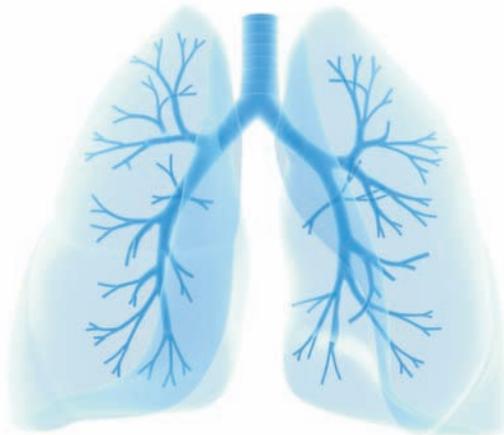


Die Entwicklung eines neuen  
Tiermodells der pulmonalen Hypertonie  
und therapeutischer Interventionen

*Katja Helmus*



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



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem  
Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Hans-Christian Siebert

und

dem Zentrum für Innere Medizin  
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly

# **Die Entwicklung eines neuen Tiermodells der pulmonalen Hypertonie und therapeutischer Interventionen**

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

eingereicht von  
**Katja Helmus**  
Tierärztin aus Hüttental jetzt Siegen

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Hans-Christian Siebert  
Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 7. Dezember 2010

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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.

Katja Helmus

*Für alle die Menschen und Tiere,  
die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht miterleben konnten  
- in unseren Herzen werdet ihr weiterleben.....*



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> .....  | <i>1</i>  |
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....   | <i>5</i>  |
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>1.1 Einführung in die Thematik</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)</b> .....   | <b>10</b> |
| 1.2.1 Akute und protrahierte alveoläre Hypoxie .....   | 11        |
| 1.2.2 Chronische Hypoxie .....   | 13        |
| <b>1.3 Pulmonale Hypertonie</b> .....  | <b>14</b> |
| 1.3.1 Definition .....   | 15        |
| 1.3.2 Klassifikation .....   | 16        |
| 1.3.3 Pathophysiologie und Vaskuläres Remodeling .....   | 17        |
| 1.3.4 Gegenwärtige Therapie der pulmonalen Hypertonie .....  | 20        |
| <b>1.4 Experimentelle Tiermodelle</b> .....  | <b>22</b> |
| 1.4.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten- bzw. Maus-Modell.....   | 23        |
| 1.4.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Rezeptor<br>Inhibitor SU5416 im Ratten-Modell ..... | 24        |
| 1.4.2.1 VEGFR-2 Inhibitor SU5416 .....   | 27        |
| 1.4.3 Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten-Modell.....   | 29        |
| <b>1.5 Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>1.6 Phosphodiesterasen bei pulmonaler Hypertonie</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>1.7 Phosphodiesterase-5 Hemmstoff Sildenafil</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>1.8 Plaket Derived Growth Factor bei pulmonaler Hypertonie</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>1.9 Der Tyrosinkinasehemmstoff Imatinib</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>1.10 Ziel der Arbeit</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>2.1 Material</b> .....  | <b>43</b> |
| 2.1.1 Versuchstiere .....  | 43        |
| 2.1.2 Tierversuchsgenehmigung .....  | 43        |
| 2.1.3 Injektionslösungen und Substanzen .....  | 44        |
| 2.1.4 Verbrauchsmaterial .....   | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.5 Geräte für Tierpräparation .....  | 45        |
| 2.1.6 Histologie.....   | 46        |
| 2.1.7 Antikörper.....   | 49        |
| 2.1.8 Geräte/ Software/ Makros für Gefäßmorphometrie .....                                  | 49        |
| <b>2.2 Methoden .....</b>   | <b>49</b> |
| 2.2.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie .....   | 49        |
| 2.2.2 Vorbereitung und Injektion von SU5416.....  | 50        |
| 2.2.3 Vorbereitung und Behandlung von Sildenafil.....                                       | 50        |
| 2.2.4 Vorbereitung und Behandlung von Imatinib.....   | 51        |
| 2.2.5 Aufteilung der Tiergruppen .....  | 52        |
| 2.2.5.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie .....                                       | 52        |
| 2.2.5.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie mit dem VEGFR-2 Rezeptor Inhibitor SU541653 |           |
| 2.2.6 Hämodynamische Messungen am Ganztier .....  | 54        |
| 2.2.6.1 Narkose .....   | 54        |
| 2.2.6.2 Tracheotomie .....  | 54        |
| 2.2.6.3 Beatmung .....  | 55        |
| 2.2.6.4 Präparation der rechten V. jugularis.....   | 55        |
| 2.2.6.5 Präparation der linken A.carotis.....   | 56        |
| 2.2.6.6 Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes .....                       | 56        |
| 2.2.7 Blutproben .....  | 57        |
| 2.2.8 Entnahme der Lunge .....  | 57        |
| 2.2.9 Präparation des Herzens.....  | 58        |
| 2.2.10 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....                            | 59        |
| 2.2.10.1 Einbettung des Gewebes und konventionelle Histologie .....                         | 59        |
| 2.2.10.1.1 Elastica-Kernechtrot-Färbung .....   | 59        |
| 2.2.10.1.2 Elastica van Gieson-Färbung.....   | 59        |
| 2.2.10.1.3 Hämatoxylin–Eosin (HE)-Färbung.....  | 60        |
| 2.2.10.1.4 Mallory Trichromfärbung acc. McFarlane .....                                     | 60        |
| 2.2.10.2 Immunhistochemische Färbemethoden.....   | 60        |
| 2.2.10.2.1 Histopuffer zur Verdünnung der Antikörper .....                                  | 60        |
| 2.2.10.2.2 Immunhistochemie (1): Anti-alpha actin/ Faktor VIII .....                        | 60        |
| 2.2.10.2.3 Färbeprotokoll / Peroxidase / ImmPRESS DETECTION SYSTEM / VECTOR /               |           |
| NovaRED – Substrat .....  | 61        |
| 2.2.11 Morphometrische Analyse der Lungengefäße .....                                       | 62        |
| 2.2.11.1 Mittlere Wandstärke.....   | 63        |
| 2.2.11.2 Muskularisierungsgrad.....   | 64        |
| 2.2.11.3 Okklusion.....   | 65        |
| 2.2.11.4 Neointima.....   | 65        |
| 2.2.12 Statistische Auswertung .....  | 67        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3 Ergebnisse .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>3.1 Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte mit Therapeutika</b>   |           |
| <b>Sildenafil und Imatinib.....</b>  | <b>68</b> |
| 3.1.1 Nebenwirkungen unter oraler Therapie mit Sildenafil 50 mg/kg und Imatinib 100 mg/kg .....  | 68        |
| 3.1.2 Gewicht.....   | 68        |
| 3.1.3 Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den einzelnen Gruppen.....   | 70        |
| 3.1.4 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP) .....  | 71        |
| 3.1.5 Bestimmung des Gewichtsverhältnisses zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie .....  | 72        |
| 3.1.6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße .....   | 73        |
| 3.1.6.1 Muskularisierungsgrad.....   | 73        |
| 3.1.6.1.1 Prozentualer Anteil voll, partiell und teilmuskularisierter Gefäße .....   | 74        |
| 3.1.6.2 Mittlere Wandstärke.....   | 76        |
| 3.1.6.2.1 Mittlere Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien (20 – 50 µm).....  | 77        |
| 3.1.6.2.2 Mittlere Wandstärke von mittelgroßen und großen Pulmonalarterien .....   | 78        |
| 3.1.6.3 Okklusion peripherer Pulmonalarterien (< 21 µm) .....  | 79        |
| 3.1.6.4 Bestimmung des Verhältnisses der Neointima zu Media als Maß der Neointimabildung ...   | 81        |
| 3.1.6.4.1 Verhältnis von Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 21 µm)   | 83        |
| <b>3.2 Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit dem</b>   |           |
| <b>VEGFR-2 Inhibitor SU5416 bei Ratte mit Therapeutika Sildenafil und Imatinib .....</b>   | <b>86</b> |
| 3.2.1 Nebenwirkungen unter oraler Therapie mit Sildenafil 50 mg/kg und Imatinib 100 mg/kg .....  | 86        |
| 3.2.2 Gewicht.....   | 86        |
| 3.2.3 Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den verschiedenen Gruppen .....  | 88        |
| 3.2.4 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP) .....  | 89        |
| 3.2.5 Bestimmung des Gewichtsverhältnisses zwischen rechten Ventrikels und linkem Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie ..... | 90        |
| 3.2.6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße .....   | 92        |
| 3.2.6.1 Muskularisierungsgrad.....   | 92        |
| 3.2.6.1.1 Prozentualer Anteil voll-, partiell- und teilmuskularisierter Gefäße .....   | 93        |
| 3.2.6.2 Mittlere Wandstärke.....   | 95        |
| 3.2.6.2.1 Mittlere Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien (20 - 50 µm).....  | 96        |
| 3.2.6.2.2 Mittlere Wandstärke in mittelgroßen und großen Pulmonalarterien .....  | 97        |
| 3.2.6.3 Okklusion peripherer Pulmonalarterien (< 21 µm) .....  | 98        |
| 3.2.6.4 Bestimmung des Verhältnisses von Neointima- zu Mediadicke als Maß für die Neointimabildung.....  | 101       |
| 3.2.7.4.1 Verhältnis von Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 21 µm)   |           |
| .....  | 103       |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.6.4.2 Verhältnis der Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 50 µm) bei hypoxischen Ratten, hypoxischen Ratten in Kombination mit SU5416 und humanem Lungengewebe .....  | 105        |
| 3.2.6.5 Proliferationsmarker-Färbung .....  | 108        |
| <b>4. Diskussion .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>4.1 Wahl des Tiermodells .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>4.2 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf Hämodynamik und Rechtsherzhypertrophie .....</b>                             | <b>114</b> |
| <b>4.3 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf Neointima und Lumen pulmonaler Gefäße .....</b>                              | <b>118</b> |
| <b>4.4 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf den Muskularisierungsgrad und die Wandstärke von pulmonalen Gefäßen.....</b> | <b>123</b> |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>  | <b>126</b> |
| <b>6. Summary .....</b>   | <b>127</b> |
| <b>7 Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>128</b> |
| <b>8 Danksagung .....</b>   | <b>142</b> |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| µg               | Mikrogramm  |
| µl               | Mikroliter  |
| µM               | Mikromolar  |
| A.               | Arterie   |
| c-Abl            | cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| ANP              | atriales natriuretisches Peptid                           |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                       |
| bcr              | breakpoint cluster region                                 |
| bcr-abl          | konstitutiv aktive Tyrosinkinase bei CML                  |
| BMPR2            | Bone-morphogenetic-protein-receptor-β                     |
| BSA              | bovines Serumalbumin                                      |
| Ca <sup>2+</sup> | Kalziumionen  |
| cAMP             | zyklisches Adenosinmonophosphat                           |
| cGMP             | zyklisches Guanosinmonophosphat                           |
| c-kit            | Stammzelleffektor-Rezeptor                                |
| cm               | Zentimeter  |
| CML              | chronisch myeloische Leukämie                             |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlendioxid  |
| CVP              | central venous pressure (zentraler Venendruck)            |
| d                | Tag   |
| DMSO             | Dimethyl Sulfoxid   |
| EGF              | Epidermal growth factor                                   |
| ERK              | Extracellular-signal Regulated Kinasen                    |
| ET <sub>A</sub>  | Endothelin-Rezeptor-Subtyp A                              |
| ET <sub>B</sub>  | Endothelin-Rezeptor-Subtyp B                              |
| FGF              | Fibroblast growth factor                                  |
| g                | Gramm   |
| GIST             | gastrointestinale Stromatumoren                           |
| h                | Stunde  |
| HPV              | Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion                     |

---

|                |   |
|----------------|---|
| HZV            | Herzzeitvolumen                             |
| i.e.           | das heißt                                   |
| i.m.           | intramuskulär                               |
| i.p.           | intraperitoneal                             |
| IC 50          | halbmaximale inhibitorische Konzentration   |
| ICH            | Immunhistochemie                            |
| IPAH           | idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie |
| kg             | Kilogramm                                   |
| KG             | Körpergewicht                               |
| kDa            | kiloDalton                                  |
| LV             | linker Ventrikel                            |
| M              | molar                                       |
| <i>M.</i>      | Muskel                                      |
| MAP-Kinase     | Mitogen activated protein kinase (MAPK)     |
| MCT            | Monocrotalin                                |
| MetOH          | Methanol                                    |
| mg             | Milligramm                                  |
| mmHg           | Millimeter Quecksilbersäule                 |
| mPAP           | mittlerer pulmonal-arterieller Druck        |
| MW             | Mittelwert                                  |
| n              | Anzahl                                      |
| NADPH          | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat        |
| <i>N.</i>      | Nerv  |
| NO             | Stickstoffmonoxid                           |
| NYHA           | New York Heart Association                  |
| O <sub>2</sub> | Sauerstoff                                  |
| °C             | Grad Celsius                                |
| p.             | nach  |
| PAH            | pulmonalerterielle Hypertonie               |
| PAP            | pulmonalerterieller Druck                   |
| PASMC          | pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen     |
| PC             | Personal Computer                           |
| PCNA           | Proliferating cell nuclear antigen          |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PDE             | Phosphodiesterase   |
| PDGF            | Platelet derived growth factor  |
| PDGF-A          | Platelet derived growth factor A (Ligand)                                 |
| PDGF-B          | Platelet derived growth factor B (Ligand)                                 |
| PDGFR- $\beta$  | Platelet derived growth factor Rezeptor beta                              |
| PDGFR- $\alpha$ | Platelet derived growth factor Rezeptor alpha                             |
| PEEP            | positiv-endexpiratorischer Druck, positive end-expiratory pressure        |
| PH              | pulmonale Hypertonie  |
| PIGF            | Placental growth factor   |
| PPH             | primäre pulmonale Hypertonie  |
| PVRI            | Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex                                       |
| Raf             | Rat fibrosarcoma  |
| Ras             | Rat sarcoma   |
| ROS             | Reactive oxygen spezies (reaktive Sauerstoffverbindungen)                 |
| RV              | rechter Ventrikel   |
| RV/LV+S         | Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum               |
| RVP             | right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)                    |
| RVSP            | rechtsventrikulär systolischer Druck, right ventricular systolic pressure |
| s.              | siehe   |
| s.c.            | subkutan  |
| SAP             | systemisch arterieller Druck, systemic arterial pressure                  |
| SCF             | stem cell factor (Stammzellfaktor)  |
| SD              | standard deviation (Standardabweichung)                                   |
| SEM             | standard error mean (Standardfehler)                                      |
| sma             | smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)                               |
| SPH             | sekundäre pulmonale Hypertonie  |
| SU              | Sugen 5416  |
| SVRI            | Systemisch-vaskulärer Widerstandsindex                                    |
| TGF $\beta$     | Transforming growth factor beta   |
| TNFalpha        | Tumornekrosefaktor alpha  |
| u.a             | unter anderem   |

|      |                                      |
|------|--------------------------------------|
| V.   | Vene                                 |
| v.a. | vor allem                            |
| VEGF | vascular endothelial growth factor   |
| VP   | Beatmungsdruck, Ventilation pressure |
| vWF  | von Willebrand Faktor (Faktor VIII)  |
| z.B. | zum Beispiel                         |
| ZNS  | zentrales Nervensystem               |

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Sauerstoff– Elixier des Lebens

Sauerstoff ist ein unverzichtbarer Baustein für zahlreiche wichtige Lebensfunktionen. So beschrieb der Nobelpreisträger von 1931 Otto Heinrich Warburg (deutscher Biochemiker, Arzt, Physiologe) die Aufgabe des Sauerstoffes als „Spender des Lebens“. Die Sauerstoffaufnahme beim Menschen erfolgt hauptsächlich aus der Atemluft. Sie enthält 21% Sauerstoff, 78% Stickstoff, ca. 1% Edelgase und 0,04% Kohlendioxid. Hauptaufnahmeorgan ist die Lunge.

Die Bronchien teilen sich unter kontinuierlicher Abnahme ihrer Durchmesser auf. Am Ende des Bronchialbaumes (Bronchioli terminales) werden die drei nächstfolgenden Abschnitte unterteilt in Bronchioli respiratorii, die Alveolargänge und –säckchen (Ductus alveolares und Sacculi alveolares) und die Lungenbläschen (Alveoli pulmonalis). Die Bronchioli respiratorii münden jeweils in zwei Alveolargänge (Ductus alveolares). Danach folgen die blind endeten Alveolarsäckchen (Sacculi alveolares), die schließlich in die Lungenbläschen (Alveolen) münden. Hier findet der Gasaustausch statt. Die Alveolen haben etwa einen Durchmesser von ca. 0,2 mm. Ein erwachsener Mensch besitzt ca. 300 Millionen Alveolen, so dass für den Gasaustausch eine Fläche von ca. 100 m<sup>2</sup> zur Verfügung steht. Das Bindegewebe zwischen den Bronchien und Alveolen enthält Aufzweigungen der Lungenarterien und -venen, die als Kapillaren enden und die Alveolen körbchenartig umgeben. Der Gasaustausch zwischen den Alveolen und dem Blut der Lungenkapillaren wird als äußere Atmung bezeichnet und erfolgt mit Hilfe der Diffusion. Die Partialdruckdifferenzen zwischen Alveolarraum und dem Kapillarblut spielen dabei eine entscheidende Rolle. Beim gesunden Menschen weist das alveoläre Gasgemisch einen O<sub>2</sub>-Partialdruck von 100 mmHg und einen CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 40 mmHg auf. Im

venösen Blut, das die Lungenkapillaren über die Äste der A. pulmonalis erreicht, liegen die  $O_2$ -Partialdrucke bei 40 mmHg und die  $CO_2$ -Partialdrucke bei 46 mmHg. Bei dem Gefäßsystem der Lunge handelt es sich um ein Niederdrucksystem. Damit unterscheidet es sich in wesentlichen Punkten von Strombahnen anderer Organe. Die arteriellen Drucke und vaskulären Widerstände betragen nur ca. 1/8 der Werte des großen Kreislaufs. Der niedrige Perfusionswiderstand ist durch die spezielle Struktur des pulmonalen Gefäßbettes bedingt. Die pulmonalarteriellen Gefäße bis zu einer Dicke von ca. 80  $\mu m$  besitzen eine kontinuierliche Media. Weiter distal finden sich partiell muskularisierte Gefäße, die in nicht-muskuläre Arteriolen übergehen, woraus ein niedriger Perfusionswiderstand resultiert.

## 1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Sauerstoff ist ein wichtiger Baustein für zahlreiche Lebensfunktionen z.B. für die Energiebereitstellung im menschlichen Körper. Die Zelle benötigt  $O_2$  zur biologischen Oxidation (Verbrennung). Dieser Vorgang wird auch als „innere Atmung“ bezeichnet. Durch biochemische Reaktionen entstehen aus Sauerstoff und Nährstoffen in den Zellen, die für den Menschen verwertbare Energieformen, vor allem das ATP (Adenosin-Tri-Phosphat). Somit ist der menschliche Organismus auf eine ständige  $O_2$ -Versorgung angewiesen.

Eine unzureichende Versorgung mit  $O_2$  z.B. aufgrund niedrigem atmosphärischem  $O_2$ -Partialdruck z.B. in großen Höhen oder bei Lungenerkrankungen kommt es zu einem verminderten  $O_2$ -Gehalt im arteriellen Blut. Der erniedrigte  $O_2$ -Partialdruck bewirkt eine Kontraktion der Pulmonalarterienäste, die sogenannte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. Diese auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnete Reaktion bewirkt, dass die Durchblutung der Lungenalveolen vermindert wird, in denen aufgrund des niedrigen  $O_2$ -Partialdruckes kein vollständiger Gasaustausch stattfinden würde. Damit kommt es zu einer optimalen Anpassung des Organismus an die veränderte  $O_2$ -Situation (Dumas *et al.* 1999).

Die HPV wird in drei Phasen eingeteilt. Die erste Phase ist die akute alveoläre Hypoxie (entsteht innerhalb von Sekunden bis Minuten). Die zweite Phase wird als protrahierte alveoläre Hypoxie (entsteht innerhalb von Stunden) bezeichnet, die in die chronischen Hypoxieprozesse überleitet. Die dritte Phase, die chronische Hypoxie, führt zu einer pulmonalen Hypertonie mit verbundenem Gefäßumbau (Weissmann *et al.* 2001).

Die biochemischen Mechanismen, die zur HPV führen sind für alle drei Phasen bisher ungeklärt. Die molekularen Effektoren dieses Reflexbogens konnten bis jetzt ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden.

Die glatten Muskelzellen werden als Effektorzellen postuliert. Es müssen zusätzlich O<sub>2</sub>-Sensoren vorhanden sein, die den erniedrigten O<sub>2</sub>-Partialdruck wahrnehmen und an die Effektorzellen weiterleiten können. Die intrazelluläre Ca-Konzentration wird erhöht und somit kommt es zu einem Ausstrom von intrazellulärem Kalium. Dadurch wird die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht.

### **1.2.1 Akute und protrahierte alveoläre Hypoxie**

Der menschliche Organismus muss sich ständig wechselnden Umweltbedingungen anpassen. Als Hypoxie bezeichnet man einen verminderten Sauerstoffgehalt im Gewebe. Man unterscheidet eine normobare und eine hypobare Hypoxie. Die normobare Hypoxie bezeichnet eine Reduzierung des relativen Sauerstoffanteils bei gleichem Luftdruck. Bei der hypobaren Hypoxie handelt es sich um einen reduzierten Sauerstoffgehalt und einem reduziertem Luftdruck. Die weitere Aufnahme von Sauerstoff wird hierbei durch verminderten O<sub>2</sub>-Partialdruck in den Alveolen erschwert (von Euler *et al.* 1946).

Dieser Mechanismus tritt schon bei sehr milder Hypoxie (20-60 mmHg) ein (Aaronson *et al.* 2006).

Die Gefäßkontraktion wird durch verschiedene Signalwege eingeleitet, die im Einzelnen noch nicht bekannt sind. Fest steht, dass es zu einer Erhöhung von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kommt, was wiederum einen Ausstrom von intrazellulärem Kalium bewirkt. Durch Membranpolarisierung kommt es zu einer

Kontraktion der Myofibrillen in den glatten Muskelzellen der kleinen Lungenarterien (Humbert *et al.* 2004a). Die Intensität der Kontraktion wird beeinflusst von Stärke und Dauer der alveolären Hypoxie.

Zu weiteren Untersuchungen konnten von Euler und Liljestrand feststellen, dass der pulmonal-arterielle Druck während der Ventilationsphasen mit einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 10% ansteigt. Die Ventilation mit Raumluft führte zu einer reversiblen Verminderung des Druckes bis zum Ausgangswert (von Euler *et al.* 1946).

Derzeit konnte die Frage nach spezifischen Sauerstoffsensoren und Signaltransduktionswegen nur unzureichend beantwortet werden. Die pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) werden in diesem Zusammenhang als Sensor- und Effektorzellen beschrieben. Isolierte PASMC können sich unter hypoxischen Bedingungen kontrahieren und es ist ein intrazellulärer Kalziumspiegel messbar (Murray *et al.* 1990, Madden *et al.* 1992, Weissmann *et al.* 2006a).

In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Enzyme innerhalb der Atmungskette, wie z.B. NAD(P)H-Oxidase (Marshall *et al.* 1996), Cytochrom P450-Enzyme (Zhu *et al.* 2000), Hämoxigenase-2 (Hoshi & Lahiri 2004), ADP-Ribosezyklase und der cADP-Ribose-Hydrolase (Wilson *et al.* 2001) in diesem Zusammenhang eine elementare Rolle spielen.

Man unterscheidet bei der HPV eine biphasische Vasokonstriktion. Die erste, akute Phase beginnt etwa fünf Minuten nach dem hypoxischen Stimulus, sie lässt nach weiteren fünf bis fünfzehn Minuten zum Teil nach. Die zweite Phase, auch subakut oder protrahiert genannt, erfolgt nach etwa 30 Minuten Hypoxie. Die zweite Phase ist durch eine wiederkehrende Zunahme der Vasokonstriktion gekennzeichnet. In der Literatur bestehen unterschiedliche Meinungen hinsichtlich der Vasokonstriktionsphasen. Nicht alle Autoren sehen eine zweigeteilte Situation, obwohl diese bei intakten Lungenmodellen und isolierten pulmonal-arteriellen Gefäßen beschrieben ist (Bennie *et al.* 1991, Zhang *et al.* 1995, Weissmann *et al.* 1995, Weissmann *et al.* 2001). Die bisherigen Forschungsergebnisse beantworten außerdem nicht die Frage, ob die ablaufenden Mechanismen, identisch oder getrennt reguliert werden. In diesem

Zusammenhang kann vermutet werden, dass die zweite Phase, die letztendlich zum vaskulären Remodeling führt, eine maßgebliche Rolle zu spielen scheint.

### 1.2.2 Chronische Hypoxie

Die Daueraktivierung des hypoxischen Vasokonstriktionsreflexes aufgrund chronischer alveolärer Hypoxie führt zum Phänomen des vaskulären Remodelings mit struktureller Fixierung der Widerstandserhöhung und damit zur Rechtsherzhypertrophie und einer Reduktion des Herz-Zeit-Volumens (HZV). Der Gefäßumbauprozess ist charakterisiert durch die *de novo* Muskularisierung und durch eine Hypertrophie der Media (Durmowicz & Stenmark 1999, Jeffery & Wanstall 2001). Es kommt zur Proliferation von Fibroblasten, die von der Adventitia in die Media wandern und dort zu einer Verdickung der Media führen. Ebenfalls proliferieren glatte Muskelzellen der Media in die distalen Lungenarterien und verursachen dort eine Muskularisierung der normalerweise muskelfreien Gefäße (Humbert *et al.* 2004a, Stenmark *et al.* 2006). Die beschriebenen Gefäßumbauprozesse führen zu einer Querschnittsverlegung (Obliteration) und zum Gefäßverlust (Rarefikation) (Stenmark & McMurtry 2005). Dabei beeinflusst die Hypoxie sowohl die Fibroblastenproliferation (Stenmark *et al.* 2002), die Stimulation (Dempsey *et al.* 1991, Lanner *et al.* 2005) als auch eine Hemmung (Stiebellehner *et al.* 2003) des Wachstums der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren. Sie sind für das Zellwachstum und den Gefäßtonus zuständig. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen den Vasokonstriktoren. Produktion und/oder Freisetzung der Vasodilatoren wie z.B. NO und Prostaglandine werden gehemmt. Dagegen werden die Mediatoren, die eine Gefäßkontraktion bewirken wie z.B. Thromboxan, Serotonin und ET-1 gefördert (Rabinovitch 2008).

### 1.3 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung des Lungen-, bzw. des kleinen Kreislaufes.

Das Kreislaufsystem wird in einen großen und kleinen Kreislauf eingeteilt. Der große Kreislauf beschreibt den Weg des sauerstoffreichen, arteriellen Blutes aus der linken Herzkammer in den gesamten Körper. Seine Aufgabe ist die Versorgung der Organe mit O<sub>2</sub>. Das sauerstoffarme, venöse Blut fließt zum rechten Herzen zurück und von dort in den Lungenkreislauf. Hier wird die eingeatmete Luft mit Hilfe des Gasaustausches in den Lungenbläschen in die Lungengefäße aufgenommen. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut fließt zum linken Herzen und weiter in den großen Körperkreislauf.

Normalerweise liegt der pulmonale systolische Blutdruck in Ruhe zwischen 18 und 25 mmHg. Der Grund hierfür liegt darin, dass der Querschnitt des pulmonalen Gefäßsystems sehr groß ist. Daraus resultiert ein niedriger Gefäßwiderstand. Eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes oder des pulmonalen Blutflusses führt zur pulmonalen Hypertonie. Die PH wird eingeteilt in eine pulmonalarterielle Hypertonie (PAH). Es erfolgt eine Abgrenzung zu anderen Formen der PH, die in Folge von Linksherzerkrankungen, chronischen Lungenerkrankungen, thromboembolischen Ereignissen oder anderen Erkrankungen auftreten können.

Die Pathomechanismen für Entstehung der PAH sind weitgehend unbekannt. Die Pathogenese der PH ist multifaktoriell. In aktuellen genetischen und pathophysiologischen Untersuchungen wird deutlich, dass ein Zusammenspiel zwischen genetischen Faktoren und assoziierten Erkrankungen und/oder Triggermechanismen zur Manifestation der Erkrankung führen.

Neuere Erkenntnisse hinsichtlich einer genetischen Ursache bei familiärer pulmonalarterieller Hypertonie brachte die Identifizierung von Mutationen im bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR-2) und activin-like-kinase-type-1. Diese Rezeptoren sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie. Sie sind für die Differenzierung, Proliferation und Apoptose für zahlreiche Zelltypen wichtig. Jedoch weisen die Mutationen nur eine geringe Penetranz von 15-20% auf, so dass man hier lediglich von prädisponierenden Faktoren ausgehen kann (Newman *et al.* 2004).

Im Hinblick auf die pathogentischen Veränderungen des vaskulären Remodelings werden als auslösende Mediatorensysteme die Endothelin-1, Prostaglandine und NO-vermittelten Signalwege diskutiert (Humbert *et al.* 2004a). Diese Einflüsse stellen zugleich die therapeutischen Angriffspunkte der derzeit zugelassenen medikamentösen Therapie dar.

Unbehandelt ist die PH mit einer schlechten Prognose behaftet, da die mittlere Überlebenszeit weniger als drei Jahre entspricht (D'Alonzo *et al.* 1991).

Die PH ist eine schwer zu diagnostizierende Erkrankung. Es existieren keine spezifischen Symptome. Belastungsdyspnoe, Abnahme der körperlichen Belastbarkeit, Müdigkeit, körperliche Schwäche, Angina Pectoris, Synkopen, periphere Ödeme und abdominale Spannung können auf eine PH hinweisen. Die diagnostischen Möglichkeiten konnten durch Einführung von Echokardiographie, einer nichtinvasiven Screeningmethode zur Messung von Druck und Fluß, sehr gut verbessert werden. Für die früher diagnostisch häufig angewendete invasive Rechtsherzkatheterisierung war dagegen ein minimalinvasiver Eingriff notwendig. Die Hauptmerkmale der pulmonalen Hypertonie sind die deutliche Erhöhung des pulmonalen Vasotonus, proliferative Gefäßveränderungen sowie eine Hypertrophie des rechten Ventrikels aufgrund erhöhter Nachlast. Die starke chronische Belastung des rechten Herzens führt in vielen Fällen der PH zur Ausbildung eines Cor pulmonale bis hin zum Rechtsherzversagen, was bei den meisten Patienten zum Tod führt.

### **1.3.1 Definition**

Die pulmonale Hypertonie ist definiert als eine chronische Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (mPAP)  $> 25$  mmHg in Ruhe und  $> 30$  mmHg bei Belastung (Rubin & Roux 2002). Voelkel und Tudor 1999 definieren den Schweregrad der Erkrankung. Eine milde PH liegt bei einem mittleren pulmonal-arteriellen Druck von 25-45 mmHg vor, eine schwere PH bei einem mPAP  $> 45$  mmHg.

### 1.3.2 Klassifikation

Die pulmonale Hypertonie wurde zunächst in eine primäre und eine sekundäre Form eingeteilt. Eine neue klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie wurde 2003 auf der dritten Weltkonferenz in Venedig eingeführt und bestand aus fünf Gruppen (Simonneau *et al.* 2004). Im Jahre 2008 fand die vierte Weltkonferenz in Dana Point (Kalifornien) statt. Die pulmonale Hypertonie wird aktuell folgendermaßen eingeteilt (Simonneau *et al.* 2009):

#### 1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

##### 1.1 Idiopatische PAH (IPAH)

##### 1.2 Erbliche Form PAH

###### 1.2.1 BMPR2

###### 1.2.2 ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Telangiektasie)

###### 1.2.3 Unbekannt

##### 1.3 Medikamente/Giftstoffe

##### 1.4 PAH assoziiert mit:

###### 1.4.1 Kollagenosen

###### 1.4.2 HIV-Infektion

###### 1.4.3 Portale Hypertonie

###### 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern

###### 1.4.5 Schistosomiasis

###### 1.4.6 Chronisch-hämolytischer Anämie

##### 1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen

##### 1.6 Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)

#### 2. Pulmonale Hypertonie bei linksventrikulärer Herzerkrankung

##### 2.1 Systolische Funktionsstörungen

##### 2.2 Diastolische Funktionsstörungen

##### 2.3 Herzklappenerkrankungen

3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen mit/ohne Hypoxämie
  - 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
  - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
  - 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktiven Mustern
  - 3.4 Schlafapnoesyndrom
  - 3.5 Zentrale alveoläre Hypoventilationssyndrome
  - 3.6 Chronische Höhenkrankheit
  - 3.7 Entwicklungsbedingte Fehlbildungen
  
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
  
5. Pulmonale Hypertonie bei unklaren multifaktoriellen Mechanismen
  - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Störungen, Splenektomie
  - 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans Zell Histiozytose: Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
  - 5.3 andere Erkrankungen (der Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Gaucher)
  - 5.4 andere: Kompression der Pulmonalgefäße durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, dialysepflichtige chronische renale Insuffizienz

### **1.3.3 Pathophysiologie und Vaskuläres Remodeling**

Bei der PH kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen insbesondere der kleinen pulmonalen Gefäße, was als vaskuläres Remodeling bezeichnet wird. Alle Schichten der Gefäßwand sind vom Umbauprozess betroffen. Hierzu zählen Adventitia (Außenschicht), die Muscularis (Mittelschicht) und die Intima (Innenschicht). Alle in der Gefäßwand befindlichen Zelltypen (Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten) sowie Entzündungszellen und Thrombozyten spielen hierbei eine bedeutende Rolle. (Humbert *et al.* 2004a). Durch Hypertrophie, Hyperplasie und Verstärkung der

extrazellulären Matrix der Zellen aller Gefäßschichten kommt es zu einer Verdickung und Veränderung der Gefäßwandarchitektur. Als Folge der Media-Verdickung, Neointimabildung und Entstehung von plexiformen Läsionen kommt es zur Verengung oder Obstruktion des Gefäßlumens der pulmonalen Strombahn. Der Widerstand wird erhöht und es erfolgt ein Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes. Die Compliance (Dehnbarkeit) der Gefäße wird durch die Verdickung der Adventitia verringert, was den Druckanstieg zusätzlich fördert (Pietra *et al.* 2004). Außerdem kommt es zu einer distalen Ausbreitung glatter Muskelzellen in kleine, physiologisch nicht muskularisierte Pulmonalarterien. Dieser Vorgang wird als *de novo*-Muskularisierung bezeichnet (Humbert *et al.* 2004a).

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) ist ein histologischer Marker für die Proliferation. Es stellt ein auxiliäres Protein dar, das für die DNA-Replikation notwendigen DNA-Polymerase  $\delta$  (delta) zuständig ist (Bravo & Donald-Bravo 1987). Der Zellzyklus bestimmt die Expression der PCNA. Die Synthese beginnt in der G<sub>1</sub>-Phase und erreicht sein Maximum in der S-Phase (Takasaki *et al.* 1981; Celis & Celis 1985; Morris & Mathews 1989). PCNA ist im Nucleolus lokalisiert, unter abnehmender Zellproliferation wird es vermindert nachgewiesen (Bravo *et al.* 1981).

Die den genannten Gefäßveränderungen zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen sind weitgehend ungeklärt (Olschewski *et al.* 1999).

An der Modulation des vaskulären Remodelings sind einige Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide und Zytokine beteiligt. Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffverbindungen spielen ebenfalls eine elementare Rolle. In Tabelle 1 werden eine Reihe von Faktoren genannt, von denen man annimmt, dass sie an der Proliferation glatter Muskelzellen und an der Kollagensynthese beteiligt sind.

**Tabelle 1: Faktoren, die die Proliferation glatter Muskelzellen und die Kollagensynthese beeinflussen können.**

| Proliferation glatter Muskelzellen |                      | Typ I Kollagensynthese |                |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|----------------|
| stimulierend                       | hemmend              | stimulierend           | hemmend        |
| IGF 1                              | TGF- $\beta$ , BMP's | IGF-1                  | Prostaglandine |
| IGF 2                              | IL-1                 | IGF-2                  | Interferone    |
| PDGF                               | Prostaglandine       | TGF- $\beta$           | NO             |
| EGF                                | Interferone          | PDGF                   | ANP            |
| bFGF                               | TNF- $\alpha$        | Angiotensin II         |                |
| aFGF                               | Heparansulfate       | Tenascin               |                |
| Insulin                            | NO                   |                        |                |
| Heparin                            | Kohlenmonoxid        |                        |                |
| Thromboxan A2                      | Adrenomedullin       |                        |                |
| Endothelin-1                       | ANP                  |                        |                |
| Angiotension II                    | Isoproterenol        |                        |                |
| Serotonin                          |                      |                        |                |
| Tenascin                           |                      |                        |                |
| Leukotriene                        |                      |                        |                |
| ROS                                |                      |                        |                |

Modifiziert nach: Pulmonary Circulation; Diseases and their treatment; second edition Arnold London publishing; Kapitel 5 (Nicholas W Morell, Trina K Jeffrey)

Die Rezeptoren für die meisten Wachstumsfaktoren sind transmembranständige, tyrosinspezifische Proteinkinasen (Rezeptortyrosinkinasen), die sich an der Zelloberfläche befinden. Sie umfassen Rezeptoren für den Plaket derived growth factor (PDGF), Fibroblast growth factor (FGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Epidermal growth factor (EGF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF). Die Phosphorylierung des intrazellulären Teils des Rezeptors und die Initialisierung der intrazellulären Signalkaskaden werden durch die Bindung des jeweiligen Liganden an den Rezeptor erreicht. TGF- $\beta$  und Bone Morphogenetic Protein (BMP) agieren über Rezeptor-Serin- oder Threoninkinasen. Die Wachstumsfaktor vermittelten zellulären Effekte wie die Proliferation, Migration und der Schutz vor Apoptose werden somit ausgelöst.

### 1.3.4 Gegenwärtige Therapie der pulmonalen Hypertonie

Viele Jahre war man der Überzeugung, dass es sich bei der pulmonalen Hypertonie, um eine vasokonstriktive Erkrankung handelt. Deshalb wurden die Therapiestrategien auf diese Ursache fokussiert und man behandelte die Patienten mit „reinen“ Vasodilatoren, wie z.B. Kalziumkanalblocker (Rich *et al.* 1992). Jedoch konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil von Patienten auf diese Therapie anspricht (Hoepfer *et al.* 1994). So kann die Behandlung lediglich für Menschen empfohlen werden, die nur unter einer Vasokonstriktion leiden und keine proliferativen Vaskulopathien besitzen.

Mit den Erkenntnissen, dass die PH sowohl eine vasokonstriktive sowie eine vasoproliferative Erkrankung ist, wurden die Therapiestrategien verändert. Eine Vielzahl von Patienten profitierte bezüglich einer Verbesserung ihrer Lebensqualität und der hämodynamischen Parameter.

#### **Prostaglandine:**

Verschiedene Analoga des Prostazyklins ( $\text{PGI}_2$ ), das selbst sehr instabil ist, wurden für die Therapie der PH entwickelt. Dazu zählen Epoprostenol, Trepostinil, Iloprost und Beraprost. Epoprostenol muß kontinuierlich intravenös verabreicht werden. Klinische Studien an Prostaglandinen zeigten deren vasodilative und antiaggregatorische Eigenschaften. Zusätzlich wurde die Hämodynamik sowie die Überlebensrate durch diese Substanzen verbessert (Barst *et al.* 1996). Die Verabreichung erfolgt über einen venösen Dauerkatheter. Als Komplikationen können Thrombosen, Sepsis, abrupte Unterbrechung der lebensnotwendigen Medikamentenzufuhr durch Verlegung des Katheters oder Versagen der Pumpe auftreten. Aus diesem Grund wurde Trepostinil entwickelt. Dabei handelt es sich um ein stabiles Prostazyklinanalogon, daß kontinuierlich subkutan verabreicht wird. Ein oral verfügbares Prostazyklin ist Beraprost. Die Einnahme des Wirkstoffes erfolgt täglich, erwies sich aber in klinischen Studien als weniger effektiv. Iloprost wird inhalativ verabreicht, was den Vorteil hat, dass es selektiv in den erkrankten Gefäßbereich wirkt und systemisch-vasodilatativen Effekte hervorruft (Olschewski *et al.* 1996). Die relativ kurze Halbwertszeit von

inhalativem Iloprost erfordert sechs bis zwölf Stunden Inhalation pro Tag, was als Nachteil zu bewerten ist. Eine weitere negative Eigenschaft bei der Prostaglandintherapie stellt die nach einiger Zeit eintretende pharmakodynamische Toleranz dar, die eine sukzessive Dosissteigerung notwendig macht, um gute Behandlungserfolge zu erzielen.

**Endothelinrezeptorantagonisten:**

Endothelin-1 ist ein starker Vasokonstriktor, der bei Patienten der PH hochreguliert ist (Giaid *et al.* 1993). Biologische Effekte von Endothelin-1 werden durch die Aktivierung der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt. Bosentan (Tracleer®) ist ein oral verfügbarer ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist, welcher sowohl systemisch als auch pulmonal vasodilativ wirkt und den pulmonal-arteriellen Druck sowie das Herzzeitvolumen verbessert. In klinischen Studien konnte bei Patienten die körperliche Belastbarkeit und die hämodynamischen Parameter verbessert werden (Channick *et al.* 2001, Rubin *et al.* 2002). Die Therapie mit Bosentan erreichte sogar eine Steigerung der Überlebensrate (McLaughlin *et al.* 2005). Die Substanz ist lebertoxisch, so dass es bei Patienten mit portopulmonaler Hypertonie nicht angewendet werden darf. Die selektiven ET<sub>A</sub>-Antagonisten Sitaxsentan (Thelin®) und Ambrisentan (Letairis®, Volibris®) sind ebenso für die PH-Therapie zugelassen (Dupuis & Hoepfer 2008). Beide stellen bis jetzt eine Alternative zu Bosentan dar, denn sie zeigen eine geringere Hepatotoxizität. Es existieren jedoch noch keine Langzeitstudien, die dies eindeutig belegen.

**Phosphodiesterase-5 Hemmstoffe:**

Der PDE5 Hemmstoff Sildenafil (Viagra® bzw. Revatio®, Pfizer) ist ein oral wirksames vasodilatatives Medikament. 2005 erhielt Sildenafil die Zulassung (Europa und USA) für die PH und ist unter dem Handelsnamen Revatio® erhältlich. Untersuchungen zur pulmonalen Hypertonie sowohl in tierexperimentellen Studien als auch beim Menschen zeigte eine erhöhte Expression und Aktivität von PDE5 in peripheren pulmonal arteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs). Sildenafil konnte bis jetzt in zahlreichen klinischen als auch tierexperimentellen Studien erfolgreich angewendet werden.

**Kombinationstherapie mit verschiedenen Präparaten:**

Neben der Therapie mit einzelnen Wirkstoffen stellt eine Kombinationstherapie eine weitere Behandlungsmöglichkeit dar. Man versucht damit die verschiedenen Pathomechanismen und Signalwege gleichzeitig zu beeinflussen und erwartet demzufolge additive Effekte der Substanzen (Rubin & Galie 2004, Humbert *et al.* 2004b).

Es finden sich zunehmend Hinweise, dass eine effektive Therapie der PH das vaskuläre Remodeling beeinflussen sollte. Neuere Substanzen mit antiproliferativer Aktivität, wie cGMP-Stimulatoren, Elastaseinhibitoren und Tyrosinkinase-Inhibitoren, eröffnen neue Behandlungsstrategien.

**Körperliches Training:**

Eine weitere Strategie zur Behandlung stellt das körperliche Training von PH Patienten dar. Normalerweise sollten Patienten der PH unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung jegliche körperliche Aktivität, die zu Dyspnoe oder Angina führen könnten, vermeiden. Der Grund hierfür ist die fehlende Möglichkeit einer suffizienten pulmonalen Vasodilatation. Jeder Anstieg des HZV bedingt eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) und des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR), was in extremen Fällen zu einer Rechtsherzinsuffizienz führt. Dennoch ist es möglich, durch gezieltes und individuell angepasstes körperliches Training und Atemtraining eine deutliche Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit und der Lebensqualität zu bewirken (Mereles *et al.* 2006).

**1.4 Experimentelle Tiermodelle**

Es bestehen weiterhin offene Fragen hinsichtlich der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie beim Menschen. Ebenso sind die verbesserten Therapiemaßnahmen immer noch nicht voll ausreichend, um eine Heilung der Erkrankung erwirken zu können. Bisherige Erkenntnisse über Ursachen und Mechanismen der PH, als auch Therapiestrategien konnten in experimentellen

Tiermodellen gut erforscht werden. Hierzu zählen das Monocrotalinmodell der Ratte sowie das Modell der Hypoxie-induzierten PH bei Ratte und bei Maus. Ein weiteres Modell ist die Hypoxie-induzierte PH in Kombination mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416. Im weiteren Verlauf werden diese drei Modelle erläutert und abschließend als Diskussionsgrundlage verwendet.

#### **1.4.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten- bzw. Maus-Modell**

Die chronische Hypoxie zur Induzierung der PH in tierexperimentellen Studien ist ein schon lange bekanntes Modell (Urbanova *et al.* 1973). Dabei bestehen tierspezifische Unterschiede im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber dem hypoxischen Stimulus. Kaninchen zeigen fast keinerlei Reaktion, hingegen reagieren Rinder sehr empfindlich und entwickeln eine starke Vasokonstriktion (Reeves *et al.* 1979). Nagetiere (z.B. Ratte, Maus) eignen sich besonders gut für diese Art von Tiermodell.

In Untersuchungen bezüglich der Sensibilität gegenüber der Hypoxie bei gesunden Menschen konnte beobachtet werden, dass auch hier Unterschiede bei der Vasokonstriktion und damit verbundenem Anstieg des PAP von fast keiner bis zu sehr starker Reaktion variieren (Naeije *et al.* 1982, Laks *et al.* 1997).

Die Auswirkungen der chronischen Hypoxie zeigen im Tiermodell eine etwa 50%ige Erhöhung des PAP sowie eine Verdopplung der Herzratio (Rabinovitch *et al.* 1979). Im histologischen Bild fällt eine Verdopplung der Wandstärke und eine Muskularisierung der distalen pulmonalarteriellen Gefäße, die beim Gesunden nicht muskularisiert sind, die sogenannte *de novo* Muskularisierung (Rabinovitch *et al.* 1979, Hislop & Reid 1976) auf.

Die vaskulären Veränderungen ähneln denjenigen, deren Ursache in obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen liegen oder denen die durch Aufenthalt in großen Höhen erzeugten PH bei Menschen zu finden sind. Die Hypoxie-induzierte PH ist teilweise stabil. Bei Rückführung in normoxische Gegebenheiten können hämodynamische Parameter, wie z.B. PAP und Herzratio, innerhalb eines Zeitraumes von etwa 10 bis 84 Tage wieder annähernd physiologische Bereiche erreichen (Ressler *et al.* 1974). Die Muskularisierung kleiner pulmonaler arterieller

Gefäße bildet sich langsamer zurück (ca. ein Monat). Jedoch erfolgt keine vollständige Rückbildung der Muskulatur, sondern lediglich eine Rückbildung von voll muskularisierten zu partiell muskularisierten Gefäßen (Meyrick & Reid 1980, Hislop *et al.* 1977, Fried & Reid 1984).

Die Hypoxie gilt als eine der wesentlichen Ursachen für die Entstehung der PH, so dass man dieses Modell als physiologisch bezeichnen kann. Es spiegelt die Auswirkungen der Hypoxie gut wieder. Für die weitere Erforschung noch offener Fragen, im Hinblick auf biochemische und molekularbiologische Mechanismen sowie das Gefäßremodeling, deren exakte Signalwege derzeit als ungeklärt gelten, ist es gut geeignet. Durch die bisherigen Erkenntnisse über die PH, die aus dieser Art Tiermodell gewonnen wurden, konnten neue Therapiestrategien entwickelt werden. Hier sind als Beispiele Sildenafil (PDE5-Inhibitor) und Imatinib (Tyrosinkinase-Hemmstoff) zu nennen.

#### **1.4.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Rezeptor Inhibitor SU5416 im Ratten-Modell**

Ein weiteres Modell zur Induzierung der PH stellt die chronische Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2 Rezeptor Inhibitor SU5416 dar. Das Modell wird als schwere Form des Lungenhochdruckes beschrieben (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001, Taraseviciene-Stewart *et al.* 2006, Oka *et al.* 2007). Als Mechanismus wird eine erhöhte Apoptose von Endothelzellen vermutet.

Es existiert aber weiterhin eine erhöhte Proliferation von Endothelzellen in den kleinen Lungengefäßen, die wie bei der humanen Erkrankung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) zu einem Verschluss der Gefäße führt.

In Zusammenhang mit der PH ist der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) bei Patienten mit PAH in den plexiformen Läsionen überexprimiert (Geiger *et al.* 2000; Tudor *et al.* 2001).

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese vor allem bei Tumoren und ist somit eine Schlüsselsubstanz auf dem Gebiet der Tumorforschung (Ferrara & vis-Smyth 1997). VEGF ist ein wichtiger Wachstums- und Überlebensfaktor für Endothelzellen, dies konnte in

zahlreichen in-vivo- und in-vitro-Studien gezeigt werden (Gerber *et al.* 1998). VEGF wird von Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft der Gefäße ausgeschüttet und hat vor allem eine parakrine Wirkung. Wie bereits erwähnt induziert VEGF das Wachstum und das Überleben von Endothelzellen, fördert aber ebenso deren Wanderung und verändert deren Zellpermeabilität (Ferrara 1999).

Hypoxie steigert die Expression von VEGF, dass bedeutet mit Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes steigt bei einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen die Ausschüttung von VEGF mRNA schnell und reversibel (Shweiki *et al.* 1992). Die Transkription vom VEGF-Gen wird über die Familie der hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) reguliert. Die Translation von VEGF-mRNA wird über eine mRNA-Stabilisierung, auf Proteinebene bei größeren VEGF-Varianten durch proteolytische Freisetzung aus der extrazellulären Matrix geregelt (Ideka *et al.* 1995, Levy *et al.* 1995).

VEGF wird als ein wichtiger Regulator des vaskulären Remodelings angesehen (Tuder *et al.* 1995, Tuder *et al.* 1999, Voelkel *et al.* 2002).

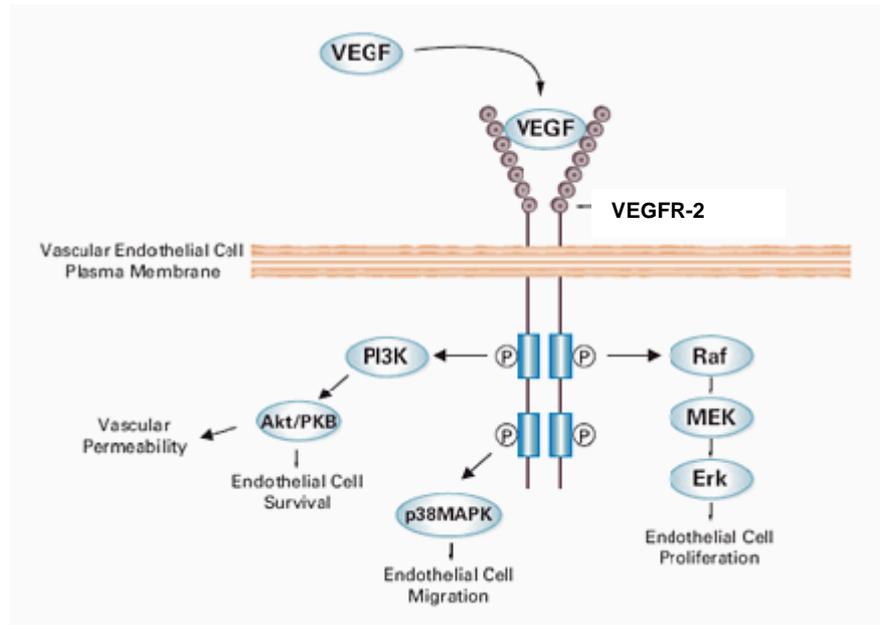
Die VEGF-Familie besteht aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF (Placental growth factor). VEGF-A ist von allen Vertretern am besten charakterisiert. Im Folgenden wird VEGF als synonym für VEGF-A verwendet. In zahlreichen in-vivo und in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass VEGF ein zentraler Wachstums- und Überlebensfaktor für Endothelzellen (EC) ist (Gerber *et al.* 1998). VEGF ist ein homodimeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Ferrara & Henzel 1989).

Es besteht aus vier verschiedenen VEGF-A Isoformen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>), mit jeweils 121, 165, 189, 206 Aminosäuren. VEGF<sub>165</sub> ist die am häufigsten vorkommende Isoform (Neufeld *et al.* 1999). VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> sind hauptsächlich für die Angiogenese und die Proliferation von Endothelzellen zuständig, VEGF<sub>121</sub> bindet ausschließlich an VEGFR-2 (Gitay-Goren 1996). VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> besitzen eine höhere Affinität zur extrazellulären Matrix. Hingegen zeigen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> eher eine geringfügigere Affinität zur extrazellulären Matrix (Ho & Kuo 2007).

Es konnten drei Typ III Rezeptortyrosinkinasen als VEGF-Rezeptoren identifiziert werden (Ferrara *et al.* 2003). Sie bestehen aus sieben extrazellulären

Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion sowie einer übereinstimmenden intrazellulären Tyrosinkinase-Sequenz, die durch Kinase-Insert-Domänen unterbrochen wird (Karkkainen & Petrova 2000). An der Zelloberfläche von vaskulären Endothelzellen werden vorwiegend VEGF-R1 und VEGF-R2 exprimiert. VEGF-R3 (Flt4) ist hauptsächlich auf lymphatischen Gefäßen/Endothelzellen lokalisiert, er ist jedoch kein Rezeptor für VEGF-A (Karkkainen *et al.* 2002).

Der jeweilige Ligand bewirkt eine Dimerisierung der Rezeptoren, die wiederum zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinkinasen in der Endothelzelle führt. Diese ist der Auslöser für den intrazellulären Signaltransduktionsweg. Die Bindung von VEGF an den VEGFR-1 bewirkt die Migration von Endothelzellen (Arora & Scholar 2005). Die Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF vermittelt eine Ras- und Proteinkinase C- (PKC) Aktivierung, wodurch Zellproliferation induziert wird. Außerdem erfolgt durch die Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase Aktivierung ein starkes Survivalsignal in der Zelle [(Abbildung 1), (Karkkainen & Petrova 2000, Ferrara *et al.* 2003)]. VEGF-A binden sowohl an den VEGF-R1, als auch an den VEGFR-2. VEGF-B und PlGF binden an VEGFR-1 und VEGF-C, VEGF-D binden speziell VEGFR-2 und VEGFR-3. VEGF-E bindet spezifisch nur an den VEGFR-2 (Ho & Kuo 2007). Einige Vertreter der VEGF-Familie (VEGF<sub>165</sub>, PlGF-2) haben eine geringe Affinität zu Neuropilin-1 und -2 (Scavelli *et al.* 2004). Diese Rezeptoren, die vor allem an der Embryonalentwicklung und der Tumorangio-genese beteiligt sind, wirken als VEGF-Co-Rezeptoren und können die Wirkung von VEGF potenzieren (Ho & Kuo 2007).



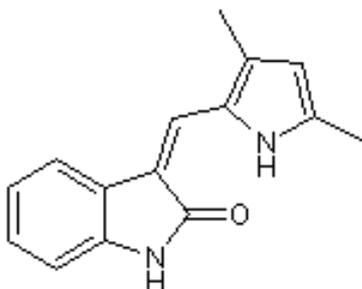
**Abbildung 1: VEGFR-2 Signaltransduktionsweg in der Endothelzelle**

VEGF bindet an den VEGFR-2-Rezeptor. Diese Bindung führt zur Dimerisierung der immunoglobulin-ähnlichen Bindungsdomäne wodurch intrazellulär verschiedene Proteine phosphoryliert werden. Eine Aktivierung der beiden Signalwege von Ras und PKC führen über RAF, MEK und Erk zu einer Zellproliferation (Zellwachstum). Die PI3-Kinase-Aktivierung führt zu einem „Survival-Signal“ (Überlebenssignal) und zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität in der Endothelzelle (Rini & Small 2005).

#### 1.4.2.1 VEGFR-2 Inhibitor SU5416

SU5416 (Semaxanib, Fa. SUGEN Inc., South San Francisco, USA, mittlerweile gehört die Fa. SUGEN zur Fa. Pfizer) ist ein kleinmolekularer kompetitiver Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität und Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion von VEGFR-2 (KDR/Flk1), c-Kit und FLT-3 (Mendel *et al.* 2000a, Yee *et al.* 2002). Die Substanz ist lipophil und stark proteingebunden. Sie wird über das Cytochrom P450-System (CYP1A2 und CYP3A4) metabolisiert. SU5416 besitzt eine kurze Plasma-Halbwertszeit (~ 30 Minuten) (Antonian *et al.* 2000). Untersuchungen im Hinblick auf die Effektivität, konnte im Xenograft-Mausmodell, jedoch eine lang anhaltende inhibitorische Wirkung auch bei 1-2 x wöchentlicher Applikation, nachgewiesen werden (Mendel *et al.* 2000b). Eine Erklärung hierfür ist die

Anreicherung der Substanz in den Zielzellen mit fortbestehender Wirkung auch nach kurzer Exposition gegenüber mM Konzentration (Halbwertszeit am Rezeptor > 96 Stunden).



**Abbildung 2: Strukturformel SU5416 (Z-3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidenyl]-2-indolinon)**

SU5416 zeigt eine selektive kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Funktion des VEGFR-2 und blockiert so die Signalweiterleitung. Die Substanz hemmt die VEGF-stimulierte DNA-Expression in kultivierten humanen Gefäßendothelzellen.

In vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass SU5416 einen schnellen, lang anhaltenden, antiproliferativen Einfluß auf Endothelzellen ausübt (Fong *et al.* 1999). In biochemischen Untersuchungen hatte SU5416 die gleiche inhibitorische Aktivität gegenüber dem PDGF-Rezeptor wie zu VEGFR-2. Im Gegensatz dazu zeigte SU5416 in Zellkulturen in Bezug auf die Hemmung der PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung eine 20fach schwächere Wirkung als im Gegensatz zur Hemmung der Flk1-Phosphorylierung. SU5416 hemmt den FGF (Fibroblast growth factor)-Rezeptor nur schwach, den EGF (Epidermal growth factor)-Rezeptor nicht (Fong *et al.* 1999).

SU5416 wurde als erster VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor in großen klinischen Studien getestet (Glade-Bender *et al.* 2003, Stadler & Wilding 2003, Stopeck *et al.* 2002). In einer randomisierten Phase III-Studie wurde SU5416 zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms verwendet. SU5416 scheiterte in dieser Untersuchung, da die Überlebensrate nicht verbessert werden konnte (Eskens 2004). In Phase II-Studien zu Prostata-Krebs-Erkrankung, Nierenzellkrebs-Erkrankung und zum osseären Myelom konnten zusätzlich keine

objektiven Resultate erzielt werden. Bei der Therapie mit SU5416 können folgende Nebenwirkungen auftreten: Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Asthenie, Schmerzen an der Infusionsseite, Phlebitis, Stimmlagenveränderungen und Fieber (Arora & Scholar 2005).

### **1.4.3 Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten-Modell**

In diesem Tiermodell sind die pathologischen und pathohistologischen Veränderungen bei der Ratte den multiplen Läsionen bei der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen sehr ähnlich (Meyrick *et al.* 1980).

Im Jahre 1961 stellten erstmals Lalich und Merkow bei Ratten eine Entzündung in den Pulmonalarterien nach Fütterung mit Samen von *Crotalaria spectabilis* fest (Lalich & Merkow 1961). Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus *Crotalaria* (Familie Leguminosae). Die Tiere erhalten eine einmalige Injektion von 60 mg/kg subcutan oder intraperitoneal (Perazzo *et al.* 1999).

Es wird nach Aufnahme in der Leber durch mischfunktionelle Oxidasen (Cytochrom-P45 Enzyme) metabolisiert. Das Ergebnis sind alkylierende pyrrolische Dehydro-Alkaloide (Mattocks 1968). Diese gelangen über die Blutbahn zur Lunge und verursachen dort charakteristische Gefäßläsionen. Diese toxischen Schädigungen schreiten in den nächsten Wochen weiter fort. Die Tiere zeigen klinische Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz, vor allem Dyspnoe, Zyanose und periphere Ödeme. Eine progressive Verdickung der Media in den Pulmonalarterien und –arteriolen sowie eine signifikante Hypertrophie des rechten Herzens treten auf. Es erfolgt eine exzentrische Dilatation des rechten Ventrikels sowie eine Dekompensation. Die Tiere sterben schließlich an Rechtsherzversagen. Nur das rechte Herz zeigt eine Hypertrophie die mit vaskulären Veränderungen korreliert.

Monocrotalin findet weiterhin Anwendung bei Ratten in Kombination mit einer einseitig durchgeführten Pneumektomie. Hierbei zeigen sich die typischen neointimalen Veränderungen bis hin zum Verschluss kleiner Lungenarteriolen (Jeffery & Wanstall 2001).

Bei der Maus führte bis heute eine Verabreichung des aktiven Metaboliten Dehydromonocrotalin zu keiner pulmonalen Hypertonie. Mäuse verfügen im Vergleich zur Ratte über einen Reparaturmechanismus. Die Tiere zeigten nur akut entzündliche und ödematöse Lungenveränderungen und im späteren Verlauf eine leichte Fibrose des Lungenparenchyms (Dumitrascu *et al.* 2008). Jedoch existiert eine widersprüchliche Veröffentlichung (Raoul *et al.* 2007), wo eine schwere pulmonale Hypertonie durch Monocrotalin-Injektion bei Mäusen beschrieben wurde. Das Monocrotalin-Modell findet auch bei Meerschweinchen (Tatebe *et al.* 1996), Kaninchen (Gunaydin *et al.* 2002), Hunden (Takahashi *et al.* 2004) und Lämmern (Katayama *et al.* 1995) Anwendung.

Dieses Modell wurde schon häufig in präklinische Studien eingesetzt. Beispielsweise für Untersuchung von Prostazyklinanaloga, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Endothelinrezeptorantagonisten. Diese Wirkstoffe werden gegenwärtig für die Behandlung von Patienten mit Pulmonaler Hypertonie verwendet.

## 1.5 Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Stickstoffmonoxid (NO) wurde bereits 1978 von Murad *et al.* als „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) identifiziert. NO ist ein sehr potenter Vasodilatator und somit ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus. NO wird hauptsächlich in der Lunge durch NO-Synthasen freigesetzt. Hauptbildungsort sind das Gefäßendothel und das Epithel der Atemwege (Ghofrani *et al.* 2004a). Es existieren drei NO-Synthasen, die auf immunologischer, neuronaler und kardiovaskulärer Ebene eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) und die neuronale NO-Synthase (n-NOS, NOS1). Die eNOS stellt dabei die wichtigste Isoform im kardiovaskulären System da.

Physiologisch wird NO aus Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff mit Hilfe der endothelialen NO-Synthase freigesetzt. Es gelangt mit Hilfe der Diffusion zu den Zielzellen, wo es an das Häm der löslichen Guanylatcyclase bindet und diese aktiviert (Ignarro *et al.* 1987). Die Aktivierung bewirkt eine vermehrte Produktion

von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP ist ein Second messenger, der eine entscheidende Rolle bei der Relaxation der glatten Muskulatur spielt. Der intrazelluläre Anstieg des cGMP-Spiegels bewirkt einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Austrom aus der Zelle und damit eine Relaxation der Muskelzelle. Die Wirkung von cGMP während der beschriebenen Signaltransduktion wird durch die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) eingeleitet. Der Abbau von cGMP zu Guanosinmonophosphat erfolgt durch Phosphodiesterasen, die damit das cGMP-Signal beenden (Beavo & Brunton 2002).

Die eNOS-Aktivität wird nicht nur, wie oben beschrieben durch die Rezeptoraktivität induziert, sondern ebenfalls durch Scherkräfte (shear stress) gesteigert. Eine erhöhte Blutflußrate führt zu einer erhöhten NO-Synthese durch die Phosphorylierung von eNOS (Corson *et al.* 1996). Dieser akut einsetzende vasodilatatorische Reflex wird durch verschiedene Scherkraft-sensitive Mechanorezeptoren in den Endothelzellen übermittelt. Die gesteigerte NO-Produktion führt zur vermehrten Bildung von cGMP und damit zur Vasodilatation. Somit erfolgt eine schnelle Anpassung an die erhöhte Blutflußrate und folglich zu einer Verminderung der Scherkraft durch die Gefäßdilatation. Im Gegensatz dazu führt eine Blockierung der NO-Synthase durch den Antagonisten NG-Monomethyl-L-Arginin zu einer Verstärkung der hypoxischen Vasokonstriktion (Archer *et al.* 1989).

Die eNOS-Verfügbarkeit ist bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie verringert (Xu *et al.* 2004). Klinische Studien von Giaid & Saleh 1995 und Xu *et al.* 2004 konnten dies bestätigen. Dagegen wird von Xue & Johns 1995 und Tuder *et al.* 1999 eine erhöhte eNOS-Expression bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie beschrieben.

## **1.6 Phosphodiesterasen bei pulmonaler Hypertonie**

Die Familie der Phosphodiesterasen (PDE) sind zelluläre Enzyme, die für den Abbau der zyklischen Monophosphate cAMP und cGMP zu AMP bzw. GMP verantwortlich sind. Gegenwärtig werden elf Phosphodiesterasen, die durch

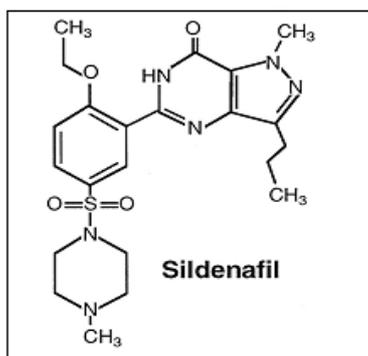
15 Gene des Säugetiergenoms codiert werden, beschrieben. Im Allgemeinen bestehen Phosphodiesterasen aus einer homologen katalytischen Domäne mit ca. 300 Aminosäuren am C-Terminus. Histidin gilt hier als die wichtigste Aminosäure. Die Proteindomänen, die die Regulation der enzymatischen Aktivität und der subzellulären Lokalisation steuern, befinden sich größtenteils im N-terminalen Teil (Conti & Beavo 2007).

Die Einteilung erfolgt nach ihrem Substrat, ihren regulatorischen Charakteristiken sowie dem Verhalten gegenüber unterschiedlichen Inhibitoren. Die PDE1 metabolisiert cAMP und cGMP und wird durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin stimuliert. PDE2 baut ebenfalls beide zyklischen Nucleotide ab und erhält einen Stimulus über cGMP. PDE3 zählt zu den funktionell cAMP-spaltenden PDEs. PDE4 ist eine cAMP-spezifische PDE, eine Inhibition wird durch Rolipram erreicht. PDE5 hydrolisiert ausschließlich cGMP. Die PDE6 ist ein wesentliches Enzym der Retina und reagiert spezifisch auf die cGMP der Photorezeptoren. PDE7 ist cAMP-spezifisch und reagiert gegenüber Rolipram unempfindlich. PDE8 ist cAMP spezifisch und PDE9 ist cGMP-spezifisch. PDE10 und PDE11 hydrolisieren beide cAMP und cGMP (Omori & Kotera 2007, Bender & Beavo 2006).

Die Familie der PDE5 befindet sich vorwiegend in der glatten Muskulatur der Corpora cavernosa penis, in den Lungengefäßen und in den Thrombozyten (Matsumoto *et al.* 2003). Beobachtungen zur pulmonalen Hypertonie sowohl in tierexperimentellen Studien als auch beim Menschen zeigte eine erhöhte Expression und Aktivität von PDE5 in peripheren pulmonal arteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs). Dies kann zur Beeinträchtigung der Gefäßfunktion und zur gesteigerten Proliferation der glatten Muskelzellen beitragen (MacLean *et al.* 1997, Wharton *et al.* 2005, Schermuly *et al.* 2008). Die Enzyme der PDE5 sind hochspezifisch für cGMP, sowohl für die katalytische als auch auf der cGMP-bindenden Seite (Thomas & Ramwell 1992).

## 1.7 Phosphodiesterase-5 Hemmstoff Sildenafil

Ursprünglich wurde Sildenafil im Jahre 1989 zur Entwicklung neuer Herzmedikamente synthetisiert. Die erektionssteigernde Wirkung war eine dabei auftretende Nebenwirkung. Sildenafil erhielt zunächst 1998 unter dem Handelsnamen Viagra<sup>®</sup> eine Zulassung zur Behandlung der erektilen Dysfunktion. Die positiven Effekte von dem PDE5-Inhibitor auf das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie wurden wenige Jahre später festgestellt. 2005 erhielt Sildenafil sowohl in Europa als auch in den USA die Zulassung für die PH und ist unter dem Handelsnamen Revatio<sup>®</sup> erhältlich (Ghofrani *et al.* 2002, Ghofrani *et al.* 2003).



**Abbildung 3: Strukturformel von Sildenafil**

Die Wirkung von Sildenafil wird erzielt durch Bindung an die aktive Seite der PDE5. Sildenafil zeigt eine 130-fach stärkere Wirkung auf PDE5 als auf PDE1 und wirkt dagegen nur ungefähr 10-fach stärker auf PDE5 als auf PDE6. Aufgrund dieser schwachen Hemmung gegenüber PDE6, die der Signaltransduktion in der Retina dient, können Farbsehstörungen eine seltene Nebenwirkung des Medikamentes darstellen (Saenz de Tejada *et al.* 2001, Weeks *et al.* 2005). Als weitere Nebenwirkungen können Kopfschmerzen, Gesichtsrötung, seltener Verdauungsstörungen, Schwindel, verstopfte Nase oder Herzklopfen auftreten (Viagra<sup>®</sup> Gebrauchsinformation: Informationen für den Anwender, Pfizer).

Die Therapie erfolgt durch orale Gabe dreimal täglich von je 20 mg Sildenafil (Galie *et al.* 2005).

Es findet eine schnelle Resorption statt. Die höchste Konzentration wird etwa 60 Minuten nach Einnahme erreicht. Der Abfall des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) und der des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR) halten nur für ca. vier Stunden an (Lepore *et al.* 2002) und haben keinen wesentlichen Einfluß auf den systemisch-arteriellen Druck (Cohen *et al.* 1996).

Sildenafil wird vorwiegend über die Leber metabolisiert. Das Hauptenzym zur Verstoffwechslung stellt Cytochrom P450 3A4 dar. Nach Metabolisierung werden 80% über die Fäzies, 20% über die Niere ausgeschieden. Eine erhöhte Sildenafil-Plasmakonzentration ist bei Patienten mit Leberschäden, schweren Nierenschäden und gleichzeitiger Einnahme von Cytochrom P450-Inhibitoren zu beobachten (Krenzelok 2000).

Sildenafil konnte bis jetzt in zahlreichen klinischen als auch tierexperimentellen Untersuchungen erfolgreich angewendet werden. Klinische Studien konnten zeigen, dass der vaskuläre Gefäßwiderstand, durch die vasodilatatorische Eigenschaft von Sildenafil, bei Patienten mit verschiedenen Formen der PH verringert wird (Ghofrani *et al.* 2002, Ghofrani *et al.* 2003, Ghofrani *et al.* 2004b,c, Reichenberger *et al.* 2007a,b).

Sowohl im Modell der Hypoxie-induzierten PH als auch im Modell der Monocrotalin-induzierten PH konnte eine Verminderung der vaskulären Gefäßumbauprozesse und des pulmonal arteriellen Druckes (PAP) durch die Therapie mit Sildenafil erzielt werden (Sebkhi *et al.* 2003, Schermuly *et al.* 2004).

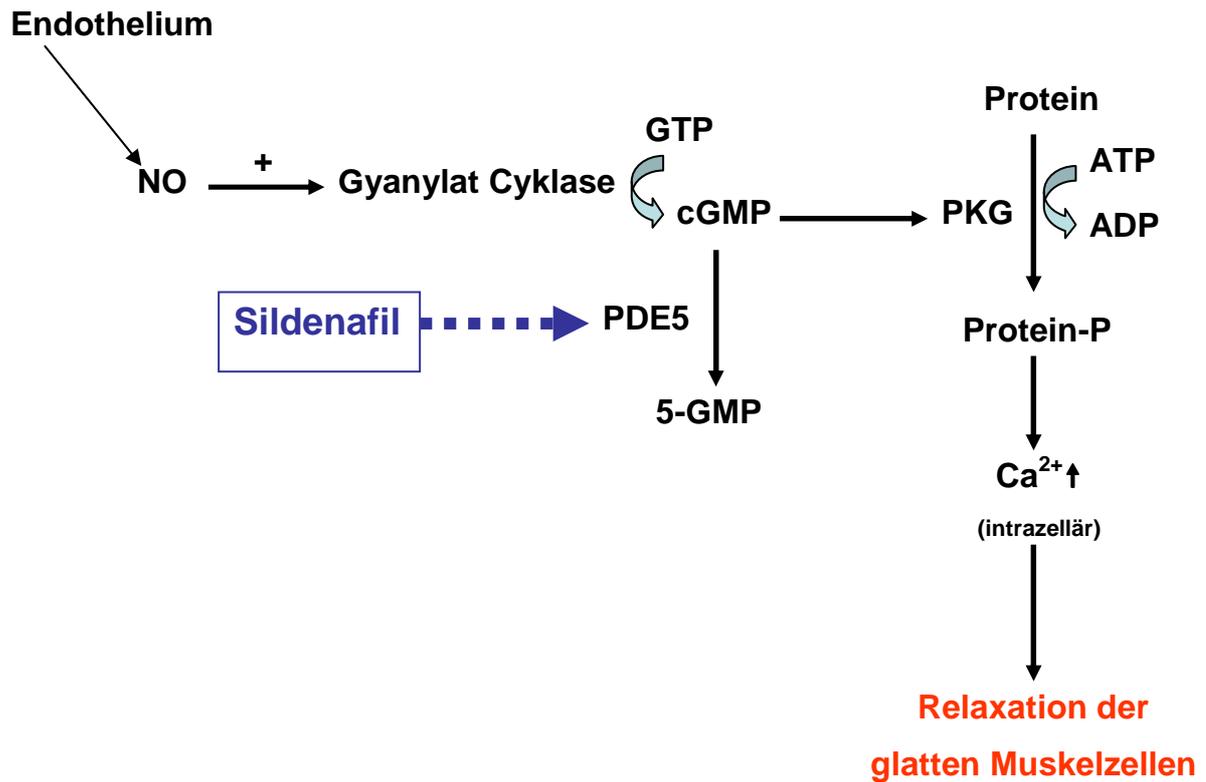


Abbildung 4: Signaltransduktionsweg von NO und cGMP in glatten Muskelzellen  
(Modifiziert nach Corbin & Francis 1999).

## 1.8 Platelet Derived Growth Factor bei pulmonaler Hypertonie

1974 erhielt der Platelet derived growth factor (PDGF) seinen Namen aufgrund der Untersuchungen von Ross *et al.* 1974. Er fand heraus, dass die Thrombozyten (Platelets) einen Faktor produzieren, der das Wachstum von glatten Muskelzellen bei Affen anregt. Seither wird der Faktor als Platelet derived growth factor bezeichnet (Ross *et al.* 1974).

PDGF ist ein wichtiges Mitogen für die glatten Muskelzellen, Bindegewebszellen und zahlreiche andere Zelltypen (Tabelle 1). Die Familie der PDGFs besteht aus kationischer Homo- und Heterodimere disulfidgebundener A- und B-Polypeptidketten.

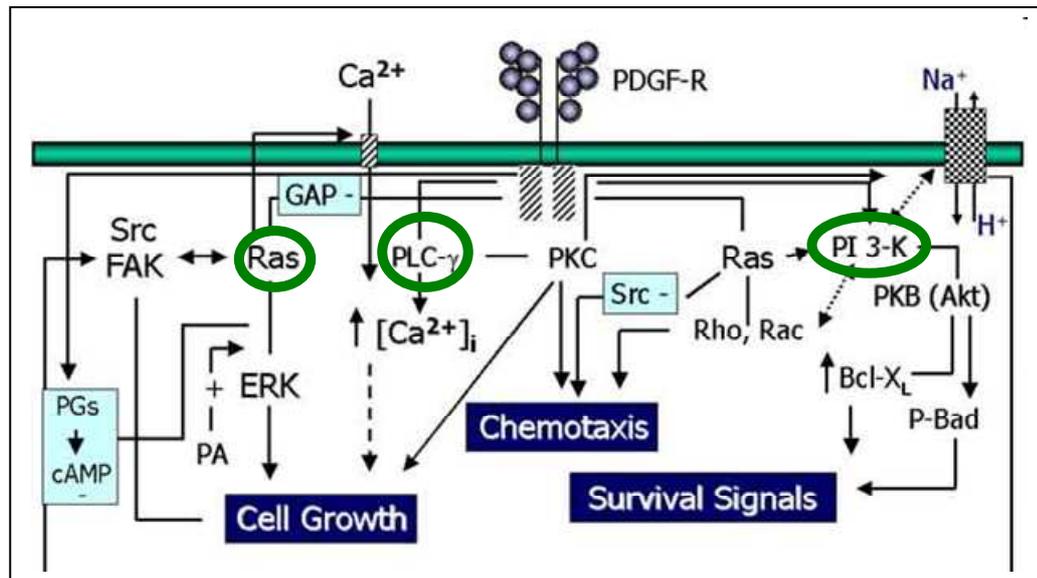
Zwei zusätzliche PDGF-Gene konnten identifiziert werden, die für PDGF-C und PDGF-D Polypeptide kodieren (Bergsten *et al.* 2001, LaRochelle *et al.* 2001, Li *et al.* 2000).

Die PDGF-Isoformen binden und aktivieren zwei strukturell ähnliche Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren PDGF- $\alpha$  und PDGF- $\beta$ . PDGF liegt als Dimer vor, und ist damit in der Lage beide Rezeptoren gleichzeitig zu binden und zu dimerisieren. Dies führt zu einer Autophosphorylierung der Rezeptoren an Tyrosinresten. Es wird ein Anstieg in der katalytischen Aktivität der Kinasen erreicht und durch die Phosphorylierung werden Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle mit SH2-Domänen geschaffen.

PDGF- $\alpha$  und PDGF- $\beta$  aktivieren die Hauptsignaltransduktionskaskaden. Zu diesen gehören Ras-mitogen activated protein kinase (MAPK), Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) und Phospholipase C $\gamma$  (Heldin & Westmark 1999; Rosenkranz & Kazlauskas 1999).

PDGF-Rezeptoraktivierung führt zu einer Stimulierung des Zellwachstums und zu Veränderungen in Zellform und -motilität. Die Aktivierung von  $\alpha$ -Rezeptoren hemmt die Chemotaxis von Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Die  $\beta$ -Rezeptoraktivierung dagegen stimuliert die Chemotaxis. PDGF wirkt zusätzlich antiapoptotisch. Fibroblasten und glatte Muskelzellen exprimieren höhere Mengen an  $\beta$ -Rezeptoren.

Die Synthese von PDGF ist infolge externer Stimuli oft erhöht, zum Beispiel bei niedriger Sauerstoffspannung (Kourembanans *et al.* 1997), unter Einfluß von Thrombin (Harlan *et al.* 1986) oder nach Stimulation durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Heldin & Westmark 1999).



**Abbildung 5: Signaltransduktion von PDGF**

PDGF bindet an einen Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Die Dimerisierung des Rezeptors führt zu einer Autophosphorylierung mit Schaffung hochaffiner Bindungsstellen für Signalproteine mit SH-2 Domänen. Die folgenden Signaltransduktionskaskaden sind in verschiedener Weise an der Regulierung der biologischen Aktivitäten von PDGF beteiligt, darunter Chemotaxis, Zellwachstum (Cell Growth) und Überlebenssignale (Survival Signals). Beide Rezeptortypen aktivieren die wichtigsten Signaltransduktionswege, darunter Ras/ MAPK, PI3K und Phospholipase Cy [(eingekreist), (Heldin & Westermark 1999)].

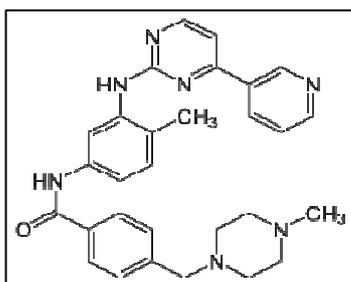
In einem Schafmodell bei persistierender pulmonaler Hypertonie des Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass sowohl PDGF- $\alpha$  als auch  $\beta$ -Rezeptoren bei PH erhöht sind. Eine Behandlung der Tiere mit Aptameren gegen PDGF-B brachte positive therapeutische Effekte (Balasubramaniam *et al.* 2003). In Lungenbiopsien von Patienten mit schwerer PAH ist die mRNA-Expression von PDGF-A signifikant erhöht (Humbert *et al.* 1998).

Jankov *et al.* 2005 konnten zeigen, dass die Expression von PDGF- $\alpha$  und - $\beta$  Rezeptor in Arterien neugeborener pulmonalhypertensiver Ratten stark erhöht ist. Außerdem machten sie deutlich, dass PDGF- $\beta$  mit  $\alpha$ -smooth muscle actin in glatten Gefäßmuskelzellen zu finden ist.

Eine signifikante Erhöhung des mRNA Levels von PDGF- $\beta$  Rezeptors wurde außerdem in Pulmonalarterien MCT-behandelter Ratten beschrieben (Tanabe *et al.* 2000). Infolge des erhöhten pulmonal-arteriellen Druckes reagieren die Arterien mit einer zuginduzierten Überexpression von PDGF- $\beta$  Rezeptor.

## 1.9 Der Tyrosinkinasehemmstoff Imatinib

Imatinib (Glivec®, STI 571, Imatinib-Mesilat) ist ein Protein-Tyrosinkinasehemmer der 2-Phenylaminopyrimidinklasse. Der Wirkstoff besitzt die klinische Zulassung für die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und von nichtresezierbarer gastrointestinalen Stromatumoren (GIST).

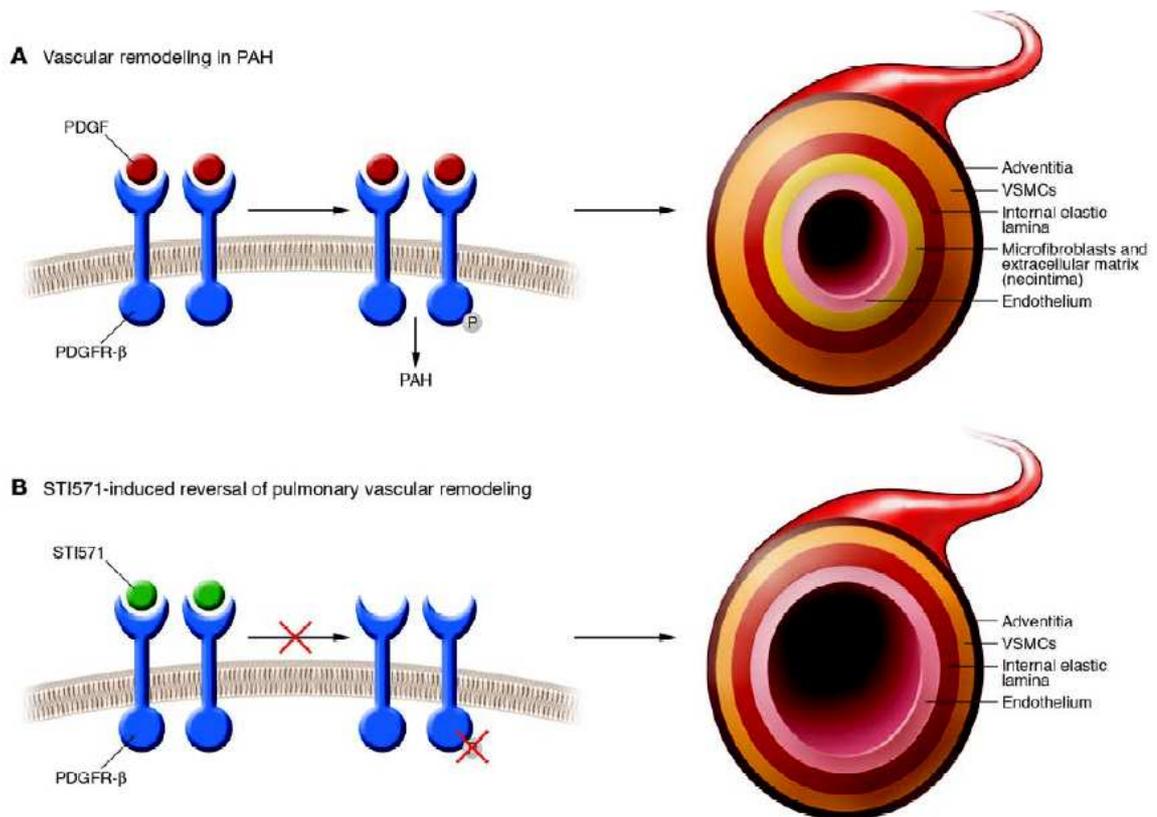


**Abbildung 6: Strukturformel vom Imatinib**

Die Substanz ist sehr gut wasserlöslich und besitzt eine hohe orale Bioverfügbarkeit (Capdeville *et al.* 2002).

Imatinib ist ein oral verfügbarer Hemmstoff der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Das Medikament verhindert die Proliferation und induziert die Apoptose Bcr-Abl positiver leukämischer Zellen.

Darüber hinaus ist es ein wirksamer Inhibitor der Rezeptortyrosinkinasen von Platelet derived growth factor und c-kit (Stammzellefaktor-Rezeptor).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung von kleinen pulmonalen Arterien bei PAH**

Es besteht eine erhöhte PDGF-Rezeptor (PDGFR)-Expression und Phosphorylierung (P) in Pulmonalarterien bei PAH (Abbildung 7A). Diese aktivieren Signalwege, die die unphysiologische Proliferation und Wanderung von VSMC, sowie die Bildung einer zusätzlichen Zellschicht aus Mikrofibroblasten und extrazellulärer Matrix zwischen der Lamina elastica interna und dem Endothelium (auch Neointima genannt) fördern. Diese Lungengefäßwandveränderungen führen zu den strukturellen und funktionellen Dysfunktionen, die zur Ausbildung der PAH führen.

Imatinib blockt gezielt die ATP-Bindungs tasche dieser Tyrosinkinase. Dadurch verhindert es die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase, und der Rezeptor kann auch nach Bindung des Liganden nicht mehr aktiv werden. Es bewirkt damit eine Rückbildung der Gefäßveränderungen [(Abbildung 7B), (Barst 2005)].

Die Kristallstruktur von Imatinib ist bekannt, außerdem existieren kristallographische Studien, die die Bindung von Imatinib an verschiedenen Tyrosinkinase Rezeptoren charakterisieren (Schindler *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2010, Jahnke *et al.* 2010).

Nach oraler Aufnahme zeigt Imatinib eine absolute Bioverfügbarkeit von 98%; die höchsten Plasmawerte werden nach zwei bis vier Stunden erreicht. In klinisch relevanten Dosen besitzt Imatinib eine Plasmaproteinbindung von etwa 95% und ist vor allem an Albumin und  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein gebunden. Die Halbwertszeiten von Imatinib und seinem Hauptmetaboliten, CGP74588, sind 18 bzw. 40 Stunden. Die Metabolisierung von Imatinib geschieht vorwiegend über die Leber. Das Hauptenzym zur Verstoffwechslung stellt dabei Cytochrom P-3A4 dar.

Nebenwirkungen unter Therapie mit Imatinib sind dosisabhängig und in den meisten Fällen leicht bis moderat. Häufig kommt es zu Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, peripheren Ödemen, Muskelkrämpfen, erhöhter Blutungsneigung und schwere Flüssigkeitsretentionen. Akute toxische Leberschädigungen werden sehr selten beobachtet.

Die zunächst angenommene kardiale Toxizität von Imatinib (Kerkela *et al.* 2006) konnte in der Zwischenzeit durch weitere klinische Studien mit größeren Patientengruppen widerlegt werden (Druker *et al.* 2006).

Imatinib wurde erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt. Es verminderte sowohl die strukturellen Gefäßveränderungen als auch die Ausbildung einer PH (Schermulý *et al.* 2005). In klinischen Studien an Patienten mit PH wurden ebenfalls gute Erfolge erzielt (Ghofrani *et al.* 2005).

Die klinische Dosis für die zugelassenen Indikationen beträgt beim Mensch 400 bis 800 mg. Das entspricht, bezogen auf die Körperoberfläche, einer Dosis von 30 bis 60 mg/kg bei Ratten (Glivec® Fachinformation für Kliniker, Novartis Pharma).

Die Kinase c-kit und Abl werden ebenfalls von Imatinib gehemmt. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass auch diese beiden Kinasen eine Rolle bei der PH spielen. Der Rezeptor für den Stammzellefaktor c-kit wird von dendritischen Zellen

und Mastzellen exprimiert, die sich in der Gefäßwand von Pulmonalarterien von Patienten mit PAH befinden (Mitani *et al.* 1999, Perros *et al.* 2007).

Imatinib konnte erfolgreich bei einigen (fibro-)proliferativen Krankheiten wie z.B. bei chronischen Nierentransplantationsabstoßung bei der Ratte (Savikko *et al.* 2003) und bei strahleninduzierter Lungenfibrose bei der Maus (Abdollahi *et al.* 2005) eingesetzt werden.

### **1.10 Ziel der Arbeit**

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines neuen Modells für die Therapie der pulmonalen Hypertonie des Menschen. Es wird in der Literatur als Modell der schweren PH beschrieben. Es beinhaltet im Tierexperiment die Kombination von Hypoxie mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte zusätzlich die therapeutische Wirkung des PDE5-Inhibitor Sildenafil (Revatio<sup>®</sup>, Viagra<sup>®</sup>) und des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI571, Glivec<sup>®</sup>) auf die verschiedenen pathophysiologischen und pathohistologischen Aspekte der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie und der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Inhibitors SU5416 untersucht werden. Es ging im speziellen um die Fragestellung inwieweit beide Wirkstoffe auf das Gefäßremodeling in beiden Modellen einwirken, um daraus weitere Erkenntnisse über die Entstehung der PH zu gewinnen und zusätzlich neue Therapiestrategien entwickeln zu können.

Sildenafil ist ein zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie und der erektilen Dysfunktion klinisch zugelassenes Medikament, das selektiv PDE1, PDE3, PDE5 und PDE6 hemmt.

Imatinib ist ein zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumor (GIST) klinisch zugelassenes Medikament, das selektiv die drei Tyrosinkinasen Bcr-Abl, c-kit und PDGF-Rezeptor hemmt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Ratten (*Rattus norvegicus*) des Aufzuchtstammes Sprague-Dawley (Farbe albino) verwendet. Der Stamm wurde 1925 von Robert W. Dawley durch Kreuzung einer weiblichen Wistar-Ratte und einer männlichen Hybridratte (Hooded) entwickelt. Zuchtbetrieb und Lieferant der Tiere ist Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland. Die Sprague-Dawley Ratte wird bei der Firma Charles River unter der Handelsbezeichnung CD<sup>®</sup>-Ratte geführt und ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Das Gewicht der Ratten betrug bei Anlieferung 250-300 g, was einem Alter von etwa sieben Wochen entspricht. Vor Applikation von Substanzen (SU5416, Sildenafil, Imatinib, Narkose) wurde das genaue Gewicht der Tiere bestimmt und die Substanzen exakt nach Gewicht verabreicht. Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Dauer der Versuche gehalten. Es waren immer vier bis fünf Ratten in einem Käfig untergebracht. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit Altromin<sup>®</sup> Standarddiätfutter ad libidum. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall betrug zwölf Stunden pro Tag, die Umgebungstemperatur im Mittel 25°C.

#### **2.1.2 Tierversuchsgenehmigung**

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die für die Versuche geltenden Tierversuchsanträge „Hypoxie-induzierte Pulmonale Hypertonie der Ratte“ und „Anti-proliferative Therapie der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte“ können unter

den Aktenzeichen GI 20/10 Nr.16/2008 und GI 20/10 Nr.03/2009 eingesehen werden.

### 2.1.3 Injektionslösungen und Substanzen

|   |   |   |
|---|---|---|
| Natronlauge 1N (1mol/l)                                       |   | Merck<br>Darmstadt, Deutschland         |
| Isofluran   | Forene <sup>®</sup>                     | Abbott<br>Wiesbach, Deutschland         |
| Atropinsulfat<br>0,5 mg/ml                                    |   | Braun<br>Melsungen, Deutschland         |
| Medetomidinhydrochlorid<br>1 mg/ml                            | Domitor <sup>®</sup>                    | Pfizer<br>Karlsruhe, Deutschland        |
| Heparin   | Liquemin N 25000 <sup>®</sup>           | Roche<br>Basel, Schweiz                 |
| Ketaminhydrochlorid<br>100 mg/ml                              | Ketamin <sup>®</sup>                    | Pharmacia<br>Erlangen, Deutschland      |
| Hydroxyethylstärke  | HAES <sup>®</sup>                       | Fresenius Kabi<br>Bad Homburg           |
| Lidocainhydrochlorid  | Xylocain <sup>®</sup>                   | Astra Zeneca<br>Wedel, Deutschland      |
| SU5416 Sigma-RBI<br>S8442-25mg                                |   | Sigma Aldrich<br>Steinheim, Deutschland |
| physiologische<br>Kochsalzlösung                              | zum Spülen und<br>Befeuchten            | Baxter S.A.<br>München, Deutschland     |
| Dimethyl Sulfoxide ≥ 99,9%<br>A.C.S. Spectrophotometric grade |   | Sigma Aldrich<br>Steinheim, Deutschland |
| Beatmungsgas  | 50% O <sub>2</sub> , 50% N <sub>2</sub> | Air Liquid<br>Siegen, Deutschland       |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterial

|                                 |                              |                                 |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Einmalspritze<br>1 ml, 2 ml     | Inject Luer <sup>®</sup>     | Braun<br>Melsungen, Deutschland |
| Kanüle<br>26 G (0,9 mm x 25 mm) | BD Microlance 3 <sup>®</sup> | Becton Dickinson<br>Deutschland |
| Medizinisches Klebeband         | Durapore <sup>®</sup>        | 3M                              |

|  |   |   |
|--|---|---|
|  |   | St. Paul, MN, USA                                     |
| Venenverweilkanüle<br>22 G und 20 G    | Vasocan<br>Braunüle®                          | Braun,<br>Melsungen, Deutschland                      |
| Zellstofftupfer<br>5 x 4 cm            | Purzellin®                                    | Lohmann und Rauscher<br>Rengsdorf, Deutschland        |
| Einmalhandschuhe                       | Transaflex®                                   | Ansell<br>Surbiton Surrey, UK                         |
| Mulltupfer<br>20 x 20 cm, pflaumengroß |   | Beese<br>Barbüttl, Deutschland                        |
| Perfusor-Leitung<br>150 cm             |   | Braun<br>Melsungen, Deutschland                       |
| Combi-Stopper                          |   | Braun<br>Melsungen, Deutschland                       |
| Dreiwegehahn                           | Discofix®                                     | Braun,<br>Melsungen, Deutschland                      |
| Zellulose-Handtücher                   |   | Tork<br>Mannheim, Deutschland                         |
| Haushaltsbindfaden<br>Nr.12            |   |   |
| Zellulose-Unterlage                    |   |   |
| Opertionsbesteck                       |   | Martin Medizintechnik<br>Tuttlingen, Deutschland      |
| Ratten-Immobilisator                   | Broome Rodent<br>Resttrainer®                 | Harvard Apparatus<br>March-Hugstetten,<br>Deutschland |
| Trachealtubus                          | aus BD Microlance 3<br>15G gekürzt auf 1,5 cm | Becton Dickinson<br>Deutschland                       |

### 2.1.5 Geräte für Tierpräparation

|  |                       |   |
|--|-----------------------|---|
| Beatmungspumpe                                   | SAR-830/P Ventilator® | IITH Inc. Life Science<br>Woodland Hills, CA, USA |
| PET-Schläuche mit unterschiedlichen Durchmessern |                       |   |
| Blutanalysegerät<br>ABL 330                      |                       | Radiometer<br>Copenhagen, Dänemark                |
| Blutanalysegerät<br>OSM                          | Hemoximeter®          | Radiometer<br>Copenhagen, Dänemark                |

|  |   |                                 |
|--|---|---------------------------------|
| Schleuse<br>Einführungsbesteck mit venös<br>hämostatischem Ventil 5F | Intradyn®   | Braun<br>Melsungen, Deutschland |
| Computer mit Monitor   |   |                                 |
| Druckwandler   | Combitrans Monitoring Set<br>Mod. II for arterial Blood<br>Pressure Measurement | Braun<br>Melsungen, Deutschland |

### 2.1.6 Histologie

|   |          |  |
|---|----------|--|
| Parafilm  |          | American National Can<br>Menasha, Wisconsin, USA |
| Urinbecher mit Deckel,<br>100 ml                            |          |  |
| Rotationsmikrotom<br>vollautomatisch                        | RM 2165  | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Objektträgerstrecktisch                                     | HI 1220  | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Paraffinstreckbad   | HI 1210  | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Paraffinausgießstation                                      | EG 1140H | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Kühlplatte  | EG 1150C | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| geschlossener Vakuum-<br>Gewebeinfiltrationsautomat         | TP 1050  | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Stereomikroskop<br>Durchlicht                               | DMLA     | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Digitale Kamera   | DC 300F  | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland      |
| Ethanol<br>70%, 96%, 99,6%<br>vergällt mit Ethylmethylketon |          | Fischer<br>Saarbrücken, Deutschland              |
| Isopropanol (99,8%)   |          | Fluka Chemie<br>Buchs, Schweiz                   |
| Methanol, reinst  |          | Fluka Chemie<br>Buchs, Schweiz                   |

|  |                              |   |
|--|------------------------------|---|
| Formaldehyd säurefrei $\geq 37\%$                            |                              | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland  |
| Resorcin Fuchsin   |                              | Chroma<br>Münster, Deutschland  |
| Kernechtrot Aluminiumsulfat                                  |                              | Chroma<br>Münster, Deutschland  |
| Roti-Histol (Xylolersatz)                                    |                              | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland  |
| Xylol  |                              | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland  |
| Citrate Buffer pH 6,0<br>Cat.NO 00-5000<br>Concentrate 100ml |                              | Invitrogen Corporation<br>Kalifornien, USA                                |
| Eisen-Haematoxylin A nach<br>Weigert enthält Ethanol         |                              | Division Chroma<br>Münster, Deutschland                                   |
| Eisen-Haematoxylin B<br>nach Weigert                         |                              | Division Chroma<br>Münster, Deutschland                                   |
| Hämalaun nach Mayer, sauer                                   |                              | Division Chroma<br>Münster, Deutschland                                   |
| Eosin-y-alkoholisch  |                              | Thermo Shandon Limited<br>Astmoor, Runcorn, Cheshire,<br>England          |
| Wasserstoffperoxid 30% pro<br>analysi                        |                              | Merck<br>Darmstadt, Deutschland   |
| Deckgläser 24 x 36mm   |                              | R. Langenbrinck<br>Emmendingen, Deutschland                               |
| Universal-Einbettkassetten mit<br>Deckel                     |                              | Leica Mikrosystems<br>Nussloch, Deutschland                               |
| Objekträger  | Superfrost Plus <sup>®</sup> | R. Langenbrinck<br>Emmendingen, Deutschland                               |
| Mikrotomklingen S 35   |                              | Feather, Japan (über Produkte<br>für die Medizin AG Köln,<br>Deutschland) |
| Paraffin Einbettmedium                                       | Paraplast Plus <sup>®</sup>  | Sigma Aldrich<br>Steinheim, Deutschland                                   |
| Pikrinsäure, wässrig, gesättigt                              |                              | Fluka Chemie<br>Buchs, Schweiz  |
| Formaldehyd –<br>Lösung 3,5 – 3,7 %                          |                              | Otto Fischar GmbH & Co. KG<br>Saarrbrücken, Deutschland                   |

|   |                           |  |
|---|---------------------------|--|
| neutral gepuffert<br>mit Methanol stabilisiert                      |                           |  |
| Eindeckmedium Xylo-löslich  | Pertex <sup>®</sup>       | Medite GmbH<br>Burgdorf, Deutschland                   |
| Natriumchlorid pro analysi  |                           | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                         |
| Di-Natriumhydrogenphosphat<br>Dihydrat, pro analysi                 |                           | Merck<br>Darmstadt, Deutschland                        |
| Kaliumhydrogenphosphat pro<br>analysi                               |                           | Merck<br>Darmstadt, Deutschland                        |
| Trypsin   | Digest All 2 <sup>®</sup> | Zytomed<br>Berlin, Deutschland                         |
| Avidin-Biotin-Blocking Kit  |                           | Vector / Linaris<br>Wertheim-Bettingen,<br>Deutschland |
| Normal Horse Serum  |                           | Alexis Biochemicals<br>Grünberg, Deutschland           |
| Normal Goat Serum   |                           | Alexis Biochemicals<br>Grünberg, Deutschland           |
| Normal Rabbit Serum   |                           | Alexis Biochemicals<br>Grünberg, Deutschland           |
| Vectastain Elite ABC Kits<br>anti-mouse, anti-rabbit, anti-<br>goat |                           | Vector / Linaris<br>Wertheim-Bettingen,<br>Deutschland |
| Vector VIP<br>Substrat Kit  |                           | Vector / Linaris<br>Wertheim-Bettingen,<br>Deutschland |
| DAB Substrat Kit  |                           | Vector / Linaris<br>Wertheim-Bettingen,<br>Deutschland |
| Methylgrün<br>Counterstain  |                           | Vector / Linaris<br>Wertheim-Bettingen,<br>Deutschland |

### 2.1.7 Antikörper

|  |                   |   |
|--|-------------------|---|
| Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human | Verdünnung 1:1000 | Sigma Aldrich<br>Steinheim, Deutschland |
| Anti-von Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti-human               | Verdünnung 1:1000 | Dako Cytomation Hamburg, Deutschland    |

### 2.1.8 Geräte/ Software/ Makros für Gefäßmorphometrie

|  |          |  |
|--|----------|--|
| Computer   | Q 550 IW | Leica Microsystems Nussloch, Deutschland   |
| Software   | Q Win V3 | Leica Microsystems<br>Nussloch, Deutschland  |
| Makro für<br>- Muskularisierungsgrad<br>- Wandstärke<br>- Okklusion<br>- Neointima/Media |          | speziell entwickelt von<br>Informatiker Herrn Christoph<br>Frank, Leica Microsystems |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie der Ratte

Zur Erzeugung der pulmonalen Hypertonie wurden die Tiere für 21 bzw. 35 Tagen in einem umschlossenen normobaren Tierkäfig gehalten, dem hypoxisches Atemgas (10% O<sub>2</sub>) zugeführt wurde (Weissmann *et al.* 2004).

Der Sauerstoffgehalt in der Kammer wurde mit Hilfe eines O<sub>2</sub>-Controllers (Modell 4010, O<sub>2</sub>-Controller (Labotect; Göttingen, Germany)), der entweder Stickstoff oder Sauerstoff zufügte, konstant bei 10% O<sub>2</sub> gehalten.

Die bei der Atmung der Tiere entstandene Feuchtigkeit wurde durch eine Kondensationskühlfalle abgefangen. Das anfallende CO<sub>2</sub> wurde kontinuierlich durch Atemkalk aus dem System entfernt.

Die Kontrolltiere wurden ebenfalls in einem umschlossenen normobaren Tierkäfig gehalten, dem normoxisches Atemgas (21% O<sub>2</sub>) zugeführt wurde.

In einer anderen Gruppe erfolgte zusätzlich die einmalige Injektion des VEGF-Antagonisten SU5416 in einer Dosis von 20 mg/kg subkutan.

### **2.2.2 Vorbereitung und Injektion von SU5416**

50 mg des gelb-pulvrigen SU5416 wurde gemäß der Löslichkeit von 9 mg/ml DMSO angemischt. Bis zur vollständigen Auflösung des SU5416 wurde die Lösung in einem Wasserbad mit einer Temperatur von ca. 60°C gehalten und dabei leicht geschwenkt.

Die Ratten wurden einzeln gewogen, in einem Gefäß mit einem Wattebausch mit Isofluran bis zur Immobilisation anbetäubt und erhielten eine einmalige subkutane Injektion von 20 mg/kg SU5416 gelöst in DMSO in die Nackenfalte. Gesunde Kontrolltiere erhielten statt SU5416 ein gleiches Volumen DMSO als s.c. Injektion in den Nacken.

### **2.2.3 Vorbereitung und Behandlung von Sildenafil**

Sildenafil (Viagra®) wurde als blaue, gerundete, rautenförmige Tabletten von der Firma Pfizer verwendet. Jede Tablette enthielt 50 mg Sildenafil (als Citrat). Auf der einen Tablettensoberfläche mit Pfizer und auf der anderen mit „VGR 50“ gekennzeichnet. Zur Herstellung der oralen Lösung wurden die Tabletten mit Hilfe von Mörser und Pistill bis zur pulvrigen Konsistenz gemörsert. Das Pulver wurde mit einer 2%igen Methylcellulose-Suspension in einer Konzentration von 1 mg/ml angemischt. Die Ratten wurden einzeln gewogen, in einem Gefäß mit einem Wattebausch mit Isofluran bis zur Immobilisation anbetäubt und erhielten innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen eine einmalige orale Gabe von

50 mg/kg Sildenafil-Suspension mit einer gebogenen Knopfkanüle direkt in die Speiseröhre. Die Kontrollgruppen erhielten eine tägliche orale Gabe des gleichen Volumens der 2%igen Methylcellulose-Suspension.

#### **2.2.4 Vorbereitung und Behandlung von Imatinib**

Imatinib (Glivec®) wurde als dunkelgelbe bis braun-orange ovaloide, bikonvexe Filmtablette mit abgeschrägten Kanten von der Firma Novartis verwendet. Jede Tablette enthielt 400 mg Imatinib (als Mesilat). Auf der einen Seite war „NVR“ und auf der anderen Seite „SL“ eingepreßt. Zur Herstellung der oralen Lösung wurden die Tabletten mit Hilfe eines Mörsers und Pistill bis zur pulvrigen Konsistenz gemörsert. Das Pulver wurde mit einer 2%igen Methylcellulose-Suspension in einer Konzentration von 1 mg/ml angemischt. Die Ratten wurden einzeln gewogen, in einem Gefäß mit einem Wattebausch mit Isofluran bis zur Immobilisation anbetäubt und erhielten innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen eine einmalige orale Gabe von 100 mg/kg Imatinib-Suspension mit einer gebogenen Knopfkanüle direkt in die Speiseröhre. Die Kontrollgruppen erhielten eine tägliche orale Gabe des gleichen Volumens der 2%igen Methylcellulose-Suspension.

## 2.2.5 Aufteilung der Tiergruppen

### 2.2.5.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie

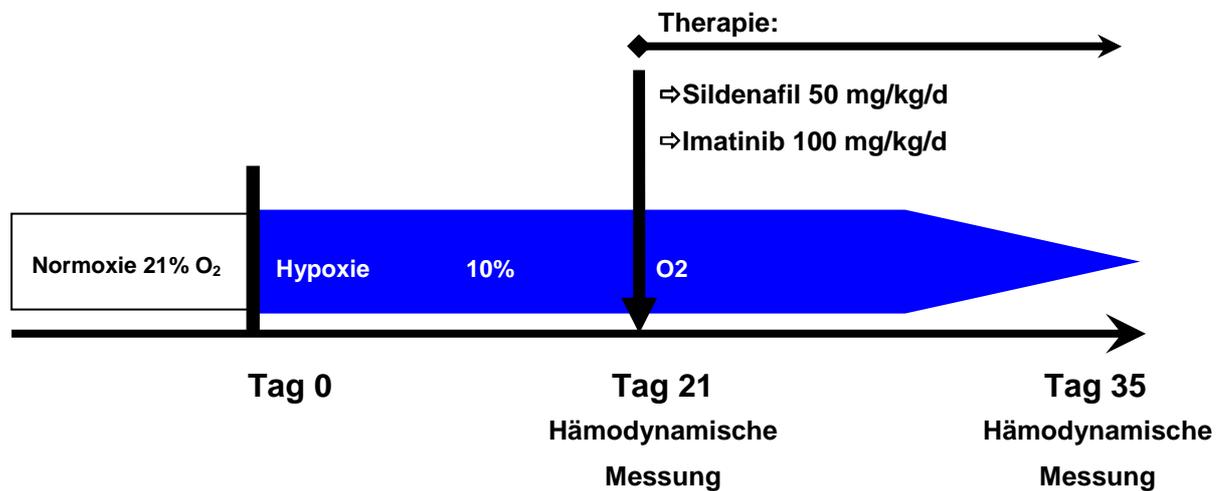


Abbildung 8: Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die Versuchsanordnung bestand aus 5 verschiedenen Tiergruppen:

1. Normoxie nach 35 Tagen (n= 10)
2. Hypoxie nach 21 Tagen (n= 14)
3. Hypoxie nach 35 Tagen therapiert mit 2%iger Methylcellulose von 21.Tag bis 35.Tag (n= 13)
4. Hypoxie nach 35 Tagen therapiert mit Sildenafil 50 mg/kg/d von 21.Tag bis 35.Tag (n= 10)
5. Hypoxie nach 35 Tagen therapiert mit Imatinib 100 mg/kg/d von 21.Tag bis 35.Tag (n= 8)

### 2.2.5.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie mit dem VEGFR-2 Rezeptor Inhibitor SU5416

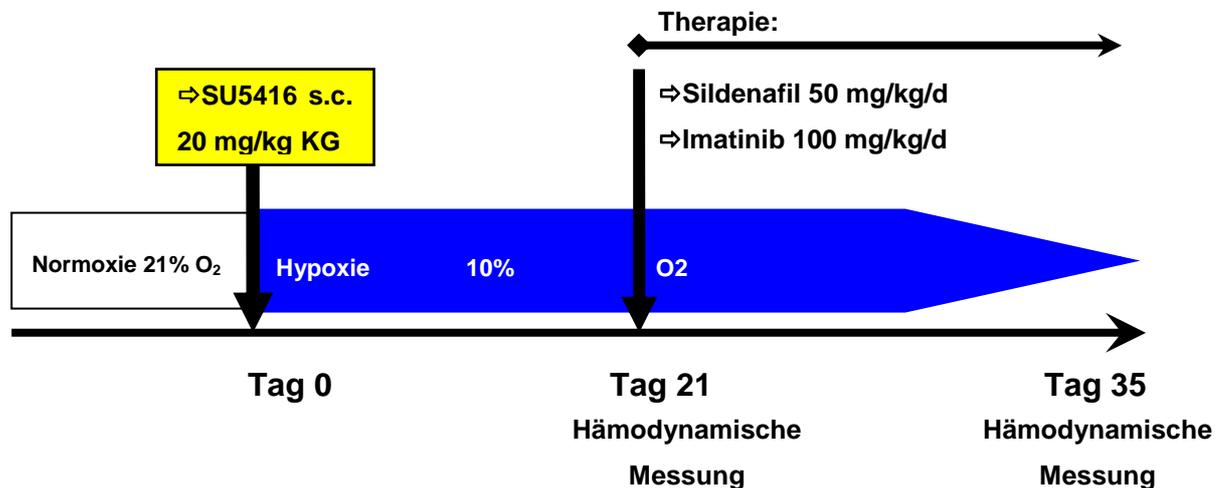


Abbildung 9: Darstellungs des Versuchsaufbaus

Die Versuchsanordnung bestand aus 5 verschiedenen Tiergruppen:

1. Normoxie 35 Tagen (n= 10)
2. Hypoxie 21 Tage nach Injektion von SU5416 (n= 14)
3. Hypoxie 35 Tage nach Injektion von SU5416 therapiert mit 2%iger Methylcellulose von 21.Tag bis 35.Tag (n= 13)
4. Hypoxie 35 Tage nach Injektion von SU5416 therapiert mit Sildenafil 50 mg/kg/d von 21.Tag bis 35.Tag (n= 10)
5. Hypoxie 35 Tage nach Injektion von SU5416 therapiert mit Imatinib 100 mg/kg/d von 21.Tag bis 35.Tag (n= 8)

### **2.2.6 Hämodynamische Messungen am Ganztier**

Vor Beginn des Versuchs wurde das Programm Labtech Pro<sup>®</sup> (Labtech Notebook Runtime Version 9.02) zur Aufzeichnung der Blutdrucke und des Beatmungsdruckes gestartet. Nach luftblasenfreier Spülung der Druckaufnehmer und Schläuche mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Ausgangswerte für den SAP, RVSP und VP durch Einstellung am Druckwandler auf 0 mmHg eingestellt.

#### **2.2.6.1 Narkose**

Die Ratten wurden in einem Kleintier-Restrainer fixiert. Sie erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Ketamin und 100 µg/kg Medetomidin in einer Mischspritze. Nach Bewußtseinsverlust wurden die Ratten auf einer vorgewärmten Heizplatte (40°C) in Rückenlage verbracht. Sie erhielten danach eine intramuskuläre Injektion von Atropinsulfat (250 µg/kg) in den M. glutaeus sinister, um vasovagale Effekte während der Manipulationen im Halsbereich zu minimieren.

Die zur Präparation ausreichende Narkosetiefe wurde anhand des Ausfalles des Corneal- und Lidreflexes, Muskelrelaxation und mehrmaligem festem Kneifen im Zwischenzehenbereich mindestens zweier Gliedmaßen ohne nachfolgende Schmerzreaktion sichergestellt. Um die Atmung der Tiere vor Beginn der maschinellen Beatmung zu erreichen wurde die Zunge vorgelagert.

#### **2.2.6.2 Tracheotomie**

Zur Erleichterung der Präparation des ventralen Halsbereichs wurden 400 µl Lidocain s.c. injiziert, um eine Quaddel zu bilden. Das Fell der Tiere wurde zuvor mit Braunol-Lösung befeuchtet, um eine Verunreinigung des Operationsfeldes durch Haare zu vermeiden. Im Bereich der Quaddel wurde ein etwa 1 x 1 cm großes Hautstück per Scherenschlag entfernt. Durch vorsichtiges stumpfes

Präparieren von Binde- und Muskelgewebe wurde die Trachea dargestellt und mittels Unterführung einer stumpfen Pinzette vorgelagert. Nach Einschalten der Beatmungspumpe wurde die Trachea zwischen zwei Knorpelspangen inzisiert und der Beatmungstubus eingeführt. Eine Ligatur mit Bindfaden fixierte den Tubus in seiner Lage vor der Bifurkation.

### **2.2.6.3 Beatmung**

Die Beatmung der Tiere erfolgte mit einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute und einem konstanten Atemzugvolumen von 3 ml. Um ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration zu vermeiden wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule festgelegt.

### **2.2.6.4 Präparation der rechten V. jugularis**

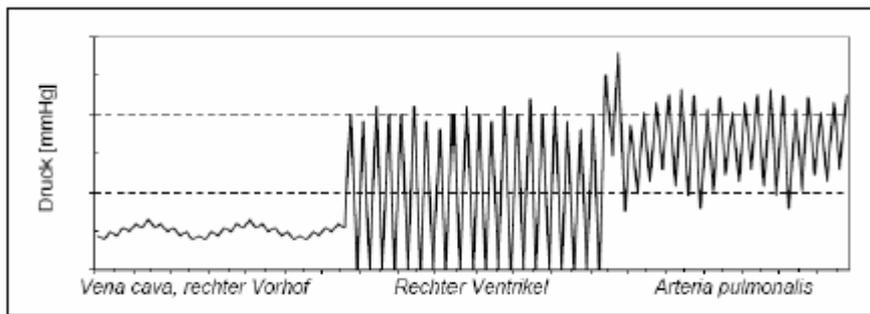
Die rechte V. jugularis wurde etwa ein cm vor dem Brusteingang isoliert, von anhängendem Bindegewebe befreit und mittels zweier unterlegter Bindfäden dargestellt. Der kraniale Bindfaden wurde gezogen und über den Kopf der Ratte hinweg mit einem Klebestreifen unter Spannung fixiert, um die Vene zu strecken und die Präparation zu erleichtern. Es erfolgte eine vorsichtige Inzision der V. jugularis zwischen den beiden Bindfäden. Mit Hilfe einer spitzen gewinkelten Pinzette wurde die Inzision erfasst und offen gehalten. Über einen in kaudaler Richtung eingebrachten flexiblen Führungsdraht wurden Mandrin und Schleuse in die Vene eingeführt. Nach Entfernung des Führungsdrahts und Zuziehen des kaudalen Bindfadens wurde die Schleuse in ihrer Lage fixiert, der Mandrin herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen durch Aspiration entfernt.

### **2.2.6.5 Präparation der linken A.carotis**

Die linke A. carotis wurde durch Auseinanderziehen der sie bedeckenden Muskelschichten dargestellt, mittels einer stumpfen Pinzette vorgelagert und benachbarte Anteile des N. vagus vorsichtig zur Seite gezogen. Es erfolgte wie bei der Präparation der V. jugularis ein Unterlegen von zwei Bindfäden und Ligatur sowie Spannung des kranialen Bindfadens. Die A. carotis wurde vor dem Brusteingang mit einem Arterienclip abgeklemmt und inzisiert. Dann wurde eine 22 G Braunüle (Nadel entfernt), verbunden mit einem Dreiwegehahn, mit Hilfe eines flexiblen Führungsdrahts in die A. carotis eingeführt und bis zu dem Gefäßclip vorgeschoben. Die Braunüle wurde mittels des kaudalen Bindfadens in der Arterie fixiert, der Führungsdraht herausgezogen, der Dreiwegehahn geschlossen und der Arterienclip entfernt. Daraufhin konnte die Braunüle vollständig in das Gefäß eingeführt werden.

### **2.2.6.6 Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes**

Arterieller und venöser Zugang wurden jeweils mit 200 µl eines Heparin-NaCl-Gemisches (Verdünnung 1:20) gespült und der arterielle Druckaufnehmer luftblasenfrei angeschlossen. Durch das Rückschlagventil der venösen Schleuse wurde ein Rechtsherzkatheter, verbunden mit einem venösen Druckabnehmer, eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die kontinuierliche Druckaufzeichnung während des Vorschiebens erleichterte dabei die Kontrolle über die Position des Katheters: bei Lage innerhalb der V. cava bzw. des rechten Vorhofes imponiert eine typische dreigipfelige und atemverschiebliche Druckkurve. Sobald die Katheterspitze die Tricuspidalklappe überschritten hat, erscheint die pulsatile Druckkurve des rechten Ventrikels mit systolischen Spitzenwerten von 20-25 mmHg bei gesunden Ratten (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Druckkurve bei unterschiedlicher Lage des Katheters.**

Die gemessenen Drücke VP, SAP und CVP/RVP wurden als analoge Signale durch die flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert, verstärkt, mit einer Wandlerkarte im PC in digitale Signale umgewandelt und durch das Programm Labtech Pro<sup>®</sup> aufgezeichnet. Nach Kalibrierung der auf Herzhöhe angebrachten Druckaufnehmer gegen den Luftdruck wurden die Werte, sobald der Rechtsherzkatheter stabil im rechten Ventrikel eingebracht war, nach Neustart des Programmes für 10 bis 20 Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und abgespeichert.

### 2.2.7 Blutproben

Nach Messung der hämodynamischen Druckwerte wurden jeweils 400  $\mu$ l arterielles (A. carotis) und gemischtvenöses (rechter Ventrikel) Blut entnommen. Die Blutproben wurden luftblasenfrei verschlossen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Zeitdauer von der Entnahme bis zur Messung betrug etwa 30 Minuten. Die arteriellen und venösen Blutparameter  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , pH, Hämoglobin, Hämatokrit und  $O_2$ -Sättigung wurden mit einem RapidLab 348 (Firma Bayer) gemessen.

### 2.2.8 Entnahme der Lunge

Nach Befeuchtung von Thorax und kranialem Abdomen mit Braunol<sup>®</sup> wurde ein medianer Hautschnitt vom Präparationsgebiet bis zur Regio xiphoidea geführt.

Nach Präparation der Haut wurde der Processus xiphoideus mit einer Klemme erfasst und das Abdomen im epigastrischen Winkel eröffnet. Anschließend wurde die Thoraxhöhle durch Herunterziehen des Diaphragmas dargestellt und das Sternum bis zur Apertura thoracis cranialis in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden bis zur Apertura thoracis cranialis in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und mit Darmklemmen seitlich fixiert. Ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Schlauch wurde in eine Inzision der A. pulmonalis eingeführt, wo bei in den linken Ventrikel eine kleine Öffnung zum Abfluß der Spüllösung geschnitten wurde. Die Lunge wurde über die A. pulmonalis mit isotoner Kochsalzlösung mit einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Verschließen der Trachea zu einem Zeitpunkt der maximalen Inspiration mit einer Klemme und Ausschalten der Beatmung. Der rechte Lungenflügel am Hilus mit einem Bindfaden ligiert, entnommen, zur weiteren Verwendung für molekularbiologische Analysen schockgefrostet und bei -80°C eingefroren. Spülen der linken Lungenhälfte zur Perfusionsfixierung über die A. pulmonalis fünf Minuten lang bei einem Druck von 22 cm Wassersäule mit Formaldehyd. Überführung in ein Gefäß mit Formaldehyd und Fixierung über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die fixierte Lungenhälfte in 0,1 M PBS verbracht und so bis zur weiteren Verwendung für die Histologie bei 4°C gelagert.

### **2.2.9 Präparation des Herzens**

Das Herz wurde aus dem Tierkörper entnommen, die Atrien und Herzklappen abgetrennt und der rechte Ventrikel exakt am Septum entlang von linkem Ventrikel und Septum gesetzt. Eine Trocknung des rechten sowie des linken Ventrikel mit Septum erfolgte zwei Wochen lang bei Raumtemperatur, um das Trockengewicht beider Herzhälften zu bestimmen. Als Index der Rechtsherzhypertrophie war das Verhältnis der Gewichte rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum zu bestimmen.

## 2.2.10 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

### 2.2.10.1 Einbettung des Gewebes und konventionelle Histologie

Die in PBS gelagerten Lungenhälften wurden parallel zur Facies diaphragmatica mit einem Trimmesser in jeweils 3 bis 5 mm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettkassetten überführt. Die Gewebestücke wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP 1050, Leica) entwässert. Danach wurden sie in Paraffin eingegossen.

#### 2.2.10.1.1 Elastica-Kernechtrot-Färbung

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |                                    |
| <b>16 Stunden</b>                                   | <b>Resorcin-Fuchsin</b>            |
| abspülen  | aqua dest.                         |
| <b>10 Minuten</b>                                   | <b>Kernechtrot-Aluminiumsulfat</b> |
| abspülen  | aqua dest.                         |
| Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium       |                                    |

#### 2.2.10.1.2 Elastica van Gieson-Färbung

Färbung mit Resorcin–Fuchsin, Weigert A / B, van Gieson-Lösung

|   |  |
|---|--|
| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |  |
| <b>10-24 Stunden</b>                                | <b>Resorcin-Fuchsin</b>                            |
| <b>15 Minuten</b>                                   | <b>Leitungswasser</b>                              |
| abspülen  | aqua dest.   |
| <b>5 Minuten</b>                                    | <b>Fe-Hämatoxylin nach Weigert A und B / 1 : 1</b> |
| abspülen  | aqua dest.   |
| <b>15 Minuten</b>                                   | <b>Leitungswasser</b>                              |
| abspülen  | aqua dest.   |
| <b>10 Minuten</b>                                   | <b>van Gieson-Lösung</b>                           |
| abspülen (kurz!)                                    | Aqua dest.   |
| Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium       |  |

### 2.2.10.1.3 Hämatoxylin–Eosin (HE)-Färbung

| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |                                   |
|---|-----------------------------------|
| <b>2 Minuten</b>                                    | <b>aqua dest.</b>                 |
| <b>20 Minuten</b>                                   | <b>Hämalaun nach Mayer, sauer</b> |
| <b>5 Minuten</b>                                    | <b>Leitungswasser</b>             |
| <b>1 Minute</b>                                     | <b>Ethanol 96%</b>                |
| <b>4 Minuten</b>                                    | <b>Eosin-y-alkoholisch</b>        |
| <b>abspülen</b>                                     | <b>aqua dest.</b>                 |
| Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium       |                                   |

### 2.2.10.1.4 Mallory Trichromfärbung acc. McFarlane

| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |  |
|---|--|
| <b>abspülen</b>                                     | <b>Leitungswasser</b>                      |
| <b>5 Minuten</b>                                    | <b>Reagenz A: Säurefuchsin</b>             |
| <b>abspülen</b>                                     | <b>aqua dest.</b>                          |
| <b>3 Minuten</b>                                    | <b>Reagenz B: Phosphormolybdänsäure</b>    |
|   | <b>Abklopfen von Phosphormolybdänsäure</b> |
| <b>5 Minuten</b>                                    | <b>Reagenz C: Mixture nach Mallory</b>     |
| Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium       |  |

### 2.2.10.2 Immunhistochemische Färbemethoden

#### 2.2.10.2.1 Histopuffer zur Verdünnung der Antikörper

PBS mit 3% BSA (Bovines Serumalbumin) und 0,2% Triton X 100

#### 2.2.10.2.2 Immunhistochemie (1): Anti-alpha actin/ Faktor VIII

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte eine Waschung (außer nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit Serum) jeweils 3 x 5 Minuten mit PBS. Bei allen weiteren angeführten immunhistochemischen Färbungen wurden in gleicher Weise verfahren.

| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |  |  |
|---|--|--|
| 15 Minuten  | Block endogener Peroxidasen              | 20 ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 190 ml MetOH                      |
| 10 Minuten  | proteolyt. Demaskierung                  | Trypsin Digest All® 1:3  |
| 45 Minuten  | Block unspezifischer Bindungen mit Serum | 1 Teil Normal Horse Serum<br>1 Teil Normal Goat Serum<br>2 Teile Histopuffer |
| 30 Minuten  | anti-alpha smooth muscle actin           | Verdünnung 1:1000 mit Histopuffer<br>30 Minuten Raumtemperatur               |
| 20 Minuten  | biotinylierter Sekundärantikörper        | Vectastatin ABC Elite Kit horse anti-mouse                                   |
| 20 Minuten  | ABC-Reagenz                              | Vectastatin ABC Elite Kit  |
| ca. 1 Minute  | Vector VIP®                              | violettes Chromogen  |
| 15 Minuten  | Avidin-Reagenz                           | Block endogenen Avidins  |
| 15 Minuten  | Biotin-Reagenz                           | Block endogenen Biotins  |
| 30 Minuten  | Anti-von Willebrand Faktor               | Verdünnung 1:1000 mit Histopuffer<br>30 Minuten Raumtemperatur               |
| 20 Minuten  | Biotinylierter Sekundärantikörper        | Vectastatin ABC Elite Kit goat anti-rabbit                                   |
| 20 Minuten  | ABC-Reagenz                              | Vectastatin ABC Elite Kit  |
| 15 Sekunden   | Vector DAB®                              | braunes Chromogen  |
| 1 Minute  | Methylgrün                               | Gegenfärbung der Zellkerne   |
| Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium       |  |  |

### 2.2.10.2.3 Färbeprotokoll / Peroxidase / ImmPRESS DETECTION SYSTEM / VECTOR / NovaRED – Substrat

AK: PCNA (FL-261) / Proliferationsmarker (proliferating cell nuclear antigen)

| Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte |   |  |
|---|---|--|
| 2 x 5 Minuten                                       | PBS   |  |
| 20 Minuten  | Kochen (Mikrowelle) in Citrate Buffer (pH 6,0 , Zymed Lab.) | Citrate Buffer 20x, cat.Nr. 00 – 5000, F-a Zymed Laboratories<br>Ansatz für 100 ml:<br>95ml aqua dest. + 5 ml Citrate Buffer 20x |

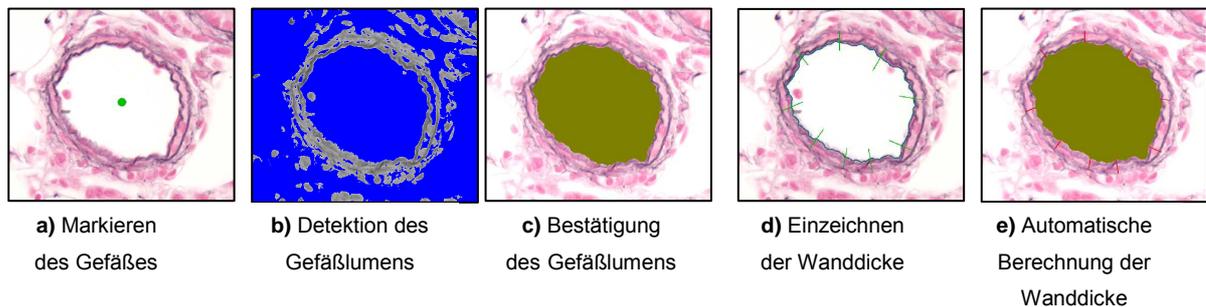
|  |   |   |
|--|---|---|
|  |   | <b>Buffer pH= 6,0</b>   |
| <b>5 Minuten</b>                                     | <b>PBS (frisch)</b>   |   |
| <b>20 Minuten</b>                                    | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Methanol Gemisch<br/>15%</b> | <b>100ml Methanol, reinst.<br/>+ 100ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%</b>   |
| <b>2 x 5 Minuten</b>                                 | <b>Aqua dest.</b>   | <b>Trypsin =&gt; RT</b>   |
| <b>2 x 5 Minuten</b>                                 | <b>PBS</b>  |   |
| <b>60 Minuten</b>                                    | <b>10% BSA</b>  |   |
| <b>2 x 5 Minuten</b>                                 | <b>PBS</b>  |   |
| <b>20 Minuten</b>                                    | <b>Serumblock I</b>   | <b>2,5% Normal Horse Serum<br/>ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig<br/>Peroxidase</b>   |
| <b>über Nacht<br/>60` RT</b>                         | <b>Primärantikörper I</b>                                   | <b>PCNA; 1:100<br/>10% BSA verdünnen</b>  |
| <b>4 x 5 Minuten / 2 Stunden</b>                     | <b>PBS</b>  |   |
| <b>30 Minuten</b>                                    | <b>Sekundäre-Antikörper</b>                                 | <b>ImmPRESS REAGENT Anti-<br/>Rabbit Ig Peroxidase</b>  |
| <b>3 x 5 Minuten</b>                                 | <b>PBS</b>  |   |
| <b>5 – 15 Minuten</b>                                | <b>Nova-RED - Substrat</b>                                  | <b>Präparation:<br/>5 ml aqua dest.<br/>+ 3 Tropfen Reag. 1, mischen<br/>+ 2 Tropfen Reag. 2, mischen<br/>+ 2 Tropfen Reag. 3, mischen<br/>+ 2 Tropfen Hydrogen<br/>Peroxide, mischen</b> |
| <b>5 Minuten</b>                                     | <b>Leitungs-H<sub>2</sub>O</b>                              |   |
| <b>5 – 45 Sekunden</b>                               | <b>Hämatoxylin QS / Vector</b>                              | <b>2 Tropfen (100 µl) Reagenz 4<br/>– Zymed Kit</b>   |
| <b>spülen / 10 Sekunden</b>                          | <b>Leitungswasser</b>                                       |   |
| <b>Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium</b> |   |   |

### 2.2.11 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Zur morphometrischen Analyse der Lungengefäße kam ein computergestütztes Analysesystem (Leica Q Win Standard Analyzing Software) mit von der Firma Leica speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros zur Anwendung. Die Beschriftung der Schnitte wurde abgeklebt. Die Schnitte wurden dann durchnummeriert und ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen analysiert.

### 2.2.11.1 Mittlere Wandstärke

Zur Bestimmung der mittleren Wandstärke wurden 3 µm Paraffinschnitte mit Elastica-Kernechtrot gefärbt wie oben protokolliert. Bei 100-facher, 200-facher, 400-facher und 630-facher Vergrößerung wurden pro Tier alle intrapulmonale Gefäße ausgezählt. Einteilung der Gefäße anhand des externen Gefäßdurchmessers in die Größenkategorien 20-50 µm, 51-100 µm und > 101µm.



**Abbildung 11(a)-(e): Bestimmung der Wandstärke.**

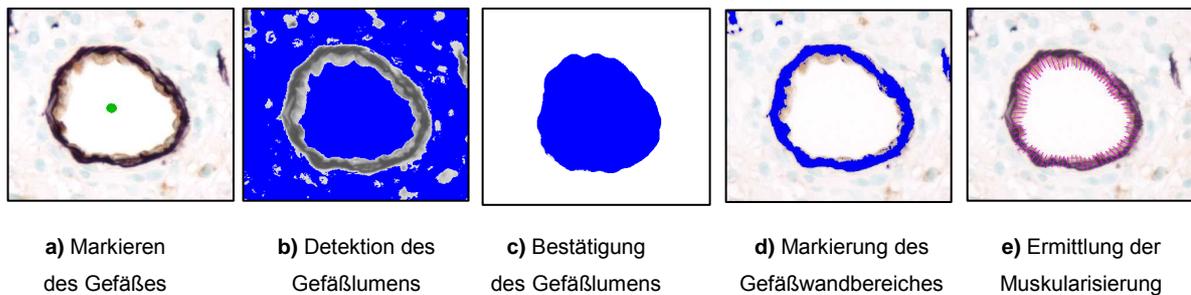
Die Mediadicke wurde definiert als der mittlere Abstand zwischen Lamina elastica interna und Lamina elastica externa (berechneter Mittelwert aus 5-8 Messungen pro Gefäß, Abbildung 11 d)). Die mittlere Wandstärke wurde als Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers des Gefäßes angegeben. Dies wurde wie folgt berechnet:

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

Der externe Durchmesser des Gefäßes umfasste den Bereich innerhalb der Lamina elastica externa. Die Adventitia konnte aus technischen Gründen nicht eingeschlossen werden. Das Lumen bzw. der Innendurchmesser des Gefäßes umfasste die Fläche innerhalb des Endothels (Abbildung 11 b)-c)).

### 2.2.11.2 Muskularisierungsgrad

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden 3 µm Paraffinschnitte mit immunhistochemischer Doppelfärbung gegen Smooth muscle alpha actin und von Willebrand Faktor (Faktor VIII) gefärbt wie im Färbeprotokoll angeführt.



**Abbildung 12 (a)-(e): Bestimmung des Muskularisierungsgrades.**

Bei 400-facher Vergrößerung wurden pro Tier 100 kleine intrapulmonale Gefäße in einer Größenordnung von 20 bis 50 µm externem Gefäßdurchmesser untersucht und als voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert kategorisiert. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen, wurde der Anteil Anti- alpha smooth muscle actin positiver (violetter) Gefäßwandbereiche ermittelt (Abbildung 12 d-e)). Dies wurde halbautomatisch in einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung von der speziell von Leica angefertigten Software durchgeführt. Nichtmuskularisierte Gefäße wurden in gleicher Art und Weise durch die (braune) endotheliale anti- von Willebrand Faktor-Färbung deutlich gemacht.

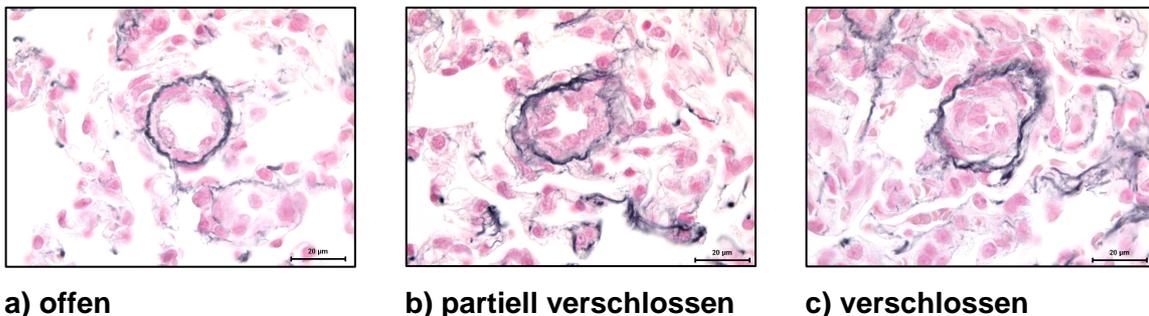
Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

- **nicht muskularisiert:**  $\leq 5\%$  Anteil von Smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **partiell muskularisiert:**  $\leq 75\%$  Anteil von Smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **voll muskularisiert:**  $> 75\%$  Anteil von Smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia

Die errechneten Werte (Außendurchmesser, Innendurchmesser, mittlere Wandstärke in Prozent und absolut, Muskularisierungsgrad in Prozent, Lumenfläche) wurden direkt nach Auswertung jedes einzelnen Gefäßes automatisch in Excel überführt und in die oben genannten Gefäßkategorien übertragen.

### 2.2.11.3 Okklusion

Zur Bestimmung der Okklusion wurden 3 µm Paraffinschnitte mit Elastica-Kernechtrot gefärbt wie oben protokolliert. Es wurde ebenfalls mit dem Programm zur Berechnung der mittleren Wandstärke gearbeitet. Bei 630-facher Vergrößerung wurden pro Tier alle intrapulmonalen Gefäße < 50 µm externen Gefäßdurchmesser ausgezählt. Die Gefäße wurden per Hand anhand des Lumenbereiches in die Gefäßkategorien offen (Lumenbereich  $\leq 50\%$ ), partiell geschlossen (Lumenbereich  $\geq 50\% - 75\%$ ) oder geschlossen (Lumenbereich  $\geq 75\%$ ) in die automatisch erstellte Excel-Tabelle eingetragen.

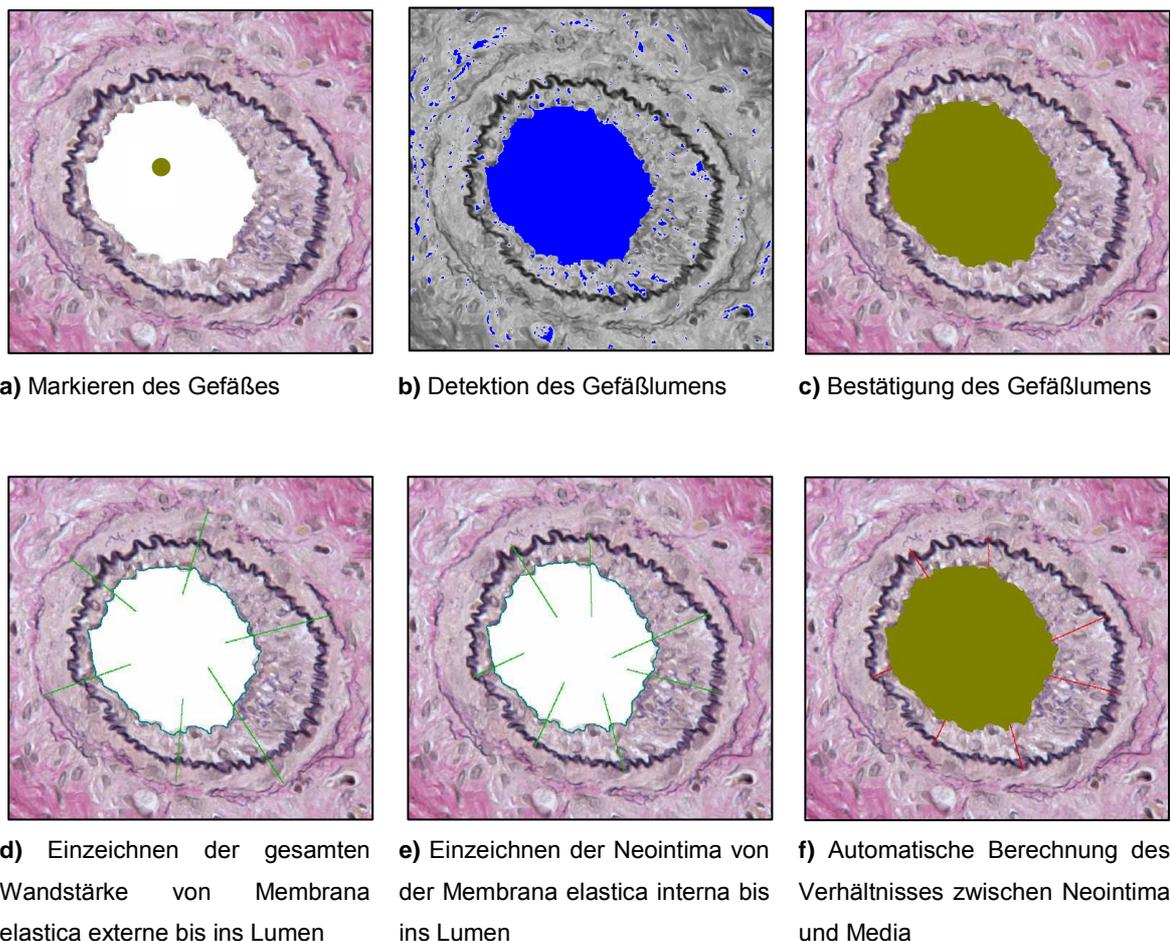


**Abbildung 13 (a)–(c): Darstellung von Beispielbildern (Elastica-Kernechtrot-Färbung) von offenen, partiell verschlossenen und verschlossenen Gefäßen.**

### 2.2.11.4 Neointima

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Neointima zu Media wurden 3 µm Paraffinschnitte mit Elastica-van Gieson gefärbt. Bei 100-facher, 200-facher, 400-facher und 630-facher Vergrößerung wurden pro Tier alle intrapulmonalen

Gefäße  $\geq 0 \mu\text{m}$  externen Gefäßdurchmesser ausgezählt. Die Gesamtwandstärke (Neointima + Media) wurde definiert als der mittlere Abstand zwischen Lamina elastica externa und Gefäßlumen [(berechneter Mittelwert aus fünf bis acht Messungen pro Gefäß), (Abbildung 14, d)]. Die Wandstärke der Neointima wurde ermittelt als der mittlere Abstand zwischen Lamina elastica interna und Gefäßlumen [(berechneter Mittelwert aus fünf bis acht Messungen pro Gefäß), (Abbildung 14, e)]. Das Verhältnis von Neointima zu Media wird berechnet, indem das Lumen vom Gesamtdurchmesser (= Media + Neointima + Lumen) subtrahiert wird und die beiden Werte der Media und der Neointima in Verhältnis zueinander. Die Ergebnisse (Außendurchmesser, Innendurchmesser, mittlere Wandstärke in Prozent und absolut, Lumenfläche, Verhältnis Neointima/Media, mittlere Breite Neointima, mittlere Breite Media) wurden nach Auswertung jedes einzelnen Gefäßes automatisch in Excel überführt.



**Abbildung 14(a) – (f): Bestimmung des Verhältnisses zwischen Neointima und Media.**

### 2.2.12 Statistische Auswertung

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die n-Zahl der jeweiligen Gruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, den im Kapitel „Aufteilung der Tiergruppen“ angegebenen Tierzahlen. Die Normalverteilung wurde getestet. Die Unterschiede zwischen den normoxischen Tieren und der Placebo-Tiere sowie die Placebotiere-Tiere zu den beiden Therapiegruppen wurden durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Die Unterschiede zwischen gesunden Menschen im Vergleich zu den IPAH erkrankten Menschen wurden mit einem t-Test ermittelt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte mit Therapeutika Sildenafil und Imatinib**

#### **3.1.1 Nebenwirkungen unter oraler Therapie mit Sildenafil 50 mg/kg und Imatinib 100 mg/kg**

Während der Behandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil traten keinerlei Nebenwirkungen auf. Auch bei der Sektion der Tiere konnten keine aus der Behandlung resultierenden pathologischen Befunde festgestellt werden.

Eine leichte, vorübergehende Diarrhoe unter Imatinib-Therapie konnte bei drei von acht Ratten beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf eine Reizung der Magenschleimhaut zurückzuführen, da Imatinib bei oraler Verabreichung, lokal reizenden und adstringierenden Einfluß auf die Magenschleimhaut ausübt (Glivec® Fachinformation für Kliniker, Novartis Pharma).

#### **3.1.2 Gewicht**

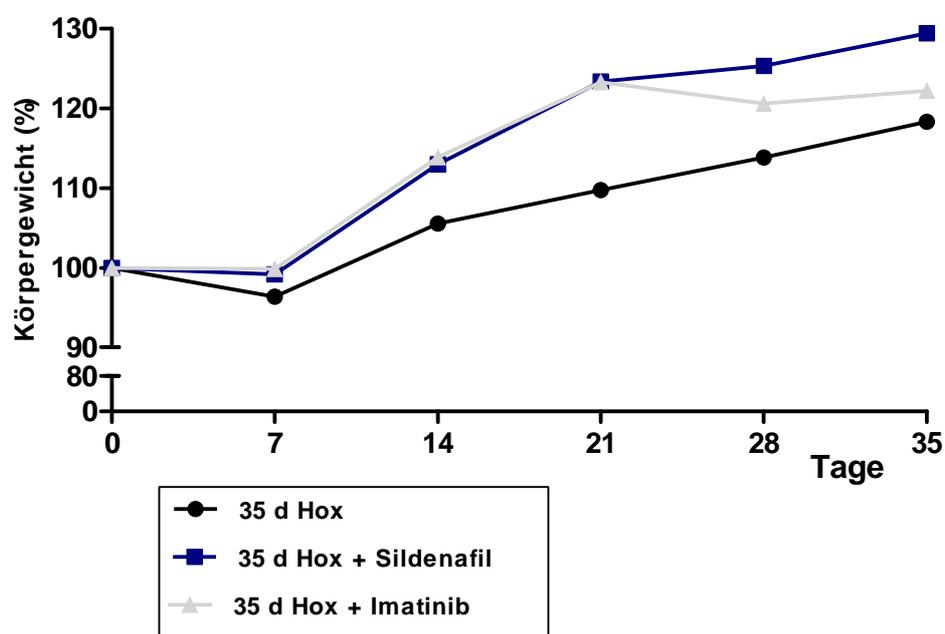
Tiere der mit 50 mg/kg/d Sildenafil behandelten Therapiegruppe wogen zu Beginn des Versuches im Mittel 283 g. Das gemittelte Gewicht reduzierte sich bis zum 7.Tag auf 281 g. Die Tiere nahmen dann kontinuierlich zu und hatten am 14. Tag ein Gewicht von 320 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag wogen die Tiere 350 g und am Tag 28 355 g. Bei Versuchsende (35.Tag) lag das gemittelte Gewicht bei 367 g.

Tiere der mit 100 mg/kg/d Imatinib behandelten Therapiegruppe wogen zu Beginn des Versuches im Mittel 283 g. Bis zum 7.Tag (283 g) erfolgte keine Gewichtszunahme. Ab dem 8.Tag nahmen die Tiere wieder kontinuierlich zu und erreichten am 14.Tag ein Gewicht von 323 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag betrug das Gewicht 349 g. Nun folgte eine Gewichtsabnahme (28.Tag) auf 342 g. Dies kann man auf die Diarrhoe zurückführen, die auf die Medikation von Imatinib

eintrat. Es erfolgte schließlich eine erneute Gewichtszunahme, so dass die Tiere am Versuchsende (35.Tag) ein gemittelttes Gewicht von 346 g aufwiesen.

Die Tiere der 35 Tage Hypoxiegruppe, die mit Methylcellulose behandelt wurden, wogen zu Versuchsbeginn im Mittel 297 g. Das gemittelte Gewicht reduzierte sich bis zum 7.Tag auf 286 g. Die Tiere nahmen aber dann wieder kontinuierlich zu und hatten am 14.Tag ein Gewicht von 314 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag wogen die Tiere 326 g und am 28.Tag 338 g. Bei Versuchsende (35.Tag) lag das gemittelte Gewicht bei 352 g.

In den ersten sieben Tagen des Versuchsverlaufes konnte in allen Gruppen entweder Gewichtsabnahme oder Gewichtsstagnation festgestellt werden. Als Begründung hierfür, wurde die Umstellung der Tiere auf hypoxische Gegebenheiten sowie die einsetzenden kompensatorischen Adaptationsmechanismen, wie z.B. die Höhendiuurese, angesehen.

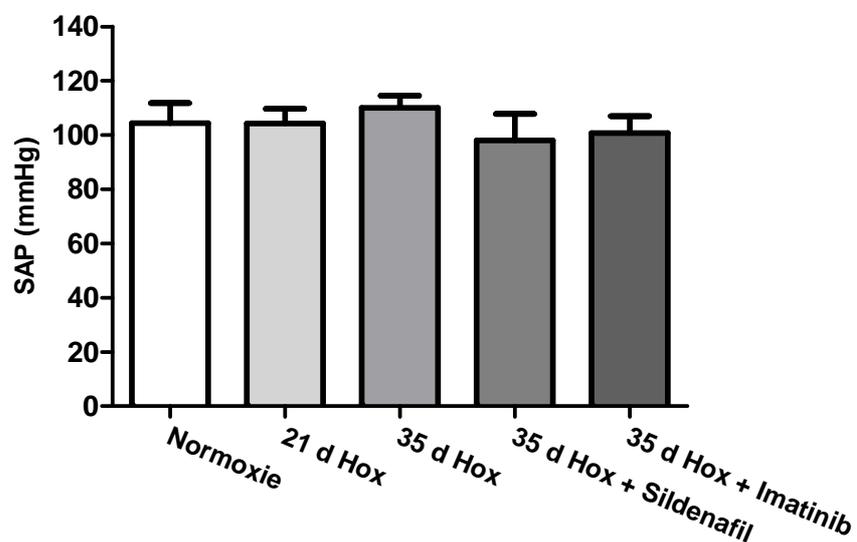


**Abbildung 15:** Graphische Darstellung des Gewichtsverlaufes der Tiere unter Therapie mit 50 mg/kg/d Sildenafil und Imatinib 100 mg/kg/d im Vergleich zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe.

### 3.1.3 Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den einzelnen Gruppen

Der mittlere systemisch-arterielle Druck betrug in der mit 50 mg/kg/Tag Sildenafil behandelten Gruppe  $98,1 \text{ mmHg} \pm 9,7$ . In den mit 100 mg/kg/Tag Imatinib behandelten Tieren betrug er  $100,8 \text{ mmHg} \pm 6,2$ . Die mit Methylcellulose behandelte Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Druck von  $110,1 \text{ mmHg} \pm 4,4$ , die Tiere nach 21 Tagen Hypoxie einen Druck von  $104,2 \text{ mmHg} \pm 5,5$  (Abbildung 16). Bei der Gruppe mit Normoxie fand sich im Mittel ein Druck von  $104,4 \text{ mmHg} \pm 7,4$  (Abbildung 16).

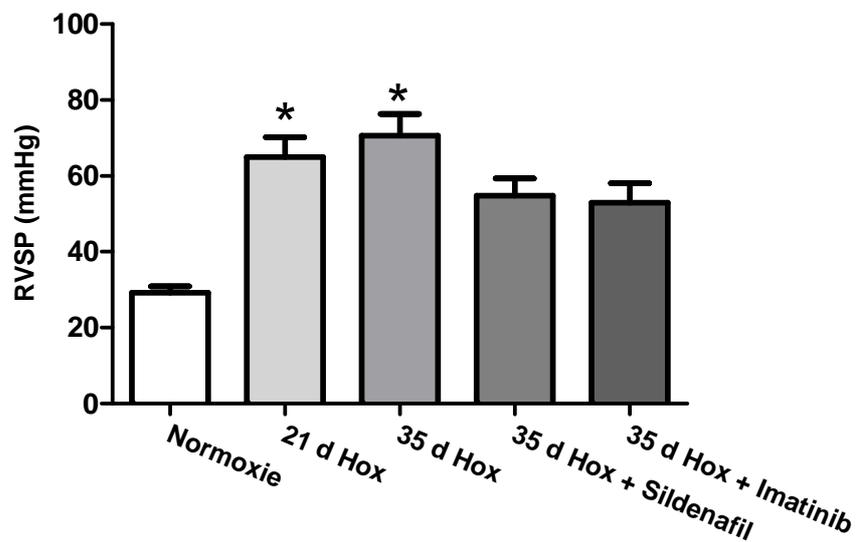
Der mittlere systemisch-arterielle Druck unterschied sich nicht signifikant in den verschiedenen Gruppen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sowohl Sildenafil als auch Imatinib keine (systemisch) vasodilatative Wirkung zeigten, denn dies würde mit einer deutlichen Senkung des arteriellen Druckes einhergehen.



**Abbildung 16** : Graphische Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes in den verschiedenen Gruppen.

### 3.1.4 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

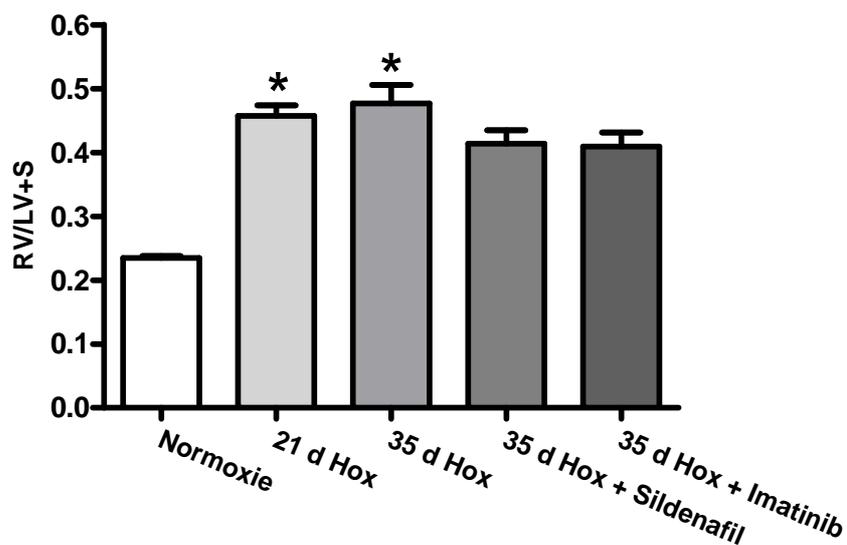
In den normoxischen Kontrollen betrug der Mittelwert  $29,3 \text{ mmHg} \pm 1,6$ . 21 Tage nach der Hypoxieexposition ließ sich eine zweifache Erhöhung des Druckes feststellen ( $\text{MW } 65,0 \text{ mmHg} \pm 5,2$ ). 35 Tage nach Hypoxieexposition erhöhte sich der rechtsventrikuläre systolische Druck und erreichte systemische Werte von  $70,6 \text{ mmHg} \pm 5,7$  (Abbildung 17). Der Druck der mit Sildenafil behandelten Gruppe lag fünf Wochen nach Hypoxieexposition bei  $54,8 \text{ mmHg} \pm 4,6$ . Der Druck der mit Imatinib behandelten Gruppe lag fünf Wochen nach Hypoxieexposition bei  $53,0 \text{ mmHg} \pm 5,1$  (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Graphische Darstellung des rechtsventrikulär systolischen Druckes (RVSP) in den verschiedenen Gruppen (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie).

### 3.1.5 Bestimmung des Gewichtsverhältnisses zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Im Verlauf der Erkrankung entwickelten die Hypoxie-behandelten Tiere durch die erhöhte Druckbelastung des rechten Ventrikels eine Rechtsherzhypertrophie. Die Ratio des Trockengewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) erhöhte sich von  $0,24 \pm 0,003$  (normoxische Kontrollen) auf  $0,46 \pm 0,02$  (21 Tage nach Hypoxieexposition) und  $0,48 \pm 0,03$  [35 Tage nach Hypoxieexposition (Abbildung 18)]. In beiden Therapiegruppen [Sildenafil (MW  $0,42 \pm 0,02$ ); Imatinib (MW  $0,41 \pm 0,02$ )] konnte die Ratio reduziert werden (Abbildung 18).

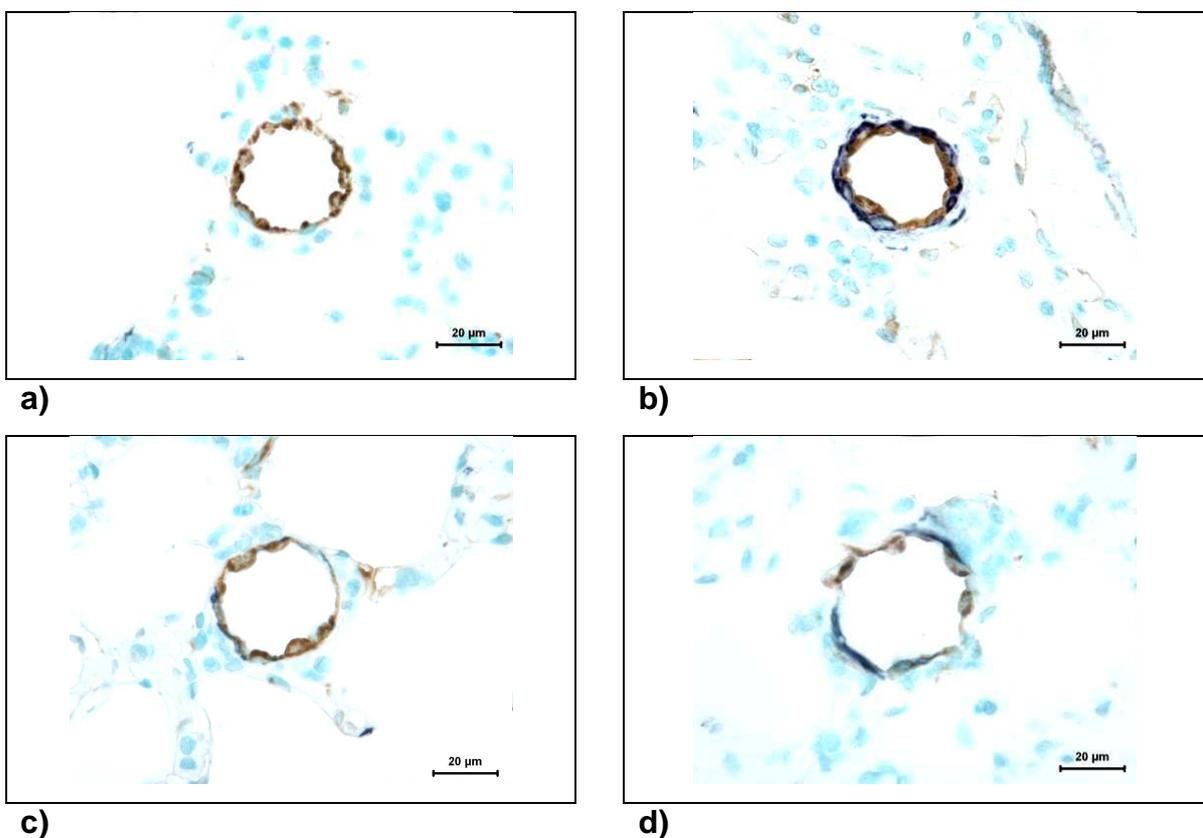


**Abbildung 18:** Graphische Darstellung des Gewichtsverhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum in den einzelnen Gruppen als Maß für die Rechtsherzhypertrophie (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie).

### 3.1.6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

#### 3.1.6.1 Muskularisierungsgrad

Im Verlauf der Erkrankung fand bei den Hypoxie-induzierten Ratten eine verstärkte Muskularisierung der arteriellen Lungengefäße statt.



**Abbildung 19 (a)- (d):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

a) Normoxische Ratte b) 35 d Hypoxie c) 35 d Hypoxie mit Sildenafilgabe d) 35 d Hypoxie mit Imatinibgabe

Immunohistochemische Doppelfärbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (630-fache Vergrößerung) gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres Smooth muscle alpha actin (violett).

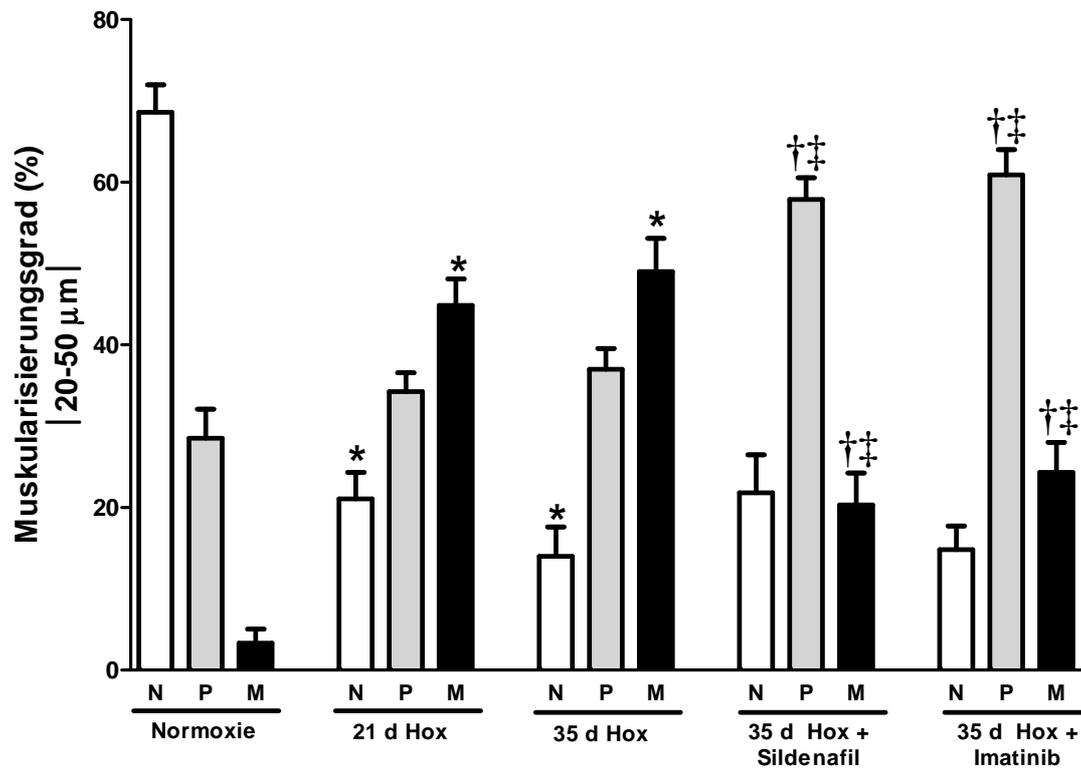
### 3.1.6.1.1 Prozentualer Anteil voll, partiell und teilmuskularisierter Gefäße

Bei normoxischen Kontrollratten war mehr als die Hälfte der Gefäße in der untersuchten Kategorie nicht muskularisiert (MW 68,60% ± 3,37). Bei hypoxischen Ratten fiel der Anteil nicht muskularisierter Arterien im Verlauf der Erkrankung stark ab. 21 Tage nach Hypoxieexposition betrug der Anteil nicht muskularisierter Arterien 21,08% ± 3,24; 35 Tage nach Hypoxieexposition nur noch 14,00% ± 3,60 (Abbildung 20).

Der Anteil voll muskularisierter Arterien dagegen nahm stark zu. 21 Tage nach Hypoxieexposition konnten 44,85% ± 3,23 und 35 Tage nach Hypoxieexposition sogar 49,00% ± 4,10 voll muskularisierte Arterien beobachtet werden (Abbildung 20).

Die Behandlung mit Sildenafil (50 mg/kg/d) führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien (MW 20,33% ± 3,91). Der Anteil partiell muskularisierter Gefäße erhöhte sich (MW 57,89% ± 2,65). Ebenso konnte eine höhere Anzahl nicht muskularisierter Arterien (MW 21,78% ± 4,68) im Vergleich zu unbehandelten Ratten erfasst werden (Abbildung 20).

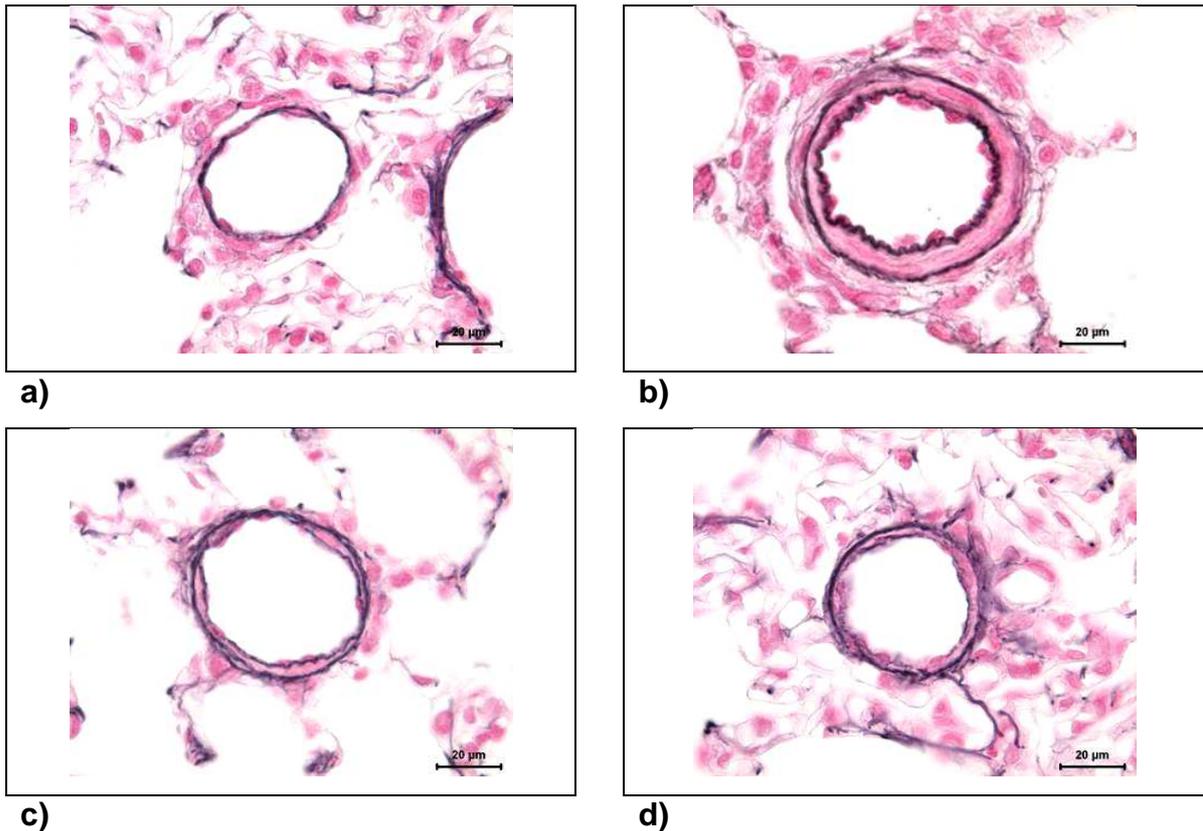
Die Behandlung mit Imatinib (100 mg/kg/d) führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien (MW 24,30% ± 3,71). Der Anteil partiell muskularisierter Gefäße erhöhte sich (MW 60,90% ± 3,13). Die Anzahl nicht muskularisierter Arterien (MW 14,80% ± 2,92) konnte bei unbehandelten Ratten nach 21 Tagen Hypoxie gesenkt werden (MW 21,08% ± 3,24). Im Vergleich zu unbehandelten Ratten nach 35 Tagen Hypoxie waren die Werte für die nicht muskularisierten Arterien (MW 14,00% ± 3,60) fast identisch (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils nicht (N), partiell (P) oder voll (M) muskularisierter peripherer Pulmonalarterien in den verschiedenen Tiergruppen (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21d Hox; ‡ $p < 0,05$  vs. 35d Hox).

### 3.1.6.2 Mittlere Wandstärke

Im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodelings verdickte sich die Gefäßwand der Hypoxie-induzierten Ratten.



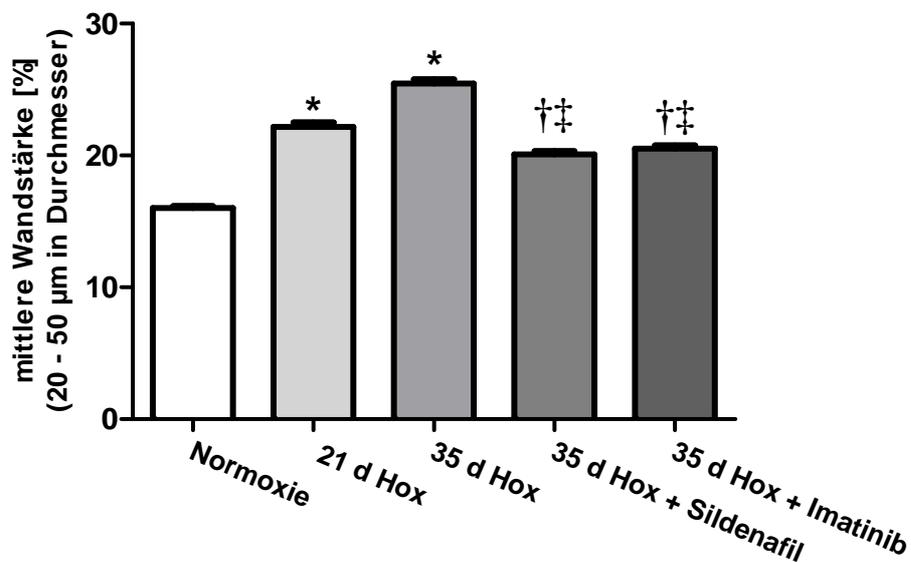
**Abbildung 21 (a)-(d):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

a) Normoxische Ratte b) 35 d Hypoxie c) 35 d Hypoxie mit Sildenafilgabe d) 35 d Hypoxie mit Imatinibgabe.

Elastica-Kernechtrot-Färbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (630-fache Vergrößerung) in den verschiedenen Tiergruppen zur morphometrischen Bestimmung der mittleren Wandstärke. Lamina elastica externa und interna sind grauschwarz gefärbt.

### 3.1.6.2.1 Mittlere Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien (20 – 50 $\mu\text{m}$ )

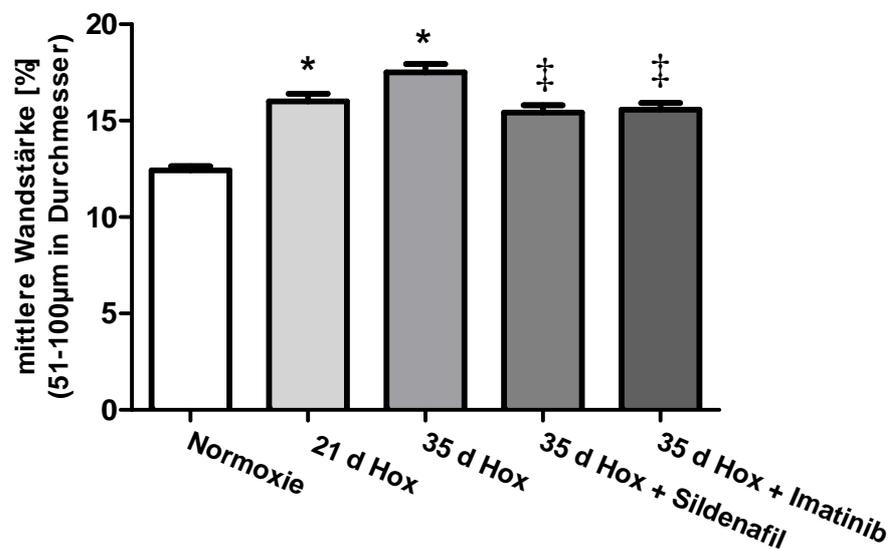
Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 20-50  $\mu\text{m}$  war in den Hypoxiegruppen stark erhöht. Am 21.Tag nach Hypoxieexposition betrug die Wandstärke  $22,16\% \pm 0,34$  (Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers). Am 35.Tag nach Hypoxieexposition erhöhte sie sich weiter auf  $25,45\% \pm 0,33$ . In normoxischen Kontrollratten betrug die mittlere Wandstärke kleiner Pulmonalarterien lediglich  $16,00\% \pm 0,17$  (Abbildung 22). Die Behandlung sowohl mit Sildenafil in einer Dosis von 50 mg/kg/d als auch mit Imatinib in einer Dosis von 100 mg/kg/d führte zu einer vollständigen Wiederherstellung dieses Zustandes [(Sildenafil: MW  $20,08\% \pm 0,26$ ; Imatinib: MW  $20,50\% \pm 0,28$ ), (Abbildung 22)].



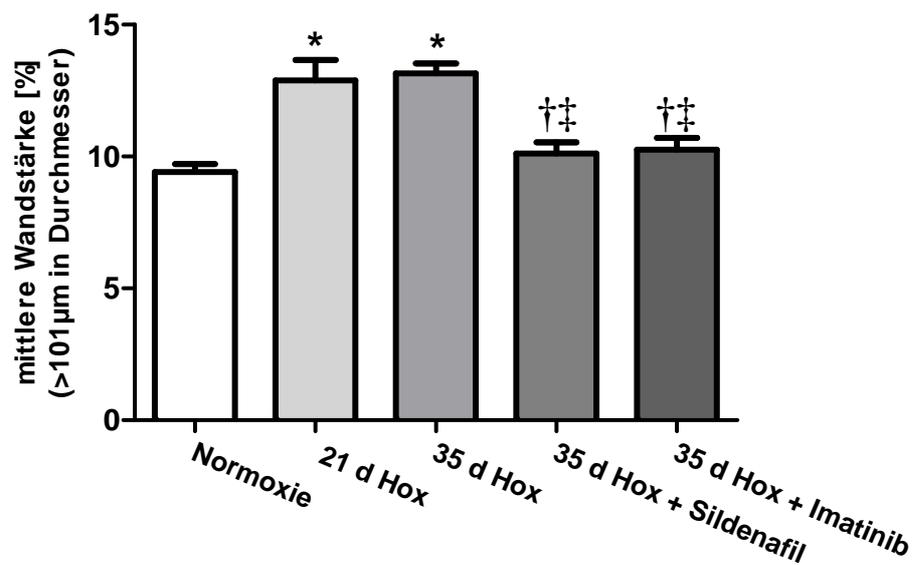
**Abbildung 22:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie, † $p < 0,05$  vs. 21d Hox; ‡ $p < 0,05$  vs. 35d Hox).

### 3.1.6.2.2 Mittlere Wandstärke von mittelgroßen und großen Pulmonalarterien

Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einer Größe zwischen 51 und 100  $\mu\text{m}$  bzw. größer als 101  $\mu\text{m}$  wurde ebenfalls bestimmt. Wie auch in den kleinen Pulmonalarterien verdickte sich die Wand der Gefäße im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. 21 Tage nach Hypoxieexposition betrug die mittlere Wandstärke mittelgroßer (51-100  $\mu\text{m}$ ) Pulmonalarterien  $15,99\% \pm 0,41$  und 35 Tage nach Hypoxieexposition  $17,50\% \pm 0,37$  (Abbildung 23). Sowohl unter der Therapie mit Sildenafil als auch mit Imatinib normalisierte sich die Wanddicke der Gefäße fast vollständig [(Sildenafil: MW  $15,43\% \pm 0,36$ ; Imatinib: MW  $15,55\% \pm 0,36$ ; normoxische Kontrolltiere: MW  $12,42\% \pm 0,22$ ), (Abbildung 23)]. Der gleiche Befund wurde auch in den Pulmonalarterien  $>101 \mu\text{m}$  erhoben (Abbildung 24).



**Abbildung 23:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke von mittelgroßen Pulmonalarterien (externer Durchmesser 51-100  $\mu\text{m}$ ) in den verschiedenen Gruppen (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; ‡ $p < 0,05$  vs. 35d Hox).



**Abbildung 24:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke großer Pulmonalarterien [(externer Durchmesser >101 µm), (\*p<0,05 vs. Normoxie; †p<0,05 vs. 21d Hox; ‡p<0,05 vs. 35d Hox)].

### 3.1.6.3 Okklusion peripherer Pulmonalarterien (< 21 µm)

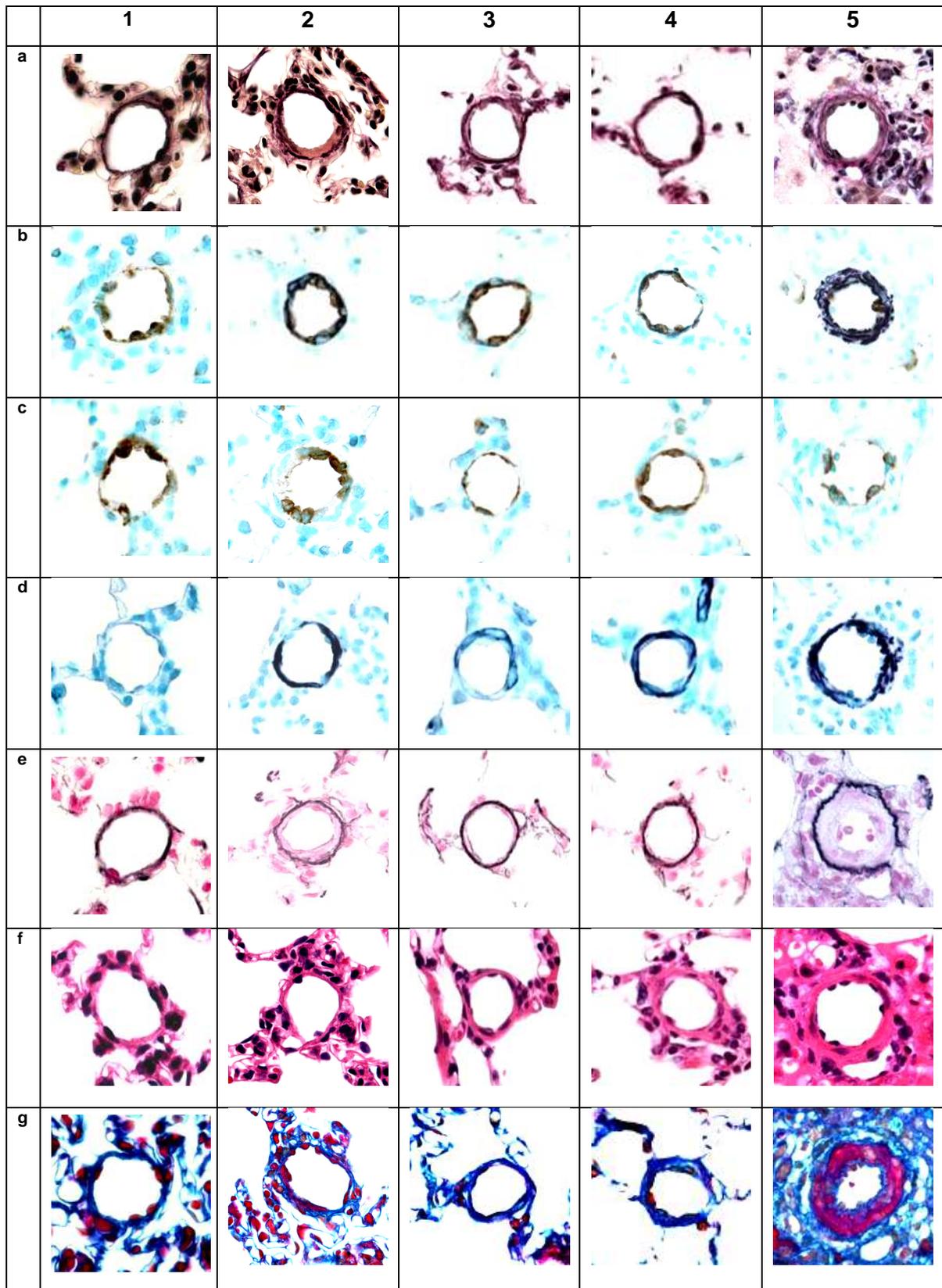
Um Veränderungen der Gefäßlumina von Pulmonalarterien im Verlauf der Erkrankung charakterisieren und quantifizieren zu können, wurden Lungenschnitte der verschiedenen Versuchsgruppen Elastica-kernechtrot gefärbt. Lamina elastica interna und externa färben sich grau-schwarz, die Kerne rot.

Die Gefäße wurden in die Kategorien offen, partiell verschlossen und verschlossen eingeteilt. Bei Auswertung der Daten konnten die aussagekräftigsten Ergebnisse bei einem externen Gefäßdurchmesser < 21 µm gefunden werden. In der Abbildung sind partiell verschlossene und verschlossene Gefäße gezeigt. Offene Gefäße bilden die Differenz zu 100%.

Die normoxischen Tiere zeigten 5,93% ± 0,99 partiell verschlossene und 2,22% ± 1,08 verschlossene Gefäße. Der Anteil der partiell verschlossenen und



### 3.1.6.4 Bestimmung des Verhältnisses der Neointima zu Media als Maß der Neointimabildung



**Abbildung 26 (a) – (g):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

1. Normoxische Ratte, 2. 35 d Hypoxie; 3. 35 d Hypoxie mit Sildenafilgabe; 4. 35 d Hypoxie mit Imatinibgabe; 5. 35 d Monocrotalin-Ratte

Gefäßdurchmesser ca. 20 µm (630-fache Vergrößerung)

Färbungen: a) Elastica van Gieson; b) immunhistochemisch; c)  $\alpha$ -actin; d) vWF; e) Elastica-Kernechtrot; f) Hämatoxylin-Eosin; g) Mallory-Trichrom

Die Abbildung 26 1 (a–g) zeigt, dass bei normoxischen Tieren keine Neointima gebildet wird. Um die Zunahme der Neointima im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodelings darstellen und quantifizieren zu können, wurden histologische Schnitte von den verschiedenen Versuchsgruppen Elastica van Gieson (Abbildung 26, a) gefärbt. Lamina elastica interna und externa färben sich schwarz, Zellkerne schwarzbraun, Cytoplasma hellbraun, elastische Fasern und Muskelgewebe gelb und Kollagenfasern rot. Eine Zunahme der Neointima im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ist zu erkennen (Abbildung 26, 2a). Im Vergleich dazu sieht man bei der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie eine deutliche Zunahme der Mediadicke, jedoch war keine Neointimabildung zu beobachten (Abbildung 26, 5a). Nach zweiwöchiger Therapie mit Sildenafil (Abbildung 26, 3a) bzw. Imatinib (Abbildung 26, 4a) erfolgte eine vollständige Regression der Neointimabildung.

Die immunhistochemische Doppelfärbung gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres Alpha-actin (violett) wurde zur gemeinsamen Beurteilung von Endothel und Media verwendet (Abbildung 26, b). Die getrennte Darstellung beider Gefäßschichten zeigen die Abbildungen 26, c und d.

Die Färbung mit Alpha-actin (Abbildung 26, c) wurde zur Beurteilung der glatten Muskulatur bzw. zur Darstellung der Media verwendet.

Die Färbung von Willebrand Faktor (Abbildung 26, d) zur Beurteilung von Endothelzellen zeigte die Hypertrophie und Proliferation im Verlaufe der 35 Tage Hypoxie. Diese Endothelzellenveränderungen wurden im Laufe der Therapie mit Sildenafil bzw. Imatinib deutlich vermindert (Abbildung 26, 3d und 4d).

Die Elastica-Kernechtrot-Färbung ermöglicht die Anfärbung der elastischen Fasern. Lamina elastica externa und interna werden grauschwarz gefärbt, die Zellkerne färben sich rot an (Abbildung 26, e).

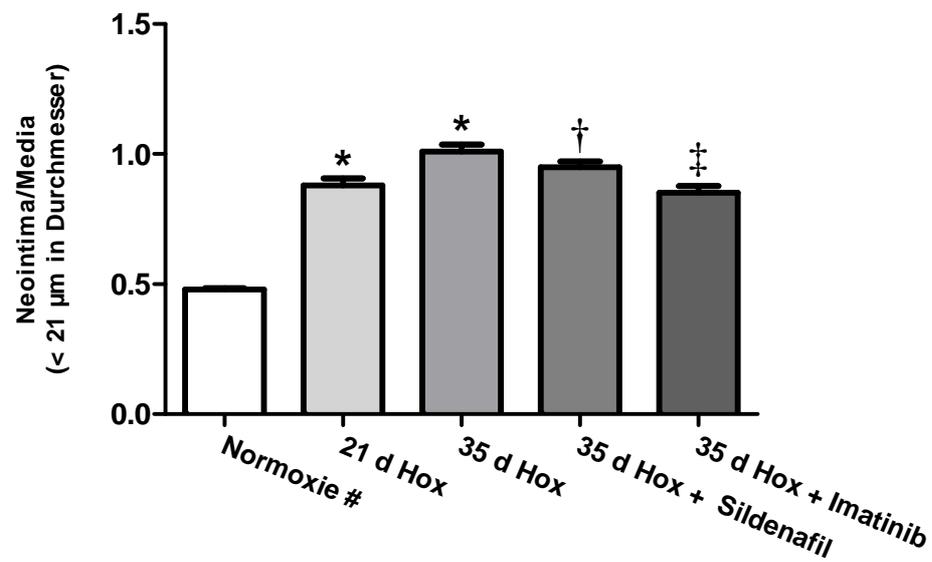
Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) wurde als Übersichtsfärbung zur Beurteilung von krankhaften Veränderungen verwandt. Zellkerne färben sich blau, Zytoplasma rötlich-bläulich und Kollagen rot an (Abbildung 26, f).

Die Mallory-Trichrom-Färbung wurde zur Darstellung von Bindegewebskomponenten insbesondere Kollagen eingesetzt. Die Zellkerne färben sich rot, Zytoplasma violett, Interstitium hellbau und Kollagen dunkelblau (Abbildung 26, g). Eine Zunahme von Kollagen im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ist zu erkennen. Diese Beobachtung wurde aber nicht weiter quantifiziert und soll somit nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

Die Lungenschnitte zu den Abbildungen 26 5 (a-g) wurden mir freundlicher Weise von Herrn Djuro Kosanovic zur Verfügung gestellt.

#### **3.1.6.4.1 Verhältnis von Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 21 µm)**

Das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Mediadicke betrug bei den normoxischen Tieren  $0,48 \pm 0,01$  (Abbildung 26, 1a). Nach 21 Tagen Hypoxieexposition erhöhte sich das Verhältnis auf  $0,88 \pm 0,03$ . Nach 35 Tagen Hypoxieexposition nahm das Verhältnis nochmals zu und erreichte Werte von  $1,01 \pm 0,03$  (Abbildung 27). Nach Behandlung mit Sildenafil verkleinerte sich das Verhältnis auf  $0,95 \pm 0,02$ . Die Therapie mit Imatinib verringerte das Verhältnis sogar auf  $0,85 \pm 0,03$  und zeigte somit eine signifikante Reduktion gegenüber der Werte der 35 Tage Hypoxiegruppe (Abbildung 27).

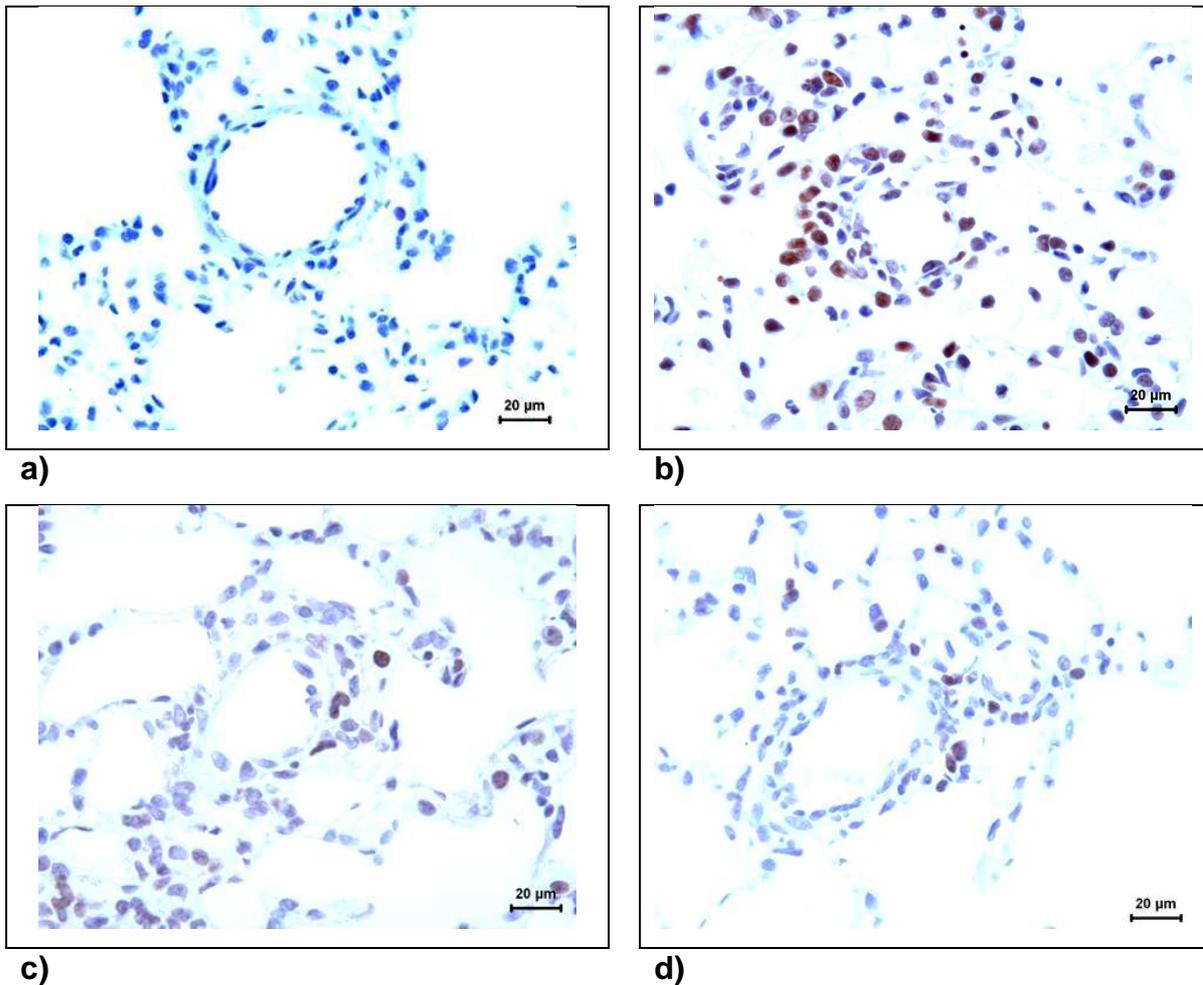


**Abbildung 27:** Graphische Darstellung der Neointima zu Media Ratio in den verschiedenen Gruppen mit einem externen Gefäßdurchmesser von  $< 21 \mu\text{m}$  (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs 21d Hox; ‡ $p < 0,05$  vs 35d Hox).

#Anmerkung: Bei den Normoxie-Tieren handelt es sich nicht um das Verhältnis von Neointima zu Media, sondern um das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Media, da bei gesunden Tieren keine Neointima existiert (Abbildung 26, 1a).

### 3.1.6.5 Proliferationsmarker-Färbung

Die für PCNA positiven Zellen in den verschiedenen Gruppen wurden rot-braun angefärbt.



**Abbildung 28 (a) – (d):** Färbung mit PCNA-Färbung von a) normoxischen, b) 35 d Hypoxie Tieren. Eine Zunahme der PCNA positiven Zellen vor allem im Bereich der Adventitia und Media im Verlauf der Erkrankung ist zu erkennen. c) 35 d Hypoxie Tieren mit Behandlung Sildenafil d) 35 d Hypoxie Tieren mit Behandlung Imatinib. Eine deutliche Abnahme der PCNA positiven Zellen vor allem im Bereich der Adventitia und Media im Verlauf der Therapie ist zu erkennen (alle 400-fache Vergrößerung).

---

## **3.2 Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 bei Ratte mit Therapeutika Sildenafil und Imatinib**

### **3.2.1 Nebenwirkungen unter oraler Therapie mit Sildenafil 50 mg/kg und Imatinib 100 mg/kg**

Während der Behandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil traten keinerlei Nebenwirkungen auf. Auch bei der Sektion der Tiere konnten keine aus der Behandlung resultierenden pathologischen Befunde festgestellt werden.

Eine leichte, temporäre Diarrhoe unter Imatinib-Therapie konnte bei vier von acht Ratten beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf eine Reizung der Magenschleimhaut zurückzuführen, da bekannt ist, dass Imatinib bei oraler Gabe lokal reizenden und adstringierenden Einfluß auf die Magenschleimhaut ausübt (siehe Glivec® Fachinformation für Kliniker, Novartis Pharma).

Gelegentlich traten umschriebene Hämatome an der Einstichstelle auf, dies wurde jedoch auch an den mit DMSO injizierten Ratten festgestellt und ist auf die Injektion zurückzuführen.

### **3.2.2 Gewicht**

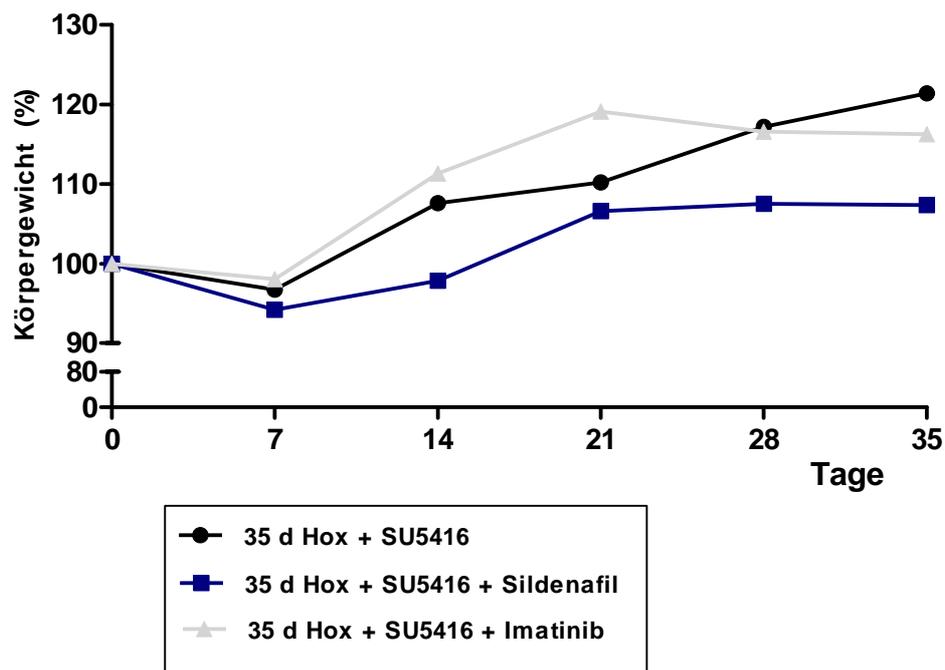
Tiere der mit 50 mg/kg/d Sildenafil behandelten Therapiegruppe wogen zu Beginn des Versuches im Mittel 302 g. Das gemittelte Gewicht reduzierte sich bis zum 7.Tag auf 285 g. Die Ratten nahmen aber dann wieder zu und hatten am 14.Tag ein Gewicht von 296 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag wogen sie 322 g und am 28.Tag 325 g. Bei Versuchsende (35.Tag) kam es zu einer Gewichtsstagnation, so dass das gemittelte Gewicht bei 324 g verblieb.

Tiere der mit 100 mg/kg/d Imatinib behandelten Therapiegruppe wogen zu Beginn des Versuches im Mittel 290 g. Es erfolgte bis zum 7.Tag (284 g) eine

Gewichtsabnahme. Die Ratten nahmen dann wieder kontinuierlich zu und hatten am 14.Tag ein Gewicht von 323 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag wogen sie 345 g. Nun folgte eine Gewichtsverringering (28.Tag) auf 338 g. Dies kann man auf die Diarrhoe zurückführen, die während der Medikation von Imatinib eintrat. Es erfolgte nun eine Gewichtsstagnation, so dass die Tiere am Versuchsende (35.Tag) ein gemittelttes Gewicht von 337 g aufwiesen.

Die Tiere der 35 Tage Hypoxiegruppe und SU5416-Injektion, die mit Methylcellulose behandelt wurden, wogen zu Versuchsbeginn im Mittel 277 g. Das gemittelte Gewicht reduzierte bis zum 7.Tag auf 268 g. Die Tiere nahmen aber dann wieder kontinuierlich zu und hatten am 14.Tag ein Gewicht von 298 g. Bei Therapiebeginn am 21.Tag wogen die Tiere 305 g und am 28.Tag 325 g. Bei Versuchsende (35.Tag) lag das gemittelte Gewicht bei 336 g. Eine Erklärung der Gewichtszunahme der Kontrollgruppentiere lag an den gering- bis mittelgradigen Ödemen, die die Tiere im Laufe der Hypoxie entwickelten.

In den ersten sieben Tagen des Versuchsverlaufes konnte in allen Gruppen eine Gewichtsabnahme bzw. eine Gewichtsstagnation festgestellt werden. Als Begründung hierfür wird die Umstellung der Tiere auf die hypoxischen Gegebenheiten sowie die einsetzenden kompensatorischen Adaptationsmechanismen, wie z.B. die Höhendiuressese gesehen.

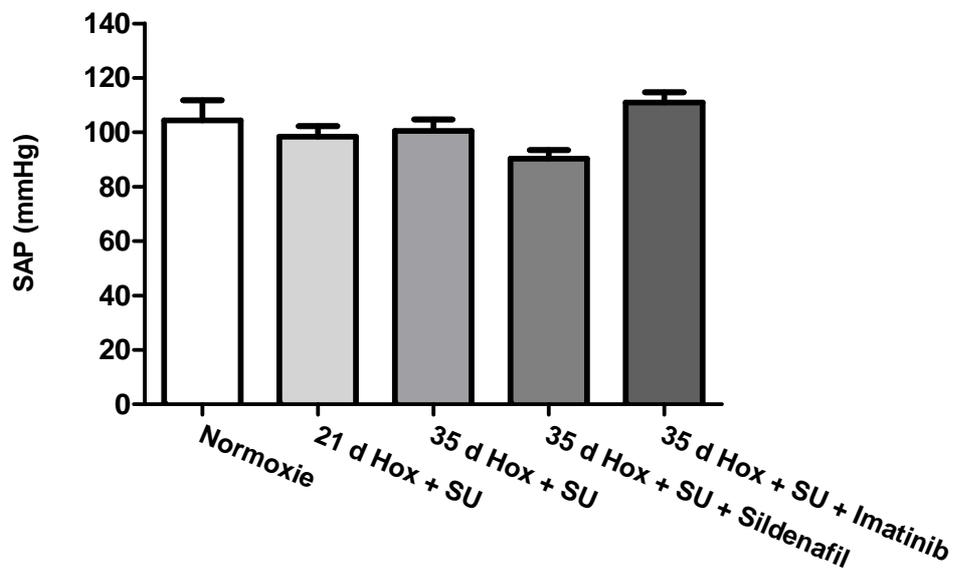


**Abbildung 29:** Graphische Darstellung des Gewichtsverlaufes der Tiere unter Therapie mit 50 mg/kg/d Sildenafil und Imatinib 100 mg/kg/d im Vergleich zu der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe.

### 3.2.3 Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den verschiedenen Gruppen

Der mittlere systemisch-arterielle Druck betrug in der mit 50 mg/kg/Tag Sildenafil behandelten Gruppe  $96,4 \text{ mmHg} \pm 6,6$ . In den mit 100 mg/kg/Tag Imatinib behandelten Tieren betrug er  $111,1 \text{ mmHg} \pm 3,7$ . Die mit Methylcellulose behandelte Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Druck von  $100,5 \text{ mmHg} \pm 4,3$ , die Ratten nach 21 Tagen Hypoxie einen Druck von  $98,5 \text{ mmHg} \pm 3,8$  (Abbildung 30). Die Gruppe der normoxischen Tiere zeigte im Mittel einen Druck von  $104,4 \text{ mmHg} \pm 7,4$  (Abbildung 30).

Der mittlere systemisch-arterielle Druck unterschied sich in den einzelnen Gruppen nicht signifikant. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sowohl Sildenafil als auch Imatinib keine (systemisch) vasodilatative Wirkung zeigen, denn dies würde mit einer deutlichen Senkung des arteriellen Druckes einhergehen.

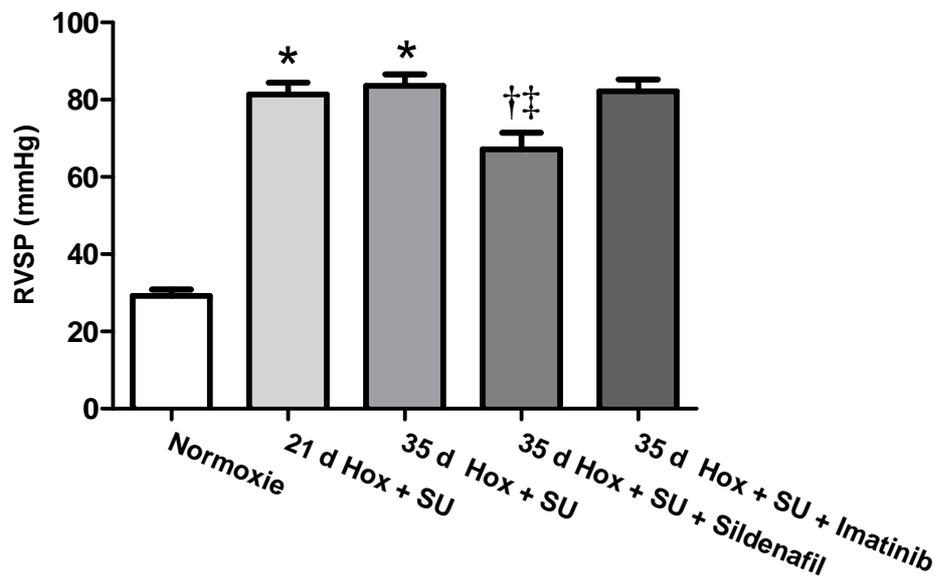


**Abbildung 30:** Graphische Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes in den verschiedenen Gruppen.

### 3.2.4 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

In den normoxischen Kontrollen betrug der Mittelwert  $29,25 \text{ mmHg} \pm 1,6$ . 21 Tage nach der Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 ließ sich bereits eine fast dreifache Erhöhung des Druckes feststellen (MW  $81,37 \text{ mmHg} \pm 3,03$ ). 35 Tage nach Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 erhöhte sich der rechtsventrikuläre systolische Druck nochmals und erreichte systemische Werte von  $83,61 \text{ mmHg} \pm 2,95$  (Abbildung 31). Der Druck der mit Sildenafil behandelten Gruppe lag fünf Wochen nach Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 hingegen nur bei  $67,16 \text{ mmHg} \pm 4,29$ . Dieser Wert zeigte sowohl einen signifikanten Unterschied zu der 21 Tage Hypoxiegruppe und Injektion von SU5416, als auch zu der 35 Tage Hypoxiegruppe mit Injektion von SU5416. Der Druck der mit Imatinib behandelten Gruppe lag fünf Wochen nach Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 bei  $82,23 \text{ mmHg} \pm 3,0$ . Ein

signifikanter Unterschied zu der 21 Tage Gruppe und 35 Tage Gruppe bestand nicht (Abbildung 31).

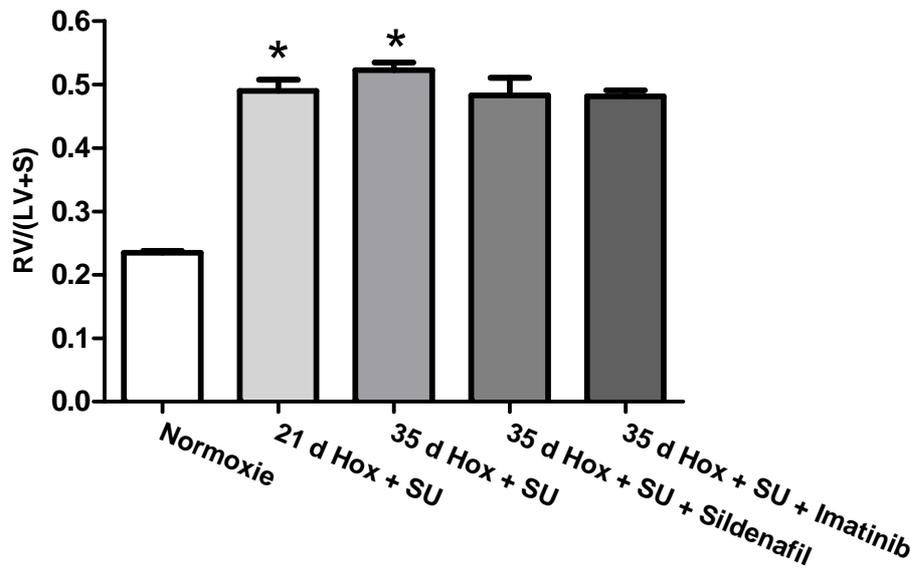


**Abbildung 31:** Graphische Darstellung des rechtsventrikulär systolischen Druckes (RVSP) in den verschiedenen Gruppen (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21d Hox+SU5416; ‡ $p < 0,05$  vs. 35d Hox+SU5416).

### 3.2.5 Bestimmung des Gewichtsverhältnisses zwischen rechten Ventrikels und linkem Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Im Verlauf der Erkrankung entwickelten die Hypoxie-Tiere in Kombination mit SU5416 infolge der erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels eine Rechtsherzhypertrophie. Die Ratio des Trockengewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) erhöhte sich von  $0,24 \pm 0,003$  (normoxische Kontrollen) auf  $0,49 \pm 0,06$  (21 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416-Injektion) und  $0,52 \pm 0,01$  [(35 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416-Injektion), (Abbildung 32)].

In beiden Therapiegruppen [Sildenafil (MW  $0,48 \pm 0,03$ ); Imatinib (MW  $0,48 \pm 0,01$ )] konnte die Ratio tendenziell verringert werden, aber nicht signifikant. (Abbildung 32).

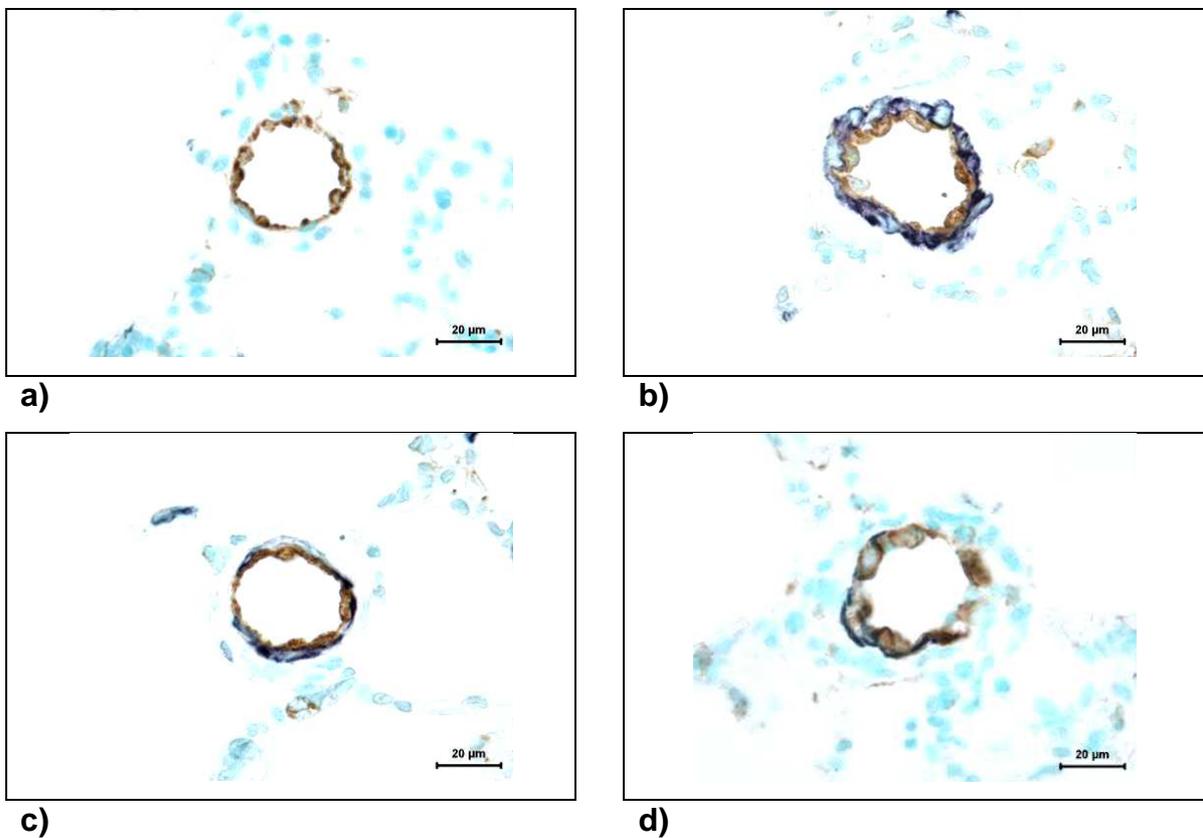


**Abbildung 32:** Graphische Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem zu linkem Ventrikel plus Septum in den verschiedenen Gruppen als Maß für die Rechtsherzhypertrophie (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie).

### 3.2.6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

#### 3.2.6.1 Muskularisierungsgrad

Im Verlauf der Erkrankung fand bei den Hypoxie-induzierten in Kombination mit SU5416 behandelten Ratten eine verstärkte Muskularisierung der arteriellen Lungengefäße statt.



**Abbildung 33(a)-(d):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

a) Normoxische Ratte b) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 c) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Sildanfilgabe d) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Imatinibgabe.

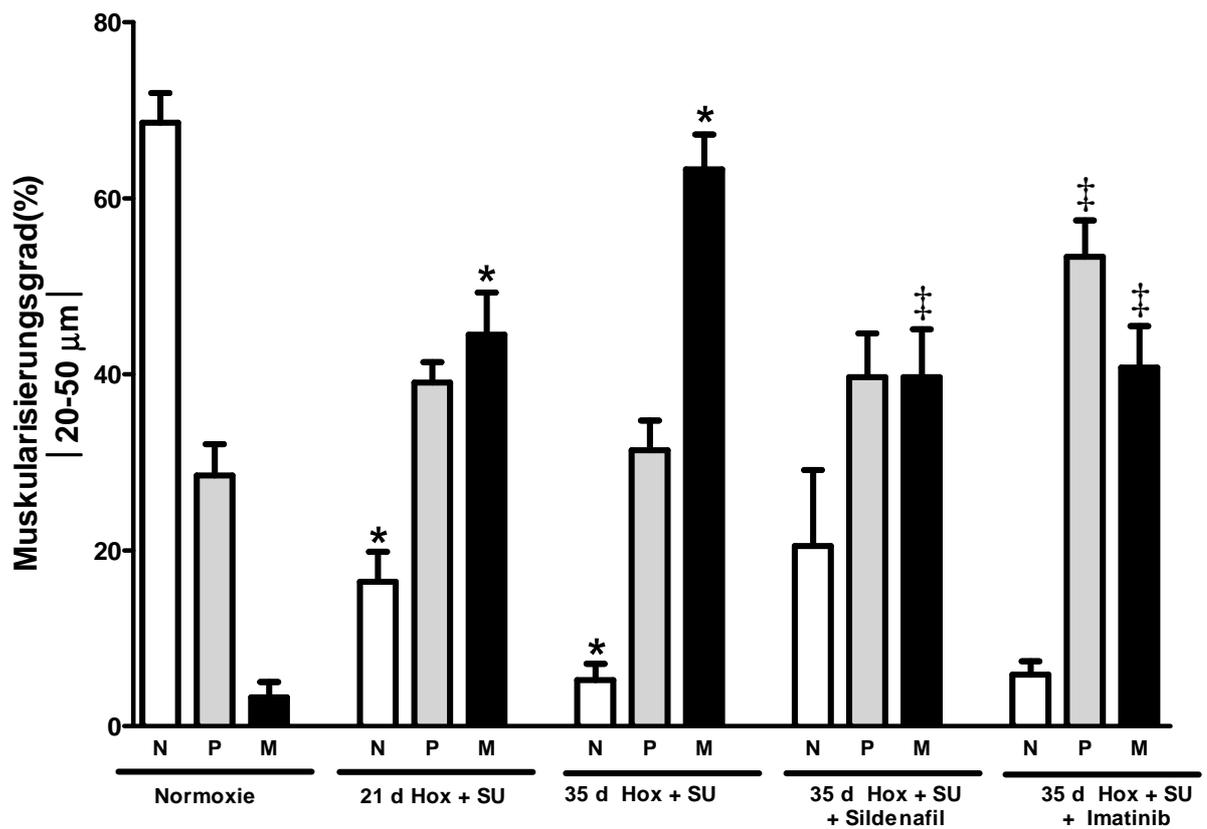
Immunhistochemische Doppelfärbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (alle Vergrößerung 630-fach) gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und Smooth muscle alpha actin (violett).

### 3.2.1.6.1 Prozentualer Anteil voll-, partiell- und teilmuskularisierter Gefäße

Bei normoxischen Kontrollratten war mehr als die Hälfte der Gefäße in der untersuchten Kategorie nicht muskularisiert (MW 68,60% ± 3,37). Bei hypoxischen Ratten mit SU5416 fiel der Anteil nicht muskularisierter Arterien im Verlauf der Erkrankung stark ab. 21 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416-Injektion betrug der Anteil nicht muskularisierter Arterien 16,43% ± 3,40; 35 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416 nur noch 5,23% ± 1,89. Der Anteil voll muskularisierter Arterien nahm dagegen stark zu. 21 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416-Injektion konnten 44,85% ± 4,78 und 35 Tage nach Hypoxieexposition und SU5416-Injektion sogar 63,31% ± 3,93 voll muskularisierte Arterien erfasst werden (Abbildung 34).

Die Behandlung mit Sildenafil (50 mg/kg/d) führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien (MW 39,70% ± 5,42). Der Anteil partiell muskularisierter Gefäße erhöhte sich (MW 39,70% ± 4,92). Ebenso konnte eine deutlich höhere Anzahl nicht muskularisierter Arterien (MW 20,50% ± 8,63) im Vergleich zu unbehandelten Ratten beobachtet werden (Abbildung 34).

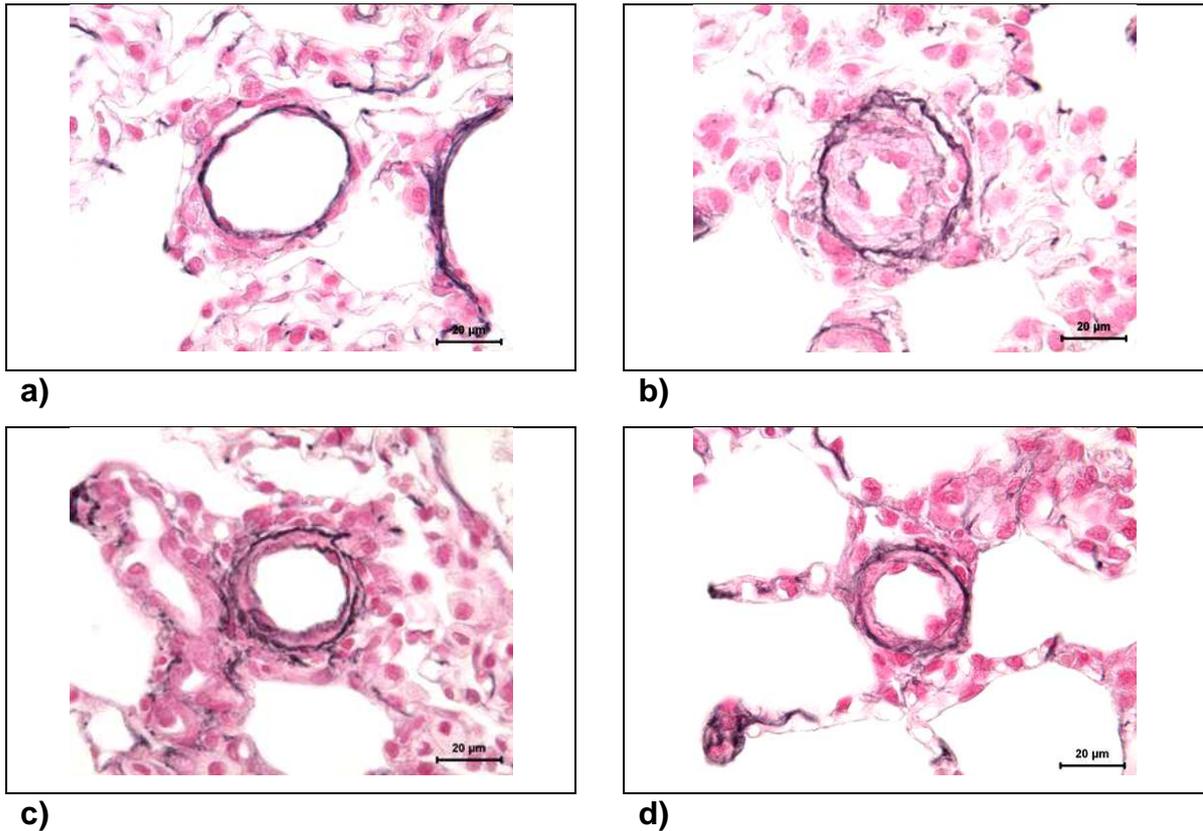
Die Behandlung mit Imatinib (100 mg/kg/d) führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien (MW 40,75% ± 4,76). Der Anteil partiell muskularisierter Gefäße erhöhte sich (MW 53,38% ± 4,14). Die Anzahl nicht muskularisierter Arterien (MW 5,88% ± 1,52) konnte im Vergleich zu den unbehandelten Ratten sowohl nach 21 Tagen (MW 16,43% ± 3,40) als auch nach 35 Tagen (MW 5,23% ± 1,89) Hypoxie und SU5416 nicht verbessert werden (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils nicht (N), partiell (P) oder voll (M) muskularisierter peripherer Pulmonalarterien in den verschiedenen Tiergruppen. (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; ‡ $< 0,05$  vs. 35d Hox+SU5416).

### 3.2.6.2 Mittlere Wandstärke

Im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodelings verdickte sich die Gefäßwand der Hypoxie-induzierten Ratten mit Injektion von SU5416.



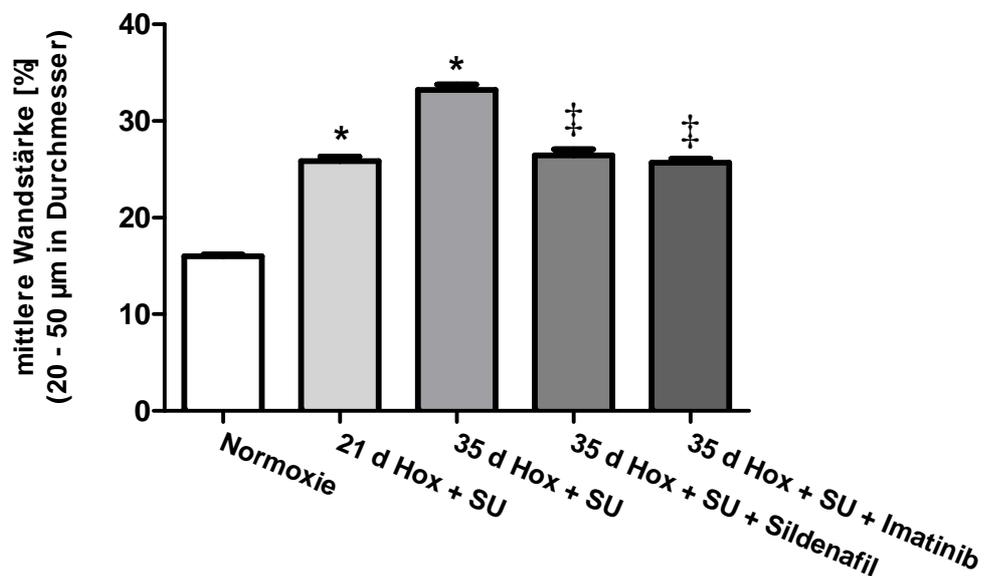
**Abbildung 35 (a)-(d):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

a) Normoxische Ratte b) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 c) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Sildenafilgabe d) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Imatinibgabe.

Elastica-Kernechtrot-Färbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (630-fache Vergrößerung) in den verschiedenen Tiergruppen zur morphometrischen Bestimmung der mittleren Wandstärke. Lamina elastica externa und interna sind grauschwarz gefärbt.

### 3.2.6.2.1 Mittlere Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien (20 - 50 $\mu\text{m}$ )

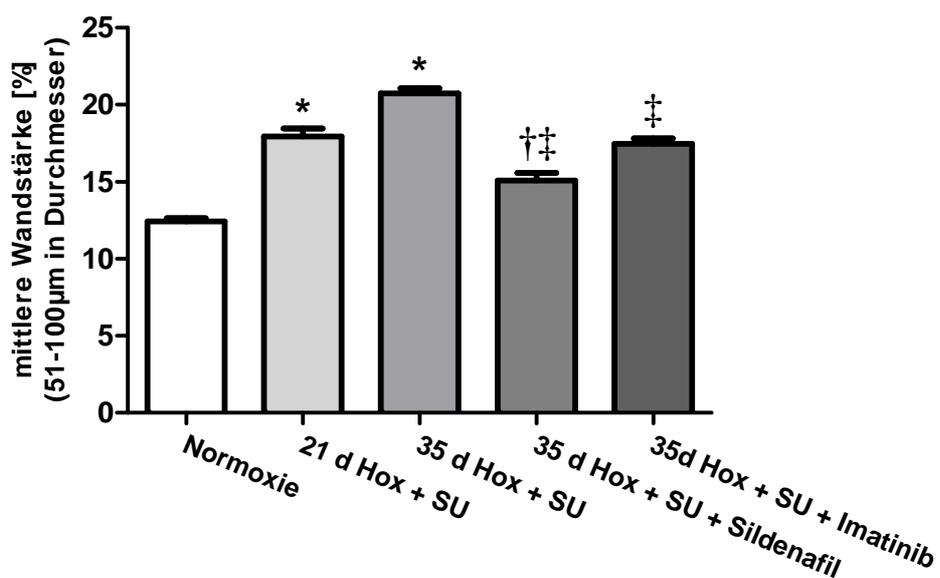
Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 20-50  $\mu\text{m}$  war in den Hypoxiegruppen in Kombination mit SU5416 stark erhöht. Am 21.Tag nach Hypoxieexposition und Injektion mit SU5416 betrug sie 25,84%  $\pm$  0,49 (Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers). Am 35.Tag nach Hypoxieexposition und Injektion mit SU5416 erhöhte sich die Wandstärke weiter auf 33,22%  $\pm$  0,56. Bei normoxischen Kontrollratten betrug die mittlere Wandstärke kleiner Pulmonalarterien lediglich 16,00%  $\pm$  0,17 (Abbildung 36). In beiden Therapiegruppen verringerte sich die mittlere Wandstärke auf MW 26,46%  $\pm$  0,63 in der Sildenafil-Gruppe und MW 25,67%  $\pm$  0,41 in der Imatinib-Gruppe und zeigte eine signifikante Reduktion gegenüber den Werten von mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppen (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke von peripheren Pulmonalarterien [(externer Durchmesser 20-50  $\mu\text{m}$ ), (\* $p$ <0,05 vs. Normoxie; †<0,05 vs. 35 d Hox+SU5416)].

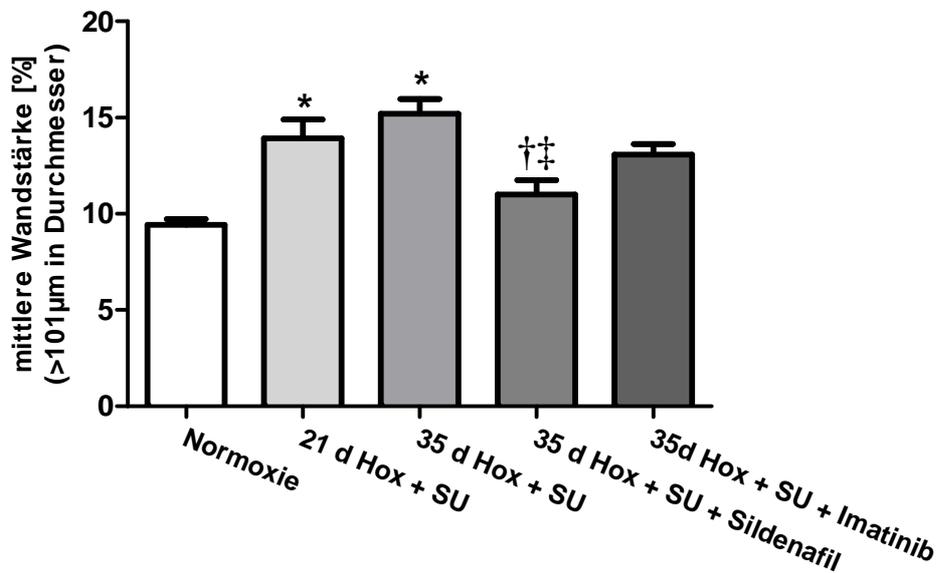
### 3.2.6.2.2 Mittlere Wandstärke in mittelgroßen und großen Pulmonalarterien

Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einer Größe zwischen 51 und 100  $\mu\text{m}$  wurde ebenfalls bestimmt. Ähnlich wie bei den kleinen Pulmonalarterien verdickte sich die Wand der Gefäße im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit SU5416. 21 Tage nach Hypoxieexposition in Kombination mit SU5416 betrug die mittlere Wandstärke mittelgroßer (51 – 100  $\mu\text{m}$ ) Pulmonalarterien  $17,95\% \pm 0,51$ , nach 35 Tagen  $20,73\% \pm 0,35$ . Sowohl unter der Therapie mit Sildenafil als auch mit Imatinib normalisierte sich die Wanddicke der Gefäße fast vollständig [(Sildenafil: MW  $15,08\% \pm 0,49$ ; Imatinib: MW  $17,47\% \pm 0,36$ ; normoxische Kontrolltiere: MW  $12,42\% \pm 0,22$ ), (Abbildung 37)].



**Abbildung 37:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke von mittelgroßen Pulmonalarterien (externer Durchmesser 51-100  $\mu\text{m}$ ) in den verschiedenen Gruppen (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21 d Hox+SU5416; ‡ $p < 0,05$  vs. 35 d Hox+SU5416).

Der Effekt war an großen Pulmonalarterien ( $> 101 \mu\text{m}$  Durchmesser) weniger deutlich zu beobachten, da sich die Vorgänge des Remodelings vor allem in den kleineren Pulmonalgefäßen abspielten (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Graphische Darstellung der mittleren Wandstärke großer Pulmonalarterien (externer Durchmesser  $> 101 \mu\text{m}$  (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21 d Hox+SU5416; ‡ $p < 0,05$  vs. 35 d Hox+SU5416)).

### 3.2.6.3 Okklusion peripherer Pulmonalarterien ( $< 21 \mu\text{m}$ )

Um die Veränderungen der Gefäßlumina von Pulmonalarterien im Verlauf der Erkrankung charakterisieren und quantifizieren zu können, wurden Lungenschnitte der verschiedenen Versuchsgruppen Elastica-kernechtrot gefärbt. Lamina elastica interna und externa färben sich grau-schwarz, die Kerne rot.

Die Gefäße wurden in die Kategorien offen, partiell verschlossen und verschlossen eingeteilt. Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten Gefäße mit einem externen Durchmesser  $< 21 \mu\text{m}$ . In der Abbildung sind partiell

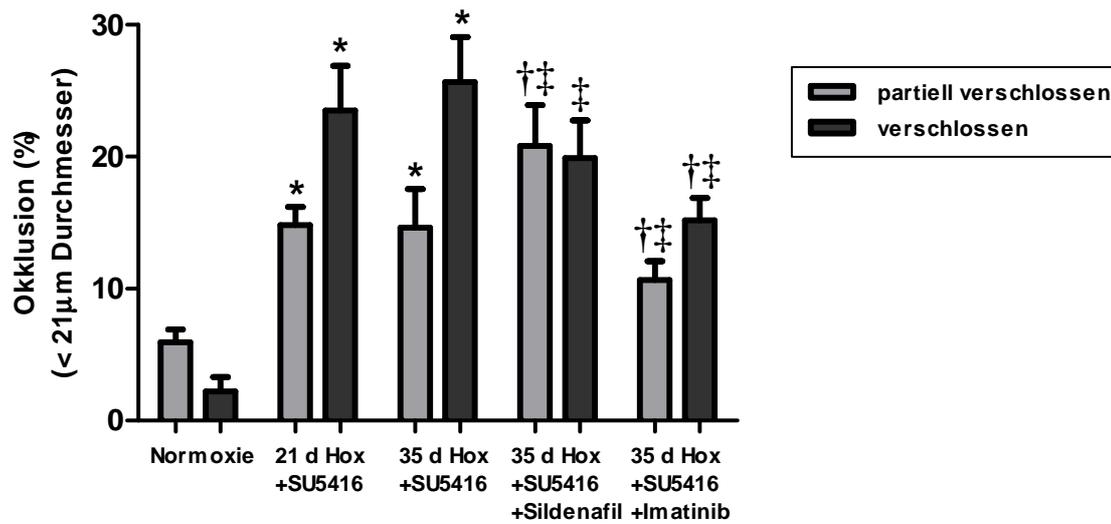
---

verschlossene und verschlossene Gefäße gezeigt. Die offenen Gefäße bilden die Differenz zu 100%.

Die Normoxie-Gruppe zeigte  $5,93\% \pm 0,99$  partiell verschlossene und  $2,22\% \pm 1,08$  verschlossene Gefäße.

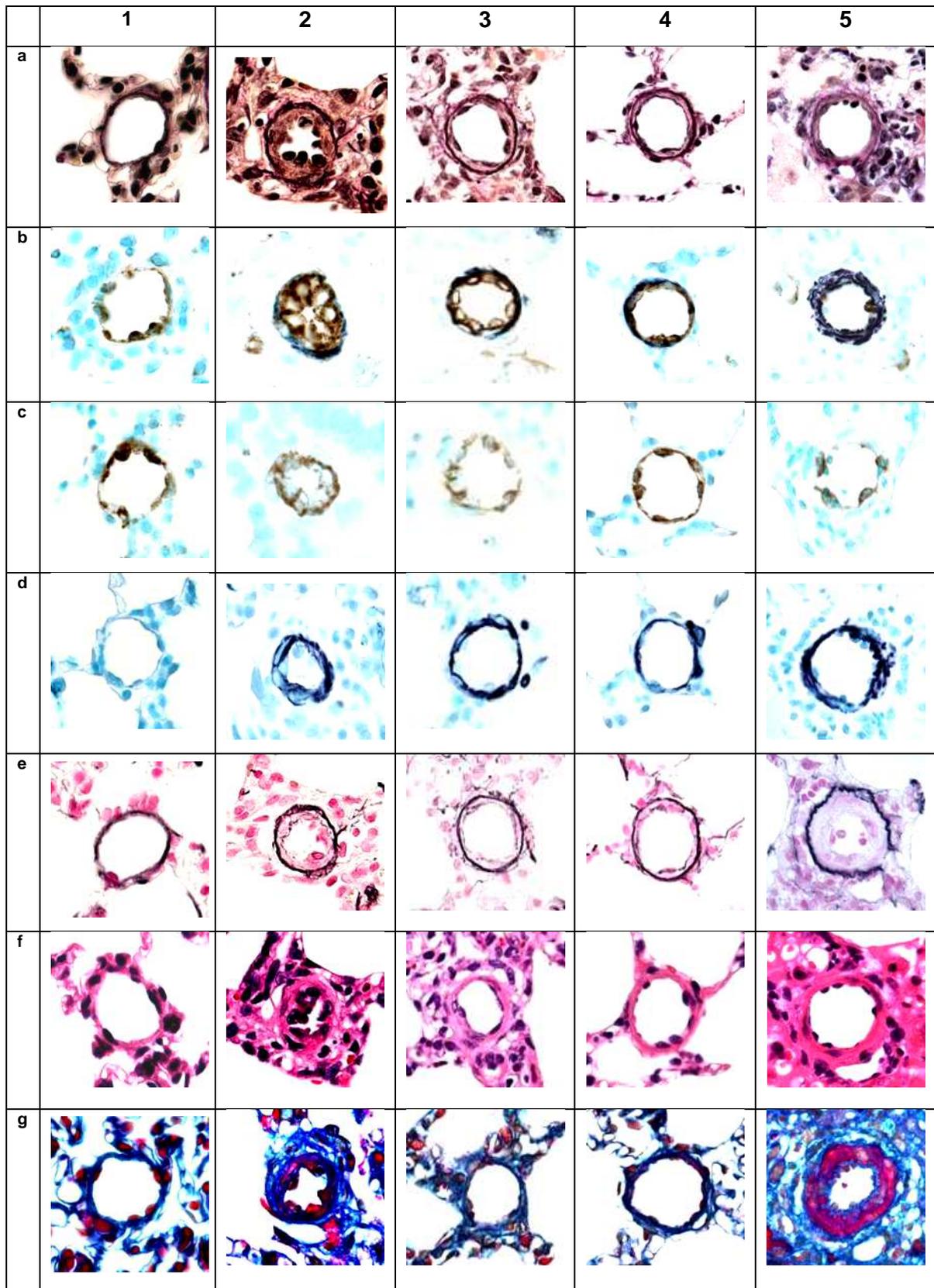
Der Anteil partiell verschlossener und verschlossener Gefäße nahm im Verlauf der Erkrankung stark zu. Die Tiere zeigten 21 Tage nach Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 einen wesentlich höheren Anteil partiell verschlossener (MW  $14,82\% \pm 1,36$ ) als auch verschlossener Gefäße (MW  $23,51\% \pm 3,37$ ). Ratten nach 35 Tagen Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 wiesen  $14,64\% \pm 2,91$  partiell verschlossene Gefäße auf. Der Anteil verschlossener Gefäße betrug  $25,67\% \pm 3,40$  (Abbildung 39).

Die Therapie mit Sildenafil zeigte sowohl bei partiell verschlossenen Gefäßen (MW  $20,81\% \pm 3,11$ ) als auch bei verschlossenen Gefäßen (MW  $19,91\% \pm 2,84$ ) eine signifikante Verringerung zu der 35 Tage Hypoxie und SU5416-Gruppe. Behandlung mit Imatinib führte in beiden Kategorien zu einer signifikanten Verbesserung (partiell verschlossene Gefäße: MW  $10,67\% \pm 1,41$ ; verschlossene Gefäße MW  $15,18\% \pm 1,71$ ) der Ergebnisse im Vergleich zu den 21 und 35 Tage Hypoxiegruppen mit Injektion von SU5416 (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils partiell verschlossener und verschlossener peripherer Pulmonalarterien in den verschiedenen Tiergruppen. Morphometrisch analysiert wurden pro Tier jeweils alle peripheren Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von  $< 21 \mu\text{m}$  (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21 d Hox+SU5416; ‡ $p < 0,05$  vs. 35 d Hox+SU5416).

### 3.2.6.4 Bestimmung des Verhältnisses von Neointima- zu Mediadicke als Maß für die Neointimabildung



**Abbildung 40 (a)-(g):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

1. Normoxische Ratte, 2. 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416; 3. 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Sildenafilgabe; 4. 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416 mit Imatinibgabe; 5. 35 d Monocrotalin-Ratte

Gefäßdurchmesser ca. 20 µm (630-fache Vergrößerung)

Färbungen: a) Elastica van Gieson; b) immunhistochemisch; c)  $\alpha$ -actin; d) vWF; e) Elastica-Kernechtrot; f) Hämatoxyllin-Eosin; g) Mallory-Trichrom

Die Abbildung 40 1 (a–g) zeigt, dass bei normoxischen Tieren keine Neointima gebildet wird. Um die Zunahme der Neointima im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodelings darstellen und quantifizieren zu können, wurden histologische Schnitte von den verschiedenen Versuchsgruppen Elastica van Gieson (Abbildung 40, a) gefärbt. Lamina elastica interna und externa färben sich schwarz, Zellkerne schwarzbraun, Cytoplasma hellbraun, elastische Fasern und Muskelgewebe gelb und Kollagenfasern rot. Eine deutliche Zunahme der Neointima im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit SU5416 ist zu erkennen (Abbildung 40, 2a). Im Vergleich dazu sieht man bei der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie eine deutliche Zunahme der Mediadicke, jedoch war keine Ausbildung einer Neointima zu beobachten (Abbildung 40, 5a). Nach zweiwöchiger Therapie mit Sildenafil (siehe Abbildung 40, 3a) bzw. Imatinib (Abbildung 40, 4a) erfolgte eine teilweise Regression der Neointimabildung.

Die immunhistochemische Doppelfärbung gegen endothelialen Faktor VIII und glattmuskuläres Alpha-actin wurde zur gemeinsamen Beurteilung von Endothel und Media verwendet (Abbildung 40, b). Die getrennte Darstellung beider Gefäßschichten zeigen die Abbildungen 40, c und d.

Die Färbung Alpha-actin (Abbildung 40, c) wurde zur Beurteilung der glatten Muskulatur bzw. zur Darstellung der Media verwendet.

Die Färbung von Willebrand Faktor (Abbildung 40, d) zur Beurteilung von Endothelzellen zeigt die deutliche Hypertrophie und Proliferation im Verlaufe der 35 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416. Diese

Endothelzellenveränderungen wurden im Laufe der Therapie mit Sildenafil bzw. Imatinib deutlich vermindert (Abbildung 40, 3d und 4d).

Die Elastica-Kernechtrot-Färbung ermöglicht die Anfärbung der elastischen Fasern. Lamina elastica externa und interna sind grauschwarz gefärbt, Zellkerne färben sich rot an (Abbildung 40, e).

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde als Übersichtsfärbung zur Beurteilung von krankhaften Veränderungen verwandt. Zellkerne färben sich blau, Zytoplasma rötlich-bläulich und Kollagen rot an (Abbildung 40, f).

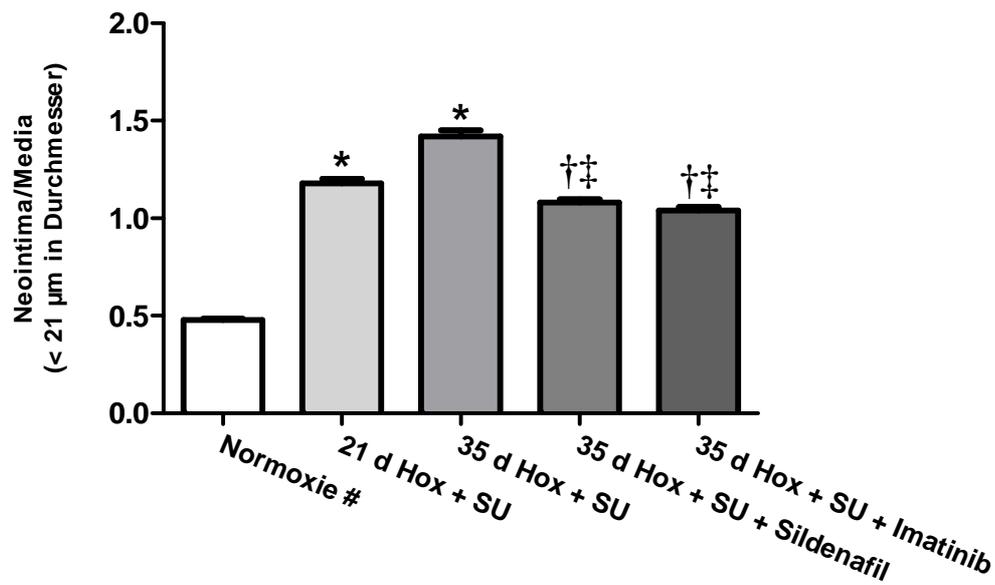
Die Mallory-Trichrom-Färbung zur Darstellung von Bindegewebskomponenten insbesondere Kollagen eingesetzt. Die Zellkerne färben sich rot, Zytoplasma violett, Interstitium hellbau und Kollagen dunkelblau (Abbildung 40, g). Eine deutliche Zunahme von Kollagen im Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit SU5416 ist zu erkennen. Diese Beobachtung wurde aber nicht weiter quantifiziert und soll somit nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

Die Lungenschnitte zu den Abbildungen 40 5 (a-g) wurden mir freundlicher Weise von Herrn Djuro Kosanovic zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.7.4.1 Verhältnis von Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 21 $\mu$ m)**

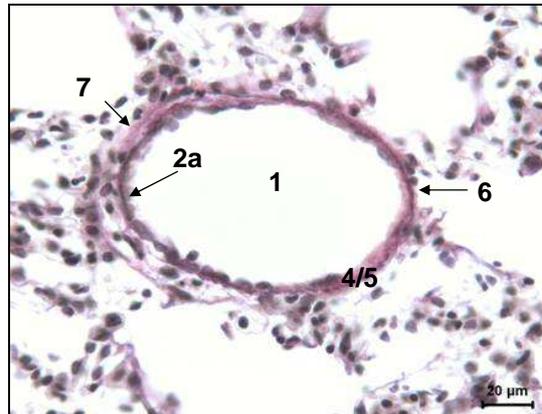
Das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Mediadicke betrug bei den normoxischen Tieren  $0,48 \pm 0,01$  (Abbildung 40, 1 a-g). Nach 21 Tagen Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 stieg das Verhältnis auf  $1,18 \pm 0,22$  an. Nach 35 Tagen Hypoxieexposition und Injektion von SU5416 nahm das Verhältnis im Verlauf der Erkrankung zu und erreichte Werte von  $1,42 \pm 0,03$  (Abbildung 41). Die Behandlung mit Sildenafil (MW  $1,08 \pm 0,18$ ) und mit Imatinib

(MW  $1,04 \pm 0,18$ ) führten zu einer signifikanten Verbesserung gegenüber den Werten der mit Methylcellulose behandelten Kontrollgruppe (Abbildung 41).

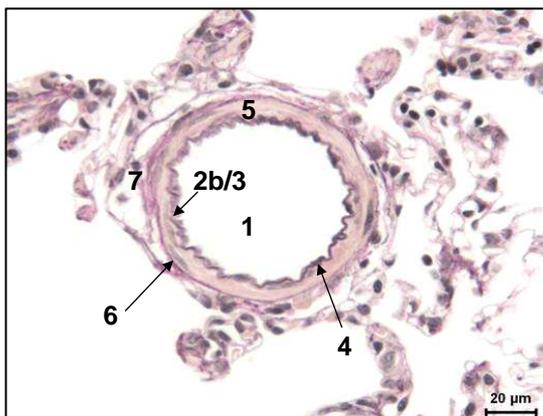


**Abbildung 41:** Darstellung der Neointima zu Media Ratio in den verschiedenen Gruppen mit einem externen Gefäßdurchmesser von  $< 21 \mu\text{m}$  (\* $p < 0,05$  vs. Normoxie; † $p < 0,05$  vs. 21 d Hox+SU5416; ‡ $p < 0,05$  vs. 35 d Hox+SU5416). #Anmerkung: Bei den Normoxie-Tieren handelt es sich nicht um das Verhältnis von Neointima/Media, sondern um das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Media, da bei gesunden Tieren keine Neointima existiert (Abbildung 40, 1a).

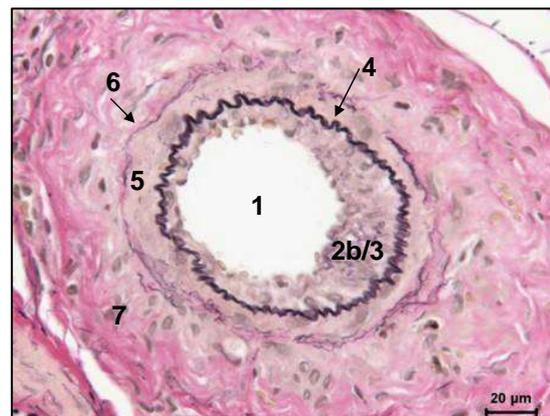
### 3.2.6.4.2 Verhältnis der Neointima- zu Mediadicke in peripheren Pulmonalarterien (< 50 µm) bei hypoxischen Ratten, hypoxischen Ratten in Kombination mit SU5416 und humanem Lungengewebe



a)



b)



c)

**Abbildung 42 (a)-(c):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie einer Ratte

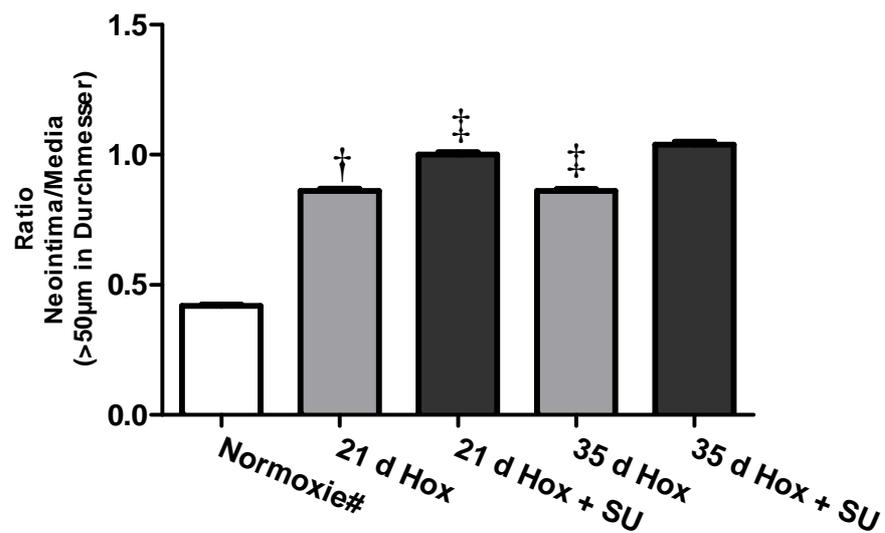
a) Normoxische Ratte, b) 35 d Hypoxie ; c) 35 d Hypoxie mit Injektion von SU5416

Färbung: van Gieson (400-fache Vergrößerung)

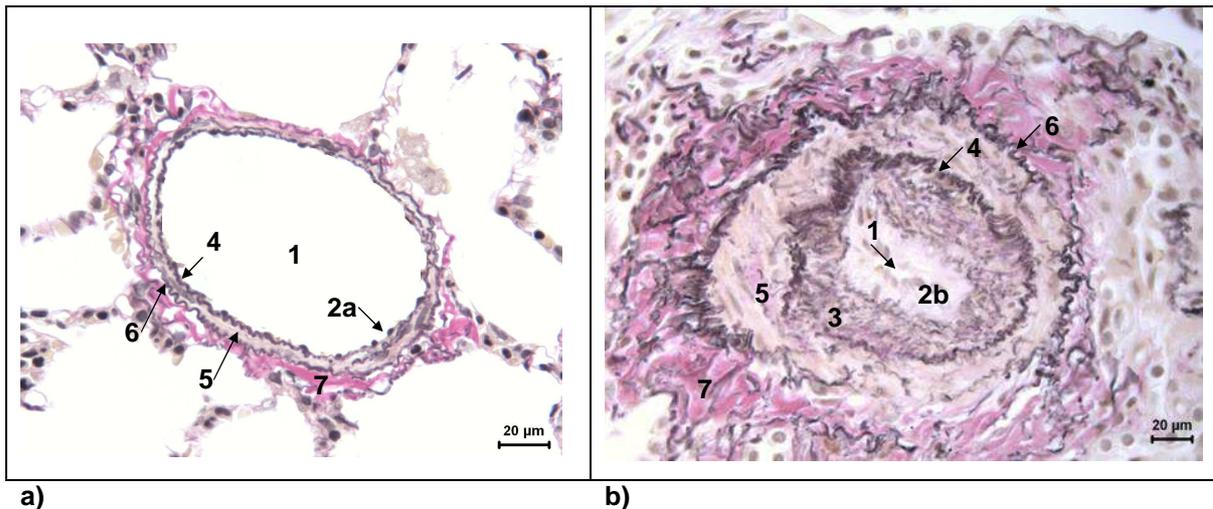
1= Lumen; 2a= Endothel; 2b= hypertrophiertes Endothel; 3= Neointima; 4= Membrana elastica interna; 5= Media; 6= Membrana elastica externa; 7= Adventitia

Es wurden sämtliche intrapulmonale Gefäße ausgezählt. In die Auswertung wurden Gefäße unter  $< 50 \mu\text{m}$  externen Gefäßdurchmesser einbezogen. Die Daten von humanem Lungengewebe (Gesunde Kontrollen  $n= 5$  und PPH-Lungen  $n= 5$ ) wurden freundlicherweise von Frau Ewa Bieniek zur Verfügung gestellt.

Das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Mediadicke betrug bei den normoxischen Tieren  $0,42 \pm 0,01$  (Abbildung 43,1a). Nach 21 Tagen Hypoxieexposition stieg das Verhältnis auf  $0,86 \pm 0,02$  an. Die 21 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe zeigte einen Wert von  $1,00 \pm 0,02$ . Bei den 35 Tage Hypoxie lag das Verhältnis bei  $0,86 \pm 0,02$  und bei den 35 d Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe bei  $1,04 \pm 0,02$ .



**Abbildung 43:** Graphische Darstellung der Neointima zu Media Ratio bei normoxischen Ratten, 21 d & 35 d Hypoxie Ratten; 21 d & 35 d Hypoxie und SU5416-Injektion Ratten; mit einem externen Gefäßdurchmesser von  $< 50 \mu\text{m}$ . ( $\dagger p < 0,05$  vs. 21 d Hox+SU5416;  $\ddagger < 0,05$  vs. 35 d Hox+SU5416). **#Anmerkung:** Bei Normoxie-Tieren handelt es sich nicht um das Verhältnis von Neointima zu Media, sondern um das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Media, da bei gesunden Tieren keine Neointima existiert (Abbildung 40, 1a).



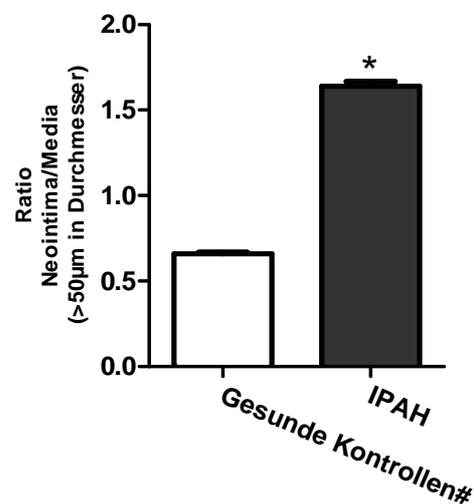
a)

b)

**Abbildung 44 (a) - (b):** Histologischer Schnitt durch eine Lungenarterie eines Menschen

a) Gesunde Kontrolle, b) IPAH-Lungengewebe Färbung: van Gieson (400-fache Vergrößerung)  
 1= Lumen; 2a= Endothel; 2b= hyperthrophiertes Endothel; 3= Neointima; 4= Membrana elastica interna; 5= Media; 6= Membrana elastica externa; 7= Adventitia

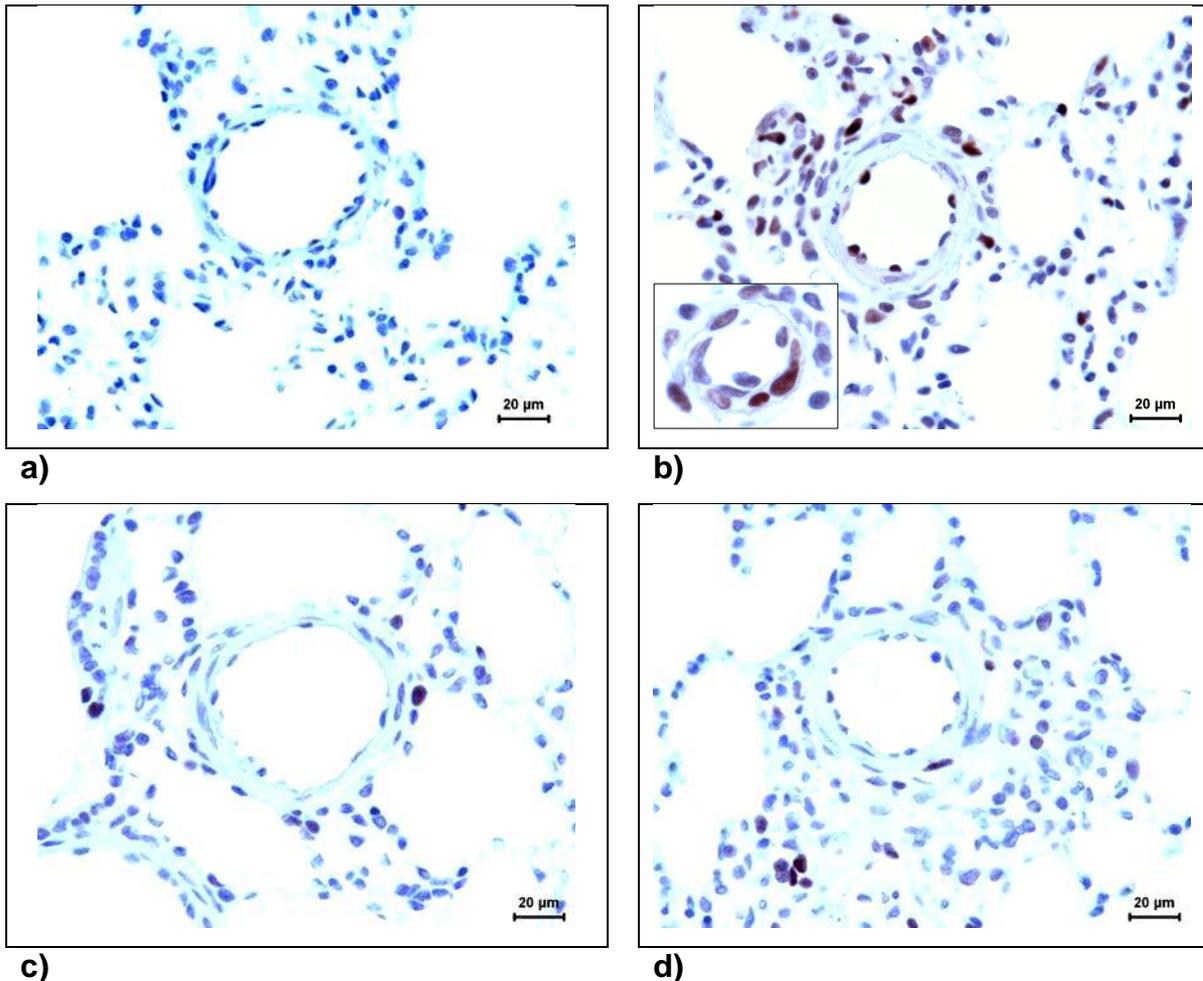
Das Verhältnis betrug bei gesunden Menschen im Mittel  $0,66 \pm 0,02$ . Dem gegenüber lag das Verhältnis bei Patienten mit IPAH bei  $1,64 \pm 0,06$ .



**Abbildung 45:** Graphische Darstellung der Neointima zu Media Ratio von humanen Lungengefäßen bei gesunden Menschen und bei Patienten mit Idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie (IPAH) mit einem externen Gefäßdurchmesser von  $< 50 \mu\text{m}$  (\* $p < 0,05$  gesunder Mensch). **#Anmerkung:** Bei gesunden Menschen handelt es sich nicht um das Verhältnis von Neointima zu Media, sondern um das Verhältnis von Intima mit Endothel zu Media, da bei gesunden Menschen keine Neointima existiert (Abbildung 44, a).

### 3.2.6.5 Proliferationsmarker-Färbung

Die für PCNA (Proliferating cellular nuclear antigen) positiven Zellen in den verschiedenen Gruppen wurden rot-braun angefärbt.



**Abbildung 46 (a) – (d):** Färbung mit PCNA-Färbung von a) normoxischen, b) 35 d Hypoxie und Injektion von SU5416-Tieren, kleine Abbildung Gefäßgröße ca. 20 µm (630-fache Vergrößerung). Eine deutliche Zunahme der PCNA positiven Zellen vor allem im Bereich der Neointima und Endotheliums im Verlauf der Erkrankung ist eindeutig zu erkennen. c) 35 d Hypoxie und Injektion von SU5416-Tieren mit Behandlung Sildenafil d) 35 d Hypoxie und Injektion von SU5416-Tieren mit Behandlung Imatinib. Eine deutliche Abnahme der PCNA positiven Zellen vor allem im Bereich der Neointima und Endotheliums im Verlauf der Therapie ist eindeutig zu erkennen (alle 400-fache Vergrößerung)

## 4. Diskussion

### 4.1 Wahl des Tiermodells

Um die bestehenden Erkenntnisse über die Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie beim Menschen und deren Therapiestrategien zu erweitern, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, die die pathophysiologischen und klinischen Symptome der PH nachahmen. Tiermodelle sind dahingehend begrenzt, da sie lediglich die Veränderungen durch die IPAH imitieren können. Bis heute besteht jedoch kein Tiermodell, welches umfassend die pathologischen Veränderungen der PH beim Menschen widerspiegelt.

Chronische Hypoxie gilt als ein anerkanntes Modell zur Ausbildung der PH (Rabinovitch *et al.* 1979, Meyrick & Reid 1983, Weissmann *et al.* 2003, Dumitrascu *et al.* 2006).

Der hypoxische Stimulus führt bei den meisten Säugern zur pulmonalen Hypertonie. Ausnahmen bilden wie z.B. Lama, tibetische Schneeschwein, Pfeifhase und Yak (Durmowicz *et al.* 1993, Rhodes 2005). Bei diesen Tieren findet kein pulmonal-arterieller Gefäßumbau statt. Ihr Organismus ist an den Lebensraum in großen Höhen adaptiert. Das Ausmaß der Veränderungen wird von der jeweiligen Spezies, dem Alter (bzw. Entwicklungsstand) und dem Geschlecht der Tiere beeinflusst (Weissmann *et al.* 2006b). Anand *et al.* 1986 konnten durch eine gezielte Kreuzung von Yaks mit nicht-adaptierten Rindern einen autosomal-dominanten Vererbungsgang zeigen. Das Phänomen wird für genetische Untersuchungen verwendet, um weitere Erkenntnisse zur Vermeidung der PH zu erhalten, und diese für den Menschen positiv einsetzen zu können. Interessanterweise haben sich die Bewohner der Anden und Tibets an ihren Lebensraum in großen Höhen über viele Jahrtausende angepasst, ohne Symptome einer PH auszubilden (Moore 2001, Tucker & Rhodes 2001).

Die physiologischen Adaptationsprozesse und die daraus sich entwickelten Umbauprozesse in den Lungengefäßen sind bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Rattenmodell gut darstellbar. Die Kombination von Hypoxie und SU5416 bewirkt eine Verschlimmerung der Symptome. Die Ursache hierfür liegt vorwiegend im Vorkommen von proliferierenden Endothelzellen, die zum Verschuß der kleinen Lungenarterien führen (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001). Proliferationen haben eine ausgeprägte Neointimabildung zur Folge, die ebenfalls bei der IPAH des Menschen beobachtet wird (Nicod 2007, Rabinovitch 2008). Im Monocrotalin-Modell fehlt diese deutliche Neointimabildung. In Ausnahmefällen kann eine moderate intimale Schwellung und Proliferation beobachtet werden, jedoch lediglich bei Ratten, bei denen der RVSP systemische Werte annimmt (Tanaka *et al.* 1996; Persönliche Mitteilung von Dr. Eva Dony und Djuro Kosanovic, Abbildung 40, 5 a-g). Das Modell der Hypoxie-induzierten PH in Kombination mit SU5416 bei der Ratte bietet somit einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Erforschungen über Entstehung sowie von Therapiestrategien der PH des Menschen.

Im Rattenmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie besteht eine Expression bestimmter Wachstumsfaktoren, wie z.B. Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Vaskular-endothelial-growth-factor (VEGF) und seinen Rezeptoren sowie verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z.B. Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 8 (IL-8). Hierbei sind Gemeinsamkeiten zur IPAH des Menschen erkennbar (Humbert *et al.* 1998; Budhiraja *et al.* 2004; Stenmark *et al.* 2006).

Die Rolle von VEGF bei der pulmonalen Hypertonie des Menschen bleibt weiterhin ungeklärt. VEGF ist in Endothelzellen der Lungengefäße lokalisiert. Bei Patienten der IPAH ist VEGF in plexiformen Läsionen hochreguliert. Die Bindung an den VEGFR-2 bewirkt Zellproliferation, Schutz vor Apoptose, Zellmigration und gesteigerte Zellpermeabilität. Da die Expression von VEGF während hypoxischen Gegebenheiten hochreguliert ist, ist dieses Modell bei alleiniger Hypoxie als auch in Kombination mit SU5416, besonders geeignet, um weitere Aufschlüsse über die Funktion von VEGF zu erhalten (Christou *et al.* 1998, Voelkel & Tuder 2000, Voelkel *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu ist die Expression von VEGF im Monocrotalin-Modell der Ratte vermindert (Partovian *et al.* 1998).

Im Rattenmodell besteht bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht die Möglichkeit, die Pathomechanismen durch speziell genveränderte Tiere zu charakterisieren, wie dies bei Mäusen der Fall ist.

Im Modell der Hypoxie-induzierten PH der Ratte in Kombination mit SU5416, im Modell der Hypoxie-induzierten PH der Maus und bei Patienten der IPAH konnte ein weiteres Schlüsselprotein identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Faktor H ähnliches Protein (Fhl-1), das zur Entstehung der PH beiträgt (Kwapiszewska *et al.* 2008).

Die hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozesse gleichen denen, die bei Patienten mit obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen oder die durch Adaptation in höheren Lagen vorkommen (Carbone *et al.* 2005). Die Dana Point-Klassifikation von 2008 grenzt diese Form der pulmonalen Hypertonie von anderen Formen der pulmonalen Hypertonie ab. Diese Art der PH entsteht durch Erkrankungen des respiratorischen Systems entweder mit oder ohne Entwicklung einer Hypoxämie. Als Auslöser können Höhengaufenthalte, COPD (Chronic obstructive pulmonary disease), Schlafapnoesyndrom oder pulmonale Entwicklungsanomalien angesehen werden.

Unabhängig von der Krankheitsätiologie zeigen sich bei allen Patienten strukturelle Veränderungen an den pulmonal-arteriellen Gefäßen (van Suylen *et al.* 1998). Dieser Befund zeigt, dass das vaskuläre Remodeling einen elementaren Anteil der PAH darstellt.

Die PH des Menschen wird je nach Schweregrad ihrer Erkrankung in NYHA-Klassen (Klassifizierung Tabelle 2) eingeteilt. Im Vergleich zwischen Patienten und der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Rattenmodell besteht nach 35 Tagen Hypoxieexposition eine PAH der Klasse NYHA II. Die Tiere zeigen eine leichte bis moderate Limitierung der körperlichen Aktivität bei geringgradig gestörtem Allgemeinbefinden. Ratten, die zusätzlich zur Hypoxie eine Injektion mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 erhalten, können in die Klasse NYHA III eingeordnet werden, da sie sowohl eine mittelgradige Limitierung der

körperlichen Aktivität als auch ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden aufzeigen.

**Tabelle 2: New York Heart Association (NYHA) Klassifizierung der PH des Menschen (Barst *et al.* 2004).**

|  |
|--|
| <b>Klasse I</b>  |
| keine Limitierung der körperlichen Aktivität<br>normale körperliche Bewegung verursacht keine Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkopen   |
| <b>Klasse II</b>   |
| leichte Limitierung der körperlichen Aktivität<br>in Ruhe keine Beschwerden. Normale körperliche Bewegung verursacht Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerzen oder drohende Synkope   |
| <b>Klasse III</b>  |
| Deutliche Limitierung der körperlichen Aktivität<br>in Ruhe keine Beschwerden. Leichte Bewegung verursacht Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkope   |
| <b>Klasse IV</b>   |
| Unfähigkeit, jeglicher körperlicher Aktivität ohne Symptomatik auszuführen. Diese Patienten manifestieren Anzeichen von Rechtsherzversagen.<br>Dyspnoe und/oder Ermüdung können sogar in Ruhe vorhanden sein. Beschwerden verstärkt bei jeglicher körperlicher Aktivität |

Ausschlaggebend für den Verlauf des Versuches und die spätere Aussagekraft der Resultate ist der Zeitpunkt des Therapiebeginns innerhalb der beiden Hypoxie-Modelle. Man unterscheidet hierbei einen präventiven und einen kurativen Ansatz. Beim präventiven Ansatz beginnt die Therapie mit der „Schädigung“ (Versetzung in Hypoxie bzw. Hypoxie mit Injektion von SU5416). In der vorliegenden Studie beginnt die therapeutische Intervention 21 Tage nach Hypoxie und Hypoxie mit Injektion von SU5416. Zu diesem Zeitpunkt sind in beiden Modellen eine pulmonale Hypertonie bzw. eine schwere PH sowie ausgeprägte Gefäßveränderungen manifest. Es wird damit ein kurativer Ansatz verfolgt, der am ehesten die Situation beim Menschen widerspiegelt. Die Therapie

beginnt hier ebenfalls nach Auftreten erster Symptome und besitzt somit eine gute Vergleichbarkeit zum humanen Patienten.

Der Phosphodiesterase-Inhibitor Sildenafil und der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib wurden als Therapeutikum bei pulmonaler Hypertonie verwendet. Sildenafil ist für die Therapie der PH des Menschen zugelassen und konnte in klinischen Studien bei Patienten mit PH sowie in verschiedenen Tiermodellen der PH gute Erfolge erzielen (Michelakis *et al.* 2002; Ghofrani *et al.* 2002; Rosenkranz *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2001; Sebkhi *et al.* 2003; Schermuly *et al.* 2004). Imatinib besitzt die therapeutische Zulassung bei myeloischen Leukämie (CML) und bei nichtresezierbaren gastrointestinalen Stromatumoren (GIST).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt besitzt die Substanz keine Zulassung zur Therapie der pulmonalen Hypertonie des Menschen. Die Gruppe der Tyrosinkinasehemmer werden häufig in der Tumorthherapie eingesetzt, weil es hier, wie bei der pulmonalen Hypertonie, zu einer Dysregulation der Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) mit nachgeschalteten Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) kommt. Die Folge der Hemmung der Signaltransduktionswege sind die Reduktion der Proliferation und die Zunahme der Apoptose. Dieser Wirkmechanismus kann vor allem gegen die pulmonalvaskulären Proliferationsprozesse der PH angewendet werden. Imatinib überzeugte mit beeindruckenden Ergebnissen sowohl in klinischen Studien als auch in Tiermodellen der PH (Ghofrani *et al.* 2005; Schermuly *et al.* 2005).

Beide Substanzen besitzen einen geringen Einfluß auf den systemisch-arteriellen Druck. Die Dosis von 50 mg/kg/d Sildenafil und 100 mg/kg/d Imatinib orientierten sich an bekannten Daten von Ratte und Maus (Zhao *et al.* 2001; Sebkhi *et al.* 2003; Schermuly *et al.* 2005). Die Wirkstoffe wurden über eine Fütterungssonde verabreicht. Der Vorteil besteht darin, dass es eine bessere Kontrolle über die tatsächlich aufgenommene Menge, im Gegensatz zur Verabreichung über das Trinkwasser, besteht.

Beide Wirkstoffe stellen vor allem in Hinblick auf deren Einfluß auf das vaskuläre Remodeling einen guten therapeutischen Ansatz dar, was bei zukünftigen Therapiestrategien vorrangig Berücksichtigung finden sollte.

## **4.2 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf Hämodynamik und Rechtsherzhypertrophie**

Es ist allgemein bekannt, dass chronische Hypoxie über eine ausgelöste pulmonale Vasokonstriktion zu einem erhöhten rechtsventrikulärem Druck sowie zu einer Rechtsherzhypertrophie führt (Heath *et al.* 1973; Meyrick & Reid 1983; Meyrick 2001). Der erhöhte Druck in der rechten Herzkammer resultiert aus den proliferativen Veränderungen in den Pulmonalarterien, die zu einem Lumenverlust führen und somit die Druckbelastung in der pulmonalen Strombahn vergrößert.

Die Rechtsherzhypertrophie ist eine physiologische Reaktion auf den anhaltenden erhöhten Perfusionswiderstand in der Lunge. Die Herzratio, die das Gewichtsverhältnis zwischen rechten Ventrikel und linken Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) aufzeigt, gilt als Index für die Hypertrophie des rechten Ventrikels. Für Patienten der PAH ist diese ein wichtiger prognostischer Faktor (Bristow *et al.* 1998).

Hypoxie verursacht bei Ratten eine Verdopplung des RVSP und des Rechtsherzgewichtes (Rabinovitch *et al.* 1979) mit begleitender Rechtsherzinsuffizienz (Ressler *et al.* 1974). Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich dazu führt Hypoxie im Mausmodell lediglich zu einer milden pulmonalen Hypertonie.

Im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit SU5416 konnten die Auswirkungen auf die Rechtsherzhypertrophie und den RVSP noch deutlicher verstärkt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Placebogruppen jeweils 21 bzw. 35 Tage und die Therapiegruppen 35 Tage unter hypoxischen Gegebenheiten gehalten und erhielten alle eine einmalige Injektion von 20 mg/kg SU5416 s.c. gelöst in DMSO.

Die Tiere zeigten nach 35 Tagen Hypoxie und Injektion mit SU5416 einen RVSP von 84 mmHg und eine Ratio von 0,52. In einer Studie von Oka *et al.* 2007 wurden nach drei Wochen Hypoxie mit SU5416 und zwei Wochen Normoxie ein

RVSP von 95 mmHg und eine Ratio von 0,70 erreicht. Taraseviciene-Stewart *et al.* zeigten in Studien der Jahre 2001, 2005 und 2006 einen RVSP von 68 mmHg und eine Ratio von 0,73 nach drei Wochen Hypoxie und Injektion von SU5416 und anschließender zweiwöchiger Normoxie.

In allen Studien wurden, wie auch hier, Sprague-Dawley Ratten verwendet. In der uns zugänglichen Literatur erhielten die Tiere meist eine einmalige s.c. Injektion mit SU5416 gelöst in Carboxymethylcellulose. Dies könnte gegebenenfalls einen Einfluß auf die Wirkungsweise der Substanz SU5416 ausgeübt haben. Die Versuchsdauer erstreckte sich in den meisten Fällen über drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen. Zusätzlich wurden die Tiere nach drei Wochen Hypoxie für zwei Wochen in Normoxie verbracht. Es erfolgte eine Verschlechterung des Krankheitsprozesses. Dieser Aussage widerspricht die Tatsache, dass normalerweise die Rückführung hypoxischer Tiere in normoxische Gegebenheiten eine teilweise Rückbildung bzw. Verbesserung sowohl der hämodynamischen als auch der histologischen Parameter bewirkt (Ressler *et al.* 1974). Dieses Phänomen wird nur für dieses Modell in Kombination mit SU5416 als eine Besonderheit beschrieben (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001, Taraseviciene-Stewart *et al.* 2005). In zukünftigen Untersuchungen könnte man diesen Versuchsablauf wählen, um diesbezüglich eigene Resultate zu erhalten.

In einer Untersuchung von Moreno-Vinasco *et al.* 2008 mit diesem Modell waren die Ratten nach Injektion mit SU5416 für 3,5 Wochen in Hypoxie untergebracht. Lediglich in dieser Studie wurden die Tiere nach Hypoxie nicht in Normoxie gebracht. Anstelle von Sprague-Dawley Ratten wurde mit Dahl salzsensitive Ratten experimentiert. Diese Versuchstiere bilden eine pulmonale Hypertonie aufgrund eines zu hohen Salzgehaltes in ihrem Futter aus. Dieser Aspekt könnte wiederum dazu geführt haben, dass die erzielten Resultate Unterschiede zu denen der vorliegenden Arbeit und den anderen genannten Studien aufzeigen.

In dieser Arbeit wurden die Ratten unter einer normobaren Hypoxie gehalten. In den Versuchsstudien der Literatur bestand eine hypobare Hypoxie. Dies könnte

ein weiterer möglicher Grund sein, für die unterschiedlichen Resultate des RVSP und der Ratio in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den anderen Studien.

Bei der Betrachtung der Hämodynamikerggebnisse (RVSP und Ratio) und der histologischen Auswertung beider Therapiegruppen (35 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416 und Sildenafil bzw. Imatinib) ist auffällig, dass diese nicht miteinander korrelieren. Die therapeutischen Verbesserungen auf das Gefäßremodeling konnten sich nicht auf eine Verringerung von Ratio und RVSP auswirken. Sildenafil erreichte zwar eine signifikante Druckminderung im rechten Ventrikel, doch auch dieser Befund hatte keine positive Auswirkung auf die Herzratio. Beide Substanzen konnten den Krankheitsverlauf zum Stillstand bringen, aber nicht verbessern. Ein Vergleich der Daten der 21 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416 Gruppe mit den Therapiegruppen zeigten eine fast identische Hämodynamik.

Vorliegende Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Rechtsherzhypertrophie durch den Einfluß einer anhaltenden Hypoxämie auf den rechten Ventrikel hervorgehen kann. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es für diese Hypothese noch keine Beweise.

In der Untersuchung von Cihak *et al.* 1992 wurden unterschiedliche Antworten des rechten und linken Ventrikels auf die experimentelle Hypertrophie gefunden. Die Unterschiede beinhalten funktionelle sowie strukturelle Eigenschaften.

In weiterführenden Studien auf molekularbiologischer und histologischer Ebene an Myozyten sollte der Einfluß chronischer Hypoxie mit und ohne den VEGFR-2-Inhibitor SU5416 auf beiden Ventrikel untersucht werden. Weiterhin lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die beiden Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib einen antiproliferativen und vasodilatativen Effekt ausschließlich auf die Lungengefäße besitzen. Tatsache ist aber, dass PDE5 in hypertrophierten Kardiomyozyten hochreguliert ist (Nagendran *et al.* 2007) und Sildenafil innerhalb der Modulation von Kardiomyozyten eine Bedeutung zukommt (Zhang *et al.* 2008). Imatinib zeigte in verschiedenen Tiermodellen der PH, dass die

Verbesserung des Gefäßremodelings sich auch in einer Verringerung des RVSP und der Ratio widerspiegelte (Schermyly *et al.* 2005). Hier besteht die Möglichkeit die Therapie mit Sildenafil und Imatinib gleich am ersten Tag mit Verbringung der Tiere in Hypoxie und Injektion von SU5416 zu beginnen. Dieser präventive Therapieansatz würde zusätzlich einen Aufschluss darüber geben, inwieweit die Signalwege der jeweiligen Wirkstoffe in den entstehenden Krankheitsprozess eingreifen können und welche Rolle den Wachstumsfaktoren hierbei zukommt.

Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der Raf, ERK, PDGFR- $\beta$  und VEGFR-1-3 hemmt, wurde als Therapeutikum in der Studie von Moreno-Vinasco *et al.* 2008 eingesetzt. Interessanterweise überzeugte Sorafenib in beiden Placebogruppen (3,5 Wochen Hypoxie und 3,5 Wochen Hypoxie in Kombination mit SU5416) und konnte eine deutliche Regression der Rechtsherzhypertrophie und korrelierend dazu der RVSP bewirken. In dieser Studie wurde ein präventiver Therapieansatz, im Gegensatz zu anderen Studien und der vorliegenden Untersuchung, die einen kurativen Therapieansatz verfolgten, gewählt.

Im Vergleich dazu zeigten die Ratten, 35 Tagen Hypoxie ohne SU5416, nur einen RVSP von etwa 71 mmHg und eine Ratio von 0,48. Bei Betrachtung der Ergebnisse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ohne SU5416 korrelieren sowohl RVSP, Ratio und die histologischen Ergebnisse. Die Therapieansätze mit Sildenafil und Imatinib konnten das weitere Fortschreiten der pulmonalen Hypertonie durch eine deutliche Regression der Druckerhöhung im rechten Ventrikel verhindern. Diese Daten zeigten einen positiven Zusammenhang zur deutlichen Abnahme der Rechtsherzhypertrophie, der Verringerung des Muskularisierungsgrades, der Wandstärke, der Okklusion sowie zur Neointima der Pulmonalarterien. In der Literatur zeigten Sebkhil *et al.* 2003 ebenfalls eine Verbesserung des RVSP nach Sildenafiltherapie im Hypoxie-Modell der Ratte. Zhao *et al.* 2001 wiesen im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH eine deutliche Verringerung des RVSP und der Ratio durch Sildenafil nach. Darüber hinaus konnte in weiteren chronisch-hypoxischen Tiermodellen eine Reduktion der Herzratio nach Therapie mit Sildenafil erreicht werden (Weissmann *et al.* 2007). Die hier gewonnenen Resultate decken sich mit der Therapie von Imatinib im Maus-Modell der Hypoxie-induzierten PH. Diese zeigte nach 35 Tagen

---

Hypoxie ebenso eine starke Regression des RVSP und der Ratio. Die Therapie erfolgte wie in dieser Arbeit vom 21.Tag bis zum 35.Tag mit einer Dosierung von 100mg/kg/d (Schermyly *et al.* 2005).

### **4.3 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf Neointima und Lumen pulmonaler Gefäße**

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse lassen erkennen, dass es sich bei der PH um eine eher vasoproliferative als vasokonstriktive Erkrankung handelt. Neue erfolgreiche Therapiestrategien sollten sich vorwiegend auf progressive Umbauprozesse in der Lunge sowie deren Revertierung fokussieren.

Die Funktionen des Lungenendothels bestehen hauptsächlich in der Erhaltung des Gefäßtonus, der Produktion von Wachstumsfaktoren, der Homöostase, der Signaltransduktion und in einer Barrierefunktion. Bei Patienten mit PAH wird angenommen, dass eine initiale Schädigung des Endothels durch Hypoxie, vermehrter Scherkräfte oder Entzündungen in Verbindung mit einer genetischen Disposition Gefäßveränderungen auslösen können (Nicod 2007). Der Stimulus, der zu Imbalancen zwischen Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1, Serotonin, Thromboxan) und Vasodilatoren (z.B. NO, Prostazyklin) führt, gilt weiterhin als unbekannt (Budhiraja *et al.* 2004, Rabinovitch 2008).

Eine morphologische Besonderheit der IPAH ist die plexogene Arteriopathie. Dabei handelt es sich um Läsionen, die überwiegend aus rasch proliferierenden Endothelzellen bestehen, die endoluminal multiple, gewundene Kanäle ausbilden. Sie erinnern fein geweblich an Glomeruli der Niere. Die Veränderungen werden als plexiforme Läsionen bezeichnet und sind Ergebnis eines frustranen Neovaskularisierungsversuches. Sie bestehen bei der IPAH überwiegend aus monoklonalen Endothelzellen. Bei anderen Formen der PH sind polyklonale Endothelzellen zu finden. Bis heute gibt es kein gängiges Tiermodell, in dem

diese Gefäßveränderungen hervorgerufen werden konnten (Stenmark *et al.* 2009). In zwei Publikationen werden überraschenderweise Gefäßveränderungen im Modell der chronischen Hypoxie in Kombination mit SU5416 der Ratte als plexiforme Läsionen diskutiert (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2005, Moreno-Vinasco *et al.* 2008).

Die gefundenen Gefäßveränderungen unserer Untersuchungen lassen sich keinesfalls als plexiforme Läsionen deuten. Man kann hier von einer Hypertrophie und Endothelzellproliferation, die zu Neointimabildung führt ausgehen.

Die Neointima bezeichnet eine aus Zellen und extrazellulärer Matrix bestehenden Schicht, die sich zwischen Endothel und Lamina elastica interna bildet. Dieses Phänomen stellt ein wesentliches Charakteristikum im Laufe der Entwicklung der PAH dar (Humbert *et al.* 2004a, Nicod *et al.* 2007).

Denkbar ist, dass die Dysfunktion des Endothels eine Aktivierung glatter Muskelzellen zur Migration, eine Ablagerung von extrazellulären Matrix sowie eine Endothelzellproliferation zur Folge haben könnte (Tuder *et al.* 2007).

Das Verhältnis von Neointima- zu Mediadicke betrug in der 35 Tage Hypoxie mit SU5416-Gruppe  $1,42 \pm 0,03$  im Vergleich mit der 35 Tage Hypoxie Gruppe  $1,01 \pm 0,03$ . Deutlich war eine weitaus höhere Zunahme der Neointimadicke infolge der Kombination von Hypoxie und SU5416 zu erkennen (Abbildung 43). In den Abbildungen 26 und 40 konnte man mit Hilfe von verschiedenen Färbemethoden eine markante Trennung von Media und Neointima erkennen.

In Untersuchungen an humanen Lungen konnte eine beinahe dreifache Erhöhung der Neointima- zu Mediadicke zwischen gesunden und IPAHLungen gezeigt werden (Abbildung 45). Diese Art der Auswertung ist nicht nur im Tiermodell anwendbar, sondern auch zusätzlich eine relevante Methode für die Beurteilung von Lungengefäßen an Patienten mit PH, um die Darstellung von Neointima und Media weiter zu charakterisieren. Vergleicht man das Verhältnis zwischen Gefäßen unter  $50 \mu\text{m}$  in den verschiedenen Hypoxiegruppen mit und ohne Injektion von SU5416, war erneut zu beobachten, dass das Verhältnis in der

---

35 Tage Hypoxiegruppe mit SU5416 am höchsten war (Abbildung 43). Ein Vergleich zwischen den humanen IPAH-Lungen und den Lungen von 35 Tage Hypoxie mit SU5416-Ratten zeigte, dass die humanen IPAH-Lungen zwar ein größeres Verhältnis aufwiesen (Abbildung 43 und 45). Andererseits ließen sich durchaus Parallelen zwischen beiden Modellen aufzeigen. Somit ist das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit SU5416 bei den Ratten als ein weiterer Schritt zur Charakterisierung der humanen IPAH anzusehen.

Ein Nachteil der dargestellten Methode ist, dass man lediglich zwischen Media und Neointima unterscheiden kann, jedoch keine Trennung zwischen Neointima und Endothel möglich ist. Die Differenzierung der Gewebe sollten künftig mit Hilfe durch spezielle histologische Färbemethoden vorgenommen werden, um die morphologischen Befunde noch genauer darstellen zu können.

Die PCNA-Färbung zeigte ebenfalls im Endothel der 35 Tage Hypoxie mit SU5416-Gruppe die größte Anzahl von PCNA-positiven Endothelzellen als im Vergleich zu der nur 35 Tage Hypoxiegruppe. In Gefäßen von normoxischen Ratten war eine Proliferation der Endothelzellen nur selten zu beobachten, ähnlich wie in Gefäßen von gesunden Menschen (Tuder *et al.* 2007). Die Arbeiten von Kasahara *et al.* 2000 und Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001 bestätigen die eigenen Untersuchungen.

In einer *in vitro* Studie von Sakao *et al.* 2005 an humanen Endothelzellen aus pulmonalen, mikrovaskulären Gefäßen konnte gezeigt werden, dass mit SU5416 die Apoptoserate und die Proliferation bei diesen Zellen erhöht ist. Die apoptose-resistenten Zellen waren mit Hilfe der PCNA Färbung ebenfalls gut darstellbar.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Blockade von VEGFR-2 durch SU5416 die Apoptoserate von Endothelzellen erhöht. Apoptotische Zellen wiederum sezernieren VEGF und TGF- $\beta_1$ . Die Folge davon ist, dass VEGF die Apoptose hemmt und TGF- $\beta_1$  die Proliferation von VSMC (Vascular smooth muscle cells) stimuliert (Sakao *et al.* 2006). In einer *in vivo* Studie von Moreno-Vinasco

---

*et al.* 2008 mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der sowohl die Hämodynamik als auch die fein geweblichen Veränderungen der PH verbessern konnte, könnte die genannte Hypothese unterstützen.

Das vaskuläre Remodeling bzw. die Proliferation der Apoptose resistenten Zellen führt zu einer Verengung und letztendlich zu einem Verschluss des Gefäßlumens (Voelkel & Tuder 2000). Der hier verwendete Okklusion-Score, der die Gefäße nach verschlossen und partiell verschlossen charakterisierte, konnte diese Veränderungen gut darstellen.

Es zeigten sich mehr verschlossene (MW 25,67% ± 3,40) und partiell verschlossene (MW 14,64% ± 2,91) Gefäße bei den Tieren nach 35 Tagen Hypoxieexposition in Kombination mit SU5416. Bei Ratten nach 35 Tagen Hypoxieexposition erniedrigte sich der Mittelwert von partiell verschlossenen Gefäßen auf 13,43% ± 1,93, bei vollständig verschlossenen Gefäßen auf einen Mittelwert von 13,32% ± 1,78.

In einer Studie der Arbeitsgruppe von Oka *et al.* 2007 konnte gezeigt werden, dass mehr als 40% verschlossene und 10% partiell verschlossene Gefäße nach chronischer Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe zu finden waren. Die Abweichungen im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit gehen vermutlich auf die unterschiedlich gewählte Methodik zurück. Zum einen wurden die Tiere in unterschiedlichen Zeitspannen unter Hypoxie gehalten. Zum anderen bestanden Unterschiede bezüglich Durchmesser und Anzahl der ausgewerteten Gefäße. Außerdem wird zur Beurteilung eine andere Färbetechnik verwendet.

Okkludierte Gefäße wurden, wenn auch äußerst selten, im Monocrotalin-Modell der Ratte beobachtet. Sie traten jedoch nicht regelmäßig, wie im Modell der Hypoxie-induzierten PH in Kombination mit SU5416 auf. Es ist meist lediglich eine moderate intimale Schwellung und Proliferation zu erkennen, die fast nur bei Tieren auftritt, bei denen der RVSP systemische Werte zeigt (Tanaka *et al.* 1996; Persönliche Mitteilung von Dr. Eva Dony und Djuro Kosanovic 2009). Die starke

Mediaverdickung kann als weitere Ursache angesehen werden, dass betroffene Gefäße okkludieren (Allen & Carstens 1970).

Sildenafil und Imatinib zeigten in beiden Modellen eine signifikante Reduzierung der Neointima- zu Mediadicke, an verschlossenen und partiell verschlossenen Gefäßen sowie an PCNA-positiven Zellen im Vergleich zu den 35 Tagen Hypoxie mit und ohne Injektion von SU5416.

Sildenafil zeichnet sich sowohl durch antiproliferative als auch vasodilatative Eigenschaften aus, da es die Aktivität von cGMP verstärkt (Raja *et al.* 2006). In kurativen Therapieansätzen in verschiedenen Tiermodellen konnte die Substanz den Lungengefäßumbau hemmen (Sebkhi *et al.* 2003, Schermuly *et al.* 2004). Auch dieser Befund konnte durch die vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Damit stellt die PDE-5 Hemmung offensichtlich einen attraktiven Therapieansatz bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie des Menschen dar.

Wahrscheinlich kann man davon ausgehen, dass unter Therapie mit Imatinib die perivaskuläre Überexpression von PDGF-Rezeptoren, die unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert werden, gehemmt ist.

Folglich wurde die Proliferation von Endothelzellen gehemmt und damit das Verhältnis der Neointima- zu Mediadicke, die Anzahl der verschlossenen und partiell verschlossenen Gefäße sowie die Anzahl von PCNA-positiven Zellen verringert.

Unklar bleibt weiterhin, in wieweit der Einfluß der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen bei der Entstehung des Gefäßremodelings eine Rolle spielt. Es wird postuliert, dass Endothelzellen durch die Stimulierung von PDGF- $\beta$  oder von TGF- $\beta$  zu glatten Muskelzellen transdifferenzieren könnten (Nicod *et al.* 2007). Auch hier könnte Imatinib einen weiteren interessanten Therapieansatz darstellen.

Die Auswertung der histologischen Resultate lässt auch die Frage für die verantwortlichen Mechanismen offen. Zukünftige Untersuchungen auf

molekularbiologischer Ebene könnten weitere Antworten auf bestehende Fragen geben.

#### **4.4 Auswirkungen der chronischen Hypoxie in Kombination mit dem VEGFR-2-Inhibitor SU5416 sowie die Effekte der Wirkstoffe Sildenafil und Imatinib auf den Muskularisierungsgrad und die Wandstärke von pulmonalen Gefäßen**

In verschiedenen Tiermodellen der PH konnten die morphologischen Gefäßveränderungen der Media- und Adventitiaverdickung gut dargestellt und beschrieben werden. Die Zunahme der Media wird durch Hypertrophie, vermehrter Ansammlung von glattmuskulären Zellen sowie Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine verursacht. Im Gegensatz dazu entsteht die Verdickung der Adventitia durch Anhäufung von Fibroblasten, Myofibroblasten und einem Anstieg von extrazellulären Matrixproteinen (Stenmark *et al.* 2006).

Die immunhistochemische Doppelfärbung (alpha-aktin/vWF) wurde mit Hilfe einer PC-gestützten Analyse zur eindeutigen Unterscheidung von nicht-, partiell- und voll-muskularisierter Gefäßen angewendet. Hierbei handelt es sich um eine valide Methode zur Darstellung und Differenzierung des Muskularisierungsgrades, da die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Endothel (vWF) und glatten Muskelzellen (alpha-Aktin) besteht (Weissmann *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Modell der Hypoxie-induzierten PH in Kombination mit SU5416 ein größerer Anteil voll muskularisierter Gefäße ( $63,31\% \pm 3,93$ ) als im hypoxischen Modell (MW  $49,00\% \pm 4,10$ ) zu finden war. Dies konnte auch an partiell muskularisierten Gefäßen sowie an nicht muskularisierten Gefäßen beobachtet werden. Auch hier wurde deutlich, dass die Gabe von SU5416 den Krankheitsprozeß in Gefäßen im Gegensatz zu alleiniger Hypoxie, zunehmend verschlechtert.

Die mittlere Wandstärke betrug bei der 35 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe in der Gefäßkategorie 20-50  $\mu\text{m}$   $33,22\% \pm 0,56$ . Im Vergleich

dazu zeigte die 35 Tage Hypoxiegruppe eine mittlere Wandstärke von  $25,45\% \pm 0,33$ . In den übrigen Gefäßkategorien ließ die 35 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe im Vergleich zur 35 Tage Hypoxiegruppe ebenfalls die höchsten Werte erkennen. Hier konnte erneut gezeigt werden, dass Hypoxie in Kombination mit SU5416, die Veränderungen der PH deutlich verschlechtert als alleinige Hypoxie.

Die Therapie mit Sildenafil im Modell der Hypoxie in Kombination mit SU5416 zeigte eine signifikante Reduzierung der Anzahl vollmuskularisierter Gefäße im Vergleich zu den 35 Tage Hypoxie in Kombination mit SU5416-Gruppe. Zusätzlich konnten die Anzahl nichtmuskularisierter Gefäße erhöht werden. Im Modell der Hypoxie-induzierten PH bei der Ratte konnte in dieser Arbeit eine signifikante Reduzierung vollmuskularisierter Gefäße sowie eine signifikante Erhöhung partiell muskularisierter Gefäße bei Sildenafilgabe gezeigt werden. Untersuchungen von Zhao *et al.* 2001 und Sebkhil *et al.* 2003 bestätigen ebenfalls eine Verbesserung der Muskularisierung durch die Therapie mit Sildenafil im Modell der Hypoxie-induzierten PH bei Ratte und bei Maus.

In gleicher Weise konnte in beiden Modellen die Wandstärke in allen drei Kategorien signifikant gesenkt werden.

Passend zur Verringerung von Muskularisierungsgrad und Wandstärke konnte Sildenafil im Modell der Hypoxie-induzierten PH auch eine deutliche Senkung des RVSP und der Ratio bewirken. Hingegen erreichte der PDE5-Inhibitor im Modell der Hypoxie-induzierten PH in Kombination mit SU5416 zumindest eine signifikante Reduzierung des RVSP. Wie im Kapitel 4.3 konnte Sildenafil auch hier seine antiproliferativen sowie vasodilatativen Eigenschaften zeigen. Die Verbesserungen hinsichtlich des Muskularisierungsgrades könnte das von Sebkhil *et al.* 2003 beschriebene glattmuskuläre Verteilungsmuster bezüglich der Lokalisation von PDE-5 bestätigen. In weiterführenden histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen bestände die Möglichkeit durch eigene Resultate die Ergebnisse zu bestätigen bzw. zu erweitern.

Die Therapie mit Imatinib im Modell der Hypoxie in Kombination mit SU5416 zeigte eine signifikante Reduzierung der Anzahl vollmuskularisierter Gefäße im Vergleich zur 35 Tage Hypoxiegruppe in Kombination mit SU5416. Außerdem

wurde eine Zunahme von partiell muskularisierten Gefäßen beobachtet. Im Modell der Hypoxie-induzierten PH der Ratte konnte eine signifikante Reduzierung von vollmuskularisierten Gefäßen und eine signifikante Erhöhung der partiell muskularisierten Gefäße bei Imatinibgabe gezeigt werden. Die Resultate bezüglich der Muskularisierung zeigten sich auch in der Studie von Schermuly *et al.* 2005 im Modell der Hypoxie-induzierten PH bei Maus unter Therapie mit Imatinib, die ebenfalls eine beeindruckende Reduzierung der vollmuskularisierten Gefäße zur Folge hatte.

Auch konnte in beiden Modellen die Wandstärke in zwei von drei Kategorien signifikant verringert werden.

Wahrscheinlich kann man davon ausgehen, dass im Therapieansatz mit Imatinib die perivaskuläre Überexpression von PDGF-Rezeptoren gehemmt wird. Folglich wurden die Muskularisierung und die Verdickung der medialen Wandstärke in den erkrankten Gefäßen signifikant reduziert. Dies korrelierte mit deutlicher Verminderung des RVSP und der Rechtsherzhypertrophie im Modell der Hypoxie-induzierten PH. Im Modell der Hypoxie-induzierten PH in Kombination mit SU5416 hatten diese Ergebnisse keine Verringerung von RVSP und Ratio zur Folge. In zukünftigen histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wäre die Möglichkeit durch neue Resultate die Ergebnisse zu bestätigen bzw. zu erweitern.

## 5. Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie des Menschen ist eine schwierig zu therapierende Erkrankung, die unbehandelt zum Tode führen kann. Die PAH ist gekennzeichnet durch eine deutlich anhaltende Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes, charakteristische Umbauprozesse in den Pulmonalarterien (Remodeling) und die Ausbildung eines *Cor pulmonale*.

In den gängigen Tiermodellen ist es bis heute nicht gelungen alle pathognomischen Symptome der pulmonalen Hypertonie des Menschen nachzuahmen. In dem hier angewendeten Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 standen hochgradige Gefäßveränderungen mit Bildung einer Neointima im Vordergrund. Die Neointima konnte zweifelsfrei als Marker der Hypertrophie und Endothelzellproliferation interpretiert werden. Somit stellt das vorliegende Tiermodell einen wichtigen Beitrag zur weiteren Erforschung des vaskulären Remodelings in Bezug auf Entstehung und Therapiestrategien der Erkrankung dar.

Die Kombination von Hypoxie und dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 verstärkte die Symptome einer schwerwiegenden pulmonalen Hypertonie deutlicher, als alleinige Hypoxie. Dies zeigte sich in der Zunahme des rechtventrikulären Druckes, der Herzratio, des Muskularisierungsgrades, der Wandstärke, der Gefäßokklusion, der Neointimabildung und von PCNA-positiven Zellen.

Die zweiwöchige Therapie der Ratten mit dem PDE-5 Hemmstoff Sildenafil und dem Tyrosinkinase-Hemmstoff Imatinib begann am 21.Tag unter Hypoxie mit oder ohne Injektion des VEGFR-2 Inhibitor SU5416 und nach Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie.

Sildenafil und Imatinib konnten ihre antiproliferative Eigenschaften sowohl im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in Kombination mit dem VEGFR-2 Inhibitor als auch bei alleiniger Hypoxie zeigen. Beide Substanzen stellen eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit bei Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie des Menschen da.

## 6. Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe, life-threatening disease characterized by a sustained elevation in pulmonary arterial pressure, remodeling of the pulmonary arteries and development of cor pulmonale. Establishment and investigation of an animal model that mimics the pathologies of human disease is useful in order to understand the pathomechanism and to develop new therapeutics of the disease.

In the present study, an experimental model of pulmonary hypertension (PH) induced by chronic hypoxic exposure in combination with the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 inhibitor SU5416 in rats was investigated. Moreover, therapeutic efficacy of the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil or the PDGF inhibitor imatinib was assessed.

Chronic hypoxia in combination with VEGFR-2 inhibition caused more severe PH in rats than chronic hypoxic exposure alone as evident from an increase in right ventricular pressure, right ventricular hypertrophy (RVH), degree of muscularization, medial wall thickness, vascular occlusion and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells. Notably, severely remodeled pulmonary vessels were characterized by presence of neointimal lesions and vascular occlusions. Sildenafil or imatinib treatment from day 21 (when PH was established and progressing) to day 35 showed improvement of PH, RVH and pulmonary vascular remodeling in rats of both hypoxia alone or hypoxia plus SU5416 groups; and the therapeutic benefit was associated with antiproliferative effects in the vascular wall.

Severe PH and pulmonary vascular lesions in chronically hypoxic rats with VEGFR-2 inhibition by SU5416 suggest that this is a useful animal model. The therapeutic efficacy of sildenafil and imatinib in PH as previously demonstrated in other models has been confirmed in this model of severe PH. It is desirable that future preclinical studies employ this animal model while investigating novel targets and therapeutic strategies.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aaronson P. I., T. P. Robertson, G. A. Knock, S. Becker, T. H. Lewis, V. Snetkov, and J. P. Ward.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J.Physiol* **570** (Pt 1):53-58, 2006.
- Abdollahi A., M. Li, G. Ping, C. Plathow, S. Domhan, F. Kiessling, L. B. Lee, G. McMahon, H. J. Grone, K. E. Lipson, and P. E. Huber.** Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J.Exp.Med.* **201** (6):925-935, 2005.
- Allen J. R. and L. A. Carstens.** Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Exp.Mol.Pathol.* **13** (2):159-171, 1970.
- Anand I. S., E. Harris, R. Ferrari, P. Pearce, and P. Harris.** Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. *Thorax* **41** (9):696-700, 1986.
- Antonian L., H. Zhang, C. Yang, G. Wagner, L. K. Shawver, M. Shet, B. Ogilvie, A. Madan, and A. Parkinson.** Biotransformation of the anti-angiogenic compound SU5416. *Drug Metab Dispos.* **28** (12):1505-1512, 2000.
- Archer S. L., J. P. Tolins, L. Raij, and E. K. Weir.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **164** (3):1198-1205, 1989.
- Arora A. and E. M. Scholar.** Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **315** (3):971-979, 2005.
- Balasubramaniam V., T. D. Le Cras, D. D. Ivy, T. R. Grover, J. P. Kinsella, and S. H. Abman.** Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **284** (5):L826-L833, 2003.
- Barst R. J., L. J. Rubin, W. A. Long, M. D. McGoon, S. Rich, D. B. Badesch, B. M. Groves, V. F. Tapson, R. C. Bourge, B. H. Brundage, and .** A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N.Engl.J.Med.* **334** (5):296-302, 1996.
- Barst R. J., M. McGoon, A. Torbicki, O. Sitbon, M. J. Krowka, H. Olschewski, and S. Gaine.** Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):40S-47S, 2004.
- Barst R. J.** PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J.Clin.Invest* **115** (10):2691-2694, 2005.
- Beavo J. A. and L. L. Brunton.** Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3** (9):710-718, 2002.
- Bender A. T. and J. A. Beavo.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol.Rev.* **58** (3):488-520, 2006.
- Bennie R. E., C. S. Packer, D. R. Powell, N. Jin, and R. A. Rhoades.** Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am.J.Physiol* **261** (2 Pt 1):L156-L163, 1991.
- Bergsten E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo, and U. Eriksson.** PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat.Cell Biol.* **3** (5):512-516, 2001.

- Bravo R., S. J. Fey, J. Bellatin, P. M. Larsen, J. Arevalo, and J. E. Celis.** Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp.Cell Res.* **136** (2):311-319, 1981.
- Bravo R. and H. Donald-Bravo.** Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J.Cell Biol.* **105** (4):1549-1554, 1987.
- Bristow M. R., L. S. Zisman, B. D. Lowes, W. T. Abraham, D. B. Badesch, B. M. Groves, N. F. Voelkel, D. M. Lynch, and R. A. Quaife.** The pressure-overloaded right ventricle in pulmonary hypertension. *Chest* **114** (1 Suppl):101S-106S, 1998.
- Budhiraja R., R. M. Tuder, and P. M. Hassoun.** Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* **109** (2):159-165, 2004.
- Capdeville R., E. Buchdunger, J. Zimmermann, and A. Matter.** Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat.Rev.Drug Discov.* **1** (7):493-502, 2002.
- Carbone R., E. Bossone, G. Bottino, A. Monselise, and M. Rubenfire.** Secondary pulmonary hypertension--diagnosis and management. *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.* **9** (6):331-342, 2005.
- Celis J. E. and A. Celis.** Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82** (10):3262-3266, 1985.
- Channick R. N., G. Simonneau, O. Sitbon, I. M. Robbins, A. Frost, V. F. Tapson, D. B. Badesch, S. Roux, M. Rainisio, F. Bodin, and L. J. Rubin.** Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **358** (9288):1119-1123, 2001.
- Christou H., A. Yoshida, V. Arthur, T. Morita, and S. Kourembanas.** Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **18** (6):768-776, 1998.
- Cihak R., F. Kolar, V. Pelouch, J. Prochazka, B. Ostadal, and J. Widimsky.** Functional changes in the right and left ventricle during development of cardiac hypertrophy and after its regression. *Cardiovasc.Res.* **26** (9):845-850, 1992.
- Cohen A. H., K. Hanson, K. Morris, B. Fouty, I. F. McMurty, W. Clarke, and D. M. Rodman.** Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *J.Clin.Invest* **97** (1):172-179, 1996.
- Conti M. and J. Beavo.** Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu.Rev.Biochem.* **76**:481-511, 2007.
- Corbin J. D. and S. H. Francis.** Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J.Biol.Chem.* **274** (20):13729-13732, 1999.
- Corson M. A., N. L. James, S. E. Latta, R. M. Nerem, B. C. Berk, and D. G. Harrison.** Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ.Res.* **79** (5):984-991, 1996.
- D'Alonzo G. E., R. J. Barst, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, A. P. Fishman, R. M. Goldring, B. M. Groves, J. T. Kernis, and .** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann.Intern.Med.* **115** (5):343-349, 1991.

- Dempsey E. C., I. F. McMurtry, and R. F. O'Brien.** Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am.J.Physiol* **260** (2 Pt 1):L136-L145, 1991.
- Druker B. J., F. Guilhot, S. G. O'Brien, I. Gathmann, H. Kantarjian, N. Gattermann, M. W. Deininger, R. T. Silver, J. M. Goldman, R. M. Stone, F. Cervantes, A. Hochhaus, B. L. Powell, J. L. Gabilove, P. Rousselot, J. Reiffers, J. J. Cornelissen, T. Hughes, H. Agis, T. Fischer, G. Verhoef, J. Shepherd, G. Saglio, A. Gratwohl, J. L. Nielsen, J. P. Radich, B. Simonsson, K. Taylor, M. Baccarani, C. So, L. Letvak, and R. A. Larson.** Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.* **355** (23):2408-2417, 2006.
- Dumas J. P., M. Bardou, F. Goirand, and M. Dumas.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen.Pharmacol.* **33** (4):289-297, 1999.
- Dumitrascu R., N. Weissmann, H. A. Ghofrani, E. Dony, K. Beuerlein, H. Schmidt, J. P. Stasch, M. J. Gnoth, W. Seeger, F. Grimminger, and R. T. Schermuly.** Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* **113** (2):286-295, 2006.
- Dumitrascu R., S. Koebrich, E. Dony, N. Weissmann, R. Savai, S. S. Pullamsetti, H. A. Ghofrani, A. Samidurai, H. Traupe, W. Seeger, F. Grimminger, and R. T. Schermuly.** Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC.Pulm.Med.* **8**:25, 2008.
- Dupuis J. and M. M. Hoeper.** Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Eur.Respir.J.* **31** (2):407-415, 2008.
- Durmowicz A. G., S. Hofmeister, T. K. Kadyraliev, A. A. Aldashev, and K. R. Stenmark.** Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude. *J.Appl.Physiol* **74** (5):2276-2285, 1993.
- Durmowicz A. G. and K. R. Stenmark.** Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr.Rev.* **20** (11):e91-e102, 1999.
- Eskens F. A.** Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br.J.Cancer* **90** (1):1-7, 2004.
- Evgenov O. V., P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. Schmidt, and J. P. Stasch.** NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat.Rev.Drug Discov.* **5** (9):755-768, 2006.
- Ferrara N. and W. J. Henzel.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **161** (2):851-858, 1989.
- Ferrara N. and T. vis-Smyth.** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* **18** (1):4-25, 1997.
- Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **237**:1-30, 1999.
- Ferrara N., H. P. Gerber, and J. LeCouter.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* **9** (6):669-676, 2003.
- Fong T. A., L. K. Shawver, L. Sun, C. Tang, H. App, T. J. Powell, Y. H. Kim, R. Schreck, X. Wang, W. Risau, A. Ullrich, K. P. Hirth, and G. McMahon.** SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **59** (1):99-106, 1999.

- Fried R. and L. M. Reid.** Early recovery from hypoxic pulmonary hypertension: a structural and functional study. *J.Appl.Physiol* **57** (4):1247-1253, 1984.
- Galie N., H. A. Ghofrani, A. Torbicki, R. J. Barst, L. J. Rubin, D. Badesch, T. Fleming, T. Parpia, G. Burgess, A. Branzi, F. Grimminger, M. Kurzyna, and G. Simonneau.** Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* **353** (20):2148-2157, 2005.
- Geiger R., R. M. Berger, J. Hess, A. J. Bogers, H. S. Sharma, and W. J. Mooi.** Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J.Pathol.* **191** (2):202-207, 2000.
- Gerber H. P., V. Dixit, and N. Ferrara.** Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **273** (21):13313-13316, 1998.
- Ghofrani H. A., R. Wiedemann, F. Rose, R. T. Schermuly, H. Olschewski, N. Weissmann, A. Gunther, D. Walmrath, W. Seeger, and F. Grimminger.** Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* **360** (9337):895-900, 2002.
- Ghofrani H. A., R. T. Schermuly, F. Rose, R. Wiedemann, M. G. Kohstall, A. Kreckel, H. Olschewski, N. Weissmann, B. Enke, S. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger.** Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **167** (8):1139-1141, 2003.
- Ghofrani H. A., J. Pepke-Zaba, J. A. Barbera, R. Channick, A. M. Keogh, M. A. Gomez-Sanchez, M. Kneussl, and F. Grimminger.** Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):68S-72S, 2004a.
- Ghofrani H. A., F. Reichenberger, M. G. Kohstall, E. H. Mrosek, T. Seeger, H. Olschewski, W. Seeger, and F. Grimminger.** Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Ann.Intern.Med.* **141** (3):169-177, 2004b.
- Ghofrani H. A., R. Voswinckel, F. Reichenberger, H. Olschewski, P. Haredza, B. Karadas, R. T. Schermuly, N. Weissmann, W. Seeger, and F. Grimminger.** Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J.Am.Coll.Cardiol.* **44** (7):1488-1496, 2004c.
- Ghofrani H. A., W. Seeger, and F. Grimminger.** Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* **353** (13):1412-1413, 2005.
- Giaid A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, and D. J. Stewart.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* **328** (24):1732-1739, 1993.
- Giaid A. and D. Saleh.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* **333** (4):214-221, 1995.
- Gitay-Goren H., T. Cohen, S. Tessler, S. Soker, S. Gengrinovitch, P. Rockwell, M. Klagsbrun, B. Z. Levi, and G. Neufeld.** Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **271** (10):5519-5523, 1996.
- Glade-Bender J., J. J. Kandel, and D. J. Yamashiro.** VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **3** (2):263-276, 2003.
- Glivec** © Fachinformation für Kliniker, Novartis Pharma.

- Gunaydin S., Y. Imai, Y. Takanashi, K. Seo, I. Hagino, D. Chang, and T. Shinoka.** The effects of vasoactive intestinal peptide on monocrotaline induced pulmonary hypertensive rabbits following cardiopulmonary bypass: a comparative study with isoproterenol and nitroglycerine. *Cardiovasc.Surg.* **10** (2):138-145, 2002.
- Harlan J. M., P. J. Thompson, R. R. Ross, and D. F. Bowen-Pope.** Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J.Cell Biol.* **103** (3):1129-1133, 1986.
- Heath D., C. Edwards, M. Winson, and P. Smith.** Effects on the right ventricle, pulmonary vasculature, and carotid bodies of the rat of exposure to, and recovery from, simulated high altitude. *Thorax* **28** (1):24-28, 1973.
- Heldin C. H. and B. Westermark.** Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* **79** (4):1283-1316, 1999.
- Hislop A. and L. Reid.** New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br.J.Exp.Pathol.* **57** (5):542-554, 1976.
- Hislop A. and L. Reid.** Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br.J.Exp.Pathol.* **58** (6):653-662, 1977.
- Ho Q. T. and C. J. Kuo.** Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39** (7-8):1349-1357, 2007.
- Hoeper M., T. Wilke, T. Welte, HWM Breuer, T.O.F. Wagner.** How effective is the treatment with high-dose nifedipine for primary pulmonary hypertension? *Semin Respir Crit Care Med*; **15**:490-494, 1994
- Hoshi T. and S. Lahiri.** Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* **306** (5704):2050-2051, 2004.
- Humbert M., G. Monti, M. Fartoukh, A. Magnan, F. Brenot, B. Rain, F. Capron, P. Galanaud, P. Duroux, G. Simonneau, and D. Emilie.** Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur.Respir.J.* **11** (3):554-559, 1998.
- Humbert M., N. W. Morrell, S. L. Archer, K. R. Stenmark, M. R. MacLean, I. M. Lang, B. W. Christman, E. K. Weir, O. Eickelberg, N. F. Voelkel, and M. Rabinovitch.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):13S-24S, 2004a.
- Humbert M., O. Sitbon, and G. Simonneau.** Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* **351** (14):1425-1436, 2004b.
- Ignarro L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga, and K. S. Wood.** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ.Res.* **61** (6):866-879, 1987.
- Ikeda E., M. G. Achen, G. Breier, and W. Risau.** Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J.Biol.Chem.* **270** (34):19761-19766, 1995.
- Jahnke W., R. M. Grotzfeld, X. Pellé, A. Strauss, G. Fendrich, S. W. Cowan-Jakob, S. Cotesta, D. Fabbro, P. Furet, J. Mestan, A. L. Marzinzik.** Binding or bending: distinction of allosteric Abl kinase agonists from antagonists by an NMR-based conformational assay. *J. Am. Chem. Soc.* **132** (20):7043-8, 2010.

- Jankov R. P., C. Kantores, R. Belcastro, S. Yi, R. A. Ridsdale, M. Post, and A. K. Tanswell.** A role for platelet-derived growth factor beta-receptor in a newborn rat model of endothelin-mediated pulmonary vascular remodeling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **288** (6):L1162-L1170, 2005.
- Jeffery T. K. and J. C. Wanstall.** Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol.Ther.* **92** (1):1-20, 2001.
- Karkkainen M. J. and T. V. Petrova.** Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* **19** (49):5598-5605, 2000.
- Karkkainen M. J., T. Makinen, and K. Alitalo.** Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat.Cell Biol.* **4** (1):E2-E5, 2002.
- Kasahara Y., R. M. Tuder, L. Taraseviciene-Stewart, T. D. Le Cras, S. Abman, P. K. Hirth, J. Waltenberger, and N. F. Voelkel.** Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J.Clin.Invest* **106** (11):1311-1319, 2000.
- Katayama H., G. W. Henry, C. Lucas, B. Ha, J. I. Ferreira, and E. G. Frantz.** Blood flow velocity profiles in pulmonary branch arteries in lambs. *J.Biomech.Eng* **117** (2):237-241, 1995.
- Kerkela R., L. Grazette, R. Yacobi, C. Iliescu, R. Patten, C. Beahm, B. Walters, S. Shevtsov, S. Pesant, F. J. Clubb, A. Rosenzweig, R. N. Salomon, R. A. Van Etten, J. Alroy, J. B. Durand, and T. Force.** Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat.Med.* **12** (8):908-916, 2006.
- Kourembanas S., T. Morita, Y. Liu, and H. Christou.** Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int.* **51** (2):438-443, 1997.
- Krenzelok E. P.** Sildenafil: clinical toxicology profile. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* **38** (6):645-651, 2000.
- Kwapiszewska G., M. Wygrecka, L. M. Marsh, S. Schmitt, R. Trosser, J. Wilhelm, K. Helmus, B. Eul, A. Zakrzewicz, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, R. M. Bohle, F. Grimminger, W. Seeger, O. Eickelberg, L. Fink, and N. Weissmann.** Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* **118** (11):1183-1194, 2008.
- Laks L., B. Lehrhaft, R. R. Grunstein, and C. E. Sullivan.** Pulmonary artery pressure response to hypoxia in sleep apnea. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **155** (1):193-198, 1997.
- Lalich J. J. and L. Merkow.** Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* **10**:744-750, 1961.
- Lanner M. C., M. Raper, W. M. Pratt, and R. A. Rhoades.** Heterotrimeric G proteins and the platelet-derived growth factor receptor-beta contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **33** (4):412-419, 2005.
- LaRochelle W. J., M. Jeffers, W. F. McDonald, R. A. Chillakuru, N. A. Giese, N. A. Lokker, C. Sullivan, F. L. Boldog, M. Yang, C. Vernet, C. E. Burgess, E. Fernandes, L. L. Deegler, B. Rittman, J. Shimkets, R. A. Shimkets, J. M. Rothberg, and H. S. Lichenstein.** PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat.Cell Biol.* **3** (5):517-521, 2001.
- Lepore J. J., A. Maroo, N. L. Pereira, L. C. Ginns, G. W. Dec, W. M. Zapol, K. D. Bloch, and M. J. Semigran.** Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension. *Am.J.Cardiol.* **90** (6):677-680, 2002.
- Levy A. P., N. S. Levy, S. Wegner, and M. A. Goldberg.** Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J.Biol.Chem.* **270** (22):13333-13340, 1995.

- Li X., A. Ponten, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, G. Backstrom, M. Hellstrom, H. Bostrom, H. Li, P. Soriano, C. Betsholtz, C. H. Heldin, K. Alitalo, A. Ostman, and U. Eriksson.** PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat.Cell Biol.* **2** (5):302-309, 2000.
- MacLean M. R., E. D. Johnston, K. M. McCulloch, L. Pooley, M. D. Houslay, and G. Sweeney.** Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **283** (2):619-624, 1997.
- Madden J. A., M. S. Vadula, and V. P. Kurup.** Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **263** (3 Pt 1):L384-L393, 1992.
- Marshall C., A. J. Mamary, A. J. Verhoeven, and B. E. Marshall.** Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **15** (5):633-644, 1996.
- Matsumoto T., T. Kobayashi, and K. Kamata.** Phosphodiesterases in the vascular system. *J.Smooth Muscle Res.* **39** (4):67-86, 2003.
- Mattocks A. R.** Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* **217** (5130):723-728, 1968.
- McLaughlin V. V., O. Sitbon, D. B. Badesch, R. J. Barst, C. Black, N. Galie, M. Rainisio, G. Simonneau, and L. J. Rubin.** Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur.Respir.J.* **25** (2):244-249, 2005.
- Mendel D. B., A. D. Laird, B. D. Smolich, R. A. Blake, C. Liang, A. L. Hannah, R. M. Shaheen, L. M. Ellis, S. Weitman, L. K. Shawver, and J. M. Cherrington.** Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Des* **15** (1):29-41, 2000a.
- Mendel D. B., R. E. Schreck, D. C. West, G. Li, L. M. Strawn, S. S. Tanciongco, S. Vasile, L. K. Shawver, and J. M. Cherrington.** The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clin.Cancer Res.* **6** (12):4848-4858, 2000b.
- Mereles D., N. Ehlken, S. Kreuzer, S. Ghofrani, M. M. Hoepfer, M. Halank, F. J. Meyer, G. Karger, J. Buss, J. Juenger, N. Holzapfel, C. Opitz, J. Winkler, F. F. Herth, H. Wilkens, H. A. Katus, H. Olschewski, and E. Grunig.** Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* **114** (14):1482-1489, 2006.
- Meyrick B. and L. Reid.** Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am.J.Pathol.* **100** (1):151-178, 1980.
- Meyrick B., W. Gamble, and L. Reid.** Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am.J.Physiol* **239** (5):H692-H702, 1980.
- Meyrick B. and L. Reid.** Pulmonary hypertension. Anatomic and physiologic correlates. *Clin.Chest Med.* **4** (2):199-217, 1983.
- Meyrick B.** The pathology of pulmonary artery hypertension. *Clin.Chest Med.* **22** (3):393-404, vii, 2001.
- Michelakis E., W. Tymchak, D. Lien, L. Webster, K. Hashimoto, and S. Archer.** Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* **105** (20):2398-2403, 2002.
- Mitani Y., M. Ueda, K. Maruyama, H. Shimpo, A. Kojima, M. Matsumura, K. Aoki, and M. Sakurai.** Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* **54** (1):88-90, 1999.

- Moore L. G.** Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt.Med.Biol.* **2** (2):257-279, 2001.
- Moreno-Vinasco L., M. Gomberg-Maitland, M. L. Maitland, A. A. Desai, P. A. Singleton, S. Sammani, L. Sam, Y. Liu, A. N. Husain, R. M. Lang, M. J. Ratain, Y. A. Lussier, and J. G. Garcia.** Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics* **33** (2):278-291, 2008.
- Morris G. F. and M. B. Mathews.** Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J.Biol.Chem.* **264** (23):13856-13864, 1989.
- Murad F., C. K. Mittal, W. P. Arnold, S. Katsuki, and H. Kimura.** Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv.Cyclic.Nucleotide.Res.* **9**:145-158, 1978.
- Murray R., E. Shipp, and G. A. FitzGerald.** Prostaglandin endoperoxide/thromboxane A2 receptor desensitization. Cross-talk with adenylate cyclase in human platelets. *J.Biol.Chem.* **265** (35):21670-21675, 1990.
- Naeije R., C. Melot, P. Mols, and R. Hallemans.** Effects of vasodilators on hypoxic pulmonary vasoconstriction in normal man. *Chest* **82** (4):404-410, 1982.
- Nagendran J., S. L. Archer, D. Soliman, V. Gurtu, R. Moudgil, A. Haromy, Aubin C. St, L. Webster, I. M. Rebeyka, D. B. Ross, P. E. Light, J. R. Dyck, and E. D. Michelakis.** Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* **116** (3):238-248, 2007.
- Neufeld G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13** (1):9-22, 1999.
- Newman J. H., R. C. Trembath, J. A. Morse, E. Grunig, J. E. Loyd, S. Adnot, F. Coccolo, C. Ventura, J. A. Phillips, III, J. A. Knowles, B. Janssen, O. Eickelberg, S. Eddahibi, P. Herve, W. C. Nichols, and G. Elliott.** Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):33S-39S, 2004.
- Nicod L. P.** The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. *Swiss.Med.Wkly.* **137** (31-32):437-442, 2007.
- Oka M., N. Homma, L. Taraseviciene-Stewart, K. G. Morris, D. Kraskauskas, N. Burns, N. F. Voelkel, and I. F. McMurtry.** Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ.Res.* **100** (6):923-929, 2007.
- Olschewski H., D. Walmrath, R. Schermuly, A. Ghofrani, F. Grimminger, and W. Seeger.** Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann.Intern.Med.* **124** (9):820-824, 1996.
- Olschewski H., W. Seeger, and F. Grimminger.** [Physiology and physiopathology of the pulmonary circulation]. *Internist (Berl)* **40** (7):696-709, 1999.
- Omori K. and J. Kotera.** Overview of PDEs and their regulation. *Circ.Res.* **100** (3):309-327, 2007.
- Partovian C., S. Adnot, S. Eddahibi, E. Teiger, M. Levame, P. Dreyfus, B. Raffestin, and C. Frelin.** Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am.J.Physiol* **275** (6 Pt 2):H1948-H1956, 1998.
- Perazzo J., F. Eizayaga, S. Romay, L. Bengochea, A. Pavese, and A. Lemberg.** An experimental model of liver damage and portal hypertension induced by a single dose of monocrotaline. *Hepatogastroenterology* **46** (25):432-435, 1999.

- Perros F., P. Dorfmüller, R. Souza, I. Durand-Gasselín, S. Mussot, M. Mazmanian, P. Herve, D. Emilie, G. Simonneau, and M. Humbert.** Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur.Respir.J.* **29** (3):462-468, 2007.
- Perros F., D. Montani, P. Dorfmüller, I. Durand-Gasselín, C. Tcherakian, Pavec J. Le, M. Mazmanian, E. Fadel, S. Mussot, O. Mercier, P. Herve, D. Emilie, S. Eddahibi, G. Simonneau, R. Souza, and M. Humbert.** Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **178** (1):81-88, 2008.
- Pietra G. G., F. Capron, S. Stewart, O. Leone, M. Humbert, I. M. Robbins, L. M. Reid, and R. M. Tuder.** Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):25S-32S, 2004.
- Rabinovitch M., W. Gamble, A. S. Nadas, O. S. Miettinen, and L. Reid.** Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am.J.Physiol* **236** (6):H818-H827, 1979.
- Rabinovitch M., W. J. Gamble, O. S. Miettinen, and L. Reid.** Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am.J.Physiol* **240** (1):H62-H72, 1981.
- Rabinovitch M.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J.Clin.Invest* **118** (7):2372-2379, 2008.
- Raja S. G., M. D. Danton, K. J. Macarthur, and J. C. Pollock.** Treatment of pulmonary arterial hypertension with sildenafil: from pathophysiology to clinical evidence. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* **20** (5):722-735, 2006.
- Raoul W., O. Wagner-Ballon, G. Saber, A. Hulin, E. Marcos, S. Giraudier, W. Vainchenker, S. Adnot, S. Eddahibi, and B. Maitre.** Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir.Res.* **8**:8, 2007.
- Reeves J. T., W. W. Wagner, Jr., I. F. McMurtry, and R. F. Grover.** Physiological effects of high altitude on the pulmonary circulation. *Int.Rev.Physiol* **20**:289-310, 1979.
- Reichenberger F., M. G. Kohstall, T. Seeger, H. Olschewski, F. Grimminger, W. Seeger, and H. A. Ghofrani.** Effect of sildenafil on hypoxia-induced changes in pulmonary circulation and right ventricular function. *Respir.Physiol Neurobiol.* **159** (2):196-201, 2007a.
- Reichenberger F., R. Voswinckel, B. Enke, M. Rutsch, Fechtali E. El, T. Schmehl, H. Olschewski, R. Schermuly, N. Weissmann, H. A. Ghofrani, F. Grimminger, E. Mayer, and W. Seeger.** Long-term treatment with sildenafil in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur.Respir.J.* **30** (5):922-927, 2007b.
- Ressler J., D. Urbanova, J. Widimsky, B. Ostadal, V. Pelouch, and J. Prochazka.** Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats. *Respiration* **31** (1):38-46, 1974.
- Rhodes J.** Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J.Appl.Physiol* **98** (3):1092-1100, 2005.
- Rich S., E. Kaufmann, and P. S. Levy.** The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* **327** (2):76-81, 1992.
- Rini B. I. and E. J. Small.** Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* **23** (5):1028-1043, 2005.

- Rosenkranz S. and A. Kazlauskas.** Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* **16** (3):201-216, 1999.
- Rosenkranz S., F. Diet, T. Karasch, J. Weihrauch, K. Wassermann, and E. Erdmann.** Sildenafil improved pulmonary hypertension and peripheral blood flow in a patient with scleroderma-associated lung fibrosis and the raynaud phenomenon. *Ann.Intern.Med.* **139** (10):871-873, 2003.
- Ross R., J. Glomset, B. Kariya, and L. Harker.** A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **71** (4):1207-1210, 1974.
- Rubin L. J.** Primary pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* **336** (2):111-117, 1997.
- Rubin L. J.** Therapy of pulmonary hypertension: the evolution from vasodilators to antiproliferative agents. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **166** (10):1308-1309, 2002.
- Rubin L. J., D. B. Badesch, R. J. Barst, N. Galie, C. M. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg, and G. Simonneau.** Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* **346** (12):896-903, 2002.
- Rubin L. J. and S. Roux.** Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist. *Expert.Opin.Investig.Drugs* **11** (7):991-1002, 2002.
- Rubin L. J. and N. Galie.** Pulmonary arterial hypertension: a look to the future. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):89S-90S, 2004.
- Saenz de Tejada, I, J. Angulo, P. Cuevas, A. Fernandez, I. Moncada, A. Allona, E. Lledo, H. G. Korschen, U. Niewohner, H. Haning, E. Pages, and E. Bischoff.** The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int.J.Impot.Res.* **13** (5):282-290, 2001.
- Sakao S., L. Taraseviciene-Stewart, J. D. Lee, K. Wood, C. D. Cool, and N. F. Voelkel.** Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* **19** (9):1178-1180, 2005.
- Sakao S., L. Taraseviciene-Stewart, K. Wood, C. D. Cool, and N. F. Voelkel.** Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **291** (3):L362-L368, 2006.
- Savikko J., E. Taskinen, and Willebrand E. von.** Chronic allograft nephropathy is prevented by inhibition of platelet-derived growth factor receptor: tyrosine kinase inhibitors as a potential therapy. *Transplantation* **75** (8):1147-1153, 2003.
- Scavelli C., A. Vacca, Pietro G. Di, F. Dammacco, and D. Ribatti.** Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia* **18** (6):1054-1058, 2004.
- Schermuly R. T., K. P. Kreisselmeier, H. A. Ghofrani, H. Yilmaz, G. Butrous, L. Ermert, M. Ermert, N. Weissmann, F. Rose, A. Guenther, D. Walmrath, W. Seeger, and F. Grimminger.** Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **169** (1):39-45, 2004.
- Schermuly R. T., E. Dony, H. A. Ghofrani, S. Pullamsetti, R. Savai, M. Roth, A. Sydykov, Y. J. Lai, N. Weissmann, W. Seeger, and F. Grimminger.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J.Clin.Invest* **115** (10):2811-2821, 2005.

- Schermuly R. T., J. P. Stasch, S. S. Pullamsetti, R. Middendorff, D. Muller, K. D. Schluter, A. Dingendorf, S. Hackemack, E. Kolosionek, C. Kaulen, R. Dumitrascu, N. Weissmann, J. Mittendorf, W. Klepetko, W. Seeger, H. A. Ghofrani, and F. Grimminger.** Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur.Respir.J.* **32** (4):881-891, 2008.
- Schindler T., W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson, and J. Kuriyan.** Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289** (5486):1938-1942, 2000.
- Sebki A., J. W. Strange, S. C. Phillips, J. Wharton, and M. R. Wilkins.** Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **107** (25):3230-3235, 2003.
- Shweiki D., A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359** (6398):843-845, 1992.
- Simonneau G., N. Galie, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebrec, R. Speich, M. Beghetti, S. Rich, and A. Fishman.** Clinical classification of pulmonary hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43** (12 Suppl S):5S-12S, 2004.
- Simonneau G., I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z. C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, and R. Souza.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* **54** (1 Suppl):S43-S54, 2009.
- Stadler W. and G. Wilding.** Angiogenesis inhibitors in genitourinary cancers. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **46** Suppl: S41-S47, 2003.
- Stenmark K. R., E. Gerasimovskaya, R. A. Nemenoff, and M. Das.** Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* **122** (6 Suppl):326S-334S, 2002.
- Stenmark K. R. and I. F. McMurtry.** Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circ.Res.* **97** (2):95-98, 2005.
- Stenmark K. R., K. A. Fagan, and M. G. Frid.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ.Res.* **99** (7):675-691, 2006.
- Stenmark K. R., B. Meyrick, N. Galie, W. J. Mooi, and I. F. McMurtry.** Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **297** (6):L1013-L1032, 2009.
- Stiebellehner L., M. G. Frid, J. T. Reeves, R. B. Low, M. Gnanasekharan, and K. R. Stenmark.** Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **285** (4):L819-L828, 2003.
- Stopeck A., M. Sheldon, M. Vahedian, G. Cropp, R. Gosalia, and A. Hannah.** Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin.Cancer Res.* **8** (9):2798-2805, 2002.
- Takahashi M., T. Nakamura, T. Toba, N. Kajiwara, H. Kato, and Y. Shimizu.** Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng* **10** (5-6):771-779, 2004.
- Takasaki Y., J. S. Deng, and E. M. Tan.** A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J.Exp.Med.* **154** (6):1899-1909, 1981.

- Tanabe Y., M. Saito, A. Ueno, M. Nakamura, K. Takeishi, and K. Nakayama.** Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol.Cell Biochem.* **215** (1-2):103-113, 2000.
- Tanaka Y., D. P. Schuster, E. C. Davis, G. A. Patterson, and M. D. Botney.** The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J.Clin.Invest* **98** (2):434-442, 1996.
- Taraseviciene-Stewart L., Y. Kasahara, L. Alger, P. Hirth, Mahon G. Mc, J. Waltenberger, N. F. Voelkel, and R. M. Tudor.** Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* **15** (2):427-438, 2001.
- Taraseviciene-Stewart L., L. Gera, P. Hirth, N. F. Voelkel, R. M. Tudor, and J. M. Stewart.** A bradykinin antagonist and a caspase inhibitor prevent severe pulmonary hypertension in a rat model. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **80** (4):269-274, 2002.
- Taraseviciene-Stewart L., R. Scerbavicius, J. M. Stewart, L. Gera, Y. Demura, C. Cool, M. Kasper, and N. F. Voelkel.** Treatment of severe pulmonary hypertension: a bradykinin receptor 2 agonist B9972 causes reduction of pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy. *Peptides* **26** (8):1292-1300, 2005.
- Taraseviciene-Stewart L., R. Scerbavicius, K. H. Choe, C. Cool, K. Wood, R. M. Tudor, N. Burns, M. Kasper, and N. F. Voelkel.** Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **291** (4):L668-L676, 2006.
- Tatebe S., H. Miyamura, M. Sugawara, H. Watanabe, and S. Eguchi.** Induction of right ventricular hypertrophy in neonatal guinea pigs by monocrotaline. *Jpn.Circ.J.* **60** (8):604-608, 1996.
- Thomas G. and P. W. Ramwell.** Identification of guanidino succinate as a putative endogenous source of the endothelium derived relaxing factor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **183** (2):584-589, 1992.
- Tucci M., S. I. Hammerman, S. Furfaro, J. J. Saukonen, T. J. Conca, and H. W. Farber.** Distinct effect of hypoxia on endothelial cell proliferation and cycling. *Am.J.Physiol* **272** (5 Pt 1):C1700-C1708, 1997.
- Tucker A. and J. Rhodes.** Role of vascular smooth muscle in the development of high altitude pulmonary hypertension: an interspecies evaluation. *High Alt.Med.Biol.* **2** (2):173-189, 2001.
- Tuder R. M., B. E. Flook, and N. F. Voelkel.** Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J.Clin.Invest* **95** (4):1798-1807, 1995.
- Tuder R. M., C. D. Cool, M. W. Geraci, J. Wang, S. H. Abman, L. Wright, D. Badesch, and N. F. Voelkel.** Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **159** (6):1925-1932, 1999.
- Tuder R. M., M. Chacon, L. Alger, J. Wang, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, C. D. Cool, A. E. Bishop, M. Geraci, G. L. Semenza, M. Yacoub, J. M. Polak, and N. F. Voelkel.** Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J.Pathol.* **195** (3):367-374, 2001.
- Tuder R. M., J. C. Marecki, A. Richter, I. Fijalkowska, and S. Flores.** Pathology of pulmonary hypertension. *Clin.Chest Med.* **28** (1):23-42, vii, 2007.

- Urbanova D., J. Ressler, J. Widimsky, B. Ostadal, V. Pelouch, and J. Prochazka.** Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat. *Beitr.Pathol.* **150** (4):389-399, 1973.
- van Suylen R. J., J. F. Smits, and M. J. Daemen.** Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **157** (5 Pt 1):1423-1428, 1998.
- Voelkel N. F. and R. M. Tuder.** Severe pulmonary hypertensive diseases: a perspective. *Eur.Respir.J.* **14** (6):1246-1250, 1999.
- Voelkel N. F. and R. M. Tuder.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J.Clin.Invest* **106** (6):733-738, 2000.
- Voelkel N. F., C. Cool, L. Taraceviene-Stewart, M. W. Geraci, M. Yeager, T. Bull, M. Kasper, and R. M. Tuder.** Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med.* **30** (5 Suppl):S251-S256, 2002.
- Voelkel N. F., R. W. Vandivier, and R. M. Tuder.** Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **290** (2):L209-L221, 2006.
- von Euler US., G. Liljestrand.** Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*;12:301-320, 1946.
- Weeks J. L., R. Zoraghi, A. Beasley, K. R. Sekhar, S. H. Francis, and J. D. Corbin.** High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients. *Int.J.Impot.Res.* **17** (1):5-9, 2005.
- Weissmann N., F. Grimminger, D. Walmrath, and W. Seeger.** Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir.Physiol* **100** (2):159-169, 1995.
- Weissmann N., F. Grimminger, A. Olschewski, and W. Seeger.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **281** (2):L314-L317, 2001.
- Weissmann N., M. Nollen, B. Gerigk, Ghofrani H. Ardeschir, R. T. Schermuly, A. Gunther, K. Quanz, L. Fink, J. Hanze, F. Rose, W. Seeger, and F. Grimminger.** Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **284** (3):H931-H938, 2003.
- Weissmann N., E. Akkayagil, K. Quanz, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, L. Fink, J. Hanze, F. Rose, W. Seeger, and F. Grimminger.** Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir.Physiol Neurobiol.* **139** (2):191-202, 2004.
- Weissmann N., N. Sommer, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger.** Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc.Res.* **71** (4):620-629, 2006a.
- Weissmann N., F. Grimminger, and W. Seeger.** Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc.Res.* **71** (4):618-619, 2006b.
- Weissmann N., B. Gerigk, O. Kocer, M. Nollen, S. Hackemack, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, G. Butrous, A. Schulz, M. Roth, W. Seeger, and F. Grimminger.** Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir.Med.* **101** (10):2125-2132, 2007.

- Wharton J., J. W. Strange, G. M. Moller, E. J. Growcott, X. Ren, A. P. Franklyn, S. C. Phillips, and M. R. Wilkins.** Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **172** (1):105-113, 2005.
- Wilson H. L., M. Dipp, J. M. Thomas, C. Lad, A. Galione, and A. M. Evans.** Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J.Biol.Chem.* **276** (14):11180-11188, 2001.
- Xu W., F. T. Kaneko, S. Zheng, S. A. Comhair, A. J. Janocha, T. Goggans, F. B. Thunnissen, C. Farver, S. L. Hazen, C. Jennings, R. A. Dweik, A. C. Arroliga, and S. C. Erzurum.** Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J.* **18** (14):1746-1748, 2004.
- Xue C. and R. A. Johns.** Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* **333** (24):1642-1644, 1995.
- Yee K. W., A. M. O'Farrell, B. D. Smolich, J. M. Cherrington, G. McMahon, C. L. Wait, L. S. McGreevey, D. J. Griffith, and M. C. Heinrich.** SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* **100** (8):2941-2949, 2002.
- Zhang F., P. A. Woodmansey, and A. H. Morice.** Acute hypoxic vasoconstriction in isolated rat small and large pulmonary arteries. *Physiol Res.* **44** (1):7-18, 1995.
- Zhang J., F.J. Adrián, W. Jahnke, S.W. Cowan-Jakob, A.G. Li, R. E. Iacob, T. Sim, J. Powers, C. Dierks, F. Sun, G.R. Guo, Q. Ding, B. Okram, Y. Choi, A. Wojciechowski, X. Deng, G. Liu, G. Fendrich, A. Strauss, N. Vajpai, S. Grzesiek, T. Tuntland, Y. Liu, B. Bursulaya, M. Azam, P. W. Manley, J. R. Engen, G. Q. Daley, M. Warmuth, N. S. Gray.** Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **463** (7280):501-6, 2010.
- Zhang M., N. Koitabashi, T. Nagayama, R. Rambaran, N. Feng, E. Takimoto, T. Koenke, B. O'Rourke, H. C. Champion, M. T. Crow, and D. A. Kass.** Expression, activity, and pro-hypertrophic effects of PDE5A in cardiac myocytes. *Cell Signal.* **20** (12):2231-2236, 2008.
- Zhao L., N. A. Mason, N. W. Morrell, B. Kojonazarov, A. Sadykov, A. Maripov, M. M. Mirrakhimov, A. Aldashev, and M. R. Wilkins.** Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **104** (4):424-428, 2001.
- Zhu D., E. K. Birks, C. A. Dawson, M. Patel, J. R. Falck, K. Presberg, R. J. Roman, and E. R. Jacobs.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **279** (4):H1526-H1533, 2000.

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Hans-Christian Siebert danke ich ganz besonders für die Übernahme der Betreuung in der Veterinärmedizin und dafür, dass er mich so herzlich aufgenommen und unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen „externen“ Betreuer Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly für die Idee zum Projekt „SU5416“, seinen stetigen Bemühungen der fachlichen Betreuung sowie die schnelle Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Norbert Weissmann sei gedankt für die Bereitstellung der Hypoxie-Anlage.

Frau Dr. Eva Dony und Frau Ewa Bieniek ein ganz besonders liebes Dankeschön für ihre unermüdete und fachliche Betreuung bei allen Fragestellungen und ihren aufmunternden Worten sowohl beruflicher als auch privater Art. Durch ihre Mithilfe konnte diese Arbeit zu einem hervorragenden Abschluss gebracht werden.

Einen ganz besonders lieben Dank geht an meine Kolleginnen Dr. Christina Klöpping und Daniela Haag für die hervorragende Zusammenarbeit beim Projekt „Hypoxie-Anlage“ und für euer stetig offenes Ohr für meine privaten und beruflichen Probleme.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Rio Dumitrascu, Dr. Bakyt Egemnazarov, Michael Behrendts, Djuro Kosanovic und Dr. Bholu Kumar Dahal für die fachliche Hilfe und Unterstützung während meiner Experimente.

Gulsina Murzabekova, Sandra Scheidl und Dr. Beate Fuchs danke ich herzlich für die nette Zusammenarbeit und die aufmunternden und lustigen Gespräche während meiner Laborzeit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Karin Quanz und Frau Christina Vroom für die Organisation der Materialbestellungen für meine Experimente.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Karl-Wilhelm Helmus und Prof. Dr. Dr. Gerd Geiger für eure liebevolle und psychologische Unterstützung und jederzeit freundliche Hilfe und Durchsicht meiner Arbeit.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern Claudia und Bernd Helmus, danke ich herzlich für ihre finanzielle Unterstützung und das Sie mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben. Ein herzlicher Dank geht an meine Großeltern Emmi und Bernhard Helmus für die vielen „Kerzen“, die mir stetig Glück und Kraft gegeben haben. Meiner Oma, Ilse-Marie Köhler, sei herzlich gedankt, für ihre Unterstützung und Hilfe in all meinen Lebenslagen. Meinem Bruder, Stephan Helmus, herzlichen Dank, dass ich immer auf dich zählen kann.

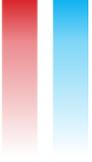
Ein lieber Dank gilt meiner Cousine Dr. Alexandra Müller für das „Schönmachen“ dieser Arbeit und für ihr stetig offenes Ohr für all meine Sorgen.

Herrn Dr. Michael und Florian Köhler ein ganz besonders lieben Dank dafür, dass Ihr mich vor vielen Jahren mit sehr viel Zuversicht und Vertrauen auf den Weg der Tiermedizin geschickt habt und ich diesen Schritt bis heute nicht bereue.

Meinen lieben Freundinnen und Studienkolleginnen, besonders Dr. Julia Wedel, Therese Zinken, Dr. Andrea Kerkman, Kerstin Fiebig und Nicole von der Weiden, danke ich ganz herzlich für eure psychologische und fachliche Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus, die für mich in einer schweren aber doch schönen Zeit sehr hilfreich waren.

Zum Schluß geht ein ganz besonders liebes Dankeschön an all meine Freunde, ohne euch wäre die Welt richtig langweilig. Schön, dass es euch gibt!

Herzlichen Dank!



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5704-6



9 783835 195704 6