Remodeling kommt es auch zu sogenannten "Plexiformen Läsionen". Hierbei bilden sich in kleinen Ästen der Pulmonalarterien endoluminal multiple gewundene Kanäle, die histologisch an Nierenglomeruli erinnern. Diese plexiformen Läsionen finden sich bei verschiedenen Arten der pulmonalen Hypertonie (Caslin et al. 1990).

## 1.3 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Ursprünglich wurde die pulmonale Hypertonie in zwei Kategorien eingeteilt: Die primäre pulmonale Hypertonie und die sekundäre pulmonale Hypertonie (Hatano et al. 1975). Die Einteilung war abhängig vom Vorliegen oder Fehlen eines identifizierbaren Auslösers oder Riskofaktors. Die primäre pulmonale Hypertonie stellte somit eine Ausschlussdiagnose dar (Rich et al. 1987). Während des zweiten Weltsymposiums für Pulmonale Hypertonie 1998 in Evian wurde eine klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie vorgestellt (Rich et al. 1988). In die neue Klassifikation sollten neue Erkenntnisse über Pathomechanismen einfließen. Die Evian-Klassifikation bestand aus fünf Kategorien, die nach Therapiemechanismen der jeweiligen auslösenden Ursache gegliedert wurden:

1.) PAH

- 2.) pulmonalvenöse Hypertonie
- 3.) PH assoziiert mit Lungenerkrankungen oder Hypoxämie
- 4.) PH durch thrombotische oder embolische Erkrankungen
- 5.) PH durch Erkrankungen der pulmalen Gefäße

Anlässlich des dritten Weltsymposiums für Pulmonale Hypertonie 2003 in Venedig wurde die Klassifikation revidiert. Der Grundgedanke einer klinischen Klassifikation mit diesen fünf Kategorien wurde beibehalten. Hauptsächlich sollte der Terminus "primäre pulmonale Hypertonie" abgelöst werden sowie einige Modifikationen und Neuklassifikation durchgeführt werden. Diese Klassifikation wurde beim vierten Weltsymposium für Pulmonale Hypertonie 2008 in Dana Point mit der Bezeichnung "hereditäre pulmonale Hypertonie" für die vormals "familiäre pulmonale Hypertonie" noch abgewandelt (vergleiche Tabelle 1.1). Tabelle 1.1: Revidierte Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Dana Point 2008) (nach Nef et al. 2010)



## 1.4 Therapie der pulmonalen Hypertonie

#### 1.4.1 Basistherapie

Sofern die pulmonalarterielle Hypertonie mit bestimmten Grunderkrankungen assoziiert ist sollte zunächst eine optimierte Therapie der entsprechenden Grunderkrankung erfolgen (Barst et al. 2009). Dies kann beispielsweise bei Kollagenosen, portopulmonaler Hypertonie oder HIV-Infektion den Verlauf der assoziierten PAH günstig beeinflussen. Bei Patienten, die klinische Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz aufweisen, wie z. B. Aszites, Pleuraergüsse und venöse Stauung, kommen Diuretika zum Einsatz, um die Volumenbelastung des rechten Herzens zu reduzieren. Als weitere Basistherapie wird eine niedrigdosierte Antikoagulation mit oralen Vitamin K-Antagonisten mit einem Ziel-INR-Wert zwischen 1,5 – 2,0 empfohlen, um in-situ-Thrombosierungen der pulmonalen Gefäße vorzubeugen (Fuster et al. 1984). Im Einzelfall können zur Frequenzkontrolle Digitalispräparate zum Einsatz kommen, z. B. bei tachykardem Vorhofflimmern (Rich et al. 1998). Bei arteriellen pO<sub>2</sub>-Werten unter 65 mmHg sollte eine Langzeitsauerstofftherapie durchgeführt werden. Höhenaufenthalte und Flugreisen können durch alveoläre Hypoxie eine pulmonale Hypertonie durch hypoxische pulmonale Vasokonstriktion aggravieren. Ebenso sollte eine obstruktive Schlafapnoe ausgeschlossen bzw. entsprechend behandelt werden. Weitere Basismaßnahmen stellen körperliche Schonung, regelmäßige Impfung gegen Influenza und Pneumokokken sowie rechtzeitige antibiotische Therapie von Infekten dar. Als unspezifische Therapie werden Kalziumantagonisten eingesetzt. Diese Therapie ist jedoch Patienten vorbehalten, die in einer Vasoreagibilitätstestung im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung auf ein kurzwirksames Vasodilatanz (z. B. Stickstoffmonoxid, inhaliertes Iloprost oder intravenöses Prostazyklin) mit einem definierten Abfall des pulmonalarteriellen Mitteldruckes reagieren (Sitbon et al. 2005). Bei Patienten, bei denen dies der Fall ist, kann eine Therapie mit Kalziumantagonisten zu einer Überlebensverbesserung führen (Rich et al. 1992).

## 1.4.2 Synthetisches Prostazyklin und Prostazyklinanaloga

Ein therapeutisches Grundprinzip in der Therapie der pulmonalen Hypertonie ist die Gabe von Prostazyklin (Barst et al. 1996). Bei der PAH kommt es zu einer verminderten Expression von Prostazyklinsynthase im Gefäßendothel und einer verminderten endogenen Produktion von Prostazyklin (Tuder et al. 1999). Hierdurch kommt es zu einem Überwiegen des Prostazyklinantagonisten Thromboxan-A<sub>2</sub>, was zu einer verstärkten Vasokonstriktion, vaskulärer Inflammation und Proliferation und Thrombosierung führt. Da das für die Therapie eingesetzte synthetische Epoprostenol eine kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten hat, ist für die systemische Applikation eine kontinuierliche Infusion erforderlich. Dies ist eine für die Patienten aufwendige Therapie mit potentiell gefährlichen Komplikationen. Für die i.v.-Dauertherapie ist ein permanenter zentralvenöser Gefäßzugang erforderlich, z. B. mittels Port- oder Hickman-Katheter, mit der Gefahr der Katheterthrombose oder Infektionen. Durch die systemische Therapie mit nichtselektiver Vasodilatation kann es zu Nebenwirkungen wie Hypotonie kommen, was dosislimitierend ist. Bei Unterbrechung der Therapie durch Katheterdislokation kann es zu überschießendem pulmonalarteriellem Druckanstieg kommen oder kardialer Dekompensation ("Rebound-Phänomen"). Diese Gefahr ist verringert beim i.v.-Einsatz von länger wirksamen Prostanoiden wie Iloprost oder Treprostinil (Higenbottam et al. 1998, Tapson et al. 2006). Zur Reduktion von katheterassoziierten Problemen wurde eine systemische Applikation von Treprostinil mittels subkutaner Dauerinfusion entwickelt (Simonneau et al. 2002). Hierbei tritt allerdings häufig ein schmerzhaftes Erythem an der Einstichstelle auf, was die Dosierung erschwert und den Langzeiteinsatz limitiert. Für die orale Gabe von Beraprost, einem synthetischen Prostazyklinderivat, konnte in einer placebokontrollierten Studie kein signifikanter Langzeiteffekt in Bezug auf Belastbarkeit und hämodynamische Parameter gezeigt werden (Barst et al. 2003).

## 1.4.3 Inhalative Therapie

Eine inhalative Therapie mit Iloprost umgeht die Problematik eines invasiven Gefäßzuganges der i.v.-Dauertherapie, katheterassoziierte Komplikationen lassen sich dementsprechend vermeiden. Darüber hinaus besteht bei der inhalativen Therapie eine pulmonale Selektivität, so dass sich systemische Nebenwirkungen der Therapie wie z. B. Hypotonie reduzieren lassen. Durch die Inhalation der vasodilatatorischen Substanzen kommt es zu einer verbesserten Anpassung von pulmonaler Ventilation und Perfusion. Da das inhalierte Aerosol bevorzugt in besser ventilierte Lungenareale gelangt, findet primär dort eine Vasodilatation statt mit entsprechender Verbesserung des Gasaustausches durch Reduktion des pulmonalen Shuntflusses. Der Nachweis der Therapiewirksamkeit in Bezug auf hämodynamische, funktionelle und symptomatische Verbesserungen gelang bei PAH unterschiedlicher Ätiologie, so dass mittlerweile die inhalative Therapie mit dem längerwirksamen Prostazyklinanalogon Iloprost einen wichtigen Bestandteil in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie darstellt (Olschewski et al. 2002). Hauptnebenwirkungen der Therapie sind Flush, Kopfschmerzen, Diarrhoe, Knochenschmerzen und Hypotonie. Bei dieser Therapie sind jedoch sechs bis neun Inhalationen täglich erforderlich mit einem speziellen Inhalationssystem, was eine komplexe Therapie mit hohen Anforderungen an die Compliance der Patienten darstellt. Durch Inhalation mit dem länger wirksamen Treprostinil, welches zudem Depotwirkung im Lungengewebe aufweist, eine partielle kann die Inhalationsfrequenz reduziert werden (Vosswinckel et al. 2006).

#### 1.4.4 Endothelinrezeptorantagonisten

Endothelin ist eine stark vasokonstriktorisch wirksame Substanz, die zudem proinflammatorisch wirkt und eine Hypertrophie von Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen verursacht. Patienten mit pulmonaler Hypertonie weisen erhöhte Gewebe- und Plasmaspiegel von Endothelin-1 auf, dem klinisch relevantesten Peptid aus der Gruppe der Endotheline (Giaid et al. 1993). Die Wirkung von ET-1 ist über zwei Rezeptoren vermittelt: den Endothelinrezeptor Typ A und Typ B. Über beide Rezeptorsubtypen wird eine Vasokonstriktion in der pulmonalen Strombahn vermittelt. Zur Blockade der negativen Wirkung des Endothelin-1 in der pulmonalen Hypertonie stehen Endothelinrezeptorantagonisten zur Verfügung, die unterschiedliche Selektivität zu den Rezeptorsubtypen aufweisen, so dass man von selektiven und dualen Endothelinrezeptorantagonisten sprechen kann. Zur Therapie in Deutschland sind drei ERA zugelassen, deren Wirksamkeit in randomisierten, placebokontrollierten, multizentrischen Studien dokumentiert werden konnte. Bosentan ist ein dualer Endothelinrezeptorantagonist des ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>- Rezeptors (Rubin et al. 2002). Mit Sitaxentan und Ambrisentan stehen zwei selektive ETA-Antagonisten zur Verfügung (Barst et al. 2004a, Galiè et al. 2008). Bei der Therapie ERA müssen aufgrund eines wahrscheinlichen Klasseneffektes von mit Lebertoxizität regelmäßige Transaminasenkontrollen erfolgen. Weitere relevante Nebenwirkungen der ERA sind periphere Ödeme, Anämie und Zytopenien, es können zudem multiple Medikamenteninteraktionen auftreten.

#### 1.4.5 Phosphodiesterase 5-Inhibitoren

Einer der stärksten endogenen Vasodilatatoren ist Stickstoffmonoxid. Die Wirkung von NO wird über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt, was zu der Bildung von zyklischem Guanylatmonophosphat führt. Beim Krankheitsbild der PAH wurde eine verringerte Expression des NO produzierenden Enzyms nachgewiesen sowie geringere cGMP-Spiegel (Giaid et al. 1995). Der Botenstoff cGMP wird in den Lungengefäßen hauptsächlich durch die Phosphodiesterase 5 abgebaut (Corbin und Francis 1999). Somit führt eine pharmakologische PDE5-Inhibition zu einer Verstärkung der NO-induzierten pulmonalen Vasodilatation. Für diese Indikation zugelassen sind die PDE5-Inhibitoren Sildenafil (Galiè et al. 2005) und das länger wirksame Tadalafil (Galiè et al. 2009). Hauptnebenwirkungen der PDE5-Inhibitortherapie sind Epistaxis, Nasenschleimhautschwellung, Kopfschmerz

und Flush. Bei den PDE5-Inhibitoren besteht in der Verbindung mit Nitraten und anderen systemischen NO-Donatoren die Gefahr einer schweren systemischen Hypotonie durch Potenzierung und Prolongation des systemischen vasodilatativen Effektes, so dass hier keine Kombination erfolgen darf.

#### 1.4.6 Einschränkungen der Therapieoptionen und Kombinationstherapie

Die verfügbaren Therapieoptionen sind häufig durch unerwünschte Wirkungen limitiert. Eine Kalziumantagonistentherapie ohne positive Reaktion in der Vasoreagibilitätstestung ist kontraindiziert, so dass diese Therapie weniger als 10% der Patienten vorbehalten bleibt. Die aufgrund der kurzen Halbwertszeit erforderliche i.v.-Dauertherapie mit Epoprostenol ist aufgrund des nötigen permanenten zentralvenösen Gefäßzuganges mit der Gefahr von Infektionen und Thrombosen verbunden sowie mit der Gefahr der Dekompensation bei Katheterdislokation. Bei der subkutanen Dauerinfusion von Treprostenil tritt häufig ein schmerzhaftes Erythem an der Einstichstelle auf, was die Dosierung erschwert und den Langzeiteinsatz limitiert. Die inhalative Therapie der pulmonalen Hypertonie stellt eine komplexe Behandlungsform dar, die zu Problemen mit der Compliance der Patienten führen kann, da häufig neun oder sogar mehr Inhalationen pro Tag mit einem speziellen Inhalationssystem erforderlich sind. Zudem treten Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Flush und Schwindel auf. Bei der Therapie mit Endothelinrezeptorantagonisten kann es zu einer Lebertoxizität kommen, die einen Abbruch der Behandlung erforderlich machen kann, darüber hinaus kann es zu verschiedenen Medikamenteninteraktionen kommen. Falls es unter einer Monotherapie nicht zum gewünschten Behandlungserfolg kommt oder es unter einer Monotherapie zur klinischen Verschlechterung des Patienten kommt, sollte eine Kombinationstherapie der pulmonalen Hypertonie als "zielorientierte Therapie" erfolgen (Hoeper et al. 2005). In Einzelfällen kann die atriale Ballonseptostomie durch Erzeugung eines Rechts-Links-Shunts die Symptomatik verbessern (Kerstein et al. 1995, Rich et al. 1997). Patienten, die trotz intensivierter medikamentöser Therapie einen progredienten Krankheitsverlauf entwickeln, können in ausgewählten Fällen in spezialisierten Zentren einer Lungentransplantation zugeführt werden (Reitz et al. 1982, Pasque et al. 1995).

## 1.5 Tiermodell der pulmonalen Hypertonie

Das Modell der durch Monocrotalin induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte ist ein vielfach genutztes Modell der pulmonalen Hypertonie, da es ein robustes Tiermodell darstellt, dessen pathophysiologische Charakteristika in vielen Punkten gut mit entsprechenden Veränderungen beim Menschen vergleichbar sind (Rosenberg und Rabinovitch 1988). Monocrotalin ist ein Pflanzenalkaloid aus Crotalaria spectabilis. Zum Genus Crotalaria gehören mehr als 600 verschiedene Pflanzen und Sträucher, die hauptsächlich in den Tropen vorkommen, einige werden als Zierpflanzen gehalten. Verschiedene Pflanzen der Crotalaria produzieren Alkaloide, die sporadisch zu Vergiftungen führen. Neben Vergiftungen bei Tieren sind auch Vergiftungen bei Menschen beschrieben, z. B. durch Ingestion von Teezubereitungen, dies führt hauptsächlich zur Entstehung einer pulmonalen Hypertonie, Cor pulmonale und einer veno-okklusiven Erkrankung der Leber. (Huxtable 1980). Die Pneumotoxizität der Pyrrolizidin-Alkaloide wurde zunächst 1942 für Monocrotalin und Retronecin beschrieben (Harris et al. 1942). Die Pyrrolizidin-Alkaloide vermitteln toxische Effekte nach Bioaktivierung über Cytochrom-P450 Enzyme in der Leber zu einem Dehydropyrrolizidin oder Pyrrol (Glowaz et al. 1992, Huxtable 1990). Diese Verstoffwechselung erfolgt rasch, die aktiven Metaboliten haben sehr kurze Halbwertszeiten von Sekunden bis Minuten und werden innerhalb der ersten 24 Stunden fast vollständig renal eliminiert (Hayashi und Lalich 1967). Das Monocrotalin-Pyrrol gelangt über die Blutbahn mit den Erythrozyten zum Endothel der Lunge. Dort werden Endothelschäden über DNA cross-links und kovalente Bindung gesetzt (Thomas et al. 1996, Wagner et al. 1993). Die Endothelschäden führen zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität, Thrombozytenaggregation und verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen.

Es kommt zu einer vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und eingewanderte Entzündungszellen. Dies bewirkt eine Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Ab dem achten Tag nach Monocrotalininjektion kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes, ab der dritten Woche nach Injektion findet sich eine komplett manifestierte pulmonale Hypertonie (Ghodsi und Will 1981). Mit progredientem Krankheitsverlauf zeigen sich Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz mit Dyspnoe, Zyanose und peripheren Ödemen. Durch fortschreitendes vaskuläres Remodeling kommt es zur progredienten Verdickung der Media in Pulmonalarterien und pulmonalen Arteriolen. Es folgen Cor pulmonale mit Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels, schließlich mündend in kardialer Dekompensation und Tod der Tiere im Rechtsherzversagen.

Bei diesen Veränderungen besteht eine erheblich Speziesvariabilität, das Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie ist etabliert mit Ratten des Zuchtstammes Sprague-Dawley (Huan et al. 1998).

## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Aus den Einschränkungen der bisherigen Therapieoptionen ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Therapieoptimierung für die pulmonale Hypertonie unterschiedlicher Ätiologie. Vielfach sind die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie durch unerwünschte Wirkungen limitiert. Eine Monotherapie ist häufig nicht ausreichend, um die Behandlungsziele zu erreichen, oder es kommt unter der Monotherapie zur klinischen Verschlechterung der Patienten. Durch die Kombinationstherapie eines Prostanoids mit einem PDE-Inhibitor, der den Abbau des induzierten second messenger cAMP hemmt, ist eine synergistische Wirkung auf die Vasodilatation zu erwarten. Dies konnte für den dualen PDE 3/4-Inhibitor Tolafentrin in der Kombination mit inhalativem Prostazyklin im Tiermodell von akut induzierter pulmonaler Hypertonie gezeigt werden (Schermuly et al. 1999, Schermuly et al. 2000, Schermuly et al. 2001). Auch bei Rechtsherzkathetertestungen bei Patienten konnte dies demonstriert werden (Ghofrani et al. 2002).

Die aktuellen Untersuchungen sollten nun zeigen, ob diese synergistischen Effekte auch in einem Ganztiermodell eines chronischen Erkrankungsmodells demonstriert werden können, welches eher dem chronischen Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie beim Menschen ähnelt. Zudem sollte nach Dosisfindung nicht nur eine Untersuchung der kurzfristigen Therapieeffekte auf die Hämodynamik, sondern auch der Dauertherapie nach Krankheitsmanifestation erfolgen, was eher dem Behandlungsfall beim Menschen gleicht. Bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie spielen jedoch nicht nur die gefäßerweiternden Effekte der Therapie eine Rolle. Aufgrund der zentralen Rolle, die das pulmonalvaskuläre Remodeling in der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie spielt, sollte auch geklärt werden, inwieweit durch die Einzeltherapien und die kombinierte Therapie das Remodeling antagonisiert werden kann. Deshalb erfolgten histologische Untersuchungen von Lungengewebe, um Vergleiche zwischen gesunden Tieren, erkrankten Tieren und behandelten Tieren aus den verschiedenen Versuchsgruppen anstellen zu können. Darüber hinaus wurde auch die Expression und Aktivität bestimmter Matrixmetalloproteinasen erforscht, deren Hochregulierung das vaskuläre Remodeling widerspiegelt, und die resultierenden Veränderungen durch die verschiedenen Therapieregime.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden Ratten (Rattus norwegicus) verwendet (Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld). Es wurden ausschließlich männliche Ratten des Zuchtstammes Sprague-Dawley mit einem Gewicht zwischen 350 und 400 Gramm verwendet. Dieser Auszuchtstamm wurde ursprünglich 1925 von Robert W. Dawley gekreuzt aus einer männlichen Hybridratte (hooded) und einer weiblichen Wistar-Ratte. Die Sprague-Dawley-Ratte wird als Handelszeichen CD®-IGS-Ratte der Firma Charles River geführt. Die Farbe der CD®-Ratte ist weiß (Albino). Die CD®-Ratte wird bei vielfältigen Fragestellungen eingesetzt, z. B. für pharmakologische Testungen sowie Modelle im Bereich von Alterungsprozessen, Ernährung, Onkologie und ernährungsinduzierter Adipositas. Das Gewicht der Ratten von 350 bis 400 Gramm entspricht einem Alter von etwa zwölf Wochen. Die Tiere wurden im Tierstall der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Gießen gehalten. Futter (Altromin® Standarddiätfutter) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall betrug ca. 12 Stunden pro Tag, die Umgebungstemperatur im Mittel 25°C. Der für die durchgeführten Versuche geltende Tierversuchsantrag wurde von dem Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

## 2.1.2 Pharmaka und Substanzen

Wenn Handelsname und Freiname voneinander abweichen ist der internationale Freiname in Klammern angegeben. Im folgenden Text wird dann durchgehend der Freiname verwendet. Folgende Pharmaka/Lösungen kamen zur Anwendung:

- Antisedan® (Atipamezolhydrochlorid), Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Aqua ad iniectabilia, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Atemgemisch Sauerstoff 4.5, Stickstoff 5.0, Messer-Griesheim, Frankfurt, Deutschland
- Baytril 2,5%® (Enrofloxacin), Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
- Braunoderm®, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Crotaline® (Monocrotalin), Sigma, Steinheim, Deutschland
- Domitor<sup>®</sup> (Medetomidinhydrochlorid), Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Fentanyl-Janssen 0,1 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
- Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
- Ilomedin® (Iloprost), Schering AG, Berlin, Deutschland
- Isotone Kochsalzlösung, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Ketavet® (Ketamin), Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
- Liquemin® N 25 000 (Heparin-Natrium), Hoffmann-La Roche AG,
- Naloxon-ratiopharm 0,4<sup>®</sup>, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
- Narcoren® (Pentobarbital-Natrium), Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
- Natronlauge 1N (1mol/l), Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Pancuronium "Organon"®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
- Rompun® 2% (Xylazinhydrochlorid), Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
- Salzsäure 1N (1mol/l), Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland

- Tissue-Tek® O.C.T. Compound<sup>™</sup>, Sakura Finetek Europe BV., Zoeterwaude, Niederlande
- Tolafentrin, Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland
- Trasylol® 500 000 KIE (Aprotinin), Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
- Trental® (Pentoxifyllin), Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Franfurt am Main, Deutschland
- Xylocain® 2% (Lidocain), Astra GmbH, Wedel, Deutschland

## 2.1.3 Geräte und Software

Folgende Geräte kamen zur Anwendung:

- AVL 995-Hb Automatisches Blutgassystem, Radiometer, Copenhagen, Dänemark
- Blutgasanalysegerät OSM2, Hemoximeter®, Radiometer, Copenhagen, Dänemark
- Thermolux® Wärmeunterlage, Witte+Sutor GmbH, Marrhardt, Deutschland
- Nagetierimmobilisator, Broome Rodent Restrainer®, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
- Verstärker Transbridge Transducer Amplifier Manifold, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA
- Braun-Perfusor VI, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Beatmungsgerät Small Animal Ventilator SAR-830/P, Life Science Instruments, Woodland Hills, Kalifornien, USA
- Druckaufnehmer Combitrans Monitoring-Set Med. II, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- PC Intel Pentium
- AD/DA Wandlerkarte PCLD-8115 Wiring Terminal Board
- Labtech Notebook Software V.9.02

## 2.1.4 Verbrauchsmaterial

- Arterieller Guide: Leader cath 20G-8 cm (REF 115.09), Vygon, Ecouen, Frankreich
- Schleusenschlauch: Masterflex® 06409-14 Tygon®, Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich
- Venöse Schleuse: Intradyn<sup>™</sup> Venous Hemostasis Introducer 5F, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Arterieller Zugang: Vasocan® Braunüle® 22G1", Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Schleuse: Vasocan® Braunüle® 14G2", Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Dreiwegehahn Discofix®, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Dreiwegehahn Connecta® Plus3, Ohmeda, Helsingborg, Schweden
- Tubus: Neoject® 15G (gekürzt auf 1,5 cm), Dispomed Witt AG, Gelnhausen, Deutschland
- Rechtsherzkatheter: Neoject® 20G, Dispomed Witt AG, Gelnhausen, Deutschland
- Rechtsherzkatheterschlauch: Tygon® S54HL, Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich
- Alzet® osmotische Minipumpen, Model 2ML2, Durect, Cupertino, USA
- Braun-Perfusorspritzen 50 ml, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Einmalspritzen 1ml/2 ml Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Bindfaden Coats GmbH, Kenzingen, Deutschland
- Combi-Stopper Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Einmalhandschuhe SensiClean® Ansell Surbiton Surrey, UK
- Medizinisches Klebeband Durapore® 3M St. Paul, MN, USA
- Mulltupfer, Beese, Barsbüttel, Deutschland

- Operationsbesteck, Martin Medizintechnik, Tuttlingen, Deutschland
- Perfusor-Leitung 150 cm, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Zellstofftupfer 5x4 cm, Purzellin® Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
- Zellulosehandtücher, Tork, Mannheim, Deutschland
- Zelluloseunterlagen, Tork, Mannheim, Deutschland

## 2.1.5 Histologie

- Parafilm, American National Can, Menasha, Wisconsin, USA
- Urinbecher mit Deckel, 100ml
- Rotationsmikrotom vollautomatisch, RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträgerstrecktisch, HI 1220, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinstreckbad, HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinausgießstation, EG 1140H, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Kühlplatte, EG 1150C, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat, TP 1050, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Stereomikroskop Durchlicht, DMLA, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Digitale Kamera DC 300F, Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
- Ethanol 70%, 96%, 99,6%, vergällt mit Ethylmethylketon, Fischer, Saarbrücken, Deutschland
- Formaldehyd säurefrei  $\geq$  37%, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Resorcin-Fuchsin, Chroma, Münster, Deutschland
- Rotihistol, Roth, Karlsruhe, Deutschland

- Isopropanol 99,8%, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Xylol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30% pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Deckgläser 24x36mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Universal-Einbettkassetten mit Deckel, verschiedenfarbig, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträger Superfrost Plus<sup>®</sup>, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Mikrotomklingen S 35, Feather, Japan
- Paraffin Einbettmedium, Paraplast Plus<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Hämatoxylin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Eosin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Versuchsanordnung

Im Rahmen der Versuchsanordnung wurden Kontrollgruppen gebildet aus Tieren, die am ersten Versuchstag eine zur verwendeten Monocrotalinmenge äquivalente Menge isotoner Kochsalzlösung subkutan in die Nackenfalte injiziert bekamen. Es wurden dann jeweils neun Tiere nach 28 Tagen und neun Tiere nach 42 Tagen zu hämodynamischen Messungen herangezogen zur Ermittlung von je einer gesunden Kontrollgruppe zu diesen zwei verschiedenen Zeitpunkten.

Von den Monocrotalin-behandelten Tieren wurden drei Gruppen gebildet, um den natürlichen Verlauf der pulmonalen Hypertonie in dem Monocrotalin-Rattenmodell zu verschiedenen Zeitpunkten mit hämodynamischen Messungen zu dokumentieren und einen Vergleich mit der Behandlung in den verschiedenen Therapiemodellen zu haben. Hierfür wurden acht Tiere nach 14 Tagen, acht Tiere nach 28 Tagen und acht Tiere nach 42 Tagen untersucht.

Verschiedene Therapiegruppen wurden gebildet. Folgende Therapiearme kamen zur Anwendung:

• Intravenöse Kurzzeitherapie an Tag 28:

Eine Intervention war die Gabe von Iloprost i.v. am Tag 28 bei Monocrotalinbehandelten Versuchstieren. Das Präparat wurde über einen Perfusor kontinuierlich über einen Zeitraum von einer Stunde verabreicht. Folgende Dosierungen kamen zur Anwendung: 1,6; 8; 16 und 80 ng/kg Körpergewicht pro Minute.

Eine weitere Intervention war die Gabe von Tolafentrin i.v. am Tag 28 bei Monocrotalin-behandelten Versuchstieren. Es erfolgte ebenfalls eine Infusion über einen Zeitraum von einer Stunde. Hier kamen folgende Dosierungen zur Anwendung: 0,62; 3,2; 6,2 und 20 µg/kg Körpergewicht pro Minute.

• Intravenöse Dauertherapie:

Eine Gruppe von acht Tieren wurde mit einer intravenösen Gabe von Iloprost in der Dosierung von 9,3 ng/kg Körpergewicht/min dauerbehandelt. Dazu wurde das Präparat über eine osmotische Minipumpe kontinuierlich über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die Implantation der Pumpe wurde am 14. Tag nach Monocrotalin-Injektion durchgeführt, so dass die Therapie vom 14. bis 28. Tag nach Gabe von Monocrotalin erfolgte. Einer Vergleichsgruppe wurden Pumpen implantiert, die mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt waren. Eine Gruppe von neun Tieren wurde mit einer intravenösen Dauertherapie mit Tolafentrin dauerbehandelt. Hierzu erfolgte ebenfalls die Verabreichung des Präparates über eine osmotische Minipumpe kontinuierlich über einen Zeitraum von 14 Tagen in der Dosierung von 625 ng/kg Körpergewicht/min. Auch hier wurden die Pumpen am 14. Tag nach Monocrotalin-Injektion implantiert, so dass die Therapie vom 14. bis 28. Tag nach Gabe von Monocrotalin erfolgte. Eine Versuchsgruppe von zehn Monocrotalinbehandelten Tieren wurde mit einer Kombination von Iloprost i.v. und Tolafentrin i.v. dauerbehandelt. Auch hier wurden die Präparate über eine osmotische

Minipumpe kontinuierlich über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die Implantation der Pumpe wurde ebenfalls am 14. Tag nach Monocrotalin-Injektion durchgeführt, so dass die Therapie vom 14. bis 28. Tag nach Gabe von Monocrotalin erfolgte. Wie in den Behandlungsgruppen mit einem Präparat wurde Iloprost mit 9,3 ng/kg Körpergewicht/min dosiert und Tolafentrin mit 625 ng/kg Körpergewicht/min. Eine zeitlich spätere i.v.-Dauertherapie erfolgte in einer Versuchsgruppe mit sieben Tieren. Auch hier erfolgte die Behandlung mit Iloprost mit 9,3 ng/kg Körpergewicht/min und Tolafentrin mit 625 ng/kg Körpergewicht/min über eine osmotische Minipumpe kontinuierlich über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Implantation der Pumpe wurde am 28. Tag nach Monocrotalin-Injektion durchgeführt, so dass die Therapie vom 28. bis 42. Tag nach Gabe von Monocrotalin erfolgte.

#### 2.2.2 Monocrotalin-Verabreichung

Von dem kristallinen Monocrotalin wurden 250 mg abgewogen und in 3 ml 1N HCl gelöst. Im Anschluss daran wurde die Lösung mit 2 ml 1N NaOH auf einen annähernd isotonen pH-Wert von 7,4 titriert. Diese fertige Monocrotalin-Lösung wurde dann in einer Dosierung von 60mg/kg Körpergewicht den Versuchstieren subkutan injiziert. Die Ratten wurden einzeln gewogen und in einem Immobilisator fixiert. Sie erhielten dann eine subkutane Injektion der fertigen Monocrotalinlösung in einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht in die Nackenfalte. Für die Kontrollgruppe erhielten die Tiere eine subkutane Injektion mit dem gleichen Volumen isotoner Kochsalzlösung. Nach erfolgter Injektion wurden die Tiere in einen frischen Käfig mit frischer Streu, Futter und Wasser überführt. Die benutzte Einstreu und Nahrung wurden gesammelt und der Entsorgung durch Verbrennung zugeführt. Die Ratten erhielten nach der Injektion über die folgenden 14 Tage kontinuierlich Enrofloxacin 2,5% oral in einer Konzentration von 2 ml/500 ml Leitungswasser. Durch diese prophylaktische antibiotische Therapie sollten

opportunistische Infektionen vermieden werden, um die Veränderungen durch die Monocrotalin-Injektion nicht durch z. B. postpneumonische Veränderungen zu verfälschen.

## 2.2.3 Chirurgische Präparation

#### 2.2.3.1 Anästhesie und Lagerung

Zunächst wurden die Versuchstiere in einem Immobilisator fixiert und durch intraperitoneale Injektionen von Pentobarbital (100 mg/kg) und Ketamin (50 mg/kg) anästhesiert. Die Lagerung erfolgte auf Wärmeunterlagen (Thermolux® Wärmeunterlage, Witte+Sutor GmbH, Marrhardt, Deutschland) bei 40°C um eine Auskühlung des Versuchstiers zu verhindern. Im Verlauf des weiteren Versuchs wurde die Anästhesie durch repetitive Gaben von Pentobarbital und Ketamin bedarfsgerecht aufrechterhalten.

#### 2.2.3.2 Tracheotomie und Beatmung

Bei Erreichen völliger Schmerzfreiheit, erkennbar durch Verlust der Schmerz- und Schutzreflexe, wurde nach Desinfektion der Cervikalregion mit Braunol-Lösung eine Quaddel mit 400 µl Lidocain 2% im cervikalen Präparationsgebiet verabreicht. Die Trachea wurde dargestellt, indem die darüberliegende Kutis, Subkutangewebe und Muskelschichten entfernt wurden und die Trachea vom umliegenden Gewebe stumpf Im Anschluss wurde das Versuchstier abgelöst wurde. zwischen zwei Knorpelspangen tracheotomiert, zügig intubiert (Tubus: modifizierter Neoject® 15G, Dispomed Witt AG, Gelnhausen, Deutschland) und an das Beatmungsgerät angeschlossen. Die korrekte Tubuslage vor der Trachealbifurkation wurde mit einer externen Ligatur mit Bindfaden fixiert. Die Beatmung wurde mit einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 3 ml volumenkontrolliert durchgeführt. Ein PEEP von 1,5 cm Wassersäule wurde über die gesamte Versuchslänge hinweg beibehalten.

## 2.2.3.3 Präparation der Gefäße und Einführung der Druckabnehmer

Die rechte Jugularvene wurde dargestellt und mobilisiert, um eine venöse Schleuse einzubringen (gefertigt aus: Intradyn<sup>™</sup> Venous Hemostasis Introducer 5F, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Schleusenschlauch: Masterflex® 06409-14 Tygon®, Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich, Vasocan® Braunüle® 14G2", Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die venöse Schleuse wurde blutdicht fixiert, der kraniale Anteil der Vene wurde ligiert. Über diesen venösen Zugang wurde ein Perfusor mit Pancuronium zur kontinuierlichen Muskelrelaxation angeschlossen. Über diesen venösen Zugang erfolgte in den jeweiligen Behandlungsgruppen die Kurzzeitinfusion von Iloprost, Tolafentrin bzw. Kochsalz. Nach erfolgter Präparation der Vene wurde die linke Arteria carotis communis dargestellt und mobilisiert, ein arterieller Zugang (gefertigt aus: Vasocan® Braunüle® 22G1", Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland und Leader cath 20G-8 cm (REF 115.09), Vygon, Ecouen, Frankreich) wurde eingeführt. Nach Platzierung des arteriellen Zugangs wurde dieser kaudal fixiert, der kraniale Anteil der Arterie ligiert. Schließlich wurde ein Rechstherzkatheter (aus: Neoject® 20G, Dispomed Witt AG, Gelnhausen, Deutschland und Rechtsherzkatheterschlauch: Tygon® S54HL, Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich) über das Rückschlagventil der venösen Schleuse eingebracht und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Da der Katheter mit dem venösen Druckabnehmer verbunden war, konnte durch die kontinuierliche Druckaufzeichung während des Vorschiebens die jeweilige Position des Katheters überprüft werden: Befindet sich der Katheter in der V. jugularis, Vena cava superior oder im rechten Vorhof, so resultiert eine typische dreigipfelige und atemverschiebliche Druckkurve. Bei weiterem Vorschieben des Katheters über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel zeigt sich dann eine pulsatile Druckkurve mit systolischen Spitzenwerten von 20 bis 25 mmHg bei gesunden Ratten.

#### 2.2.4 Hämodynamische Messungen

Über den gesamten Zeitraum der Experimente wurden das Atemminutenvolumen, der rechtsventrikuläre Blutdruck und der systemische arterielle Blutdruck kontinuierlich gemessen. RVP und SAP wurden blutig gemessen über den Rechtsherzkatheter bzw. arteriellen Zugang. Nach Spülung der arteriellen und venösen Zugänge mit 150 µl einer mit Kochsalz verdünnten Heparinlösung (Verdünnung 1:20) wurden diese an die gegen den Luftdruck kalibrierten flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer angeschlossen. Die Druckabnehmer (Combitrans Monitoring-Set Med. II, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) waren an einen Verstärker (Transbridge Transducer Amplifier Manifold, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) angeschlossen. Die Verstärkerdaten wurden über eine AD/DA Wandlerkarte (PCLD-8115 Wiring Terminal Board) auf den Personal Computer übertragen, die Aufzeichnung erfolgte mittels der Software Labtech Notebook V.9.02.

Aus den gewonnenen Versuchsparametern kann schließlich zur weiteren Untersuchung das Herzzeitvolumen (HZV) rechnerisch nach dem Fick-Prinzip bestimmt werden. Hierbei kann das HZV dann über den Quotienten aus der Sauerstoffaufnahme und der Differenz zwischen arterieller und gemischtvenöser Sauerstoffsättigung ermittelt werden (nach Hoeper et al. 1999):

 $HZV = Sauerstoffaufnahme / (arterielle O_2-Sättigung - venöse O_2-Sättigung)$ 

## 2.2.5 Verabreichung von Tolafentrin und Iloprost

Für die Testung der akuten vasodilatatorischen Effekte erfolgte die Gabe der jeweiligen Versuchssubstanz über die venöse Schleuse in die rechte Jugularvene. Die Dauertherapie mit Tolafentrin, Iloprost oder einer kombinierten Gabe erfolgte über eine osmotische Minipumpe (Alzet®, Model 2ML2, Durect, Cupertino, USA). Vor Implantation erfolgte zunächst die Anästhesie der Versuchstiere mit körpergewichtsadaptierter Gabe von Fentanyl und Medetomidin. Es erfolgte, wie oben beschrieben, eine Lagerung auf Wärmeunterlagen. Nach Erreichen völliger

Schmerzfreiheit erfolgte zunächst eine Lagerung der Tiere in Bauchlage. Unter sterilen Bedingungen erfolgte nach Desinfektion und Lokalanästhesie laterocaudal der linken Scapula der Hautschnitt, danach wurde stumpf eine subkutane Tasche zur Implantation der Pumpe präpariert. In diese Tasche wurde die mit der jeweiligen Versuchssubstanz gefüllte osmotische Minipumpe eingesetzt. Im Anschluss wurde, ausgehend von der dorsalen Tasche, ein Tunnel zur Cervikalregion stumpf präpariert. Nach Umlagerung, Desinfektion und Lokalanästhesie der Cervikalregion erfolgte ein Schnitt über der linken Vena jugularis, danach wurde der Verbindungskatheter der Pumpe durch den vorbereiteten Tunnel gezogen. Die Vena jugularis wurde freipräpariert, der Pumpenkatheter wurde in die Vene eingebracht, mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial fixiert und das kraniale Ende der Vene ligiert. Die Hautschnitte wurden mit Einzelknopfnähten oder sterilem Klammermaterial versorgt. Nach Antagonisierung der Narkose mit Nalaxon und Atipamezol wurden die Tiere in Einzelkäfige gebracht und bis zur völligen Erholung weiter engmaschig überwacht.

#### 2.2.6 Probenentnahme und Organpräparation

#### 2.2.6.1 Blutproben

Nachdem die Vorbereitung des Versuchstieres abgeschlossen war, wurde als erster Schritt des Experimentes die erste Blutentnahme durchgeführt, weitere erfolgten im Laufe der Behandlung sowie am Ende des Versuches. Die Proben wurden luftdicht verschlossen und bis zur Analyse kurzzeitig auf Eis zwischengelagert. Es wurden jeweils 200 µl venöses und arterielles Blut entnommen. Die Proben wurden untersucht auf pH-Wert, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> (AVL 995-Hb Automatisches Blutgassystem, AVL Medizintechnik GmbH, Bad Homburg, Deutschland) sowie auf Hämoglobin und Sauerstoffsättigung (Hemoximeter®, Radiometer, Copenhagen, Dänemark).

Am Ende des Experimentes wurden noch 2 ml Blut entnommen und jeweils 0,1 ml Aprotinin und Pentoxifyllin hinzugefügt. Die Probe wurde zentrifugiert, um Material für weiterführende Untersuchungen zu gewinnen.

## 2.2.6.2 Herzaufbereitung

Nach Ende des Experiments wurde das Versuchstier mit 1 ml Xylazin euthanasiert. Danach wurde eine mediane Thorakotomie durchgeführt und Herz und Lunge entnommen. Das Herz wurde an der Basis abgetrennt und die Vorhöfe entfernt. Durch Schnitt entlang des Septums wurde in rechten und linken Ventrikel getrennt, das Septum verblieb am linken Ventrikel. Die Teile wurden gelagert und nach Trocknung (im Brutschrank sieben Tage bei 37°C) gewogen. Mittels der Trockengewichte wurde der Quotient RV\LV+S gebildet, um damit einen Parameter für den Grad der rechtsventrikulären Hypertrophie zu gewinnen.

## 2.2.6.3 Lungenfixierung

Die Pulmonalgefäße wurden mit isotoner Kochsalzlösung gespült, um die Lunge von Blut zu befreien. Nach Trennung an der Trachealbifurkation wurde die linke Lungenhälfte in Formaldehydlösung konserviert zwecks Gewinnung von Material für die Anfertigung von histologischen Schnitten. Die rechte Lunge wurde über die Trachea mit 1-2 ml Tissue Tek® aufgefüllt und dann in Flüssigstickstoff gefroren, um Gewebe für die Untersuchung der Matrixmetalloproteinase zu gewinnen.

## 2.2.7 Histologie

Die in Formaldehydlösung konservierte linke Lunge wurde für die histologische Untersuchung verwendet. Nach Entwässerung erfolgte die Einbettung der Lunge in Paraffinblöcke. Anschließend wurden mit dem Mikrotom Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Über Nacht erfolgt eine Inkubation im Wärmeschrank bei 36°C. Die Färbungen der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) und die Elastica-Färbung wurden nach unten angeführten Protokollen durchgeführt.

## 2.2.7.1 H&E Färbung

- 2 x 10 min, 1 x 5 min Entparaffinieren mit Rotihistol
- Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe: 2 x 5 min mit Ethanol 99,6%,
  5 min mit Ethanol 96%, 5 min mit Ethanol 70%
- 2 min Rehydrieren mit Aqua dest.
- 20 min Färbung mit Hämatoxylin
- 5 min Spülung mit fließendem Leitungswassser
- 1 min Spülung mit Ethanol 99,6%
- 4 min Färbung mit Eosin
- Spülung mit Aqua dest.
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: 2 x 2 min mit Ethanol 96%, 1 x 5 min mit Ethanol 99,6%
- 5 min Behandlung mit Isopropanol 99,8%
- 2 x 5 min Klärung mit Rotihistol
- 5 min Klärung mit Xylol
- Eindecken mit Eindeckmedium und Deckgläschen

## 2.2.7.2 Elastica Färbung

- 2 x 5 min Entparaffinieren mit Xylol
- Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe: jeweils 2 min mit Ethanol 99,6%, Ethanol 96%, Ethanol 70%
- 5 min Färbung mit Resorcin-Fuchsin
- Spülung mit Aqua dest.
- Differenzierung für 30 sec mit HCl-Alkohol 1%ig
- 10 min Spülung mit fließendem Leitungswassser
- Spülung mit Aqua dest.
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: kurze Spülung mit Ethanol 70%, je 2 min mit Ethanol 96% und Ethanol 99,6%
- 2 x 5 min Klärung mit Xylol
- Eindecken mit Eindeckmedium und Deckgläschen

### 2.2.7.3 Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen histologischen Schnitte wurden verblindet ohne Kenntnis der Behandlungsgruppen ausgewertet. Hierfür wurde von jedem Versuchstier 30 bis 40 intraazinäre Arterien kategorisiert als voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert. Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

- voll muskularisiert: mit einer kompletten Muskelschicht der Media
- partiell muskularisiert: mit halbmondförmigem Muskelanteil
- nicht muskularisiert: ohne nachweisbaren Muskelanteil

Darüber hinaus wurde das Verhältnis von Alveolen zu Pulmonalarterien ermittelt. Die Mikroskopie und Photographie wurden mit einem Nikon UFX-II Mikroskop mit einer angeschlossenen Nikon D1 digitalen Spiegelreflexkamera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) bei 100- bis 400-facher Vergrößerung durchgeführt in Anlehnung an die üblichen Auswertungen (Rabinovitch et al. 1981, Cowan et al. 2000).

#### 2.2.8 MMP Western Blot (Immunoblot)

Beim Western Blot oder Immunoblot werden Proteine, in diesem Fall die Matrixmetalloproteinasen 2 und 9, auf eine Trägermembran übertragen und können anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Dafür werden Proteingemische zunächst mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Elektro-Blotting auf eine Membran, in diesem Fall eine PVDF-Membran, transferiert und so immobilisiert. Auf diese Weise fixiert, können die Proteine auf der Membran nachweisbar gemacht werden, z. B. durch den Einsatz spezifischer Antikörper.

Die zu untersuchenden gefrorenen Pulmonalarterien wurden mit einem Gewebehomogenisator in einem Lysepuffer (enthielt 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,6, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 150 mmol/l NaCl, 60 mmol/l NaN<sub>3</sub>, 0,1% Triton X-100) mechanisch zerkleinert. Das Homogenat wurde dann bei 13000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten zentrifugiert. Die Bestimmung der in den Überständen enthaltenen Proteinmengen erfolgte photometrisch nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Hierauf basiert der Bio-Rad Proteinassay (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Fa. Bio-Rad, München, Deutschland). Bei der Bindung von "Coomassie Brilliant Blue G-250" an Proteine erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Unter Verwendung von Standards aus Rinderserumalbumin wurde eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt. Auf dieser Proteinmengenbestimmung basierend wurden die Proteinkonzentrationen der Proben einander angeglichen und zur Bestätigung ein Western Blot für das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Nun wurden die Proben, die gleiche Mengen an Protein enthielten (10 µg für MMP-2 bzw. 30 µg für MMP-9), durch Erhitzen für zehn Minuten auf 95°C mit Lämmlipuffer (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1% Sodiumdodecylsulfat, 0,008% Bromphenolblau) unter Zugabe von 5% β-Mercaptoethanol denaturiert. Nach Denaturierung der Proteine lagert sich das SDS an die Proteine an, so dass diese eine gleich negative Ladung erhalten und dann in der Elektrophorese unabhängig von der Ausgangsladung je nach Molekulargewicht aufgetrennt werden, da die größeren Moleküle langsamer zur Anode laufen als kleinere. So wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5% SDS-Gel) bei 100 Volt getrennt. Unter Verwendung einer Semi-Dry Transfer Einheit wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Der elektrophoretische Transfer wurde für 2 h bei 100 mA durchgeführt. Nach Transfer der Proteine erfolgt der immunologische Nachweis durch spezielle Antikörper. Der erste Antikörper kann dabei spezifisch an das gesuchte Protein binden. An den ersten Antikörper bindet dann wiederum der zweite, an eine Peroxidase gekoppelte Antikörper. Zunächst wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockierlösung inkubiert (5% Magermilch in TBST). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (0,3 und 0,2 µg/ml polyklonale Kaninchen-IgG-Antikörper gegen Ratten-MMP-2 und Ratten-MMP-9) über Nacht bei 4 °C. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1/7500 Verdünnung von Meerrettichperoxidase-markierten Anti-Ratten IgG-Ziegen, Abcam LTD, Cambidge, Antikörpern aus Großbritannien). Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol und entsprechenden Derivaten in die oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Visualisierung erfolgte über ein Chemolumineszenz-Detektionssystem (Amersham Corp., Arlington Heights, USA). Die Filme wurden mit üblichen phototechnischen Methoden entwickelt, die Quantifizierung der Chemoluminiszenz-Signale erfolgte mit Densitometrie und einer entsprechenden Auswertungssoftware.

# 2.2.9 Gelatinzymographie

Die Zymographie ist eine Technik zur Detektion von Enzymaktivitäten, die auf der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese basiert. Dabei wird das Polyacrylamid-Gel mit einem Substrat copolymerisiert. Mit der Gelatinzymographie ist eine Aktivitätsund Größenbestimmung von gelatineverdauenden Proteasen möglich. Hierfür wird einem SDS-PAGE-Gel vor der Polymerisation Gelatine hinzugefügt. Die Gelatine dient als Substrat für die in den Proben vorhandenen Proteasen, welche Gelatine spezifisch verdauen. Die Pulmonalarterien wurden bei 4°C homogenisiert in einem Lysepuffer (enthielt 1% Triton X-100, 150 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l Tetrasodium Pyrophosphat, 1 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphat, 10  $\mu$ mol/l E-64, 20 mmol/l Tris-HCl pH 7,5). Bei der Zymographie werden die Proben wie bei der Standard SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verarbeitet, jedoch ohne Erhitzen, und ohne reduzierende Zusätze. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einem 10%-Polyacrylamid-Gel mit Zugabe von Gelatine (1 mg/ml) bei 4°C. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für eine Stunde inkubiert bei 25°C in 2,5% Triton X-100 Lösung. Das Gel wurde dann zweimal für jeweils 20 Minuten mit Wasser gewaschen. Durch das Entfernen des SDS mit dem Detergenz und den anschließenden Waschschritten ist eine Renaturierung der Enzyme möglich, so dass diese wieder ihre Tertiärstruktur erlangen und somit ihre enzymatische Aktivität als Gelatinasen. Der Gelatineverdau findet während eines anschließenden Inkubationsschrittes in einem physiologischen Puffer statt. Nach dem Waschen wird das Gel über Nacht bei 37°C in einem Puffer inkubiert (0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, mit 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>). Das Gel wurde dann für eine Stunde in einer Fixierlösung mit 40% Methanol und 7% Essigsäure fixiert. Durch eine Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau kann die im Gel enthaltene Gelatine gefärbt werden, während die Zonen gelatinolytischer Aktivität ungefärbt bleiben. Dafür wurde das Gel mit 0,25% Coomassie-Brilliant-Blau R250 für eine Stunde gefärbt. Dadurch werden die Zonen, in denen Gelatineverdau stattgefunden hat, als klare Banden gegen den dunkelblauen Hintergrund dargestellt. Dafür wurde nach der Färbung das Gel mit einer Lösung mit 10% Methanol und 7% Essigsäure behandelt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Biodoc Analyzer (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland), so dass die Aktivität der MMP-2 und MMP-9 durch den Gelatineverdau als helle Banden vor dem dunklen Hintergrund erscheinen.

# 2.2.10 Statistische Datenanalyse

Aus den ermittelten Daten der jeweiligen Versuchsgruppen wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung errechnet. Anhand dieser Daten wurden die Versuchsgruppen durch Varianzanalyse und den Student-Newman-Keuls post hoc Test für multiple Vergleiche untersucht. Dabei wurde ein p-Wert von < 0,05 als signifikant angesehen. Die Überlebensraten wurden dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve und mittels log-Rang-Test verglichen, auch hierbei wurde ein Signifikanzniveau von < 0,05 angenommen.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Monocrotalin-behandelte Ratten

28 Tage nach Monocrotalin-Injektion zeigte sich bei den Versuchstieren (n = 8) ein signifikant erhöhter mittlerer rechtsventrikulärer systolischer Druck (62,9  $\pm$  3,4 mmHg) verglichen mit Kontrolltieren nach Kochsalzinjektion (25,8  $\pm$  2,0 mmHg; n=9). Im Verlauf stieg der RVSP weiter signifikant an (70,5  $\pm$  7,4 mmHg nach 42 Tagen; n=8). 14 Tage nach Monocrotalin-Injektion waren bereits tendenziell höhere rechtsventrikuläre systolische Drücke zu messen (vergleiche Abbildung 3.1).



<u>Abbildung 3.1:</u> Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Die invasive Druckmessung (Einführen eines Katheters über die Jugularvene in den rechten Ventrikel in tiefer Narkose) fand an gesunden Ratten sowie an Ratten 14, 28 und 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion statt. Dargestellt sind Mittelwerte des RVSP in mmHG  $\pm$  SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Die Aufarbeitung der Herzen der Versuchstiere erfolgte anhand der Trockengewichte mit dem Quotienten RV\LV+S, um einen Parameter für den Grad der rechtsventrikulären Hypertrophie zu gewinnen. Verglichen mit dem mittleren Quotienten von  $0,29 \pm 0,01$  bei den Kontrolltieren zeigte sich ein signifikanter Anstieg des mittleren Quotienten bei den Monocrotalin-behandelten Tieren nach 28 Tagen auf  $0,52 \pm 0,03$ . Im weiteren Verlauf war dann auch bei den MCT-behandelten Tieren nach 42 Tagen ein signifikanter Anstieg auf durchschnittlich  $0,71 \pm 0,07$  zu verzeichnen. 14 Tage nach der Monocrotalin-Injektion waren tendenziell höhere Quotienten zu messen (im Mittel  $0,33 \pm 0,02$ , vergleiche Abbildung 3.2).



<u>Abbildung 3.2:</u> Darstellung des Quotienten des Trockengewichtes des rechten Ventrikels durch die Summe der Trockengewichte aus linkem Ventrikel plus Septum bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte des RV\LV+S ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Der Herzindex betrug bei Kontrolltieren im Mittel 37,0  $\pm$  4,1 ml/min/100 g Körpergewicht. Hier zeigten sich bei den Monocrotalin-behandelten Tieren signifikant erniedrigte Werte von durchschnittlich 28,9  $\pm$  2,4 ml/min/100 g nach 28 Tagen sowie durchschnittlich 29,5  $\pm$  1,8 ml/min/100 g nach 42 Tagen (vergleiche Abbildung 3.3). Nach 14 Tagen lag der Herzindex tendenziell niedriger mit 33,4  $\pm$  5,4 ml/min/100 g.



Abbildung 3.3: Darstellung des Herzindex (CI) bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte des CI in ml/min/100 g Körpergewicht ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Die systemischen arteriellen Blutdruckwerte lagen bei der Kontrollgruppe im Mittel bei 134  $\pm$  5 mmHg. 14 Tage nach Monocrotalin-Injektion betrug der SAP im Mittel 114,5  $\pm$  9 mmHg. Nach 28 Tagen zeigte sich bei den behandelten Tieren ein durchschnittlicher SAP von 110,6  $\pm$  5,7 mmHg, nach 42 Tagen ein durchschnittlicher SAP von 106,5  $\pm$  12,5 mmHg. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant (vergleiche Abbildung 3.4).



<u>Abbildung 3.4:</u> Darstellung des systemischen arteriellen Druckes (SAP) bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte des SAP in mmHG ± SEM.

Die mittlere arterielle Sauerstoffsättigung/FiO<sub>2</sub> (Oxygenierungsindex nach Horowitz) als Maß der Lungenschädigung der Kontrolltiere lag bei 410  $\pm$  25 mmHg. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion auf im Mittel 307  $\pm$  17 mmHg bei den behandelten Tieren nach 28 Tagen. Nach 14 Tagen fanden sich verglichen mit den Kontrollen tendenziell niedrigere Werte von durchschnittlich 350  $\pm$  30 mmHg, nach 42 Tagen fanden sich ebenfalls verglichen mit den Kontrollen tendenziell niedrigere Werte von durchschnittlich 350  $\pm$  30 mmHg, nach 42 Tagen fanden sich ebenfalls verglichen mit den Kontrollen tendenziell niedrigere Werte von durchschnittlich 325  $\pm$  58 mmHg (vergleiche Abbildung 3.5).



<u>Abbildung 3.5:</u> Darstellung des Oxygenierungsindex nach Horowitz (Quotient aus  $paO_2$  und  $FiO_2$ ) bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte des Oxygenierungsindex in mmHg ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Die zentralvenöse Sauerstoffsättigung betrug bei den Kontrolltieren im Mittel 0,70  $\pm$  0,02%. Hier fand sich bei den MCT-behandelten Tieren nach 14 Tagen eine tendenziell niedrigere mittlere zentralvenöse Sättigung von 0,56  $\pm$  0,07%, nach 28 Tagen eine signifikant niedrigere mittlere zentralvenöse Sättigung von 0,54  $\pm$  0,03%. Nach 42 Tagen zeigte sich weiterhin eine verglichen mit den Kontrolltieren signifikant erniedrigte mittlere zentralvenöse Sauerstoffsättigung 0,52  $\pm$  0,06% (vergleiche Abbildung 3.6).



<u>Abbildung 3.6</u>: Darstellung der zentralvenösen Sauerstoffsättigung bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte der zentralvenösen Sauerstoffsättigung in Prozent ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Das Körpergewicht der Kontrolltiere betrug im Mittel  $480 \pm 12$  Gramm. Hier zeigte sich ein signifikant niedriges mittleres Körpergewicht der Monocrotalin-behandelten Versuchstiere nach 14 Tagen mit  $400 \pm 11$  Gramm und nach 28 Tagen mit  $400 \pm 163$  Gramm. Im Verlauf kam es dann zu einer weiteren Abnahme bei den MCT-behandelten Tieren auf  $372 \pm 25$  Gramm nach 42 Tagen (vergleiche Abbildung 3.7).



<u>Abbildung 3.7:</u> Darstellung des Körpergewichtes (KG) bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte des Körpergewichtes in Gramm  $\pm$  SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Von den Kontrolltieren überlebten alle die vorgesehene Zeit bis zur hämodynamischen Testung von 28 bzw. 42 Tagen. Bei den MCT-behandelten Tieren überlebten alle die ersten 14 Tage nach MCT-Gabe (8 von 8 Tieren). In den weiteren Gruppen mit MCT-behandelten Tieren kam es zu einem Abfall der Überlebensrate auf 80% nach 28 Tagen (8 von 10 Tieren) und auf 60% nach 42 Tagen (8 von 13 Tieren, vergleiche Abbildung 3.8).



<u>Abbildung 3.8:</u> Darstellung der Überlebensrate bei Kontrollen und nach Monocrotalin-Gabe. Dargestellt sind die Überlebensraten in Prozent.

Bei den mit Monocrotalin behandelten Versuchstieren zeigte sich parallel zu den hämodynamischen Veränderungen auch eine signifikante Mediahypertrophie der pulmonalen Blutgefäße (vergleiche Abbildung 3.9).



<u>Abbildung 3.9:</u> H&E Elastica Färbung von paraffineingebettetem Lungengewebe bei Kontrollen und 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion. A: Kontrolle, Bronchiolus mit begleitender peribronchialer Arterie. Ausschnittsvergrößerung: Kleine intrapulmonale Arterie. B: Peribronchiale Arterie 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion. Deutlich verdickte Arterienwand mit hypertrophierter Media und Endothelläsionen. Ausschnittsvergrößerung: Massiv verdickte Media in einer kleinen Arterie im Lungenparenchym.

Die Behandlung mit Monocrotalin führte zu einem signifikanten Anstieg der Muskularisation der distalen Pulmonalarterien (vergleiche Abbildung 3.10). Bei den unbehandelten Kontrolltieren fanden sich im Mittel 73% nicht muskularisierte, 17% partiell muskularisierte und 10% muskularisierte Arterien. 14 Tage nach Monocrotalin-Behandlung fiel der Anteil der nicht muskularisierten Arterien auf 57%, der Anteil partiell muskularisierter stieg auf 20% und der Anteil muskularisierter auf 23%. 28 Tage nach der Monocrotalin-Gabe waren noch 8% nicht muskularisierte Arterien zu finden, der Anteil partiell muskularisierter lag bei 26% und der Anteil muskularisierter bei 66%. 42 Tage nach Monocrotalin-Behandlung waren dann noch 7% nicht muskularisierte Arterien zu finden, 13% partiell muskularisierte und 80% muskularisierte Pulmonalarterien. Es wurden jeweils 30-40 intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier hinsichtlich des Muskularisierungsgrades ausgewertet.



<u>Abbildung 3.10:</u> Darstellung des Muskularisierungsgrades der Pulmonalarterien bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind die mittleren Anteile muskularisierter, partiell muskularisierter und nicht muskularisierter Pulmonalarterien in %. Ausgewertet wurden jeweils 30-40 intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Durch die Behandlung der Versuchstiere mit Monocrotalin kam es zu einer Verminderung der Anzahl der peripheren Pulmonalarterien (vergleiche Abbildung 3.11). Es wurde zur Quantifizierung das Verhältnis von Alveolen zu Pulmonalarterien ermittelt, d. h. ein steigender Quotient entspricht einer Rarefizierung der Pulmonalgefäße. Bei den Kontrolltieren betrug das mittlere Verhältnis Alveolen zu Pulmonalarterien 13,0  $\pm$  2,1. 14 Tage nach Monocrotalin-Behandlung betrug das Verhältnis im Mittel 12,8  $\pm$  1,8. 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion war das Verhältnis dann signifikant gestiegen auf durchschnittlich 23,0  $\pm$  2, nach 42 Tagen signifikant auf durchschnittlich 27,0  $\pm$  2,6.



<u>Abbildung 3.11:</u> Darstellung des Quotienten von Alveolen zu Pulmonalarterien bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt ist der mittlere Quotient ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen.

Durch die Behandlung mit Monocrotalin kam es im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren zu einem verstärkten Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 (vergleiche Abbildung 3.12)



<u>Abbildung 3.12:</u> Autoradiogramme von Immunoblots der MMP-2 und MMP-9 bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Immunoblots von n = 4 pro Gruppe und der Blot des Haushaltsgens GAPDH.

Diese verstärkte Expression der Matrixmetalloproteinase 2 stieg im Zeitverlauf nach Monocrotalin-Injektion kontinuierlich an (vergleiche Abbildung 3.13).



<u>Abbildung 3.13:</u> Darstellung der MMP-2 Expression bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt ist die MMP-2 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen.

Auch die vermehrte Expression der MMP-9 stieg im Laufe der Zeit nach MCT-Gabe kontinuierlich an (vergleiche Abbildung 3.14).



<u>Abbildung 3.14:</u> Darstellung der MMP-9 Expression bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt ist die MMP-9 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \*\* p<0,01 gegen Kontrollen. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen.

In der Gelatinzymographie zeigte sich eine erhöhte gelatinolytische Aktivität. Hier war die MMP-2 die stärkste Fraktion. Die am häufigsten vorkommende Form der MMP-2 lag bei 62 kDa, weitere Formen lagen bei 66 und 59 kDa (vergleiche Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16).



<u>Abbildung 3.15:</u> Darstellung der MMP-2 Aktivität bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt ist eine repräsentative Gelatinzymographie von n = 4 pro Gruppe.



<u>Abbildung 3.16</u>: Darstellung der MMP-2 Aktivität bei Kontrollen und Monocrotalin-Gruppen. Dargestellt ist die MMP-2 Aktivität bezogen auf die Aktivität bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \* p<0,05 gegen Kontrollen. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen.

## 3.2 Monocrotalin-behandelte Ratten mit intravenöser Kurzzeittherapie

28 Tage nach Monocrotalin-Injektion erfolgte bei einer Gruppe die Testung der Hämodynamik während einer einstündigen intravenösen Infusion von Iloprost mit Dosierungen von 1,6; 8; 16 und 80 ng/kg Körpergewicht pro Minute (n = 6 pro Dosierung). Eine weitere Gruppe von MCT-behandelten Tieren erhielt nach 28 Tagen eine einstündige i.v.-Infusion von Tolafentrin. Hier kamen folgende Dosierungen zur Anwendung: 0,62; 3,2; 6,2 und 20  $\mu$ g/kg Körpergewicht pro Minute mit jeweils sechs Tieren pro Dosierung. Es zeigte sich sowohl bei der Versuchsgruppe mit Iloprost als auch bei der Gruppe mit Tolafentrin eine dosisabhängige Reduktion des rechtsventrikulären systolischen Druckes. Darüber hinaus fand sich ein dosisabhängiger Abfall des systemischen arteriellen Druckes sowie ein entsprechender dosisabhängiger Anstieg des Herzindex (vergleiche Abbildung 3.17 und 3.18).



<u>Abbildung 3.17:</u> Darstellung der dosisabhängigen Veränderungen von RVSP, SAP und CI bei Monocrotalin-behandelten Tieren während einer einstündigen Infusion von Iloprost in verschiedenen Dosierungen 28 Tage nach MCT-Injektion. Dargestellt sind die jeweiligen Veränderungen zum Ausgangswert in Prozent ± SEM.



<u>Abbildung 3.18:</u> Darstellung der dosisabhängigen Veränderungen von RVSP, SAP und CI bei Monocrotalin-behandelten Tieren während einer einstündigen Infusion von Tolafentrin in verschiedenen Dosierungen 28 Tage nach MCT-Injektion. Dargestellt sind die jeweiligen Veränderungen zum Ausgangswert in Prozent  $\pm$  SEM.

# 3.3 Monocrotalin-behandelte Ratten mit i.v.-Dauertherapie, Tag 14-28

Bei den MCT-behandelten Tieren, die 14 Tage nach Monocrotalin-Injektion eine intravenöse Dauertherapie durch eine implantierte osmotische Minipumpe über 14 Tage erhielten, zeigte sich verglichen mit MCT-behandelten Tieren mit Kochsalzinfusion bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost ein signifikanter Rückgang des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druck auf 42,4  $\pm$  3,1 mmHg. Bei der Therapiegruppe mit i.v.-Dauertherapie mit Tolafentrin zeigte sich verglichen mit MCT-behandelten Tieren mit Kochsalzinfusion ein ebenfalls signifikanter Rückgang des durchschnittlichen rechtsventrikulären systolischen Druck auf im Mittel 37,6  $\pm$  3,0 mmHg. Die i.v.-Kombinationstherapie mit Iloprost und Tolafentrin erbrachte eine Senkung des RVSP auf durchschnittlich 25,1  $\pm$  1



mmHg, was einer Normalisierung mit einem vergleichbaren Druck auf dem Niveau von gesunden Kontrolltieren entspricht (vergleiche Abbildung 3.19).

<u>Abbildung 3.19:</u> Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des RVSP in mmHG  $\pm$ SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d, † p<0,05 gegen MCT Iloprost

Bei der Behandlungsgruppe von MCT-Tieren mit Iloprost-Dauerinfusion von Tag 14 bis 28 zeigte sich ein signifikant niedrigerer durchschnittlicher Quotient von RV/LV+S (0,37  $\pm$  0,03) verglichen mit MCT-behandelten Tieren mit Kochsalzinfusion. Auch bei der Therapiegruppe mit i.v.-Dauertherapie mit Tolafentrin zeigte sich ein signifikant niedrigerer mittlerer Quotient RV/LV+S von 0,38  $\pm$  0,04. Der Quotient RV/LV+S zeigte sich bei der Behandlungsgruppe mit Kombination von Iloprost und Tolafentrin mit durchschnittlich 0,29  $\pm$  0,01 auf dem niedrigen Niveau von gesunden Kontrolltieren (0,29  $\pm$  0,01, vergleiche Abbildung 3.20).



<u>Abbildung 3.20:</u> Darstellung des Quotienten des Trockengewichtes des rechten Ventrikels durch linken Ventrikel plus Septum 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des RV\LV+S ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d, † p<0,05 gegen MCT Iloprost.

Der Herzindex zeigte sich bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost-Dauerinfusion bei MCT-Ratten von Tag 14-28 nicht signifikant verändert mit durchschnittlich  $33,3 \pm 2,6$  ml/min/100 g Körpergewicht. Sowohl bei der Gruppe mit alleiniger Tolafentrin-Behandlung stieg der mittlere Herzindex signifikant an  $(42,2 \pm 4,2 \text{ ml/min/100 g}$  Körpergewicht) als auch bei der Gruppe mit Kombinationstherapie mit Iloprost und Tolafentrin  $(42,0 \pm 4,1)$ , sogar auf höhere Werte als bei der Kontrollgruppe gesunder Tiere  $(37,0 \pm 4,1 \text{ ml/min/100 g}$  Körpergewicht, vergleiche Abbildung 3.21).



<u>Abbildung 3.21:</u> Darstellung des Herzindex (CI) 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des CI in ml/min/100 g Körpergewicht ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d.

Die systemischen arteriellen Blutdruckwerte lagen bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost am Tag 28 im Mittel bei 129.8  $\pm$  6.6 mmHg. Bei den mit Tolafentrin behandelten MCT-Tieren lag der SAP 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion im Mittel bei 101,4  $\pm$  9 mmHg. Bei der kombinierten Behandlungsgruppe mit Iloprost und Tolafentrin betrug der mittlere SAP am Tag 28 119  $\pm$  9 mmHg, diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant (vergleiche Abbildung 3.22).



<u>Abbildung 3.22:</u> Darstellung des systemischen arteriellen Druckes (SAP) 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des SAP in mmHG ± SEM.

Der Oxygenierungsindex nach Horowitz zeigte sich bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost-Dauerinfusion bei MCT-Ratten von Tag 14 bis 28 nicht signifikant verändert mit durchschnittlich  $332 \pm 45$  mmHg. Auch bei der Gruppe mit Tolafentrin-Dauerinfusion (365  $\pm$  21 mmHg) fand sich kein signifikanter Unterschied zum durchschnittlichen Wert der MCT-behandelten Tiere am Tag 28 (307  $\pm$  17,0 mmHg). Bei der Gruppe mit Kombinationstherapie mit Iloprost und Tolafentrin zeigte sich mit durchschnittlich 391  $\pm$  5 mmHg eine Normalisierung verglichen mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe gesunder Tiere (410  $\pm$  25 mmHg, vergleiche Abbildung 3.23).



<u>Abbildung 3.23:</u> Darstellung des Oxygenierungsindex nach Horowitz (Quotient aus  $pO_2$  und  $FiO_2$ ) 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des  $paO_2/FiO_2$  in mmHg ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d.

Die zentralvenöse Sauerstoffsättigung betrug bei den mit Iloprost-Dauerinfusion von Tag 14 bis 28 behandelten MCT-Tieren im Mittel 0,59  $\pm$  0,04%. Bei den mit Tolafentrin-Dauerinfusion behandelten MCT-Tieren zeigte sich am Tag 28 eine durchschnittliche zentralvenöse Sättigung von 0,64  $\pm$  0,06%. Bei der Behandlungsgruppe mit kombinierter Therapie mit Iloprost und Tolafentrin lag am Tag 28 die zentralvenöse Sättigung durchschnittlich bei 0,62  $\pm$  0,06% (vergleiche Abbildung 3.24).



<u>Abbildung 3.24:</u> Darstellung der zentralvenösen Sauerstoffsättigung 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte der zentralvenösen Sauerstoffsättigung in Prozent ± SEM.

Bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost zeigte sich nach Dauerinfusion von Tag 28 bis Tag 42 ein durchschnittliches Körpergewicht von 386  $\pm$  16 Gramm. Bei der Behandlungsgruppe mit Tolafentrin-Dauerinfusion lag das durchschnittliche Körpergewicht am Tag 28 bei 377,5  $\pm$  17,5 Gramm, bei der kombinierten Behandlungsgruppe bei 397,5  $\pm$  6,3 Gramm (vergleiche Abbildung 3.25).



<u>Abbildung 3.25:</u> Darstellung des Körpergewichtes 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des Körpergewichtes in Gramm ± SEM.

Bei den MCT-behandelten Tieren mit 14-tägiger Dauerinfusion von Iloprost überlebten 80% der Tiere bis zum Ende der Behandlungszeit am Tag 28 (8 von 10 Tieren). Bei der Behandlungsgruppe mit Tolafentrin von MCT-behandelten Tieren überlebten 90% der Versuchstiere (9 von 10 Tieren). Bei der kombinierten Behandlungsgruppe stieg die Überlebensrate auf 100% (10 von 10 Tieren), damit wieder auf das Vergleichsniveau gesunder Kontrolltiere, allerdings ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz aufwiesen (vergleiche Abbildung 3.26).



<u>Abbildung 3.26:</u> Darstellung der Überlebensrate 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind die Überlebensraten in Prozent.

Alle Behandlungsregime führten bei den mit Monocrotalin behandelten Tieren zu einer signifikanten Abnahme der Muskularisation der distalen Pulmonalarterien (vergleiche Abbildung 3.27). Bei den unbehandelten Kontrolltieren fanden sich im Mittel 73% nicht muskularisierte, 17% partiell muskularisierte und 10% muskularisierte Arterien. 28 Tage nach der Monocrotalin-Gabe waren durchschnittlich noch 8% der Arterien nicht muskularisiert, der Anteil partiell muskularisierter lag bei 26% und der Anteil muskularisierter bei 66%. Bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost zeigten sich im Mittel 56% nicht muskularisierte Arterien, 23% partiell muskularisierte und 21% muskularisierte Pulmonalarterien. Bei der Behandlungsgruppe mit Tolafentrin lag der Anteil nicht muskularisierter Arterien durchschnittlich bei 62%, 21% waren partiell muskularisiert und 17% muskularisierte Pulmonalarterien. Bei der kombinierten Behandlungsgruppe mit Iloprost und Tolafentrin von Tag 14 bis 28 waren durchschnittlich 64% nicht muskularisierte Arterien zu finden, 23% partiell muskularisierte und 13% muskularisierte Pulmonalarterien. Es wurden jeweils 30-40 intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier hinsichtlich des Muskularisierungsgrades ausgewertet.



<u>Abbildung 3.27:</u> Darstellung des Muskularisierungsgrades der Pulmonalarterien 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind die mittleren Anteile muskularisierter, partiell muskularisierter und nicht muskularisierter Pulmonalarterien in %. Ausgewertet wurden jeweils 30-40 intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier. \* p<0,05 gegen MCT 28 d.

Der durchschnittliche Quotient von Alveolen und Pulmonalarterien fiel in den Behandlungsgruppen signifikant ab, d. h. durch die Therapieregime kam es zu einer signifikanten Verminderung des durch Monocrotalin verursachten Verlust an Pulmonalgefäßen. 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion betrug das durchschnittliche Verhältnis von Alveolen zu Pulmonalarterien durchschnittlich 23,0  $\pm$  2. Bei der Behandlungsgruppe mit Iloprost fiel der durchschnittliche Quotient am Tag 28 signifikant ab auf 17,0  $\pm$  1,8, bei der Behandlungsgruppe mit Tolafentrin fiel er signifikant ab auf 16,0  $\pm$  1,6, bei der kombinierten Behandlungsgruppe mit Iloprost und Tolafentrin fiel er signifikant ab auf 14,0  $\pm$  1,3 (vergleiche Abbildung 3.28).



<u>Abbildung 3.28:</u> Darstellung des Quotienten von Alveolen zu Pulmonalarterien 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist der mittlere Quotient ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d.

Durch die unterschiedlichen Therapieregime der mit Monocrotalin-behandelten Versuchstiere kam es verglichen mit unbehandelten MCT-Tieren zu einer Abnahme der MMP-2 und MMP-9 Expression, die statistisch signifikant war (vergleiche Abbildung 3.29).



<u>Abbildung 3.29:</u> Autoradiogramme von Immunoblots der MMP-2 und MMP-9 28 Tage nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Immunoblots von n = 4 pro Gruppe und der Blot des Haushaltsgens GAPDH.

Die verschiedenen Therapieregime als Dauerinfusion von Tag 14 bis Tag 28 nach Monocrotalin-Injektion führten zu einer signifikanten Abnahme der MMP-2-Expression (vergleiche Abbildung 3.30). Ebenso kam es zu einer signifikanten Abnahme der MMP-9-Expression, die stärkste Reduktion mit Normalisierung der Werte zeigte sich bei der kombinierten Behandlungsgruppe mit Iloprost und Tolafentrin (vergleiche Abbildung 3.31).



<u>Abbildung 3.30:</u> Darstellung der MMP-2 Expression nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-2 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen. ††p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.



<u>Abbildung 3.31:</u> Darstellung der MMP-9 Expression nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-9 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen, ††p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.

In der Gelatinzymographie zeigte sich eine signifikant erniedrigte gelatinolytische Aktivität in den verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen mit den MCT-Tieren am Tag 28 (vergleiche Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33).



<u>Abbildung 3.32:</u> Darstellung der MMP-2 Aktivität nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist eine repräsentative Gelatinzymographie von n = 4 pro Gruppe.



<u>Abbildung 3.33:</u> Darstellung der MMP-2 Aktivität nach MCT-Injektion, bei Behandlungsgruppen von Tag 14 bis Tag 28 mit Dauertherapie von Iloprost, Tolafentrin oder Kombinationstherapie und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-2 Aktivität bezogen auf die Aktivität bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen, ††p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.

### 3.4 Monocrotalin-behandelte Ratten mit i.v.-Dauertherapie, Tag 28-42

Die kombinierte Therapie mit Iloprost und Tolafentrin als kontinuierliche i. v. – Dauertherapie bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 erbrachte eine signifikante Senkung des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druckes auf  $50,6 \pm 2,3$  mmHg verglichen mit der Kontrollgruppe der MCT-behandelten Tiere am Tag 42, die im Mittel einen rechtsventrikulären systolischen Druckes von  $70,5 \pm 7,5$ mmHg aufwiesen. Auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe der MCT-behandelten Tiere am Tag 28, bei der sich ein mittlerer RVSP von  $62,9 \pm 3,4$  mmHg zeigte, war die Reduktion statistisch signifikant (vergleiche Abbildung 3.34).



<u>Abbildung 3.34:</u> Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des RVSP in mmHG ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28d, † p<0,05 gegen MCT 42d.

Bei der Behandlungsgruppe von MCT-Tieren mit kombinierter Dauerinfusion von Tag 28 bis 42 zeigte sich ein signifikant niedrigerer durchschnittlicher Quotient von RV/LV+S (0,55  $\pm$  0,02) verglichen mit der Kontrollgruppe von MCT-behandelten Tieren am Tag 42, bei der sich ein mittlerer Quotient RV/LV+S von 0,71  $\pm$  0,07 fand (vergleiche Abbildung 3.35).



<u>Abbildung 3.35:</u> Darstellung des Quotienten des Trockengewichtes des rechten Ventrikels durch linken Ventrikel plus Septum 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des RV\LV+S ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 42d.

Der Herzindex zeigte sich bei der Behandlungsgruppe mit kombinierter Dauerinfusion bei MCT-Ratten von Tag 28 bis 42 signifikant höher mit durchschnittlich 46,9  $\pm$  8,2 ml/min/100 g Körpergewicht als bei der MCT-Kontrollgruppe am Tag 42 mit 29,5  $\pm$  1,8. Auch verglichen mit den MCT-Kontrolltieren am Tag 28 (28,9  $\pm$  2,4 ml/min/100 g Körpergewicht) zeigte sich ein signifikant höherer Wert, der sogar die Werte der Kontrollgruppe gesunder Tiere  $(37,0 \pm 4,1 \text{ ml/min/100 g Körpergewicht})$  überstieg (vergleiche Abbildung 3.36).



<u>Abbildung 3.36</u>: Darstellung des Herzindex (CI) 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des CI in ml/min/100 g Körpergewicht ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28d, † p<0,05 gegen MCT 42d.

Der systemische arterielle Druck lag bei der Behandlungsgruppe von MCT-Tieren mit Kombination von Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis Tag 42 bei durchschnittlich 94  $\pm$  13 mmHg. Damit unterschied er sich nicht signifikant zu den verschiedenen Kontrollgruppen (vergleiche Abbildung 3.37).



<u>Abbildung 3.37:</u> Darstellung des systemischen arteriellen Druckes (SAP) 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des SAP in mmHG ± SEM.

Der Oxygenierungsindex nach Horowitz (arterieller Sauerstoffpartialdruck/FiO<sub>2</sub>) zeigte sich bei der Behandlungsgruppe mit kombinierter Dauerinfusion bei MCT-Ratten von Tag 28 bis 42 nicht signifikant verändert mit durchschnittlich  $352 \pm 38$  mmHg verglichen mit der MCT- Kontrollgruppe am Tag 42 ( $325 \pm 58$  mmHg, vergleiche Abbildung 3.38).


<u>Abbildung 3.38:</u> Darstellung des Darstellung des Oxygenierungsindex nach Horowitz (Quotient aus  $pO_2$  und FiO<sub>2</sub>) 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des  $paO_2/FiO_2$  in mmHg ± SEM.

Die zentralvenöse Sauerstoffsättigung unterschied sich nicht signifikant in den verschiedenen Gruppen, bei der Behandlungsgruppe mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin zeigte sich eine mittlere zentralvenöse Sauerstoffsättigung von  $0,62 \pm 0,06\%$ , bei der Kontrollgruppe von MCT-Tieren am Tag 42 lag die mittlere zentralvenöse Sättigung bei  $0,53 \pm 0,06\%$  (vergleiche Abbildung 3.39).



<u>Abbildung 3.39:</u> Darstellung der zentralvenösen Sauerstoffsättigung 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte der zentralvenösen Sauerstoffsättigung in Prozent ± SEM.

Das Körpergewicht der Monocrotalin-behandelten Versuchstiere mit kombinierter Dauerinfusion von Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis Tag 42 lag bei durchschnittlich 395  $\pm$  10 Gramm. Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe der MCT-Tiere am Tag 42 kein signifikanter Unterschied (372  $\pm$  25 Gramm, vergleiche Abbildung 3.40)



<u>Abbildung 3.40:</u> Darstellung des Körpergewichtes (KG) 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte des Körpergewichtes in Gramm ± SEM.

Bei den MCT-behandelten Tieren mit 14-tägiger Dauerinfusion von Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis 42 überlebten 70% der Tiere bis zum Ende der Behandlungszeit am Tag 42 (7 von 10). Bei der Kontrollgruppe mit MCTbehandelten Tieren lebten am Tag 28 noch 80% der Versuchstiere (8 von 10), am Tag 42 lebten noch 60% der Versuchstiere (8 von 13), ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz aufwiesen (vergleiche Abbildung 3.41).



<u>Abbildung 3.41:</u> Darstellung der Überlebensrate 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind die Überlebensraten in Prozent.

Bei den mit Monocrotalin behandelten Versuchstieren bei der Behandlungsgruppe mit Kombination von Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis Tag 42 zeigte sich histologisch eine deutliche Reduktion der Mediahypertrophie der pulmonalen Blutgefäße im Vergleich zu den Monocrotalin-behandelten Kontrolltieren (vergleiche Abbildung 3.42).



Abbildung 3.42: H&E Elastica Färbung von paraffineingebettetem Lungengewebe bei gesunden Kontrollen, 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion und bei der späten kombinierten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin. A: Kontrolle, Bronchiolus mit begleitender peribronchialer Arterie. Ausschnittsvergrößerung: Kleine intrapulmonale Arterie. B: Peribronchiale Arterie 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion. Deutlich verdickte Arterienwand mit hypertrophierter Media und Endothelläsionen. Ausschnittsvergrößerung: Massiv verdickte Media in einer kleinen Arterie im Lungenparenchym. C: Nach Iloprost/Tolafentrin-Dauertherapie von Tag 28 bis 42 bei MCT-Tieren zeigt sich eine deutlich verringerte arterielle Wandverdickung bei peribronchialen Arterien sowie in einer kleinen Arterie im Lungenparenchym (Ausschnittsvergrößerung).

Bei den mit Monocrotalin behandelten Versuchstieren in der Behandlungsgruppe mit Kombination von Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis Tag 42 zeigte sich eine Reduktion der Muskularisation der pulmonalen Blutgefäße im signifikante Vergleich zu den unbehandelten MCT-Kontrolltieren am Tag 42 (vergleiche Abbildung 3.43). 42 Tage nach Monocrotalin-Behandlung waren 7% nicht muskularisierte Arterien zu finden, 13% partiell muskularisierte und 80% muskularisierte Pulmonalarterien. Bei der Versuchsgruppe mit später kombinierter Therapie mit Iloprost und Tolafentrin waren hingegen am Tag 42 34% nicht muskularisierte Arterien zu finden, 23% partiell muskularisierte und 43% muskularisierte. Dieser geringere Muskularisationsgrad war auch im Vergleich zu den unbehandelten MCT-Kontrolltieren am Tag 28 (8% nicht muskularisiert, 26% muskularisiert) statistisch signifikant. Bei den unpartiell muskularisiert, 66% behandelten gesunden Kontrolltieren fanden sich 73% nicht muskularisierte, 17% partiell muskularisierte und 10% muskularisierte Arterien. Es wurden jeweils 30-40



intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier hinsichtlich des Muskularisationsgrades ausgewertet.

<u>Abbildung 3.43:</u> Darstellung des Muskularisierungsgrades der Pulmonalarterien 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind die mittleren Anteile muskularisierter, partiell muskularisierter und nicht muskularisierter Pulmonalarterien in %. Ausgewertet wurden jeweils 30-40 intraazinäre Blutgefäße pro Versuchstier. \* p<0,05 gegen MCT 28d, † p<0,05 gegen MCT 42d.

Durch die kombinierte Behandlung mit Iloprost und Tolafentrin der MCT-Versuchstiere von Tag 28 bis 42 kam es zu einem signifikant niedrigeren mittleren Quotienten von Alveolen zu Pulmonalarterien (19,0  $\pm$  2,3) verglichen mit den MCT-Kontrolltieren am Tag 42 (27,0  $\pm$  2,6), d. h., es fanden sich deutlich mehr Pulmonalarterien bei der Behandlungsgruppe. Es wurde zur Quantifizierung das Verhältnis von Alveolen zu Pulmonalarterien ermittelt, d. h. ein steigender Quotient entspricht einer Rarefizierung der Pulmonalgefäße. Bei den gesunden Kontrolltieren betrug das Verhältnis Alveolen zu Pulmonalarterien im Durchschnitt 13,0  $\pm$  2,1, 28





<u>Abbildung 3.44:</u> Darstellung des Quotienten von Alveolen zu Pulmonalarterien 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist der mittlere Quotient ± SEM. \* p<0,05 gegen MCT 28 d.

Durch die duale Behandlung mit Iloprost und Tolafentrin der MCT-Versuchstiere von Tag 28 bis 42 kam es im Vergleich zu MCT-Tieren am Tag 42 zu einem signifikanten Rückgang der Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 (vergleiche Abbildung 3.45, 3.46, 3.47) Für jede der Versuchsgruppen wurden vier Western-Blots durchgeführt.



<u>Abbildung 3.45:</u> Autoradiogramme von Immunoblots der MMP-2 und MMP-9 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Immunoblots von n = 4 pro Gruppe und der Blot des Haushaltsgens GAPDH.



<u>Abbildung 3.46:</u> Darstellung der MMP-2 Expression 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-2 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent  $\pm$  SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen,  $\dagger$  p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.



<u>Abbildung 3.47:</u> Darstellung der MMP-9 Expression 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-9 Expression bezogen auf die Expression bei Kontrolltieren in Prozent  $\pm$  SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen,  $\dagger$  p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.

In der Gelatinzymographie zeigte sich eine signifikant erniedrigte gelatinolytische Aktivität bei der kombinierten Behandlungsgruppe mit Iloprost und Tolafentrin von Tag 28 bis 42 verglichen mit den MCT-behandelten Kontrolltieren (vergleiche Abbildung 3.48 und Abbildung 3.49).



<u>Abbildung 3.48:</u> Darstellung der MMP-2 Aktivität 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist eine repräsentative Gelatinzymographie von n = 4 pro Gruppe.



<u>Abbildung 3.49:</u> Darstellung der MMP-2 Aktivität 42 Tage nach MCT-Injektion, bei der späten Behandlungsgruppe von Tag 28 bis Tag 42 mit kombinierter Dauertherapie mit Iloprost und Tolafentrin und gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MMP-2 Aktivität bezogen auf die Aktivität bei Kontrolltieren in Prozent ± SEM. \*\*\* p<0,001 gegen Kontrollen, ††p<0,01 gegen MCT 28d oder MCT 42d.

## 4 Diskussion

Durch die Experimente konnte demonstriert werden, dass es durch die Therapie mit dem Prostazyklinanalogon Iloprost, dem Phosphodiesterase 3/4-Hemmer Tolafentrin und mit einer Kombination dieser zwei Substanzen zu einer abgeschwächten bzw. teilweise sogar reversiblen Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie in dem Model der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte kam.

Um die jeweiligen Therapieeffekte während der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie und im Vollbild der Erkrankung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Behandlungszeitpunkte für die Experimente gewählt. Nach Dosisfindung der Substanzen war ein zeitlich früher therapeutischer Ansatz die Gabe der jeweiligen medikamentösen Therapie von dem 14. bis zum 28. Tag nach Gabe des Monocrotalin. Hier konnte für beide Substanzen ein signifikanter therapeutischer Effekt gezeigt werden. Es zeigte sich bei der kombinierten Gabe von Iloprost und Tolafentrin eine Normalisierung der durch die pulmonale Hypertonie bedingten pathologischen hämodynamischen Veränderungen. Zudem verhinderte die duale Therapie die Rechtsherzhypertrophie, die normalerweise bei den mit Monocrotalin behandelten Versuchstieren auftritt. Darüber hinaus war es durch die kombinierte Therapie jedoch auch möglich, in dem späten therapeutischen Versuchsansatz mit Behandlung vom 28. bis 42. Tag nach Monocrotalin-Gabe eine signifikante Verbesserung der durch die pulmonale Hypertonie bedingten pathologischen Veränderungen zu bewirken. Dies gelang zu einem Zeitpunkt an dem die Versuchstiere bereits das Vollbild einer pulmonalen Hypertonie mit fortgeschrittenem Krankheitsbild aufwiesen.

### 4.1 Monocrotalin-Tiermodell

Es wurden bislang verschiedene Tiermodelle entwickelt, um die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie zu erforschen und neue Therapieansätze zu untersuchen. Diese Modelle bilden unterschiedlich gut die Veränderungen ab, die im Rahmen der pulmonalen Hypertonie beim Menschen auftreten. Von den vorhandenen Tiermodellen erscheint das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte am ehesten vergleichbar mit der pulmonalen Hypertonie des Menschen. Ratten entwickeln nach Monocrotalin-Gabe eine pulmonale Hypertonie, die vier Wochen nach Injektion vergleichbar ist mit menschlichen Patienten mit einem funktionellen Schweregrad der pulmonaler Hypertonie des WHO-Stadiums II-III (vergleiche Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 WHO-Klassifikation des funktionellen Schweregrades der pulmonalen Hypertonie (nach Barst RJ et al. 2004)

### Klasse I

Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.

#### Klasse II

Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit leichter Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.

#### Klasse III

Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.

#### Klasse IV

Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, irgendeine körperliche Belastung ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt. Das Monocrotalin-Tiermodell wurde gewählt, da es eine leicht induzierbare, schwere und gut reproduzierbare pulmonale Hypertonie verursacht, die viele pathophysiologische und pathohistologische Gemeinsamkeiten zum Menschen aufweist. Daher wurde dieses Modell auch vielfach genutzt, um beispielsweise Veränderungen der Hämodynamik und des Gasaustausches oder die Effekte verschiedener antiinflammatorischer oder antiproliferativer Substanzen auf das vaskuläre Remodeling zu untersuchen (Cowan et al. 2000, Prie et al. 1997, Sakuma et al. 1999, Kodama und Adachi 1999).

Nachteilig an dem Monocrotalin-Modell ist jedoch, dass es nicht vollständig die für die pulmonale Hypertonie des Menschen pathognomonischen Gefäßveränderungen widerspiegelt. In dem überwiegenden Teil der Fälle ist die pulmonale Hypertonie beim Menschen nicht toxininduziert wie in dem Monocrotalin-Modell der Ratte. Allerdings stellt das Monocrotalin nur den initiierenden Faktor dar, da das Toxin nach 24 Stunden nahezu vollständig wieder ausgeschieden ist (Hayashi und Lalich 1967) und sich das Krankheitsbild anschließend weiter entwickelt. Hier spielt die toxinvermittelte Endothelschädigung mit konsekutiver Permeabilitätssteigerung die wesentliche Rolle (Valvidia et al. 1967, Sugita et al. 1983, Wilson et al. 1989, Tanaka et al. 1996), ähnlich wie bei der pulmonalen Hypertonie des Menschen die Dysfunktion der Endothelzellen im Vordergrund steht (Voelkel und Tudor 1995). Im Rattenmodell zeigt sich eine Fragmentierung der Lamina elastica interna durch eine veränderte Elastin- und Kollagensynthese (Todorovich-Hunter et al. 1988), wie man sie bei der humanen pulmonalen Hypertonie hauptsächlich in Zusammenhang mit kongenitalen Vitien sieht (Rabinovitch et al. 1986). Im Monocrotalin-Modell fehlen die plexiformen Läsionen sowie eine deutliche Neointimabildung. In geringerem Ausmaß kann eine intimale Schwellung und Proliferation bei Monocrotalinbehandelten Ratten beobachtet werden, bei denen das Krankheitsbild soweit fortgeschritten ist, dass der rechtsventrikuläre systolische Druck systemische Werte annimmt (Tanaka et al. 1996). Entzündliche Veränderungen finden sich sowohl in

dem Tiermodell als auch bei der pulmonalen Hypertonie des Menschen vorwiegend perivaskulär. Darüber hinaus zeigen sich jedoch bei der Ratte auch interstitiell entzündliche Veränderungen (Wilson et al. 1989, Stenmark et al. 1985), beim Menschen auch im Bereich der plexiformen Läsionen (Caslin et al. 1990, Tuder et al. 1994, Dorfmüller et al. 2003), die bislang in keinem gängigen Tiermodell gefunden wurden. Vorwiegend handelt es sich um mononukleäre Entzündungen, bei der Ratte findet sich zudem eine Mastzellhyperplasie (Valvidia et al. 1967, Miyata et al. 2000). Sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell finden sich Thrombosen, bei der Ratte finden sich intravaskuläre Thromben (Allen und Carstens 1970, Lalich et al. 1977, Hayashi et al. 1984). Bei plättchendefizienten Ratten konnte eine Abschwächung der durch Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie gezeigt werden. (Roth und Ganey 1988, Schultze und Roth 1998). Sowohl zirkulierende Plättchenaggregate als auch in-situ-Thrombosen konnten bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie gezeigt werden (Lopes et al. 1993, Wagenvoort und Mulder 1993). Sowohl im MCT-Tiermodell (Van Suylen et al. 1998) als auch beim Menschen finden sich eine Mediahypertrophie und Neo-Muskularisierung peripherer Arterien als Krankheitskorrelat sowie ein Cor pulmonale als gemeinsame pathophysiologische Endstrecke.

Somit stellt das Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte ein robustes, vielfach genutztes und bewährtes Modell dar. Keines der etablierten Tiermodelle ist in der Lage, die ja teilweise auch unterschiedlichen Teilentitäten der pulmonalen Hypertonie beim Menschen hundertprozentig abzubilden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass eine Vielzahl von Interventionen die pulmonale Hypertonie im Monocrotalin-Tiermodell verhindern bzw. abschwächen können, was am ehesten an dem Charakter des Modells mit einem toxischen Startschaden, der durch Intervention abgeschwächt werden kann, begründet liegt. Somit muss, wie bei anderen Tiermodellen auch, eine erfolgreiche Intervention im Modell kritisch hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen betrachtet werden. Ein Vergleich der etablierten Tiermodelle der PAH und neuerer Genmodelle in der Maus zeigt jedoch, dass das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie eine gute Vergleichbarkeit zum Menschen aufweist (Stenmark et al. 2009).

### 4.2 Dosisabhängige Effekte von Iloprost und Tolafentrin

Durch die Monocrotalin-Injektion konnte eine gut reproduzierbare Induktion einer pulmonalen Hypertonie erzielt werden, hier zeigte sich ein sehr ausgeprägter Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Druckes mit deutlich hervortretender Rechtsherzhypertrophie. Zudem kam es zum Abfall des Herzindex mit reduzierter zentralvenöser Sättigung. Darüber hinaus fand sich sogar eine Verminderung der arteriellen Oxygenierung. Als Ausdruck des fortgeschrittenen Krankheitsverlaufes zeigte sich ein deutlicher Gewichtsverlust der erkrankten Tiere. Der kritische Verlust an Querschnittsfläche der präkapillären Pulmonalgefäße spiegelte sich in der histologisch und morphometrisch demonstrierten ausgeprägten Mediahypertrophie dieser Gefäße wieder.

Es wurden zunächst die akuten dosisabhängigen hämodynamischen Effekte von Iloprost und Tolafentrin bei Versuchstieren mit MCT-induzierter pulmonaler Hypertonie untersucht. Hier kommen zwei unterschiedliche Therapieansätze zur Wirkung, die im weiteren Verlauf auch kombiniert wurden.

Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) gehört zur Familie der Prostaglandine, die sich von der Arachidonsäure ableiten, und wurde 1976 erstmalig isoliert (Moncada et al. 1976). Bei der Betrachtung des Wirkspektrums der Prostaglandine fällt auf, dass diese zum Teil antagonistische Effekte vermitteln (Moncada et al. 1978). Prostaglandin  $E_1$ 

und Prostazyklin wirken beispielsweise vasodilatatorisch, während Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ in der pulmonalen Strombahn vasokonstriktiv wirkt. Darüber hinaus wirkt Prostaglandin F<sub>2a</sub> proaggregatorisch, während Prostazyklin die Thrombozytenaggregation hemmt (Vane und Botting 1995). Die vasodilatatorische Wirkung von Prostazyklin wird durch Aktivierung der intrazellulären Adenylatzyklase vermittelt mit konsekutivem Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphat, welches schließlich über Phosphodiesterasen abgebaut wird. Das cAMP bewirkt über Zwischenschritte letztlich einen Einstrom des freien Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum und über die konsekutive Verminderung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration eine Vasodilatation. Ein wesentlicher Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie ist ein erhöhter Vasotonus. Die endotheliale Dysfunktion bewirkt eine Mediatorenimbalance mit Überwiegen vasokonstriktiver Substanzen wie Thromboxan und Endothelin-1 und führt zur verminderten Synthese vasodilatatorischer Mediatoren wie Prostazyklin und NO (Giaid et al. 1993). Zudem konnte eine verminderte Expression der endothelialen NO- und Prostazyklin-Synthetase gezeigt werden (Giaid und Saleh, 1995, Tuder et al. 1999). Das stabile Prostazyklinderivat Epoprostenol erwies sich in Rechtsherzkatheteruntersuchungen als Vasodilatator mit positivem Effekt auf die Hämodynamik bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (Rubin et al. 1982, Raffy et al. 1996). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 2-3 Minuten ist die Gabe von Prostazyklin als Dauerinfusion erforderlich, hier erwies es sich als effektive und bewährte Therapie der pulmonalen Hypertonie (Higenbottam et al. 1984, Rubin et al. 1990, McLaughlin et al. 1998). Die Weiterentwicklung der Therapie wurde durch Aerosolierung und Inhalation mit dem Vorteil einer pulmonalen Selektivität und Wegfall der erforderlichen Dauerinfusion erreicht (Walmrath et al. 1997, Mikhail et al. 1997). Das in den vorliegenden durchgeführten Untersuchungen benutzte Iloprost (Firma Schering, Berlin Deutschland) ist ein synthetisches Prostazyklinanalogon, welches sich durch eine hohe Effektivität und längere Plasmahalbwertszeit von ca. 20 min auszeichnet. Die intravenöse und inhalative Therapie mit Iloprost ist durch die im Vergleich mit Epoprostenol längere Wirkdauer begünstigt (Olschewski et al. 1996, Hoeper et al. 2000, Scott et al. 1990). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde daher Iloprost verwendet.

Phosphodiesterasen sind Enzyme, durch die die zyklischen Monophosphate cAMP und cGMP zu AMP bzw. GMP abgebaut werden. Es wurden bislang elf unterschiedliche Enzymfamilien von Phosphodiesterasen beschrieben (Maurice et al. 2003). Die Einteilung der Phosphodiesterasen erfolgt nach Substrat, den regulatorischen Charakteristika sowie dem Verhalten gegenüber unterschiedlichen Inhibitoren (Beavo 1995, Dent et al. 1994, Suttorp et al. 1996). Phosphodiesterasen spielen eine Rolle in der Modulation verschiedener physiologischer Prozesse, so ist beispielsweise die PDE 6 ein wesentliches Enzym der Retina. In der Regulation des vaskulären Tonus spielen die PDE-Familien 1,3,4 und 5 eine wichtige Rolle (Beavo 1995, Conti et al. 1995, Polson und Strada 1996). So gelang der Nachweis von Aktivität der PDE 1,3,4 und 5 in menschlichen Pulmonalarterien (Rabe et al. 1994). Auch im Lungenhomogenat konnten diese Phosphodiesterasen histochemisch nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wird den Phosphodiesterasen eine wichtige Rolle in der Proliferation glatter Muskelzellen zugesprochen. Im Tiermodell der pulmonalen Hypertonie, das mit einer Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen einhergeht, konnte eine gesteigerte Aktivität der Phosphodiesterase 3 und 5 gezeigt werden (Murray et al. 2002). Im Zellmodell gelang eine Inhibition der durch Serum stimulierten Proliferation glatter Muskelzellen durch selektive Inhibitoren der PDE 3 und 4 (Pan et al. 1994, Polson und Strada 1996). Eine Verstärkung der Relaxation von Pulmonalarterien durch Vasodilatatoren und die kombinierte Gabe mit einem PDE 3-Inhibitor und einem PDE 4-Inhibitor konnte demonstriert werden (Wagner et al. 1997). Auch für Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 konnten synergistische Effekte mit anderen Vasodilatatoren gezeigt werden (Ichinose et al. 1995, Kinsella et al. 1995). Der therapeutische Nutzen von Sildenafil, einem selektiven Inhibitor der PDE 5, konnte in randomisierten kontrollierten Studien am Menschen bestätigt werden (Galie et al. 2005), in Deutschland ist Sildenafil zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen (Revatio®).

Auch die Wirksamkeit von Tadalafil, einem weiteren PDE 5-Inhibitor, der in Deutschland für die Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen ist (Cialis®), konnte in einer randomisierten kontrollierten Studie an Patienten mit pulmonaler Hypertonie gezeigt werden (Galie et al. 2009). Für die durchgeführten Untersuchungen wurde der PDE 3/4-Inhibitor Tolafentrin gewählt. Für Tolafentrin konnte eine Verstärkung der vasodilatatorischen Antwort bei Kombination mit inhalativem Iloprost im Tiermodell der akut induzierten pulmonalen Hypertonie (Schermuly et al. 1999, Schermuly et al. 2000, Schermuly et al. 2001) und am Menschen gezeigt werden (Ghofrani et al. 2002). In diesen Untersuchungen sollte darüber hinaus die Dauertherapie und die jeweiligen Effekte der Einzeltherapien und der Kombinationstherapie auf das vaskulare Remodeling untersucht werden.

Bei der Untersuchung der akuten dosisabhängigen hämodynamischen Effekte von Iloprost und Tolafentrin bei Versuchstieren mit Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie zeigten beide Substanzen das Wirkprofil eines Vasodilatators. Es fand sich eine dosisabhängige Reduktion des rechtsventrikulären systolischen Druckes. Bedingt durch die unselektive intravenöse Verabreichung der Substanzen trat ein begleitender Abfall des systemischen arteriellen Druckes auf. Als Ausdruck der Vasodilatation mit reduziertem pulmonalen und systemischen Gefäßwiderstand kam es jedoch zu einem Anstieg des Herzindex. Schätzt man hierbei die Reduktion des peripheren vaskulären Resistence Index anhand der Reduktion des RVSP und des Anstieg des Herzindex ab, so zeigte sich durch Tolafentrin eine höhere maximale Reduktion von ca. 35% verglichen mit einer maximalen Reduktion von ca. 20% durch Iloprost. Dies steht im Einklang mit den Effekten von Tolafentrin als potentem Vasodilatator der Lungengefäße im isolierten Lungenmodell der akut indizierten pulmonalen Hypertonie am Kaninchen (Schermuly et al. 1999) sowie im Ganztiermodell (Schermuly et al. 2001). Da die Therapie mit Iloprost bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie belegt ist (Olschewski et al. 1996, Hoeper et al. 2000, Scott et al. 1990), spricht die Wirksamkeit der Iloprost-Gabe in dem hier benutzten Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie für die Vergleichbarkeit der hier gewonnen Ergebnisse mit dem Menschen.

### 4.3 Dauertherapien ab Tag 14 / Tag 28

Bei den Monocrotalin-behandelten Tieren wurden Behandlungsgruppen ab dem 14. bzw. ab dem 28. Tag gebildet, die jeweils eine 14-tägige Behandlung erhielten. Bei einigen vorherigen Untersuchungen erfolgte die Gabe von Monocrotalin und einer Behandlung gleichzeitig, z. B. mit einem Endothelin-Antagonisten, Prostaglandin E1 oder einem PDE 5-Inhibitor (Prie et al. 1997, Sakuma et al. 1999, Kodama und Adachi 1999). Im Gegensatz dazu wurde in diesem Fall die Therapie zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem die Entwicklung der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie bereits fortgeschritten war (Tag 14) oder sogar schon das Vollbild einer pulmonalen Hypertonie vorlag (Tag 28). Die Therapie erfolgte als kontinuierliche i.v.-Therapie über 14 Tage. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich, dass sowohl Iloprost als auch Tolafentrin zu einer deutlichen Abschwächung der durch Monocrotalin induzierten pulmonalen Hypertonie führten. Dies zeige sich signifikant am systolischen pulmonalen Druck, dem Herzindex, der zentralvenösen Sättigung sowie der Rechtsherzhypertrophie. Die erzielten Veränderungen im natürlichen Verlauf der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie waren durch beide Substanzen im Wesentlichen vergleichbar. Es zeigte sich jedoch durch die Therapie mit Tolafentrin eine stärkere Verbesserung des Herzindex, sogar mit Erhöhung über das Niveau der Kontrolltiere hinaus. Dies steht im Einklang mit Versuchen, die bei Kaninchen mit einer durch das Thromboxanmimetikum U46619 erzeugten pulmonalen Hypertonie eine deutliche Verbesserung des Herzindex durch Infusion von Tolafentrin zeigen konnte (Schermuly et al. 2001). Der deutlichste Effekt konnte durch die simultane Gabe von Iloprost und Tolafentrin erreicht werden. Durch die gleichzeitige Gabe von Tag 14 bis 28 konnte eine Normalisierung des pulmonalarteriellen Druckes erreicht werden. Darüber hinaus zeigte sich eine vollständige Verhinderung der typischen Rechtsherzhypertrophie und des pulmonalvaskulären Remodelings. Dies steht im Einklang damit, dass für Iloprost antithrombotische Effekte gezeigt werden konnten (Witt und Müller 1987). Zudem wurde in vitro an Gefäßmuskelzellen ein antiproliferativer Effekt beschrieben.

Tolafentrin ist ein dual-selektiver Inhibitor der Phosphodiesterase 3/4 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60-90 nM. Diese PDE-Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von cAMP in vielen Geweben, so auch in der Lunge (Beavo 1995, Manganiello et al. 1995, Torphy 1998). Für die gleichzeitige Gabe von Tolafentrin und Prostazyklin konnte eine additive Wirkung auf den Vasotonus gezeigt werden (Schermuly et al. 1999, Schermuly et al. 2000, Schermuly et al. 2001). So konnte postuliert werden, dass auch durch Tolafentrin eine cAMP-vermittelte Hemmung des vaskulären Remodelings erreicht werden kann, welche der des Iloprost ähnelt und somit ggf. auch in Bezug auf das pulmonalvaskuläre Remodeling additive Effekte durch die simultane Gabe zu erwarten sind. Hier zeigten sich bei der simultanen Gabe ab Tag 14 eine komplette Verhinderung des Anstiegs der pulmonalvaskulären Resistance (geschätzt über systolischen pulmonalarteriellen Druck und Herzindex) sowie eine Verhinderung der Rechtsherzhypertrophie. Zudem blieb durch die kombinierte Gabe von Tolafentrin und Iloprost der Herzindex erhalten mit im Vergleich zu den nicht therapierten Monocrotalin-behandelten Tieren normalisierten Gasaustausch, was sich an dem erhaltenen normalen arteriellen Sauerstoffpartialdruck zeigte. Darüber hinaus fand sich histologisch eine signifikante Reduktion der Dicke der präkapillären glattmuskulären Schicht.

Die Effektivität der kombinierten Therapie mit Tolafentrin und Iloprost zeigte sich gut auch in der späten Behandlungsgruppe ab Tag 28. Hier erfolgte die Therapie zu einem Zeitpunkt, an dem sich bereits das Vollbild der durch Monocrotalininduzierten pulmonalen Hypertonie ausgebildet hatte. Obwohl ein sehr später Interventionszeitpunkt vorlag, konnten viele der durch Monocrotalin induzierten Veränderungen zurückgebildet werden. Durch die 14-tägige Behandlung von Tag 28 bis Tag 42 konnte der systolische pulmonalarterielle Druck nicht nur unter das Niveau der Kontrollgruppe an Tag 42 gesenkt werden, sondern auch unter das Niveau der Kontrollgruppe an Tag 28. Diese deutliche Normalisierung der zu erwartenden pulmonalen Hypertonie spricht dafür, dass durch die kombinierte Gabe eines Prostanoids und des entsprechenden PDE 3/4-Inhibitors ein deutlicher antiproliferativer Effekt in Bezug auf die pulmonalen Gefäße erzielt werden kann. Die Reduktion der Anzahl an peripheren Arterien, die bei Monocrotalin-behandelten Versuchstieren histologisch gezeigt werden kann, spiegelt den durch Monocrotalin bewirkten endothelialen Schaden und die Okklusion von peripheren Gefäßen wider (Cowan et al. 2000). Durch die kombinierte Gabe von Tolafentrin und Iloprost konnte eine signifikante Vermehrung der Vaskularisation erzielt werden, was durch VEGF vermittelt sein könnte, da bereits gezeigt werden konnte, dass VEGF durch cAMP-Steigerung induziert werden kann (Hoeper et al. 1997). Die Annahme, dass hierbei cAMP eine Rolle spielt, wird auch durch die Messungen der Expression von MMP-2 und MMP-9 unterstützt. Matrixmetalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die eine Rolle spielen im Metabolismus der extrazellulären Matrix sowie darüber hinaus auch beim Abbau verschiedener anderer Proteine. Bislang sind 28 Matrixmetalloproteinasen beschrieben, die teilweise unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Sie werden nach Struktur oder bevorzugtem Substrat in verschiedene Gruppen eingeteilt und dann als Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membrangebundene MMP oder andere kategorisiert (Bäck et al. 2010). Die Matrixmetalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle bei Vorgängen der Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung, Angiogenese und Apoptose. Die durch MMP vermittelte Proteolyse der extrazellulären Matrix spielt eine wesentliche Rolle für die Gewebshomöostase, so sind veränderte proteolytische Verhältnisse durch MMP im Rahmen der Tumorgenese beschrieben (Kessenbrock et al. 2010). Einige Matrixmetalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle als Modulatoren der Atherogenese und des vaskulären Remodelings (Bäck et al. 2010). Insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und die MMP-9 spielen eine wesentliche Rolle in der Degradation der vaskulären Basalmembran und extrazellulärer Matrix, was die Zellproliferation im Rahmen des vaskulären Remodeling ermöglicht (Pauly et al. 1994, George et al. 1997). Im Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie und Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte konnte die gesteigerte MMP-Aktivität in den Pulmonalgefäßen demonstriert werden (Frisdal et al. 2001, Gurjar et al. 1999). Bei unseren Versuchen konnte bei den Monocrotalinbehandelten Versuchstieren eine ca. vier- bis fünffache Erhöhung der MMP-2 und MMP-9 im Rahmen des vaskulären Remodelings demonstriert werden. Die Expression beider MMP wurde durch die Behandlungsregime deutlich reduziert. Sehr deutlich war die Reduktion der MMP-2 in der späten Behandlungsgruppe ab Tag 28. Prinzipiell wird sowohl die MMP-2 als auch die MMP-9 durch cAMP reguliert, erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel senken die Expression (McCawley et al. 2000, Peracchia et al. 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> und Dibutyryl-cAMP die Membran Typ 1 Matrix-MMP supprimieren, die ein Aktivator der MMP-2 ist (Shankavaram et al. 2001). Eine weitere mögliche Ursache für die verminderte Expression der MMP-2 könnte eine vermehrte Expression von Gewebsinhibitoren von Matrixmetalloproteinasen sein, welche ebenfalls durch cAMP reguliert werden (Tanaka et al. 1995, Zhong et al. 2000). Die verminderte Aktivität der MMP-2 und MMP-9 bei den Behandlungsgruppen demonstriert das durch die Behandlung verminderte vaskuläre Remodeling durch die attenuierte pulmonale Hypertonie. Dies konnte auch histologisch bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich neben den hämodynamischen Verbesserungen auch eine signifikante Verminderung der Rechtsherzhypertrophie. Die Therapie erfolgte zeitlich erst nach Einsetzen des Vollbilds der Krankheit, so dass hier eine Vergleichbarkeit mit dem Therapiebeginn am Patienten besteht. In Bezug auf die therapeutischen Konzepte der pulmonalen Hypertonie sind antiproliferative Therapieansätze mit Einfluss auf das pulmonalvaskuläre Remodeling neben den reinen Vasodilatatoren zunehmend in den Fokus gerückt. Somit könnte die Therapie der pulmonalen Hypertonie mit kombinierter Gabe von Iloprost und einem dual-selektiven PDE 3/4- Inhibitor neben den beschrieben hämodynamischen Vorteilen ein neues therapeutisches Konzept zur Therapie des vaskulären Remodeling der pulmonalen Hypertonie darstellen. Es sind jedoch noch weitere präklinische und klinische Studien erforderlich, um optimierte Kombinationstherapien mit Einfluss auf das vaskuläre Remodeling zur Therapie der pulmonalen Hypertonie am Menschen zu finden.

# 5 Zusammenfassung

Die schwere pulmonale Hypertonie ist eine erheblich die Lebensqualität einschränkende Erkrankung mit einer hohen Mortalität. Wir untersuchten die therapeutischen Effekte von Iloprost, einem langwirksamen Prostazyklinanalogon, und dem dual-selektiven Phosphodiesterase 3/4-Inhibitor Tolafentrin während akuter Gabe sowie bei Dauertherapie in einem Tiermodell der Monocrotalininduzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Achtundzwanzig Tage nach Gabe des Alkaloids war der rechtsventrikuläre systemische Blutdruck von ursprünglich 25,8 ± 2,0 auf  $62.9 \pm 3.4$  mmHg erhöht, nach zweiundvierzig Tagen auf  $70.5 \pm 7.4$  mmHg. Parallel dazu zeigte sich ein Abfall des Herzindex, der zentralvenösen Sauerstoffsättigung und der arteriellen Oxygenierung. Es konnte eine ausgeprägte Rechtsherzhypertrophie gezeigt werden anhand der deutlich erhöhten Quotienten des Gewichts von rechtem Ventrikel/ Gewicht des linken Ventrikels plus Septum. Histologisch fand sich eine massive Verdickung der glattmuskulären Schicht der präkapillären Arterien. Analyse mit Western Blot zeigte erhöhte Spiegel der 2 und 9, dementsprechend konnte in isolierten Matrixmetallproteinasen Gelatinzymographie eine erhöhte proteolytische Pulmonalarterien der in Enzymaktivität demonstriert werden. Sowohl intravenöses Iloprost als auch intravenöses Tolafentrin führte in dem Tiermodell zur Vasodilatation. Bei Dauerinfusion von Tag 14 bis Tag 28 führten beide Substanzen zur signifikanten Abschwächung aller Monocrotalin-induzierter hämodynamischer Veränderungen, des pathologischen Gasaustausch sowie der Rechtsherzhypertrophie.

Eine vollständige Normalisierung dieser Parameter konnte durch kombinierte Verabreichung beider Substanzen in dem Zeitraum von Tag 14 bis Tag 28 erreicht werden. Gleiches galt für die Expression und Aktivität der MMP-2 und MMP-9. Darüber hinaus konnte durch die Infusion von Iloprost und Tolafentrin als späte therapeutische Intervention von Tag 28 bis Tag 42, wenn sich bereits das Vollbild einer schweren pulmonalen Hypertonie mit Cor pulmonale eingestellt hatte, eine signifikante Rückbildung der pathologischen Veränderungen des Gasaustausches, der Hämodynamik, der Rechtsherzhypertrophie sowie des pulmonalvaskulären Remodelings erreicht werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die kombinierte Verabreichung von Iloprost und einem dual-selektivem Phosphodiesterase 3/4-Inhibitor die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und Cor pulmonale nach Monocrotalin-Gabe im Rattenmodell verhindern und bereits eingetretene Veränderungen zur Rückbildung bringen kann. Daher könnte dieses kombinierte Therapieregime möglicherweise eine Therapie des pathologischen Remodelings der pulmonalen Hypertonie darstellen.

# **6** Summary

Severe pulmonary hypertension is a disabeling disease with high mortality. We investigated acute and chronic effects of iloprost, a long-acting prostacyclin analogue, and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. 28 and 42 days after administration of the alkaloid, right ventricular systolic pressure increased from 25,8  $\pm$  2,0 to 62,9  $\pm$  3,4 and 70,5  $\pm$  7,4 mmHg, with concomitant decline in cardiac index, central venous oxygen saturation, and arterial oxygenation. Marked right heart hypertrophy was demonstrated by the strongly elevated ratio of right ventricle/left ventricle plus septum weight, and massive thickening of the precapillary artery smooth muscle layer was shown histologically. Western blot analysis demonstrated increased levels of matrix metalloproteinases (MMPs) -2 and -9 and increased gelatinolytic activities in isolated pulmonary arteries. In these animals, both intravenous iloprost and tolafentrine displayed characteristic features of pulmonary vasodilators. When chronically infused from days 14 to 28, both agents significantly attenuated all monocrotaline-induced hemodynamic and gas exchange abnormalities as well as right heart hypertrophy. Full normalization of all variables including right ventricle size was achieved on combined administration of both agents during this period. This was also true for MMP-2 and MMP-9 expression and activity. Moreover, when iloprost plus tolafentrine was used for late therapeutic intervention, with infusion from days 28 to 42 after full establishment of severe pulmonary hypertension and cor pulmonale, hemodynamic, gas exchange, and cardiac and pulmonary vascular remodeling changes were significantly reversed. We conclude that the combined administration of iloprost and a dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor prevents and reverses the development of pulmonary hypertension and cor pulmonale in response to monocrotaline in rats. This regimen may therefore offer a possible antiremodeling therapy in severe pulmonary hypertension.

# 7 Literaturverzeichnis

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

Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. Prog Cardiovasc Dis. 2010 Mar-Apr;52(5):410-28.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. N Engl J Med. 1996 Feb 1;334(5):296-302.

Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V, Tapson V, Rich S, Rubin L, Wasserman K, Oudiz R, Shapiro S, Robbins IM, Channick R, Badesch D, Rayburn BK, Flinchbaugh R, Sigman J, Arneson C, Jeffs R; Beraprost Study Group. Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol. 2003 Jun 18;41(12):2119-25.

Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S, McLaughlin V, Hill N, Tapson VF, Robbins IM, Zwicke D, Duncan B, Dixon RA, Frumkin LR; STRIDE-1 Study Group. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2004 Feb 15;169(4):441-7. Epub 2003 Nov 20.

Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S. Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. J Am Coll Cardiol. 2004 June 16;43 (12 Suppl 1):40-47.

Barst RJ, Gibbs JS, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Rubin LJ, Sitbon O, Tapson VF, Galiè N. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol. 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S78-84.

Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. 1976.

Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol Rev. 1995 Oct;75(4):725-48.

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

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1992 Jul 9;327(2):70-5.

Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Feb;26(2):194-201.

Conti M, Nemoz G, Sette C, Vicini E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. Endocr Rev. 1995 Jun;16(3):370-89. Review.

Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. J Biol Chem. 1999 May 14;274(20):13729-32.

Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. Nat Med. 2000 June;5(6):698-702.

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, Levy PS, Pietra GG, Reid LM, Reeves JT, Rich S, Vreim CE, Wiliams GW, Wu M. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. Ann Intern Med. 1991 Sep 1;115(5):343-9.

Dent G, Magnussen H, Rabe KF. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in the human lung. Lung. 1994;172(3):129-46.

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

Frisdal E, Gest V, Vieillard-Baron A, Levame M, Lepetit H, Eddahibi S, Lafuma C, Harf A, Adnot S, Dortho MP. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. Eur Respir J. 2001 Nov;18(5):838-45.

Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. Circulation. 1984 Oct;70(4):580-7.

Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G; Sildenafil

Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med. 2005 Nov 17;353(20):2148-57.

Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ; Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy Studies (ARIES) Group. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. Circulation. 2008 Jun 10;117(23):3010-9. Epub 2008 May 27.

Galiè N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, Shapiro S, White RJ, Chan M, Beardsworth A, Frumkin L, Barst RJ; Pulmonary Arterial Hypertension and Response to Tadalafil (PHIRST) Study Group. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. Circulation. 2009 Jun 9;119(22):2894-903.

George SJ, Zaltsman AB, Newby AC. Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein. Cardiovasc Res. 1997 Feb;33(2):447-59.

Ghodsi F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. Am J Physiol. 1981 Feb;240(2):H149-55.

Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Wiedemann R, Weissmann N, Schudt C, Tenor H, Seeger W, Grimminger F. Amplification of the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost by subthreshold phosphodiesterase types 3 and 4 inhibition in severe pulmonary hypertension. Crit Care Med. 2002 Nov;30(11):2489-92.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1993 Jun 17;328(24):1732-9. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1995 Jul 27;333(4):214-21.

Glowaz SL, Michnika M, Huxtable RJ. Detection of a reactive pyrrole in the hepatic metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. Toxicol Appl Pharmacol. 1992 Aug;115(2):168-73.

Gómez-Sánchez MA, Mestre de Juan MJ, Gómez-Pajuelo C, López JI, Díaz de Atauri MJ, Martínez-Tello FJ. Pulmonary hypertension due to toxic oil syndrome. A clinicopathologic study. Chest. 1989 Feb;95(2):325-31.

Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Dec;19(12):2871-7.

Harris PN, Anderson RC, Chen KK. The action of monocrotaline and retronecine. J Pharmac exp Ther. 1942;(75)78-82.

Hatano, S., Strasser, T. (Eds.): Primary pulmonary hypertension, report on a WHO-Meeting 1973. Geneva: WHO 1975 Hayashi Y, Lalich JJ. 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. Correlative morphological and biochemical studies on monocrotaline-induced pulmonary alterations in rats. Toxicol Lett. 1984 Apr;21(1):65-71.

Higenbottam T, Wheeldon D, Wells F, Wallwork J. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). Lancet. 1984 May 12;1(8385):1046-7.

Higenbottam TW, Butt AY, Dinh-Xaun AT, Takao M, Cremona G, Akamine S. Treatment of pulmonary hypertension with the continuous infusion of a prostacyclin analogue, iloprost. Heart. 1998 Feb;79(2):175-9.

Hoeper MM, Voelkel NF, Bates TO, Allard JD, Horan M, Shepherd D, Tuder RM. Prostaglandins induce vascular endothelial growth factor in a human monocytic cell line and rat lungs via cAMP. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 Dec;17(6):748-56.

Hoeper MM, Maier R, Tongers J, Niedermeyer J, Hohlfeld JM, Hamm M, Fabel H. Determination of cardiac output by the Fick method, thermodilution, and acetylene rebreathing in pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Aug;160(2):535-41.

Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M, Fabel H. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. N Engl J Med. 2000 Jun 22;342(25):1866-70.

Hoeper MM, Markevych I, Spiekerkoetter E, Welte T, Niedermeyer J. Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J. 2005 Nov;26(5):858-63.

Huan JY, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke PR. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. Toxicol Lett. 1998 Oct 15;99(2):127-37.

Huxtable RJ. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. Perspect Biol Med. 1980 Autumn;24(1):1-14.

Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. Pharmacol Ther. 1990;47(3):371-89.

Ichinose F, Adrie C, Hurford WE, Zapol WM. Prolonged pulmonary vasodilator action of inhaled nitric oxide by Zaprinast in awake lambs. J Appl Physiol. 1995 Apr;78(4):1288-95.

Kerstein D, Levy PS, Hsu DT, Hordof AJ, Gersony WM, Barst RJ. Blade balloon atrial septostomy in patients with severe primary pulmonary hypertension. Circulation. 1995 Apr 1;91(7):2028-35.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell. 2010 Apr 2;141(1):52-67.

Kinsella JP, Torielli F, Ziegler JW, Ivy DD, Abman SH. Dipyridamole augmentation of response to nitric oxide. Lancet. 1995 Sep 2;346(8975):647-8.

Kodama K, Adachi H. Improvement of Mortality by Long-Term E4010 Treatment in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Aug 1;290:748–752.

Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. Eur Respir J. 2009 Oct;34(4):888-94.

Lalich JL, Johnson WD, Raczniak TJ, Shumaker RC. Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats. Arch Pathol Lab Med. 1977 Feb;101(2):69-73.

Lopes AA, Maeda NY, Almeida A, Jaeger R, Ebaid M, Chamone DF. Circulating platelet aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension. Angiology 1993 Sep; 44(9):701-06.

Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. Arch Biochem Biophys. 1995 Sep 10;322(1):1-13.

Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. Mol Pharmacol. 2003 Sep;64(3):533-46.

McCawley LJ, Li S, Benavidez M, Halbleib J, Wattenberg EV, Hudson LG. Elevation of intracellular cAMP inhibits growth factor-mediated matrix metalloproteinase-9 induction and keratinocyte migration. Mol Pharmacol. 2000 Jul;58(1):145-51.

McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Rich S. Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1998 Jan 29;338(5):273-7.

Mikhail G, Gibbs J, Richardson M, Wright G, Khaghani A, Banner N, Yacoub M. An evaluation of nebulized prostacyclin in patients with primary and secondary pulmonary hypertension. Eur Heart J. 1997 Sep;18(9):1499-504.

Miyata M, Dakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. Int Arch Allergy Immunol. 2000; 121(3):246-52.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature. 1976 Oct 21;263(5579):663-5.

Moncada S, Korbut R, Bunting S, Vane JR. Prostacyclin is a circulating hormone. Nature. 1978 Jun 29;273(5565):767-8.

Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. Br J Pharmacol. 2002 Dec;137(8):1187-94.

Nef HM, Möllmann H, Hamm C, Grimminger F, Ghofrani HA. Pulmonary hypertension: updated classification and management of pulmonary hypertension. Heart. 2010 Apr;96(7):552-9.

Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. Ann Intern Med. 1996 May 1;124(9):820-4.

Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. Der Internist. 1999; 40(7): 696-709.

Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoeper MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W; Aerosolized Iloprost Randomized Study Group. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. N Engl J Med. 2002 Aug 1;347(5):322-9.

Pan X, Arauz E, Krzanowski JJ, Fitzpatrick DF, Polson JB. Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE III and PDE IV to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. Biochem Pharmacol. 1994 Aug 17;48(4):827-35.

Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. Circ Res. 1994 Jul;75(1):41-54.

Pasque MK, Trulock EP, Cooper JD, Triantafillou AN, Huddleston CB, Rosenbloom M, Sundaresan S, Cox JL, Patterson GA. Single lung transplantation for pulmonary hypertension. Single institution experience in 34 patients. Circulation. 1995 Oct 15;92(8):2252-8.
Peracchia F, Tamburro A, Prontera C, Mariani B, Rotilio D. cAMP involvement in the expression of MMP-2 and MT-MMP1 metalloproteinases in human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Nov;17(11):3185-90.

Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:403-27.

Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ETA receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy- pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. J Pharmacol Exp Ther. 1997 Sept 1;282:1312–1318.

Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. Am J Physiol. 1994 May;266:L536-43.

Rabinovitch M, Bothwell T, Hayakawa BN. 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; 55:632-53.

Raffy O, Azarian R, Brenot F, Parent F, Sitbon O, Petitpretz P, Hervé P, Duroux P, Dinh-Xuan AT, Simonneau G. Clinical significance of the pulmonary vasodilator response during short-term infusion of prostacyclin in primary pulmonary hypertension. Circulation. 1996 Feb 1;93(3):484-8.

Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. N Engl J Med. 1982 Mar 11;306(10):557-64.

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann Intern Med. 1987 Aug;107(2):216-23.

Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1992 Jul 9;327(2):76-81.

Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner D, McLaughlin V, Francis G. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. Chest. 1998 Sep;114(3):787-92.

Rich S, Dodin E, McLaughlin VV. Usefulness of atrial septostomy as a treatment for primary pulmonary hypertension and guidelines for its application. Am J Cardiol. 1997 Aug 1;80(3):369-71.

Rich S, Rubin LJ, Abenhail L et al. (1998). Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension (Evian, France, September 6–10, 1998). Geneva: The World Health Organization.

http://web.archive.org/web/20020408173726/http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html.

Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. Am J Physiol. 1988 Dec;255(6 Pt 2):H1484-91.

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

Rubin LJ, Groves BM, Reeves JT, Frosolono M, Handel F, Cato AE. Prostacyclininduced acute pulmonary vasodilation in primary pulmonary hypertension. Circulation 1982 Aug;66(2):334-8.

Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, Diehl JH, Crow J, Long W. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. Ann Intern Med. 1990 Apr 1;112(7):485-91.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med. 2002 Mar 21;346(12):896-903.

Sakuma F, Miyata M, Kasukawa R. Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. Lung 1999 Mar; 177:77–88.

Schermuly RT, Ghofrani HA, Enke B, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schudt C, Walmrath D. Low-dose systemic phosphodiesterase inhibitors amplify the pulmonary vasodilatory response to inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Nov;160(5):1500-6.

Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Schudt C, Tenor H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Feb;292(2):512-20.

Schermuly RT, Krupnik E, Tenor H, Schudt C, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D, Ghofrani HA. Coaerosolization of phosphodiesterase inhibitors markedly enhances the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension. Maintenance of lung selectivity. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Nov 1;164(9):1694-700.

Schultze AE, Roth RA. 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.

Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J. The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. Br J Clin Pract. 1990 Jun;44(6):231-4.

Shankavaram UT, Lai WC, Netzel-Arnett S, Mangan PR, Ardans JA, Caterina N, Stetler-Stevenson WG, Birkedal-Hansen H, Wahl LM. Monocyte membrane type 1matrix metalloproteinase. Prostaglandin-dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. J Biol Chem. 2001 Jun 1;276(22):19027-32.

Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, Keogh A, Oudiz R, Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ; Treprostinil Study Group. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Mar 15;165(6):800-4.

Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Circulation. 2005 Jun 14;111(23):3105-11.

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 Heart Circ Physiol. 1985 June;248(6):H859-H866.

Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmagological cure. Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol. 2009 Dec;297(6):L1013-L1032.

Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated Rats. J Appl Physiol. 1983 Feb;54(2):371-74.

Suttorp N, Ehreiser P, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Tenor H, Schudt C. Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. Lung. 1996;174(3):181-94.

Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, Ishibashi T, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Sugioka Y. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. Cancer Res. 1995 Jul 1;55(13):2927-35.

Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD. The Role of Vascular Injury and Hemodynamics in Rat Pulmonary Artery Remodeling. J Clin Invest. 1996 July 15;98(2):434-442.

Tapson VF, Gomberg-Maitland M, McLaughlin VV, Benza RL, Widlitz AC, Krichman A, Barst RJ. Safety and efficacy of IV treprostinil for pulmonary arterial hypertension: a prospective, multicenter, open-label, 12-week trial. Chest. 2006 Mar;129(3):683-8.

Thomas HC, Lamé MW, Wilson DW, Segall HJ. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. Toxicol Appl Pharmacol. 1996 Nov;141(1):319-29.

Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M. 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.

Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Feb;157(2):351-70.

Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. Am J Pathol 1994 Feb; 144(2):275-285.

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jun;159(6):1925-32. Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline Arch Pathol 1967; 84(1):64-76.

Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic Profile of Prostacyclin. Am J Cardiol. 1995;75:3A-10A.

Van Suylen RJ, Smits JFM, Daemen MJAP. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline induced pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1423-28.

Veyssier-Belot C, Cacoub P. Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. Cardiovasc Res. 1999 Nov;44(2):274-82.

Voelkel NF, Tuder RM. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. Eur Respir J 1995 Dec; 8(12):2129-38.

Voswinckel R, Enke B, Reichenberger F, Kohstall M, Kreckel A, Krick S, Gall H, Gessler T, Schmehl T, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grimminger F, Rubin LJ, Seeger W, Olschewski H. Favorable effects of inhaled treprostinil in severe pulmonary hypertension: results from randomized controlled pilot studies. J Am Coll Cardiol. 2006 Oct 17;48(8):1672-81.

Wagenvoort CA, Mulder PG. Thrombotic lesions in primary plexogenic arteriopathy. Similar pathogenesis or complication? Chest 1993 Mar; 103(3):844-49.

Wagner JG, Petry TW, Roth RA. Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-linking in pulmonary artery endothelium. Am J Physiol. 1993 May;264(5 Pt 1):L517-22.

Wagner RS, Smith CJ, Taylor AM, Rhoades RA. Phosphodiesterase inhibition improves agonist-induced relaxation of hypertensive pulmonary arteries. J Pharmacol Exp Ther. 1997 Sep; 282(3):1650-7.

Walmrath D, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. NO und alternative inhalative Therapieansätze bei pulmonaler Hypertonie. Internist (Berl). 1997 May;38(5):453-60.

Wilson DW, Segall HJ, Pan CW, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats Microvasc Res. 1989 July; 38(1):57-80.

Witt W, Müller B. Antithrombotic profile of iloprost in experimental models of in vivo platelet aggregation and thrombosis. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res. 1987;17A:279-84.

Zhong ZD, Hammani K, Bae WS, DeClerck YA. NF-Y and Sp1 cooperate for the transcriptional activation and cAMP response of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18602-10.

## Publikationsverzeichnis

Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissman N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Chronic Sildenafil Treatment Inhibits Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:39-45.

Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissman N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F. Antiremodeling Effects of Iloprost and the Dual-Selective Phosphodiesterase 3/4 Inhibitor Tolafentrine in Chronic Experimental Pulmonary Hypertension. Circ Res 2004;94:1101-08.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

## Danksagung

Für die Bereitstellung eines Dissertationsthemas und somit für die Möglichkeit wertvolle Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten zu gewinnen möchte ich Herrn Professor Werner Seeger ganz herzlich danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Professor Ralph Theo Schermuly, der mir bei allen Problemen hilfreich zur Seite stand und dabei stets ein vorbildliches Musterbeispiel an Geduld war.

Meinen Mitstreitern und Kollegen im Labor danke ich für die Einweisung, Unterstützung und konstante Ermutigung.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meiner Ehefrau Daniela, ohne deren Hilfe und Geduld all dies nicht möglich gewesen wäre.