



**HYPOXIE-INDUZIERTE PULMONALE HYPERTONIE:
Reversibilität und therapeutische Effekte durch
körperliches Training**

Christina Klöpping

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition 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.

1st 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

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Veterinärphysiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Joachim Roth
und
dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Gießen
Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weissmann

Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie:
Reversibilität und therapeutische Effekte durch
körperliches Training

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

eingereicht von

Christina Klöpping

Tierärztin aus Herford

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Norbert Weissmann

Tag der Disputation: 11. November 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 in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christina Klöpping

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Einführung in die Thematik	4
1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	6
1.2.1 Akute und protrahierte alveoläre Hypoxie	7
1.2.2 Chronische Hypoxie.....	9
1.3 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH)	10
1.3.1 Definition	10
1.3.2 Klassifikation	11
1.4 Experimentelle Tiermodelle	12
1.4.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Maus-Modell	13
1.4.2 Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten-Modell.....	14
1.5 Der NO/cGMP Signaltransduktionsweg	15
1.6 Phosphodiesterasen in pulmonaler Hypertonie	16
1.7 Der Phosphodiesterase-Inhibitor Sildenafil als Standardtherapeutikum zur Behandlung der PH	17
1.8 Der Einfluss körperlichen Trainings auf die vaskuläre Funktion	18
1.9 Pulmonale Hypertonie und körperliches Training	19
1.10 Zielsetzung	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Versuchstiere	22
2.2 Tierversuchsgenehmigung	22
2.3 Injektionslösungen und Substanzen	23
2.4 Verbrauchsmaterial	23

2.5	Geräte	25
2.6	Histologische Untersuchungen	25
2.7	Telemetrische rechtsventrikuläre Blutdruckmessung	28
2.8	Laufband/Zubehör	29
2.9	Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH	30
2.9.1	Experimentelles Design	30
2.9.2	Haltung der Tiere während des Versuchs	30
2.9.3	Hämodynamische Messungen am Ganztier	31
2.9.4	Blutentnahme zur Hämatokritmessung	32
2.9.5	Entnahme der Lunge	32
2.9.6	Präparation des Herzens	33
2.9.7	Immunhistochemische Untersuchungen	34
2.10	Training und pulmonale Hypertonie	38
2.10.1	Experimentelles Design	38
2.10.2	Applikation von Sildenafil	38
2.10.3	Versuchsablauf	41
2.10.4	Leistungsdiagnostik	43
2.10.5	Vorbereitung und Implantation der Transmitter	44
2.10.6	Explantation der Transmitter	46
2.10.7	Immunhistochemie: Anti-alpha Aktin/Faktor VIII und Anti-PDE 5A	47
2.11	Statistische Auswertung	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH	49
3.1.1	Gewichtsentwicklung unter Hypoxie	49
3.1.2	Hämatokrit	50
3.1.3	Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP)	52
3.1.4	Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie	54
3.1.5	Morphometrische Analyse der LungengefäÙe	55
3.2	Training und pulmonale Hypertonie	58
3.2.1	Gewichtsentwicklung der Tiere	58
3.2.2	Gehstrecke	58
3.2.3	VO ₂ max in ml O ₂ /min/kg Körpermasse	60

3.2.4	Telemetrisch ermittelter rechtsventrikulärer Druck (RVSP).....	62
3.2.5	Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie	64
3.2.6	Muskularisierungsgrad der pulmonal-arteriellen Gefäße	65
4	DISKUSSION	68
4.1	Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH	68
4.1.1	Wahl des Tiermodells	68
4.1.2	Normoxie-bedingte Effekte auf die pulmonalen Gefäße, die Rechtsherzhypertrophie und die RVSP.....	70
4.2	Training und pulmonale Hypertonie	75
4.2.1	Gegenwärtige Therapien der PH.....	75
4.2.2	Wahl des Tiermodells	76
4.2.3	Effekte körperlichen Trainings auf die Gehstrecke und die VO ₂ max im Vergleich zu einer Standardtherapie	78
4.2.4	Effekte körperlichen Trainings auf den Muskularisierungsgrad im Vergleich zu einer Standardtherapie.....	82
4.2.5	Effekte körperlichen Trainings auf den RVSP und die Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zu einer Standardtherapie.....	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	SUMMARY	90
7	LITERATURVERZEICHNIS	92
8	DANKSAGUNG	110

Abkürzungen

A.	Arteria
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5`-GMP	Guanosinmonoposphat
6-MWT	6-Minuten-Gehtest
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALK 1	Activin-like-kinase-type 1
APAH	pulmonal-arterielle Hypertonie assoziiert mit bestimmten Faktoren
BMPR2	Bone-morphogenetic-protein-receptor-β
Ca ²⁺	Kalziumionen
cADP	zyklisches Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	cardiac output
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
Fa.	Firma
Fhl-1	four and a half lim domains protein 1
FiO ₂	inspiratorische O ₂ -Fraktion
FPAH	familiäre Form der pulmonal-arteriellen Hypertonie
g	Gramm
Gll.	Glandula
HPV	hypoxische Vasokonstriktion
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
ICH	Immunohistochemie
IL-1	Interleukin 1
IL-8	Interleukin 8
i-NOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase

IPAH	idiopatische pulmonal-arterielle Hypertonie
kg	Kilogramm
M	Molar
m/s	Meter pro Sekunde
MCT	Monocrotalin
Mio.	Millionen
ml/kg/min	Milliliter pro Kilogramm pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPTS	Metabolic Performance Testing System
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n-NOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthetase
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
°C	Grad Celsius
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	pulmonal-arterieller Druck
PASMC	pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PC	personal computer
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
PH	pulmonale Hypertonie
PHS	pulmonales Hypertonie Syndrom
PKG	Proteinkinase G
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
RV/(LV+S)	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
s.c.	subkutan

SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche Guanylatzyklase
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming-growth-factor- β
v	Geschwindigkeit
V.	Vena
VEGF	Vaskular endothelium growth factor
v_{\max}	maximale Geschwindigkeit
$VO_{2\max}$	maximale Sauerstoffaufnahme
VP	Beatmungsdruck
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organization
6-MWT	6-Minuten-Walk Test, 6-Minuten-Gehtest

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Die Lungen sind paarige Organe und liegen im Brustraum (Thorax) beidseits des Mittelfellraumes (Mediastinum) in jeweils einer Pleurahöhle, deren Begrenzung das Zwerchfell darstellt. Zu den Seiten und nach oben wird die Lunge durch den Brustkorb abgegrenzt. Die Lungenspitzen ragen in die obere Thoraxspitze und stehen höher als die erste Rippe. Jede Lunge wird durch tiefe Einschnitte in eine bestimmte Anzahl von Lungenlappen unterteilt, die sich ihrerseits wieder in Segmente unterteilen lassen. Jedes Segment wird von jeweils einem Segmentbronchus versorgt. An der zum Mittelfell gerichteten Seite befindet sich die Lungenpforte. Hier treten Bronchien, Arterien und vegetative Nerven ein sowie Venen und Lymphgefäße aus. Die Bronchien teilen sich im Lungengewebe unter kontinuierlicher Abnahme ihrer Durchmesser. Von der Endverzweigung des Bronchialbaumes (Bronchioli terminales) zweigen mehrere kleine Äste ab (Bronchioli respiratorii), von denen jeder in zwei Alveolargänge (Ductuli alveolares) mündet. Diese führen schließlich in die Alveolarsäckchen (Sacculi alveolares). Zusammen besitzen beide Lungen ca. 300 Mio. Lungenbläschen, von denen jedes einen Durchmesser von etwa 0,2 mm besitzt. Demnach hat ein erwachsener Mensch eine Fläche von ca. 100m² für den Gasaustausch zur Verfügung. Die Äste der Lungenarterien folgen dem Bronchialbaum bis zu den Alveolen, welche von dem Kapillarnetz körbchenartig umgeben sind. An dieser Stelle erfolgt der Gasaustausch (Faller 1995).

Die Hauptfunktion der Lunge besteht in der äußeren Atmung. Zusätzlich transportiert sie kleinste Schmutzpartikel über das Flimmerepithel ab. Die pulmonale Strombahn unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von den Strombahnen anderer Organe. Anders als im Körperkreislauf herrschen hier niedrigere Drücke. Die arteriellen Drücke und vaskulären Widerstände betragen nur 1/8 der Werte des großen Kreislaufs. Der daraus resultierende niedrigere Perfusionswiderstand ergibt sich aus der Anatomie der kleinen Lungenarterien, die nur bis zu einer Gefäßweite von 80µm eine kontinuierliche Muskularisierung

besitzen. Gefäße, die sich weiter distal befinden, sind partiell muskularisiert. Im weiteren Verlauf gehen sie in nicht-muskularisierte Gefäße über. Divergierend zum Körperkreislauf führt Hypoxie in der Lunge zu einer Vasokonstriktion und nicht zur Vasodilatation (Seeger *et al.* 2000).

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Erkrankung, die den Lungenkreislauf betrifft. Sie ist gekennzeichnet durch einen zunehmenden Anstieg des Gefäßwiderstandes und einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf. Unbehandelt ist diese Erkrankung mit einer schlechten Prognose behaftet. Die gravierendste Folge der PH besteht in der chronischen Rechtsherzbelastung, die zur Ausbildung des Cor pulmonale bis hin zum Rechtsherzversagen führen kann. Die PH kann entweder auf Grund einer Lungenkrankheit oder als primäre Form, d.h. ohne erkennbare Ursache, vorliegen. Nach der aktuellen Klassifikation (Venedig 2003) wird die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) von den anderen Formen der pulmonalen Hypertonie abgegrenzt. Unter dem Begriff der PAH wurden nach der neuen WHO-Klassifikation die idiopatischen (IPAH), die familiären (FPAH) und die assoziierten (APAH) Formen sowie die PAH mit venöser oder kapillärer Beteiligung zusammengefasst (Simonneau *et al.* 2004). Die Pathogenese der PAH ist multifaktoriell, und die genauen Pathomechanismen, die zur Entwicklung der pulmonal-arteriellen Hypertonie führen, konnten bis heute noch nicht ausreichend geklärt werden. Aktuelle genetische und pathophysiologische Untersuchungen zeigen, dass die Kombination genetischer Faktoren und assoziierter Erkrankungen und/oder Triggermechanismen zur Manifestation der Erkrankung führen. Bei der Entstehung der PAH werden als prädisponierende Faktoren die Mutationen im bone-morphogenetic-protein-receptor- β (BMP2) und activin-like-kinase-type-1 (ALK1) diskutiert (Newman *et al.* 2004). Diese Rezeptoren sind Mitglieder der Transforming growth-factor- β - (TGF- β) Familie. Da die Mutationen jedoch nur eine geringe Penetranz von 5-20 % aufweisen, sind sie lediglich als prädisponierende Faktoren anzusehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der genetischen Prädisposition weitere Mechanismen existieren müssen, die die Pathomechanismen in Gang setzen, damit es zur Gefäßschädigung und zum pulmonal-hypertensiven Status kommt (Rubin u. Galie 2004). Diskutiert werden u.a. Anomalien in zellulären Signalwegen. Innerhalb dieser existieren

verschiedene Mediatorsysteme, die Endothelin-1-, Prostazyklin- und NO-vermittelte Signale beinhalten. Diese Faktoren stellen den therapeutischen Angriffspunkt der derzeit zugelassenen medikamentösen Therapieoptionen dar. Damit eine Behandlungsstrategie jedoch effektiv ist, muss sich diese gegen das schwere pulmonal-vaskuläre Gefäßremodeling richten, damit es zu einer Regression der Krankheit kommt. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten zielen deshalb vor allem auf eine Verbesserung der Vasoreaktivität, der Verbesserung der Lebensqualität und Erhöhung der Lebenserwartung ab.

In Verbindung mit dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie wird körperliches Training als eine zusätzliche unterstützende Therapiemaßnahme kontrovers diskutiert. In der letzten Zeit verdichten sich jedoch die Hinweise dafür, dass es einen Nutzen in der Therapie der pulmonalen Hypertonie bieten könnte. Erst kürzlich konnte eine Studie Anhaltspunkte dafür liefern. Entgegen der gängigen Lehrmeinung profitierten Patienten mit pulmonaler Hypertonie unter kontrollierter Therapie von einem wohldosierten körperlichen Training (Mereles *et al.* 2006). Diese Untersuchung konnte aber keinen Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen geben. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu der Frage leisten, ob das führende Geschehen bei pulmonaler Hypertonie, der Gefäßumbauprozess, durch eine präventive Trainingsintervention positiv beeinflusst werden kann.

1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Eine angemessene Sauerstoffzufuhr ist für alle höheren Lebewesen, insbesondere für den Menschen, von besonderer Bedeutung. Sauerstoff spielt zum einen als Oxidationsmittel eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung zur Bildung von ATP in den Mitochondrien und ist zum anderen auch als Substrat an verschiedenen enzymatischen Prozessen beteiligt. Da der Sauerstoffversorgung des Körpers eine so wichtige Rolle zukommt, ist eine Optimierung des Gasaustausches in der Lunge besonders wichtig. In diesem Zusammenhang besitzt die HPV eine wichtige Rolle. Sie ist als physiologische Antwort der Lunge auf die sich ständig ändernden lokalen Ventilationsbedingungen zu sehen.

Die HPV wird in zwei Phasen eingeteilt: 1. die akute alveoläre Hypoxie (entsteht binnen Sekunden bis Minuten), 2. die protrahierte alveoläre Hypoxie (Stunden), welche zu den chronischen Hypoxieprozessen überleitet, und 3. die chronische Hypoxie, die zur pulmonalen Hypertonie mit verbundenem Gefäßumbau führt (Weissmann *et al.* 2001).

1.2.1 Akute und protrahierte alveoläre Hypoxie

Auf normobare und hypobare Hypoxie reagiert der Organismus mit einer Reihe von Adaptionsmechanismen. Normobare Hypoxie ist durch eine Herabsetzung des Sauerstoffpartialdruckes in der Umgebungsatmosphäre gekennzeichnet. Von hypobarer Hypoxie spricht man, wenn die Gaskonzentration der Atmosphäre unverändert ist, jedoch durch den Aufenthalt in großen Höhen ein geringerer Druck vorliegt. Dieser niedrigere Druck führt zu einer Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in den Alveolen. In dieser Situation kommt es zu einer erschwerten Sauerstoffaufnahme.

Einer der wichtigsten Adaptionsmechanismen des Organismus zur Optimierung des Gasaustausches liegt in der Anpassung der Perfusion an die Ventilation und ist als Antwort der Lunge auf alveoläre Hypoxie zu verstehen. Minderbelüftete Lungenareale reagieren mit einer Erhöhung des Gefäßtonus präkapillärer Lungengefäße. Daraus resultiert eine Drosselung des Blutflusses zugunsten besser belüfteter Areale (siehe Abbildung 1). Dadurch wird der Gasaustausch optimiert und einer arteriellen Hypoxämie entgegengewirkt. Von Euler und Liljestrand beschrieben 1946 erstmals das Phänomen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV). Dieses Phänomen ist als physiologische Antwort auf alveoläre Hypoxie den meisten Säugern gemeinsam. Schon durch vergleichsweise milde Hypoxie (<80 mmHg) können die kompensierenden Mechanismen der HPV ausgelöst werden (Weissmann *et al.* 1995). Die Kontraktion wird durch die Stimulation mehrerer Signalwege eingeleitet, die letztendlich eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken (Aaronson *et al.* 2006). Ihre Intensität hängt von der Stärke und Dauer der alveolären Hypoxie ab. Von Euler und Liljestrand fanden bei ihren

Untersuchungen heraus, dass der pulmonal-arterielle Druck während Ventilationsphasen mit einer O_2 -Konzentration von 10% ansteigt. Dieser Anstieg war reversibel und kehrte in Phasen der Ventilation mit Raumluft auf den Ausgangswert zurück. Obwohl die Frage nach dem genauen Sauerstoffsensor und des hierdurch aktivierten Signaltransduktionsweges noch nicht zufriedenstellend geklärt ist, werden als Sensor- und Effektorzellen die pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) beschrieben, da sich diese isoliert unter Hypoxie kontrahieren können und ein Anstieg des intrazellulären Kalziums messbar ist (Madden *et al.* 1992; Murray *et al.* 1990; Weissmann *et al.* 2006). Neueste Untersuchungen zeigen, dass verschiedenen Enzymen innerhalb der Atmungskette, wie z. B. NAD(P)H-Oxidase (Marshall *et al.* 1996), Cytochrom P450-Enzyme (Zhu *et al.* 2000), Hämoxigenase-2 (Hoshi u. Lahiri 2004), ADP-Ribosezyklase und der cADP-Ribose-Hydrolase (Wilson *et al.* 2001) in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zukommen könnte.

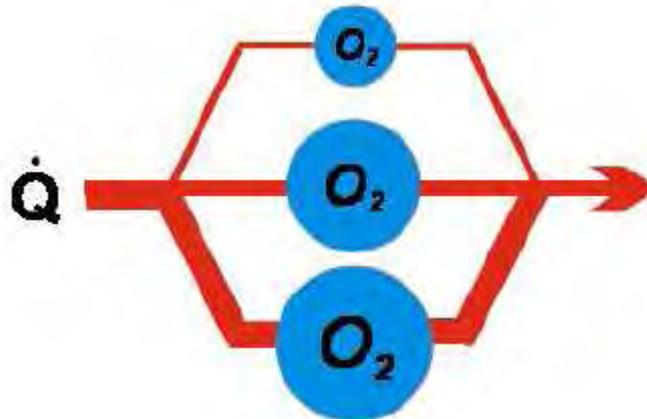


Abbildung 1: Effekt der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Das Schema zeigt den Einfluss der HPV auf den Blutfluss (Q) in der Lunge. Durch Konstriktion der Gefäße (dünne rote Linie) in Regionen niedrigen Sauerstoffpartialdruckes (kleiner blauer Kreis, oberer Teil der Darstellung) wird Blut in Regionen hohen Sauerstoffpartialdruckes (großer blauer Kreis) dirigiert (dicke rote Linie, im unteren Teil der Darstellung).

Die Reaktion der Gefäße auf akute Hypoxie verläuft in 2 Phasen. In der ersten, akuten Phase kommt es innerhalb von Sekunden zum Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes, der nach weiteren 5 bis 15 Minuten teilweise nachlässt. Danach folgt bei Anhalten der Hypoxie die zweite, subakute oder

protrahierte Phase, die durch eine erneute Zunahme der Vasokonstriktion gekennzeichnet ist. Nicht alle Untersucher finden eine biphasische Reaktion, sie ist jedoch für intakte Lungenmodelle und isolierte pulmonal-arterielle Gefäße beschrieben (Bennie *et al.* 1991; Weissmann *et al.* 1995; Weissmann *et al.* 2001). Bisher liegen nur wenige Untersuchungen vor, die sich mit dem Verlauf der HPV über mehrere Stunden befassen. Darüber hinaus konnte noch nicht ausreichend geklärt werden, ob die erste und zweite Vasokonstriktion unter protrahierter Hypoxie durch identische oder unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Dabei scheint gerade diese Phase der HPV wichtig zu sein, da es unter chronischer Hypoxie zum Gefäßumbau der Lungengefäße kommt.

1.2.2 Chronische Hypoxie

Durch die generalisierte chronische Hypoxie findet die HPV in der gesamten Lunge statt, und führt so zur Erhöhung des Lungenwiderstandes, Rechtsherzhypertrophie und Umbauprozessen in den Lungenarterien, dem vaskulären Remodeling (siehe Abbildung 2). Das vaskuläre Remodeling der kleinen Pulmonalarterien beinhaltet die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßmedia und die Einwanderung von Fibroblasten aus der Adventitia in die Media (Stenmark *et al.* 2002; Stenmark *et al.* 2006). Dieser Prozess führt zu einer Mediaverdickung. Zusätzlich findet eine *de-novo*-Muskularisierung kleiner unter Normoxie nicht-muskularisierter Gefäße statt. (Humbert *et al.* 2004). Diese strukturellen Umbauprozesse führen zu Querschnittsverlegung (Obliteration). Zusätzlich kann es zu einem Gefäßverlust (Rarefizierung) (Stenmark u. Mc Murty 2005) und folglich zu einem erhöhten Lungenwiderstand mit verbundenem Druckanstieg, verbundener Rechtsherzhypertrophie und einer Reduktion des Herz-Zeit-Volumens (HZV) kommen. Als zu Grunde liegender Mechanismus wird der direkte Einfluss von Hypoxie auf das Zellwachstum diskutiert, der mit der Proliferation von Fibroblasten (Welsh *et al.* 1998; Das *et al.* 2002), Hemmung des endothelialen Zellwachstums (Tucci *et al.* 1997) und Stimulation des pulmonal-arteriellen Zellwachstums (Dempsey *et al.* 1991) einhergeht. Dadurch treten Inbalancen zwischen verschiedenen Wachstumsfaktoren und vasoaktiven Substanzen wie z.B. NO, Endothelin-1, Serotonin und Thromboxan auf, die auf

den Vasotonus und das Zellwachstum Einfluss nehmen. Diese Mediatoren stehen unter physiologischen Bedingungen in einem kontinuierlichen Gleichgewicht. Unter Einfluss von Hypoxie wird die Produktion und/oder Freisetzung vasodilatativer Mediatoren zu Gunsten vasokonstriktiver Mediatoren verschoben (Budhiraja *et al.* 2004). Die chronische Verengung der Lungengefäße führt zu einem erhöhten Blutdruck im Lungenkreislauf und mündet somit in das Krankheitsbild der PH.

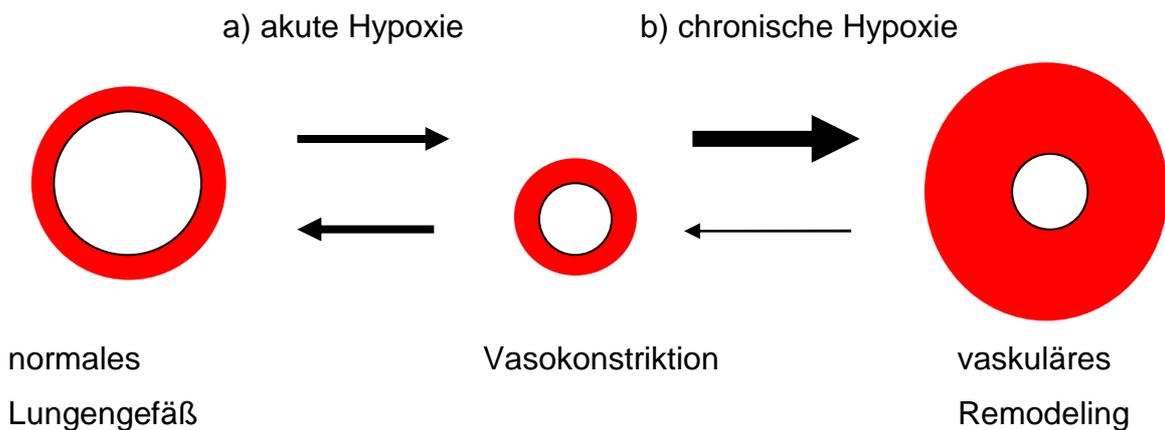


Abbildung 2: Effekte von akuter und chronischer Hypoxie auf die Lungenarterien. Akute Hypoxie führt zu einer physiologischen Vasokonstriktion (a). Chronische Hypoxie führt zu Umbauprozessen in den Lungenarterien und zu einer Verengung des Lumens (b). Die pulmonale Vasokonstriktion unter akuter Hypoxie stellt einen reversiblen Prozess dar. Vaskuläres Remodeling ist gegenüber akuter re-Exposition unter Normoxie irreversibel.

1.3 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH)

1.3.1 Definition

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwere, oftmals lebensbedrohliche Erkrankung der pulmonalen Strombahn, bedingt durch die Folgen pathologisch anhaltender Vasokonstriktion und von Umbauprozessen im pulmonalen Gefäßbett in Form von Mediahypertrophie, Intimafibrose, Endothelzellproliferation und plexiformen Läsionen (Seeger *et al.* 2000). Von PH

spricht man, wenn ein pulmonal-arterieller Mitteldruck (mPAP) zwischen 20 und 25 mmHg in Ruhe vorliegt. Ab 25 mmHg spricht man von einer manifesten PH (Hoepfer *et al.* 2008). Die geschätzte Inzidenz der IPAH liegt bei ein bis zwei Fällen pro 1 Mio. Personen. Zudem liegt eine Prädisposition bei Frauen im jungen und mittleren Alter vor. Ungefähr 10% der Fälle treten familiär gehäuft auf (Gaine u. Rubin 1998). Ohne effiziente Therapie ist der natürliche Verlauf der Erkrankung durch eine hohe Letalität und eine begrenzte Lebenserwartung von im Durchschnitt 2,8 Jahren nach Diagnosestellung gekennzeichnet (D'Alonzo *et al.* 1991). Die häufigste Todesursache stellt bei diesen Patienten das Herzversagen dar. Da keine spezifischen Symptome der PH existieren, ist die Diagnostik schwierig. Die anfänglich unspezifischen Beschwerden veranlassen den Patienten erst spät, einen Arzt aufzusuchen. Die vorherrschende klinische Symptomatik schließt herabgesetzte Belastbarkeit, Müdigkeit und Dyspnoe ein. Erschöpfung gilt als häufiges Frühsymptom. Bestehen bereits Angina pectoris und Synkopen, kann von einem fortgeschrittenen Stadium ausgegangen werden (Rubin 1997). Neue antiproliferative Therapieansätze verbesserten die Prognose sowie die Versorgung der Patienten. Auf der vierten Weltkonferenz für pulmonale Hypertonie in Kalifornien (2008) wurde jüngst klargestellt, dass die PH keine unheilbare Krankheit mehr ist (Humbert 2008).

1.3.2 Klassifikation

Die Klassifikation und Nomenklatur der PH wurde auf der dritten Weltkonferenz für pulmonale Hypertonie, die im Jahre 2003 in Venedig stattfand, grundlegend verändert (Simonneau *et al.* 2004). Ein Grund war, dass man Fortschritte im Verständnis über Mechanismen, die im Zusammenhang mit der Pathogenese der PH stehen, erkannt hatte. Nach dieser neuen Klassifikation wird die PAH von anderen Formen der PH abgegrenzt, die als Folge von Linksherzerkrankungen, chronischen Lungenerkrankungen, thrombo-embolischen Ereignissen oder anderen Erkrankungen auftreten können. In der folgenden Abbildung wird die Einteilung der PAH nach deren Ursache aufgeführt.

- 1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)**
 1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)
 2. Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH)
 3. Pulmonalarterielle Hypertonie assoziiert mit (APAH)
 1. Bindegewebserkrankungen
 2. Angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts (u.a. Herzfehler)
 3. Portaler Hypertension
 4. HIV-Infektion
 5. Medikamenten und Giftstoffen
 6. Anderen Erkrankungen (Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Splenektomie usw.)
 4. Pulmonalarterielle Hypertonie mit relevanter venöser oder kapillärer Beteiligung
 1. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
 2. Pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)
 5. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen**
 1. Erkrankungen des linken Vorhofes oder Ventrikels
 2. Mitral- oder Aortenklappenfehler
- 3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/ oder Hypoxie**
 1. Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
 2. Interstitielle Lungenerkrankung
 3. Schlafapnoe-Syndrom
 4. Alveoläre Hypoventilation
 5. Chronische Höhenkrankheit
 6. Anlagebedingte Fehlbildungen
- 4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)**
 1. Thrombembolischer Verschluss proximaler Lungenarterien
 2. Thrombembolischer Verschluss distaler Lungenarterien
 3. Nicht-thromboembolische Lungenembolien (Tumoren, Parasiten, Fremdkörper)
- 5. Verschiedenes (Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangiomatose usw.)**

Abbildung 3: Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie, Venedig 2003

1.4 Experimentelle Tiermodelle

Für die weiterführende Erforschung der genauen Ursachen und Mechanismen der PH ist es bedeutsam, experimentelle Tiermodelle heranzuziehen, die die pathologischen Prozesse, die bei der Entstehung und Erhaltung der PH eine Rolle spielen, aufweisen. Die Literatur beschreibt verschiedene Möglichkeiten zur Induktion der pulmonalen Hypertonie in Tieren. Die Exposition unter Hypoxie und die Injektion von Monocrotalin (MCT) stellen dabei die am häufigsten genutzten Modelle dar. Diese Tiermodelle werden nicht nur eingesetzt, um die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen zu ergründen, sondern auch, um neue Einsichten in mögliche Therapiestrategien zu erforschen (Campian *et al.* 2006). Im Folgenden werden diese beiden wichtigsten Modelle vorgestellt. Sie

dienen abschließend als Diskussionsgrundlage für die innerhalb dieser Arbeit gestellten Fragestellungen.

1.4.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Maus-Modell

Chronische Exposition unter Hypoxie führt zur Ausbildung der pulmonalen Hypertonie (Urbanova *et al.* 1973). Innerhalb der verschiedenen Spezies bestehen Unterschiede in der Empfänglichkeit für den hypoxischen Stimulus. So zeigen Kaninchen fast keinerlei Reaktion, Rinder entwickeln hingegen die stärkste Vasokonstriktion (Reeve *et al.* 1979). Weitere Arbeitsgruppen zeigten Unterschiede innerhalb der Hypoxieantwort beim Menschen (Naeije *et al.* 1982; Weitzenblum u. Chaouat 2001). Intermittierende Hypoxie führt im Tiermodell – weitgehend unabhängig von der Dauer der Intervalle zwischen Hypoxie und Normoxie – zur Ausbildung der PH (Widimsky *et al.* 1980). Die Rückkehr unter normoxische Bedingungen führt zu einer partiellen Revertierung des pulmonalen Gefäßumbaus im Rattenmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (Ressler *et al.* 1974; Hislop u. Reid 1977; Meyrick u. Reid 1980; Fried u. Reid 1984). Dieser Adaptationsvorgang stellt einen natürlichen physiologischen Prozess dar. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen jedoch noch keine detaillierten Untersuchungen zur Revertierung des Gefäßumbaus im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie vor. Diese Untersuchungen sind aber nicht nur von großer Bedeutung, um die zeitliche Abfolge der Revertierung des Gefäßumbaus zu zeigen, sondern stellen darüber hinaus die Basis dar, zugrunde liegende molekulare Mechanismen zu beleuchten. In diesem Zusammenhang machen genetisch-veränderte Tiere eine gezielte Untersuchung spezieller Stoffwechselwege denkbar. Studien zeigten dabei die Bedeutung des NO-cGMP-Stoffwechselweges in Hinblick auf die Entwicklung struktureller Lungengefäßveränderungen unter chronischer Hypoxie (Fagan *et al.* 2001; Ozaki *et al.* 2001). Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt.

1.4.2 Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie im Ratten-Modell

Lalich und Merkow beschrieben 1961 erstmals das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie (Lalich u. Merkow 1961). Es basiert auf einer einzigen Injektion von Monocrotalin (60mg/kg intraperitoneal oder subkutan). Monocrotalin ist ein Pflanzenalkaloid aus der Pflanze *Crotalaria spec.*, die zu der Familie der Leguminosen gehört. Dieses Modell wird verwendet, seitdem gezeigt wurde, dass es ähnliche pathologische und pathohistologische Veränderungen erzeugt, wie sie bei der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie des Menschen zu finden sind (Meyrick u. Reid 1980). Durch die Kombination von einer MCT-Injektion und einer einseitigen Pneumektomie werden sowohl die neointimalen Veränderungen als auch der Verschluss kleiner Lungenarteriolen herbeigeführt. In der Leber werden die Pyrrolizidinalkaloide durch mischfunktionelle Oxidasen (Cytochrom-P450-Enzyme) metabolisiert. Dadurch entstehen pyrrolische Dehydroalkaloide (Mattocks 1968). Diese Verbindungen sind sehr reaktiv und werden von der Leber in die Blutbahn abgegeben und induzieren in der Lunge charakteristische Gefäßläsionen. Zusätzlich entstehen durch Monocrotalin auch in anderen Organen nennenswerte Veränderungen. Diese umfassen Leberzellnekrose und Leberzellhyperplasie, Leberzirrhose sowie -fibrose, veno-okklusive Lebererkrankungen, Glomerulopathien und schließlich sekundäre Veränderungen am Zentralnervensystem, die durch die Leberschädigung und damit verbundene erhöhte Freisetzung von Ammoniak entstehen. Es existieren Unterschiede in der Empfänglichkeit und damit verbundenen Ausbildung der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie zwischen den Spezies. Speziell Mäuse reagieren in deren Folge resistent und entwickeln keine PH, sondern zeigen akute Lungenschädigung mit fibrotischen Veränderungen. Anders als Ratten verfügen Mäuse über einen Reparaturmechanismus dieser Läsionen (Dumitrascu *et al.* 2008). Widersprüchlich dazu ist eine andere Arbeit, in der die Monocrotalin-induzierte PH bei der Maus beschrieben wurde (Raoul *et al.* 2007). Weitere Anwendung findet dieses Modell bei Hunden (Takahashi *et al.* 2004), Kaninchen (Gunaydin *et al.* 2002) und Lämmern (Katayama *et al.* 1995).

1.5 Der NO/cGMP Signaltransduktionsweg

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein leicht diffundierendes Gas, das den Gefäßtonus bereits in sehr geringer Konzentration reduziert und als potenter Vasodilatator darstellt. NO wird im Wesentlichen in der Lunge durch NO-Synthasen generiert. Hauptbildungsort ist das Gefäßendothel und das Atemwegsepithel (Ghofrani *et al.* 2004). Bis heute konnten drei NO-Synthasen identifiziert werden: die endotheliale NO-Synthase (e-NOS, NOS3), die induzierbare NO-Synthase (i-NOS, NOS2) und die neuronale NO-Synthase (n-NOS, NOS1). Innerhalb des kardio-vaskulären Systems stellt die e-NOS die wichtigste NOS-Isoform dar. NO wird durch die endotheliale NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff hergestellt. Vom Entstehungsort aus diffundiert NO durch die Zellmembran in die darunter liegende Muskelschicht und aktiviert die lösliche Guanylatcyclase (sGC), ein Häm-Protein (Ignarro *et al.* 1987). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), einem second messenger, und einer daran anschließenden Gefäßdilataion. Seine Wirkung bei der Signaltransduktion entfaltet cGMP über die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG). Das cGMP-Signal wird durch Phosphodiesterasen beendet, die den second messenger zu Guanosinmonophosphat (5'-GMP) hydrolysieren (Beavo u. Brunton 2002).

Neben der Rezeptor-vermittelten Aktivierung induzieren insbesondere Scherkräfte (shear stress) eine gesteigerte e-NOS-Aktivität und sind demzufolge Schlüssel-Regulatoren der NO-Synthese. Eine erhöhte Blutflussrate bewirkt durch die Phosphorylierung von e-NOS eine erhöhte NO-Synthese (Corson *et al.* 1996). Dieser akut einsetzende vasodilatative Effekt wird durch verschiedene Scherkraft-sensitive Mechanorezeptoren übermittelt (siehe Abbildung 4). Die vermehrte NO-Synthese führt zu einer schnellen Anpassung an die erhöhte Blutflussrate mit einhergehender Vasodilatation und folglich zu verminderter Scherkraft. Die Blockierung der NO-Synthese durch den Antagonisten NG-Monomethyl-L-Arginin verstärkt hingegen die hypoxische Vasokonstriktion (Archer *et al.* 1989). Patienten mit pulmonaler Hypertonie zeigen eine reduzierte NO-Verfügbarkeit (Xu *et al.* 2004). Es gibt sowohl klinische Studien, in denen bei diesen Patienten eine verminderte e-NOS-Expression festgestellt wurde (Gaiad u.

Saleh 1995), als auch Studien, in denen im Gegenteil dazu eine erhöhte e-NOS-Expression gezeigt wurde (Xue u. Johns 1995).

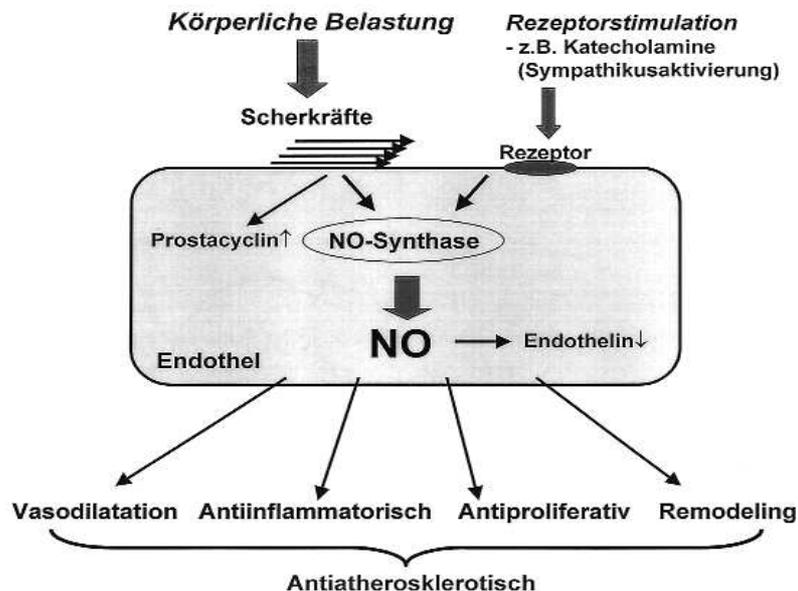


Abbildung 4: Flussabhängige und rezeptorabhängige Freisetzung von NO (aus Britten, 2000)

1.6 Phosphodiesterasen in pulmonaler Hypertonie

Die Aufreinigung und Charakterisierung von Phosphodiesterasen (PDE) wurde erstmals von Butcher und Sutherland 1962 beschrieben (Butcher 1962). Phosphodiesterasen sind eine Gruppe von Metallophosphohydrolasen, welche die second messenger cGMP und cAMP abbauen. Zu den allgemeinen Strukturmerkmalen gehört eine homologe katalytische Domäne aus ca. 300 Aminosäuren am C-Terminus und Histidin als wichtigste Aminosäure in diesem Bereich. Proteindomänen, die an der Regulation der enzymatischen Aktivität und der subzellulären Lokalisation beteiligt sind, befinden sich größtenteils im N-terminalen Teil. Derzeit sind 21 PDE-Gene identifiziert, die in 11 Gruppen zusammengefasst wurden (Raja u. Nayak 2004). Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer strukturellen Ähnlichkeiten wie Sequenzhomologie, Proteindomänen oder enzymatische Eigenschaften (Substratspezifität, Kinetik, Sensitivität gegenüber endogenen Regulatoren und Inhibitoren) (Kulkarni u. Patil

2004). Die einzigartigen Charakteristika jeder PDE-Genfamilie werden durch die N-terminalen Proteindomänen definiert.

1.7 Der Phosphodiesterase-Inhibitor Sildenafil als Standardtherapeutikum zur Behandlung der PH

Phosphodiesterasen spielen in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie eine besondere Rolle. Die bedeutsamste Phosphodiesterase-Isoform in der Lunge ist die PDE-5, eine cGMP-abbauende PDE. Bei Patienten mit PH wurde eine Überexpression der PDE-5 in der Lunge nachgewiesen (Sanchez *et al.* 1998; Murray *et al.* 2002). Sildenafil ist ein selektiver PDE-5-Inhibitor, der seit 1998 für die Behandlung erektiler Dysfunktionen eingesetzt wird (Morales *et al.* 1998; Cheitlin *et al.* 1999). Wegen der oralen Verfügbarkeit und einer hohen Selektivität zu cGMP-hydrolysierenden PDE-5, ist Sildenafil seit 2005 auch in Europa und den USA unter dem Handelsnamen Revatio® zur Behandlung der PH zugelassen (Ghofrani *et al.* 2002; Ghofrani *et al.* 2003).

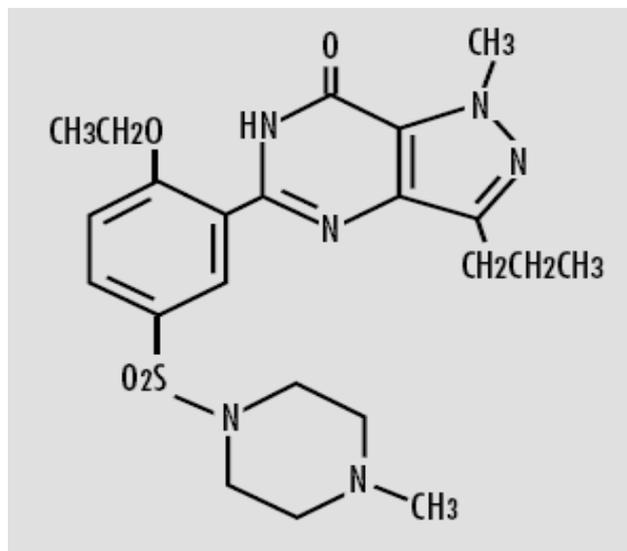


Abbildung 5: Strukturformel von Sildenafil (aus Böhm *et al.*, 2004)

Neben einer hohen Selektivität zu der cGMP-hydrolysierenden PDE-5 besitzt Sildenafil eine weitaus schwächere zu PDE-1 und PDE-6 (Raja *et al.* 2006). Die

Therapie mit Sildenafil erfolgt in einer Dosierung von jeweils 3-mal täglich je 20 mg (Galie *et al.* 2005). Der Wirkstoff wird schnell resorbiert, die höchste Konzentration wird ca. 60 Minuten nach Gabe erreicht. Die dann eintretenden Effekte, wie der Abfall des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) und der des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR), halten für ca. vier Stunden an (Hoeper *et al.* 2000; Lepore *et al.* 2002), ohne großen Einfluss auf den systemisch-arteriellen Druck auszuüben (Cohen *et al.* 1996). Das hepatische Cytochrom P450 3A4 metabolisiert den Wirkstoff, der anschließend zu 80 % über den Stuhl und 20 % über die Nieren ausgeschieden wird. Die Sildenafil-Plasmakonzentrationen sind bei Patienten mit Leberschäden, schweren Nierenschäden und gleichzeitiger Einnahme von Cytochrom P450-Inhibitoren erhöht (Krenzelok *et al.* 2000). Unter regelmäßiger Therapie mit Sildenafil konnte eine Verringerung der Proliferation glatter pulmonal-arterieller Muskelzellen gezeigt werden (Garg u. Hassid 1990; Lee *et al.* 1996) *In-vivo* Studien in verschiedenen Tiermodellen bestätigen die präventiven und zur reversiblen Gefäßumstrukturierung neigenden Effekte des PDE-5-Inhibitors (Rondelet *et al.* 2004; Itoh *et al.* 2004; Schermuly *et al.* 2004).

1.8 Der Einfluss körperlichen Trainings auf die vaskuläre Funktion

Körperliches Training gilt als wichtiger Faktor in der Prävention kardio-vaskulärer Erkrankungen (Gielen *et al.* 2001; Kojda u. Hambrecht 2005). Training induziert sowohl Scherkräfte als auch oxidativen Stress. Der Beitrag jeder dieser Effekte zu der gesteigerten e-NOS-Expression ist nicht bekannt (Gewaltig u. Kojda 2002). Die höhere endogene NO-Produktion führt zu einer größeren Expression der extrazellulären Superoxiddismutase (ecSOD) und verbessert demzufolge die antioxidative Kapazität der Gefäßwand (Fukai *et al.* 2000). Diese Trainings-induzierten Adaptationsprozesse reduzieren im weiteren Verlauf den oxidativen Stress (Kojda *et al.* 2001). An Hunden, Schweinen und Ratten konnte gezeigt werden, dass körperliches Training zu einer Steigerung der e-NOS Expression in der Aorta und an den Herzkranzarterien führt (Woodman *et al.* 1997; Delp u. Laughlin 1997). Körperliche Inaktivität verursachte hingegen bei gesunden Mäusen eine Funktionsstörung des Endothels, welche sich jedoch nach

moderatem körperlichen Training vollständig umkehren ließ (Suvorava *et al.* 2004). Darüber hinaus bewirkt körperliches Training eine gewebe-abhängige NO-Produktion in der Niere und Lunge (Miyachi *et al.* 2003). Zusätzlich zu den Akuteffekten beeinflusst eine gesteigerte NO-Produktion die Hämostaseparameter positiv, wirkt antiproliferativ, hemmt die Leukozytenmigration und wirkt so atherogenen Inflammationsprozessen in der koronaren und peripheren Gefäßwand entgegen (Traub u. Berk 1998).

Der Endothel-abhängige vasodilatorische Effekt von körperlichem Training auf das Endothel der Lungengefäße wird weitaus kontroverser diskutiert. Zum einen konnte eine verbesserte Lungenendothel-vermittelte Vasorelaxation bei Kaninchen und Schweinen gezeigt werden (Chen u. Li 1993; Johnson *et al.* 2001). Andere Studien kamen jedoch zu einem gegensätzlichen Ergebnis (Mitani *et al.* 1999; Johnson u. Laughlin 2000).

1.9 Pulmonale Hypertonie und körperliches Training

Mehrere Studien zeigten, dass derzeitige Therapiemöglichkeiten zu einer Verbesserung der Überlebenszeit, Symptomausprägung und Belastbarkeit während der 6-Minuten Gehstrecke und einer Besserung in der Hämodynamik führen können (Channick *et al.* 2001; Rubin *et al.* 2002; Blumberg *et al.* 2002; Galie *et al.* 2003). Unter diesen Bedingungen nimmt das Risiko kardio-vaskulärer Dekompensation ab (Desai u. Channick 2008). Zu den aktuellen Therapieoptionen gehören: Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, Endothelinrezeptorenantagonisten, Prostazykline und deren Kombinationstherapien. Früher wurde die Ansicht vertreten, dass Sport und körperliche Belastung zu einer Verschlimmerung der klinischen Symptomatik führen können (Badesch *et al.* 2004). Bei schweren Fällen wurde eine Vermeidung jeglicher körperlicher Anstrengung empfohlen (Gaine u. Rubin 1998). Entgegen gängiger Lehrmeinung zeigte eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, dass die Symptomausprägung durch kontrollierte Belastung verbessert werden kann, so dass bei diesen Patienten im Rahmen von Rehabilitationsprogrammen ein wohldosiertes Training erwogen werden kann (Mereles *et al.* 2006). Zudem belegen Studien, dass verminderte Lebensqualität,

Mobilitätseinschränkungen und soziale Isolation, als Folge der Erkrankung, zu Angst und Depression beim Patienten führen können (Lowe *et al.* 2004; White *et al.* 2006). Training kann einen förderlichen Einfluss auf bestehende Komorbiditäten haben und sich dadurch positiv auf die bestehenden Symptome auswirken. Körperliches Training scheint demnach bei schwerer PH unter Therapie sicher.

Bei der oben angeführten Patientenstudie ist verständlicherweise der objektive Trainingseffekt auf den Gefäßumbauprozess nicht nachweisbar. Tierversuche besitzen darüber hinaus eine bessere Kontrollierbarkeit. Aus diesen Gründen sind weitere Untersuchungen nötig, da bis heute nur wenige Daten zum direkten Zusammenhang von körperlichem Training und den in der Pathogenese maßgeblichen Variablen, wie z.B. dem pulmonalen Gefäßbett, existieren.

1.10 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Reversibilität und neue Therapieansätze bei Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie zu untersuchen. Durch die Etablierung eines entsprechenden Mausmodells sollte zunächst überprüft werden, ob eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie prinzipiell reversibel ist, um in einem zweiten Teil der Arbeit zu klären, ob ein körperliches Training die Entstehung der pulmonalen Hypertonie verhindern kann und zu einer positiven Beeinflussung des Krankheitsbildes führt.

Zur Bearbeitung dieses Themenkomplexes wurden die Tiere im Anschluss an eine 3-wöchige Hypoxieexposition unter Normoxie gehalten und in einer abschließenden Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten – 7, 14, 21, 28 und 42 Tage – nach Normoxieexposition untersucht.

Im Anschluss daran sollte dann der Einfluss präventiven körperlichen Trainings auf den Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Mausmodell untersucht werden und dieser im Vergleich zu einer Standardtherapie mit dem Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil (Revatio®) beurteilt werden. Zusätzlich sollte die Frage nach synergistischen Effekten medikamentöser Therapie und körperlichen Trainings beantwortet werden. Für die Bestimmung des

rechtsventrikulär-systolischen Drucks wurden in einer wenig invasiven Operationsmethode telemetrische Transmitter in den rechten Ventrikel implantiert. Die weitere Evaluation der Trainingsintervention und deren gesundheitlicher präventiver Nutzen sollte im Anschluss an das 3-wöchige Trainingsprotokoll mittels histologischer und morphologischer Parameter untersucht und diskutiert werden.

Körperliches Training stellt in Verbindung mit dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie eine in der Vergangenheit kontrovers diskutierte Thematik dar. Darüber hinaus existiert zu dieser Fragestellung nur eine einzelne randomisierte Studie, die in diesem Zusammenhang einen positiven Nutzen von körperlichem Training auf das Krankheitsbild aufzeigt (Mereles *et al.* 2006). Somit sollten durch die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über die präventiven Effekte eines körperlichen Trainings bei pulmonaler Hypertonie gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden männliche C57Bl/6J-Mäuse (Charles-River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt. Um das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie des erwachsenen Menschen vergleichen zu können, wurden bereits adulte Mäuse (22-30g) eingesetzt. Die Tiere wurden während der Versuche im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen unter der Betreuung eines Tierpflegers versorgt. Sie erhielten Wasser und Futter (Altromin® Standarddiätfutter) ad libitum. Des Weiteren waren die Tiere bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 24°C einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt.

2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die nötigen Versuche für die vorliegende Arbeit wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die für die Versuche geltenden Tierversuchsanträge „Training und pulmonale Hypertonie“ sowie „Genregulation des reversiblen pulmonalen Gefäßremodelings“ können unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 04/200 und GI 20/11 Nr. 34/2006 eingesehen werden.

2.3 Injektionslösungen und Substanzen

Xylazin	Rompun®	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100mg/ml	Ketamin®	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
physiologische Kochsalzlösung	zum Spülen und Befeuchten	Baxter S.A München, Deutschland
Enrofloxacin	Baytril 2,5%®	Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland
Heparin	Liquemin N 25000 ®	Roche Basel, Schweiz
Beatmungsgas	50% O ₂ 50% N ₂	Air Liquid Siegen, Deutschland
Natronlauge 1N		Merk Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1N		Merk Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Forene®	Abbott Wiesbaden, Deutschland
Sildenafil (Pulverform)		Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Methylcellulose	gebrauchsfertige Verdünnung zu 2%	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.4 Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen 1ml, 2ml, 10ml	Inject Luer®	Braun Melsungen, Deutschland
Kanülen 26G (0,9mm×25mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, Deutschland

Trachealtubus 20G auf 1 cm gekürzt	Vasocan®	Braun Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe	Transaflex®	Ansell Surbiton Surrey, GB
Heidelberger Verlängerung 150cm		M. Schilling GmbH Gelnhausen, Deutschland
Mulltupfer		Beese Barbüttel, Deutschland
Dreiwegehahn	Discofix®	Braun Melsungen, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland
Wärmeunterlage	Thermo-Lux®	Witte und Sutor Murrhardt, Deutschland
Operationsbesteck		Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland
Haushaltsbindfaden		
wasserfeste gelbe Unterlage		
Einmalspritze, 50ml	Original-Perfusor®- Spritze OPS	Braun Melsungen, Deutschland
Stativ	zum Halten der Spritzen während des Spülens	
Eppendorf-Caps		Braun Melsungen, Deutschland
Falconröhrchen		Braun Melsungen, Deutschland
Nahtmaterial, nicht-resorbierbar	Ethibond Exel®	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Kapillaren, heparinisiert		

2.5 Geräte

PC und Monitor		Dell, Bracknell, GB
Beatmungspumpe	SAR-830A/P	IITH Inc. Life Science, Woodland Hills, CA, USA
Druckwandler		Braun Melsungen, Deutschland
Hkt-Zentrifuge	Adams Autocrit Centrifuge	Adams Parsippany, NY, USA
Vergößerungs-Lupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
O ₂ -Controller	Modell 4010	Labotect, Göttingen
CO ₂ -Absorbent		Sodasorb®, Grace, Columbia

2.6 Histologische Untersuchungen

Rotationsmikrotom	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgussstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrations- automat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Isopropanol (99,8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Ethanol (70%, 95%, 99%)		Fischer Saarbrücken, Deutschland
Methanol, reinst.		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Formaldehyd säurefrei \geq 37%		Roth Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol		Roth Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Roth Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% pro analysi		Merk Darmstadt, Deutschland
Deckgläser 24x36mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Universal- Einbettkassetten mit Deckel		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Mikrotomklingen S 35		Feather Osaka, Japan
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Pikrinsäure, wässrig gesättigt		Fluka Chemie Buchs, Schweiz

Eindeckmedium	Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Natriumchlorid pro analysi		Roth Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogen- phosphatdihydrat, pro analysi		Merk Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid, pro analysi		Merk Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat, pro analysi		Merk Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Digest All®	Zytomed Berlin, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Normal Goat-Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Vectastain Elite ABC-Kits anti-rabbit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
M.O.M-Kit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector-VIP Substrat-Kit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
DAB Substrat-Kit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Methylgrün Counterstain		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland

Hämatoxylin QS Counterstain		Zymed Kit, California, USA
Sekundärantikörper, ImmPRESS Kit Anti- Rabbit Ig Peroxidase		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
2,5% Normal Horse Serum, ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Anti-alpha smooth muscle Actin, clone 1A4 monoklonal, mouse anti- human	Verdünnung 1:900	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von-Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti- human	Verdünnung 1:900	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Anti-PDE 5A rabbit anti- human clone PD5A-101AP	Verdünnung 1:10	Fab Gennix, Inc. International, Frisco, USA
PC	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro -für Muskularisierungsgrad		entwickelt von Herrn Christoph Frank, Leica Microsystems

2.7 Telemetrische rechtsventrikuläre Blutdruckmessung

Software	Dataquest A.R.T Version 3.0 Analysis Software Data Science Inc.	DSI Data Science International, St. Paul, USA
----------	--	--

Receiver	Physio Tel TM Receiver Model RCP-1	DSI Data Science International, St. Paul, USA
Datenkonvertierer (analog-digital)	Data Exange Matrix	DSI Data Science International, St. Paul, USA
Ambient Pressure Reference	Model APR-1	DSI Data Science International, St. Paul, USA
PC+Monitor		Dell, Bracknell, GB
DSI-Transmitter	TA11PA-C10 Implant	DSI Data Science International, St. Paul, USA
antithrombotisches Gel	Regel-Syringe.50CC	DSI Data Science International, St. Paul, USA
Glutaraldehyd-Lösung	2%ige Endlösung	Fluka Chemie GmbH Buchs, Schweiz

2.8 Laufband/Zubehör

Metabolic Performance Testing System	Messung von VO ₂ max und der Belastungsintensität	entwickelt von Herrn Arnfinn Sira NTNU Fysiologiog Biomed.Teknikk Trondheim, Norwegen
---	--	--

2.9 Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH

In diesem ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob eine voll-etablierte pulmonale Hypertonie generell reversibel ist.

2.9.1 Experimentelles Design

Für die Durchführung der Versuche wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in 7 gleichstarke Gruppen mit jeweils $n=7$ aufgeteilt.

- 21 d Hypoxie
- 21 d Hypoxie + 7 d Normoxie
- 21 d Hypoxie + 14 d Normoxie
- 21 d Hypoxie + 21 d Normoxie
- 21 d Hypoxie + 28 d Normoxie
- 21 d Hypoxie + 42 d Normoxie
- Kontrolle: 63 d Normoxie

2.9.2 Haltung der Tiere während des Versuchs

Männliche C57Bl/6J-Mäuse (Charles-River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 22-30 g wurden unter Normaldruckverhältnissen in einer ventilerten Kammer unter Hypoxie bei einer O_2 -Fraktion (FiO_2) von 0,10 gehalten (siehe Abbildung 6). Mithilfe eines autoregulatorischen Kontrollsystems (Model 4010, O_2 -Controller, Labotect, Göttingen) konnte die Sauerstoffkonzentration konstant gehalten werden, indem entweder Stickstoff (N) oder Sauerstoff (O_2) in das in sich geschlossene System eingelassen wurde. Die durch Kondensation über ein Kühlsystem entstandene überschüssige Feuchtigkeit aus der Abatmung wurde täglich entfernt. Das entstandene CO_2 wurde durch Bindung an Natronkalk (Sodasorb® CO_2 -Absorbent, Grace, Columbia) aus dem System kontinuierlich eliminiert. Die zur Kontrolle mitgeführten Tiere wurden unter vergleichbaren Konditionen in einer Kammer bei einer FiO_2 von 0,21 gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser

ad libitum. Einmal täglich wurde die Kammer zum Säubern, Tränken und Füttern der Tiere geöffnet. Die Temperatur wurde bei 22-24 °C gehalten während eines Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden.

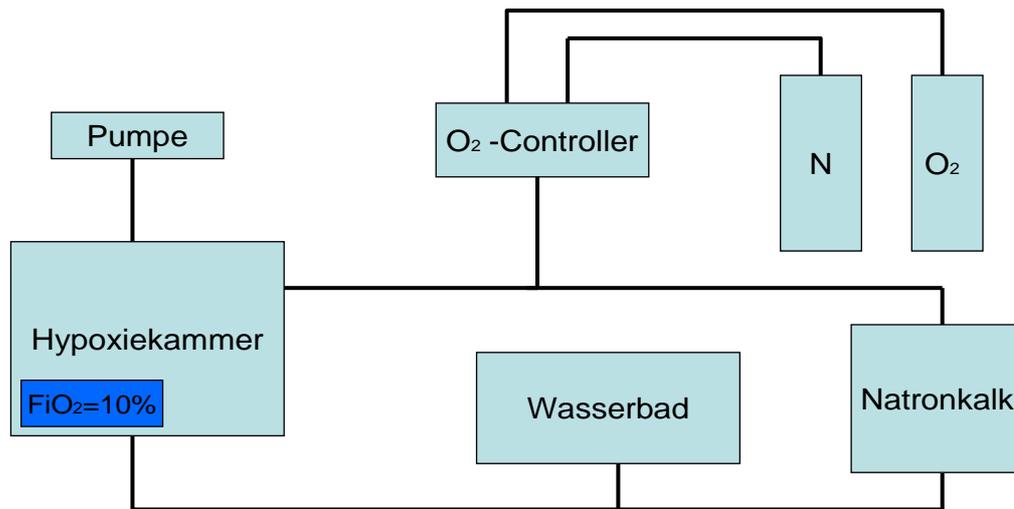


Abbildung 6: Schematische Übersicht der ventilerten Hypoxiekammer

2.9.3 Hämodynamische Messungen am Ganztier

Nach Beendigung der Expositionszeit wurden die Tiere aus der Hypoxie- bzw. Normoxiekammer entnommen. Die Narkose erfolgte durch eine Injektion von Ketamin und Xylazin in einer Mischspritze (120 mg/kg Ketamin + 16 mg/kg Xylazin). Danach wurden die beiden Substanzen mit isotonischer Kochsalzlösung auf 10 ml verdünnt und anschließend 0,1 ml/10g intraperitoneal gegeben. Nachdem die Tiere das Bewusstsein verloren hatten und keine Reflexe mehr zeigten, wurden sie auf eine beheizbare Platte verbracht, um die Körpertemperatur im physiologischen Bereich zu halten. Danach erhielten sie eine intramuskuläre Injektion Heparin/NaCl. Das Programm Labtech Pro® (Labtech Notebook Runtime Version 9.02) wurde vor Beginn der Aufzeichnungen der Parameter (RVSP und Beatmungsdruck (VP)) gestartet. Nach blasenfreier

Spülung der Druckaufnehmer und Schläuche mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Ausgangswerte für RVSP und VP durch Einstellung am Druckwandler auf 0 mmHg eingestellt. Dann wurde das Tier mithilfe eines median der Trachea geführten Hautschnittes, daran anschließender Durchtrennung der Kehlgangsmuskulatur und Freipräparieren der Gll. mandibulares intubiert. Die künstliche Atemfrequenz betrug 120 Züge/min (SAR830A/P, IITH Inc. Life Science, Woodland Hills, CA, USA) mit einem Atemvolumen von 10 ml/kg. Um eine Verunreinigung des Operationsfeldes mit Haaren zu vermeiden, wurde das Fell mit Braunol®-Lösung befeuchtet. Anschließend wurde ein Teil des Felles und der Haut entfernt, um dann durch einen Schnitt in der Linea alba Zugang zum Brustausgang (Apertura thoracis caudalis) zu erhalten. Darauffolgend wurde durch einen kleinen Schnitt das Diaphragma perforiert, um in anschließender Präparation dasselbe von umgebenen Rippen freizupräparieren. Als nächstes wurde ein flüssigkeitsgefüllter Druck-Katheter (Braun, Melsungen, Deutschland) direkt in die rechte Herzspitze eingeführt. Die Aufzeichnungen wurden je Tier 20 Minuten belassen und anschließend im Programm gespeichert. Die Daten ließen sich so später aufrufen und auswerten. Danach wurden die Tiere durch eine Überdosierung von Ketamin euthanasiert.

2.9.4 Blutentnahme zur Hämatokritmessung

Der Thorax wurde mit seitlich befestigten Klemmen an den Rippenbögen auseinandergespreizt. Durch die Perforation des rechten Ventrikels erfolgte die Blutentnahme unter Zuhilfenahme einer heparinisierten Kapillare. Der Hämatokritwert wurde durch die Hämatokrit-Zentrifuge bestimmt.

2.9.5 Entnahme der Lunge

Die Luftröhre (Trachea) wurde vom umliegenden Gewebe freipräpariert und mittels Unterführung einer stumpfen Pinzette vorgelagert und inzidiert. Im weiteren Verlauf wurde der linke Ventrikel durch einen kleinen Schnitt nahe der Herzspitze (Apex cordis) eröffnet. Nun wurde ein Schlauch mit isotoner Kochsalzlösung und einem Druck von 22 cm-Wassersäule durch die Öffnung des rechten Ventrikels in

die Pulmonalarterie (A. pulmonalis) vorgeschoben. Anschließend wurde die Lunge blutfrei gespült. Als Abfluss der Spülflüssigkeit diente die Öffnung des linken Ventrikels. In die Tracheotomiestelle wurde nun ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Schlauch mit einem Druck von 12 cm Wassersäule eingeführt und die Lunge dadurch gebläht. Die Lunge wurde zur Perfusionsfixierung über die A. pulmonalis 10 Minuten lang bei einem Druck von 22 cm Wassersäule mit Zamboni's Fixativ (2 %iges Formaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer mit 15 % Prikriensäure; pH 7,3-7,4 gespült (Zamboni *et al.* 1967). In einem weiteren Schritt wurden die A. pulmonalis und die Trachea ligiert, um ein Verbleiben des Zamboni's Fixativ in der Lunge zu erwirken. Die Lunge wurde anschließend entnommen und in ein mit Zamboni's Fixativ gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Im nächsten Arbeitsschritt teilte man die Lunge in ihre einzelnen Lungenlappen auf. Für die weiteren histologischen Untersuchungen wurden der linke und der rechte obere Lungenlappen benötigt. Diese wurden von dem anderen Gewebe präpariert (Trimmen) und einzeln in Einbettkassetten verbracht, in denen sie bis zur Entparaffinierung in 0,1 M PBS bei 4°C aufbewahrt wurden.

2.9.6 Präparation des Herzens

Nachdem das Herz durch das Trimmen des Lungengewebes vom umliegenden Gewebe freipräpariert wurde, konnten die Arterien und Herzklappen mit einer Vergrößerungslupe (MS5, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) entfernt werden. Die Trennung der Ventrikel wurde direkt am Septum durchgeführt, wobei letzteres am linken Ventrikel verblieb. Anschließend wurden beide Hälften 3 Wochen lang bei Raumtemperatur getrocknet. Folgend wurde die Herzratio, d.h. das Verhältnis des rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum ($RV/(LV+S)$) als Index der Rechtsherzhypertrophie gebildet. Diese Methode ist allgemein gebräuchlich zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie (Fulton *et al.* 1952).

2.9.7 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Entwässerung der entnommenen Lungen erfolgte über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP 1050, Leica). Anschließend wurden die Lungensegmente durch die Paraffinausgussstation (Modell EG 1140H) in Paraffin eingegossen und auf einer integrierten Kühlplatte (Modell EG 1150C) heruntergekühlt, bis die Einbettkassetten mit dem Lungengewebe entnommen werden konnten. Es wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden und zum Trocknen auf eine Heizplatte gebracht wurden. Danach blieben die Schnitte bis zu den später durchgeführten immunhistochemischen Färbungen bei 37°C im Wärmeschrank. Als Positivkontrolle wurde bei der immunhistochemischen Doppelfärbung (Anti-alpha actin/Factor VII) Darmgewebe der Maus mitgeführt. Der Immunfärbung ging das Entparaffinieren und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe der Gewebeschnitte voraus. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mehrmals jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

15 Minuten	Block endogener Peroxidasen	20ml 30% H ₂ O ₂ in 190ml Methanol
10 Minuten	Block unspezifischer Bindungen	Trypsin Digest All® 1:3
15 Minuten	Block endogenen Avidins	Avidin-Reagenz
15 Minuten	Block endogenen Biotins	Biotin-Reagenz
15 Minuten	Block unspezifischer Bindungen	10% BSA-Block
60 Minuten	Mouse IG-Blocking-Reagenz	M.O.M Kit
5 Minuten	Proteinblocking	M.O.M Kit
30 Minuten	Primärantikörper	Anti-alpha smooth muscle actin (1:900)
10 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	M.O.M Kit

5 Minuten	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Kit
ca. 3 Minuten	violettes Chromogen	Vector VIP®
15 Minuten	Block unspezifischer Bindungen	10% BSA-Block
20 Minuten	Serumblock I	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
30 Minuten	Primärantikörper	vWF aus Kaninchen (1:900)
30 Minuten	Sekundärantikörper	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
40 Sekunden	braunes Chromogen	Vector DAB®
3 Minuten	Darstellung der Zellkerne	Methylgrün

Im Anschluss an die Immunfärbung wurden die Schnitte dehydriert und mit Pertex eingedeckt.

Die morphologischen Auswertungen erfolgten durch ein computergestütztes Analysesystem (Leica Q Win Standard Analyzing Software) in Kombination mit speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelter Makros.

Die Schnitte wurden für die Auswertung geblindet, so dass keine Rückschlüsse auf die Tier-Gruppen erfolgen konnten. Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden die nach Protokoll (Anti-alpha actin/Faktor VIII) gefärbten Schnitte bei einer 400 fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet. Dazu wurden pro Tier insgesamt 200 Gefäße (100 Gefäße aus dem rechten und 100 Gefäße aus dem oberen linken Lungenlappen) untersucht.

Die Gefäße wurden in folgende Kategorien gefasst:

Kategorie 20-70µm - 80 Gefäße/Tier

Kategorie 71-150µm - 15 Gefäße/Tier

Kategorie 151-1000µm - 5 Gefäße/Tier

Innerhalb der Größen-Kategorie wurde jedes Gefäß in eine weitere vom Muskularisierungsgrad abhängige Kategorie eingeteilt.

Die Grenze zwischen den einzelnen Kategorien wurde wie folgt festgelegt:

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

Um den Muskularisierungsgrad bestimmen zu können wurde der Anteil anti-alpha smooth muscle actin positiver Gefäßwandbereiche ermittelt. Diese Bereiche waren durch das Substrat (Vector-VIP Substrat-Kit) violett dargestellt und konnten somit durch die Analysesoftware im Rahmen einer kolorimetrisch-spektrometrischen Analyse erkannt werden. Nicht-muskularisierte Gefäße, nur markiert durch den endothelialen anti-von Willebrand-Faktor (braun), konnten daher von muskularisierten- bzw. teilweise-muskularisierten Gefäßen unterschieden werden (siehe Abbildung 7).

Das System ordnete die Ergebnisse nach oben beschriebenen Kriterien und überführte und speicherte diese in einer Excel Tabelle. Sie konnten so zu einem späteren Zeitpunkt abgerufen und ausgewertet werden.

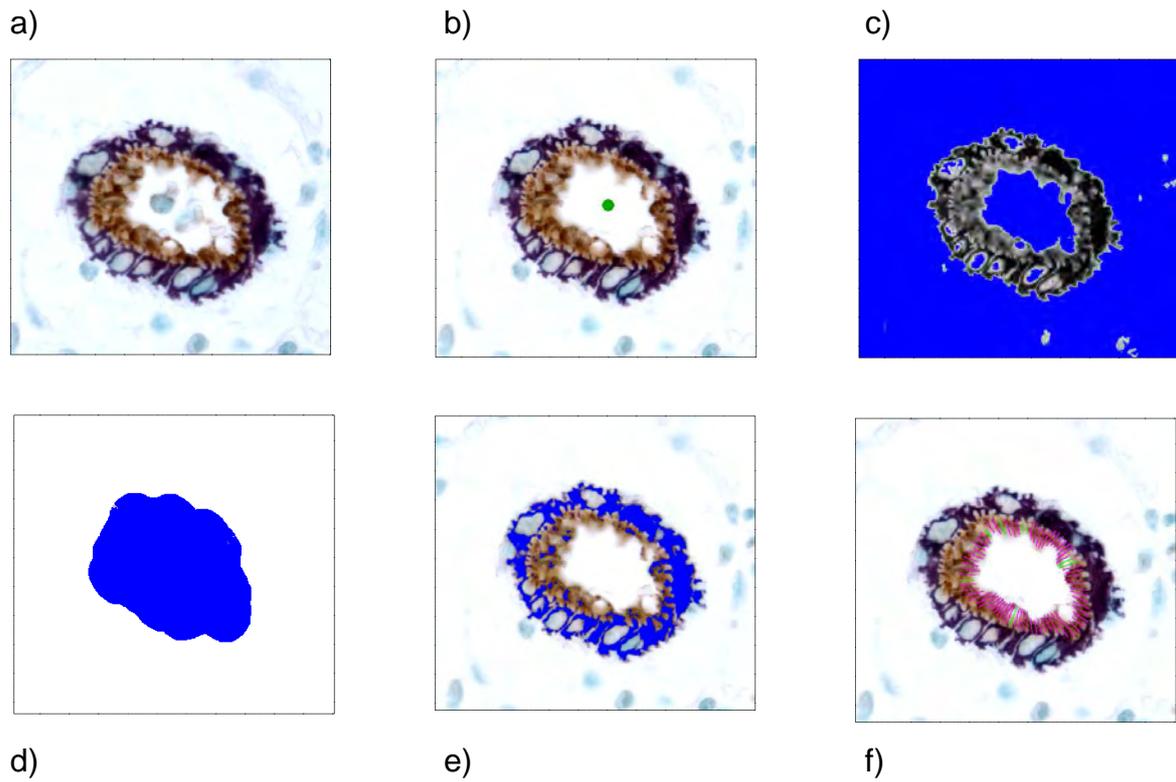


Abbildung 7: Verfahren der vaskulären Morphometrie. Markierung des Gefäßes und Farbbildbearbeitung durch das Analyseprogramm in a)+b). Erkennung und Kontrolle des Gefäßinnenraumes in c)+d). Ermittlung anti-alpha smooth muscle actin positiver Gefäßwandbereiche in e). Abschließende Berechnung der prozentualen vaskulären Muskularisierung in f).

2.10 Training und pulmonale Hypertonie

In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss eines präventiven körperlichen Trainings auf den Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Mausmodell untersucht werden und dieser im Vergleich zu einer Standardtherapie mit dem Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil (Revatio®) beurteilt werden. Zusätzlich soll die Frage nach synergistischen Effekten medikamentöser Therapie und körperlichen Trainings beantwortet werden.

2.10.1 Experimentelles Design

Die Tiere wurden zu Beginn gewogen und in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt:

- 21 d Normoxie, tägliche Behandlung mit 2 %iger Methylcellulose
- 21 d Hypoxie, tägliche Behandlung mit 2 %iger Methylcellulose
- 21 d Hypoxie, tägliche Behandlung mit Sildenafil
- 21 d Hypoxie, tägliche Behandlung mit Sildenafil, tägliches Training
- 21 d Hypoxie, tägliche Behandlung mit 2 %iger Methylcellulose, tägliches Training

Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug n=6

Die Tiere wurden während der Zeit der Versuche zu oben bereits beschriebenen Bedingungen gehalten.

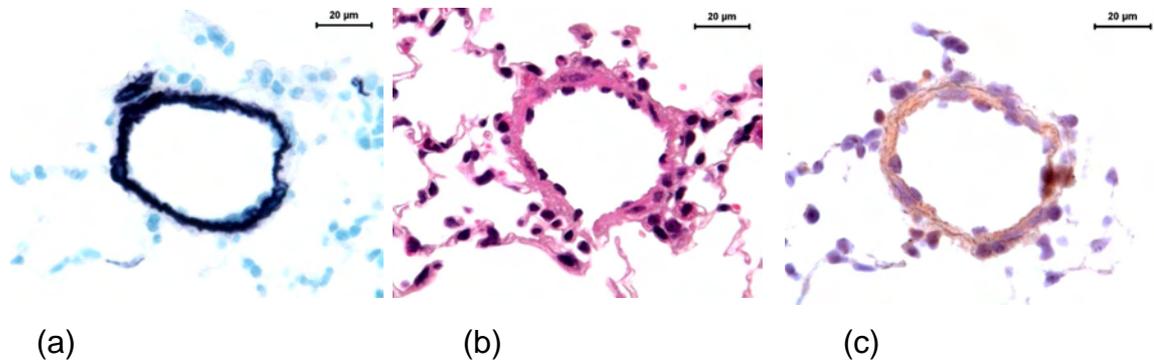
2.10.2 Applikation von Sildenafil

In der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie spielen Phosphodiesterasen eine besondere Rolle. Die bedeutendste Phosphodiesterase-Isoform in der Lunge repräsentiert die PDE-5. Bei Patienten mit PH wurde eine Überexpression der PDE-5 in der Lunge nachgewiesen (Sanchez *et al.* 1998; Murray *et al.* 2002).

Immunohistochemisch lässt sich in den Lungengefäßen kranker, Hypoxie-exponierter Mäuse eine vermehrte Reaktivität des PDE-5A-Antigens im

Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren feststellen. PDE-5 ist vorwiegend in glatten Muskelzellen lokalisiert. Zusätzlich zeigt PDE-5A weitere Immunreaktivität in den Bronchien.

a) hypoxische Lungen



b) normoxische Lungen

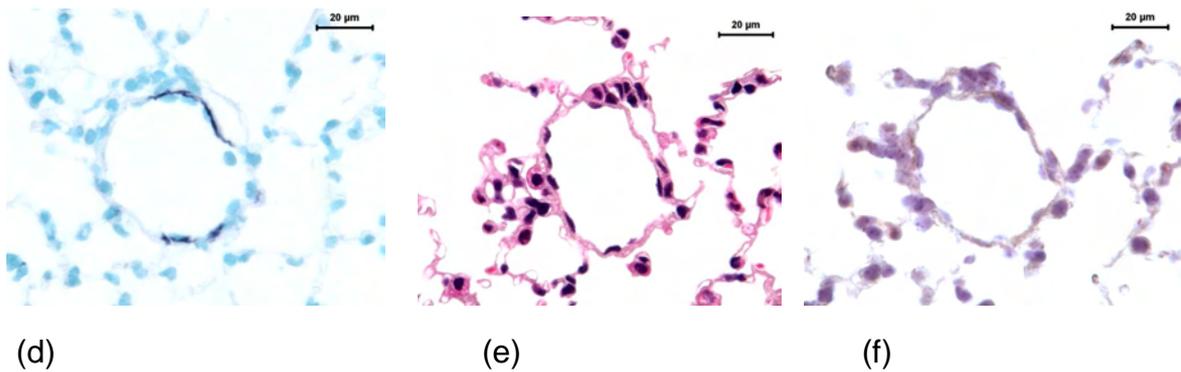
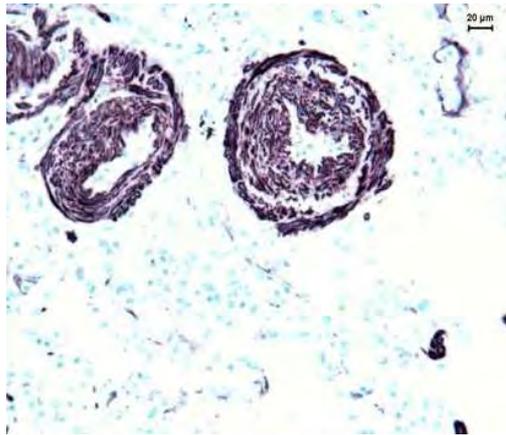
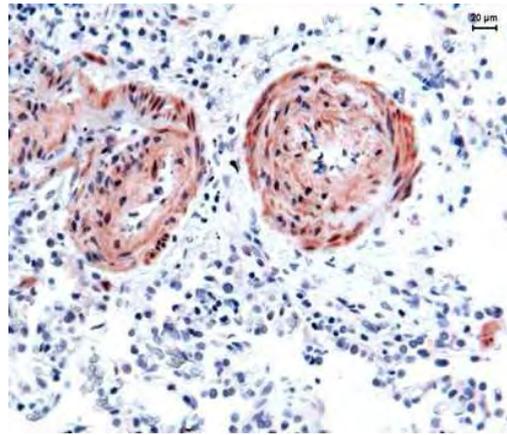


Abbildung 8: (a)-(f): Immunohistochemische Färbungen: (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) mit anti-alpha-SMA (Substrat VectorVIP), (a)+(d); anti-PDE-5A (Substrat NovaRed) (b)+(e) in gesunden Tieren und nach 3-wöchiger Exposition unter Hypoxie. (c)+(f) sind die H.E.-Übersichtsfärbungen. Dargestellt sind periphere Lungenarterien. (alle 630x Vergrößerung).

Der Nachweis der Überexpression von PDE-5A gelang immunohistochemisch auch in humanen Lungen. Gesunde Patienten zeigten eine geringere PDE5A-Immunreaktivität als Patienten mit IPAH. Auch hier befanden sich die positiven Zellen in der Gefäßmedia, deckungsgleich mit den positiven Bereichen des alpha smooth muscle actins.



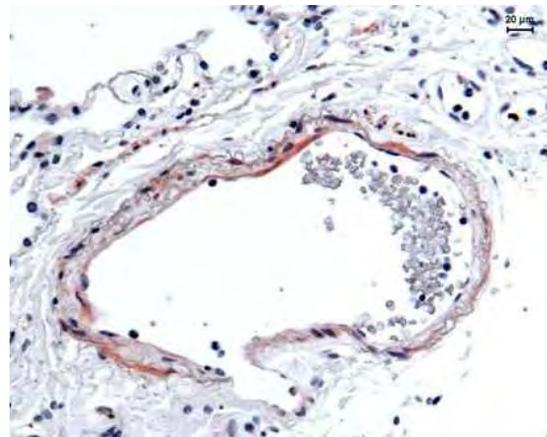
(a) Lunge IPAH 40x (alpha sma)



(b) Lunge IPAH 40x (PDE5A)



(c) Lunge Spender 40x (alpha-sma)



(d) Lunge Spender 40x (PDE5A)

Abbildung 9: (a)-(d): Immunohistochemische Färbung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) von glattmuskulärem alpha-sma (Substrat VectorVIP) und PDE-5A (Substrat NovaRed) in Lungenschnitten gesunder Spender bzw. Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie. PDE5-A ist in Lungengewebe von Patienten mit IPAH in den glattmuskulären Zellen stark exprimiert. Vergrößerung (a)-(d): 400x

Diese Daten sind in Einklang mit der Tatsache, dass Sildenafil als PDE-5 Inhibitor, seit 2005 auch in Europa und den USA unter dem Handelsnamen Revatio® zur Therapie der PH beim Menschen zugelassen ist (Ghofrani *et al.* 2002; Ghofrani *et al.* 2003). Innerhalb dieser Arbeit wurde Sildenafil als Standardtherapeutikum eingesetzt, um daran den Effekt eines körperlichen Trainings zu bemessen. Sildenafil zeigte in zahlreichen klinischen Studien positive Effekte, wie die Reduktion des PAP und PVR, bei Patienten mit PAH (Michelakis *et al.* 2002; Ghofrani *et al.* 2002). Neben einer hohen Selektivität zu cGMP-hydrolysierenden

PDE-5 besitzt Sildenafil eine weitaus schwächere zu PDE-1 und PDE-6 (Raja *et al.* 2006).

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Substanz wurde der Wirkstoff in 2%iger Methylcellulose gelöst. Als Placebo diente die alleinige Gabe von Methylcellulose. Während der Exposition unter Hypoxie bzw. Normoxie erhielten die Tiere täglich, nach Ableistung des halbstündlichen Trainings, eine einmalige Gabe Sildenafil (100mg/kg/d) via Fütterungssonde. Die Effektivität der gewählten Dosis konnte bereits in anderen Tiermodellen an Ratte und Maus (Zhao *et al.* 2001; Sebki *et al.* 2003) gezeigt werden. Eine einmalige Gabe stellt darüber hinaus einen ethisch-moralischen Kompromiss dar. Durch eigene Untersuchungen ist bekannt, dass bereits eine einmalige Gabe Sildenafil wichtige Signalwege aktiviert. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen Methylcellulose. Die Substanz wurde täglich frisch zubereitet.

2.10.3 Versuchsablauf

Zu Beginn der Studie gewährte man den Tieren 2-3 Tage zur Eingewöhnung an den Tierstall, danach wurden sie gewogen und es erfolgte eine randomisierte Einteilung in Tiergruppen. Die eingangs durchgeführte Leistungsdiagnostik fand auf einem luftdicht verschlossenen Laufband (Treadmill for mice, entwickelt von Herrn Arnfinn Sira Trondheim, Norwegen, siehe Abbildung 10) und der dazugehörigen Analysesoftware (Metabolic Performance Testing System, MPTS) statt. Danach setzte man die Tiere in die Hypoxie- bzw. Normoxiekammer ein.

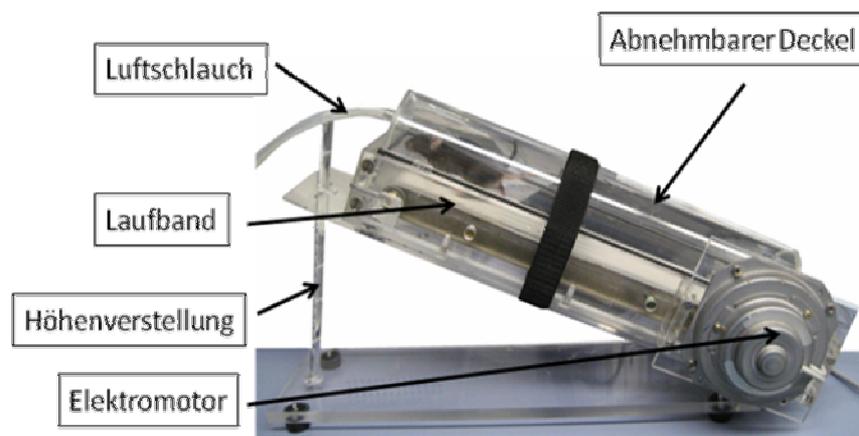


Abbildung 10: Treadmill for mice, entwickelt von Herrn Arnfinn Sira Trondheim, Norwegen

Das Messsystem basiert auf dem Prinzip der Spirometrie, bei dem Leistungsparameter wie die $VO_2\text{max}$ und die O_2 -Aufnahme erfasst werden können. Durch einen Elektromotor wird ein Endlosband über eine Rolle angetrieben. Die Steigungseinstellung lässt sich in 5° -Schritten von 0° bis 45° verändern. Es besitzt eine Steigung zur Horizontalen von 25° , welche der Vorliebe von Mäusen, bergaufwärts zu laufen, entgegenkommt. Zu Beginn jeder Leistungsdiagnostik wurde die Kalibrierung des Gerätes vorgenommen (siehe Kapitel 2.10.4).

Ziel der anfänglichen Leistungsdiagnostik, an der alle Tiere teilnahmen, lag in der Bestimmung der maximal erreichten Geschwindigkeit (V_{max}), um die tägliche Trainingsintensität festzulegen. Den Mäusen wurden zunächst einige Minuten auf dem Laufband zur Eingewöhnung ermöglicht. In dieser Zeit wurde das Laufband auf ca. 0,01-0,02 m/s beschleunigt. Danach erhöhte man die Geschwindigkeit auf 0,15 m/s und die Datenaufzeichnung begann. Nach jeweils 3 Minuten wurde die Laufbandgeschwindigkeit stufenweise um 0,05 m/s gesteigert. Bei Erschöpfung des Tieres wurde der Test abgebrochen und die maximale Geschwindigkeit und die $VO_2\text{max}$ festgehalten.

Im weiteren Verlauf wurden die Tiere bei 60% der initial bestimmten Leistungsintensität an fünf Tagen wöchentlich für jeweils eine halbe Stunde trainiert. Einmal wöchentlich wurde eine Leistungsdiagnostik zur Überprüfung der $VO_2\text{max}$ durchgeführt (siehe Kapitel 2.10.4), die dem Zweck diente, Verschlechterungen oder Verbesserungen der Leistung aller Tiere zu erfassen, um im nächsten Schritt eine Anpassung vorzunehmen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen verbrachten die Kontrolltiere (Placebo+Sildenafil-Tiere) die Zeit des täglichen Trainings unter normoxischen Druckverhältnissen. Die übrige Zeit verlebten die Tiere in der Hypoxie- bzw. Normoxiekammer. Zur Messung des Blutdruckes im rechten Ventrikel des Herzens wurden kleine implantierbare Transmitter genutzt, die telemetrisch Daten übermitteln. Die Implantation von Transmittern erfolgte, bevor die abschließende Leistungsdiagnostik nach 21 Tagen durchgeführt wurde. Ein Vorteil der Implantation von Transmittern besteht darin, dass *in-vivo*-Messungen über einen bestimmten Zeitraum unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt

werden können. Danach wurden die Tiere euthanasiert und es erfolgte die Probenentnahme und Auswertung (Übersicht siehe Abbildung 11).

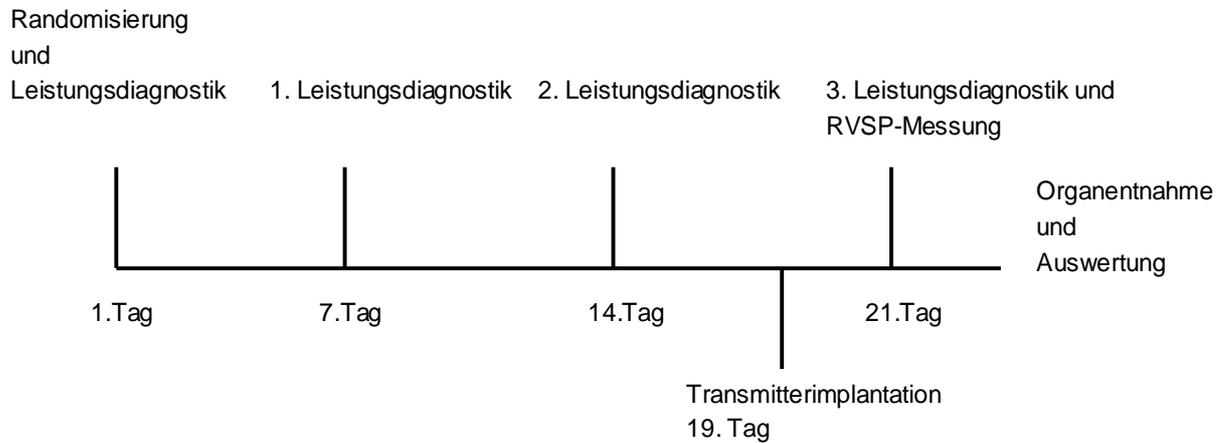


Abbildung 11: Überblick über den zeitlichen Ablauf des Versuches

2.10.4 Leistungsdiagnostik

Die Tiere wurden zur Eingewöhnung zunächst einige Minuten ohne weitere Interventionen auf dem Laufband belassen, um möglicherweise aufkommenden Stress während der Messungen weitestgehend minimieren zu können. Simultan fand die Eichung bzw. Kalibration von O_2 - und CO_2 - Gehalt der umgebenden Luft statt. Anschließend wurde die zu testende Maus auf das Laufband gesetzt und der Deckel aufgesetzt. Danach fand eine Kalibration des O_2 - und CO_2 - Gehaltes der Kammer statt. Von einer Pumpe wurde eine voreingestellte definierte Menge Luft (0,5l/min) über einen Schlauch der geschlossenen Kammer zugeführt. Am hinteren Ende führte ein zweiter Schlauch die Luft aus der Kammer zurück zur Gas-Analyseeinheit, in der die Gaskonzentrationen gemessen wurden. Letztere war mit einem PC verbunden. Über die Software MPTS konnten die gemessenen Daten gespeichert und ausgewertet werden.

Waren die Tiere mit dem Laufband und ihrer weiteren Aufgabe vertraut, konnte die Geschwindigkeit des Laufbandes langsam gesteigert werden und die Daueraufzeichnung beginnen. Das Leistungsdiagnostikprotokoll umfasste eine

3-minütige anfängliche Belastungsintensität von 0,15 m/s, die im Abstand von weiteren 3 Minuten um jeweils 0,05 m/s erhöht wurde. Der Erschöpfungszustand wurde definiert als Unwillen des Tieres weiterzulaufen. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Test beendet und die Maus wurde nach einer kurzen Auslaufphase bei niedrigem Tempo von dem Laufband genommen und in ihrem separaten Käfig wieder in die Kammer eingesetzt. Die Daten zu jeder Leistungsdiagnostik wurden gespeichert und zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet.

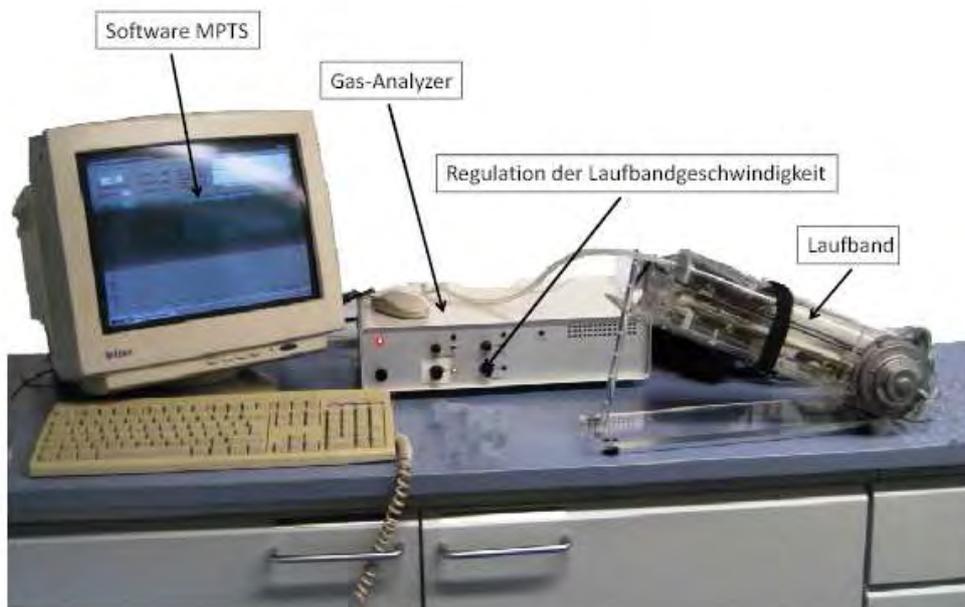


Abbildung 12: Die gesamte Analyseeinheit zur Aufzeichnung der $VO_2\max$ und Regulation der Laufbandgeschwindigkeit bei Mäusen.

2.10.5 Vorbereitung und Implantation der Transmitter

Die Katheter wurden vor der Implantation mit einem antithrombotischen Gel (Regel-Syringe.50CC, DSI, St. Paul, USA) gefüllt und über Nacht zur Desinfektion in 2%ige Glutaraldehydlösung verbracht. Die Mäuse wurden durch den Nackengriff fixiert und erhielten anschließend eine intraperitoneale Injektion (i.p.) mit Ketaminhydrochlorid/Xylazin/NaCl im Verhältnis 20µl Ketaminhydrochlorid/20µl Xylazin/40µl NaCl in einer Mischspritze. Nach kurzer Zeit und Eintritt des Bewusstseinsverlustes wurden die Tiere auf eine beheizbare Platte verbracht, um

die Körpertemperatur im physiologischen Bereich zu halten. Nun wurde das Fell mit Braunol-Lösung® befeuchtet, um Verunreinigungen des Operationsfeldes durch Haare zu vermeiden. Das Operationsfeld wurde anschließend im Bereich der Halsunterseite und im Nackengebiet gründlich rasiert. Im weiteren Verlauf wurde ein medianer Hautschnitt im Bereich der Halsunterseite durchgeführt, um durch vorsichtiges stumpfes Präparieren die Unterkieferdrüsen (Gl. mandibulares) und die rechte Drosselvene (V. jugularis) darzustellen. Die rechte V. jugularis wurde kranial ligiert.

Nun wurde ein kleiner Hautschnitt caudal der Ohren durchgeführt, der als Hauttasche für den Transmitter diente. Dieser wurde anschließend in diese vorgeschoben und dort fixiert. Der Katheter wurde subkutan bis in das Präparationsfeld an der Halsunterseite geführt. Die V. jugularis wurde gespannt und anschließend inzidiert.

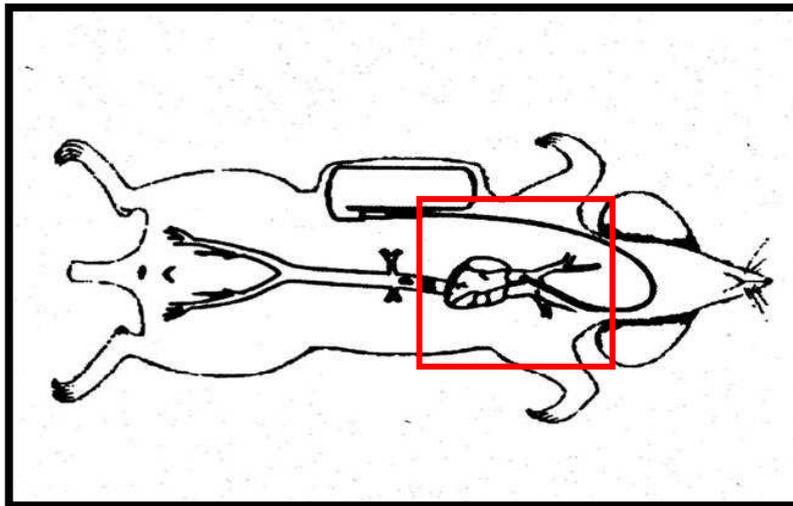


Abbildung 13: Schematische Darstellung des telemetrischen Sensors in-vivo. Lage des Transmitters in situ (roter Kasten) im seitlichen subkutanen Halsbereich. Der flüssigkeitsgefüllte Katheter wurde über die V. jugularis in die rechte Herzkammer vorgeschoben und in dieser Position in die V. jugularis eingebunden.

Den flüssigkeitsgefüllten Katheter, der mit dem Transmitter (Modell TA11PA-C10-Implant) verbunden war, führte man anschließend unter akustischer Kontrolle (Radiowelle AM) bis in den rechten Ventrikel des Herzens vor. Nachdem die korrekte Lage des Katheters durch die typischen Druckamplituden des rechten Ventrikels (siehe Abbildung 14) auf dem Monitor überprüft wurde, erfolgte die

Fixierung des Katheters mit Hilfe eines chirurgischen Knotens an der Vene und dem umliegenden Gewebe.

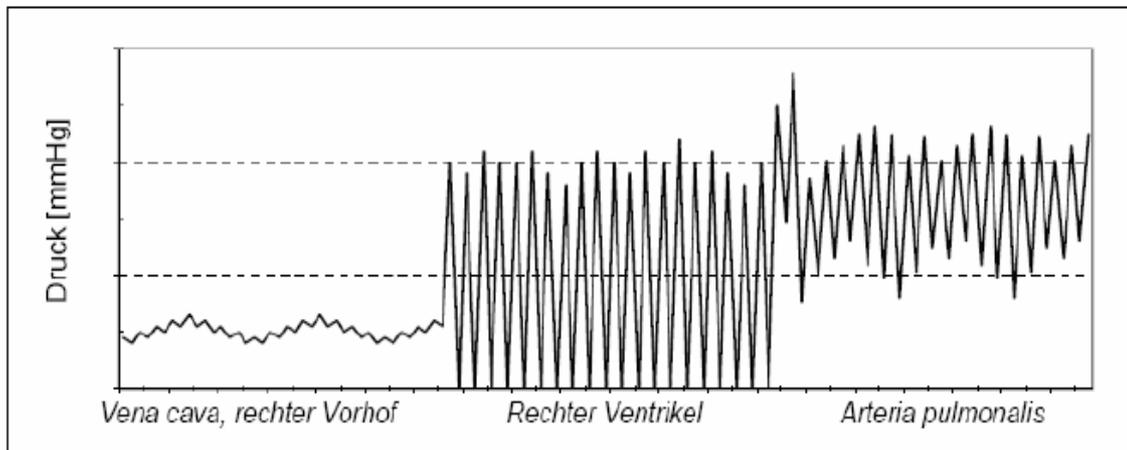


Abbildung 14: Druckkurve bei unterschiedlicher Lage des Katheters

Anschließend wurde die Wunde durch eine fortlaufende Hautnaht verschlossen und man verbrachte die Tiere in Einzelkäfige. Hier stand ihnen gegen die narkosebedingte Hypothermie eine Wärmequelle zur Verfügung. Die Tiere erhielten in den anschließenden Tagen zur Vorbeugung gegen Wundheilungsstörungen Baytril®-oral in einer Konzentration von 1 ml/250ml Leitungswasser. Im weiteren Verlauf erfolgte eine engmaschige Überwachung der Tiere. Nach abgeschlossener Rekonvaleszenz (ca. 2-3 Tage) durchliefen die Tiere das Leistungsprotokoll zur Abschlussdiagnostik. In dieser letzten Messung wurden sowohl $VO_2\max$ als auch der rechtsventrikuläre systemische Spitzendruck (RVSP) über die Daueraufzeichnung erfasst und abgespeichert. Die Daten ließen sich zu einem späteren Zeitpunkt erneut aufrufen und auswerten.

2.10.6 Explantation der Transmitter

Im Anschluss an die letzte Leistungsdiagnostik wurden die Tiere erneut durch eine intraperitoneale Injektion (i.p.) mit Ketaminhydrochlorid/Xylazin/NaCl im Verhältnis 20 μ l Ketaminhydrochlorid/20 μ l Xylazin/40 μ l NaCl in eine tiefe Narkose verbracht. Nachdem die Tiere keine Reflexe mehr zeigten, wurden durch einen medianen

Hautschnitt im Bereich der Halsunterseite die Gll. mandibulares und die V. jugularis freipräpariert. Durch vorsichtiges Durchtrennen der Ligatur entfernte man den Katheter ohne weiteren zusätzlichen Blutverlust. Die Entnahme des Blutes, der Lunge und des Herzens und anschließende Arbeitsschritte gestalteten sich wie in Kapitel 2.9.4-2.9.6 bereits beschrieben.

2.10.7 Immunhistochemie: Anti-alpha Aktin/Faktor VIII und Anti-PDE 5A

Die Durchführung der Immunfärbung gegen Anti-alpha smooth muscle actin und Faktor III gestalteten sich wie in Kapitel 2.9.7 bereits beschrieben. Zusätzlich wurde eine Immunfärbung gegen Anti-PDE 5A durchgeführt.

Der Immunfärbung ging das Entparaffinieren und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe der Gewebeschnitte voraus. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mehrmals jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

20 Minuten	Serumblock	2,5 % Normal Horse Serum ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase
über Nacht	Anti-PDE5A Primärantikörper (1:10)	Fab Gennix
30 Minuten	Sekundärantikörper	ImmPRESS Reagent Anti-Rabbit Ig Peroxidase
5 Minuten	Substrat	NovaRED (rot)
3 Minuten	Gegenfärbung (violett)	Hämatoxylin QS/Vector Zymed Kit

Im Anschluss an die Immunfärbung wurden die Schnitte dehydriert und mit Pertex eingedeckt.

2.11 Statistische Auswertung

Die n-Zahl der jeweiligen Tiergruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, den vorausgehend im Kapitel „Aufteilung der Tiergruppen“ angegebenen Tierzahlen. Für die statistische Analyse wurden die Daten zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test (P-Werte > 0,10 für $\alpha = 0,05$) auf Normalverteilung hin untersucht. Alle Daten bis auf die des rechtsventrikulären systolischen Druckes in Abb. 23 waren normalverteilt.

Für die normalverteilten Daten erfolgte die Darstellung als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Entsprechend wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen des kurativen Ansatzes durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls *post hoc* Test analysiert.

Die Daten des präventiven Ansatzes wurden auf signifikante Unterschiede im Vergleich normoxisch vs. chronisch hypoxisch gehaltene Tiere durch einen Bonferroni *post hoc* Test statistisch bewertet. Effekte des Trainings und der Behandlungen wurden im Zuge einer Varianzanalyse und einem Dunnett *post hoc* Test im Vergleich zur hypoxischen Kontrollgruppe durchgeführt. Ein *p*-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen. Für die Darstellung in Balkendiagramme repräsentieren die Balkenhöhen die jeweiligen Mittelwerte und die Fehlerbalken (Wiskers) die Standardfehler.

Für die nicht normalverteilten Daten (Abb. 23) erfolgte die Darstellung als Median und Spannweite (Range) in Form des Minimal – und Maximalwertes. Hier erfolgte die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis test incl. Dunn's *post test*, *p*-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH

Ein Ziel dieser Arbeit war es, innerhalb eines initial durchgeführten Analyse-Screenings zu untersuchen, ob eine voll-etablierte Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Mausmodell generell reversibel ist und zu einer Revertierung des Gefäßumbaus führt. Daran sollte sich in einem weiteren Schritt eine Genanalyse anschließen, die allerdings nicht Teil dieser Arbeit war. Diese soll zur Erfassung neuer, bisher nicht identifizierter Target-Gene und Signalmoleküle dienen. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit vorgestellt.

3.1.1 Gewichtsentwicklung unter Hypoxie

Die Tiere zeigten im Verlauf der Exposition unter Hypoxie- bzw. Normoxie keine klinischen Anzeichen allgemeinen Unwohlseins. Das anfängliche Gewicht der Tiere betrug vor dem Einsetzen in die Hypoxie- bzw. Normoxiekammer im Durchschnitt $21,3 \pm 0,4$ g. Im weiteren Verlauf zeigte sich nach 3-wöchiger Hypoxieexposition eine Gewichtsreduktion auf $20,9 \pm 0,5$ g. Jenes ist begründet durch die Umstellung der Tiere und den damit einhergehenden Stress sowie durch kompensatorische Adaptationsmechanismen, wie z.B. Höhendiuurese. Nachdem die 3-wöchige Expositionszeit abgeschlossen war, wurde ein Teil der Tiere in die Normoxiekammer eingesetzt (lt. Gruppeneinteilung, siehe Kapitel 2.9.1). Dort verbrachten sie die weitere Zeit bis zur jeweiligen Endzeitpunktmessung und Probenentnahme. Die Hypoxie-Kontrollgruppe wurde nach 3 Wochen, die Normoxie-Kontrollgruppe nach 9 Wochen zur Endzeitpunktmessung und Probenentnahme aus der jeweiligen Kammer genommen. Nach Re-Exposition unter Normoxie nahmen die Tiere in der folgenden Zeit an Gewicht zu. Nach 7 Tagen unter Normoxie wiesen sie ein durchschnittliches Gewicht von

21,9 ± 0,5g auf, welches sich kontinuierlich bis auf 28,1 ± 0,5g erhöhte. Die normoxischen Kontrolltiere, die zeitgleich eingesetzt wurden, nahmen kontinuierlich an Gewicht zu und wiesen ein Endgewicht von 28,0 ± 0,8g auf.

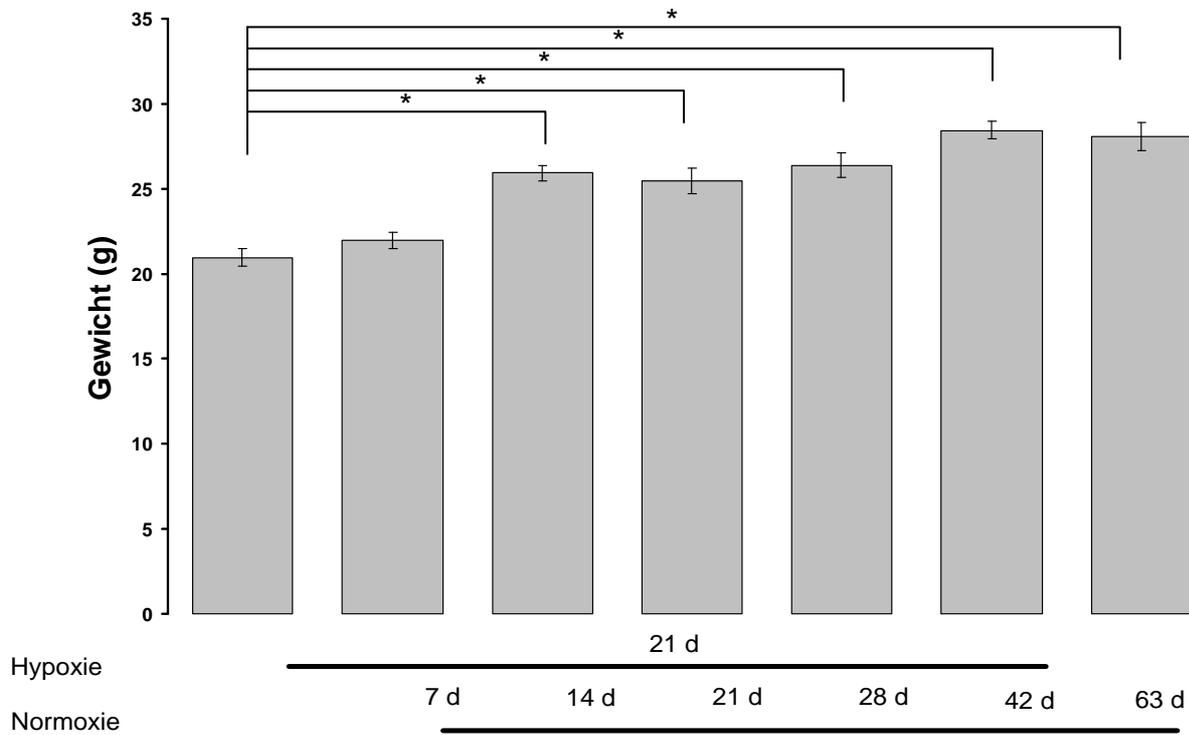


Abbildung 15: Darstellung der Gewichtsentwicklung innerhalb der verschiedenen Gruppen. Die Messung erfolgte an hypoxischen Tieren, an Tieren mit nachfolgender normoxischer Exposition nach 7, 14, 21, 28 und 42 Tagen und an einer normoxischen Kontrollgruppe mit jeweils n=7 (63 d Normoxie). *p<0,05 vs. 21 Tage Hypoxie

3.1.2 Hämatokrit

Am Anfang der Präparation wurden für die Hämatokritbestimmung pro Maus 40 µl Blut aus dem rechten Ventrikel des Herzens via Kapillare entnommen und anschließend mit Hilfe einer Zentrifuge der Hämatokritwert bestimmt. Nach 3-wöchiger Exposition unter Hypoxie entwickelten die Tiere einen Hämatokritwert von 57,3 ± 1,4%. Bei diesem Adaptationsmechanismus handelt es sich um eine bekannte physiologische Reaktion. Hypoxie führt zu einer verstärkten

Erythropoese, um den relativen Sauerstoffmangel über die Vermehrung der Sauerstoff-bindenden Zellen auszugleichen. Im weiteren Verlauf der Untersuchung und Exposition der Tiere unter Normoxie kam es zur Regression des Hämatokritwertes. Nach 7 Tagen Normoxie zeigten die Tiere einen Mittelwert von $53,9 \pm 1,3\%$. Im weiteren Verlauf unter Normoxie sank der Hämatokritwert nach 42 Tagen auf $39,3 \pm 1,8\%$. In den gesunden Kontrolltieren wurde nach 63 Tagen Normoxieexposition ein Mittelwert von $41,3 \pm 1,2\%$ ermittelt.

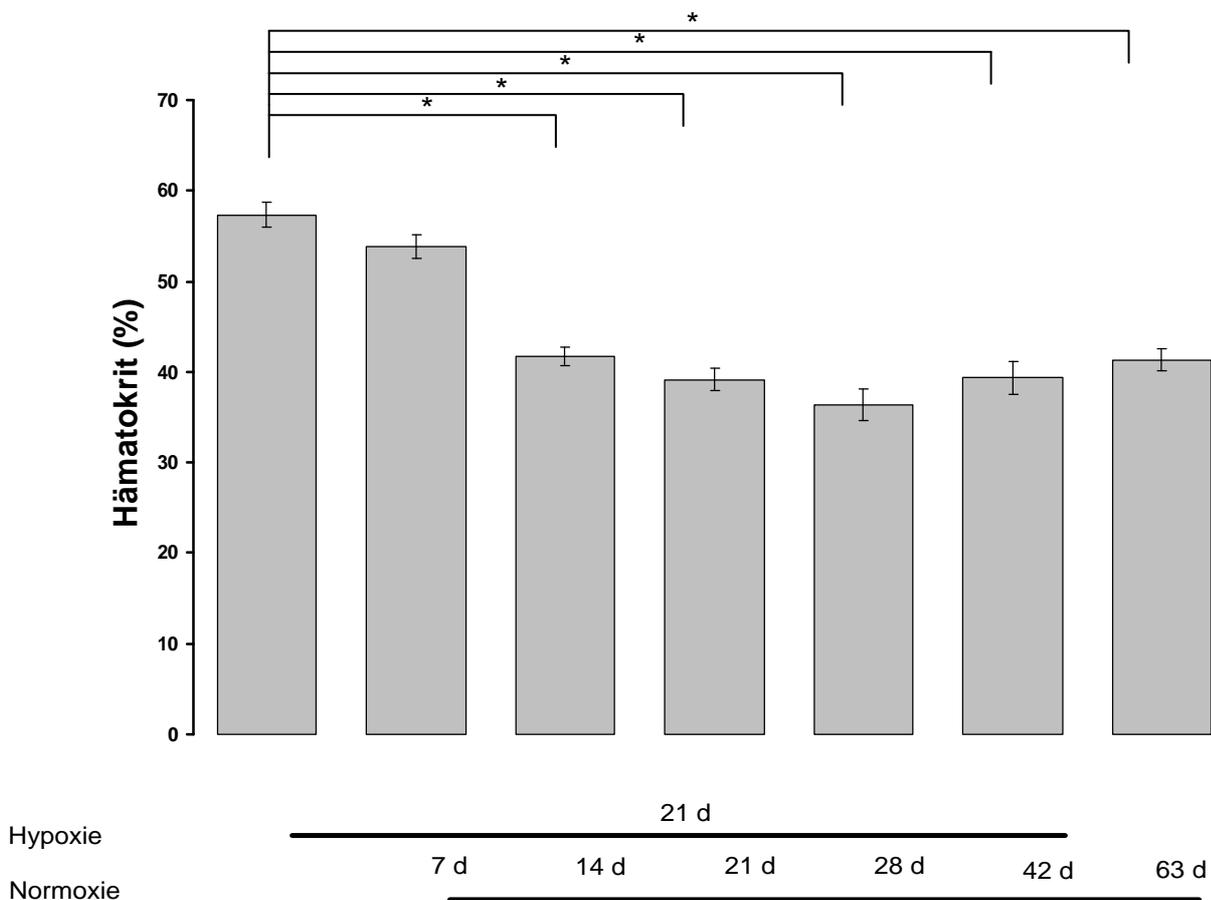


Abbildung 16: Darstellung des Hämatokritwertes innerhalb der verschiedenen Gruppen. Die Messung erfolgte an hypoxischen Tieren, an Tieren mit nachfolgender normoxischer Exposition nach 7, 14, 21, 28 und 42 Tagen und an einer normoxischen Kontrollgruppe mit jeweils n=7 (63 d Normoxie). *p<0,05 vs. 21 Tage Hypoxie

3.1.3 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP)

Nach Normoxie- bzw. Hypoxieexposition wurden die Tiere zum Abschluß des Versuches in das Stadium der chirurgischen Toleranz (Stadium III) verbracht. Im Rahmen der Bestimmung des RVSP wurde der rechte Ventrikel des Herzens mit Hilfe einer flüssigkeitsgefüllten Kanüle punktiert. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Aufzeichnung des rechtsventrikulären systemischen Druckes in Form einer Druckkurve. Aus dieser Kurve wurden die gemittelten systolischen Druckwerte zur Darstellung herangezogen.

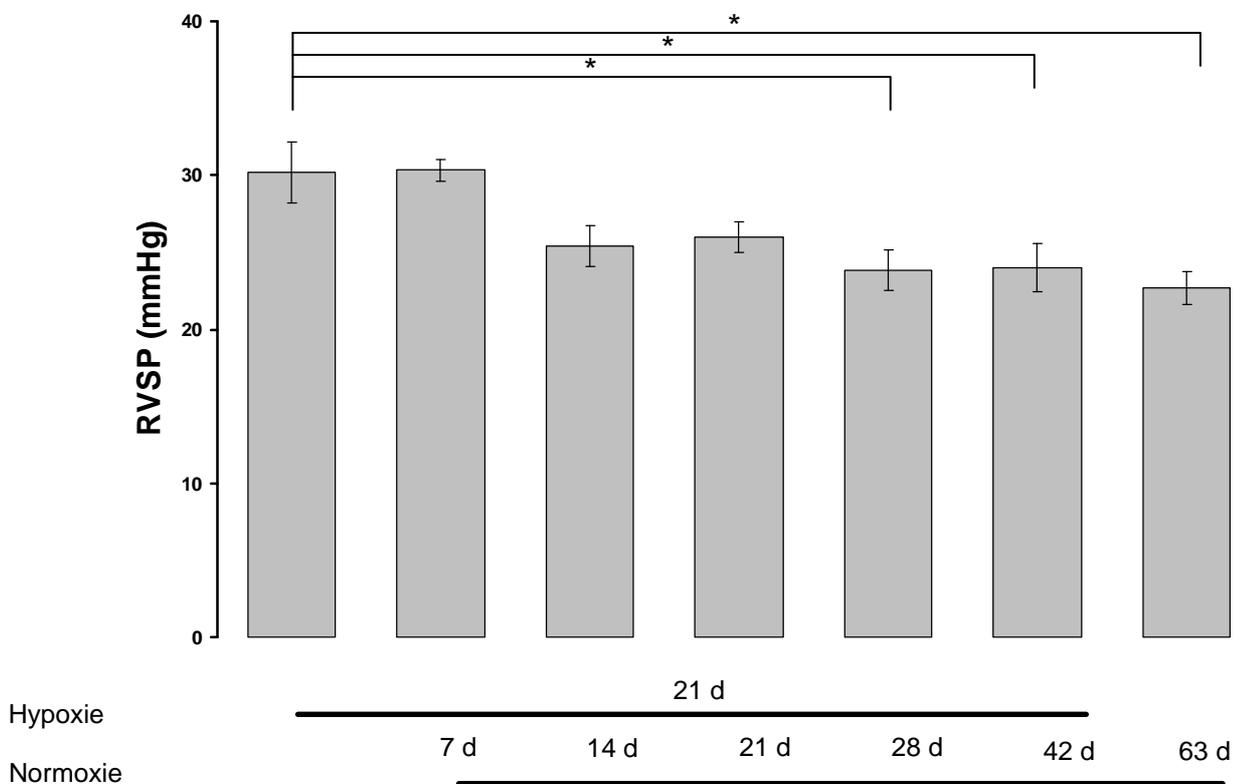


Abbildung 17: Darstellung des rechtsventrikulär systolischen Druckes (RVSP) innerhalb der verschiedenen Tiergruppen. Die Messung erfolgte an hypoxischen Tieren, an Tieren mit nachfolgender normoxischer Exposition nach 7, 14, 21, 28 und 42 Tagen und an einer normoxischen Kontrollgruppe mit jeweils n=7 (63 d Normoxie) *p<0,05 vs. 21 Tage Hypoxie

Nach dreiwöchiger Exposition unter Hypoxie zeigten die Tiere einen RVSP von $30,2 \pm 1,9$ mmHg. Tiere, die anschließend 7 bzw. 14, 21, 28 und 42 Tage in

Normoxie verbrachten, wiesen einen RVSP von $30,3 \pm 0,7$ bzw. $25,4 \pm 1,3$; $26,0 \pm 1,0$; $23,8 \pm 1,3$; $24,0 \pm 1,6$ mmHg auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass bereits nach 14-tägiger normoxischer Behandlung eine deutliche Regression der Drücke im rechten Ventrikel vorlag. Diese unterschieden sich jedoch noch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (21 Tage Hypoxie). Erst im weiteren Verlauf unter Normoxie (21 Tage Hypoxie + 28 bzw. 42 Tage Normoxie) traten Signifikanzen zu der hypoxischen Kontrollgruppe auf. Bei den gesunden Kontrolltieren betrug der Mittelwert $22,7 \pm 1,1$ mmHg und stellte sich folglich gegenüber der hypoxischen Kontrollgruppe (21 Tage Hypoxie) signifikant dar.

3.1.4 Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie

Die Tiere entwickelten im Verlauf der Erkrankung als Folge der erhöhten pulmonalen Drücke eine Rechtsherzhypertrophie.

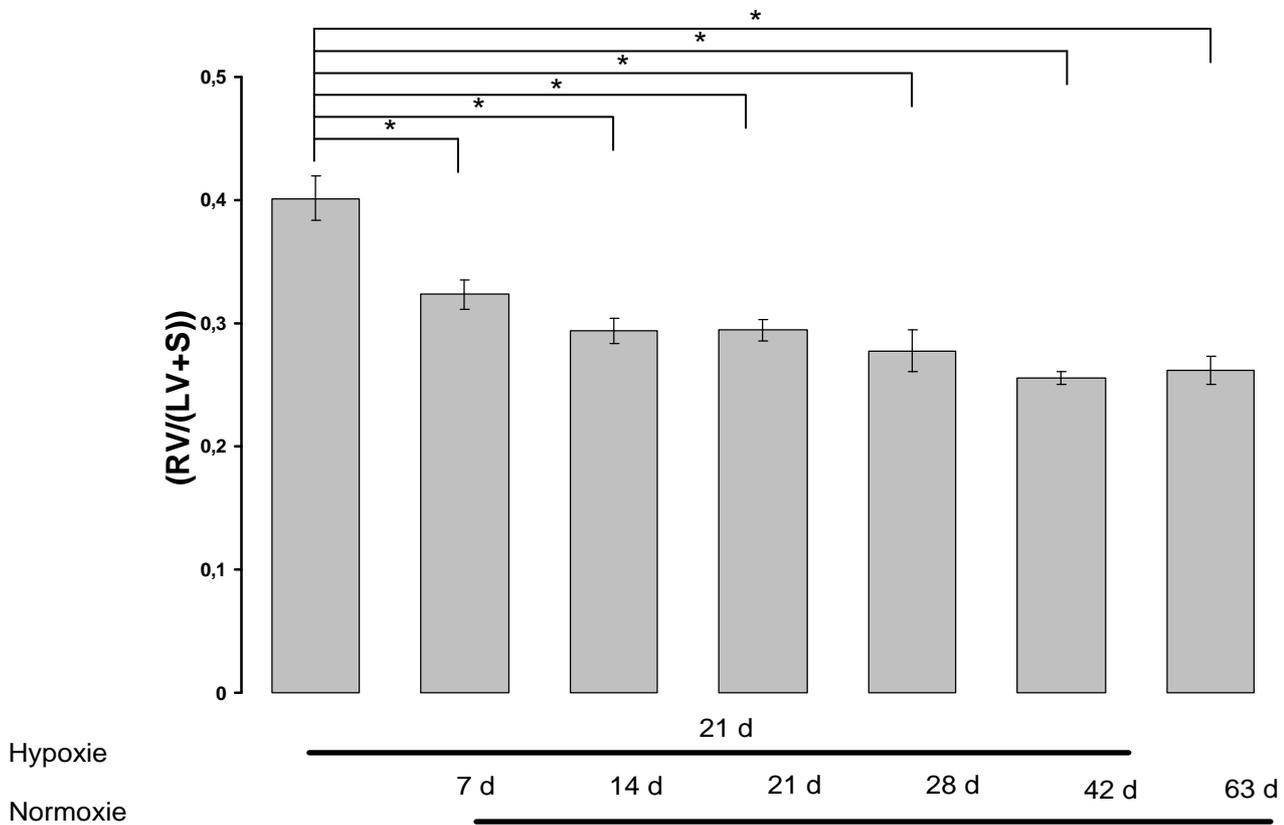


Abbildung 18: Darstellung des Verhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/(LV+S)) in den einzelnen Gruppen als Index für die Rechtsherzhypertrophie mit jeweils n=7. *p<0,05 vs. 21 Tage Hypoxie.

Nach dreiwöchiger Hypoxieexposition zeigten die Tiere einen Mittelwert von $0,40 \pm 0,02$. In Folge der normoxischen „Behandlung“ von 7 Tagen sank diese signifikant auf $0,32 \pm 0,01$ ab. Die weitere Exposition unter Normoxie führte nach 42 Tagen zu einer Rechtsherzratio von $0,26 \pm 0,01$. Die Herzratio in gesunden Kontrolltiere ergab einen Wert von $0,26 \pm 0,01$. Dieser stellte sich signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe (21 Tage Hypoxie) dar.

3.1.5 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Im Zuge der Ausbildung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie kommt es zu einer Muskularisierung von unter Normoxie nicht-muskularisierten, distalen Lungengefäßen. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen quantitativ bestimmen zu können, wurde am Lungengewebe eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Sie enthält zum einen die Färbung gegen glattmuskuläres alpha-Aktin, die mit einem violetten Chromogen (VectorVIP®) entwickelt wurde, und zum anderen eine Färbung gegen den endothelialen Von-Willebrand-Faktor, welcher mit einem braunen Chromogen (VectorDAB®) entwickelt wurde. Auf diese Weise konnte zwischen nicht- ($\leq 5\%$ Anteil glattmuskulärem alpha-Aktin in positiven Bereichen in der Gefäßmedia), teilweise- ($\leq 75\%$ Anteil) und voll-muskularisierten Gefäßen ($> 75\%$ Anteil) differenziert werden.

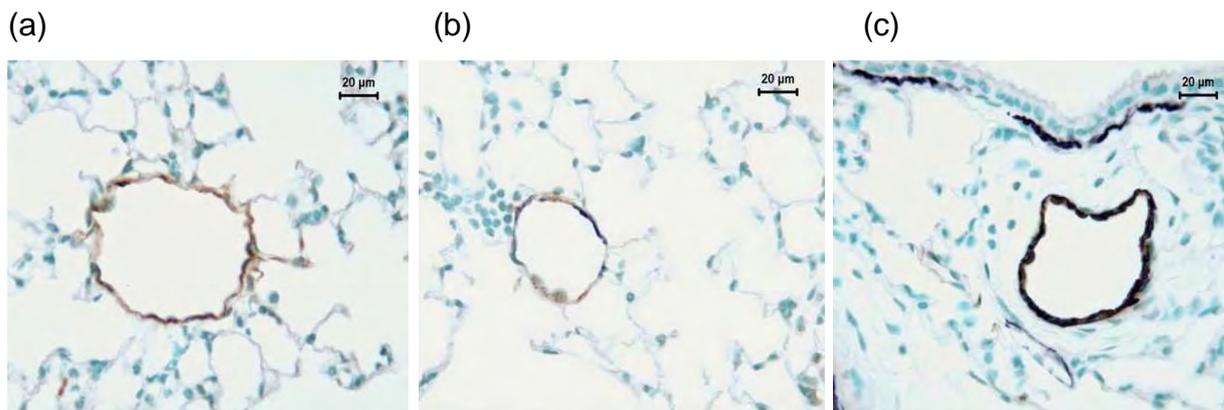


Abbildung 19: Immunhistochemische Doppelfärbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (analysiert bei einer 400-fachen Vergrößerung) gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres alpha-Aktin (violett). (a)+(b) in gesunden Mäusen sind die kleinen peripheren Pulmonalarterien nicht- oder nur teilweise-muskularisiert. (c) im Verlauf der Progression der pulmonalen Hypertonie unter Hypoxie erfolgt eine Zunahme des Muskularisierungsgrades.

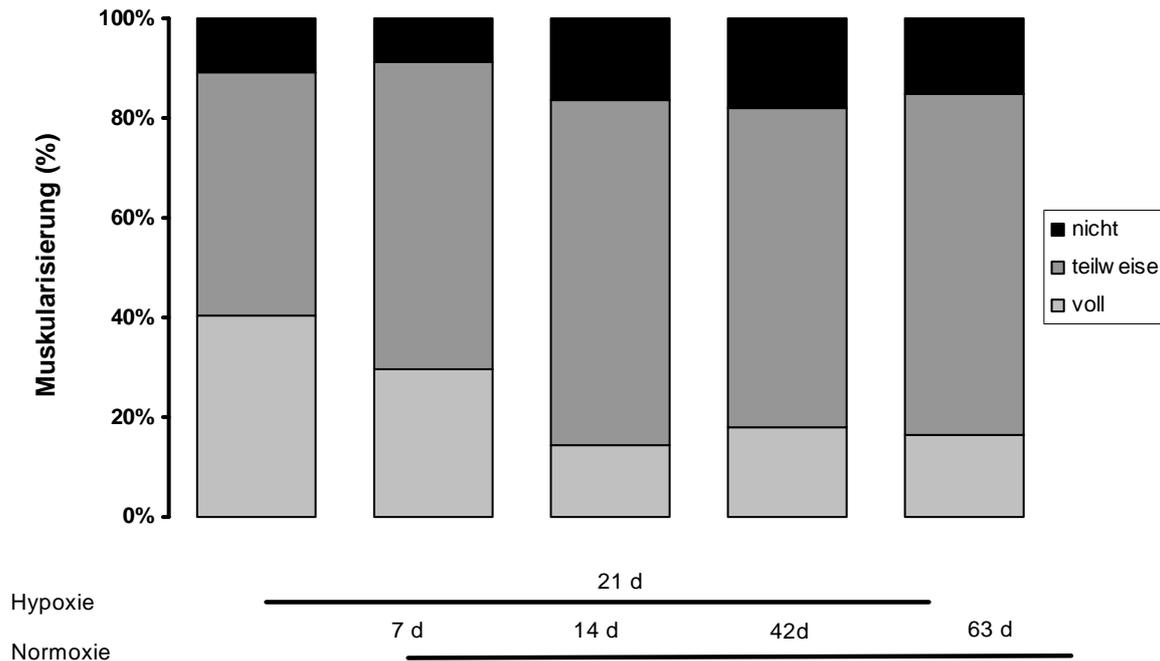


Abbildung 20: Prozentualer Anteil voll-, teilweise- oder nicht-muskularisierter peripherer Pulmonalarterien in den einzelnen Tiergruppen (mit jeweils n=7) bezogen auf die Gesamtsumme der ausgezählten Gefäße. Morphometrisch analysiert wurden pro Tier jeweils 160 periphere Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 20-70 μm .

Nach 3-wöchiger Exposition unter hypoxischen Konditionen entwickelten die Tiere eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie mit einem Umbau der peripheren Lungengefäße. Im Rahmen der Analyse wurde bei den hypoxischen Kontrolltieren innerhalb der Gefäßkategorie von 20-70 μm $40 \pm 5,0\%$ voll-muskularisierte periphere Lungengefäße, $49 \pm 5,0\%$ teilweise-muskularisierte Lungengefäße und $11 \pm 2\%$ nicht-muskularisierte Lungengefäße erfasst. Im Verlauf der normoxischen re-Exposition kam es zu einer Regression der voll-muskularisierten Gefäße über die bestehende Zeitdauer hinweg. Nach 7 Tagen Normoxie betrug deren Anteil $30 \pm 3,0\%$ nach 14 Tagen $15 \pm 3,0\%$ und nach 42 Tagen unter normoxischen Konditionen $18 \pm 2\%$. Der Anteil der nicht-muskularisierten peripheren Lungengefäße nahm hingegen innerhalb des Zeitverlaufes zu und verhielt sich folglich gegenläufig zu den voll-muskularisierten Gefäßen. Nach 7 Tagen Normoxie betrug diese $9 \pm 2\%$; nach 14 Tagen $16 \pm 2\%$ und nach 42 Tagen $18 \pm 2\%$. In gesunden Kontrolltieren (63d Normoxie) wurden in der zu

untersuchenden Kategorie (20-70µm) $16 \pm 2\%$ voll-muskularisiert, $68 \pm 4\%$ teilweise-muskularisiert und $15 \pm 4\%$ nicht-muskularisierte Gefäße analysiert. Der Anteil an teilweise-muskularisierten Lungengefäßen erhöhte sich zum Zeitpunkt der 7-tägigen Behandlung auf $61 \pm 3\%$ und nach 14 Tagen auf $69 \pm 11\%$. Nach 42 Tagen unter Normoxie veränderte sich dieser Wert nur minimal ($MW 64 \pm 2\%$). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Normoxie-bedingten Effekte auf die Revertierung der kleinen peripheren Gefäße nach einer 14-tägigen re-Exposition vollständig erfolgt sind. Die Werte sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst.

Muskularisierungsgrad (%)

Tiergruppen	nicht (MW±SEM)	teilweise (MW±SEM)	voll (MW±SEM)
21d Hypoxie	11 ± 2	49 ± 5	40 ± 5
21d Hypoxie+ 7d Normoxie	9 ± 2	61 ± 3	$30 \pm 3^*$
21d Hypoxie+ 14d Normoxie	16 ± 2	69 ± 11	$15 \pm 2^*$
21d Hypoxie+ 42d Normoxie	18 ± 2	64 ± 2	$18 \pm 2^*$
63d Normoxie	15 ± 4	68 ± 4	$16 \pm 2^*$

Tabelle 1: Effekte der Re-Exposition von chronisch hypoxischen Mäusen in einer normoxischen Atmosphäre auf die Muskularisierung kleiner peripherer voll-, teilweise- und nicht-muskularisierter pulmonalarterieller Gefäße (20-70µm externer Querdurchmesser) im Zeitverlauf der Behandlung. * $p < 0,05$ vs. 21 d Hypoxie für die voll-muskularisierten Gefäße.

3.2 Training und pulmonale Hypertonie

3.2.1 Gewichtsentwicklung der Tiere

Die Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Randomisierung ein durchschnittliches Gewicht von 24,3 g auf. Zum Ende der Studie zeigten sie ein innerhalb der verschiedenen Gruppen homogenes durchschnittliches Gewicht von 23,9 g, die normoxischen Kontrolltiere wogen im Durchschnitt 26,5 g. Die Tiere ließen während des Versuchs keine klinischen Anzeichen von Unwohlsein erkennen.

3.2.2 Gehstrecke

Die 6-Minuten-Gehstrecke (6-MWT) wird in der Humanmedizin als ein leicht zu ermittelnder Parameter für die Schwere der pulmonalen Hypertonie und die Prognose des Patienten eingesetzt (Solway *et al.* 2001; Runo u. Loyd 2003). Der Test misst die zurücklegbare Gehstrecke innerhalb von 6 Minuten. Im Rahmen der vorliegenden Studie ist die Anwendung aufgrund der generell guten Laufbereitschaft der Mäuse nur bedingt möglich und sinnvoll. Aus diesen Gründen wurde die gesamte Gehstrecke der Tiere bis zur Ermüdung ermittelt. Zu diesem Zweck wurde ein standardisiertes Protokoll eingesetzt, welches eine kontinuierliche Geschwindigkeitserhöhung des Laufbandes um 0,05 m/s alle 3 Minuten vorsah.

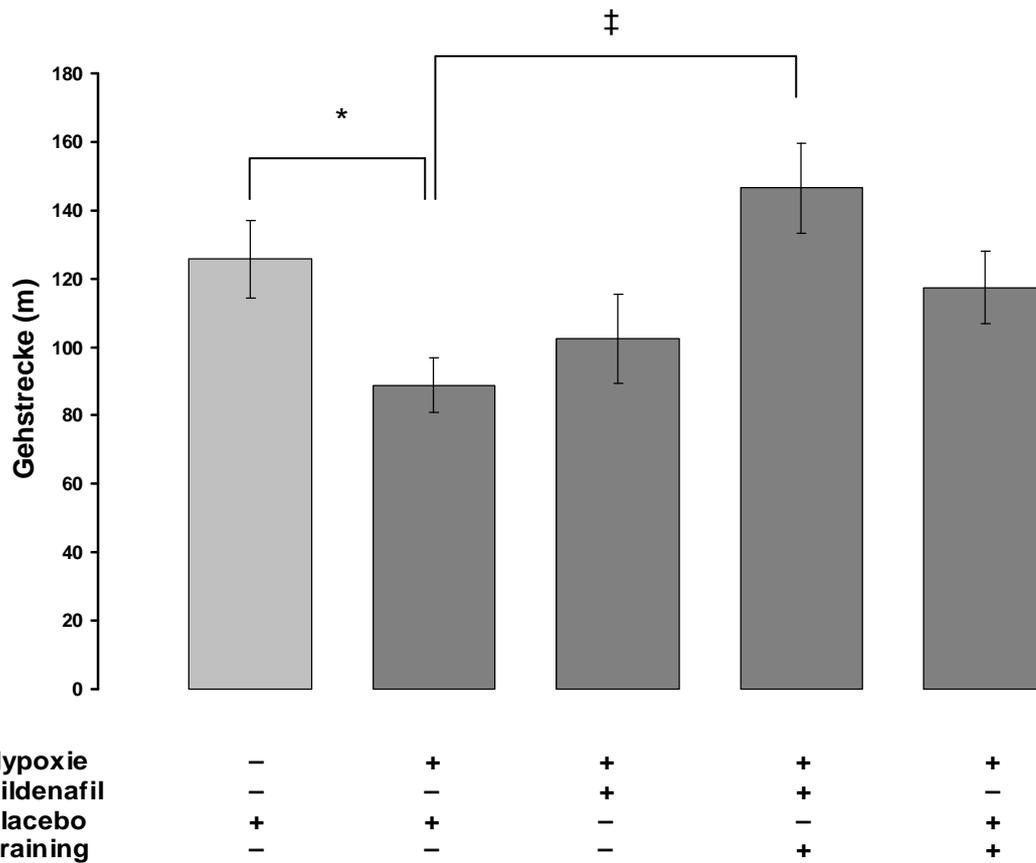


Abbildung 21: Darstellung der Gehstrecke in m. Ermittlung nach Abschluss der 3-wöchigen Expositionszeit in den einzelnen Gruppen (mit jeweils n=6). Die Messung erfolgte auf einem Laufband (Treadmill for mice, entwickelt von Herrn Arnfinn Sira, Trondheim, Norwegen) und der dazugehörigen Analysesoftware (Metabolic Performance Testing System, MPTS). *p<0,05 vs. gesunde Kontrollgruppe (Normoxie); ‡ p<0,05 vs. kranke Kontrollgruppe (Hypoxie).

Die normoxischen untrainierten Tiere (MW $125,7 \pm 1,8$ m) legten eine signifikant erhöhte Gehstrecke gegenüber den hypoxischen untrainierten Placebo-Tieren (MW $88,9 \pm 8,1$ m) zurück. Trainierte hypoxische Placebo-Tiere legten eine Distanz von $117,4 \pm 10,6$ m zurück. Untrainierte, hypoxisch gehaltene Mäuse, die mit einer täglichen Gabe Sildenafil (Revatio®, 100mg/kg/d) behandelt wurden, legten eine Gehstrecke von $102,5 \pm 13,0$ m zurück. Jene Tiere, die zusätzlich zu der Therapie ein tägliches halbstündiges Training absolvierten, erzielten eine signifikant erhöhte Gehstrecke ($146,4 \pm 13,1$ m) im Vergleich zu den hypoxischen untrainierten Placebo-behandelten Tieren.

3.2.3 VO_2 max in ml O_2 /min/kg Körpermasse

Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2 max) gibt an, wieviel ml Sauerstoff der Körper im Zustand der höchsten Belastung maximal pro Minute verwerten kann. Die Angabe erfolgt in ml Sauerstoff pro Minute (ml O_2 /min/kg Körpermasse) (Benzo *et al.* 2007). Die VO_2 max kann als Kriterium für die Bewertung der Ausdauerleistungsfähigkeit eines Menschen herangezogen werden. Der VO_2 max-Wert stellt bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie einen zuverlässigen Prognoseparameter dar (Wenzel *et al.* 2002). Bei diesen Patienten kommt es bei der Überbeanspruchung des rechten Herzens während körperlicher Anstrengung und der damit verbundenen erhöhten Nachlast zu einem verminderten Herzzeitvolumen (HZV), das zu einer Unterversorgung der arbeitenden Muskulatur mit O_2 führt. Die Leistungsfähigkeit bei diesen Patienten ist durch eine eingeschränkte Steigerung des HZV an den erhöhten peripheren O_2 -Bedarf bei körperlicher Belastung limitiert.

Die Erfassung der individuellen VO_2 max-Werte fand auf einem Laufband statt, welches mit einem Deckel verschlossen wurde und somit ein in sich geschlossenes System darstellte. Die Analyseeinheit erlaubte eine spirometrische Erfassung der O_2 -Aufnahme und der CO_2 -Abgabe. Von einer Pumpe wurde eine voreingestellte definierte Menge Luft (0,5l/min) über einen Schlauch der geschlossenen Kammer des Laufbandes zugeführt. Am hinteren Ende der Kammer führte ein zweiter Schlauch die Luft aus der Kammer zurück zur Gasanalyseeinheit, in der die Gaskonzentrationen gemessen wurden. Die Ermittlung der VO_2 max-Werte erfolgte anschließend durch die speziell für das System entwickelte Software namens „Metabolic Performance Testing System“ (MPTS). Die Speicherung der Daten erlaubte eine Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt.

Bei der anfänglichen und abschließenden Leistungsdiagnostik wurde der VO_2 max-Wert in allen Tiergruppen erfasst. Dazu wurde der in der Eingangsleistungsdiagnostik ermittelte VO_2 max-Wert auf 100 % festgelegt. In der Abschlussdiagnostik nach 3 Wochen wurde die VO_2 max als prozentuale Änderung dieses Wertes angegeben.

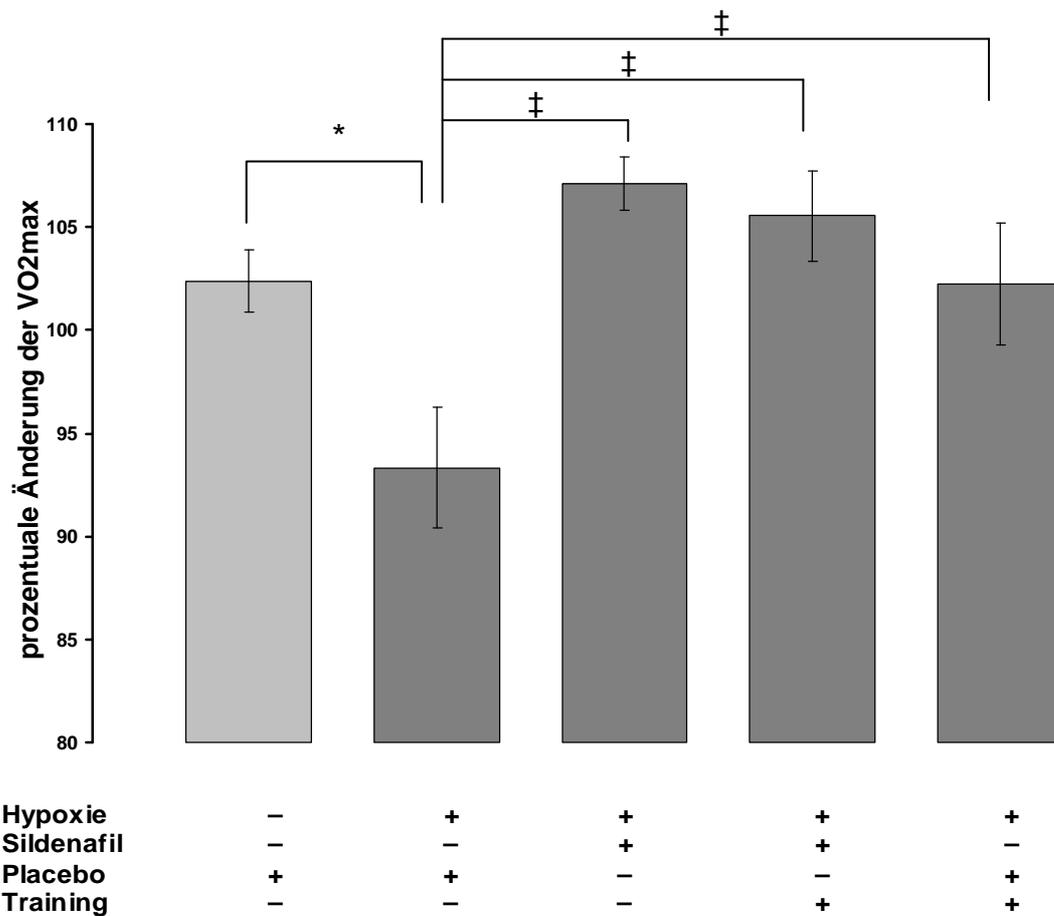


Abbildung 22: Darstellung der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO₂max) der abschließenden Leistungsdiagnostik in den einzelnen Gruppen (mit jeweils n=6). Die innerhalb der ersten Leistungsdiagnostik ermittelten absoluten Werte wurden als 100% festgelegt. Die Graphik stellt die prozentuale Änderung der anfangs ermittelten VO₂max-Werte gegenüber der Abschlussmessung dar. *p<0,05 vs. gesunde Kontrollgruppe (Normoxie); ‡p<0,05 vs. kranke Kontrollgruppe (Hypoxie).

Verglichen mit den gesunden Kontrolltieren (MW 102,4 ± 1,5%) war die maximale Sauerstoffaufnahme in der Placebo-Gruppe vermindert (MW 93,3 ± 2,9%). Sildenafil-therapierte Tiere (MW 107,1 ± 1,3%) und Tiere, die zusätzlich ein halbstündliches tägliches Training absolvierten (MW 105,5 ± 2,2%), zeigten eine signifikante Steigerung der VO₂max gegenüber der kranken Kontrollgruppe. Trainierte, hypoxisch gehaltene Tiere (MW 102,2 ± 3,0%) lagen auf dem Niveau der gesunden Tiere und zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine signifikante Verbesserung in der maximalen Sauerstoffaufnahme.

3.2.4 Telemetrisch ermittelter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

Für die Messung des RVSP wird über eine kleine Inzision der V. jugularis eine Messsonde bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben und verbleibt dort dauerhaft. Bei dieser Methode handelt es sich um eine minimal-invasive Operationstechnik. Der Vorteil dieser Methode liegt in der komplikationslosen Durchführung und der raschen postoperativen Erholungszeit gegenüber den in der Literatur beschriebenen stärker invasiven Methoden, wie z. B. durch Thorakotomie (Hess *et al.* 1996; Pozeg *et al.* 2003; Sebki *et al.* 2003). Der wesentliche Vorteil ist jedoch die Möglichkeit, *in-vivo* Messungen über einen längeren Zeitraum unter annähernd physiologischen Bedingungen durchzuführen. Nach Implantation des telemetrischen Sensors und einer zweitägigen Rekonvaleszenz wurde der RVSP im Rahmen der abschließenden Leistungsdiagnostik ermittelt. Die unterschiedliche Anzahl der Tiere innerhalb der Gruppen ist durch Ausfälle aufgrund einer fehlerhaften Position des Katheters, die sich in einer postoperativen Phase ergeben kann, begründet. Tiere, bei denen bereits nach Aufhebung der Narkose eine fehlerhafte Lokalisation des Katheters festgestellt wurde, wurden in einem weiteren Eingriff erneut operiert. Spätere Lokalisationsveränderungen konnten jedoch nicht mehr korrigiert werden. Für die weitere Auswertung wurden auch Organe der Tiere verwendet, bei denen der RVSP aus oben genannten Gründen nicht ermittelt werden konnte. Um die verschiedenen Tiergruppen innerhalb der Leistungsdiagnostik miteinander zu vergleichen, wurde eine Geschwindigkeit gewählt, die alle Tiere erreichten.

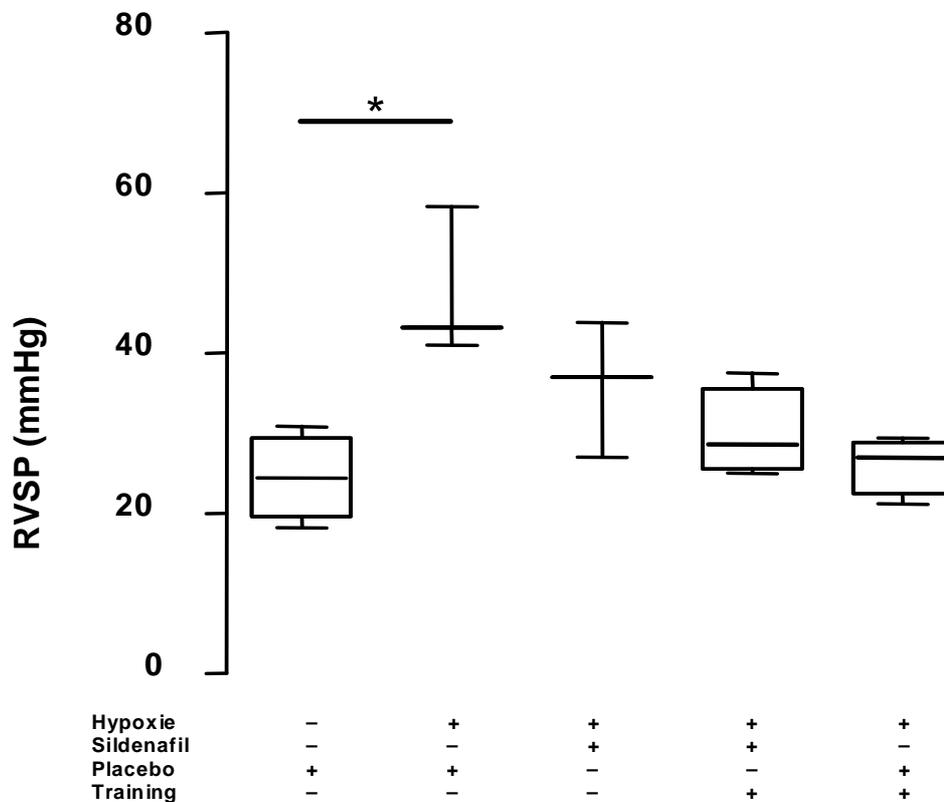


Abbildung 23: Darstellung des mittels telemetrischer Sensoren gemessenen RVSP in den verschiedenen Tiergruppen (mit unterschiedlichen n-Anzahlen, s.Text). Die Messung wurde im Rahmen der abschließenden Leistungsdiagnostik durchgeführt. Die ermittelten rechtsventrikulären Drücke wurden bei einer Geschwindigkeit von 0,20m/s gemessen. * $p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollgruppe (Normoxie).

Der RVSP wurde bei einer Laufbandgeschwindigkeit von 0,20 m/s ermittelt. In den gesunden Kontrolltieren (n=4) betrug der Median 24,5mmHg (Minimum 18,25mmHg/Maximum 30,9mmHg). Im Vergleich dazu zeigte die Hypoxie-Kontrollgruppe signifikant erhöhte Drücke (43,2 mmHg, n=3, Minimum 41,0mmHg/Maximum 58,3mmHg). Mit Sildenafil (Revatio®, 100mg/kg/d) therapierte Tiere (n=3) wiesen einen Druck von 37,0 mmHg (Minimum 27,0mmHg/Maximum 43,9mmHg) auf. Bei Tieren, die sowohl mit Sildenafil behandelt wurden als auch an einem täglichen halbstündigen Training teilnahmen,

betrug der Mittelwert 28,6mmHg (n=4, Minimum 25,0mmHg/Maximum 37,6mmHg). Die trainierte Placebo-Gruppe (n=4) wies einen durchschnittlichen rechtsventrikulären Druck von 27,0mmHg (Minimum 21,2mmHg/Maximum 29,4mmHg) auf. In sämtlichen Trainings- und Behandlungsgruppen war der RVSP nicht signifikant gegenüber dem der gesunden Kontrolltiere erhöht.

3.2.5 Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie

Eine 3-wöchige Exposition unter Hypoxie führt durch die Hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozesse und dem daraus resultierenden erhöhten pulmonal-vaskulären Perfwiderstand zu einer progressiven Belastung des rechten Herzens. Dieser Zustand führt zu einer Adaptation des rechten Ventrikels, der sich in einer rechtsventrikulären Hypertrophie zeigt.

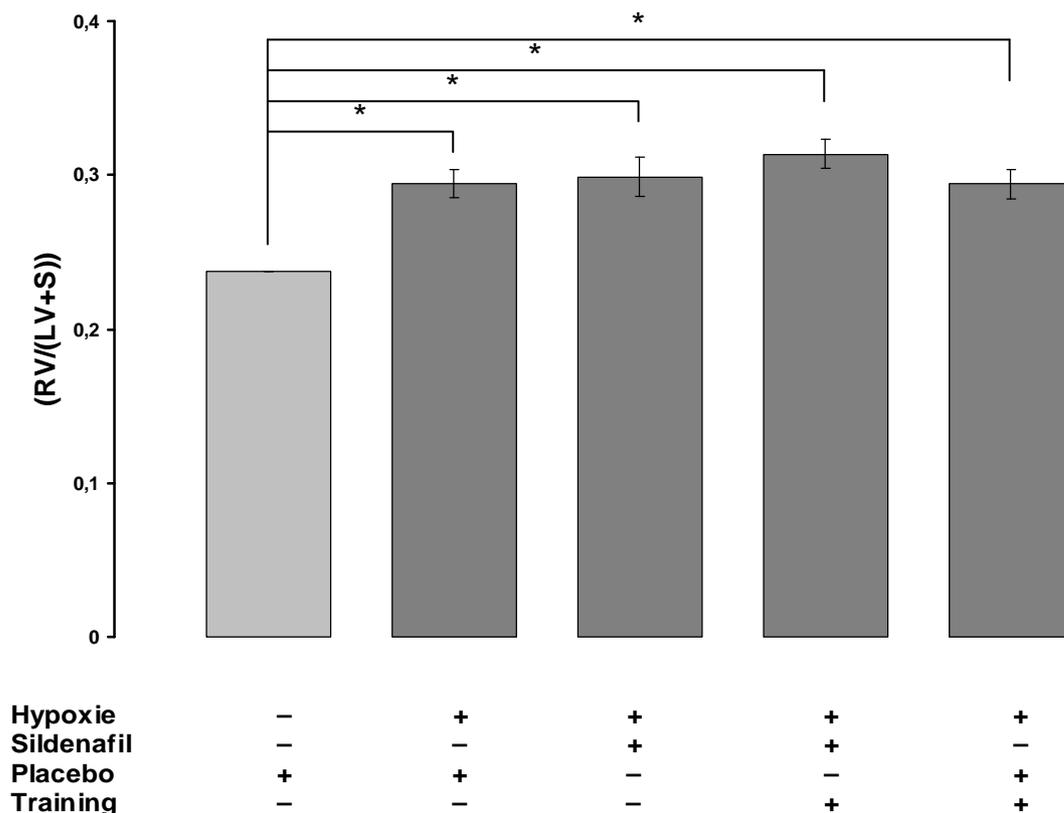


Abbildung 24: Darstellung des Verhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/(LV+S)) in den einzelnen Gruppen (mit jeweils n=6) als Index für die Rechtsherzhypertrophie. *p<0,05 vs. gesunde Kontrollgruppe (Normoxie).

In den gesunden Kontrolltieren betrug der Mittelwert $0,24 \pm 0,00$. Die hypoxische Placebo-Gruppe entwickelte im Zuge der Erkrankung als Folge der erhöhten pulmonalen Drücke eine Rechtsherzhypertrophie (MW $0,29 \pm 0,01$). Die Rechtsherzratio der mit Sildenafil (Revatio®; 100mg/kg/d) therapierten Tiere (MW $0,30 \pm 0,01$), der Sildenafil/Training-Gruppe (MW $0,31 \pm 0,01$) und der Placebo/Training-Gruppe (MW $0,29 \pm 0,01$) stellte sich nicht signifikant reduziert gegenüber der kranken Placebo-Kontrollgruppe (MW $0,29 \pm 0,01$) dar. Dieses Ergebnis könnte die Annahme stützen, dass ein Hypoxie-Stimulus per se zu einer Hypertrophie des rechten Herzens führt. Auf diese Hypothese wird in der Diskussion näher eingegangen.

3.2.6 Muskularisierungsgrad der pulmonal-arteriellen Gefäße

In Folge eines hypoxischen Stimulus kommt es zu einer akut einsetzenden Vasokonstriktion, die über eine protrahierte Form zu den chronischen Umbauprozessen überleitet. Diese führt auf dem Niveau des Lungengefäßbettes zu der Muskularisierung kleiner, ehemals nicht-muskularisierter Lungengefäße. Diese Gefäße können durch eine quantitative Morphometrie bestimmt werden.

Muskularisierungsgrad %

Tiergruppen	nicht (MW±SEM)	teilweise (MW±SEM)	voll (MW±SEM)
gesund (21d Normoxie)	31 ± 5	56 ± 3	13 ± 2
Placebo (21d Hypoxie)	6 ± 1 *	62 ± 2	31 ± 2 *
Sildenafil (100mg/kg/d)	19 ± 3 ‡	61 ± 3	21 ± 4 ‡
Sildenafil+Training	21 ± 3 ‡	63 ± 3	16 ± 3 ‡
Placebo+Training	21 ± 5 ‡	62 ± 2	17 ± 5 ‡

Tabelle 2: Effekte der Behandlung mit Sildenafil, Training und deren Kombinationen auf die Muskularisierung kleiner peripherer Pulmonalarterien (20-70µm externer Querdurchmesser).
* $p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollen (Normoxie) ; ‡ $p < 0,05$ vs. kranke Kontrollgruppe (Hypoxie).

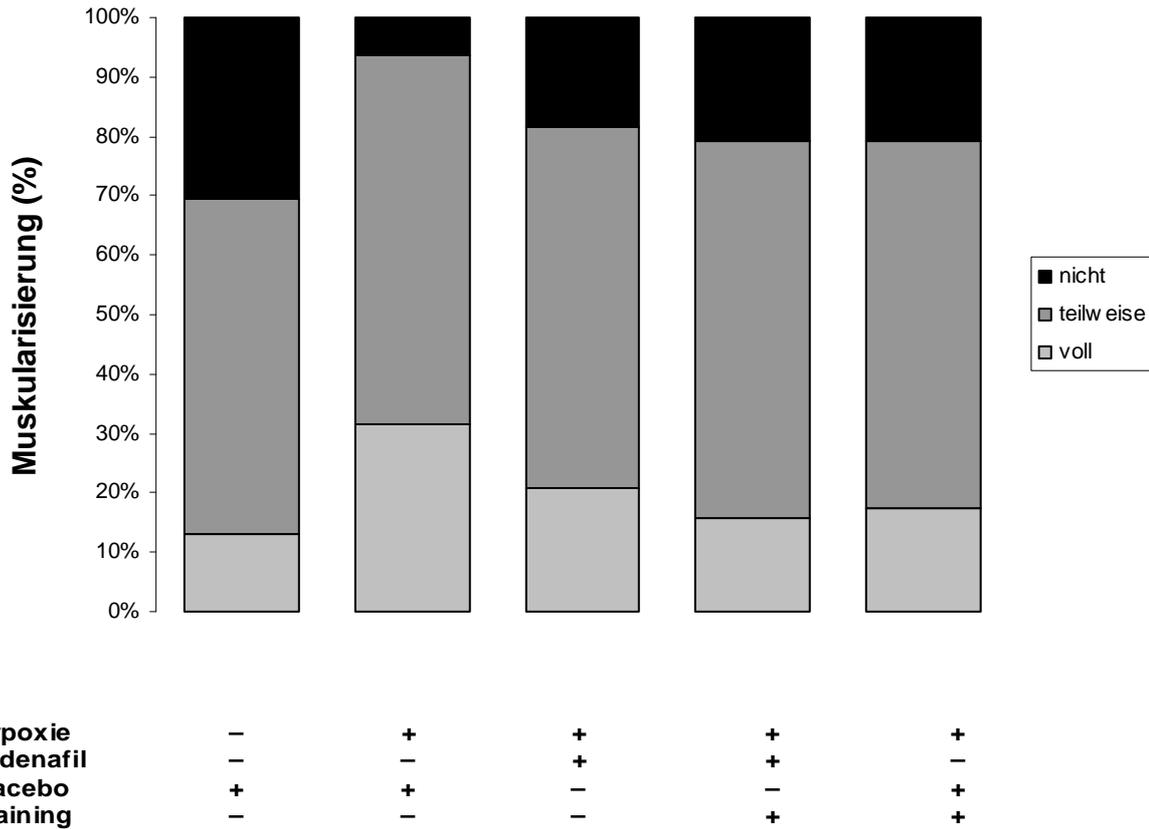


Abbildung 25: Prozentualer Anteil voll-, teilweise- oder nicht-muskularisierter peripherer Pulmonalarterien in den einzelnen Tiergruppen bezogen auf die Gesamtsumme der ausgezählten Gefäße. Morphometrisch analysiert wurden pro Tier (mit jeweils n=6) jeweils 160 periphere Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 20-70 μm .

Der Anteil voll-muskularisierter Gefäße betrug in der hypoxischen Placebo-Gruppe $31 \pm 2\%$ und in der gesunden Kontrollgruppe $13 \pm 2\%$. Der Anteil nicht-muskularisierter Gefäße machte bei der Placebo-Gruppe $6 \pm 1\%$ und bei der gesunden Kontrollgruppe $31 \pm 5\%$ aus. Der Anteil der teilweise-muskularisierten Gefäße differierte zwischen den beiden Gruppen nur unwesentlich (Placebo MW $62 \pm 2\%$ vs. gesunde Kontrollgruppe MW $56 \pm 3\%$). In den verschiedenen Therapie-Gruppen kam es zu einer signifikanten Verringerung der voll-muskularisierten Gefäße (Sildenafil MW $21 \pm 4\%$; Sildenafil/Training MW $16 \pm 3\%$; Placebo/Training MW $17 \pm 5\%$) gegenüber der Placebo-Gruppe (MW $31 \pm 2\%$) und einer signifikanten Erhöhung der nicht-muskularisierten Gefäße (Sildenafil MW $19 \pm 3\%$; Sildenafil/Training MW $21 \pm 3\%$; Placebo/Training MW $21\% \pm 3$) gegenüber der Placebo-Gruppe (MW $6 \pm 1\%$). Der Anteil der

teilweise-muskularisierten peripheren Lungengefäße in den verschiedenen Gruppen verhielt sich auf ähnlichem Niveau und unterschied sich in den einzelnen Therapie-Gruppen (Sildenafil MW $61 \pm 3\%$; Sildenafil/Training MW $63 \pm 3\%$; Placebo/Training MW $62 \pm 2\%$) gegenüber der Placebo-Gruppe (MW $62 \pm 2\%$) nicht signifikant voneinander.

4 Diskussion

4.1 Normoxie-induzierte Revertierung des vaskulären Gefäßumbaus bei Hypoxie-induzierter PH

4.1.1 Wahl des Tiermodells

Um tiefere Einblicke in die Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie beim Menschen zu bekommen und um neue Therapieansätze zu testen, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um die pathophysiologischen und klinischen Veränderungen der IPAH nachzuahmen. Trotz intensiver langjähriger Forschung existiert bis heute kein ideales Modell. Man weiss jedoch, dass Hypoxie bei fast allen Säugern den gleichen Effekt besitzt. Darüber hinaus konnten sowohl durch das Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie als auch durch das Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie bereits erfolgreich neue Therapiekonzepte zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie entwickelt werden.

Durch mehrere Quellen ist bekannt, dass chronische Hypoxie zur Ausbildung der PH führt (Rabinovitch *et al.* 1979; Meyrick u. Reid 1983; Weissmann *et al.* 2003; Dumitrascu *et al.* 2006). Die oben angeführten Modelle stellen bei der Erforschung der PH die beiden gängigsten Modelle dar, da sie die pathologischen Veränderungen der PH am besten wiedergeben. Die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie im Mausmodell spiegelt die physiologischen Adaptationsprozesse und daraus hervorgehenden Umbauvorgänge in den Lungengefäßen, wie sie auch bei Hypoxie im Menschen stattfinden, wider. Monocrotalin ist ein Pflanzenalkaloid, das neben der Ausbildung der PH noch zahlreiche weitere unerwünschte Veränderungen hervorruft, wie Leberzellnekrose und Leberzellhyperplasie, Leberzirrhose sowie -fibrose, veno-okklusive Lebererkrankungen, Glomerulopathien und schließlich sekundäre Veränderungen am Zentralnervensystem.

Die Veränderungen einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie gleichen denen, die bei Personen mit obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen oder Adaptation in höheren Lagen vorkommen. (Carbone *et al.* 2005). In der Venedig-Klassifikation der PH von 2003 wird diese Form der pulmonalen Hypertonie von den anderen Formen der pulmonalen Hypertonie abgegrenzt. Sie entsteht durch Erkrankungen des respiratorischen Systems mit oder ohne Entwicklung einer Hypoxämie. Diese Erkrankungen können entweder durch Höhengaufenthalte, COPD (chronic obstructive pulmonary disease), das Schlafapnoesyndrom oder pulmonale Entwicklungsstörungen hervorgerufen werden. Darüber hinaus können alle weiteren Erkrankungen, die zu einer alveolären Hypoventilation führen eine Hypoxie-induzierte PH auslösen. Der Gefäßumbau stellt einen integralen Anteil des Krankheitsbildes der PH dar. Ungeachtet der Ätiologie zeigen alle Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie strukturelle Veränderungen der pulmonal-arteriellen Gefäße (van Suylen *et al.* 1998). Die Ausbildung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ist den meisten Säugern gemeinsam und dennoch existieren einige Ausnahmen. Das Lama, das Schneeschwein, der Pfeifhase und das Yak sind an das Leben in großer Höhe angepasst, und es konnte dort kein Hinweis auf einen pulmonal-arteriellen Gefäßumbau gefunden werden (Durmowicz *et al.* 1993; Rhodes *et al.* 2005). Das Ausmaß der Veränderungen hängt zusätzlich von der Spezies, dem Geschlecht und dem Entwicklungsstand des Tieres ab (Rabinovitch *et al.* 1981). Durch die gezielte Ankreuzung des Yaks an nicht-adaptierte Rinder konnte gezeigt werden, dass die abgeschwächte Antwort auf Hypoxie auf einem autosomal-dominanten Erbgang beruht (Anand *et al.* 1986). Genetische Untersuchungen bei diesen Tieren stellen die Basis dar, unser Verständnis der physiologischen Protektion vor PH zu verbessern und diese in einem weiteren Schritt für den Menschen anwendbar zu machen. Auch Tibeter sind durch natürliche Selektion über Jahrtausende hinweg vollkommen an hohe Lagen adaptiert (Moore 2001).

Das Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie besitzt Gemeinsamkeiten mit der IPAH beim Menschen. Es bestehen Übereinstimmungen in der Expression bestimmter Wachstumsfaktoren, wie z.B. Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Vaskular-endothelium-growth-factor

(VEGF) und seinen Rezeptoren sowie verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z.B. Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 8 (IL-8) (Humbert *et al.* 1998; Budhiraja *et al.* 2004; Stenmark *et al.* 2006). Erst kürzlich konnte im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH und bei Personen mit IPAH ein weiteres Schlüsselprotein identifiziert werden. Four and a half lim domains protein 1 (Fhl-1) spielt bei der Entstehung der PH eine wichtige Rolle (Kwapiszewska *et al.* 2008). Ein weiteres Argument, Mäuse als Versuchstiere zu verwenden, resultiert aus dem bereits sequenzierten Mäusegenom, welches für die weiterhin geplanten molekularbiologischen Untersuchungen zur Verfügung stehen würde. In Anschlussarbeiten soll nun geklärt werden, in welcher Weise verschiedene Gene an der Normoxie-bedingten reversiblen Gefäßumstrukturierung beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollen denkbare Kandidaten ermittelt werden. Die aus diesem Ansatz resultierenden Erkenntnisse können der Weiterentwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten dienen, die so eine Alternative zu bereits bestehenden Therapieoptionen bieten.

4.1.2 Normoxie-bedingte Effekte auf die pulmonalen Gefäße, die Rechtsherzhypertrophie und die RVSP

Die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie resultiert sowohl aus einer anhaltenden Vasokonstriktion als auch aus den pulmonal-vaskulären Umbauprozessen. Diese Umbauprozesse beinhalten die Muskularisierung kleiner, ehemals nicht-muskularisierter präkapillärer Lungenarterien und sind als erste zelluläre Reaktion des Organismus auf Hypoxie zu sehen. Der Wegfall des hypoxischen Stimulus führt zu deren Umkehr (Stenmark *et al.* 2006). Akute Reoxigenierung besitzt in einer progressiv entwickelnden Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie immer weniger Einfluss auf die effektive Senkung des PAP. Auch bei Bewohnern hoher Lagen führt Hypoxie zu den beschriebenen Umbauprozessen in den Lungenarterien und daher zu einer Steigerung des PAP (Groves *et al.* 1987). Dieser physiologische Adaptationsmechanismus ist unter Normoxie teilweise reversibel (Sime *et al.* 1971). Die morphologischen Veränderungen schließen sowohl die Verdickung der Media als auch der

Adventitia ein und wurden bereits in mehreren Tiermodellen beschrieben. Die Verdickung der Media entsteht sowohl durch eine Hypertrophie und einem vermehrten Auftreten von glattmuskulären Zellen als auch durch eine Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine. Die Verdickung der Adventitia hingegen entsteht durch die Anhäufung von Fibroblasten, Myofibroblasten und einem Anstieg extrazellulärer Matrixsubstanz (Stenmark *et al.* 2006). Der Einfluss von Hypoxie auf die Intima ist nur gering (Meyrick u. Reid 1980).

Bis heute gibt es keine systematische experimentelle Untersuchung zur Normoxie-bedingten Revertierung der pulmonalen Hypertonie und der Veränderungen der kleinen Lungengefäße im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Verlauf erstmalig bei Mäusen gezeigt werden. Es liegen bereits mehrere ältere Studien vor, in denen der Effekt von Normoxie auf die kleinen Lungengefäße im Rattenmodell untersucht wurde (Hislop u. Reid 1977; Meyrick u. Reid 1980; Fried u. Reid 1984). Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Untersuchungszeitpunkte – 7, 14, 21, 28 und 42 Tage Normoxie nach einer 21-tägigen Hypoxieexposition – leiten sich aus oben stehenden Untersuchungen ab.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Doppelfärbung (alpha-aktin/vWF) wurde im Rahmen einer PC-gestützten Analyse die eindeutige Unterscheidung zwischen nicht-, teilweise- und voll-muskularisierter Gefäße vorgenommen. Sie ist eine valide Methode zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades, da sie zwischen Endothel (vWF) und glatten Muskelzellen (alpha-Aktin) unterscheidet. Bereits nach zweiwöchiger Normoxieexposition konnte eine vollständige Revertierung des Gefäßumbaus gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu den früheren Untersuchungen an Ratten. Obwohl bereits nach zwei Wochen Normoxie eine signifikante Verringerung der Gefäßwanddicke gezeigt werden konnte, bestand am Ende des Untersuchungszeitraumes nur eine partielle Revertierung (Hislop u. Reid 1977). Auch andere Studien zeigten ein langsames und unvollständiges Regressionsverhalten in den Untersuchungszeiträumen von 5-10 Wochen (Meyrick u. Reid 1980; Fried u. Reid 1984). In der Studie von Meyrick *et al.* wurde schon nach drei Tagen eine partielle Regression einzelner Zellen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde keine detaillierte Analyse des

Regressionsverhaltens einzelner Zellen durchgeführt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass einige Zellen bereits zu diesem Untersuchungszeitpunkt ihr ursprüngliches Aussehen wiedererlangt haben, da zum ersten Untersuchungszeitpunkt (nach 7 Tagen Normoxie) eine Verringerung der voll-muskularisierten Gefäße gezeigt werden konnte. Eine neuere Studie zur neonatalen PH bei Ferkeln zeigte, dass die Revertierung des Gefäßumbaus altersabhängig ist und sich in den elastischen und muskulären Lungenarterien unterscheidet (Hall *et al.* 2004).

Die Abweichungen der Literatur untereinander in Angaben über Revertierungsprozesse liegen offenbar in Speziesunterschieden und einem unterschiedlichen Regenerationspotential begründet. Darüber hinaus hängt das Ausmaß der Veränderungen von dem Geschlecht und dem Entwicklungsstand eines jeden Tieres ab (Rabinovitch *et al.* 1981). Mäuse verfügen u.a. über ein hohes Regenerationspotential des Lungengewebes (Dumitrascu *et al.* 2008; Wolff *et al.* 2009). Zusätzlich konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Ratten grundsätzlich zu einer stärkeren Ausprägung der Erkrankung unter Hypoxie neigen als Mäuse (Ressler *et al.* 1974; Rabinovitch *et al.* 1979).

In dieser Arbeit konnte eine vollständige Regression des RVSP gezeigt werden. Diese Reduzierung ist als Antwort auf die niedrigeren Perfusionswiderstände durch eine verminderte Muskularisierung der kleinen Lungengefäße zu bewerten. In der Studie von Fried *et al.* wurde nach nur zwei Tagen ein schneller initialer Druckabfall im rechten Ventrikel gezeigt, jedoch bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von einem Monat keine vollständige Regression beschrieben. In einer anderen Studie konnte eine vollständige Regression des RVSP gezeigt werden (Urbanova *et al.* 1973). Allerdings war der einzige Untersuchungszeitpunkt erst nach 70 Tagen. In der vorliegenden Arbeit besteht eine enge Korrelation zwischen der Revertierung des Gefäßumbaus und der Regression der hämodynamischen Parameter. Auch in einer anderen Studie konnte ein enger zeitlicher Zusammenhang belegt werden (Abraham *et al.* 1971; Fried u. Reid 1984).

Die Hypertrophie des rechten Ventrikels ist allgemein als ein physiologischer Prozess auf den anhaltenden erhöhten Perfusionswiderstand in der Lunge zu

verstehen. Das Verhältnis des rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum ((RV/LV+S)) gilt als Index für eine Rechtsherzhypertrophie. In der vorliegenden Studie erholte sich der rechte Ventrikel vollständig. In früheren Studien wurde bereits eine komplette Erholung beschrieben (Heath *et al.* 1973; Ressler *et al.* 1974; Meyrick u. Reid 1980). Widersprüchlich dazu verhält sich eine andere Studie (Fried u. Reid 1984). In der vorliegenden Arbeit korrelierte die früh einsetzende Regression des rechten Ventrikels mit einem anfänglichen Rückgang des Muskularisierungsgrades der kleinen Lungengefäße. Der invasiv am narkotisierten Tier gemessene rechtsventrikulär-systolische Druck sank erst bei der nächsten Zeitpunktmessung nach weiteren 7 Tagen.

Der Perfusionsdruck des Herzens setzt sich aus dem Multiplikant von cardiac output (CO) und pulmonal-vaskulären Widerstand (PVR) zusammen. Da der cardiac output unbekannt bleibt, kann trotz gleichem kardialen Perfusionsdruck bereits der pulmonal-vaskuläre Widerstand (PVR) gefallen sein. Dies führt dann zu einer maskierten Verbesserung kardio-pulmonaler Funktion.

Ein möglicher Grund für die allgemein verlangsamten Revertierungsprozesse im Rattenmodell könnte in der generell verstärkten Ausprägung der Erkrankung unter Hypoxie begründet sein. Hypoxie führt im Rattenmodell zu einer Verdoppelung des RVSP und des Rechtsherzgewichtes (Rabinovitch *et al.* 1979) mit begleitender Rechtsherzinsuffizienz (Ressler *et al.* 1974). Auch neuere Untersuchungen an chronisch-hypoxisch gehaltenen Ratten zeigen einen allgemein erhöhten Schweregrad der Erkrankung bei Ratten im Vergleich zu chronisch-hypoxisch gehaltenen Mäusen (Mam *et al.* 2010). Hypoxie verursacht im Mausmodell lediglich eine milde pulmonale Hypertonie. Zusätzlich verfügen Mäuse, wie oben bereits erwähnt, über ein sehr gutes Regenerationspotential.

Die New York Heart Association Klassifikation (NYHA) teilt die PH des Menschen in Abhängigkeit der klinischen Symptomatik und hämodynamischen Parametern in die Schweregrade I-IV ein. Der Schweregrad im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH ist analog der Schweregrade II-III zu bewerten, da die Tiere nur eine leichte bis moderate Limitierung der körperlichen Aktivität bei ansonsten ungestörtem Allgemeinbefinden zeigen.

Klasse I
keine Limitierung der körperlichen Aktivität, normale körperliche Bewegung verursacht keine Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkopen
Klasse II
leichte Limitierung der körperlichen Aktivität, in Ruhe keine Beschwerden, normale körperliche Bewegung verursacht Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkopen
Klasse III
Merkliche Limitierung der körperlichen Aktivität, in Ruhe keine Beschwerden, leichtere als gewöhnliche Bewegung verursacht Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkopen
Klasse IV
Unfähigkeit, jegliche körperliche Aktivität ohne Symptome auszuführen, diese Patienten manifestieren Anzeichen von Rechtsherzversagen, Dyspnoe und/oder Ermüdung können sogar in Ruhe vorhanden sein, Beschwerden verstärkt bei jeglicher körperlicher Aktivität

Abbildung 26: New York Heart Association (NYHA) Klassifikation der PH des Menschen (Hunt et al. 2001)

4.2 Training und pulmonale Hypertonie

4.2.1 Gegenwärtige Therapien der PH

Noch vor 10 Jahren basierte die Behandlung der PH auf einem eingeschränkten Verständnis in der Pathogenese und war im Wesentlichen empirisch ausgerichtet und normalerweise ineffektiv. Innerhalb der letzten Jahre kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit PAH durch ein besseres Verständnis der Krankheit (Rubin u. Galie 2004). Die individuelle Therapie richtet sich dabei nach der präzisen Zuordnung und Klassifizierung der PH. Um die Wirksamkeit einer Therapie zu optimieren, wurden Therapiealgorithmen für Patienten mit PAH eingeführt (Galie *et al.* 2004). Neben Prostazyklinanaloga und Endothelinrezeptorantagonisten zeigen Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, wie Sildenafil (Revatio®), positive Effekte (Reduktion des PAP und des pulmonalvaskulären Widerstandes) (Ghofrani *et al.* 2002; Rosenkranz *et al.* 2003). Zusätzlich wird bei einer Mehrzahl der Patienten eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Präparaten eingesetzt. Diese Substanzen beeinflussen verschiedene Pathomechanismen und Signalwege und lassen demzufolge additive Effekte erwarten (Rubin u. Galie 2004). Darüber hinaus existieren zahlreiche weitere Pathomechanismen und Mediatoren, denen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PAH zugeschrieben wird und deren Beeinflussung daher zu einer Verhinderung der Krankheitsprogression bei Patienten mit PAH führen könnte. Dabei wären gentherapeutische Ansätze, cGMP-Aktivatoren/Stimulatoren, Elastaseinhibitoren, Kaliumkanalmodulatoren, Rho-Kinase-Inhibitoren und Tyrosinkinaseinhibitoren als Therapieansätze zu nennen (Rosenkranz 2007).

Körperliches Training stellt als unterstützende Therapiemaßnahme eine kontrovers diskutierte Thematik dar. Bis heute ist wissenschaftlich nicht eindeutig belegt, ob es in diesem Zusammenhang einen Nutzen bieten kann, oder ob es eher zu einer Verschlechterung der Symptomatik führt. Es liegen bereits evidenzbasierte Studien vor, die kurzfristige funktionelle Effekte körperlichen

Trainings sowie positive Auswirkungen gesteigerter körperlicher Aktivität auf das Wohlbefinden von Patienten mit PAH beschreiben, welche mit den gängigen medikamentösen Therapien vergleichbar sind. Ob diese Effekte dauerhaft anhalten und zu einer Verbesserung der Überlebenszeit führen, bleibt unbekannt. Das Hauptproblem liegt in den eingeschränkten Studienlängen, um die Auswirkungen körperlichen Trainings auf das Überleben von Patienten beurteilen zu können (Newman u. Robbins 2006).

4.2.2 Wahl des Tiermodells

Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6J-Mäuse sind sowohl in der Erforschung der PAH (Zhao *et al.* 2001; Campen *et al.* 2005; Dumitrascu *et al.* 2006) als auch in einer Vielzahl von Studien zum Ausdauertraining (Kemi *et al.* 2002; Evangelista u. Krieger 2006; Davidson *et al.* 2006) bereits beschrieben worden. Zudem gibt es im Wesentlichen nur bei Mäusen genveränderte Tiere, die für weitere Untersuchungen zum Einfluss körperlichen Trainings auf die Entstehung der PAH herangezogen werden könnten. Die Anpassung an körperliches Training ist das Ergebnis einer aufeinander abgestimmten Antwort mehrerer Organsysteme, wie z.B. dem Herz-Kreislaufsystem, der Lunge, des Hormonhaushaltes, des Immunsystems und der Muskeln (Bernstein 2003). Diese Adaptationsmechanismen sind denen des Menschen ähnlich (Wisloff *et al.* 2001). Aus Praktikabilitätsgründen wurden das tägliche Training und die Leistungsdiagnostiken unter Normoxie durchgeführt. Es wurde mehrfach gezeigt, dass eine zeitlich begrenzte Exposition unter Normoxie die Ausbildung einer Hypoxie-induzierten pulmonaler Hypertonie nicht behindern oder beeinflussen kann (Widimsky *et al.* 1973; Ressler *et al.* 1974). Eine Überprüfung bot darüber hinaus die mitgeführte Kontrollgruppe.

Um körperliches Training bei Mäusen zu gewährleisten, stehen mehrere etablierte Modelle mit Vor- und Nachteilen zur Verfügung. Schwimmen induziert bei Mäusen anhaltenden Stress und löst den Tauchreflex aus, welcher durch Intervalle von Hypoxie begleitet wird (Flaim *et al.* 1979). Zusätzlich ist Schwimmen keine natürliche Bewegungsform bei Mäusen sowie experimentell für die Bearbeitung

der Fragestellung dieser Arbeit nicht geeignet. Ein weiteres denkbare Modell stellt das Laufen in einem Laufrad dar. In diesem Fall ist aber die kontinuierliche Überwachungsmöglichkeit der Trainingsintensität und des Trainingsumfangs nicht gegeben. Dadurch kann keine Standardisierung gewährleistet werden, was jedoch für eine wissenschaftliche Studie erforderlich ist. Das Training auf dem Laufband hingegen bietet den Vorteil, die Trainingsintensität der Mäuse an ihre individuelle Leistungsfähigkeit anzupassen und zu standardisieren (Wisloff *et al.* 2001). Zudem entspricht es dem Goldstandard, gesteuerten kardio-vaskulären Stress herbeizuführen (Bernstein 2003). Die Wahl dieses Testverfahrens resultierte zusätzlich aus der Tatsache, dass es mit der Spiroergometrie beim Menschen vergleichbar ist, die neben dem 6-Minuten-Gehtest (6-MWT) ein wichtiges Maß für die Beurteilung von Schweregrad, Verlauf und Prognose bei Patienten mit PAH ist (Olschewski *et al.* 2007). Die abschließende Messung des RVSP erfolgte über telemetrische Sensoren. Bei dieser Methode wurde durch eine minimal-invasive Operationstechnik über eine kleine Inzision der V. jugularis eine Messsonde bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Der Vorteil dieser Methode liegt in der komplikationslosen Durchführung und der raschen postoperativen Erholungszeit gegenüber den in der Literatur beschriebenen stärker invasiven Methoden, wie z. B. durch Thorakotomie (Hess *et al.* 1996; Sebki *et al.* 2003; Pozeg *et al.* 2003). Zusätzlich können *in-vivo*-Messungen über einen längeren Zeitraum unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Studie wurde eine moderate Trainingsintensität von 60 % der maximalen Geschwindigkeit (V_{max}) gewählt, da diese der im Gesundheitssport vorgeschlagenen Belastung entspricht. Die Wahl des 3-minütigen Stufenprotokolls, das bereits in verschiedenen murinen Modellen evaluiert wurde, lehnt sich an das in der Humanmedizin eingesetzte Protokoll an. Ein Grund, die 6-Minuten-Gehtest nicht maßstabsgetreu auf die vorliegende Arbeit zu übertragen, besteht in dessen Umsetzbarkeit und der generellen guten Laufbereitschaft der Mäuse. Als Alternative wurde die gesamte zeitunabhängige Gehstrecke der Tiere bis zur Ermüdung ermittelt, da dieser Endzeitpunkt zur Bestimmung der Ausdauerleistungsfähigkeit bei Mäusen auch allgemein anerkannt ist (Fushiki *et al.* 1995). Als Therapeutikum zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie wurde für diese Studie der Phosphodiesterase-Inhibitor Sildenafil gewählt. Dieser zeigte in zahlreichen klinischen Studien positive Effekte, wie die Reduktion des PAP und

PVR, bei Patienten mit PAH (Michelakis *et al.* 2002; Ghofrani *et al.* 2002; Rosenkranz *et al.* 2003). Zudem besitzt Sildenafil einen geringen Einfluss auf den systemisch-arteriellen Druck. Die Festlegung der verwendeten Dosis von 100 mg/kg/d orientierte sich an bestehenden Daten von Ratte und Maus (Zhao *et al.* 2001; Sebki *et al.* 2003). Die Gabe erfolgte über eine Fütterungssonde, da bei dieser Methode, im Gegensatz zur Verabreichung über das Trinkwasser, eine definiere Kontrolle über die tatsächlich verabreichte Menge besteht. Die Applikation erfolgte nur einmal pro Tag, obwohl es bei dieser Applikationsart zu einem Abfall des Sildenafil-Plasmaspiegels kommt, da 1) in der Arbeit mögliche additive Effekte eines moderaten Trainings zu einer Sildenafil-Therapie untersucht werden sollten und somit, wie die eigenen Daten zeigen, kein maximaler therapeutischer Effekt durch Sildenafil erreicht werden sollte und 2) eine mehrmals tägliche Gavage nicht mit dem Lauftraining kompatibel war, da gavagierte Tiere keine Laufmotivation zeigten, wenn die Gavage nicht mehr als 5 Stunden zurück lag. Es war aus eigenen Untersuchungen bekannt, dass durch eine einmalige Gabe von Sildenafil bereits eine Reduktion der pulmonalen Hypertonie erreicht werden kann.

4.2.3 Effekte körperlichen Trainings auf die Gehstrecke und die VO_2 max im Vergleich zu einer Standardtherapie

Der 6-Minuten-Gehtest stellt in der Humanmedizin einen einfachen, verlässlichen und preiswerten Parameter dar, mit dem Schweregrad und Krankheitsprogression bzw. therapeutische Effizienz beurteilt werden können und der zudem prognostische Bedeutung besitzt. Dieser Test misst die innerhalb 6 Minuten zurücklegbare Gehstrecke in einem für den Patienten angenehmen Tempo und stellt somit einen submaximalen Belastungstest dar (Miyamoto *et al.* 2000). Darüber hinaus hat sich dieses Diagnostikum bereits in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als valides und verlässliches Testverfahren zur Beurteilung der Belastbarkeit bewährt (Scheld 2007). Neben dem 6-MWT dient vor allem die Spiroergometrie zur weiteren Spezifizierung der Leistungsfähigkeitsparameter. Spiroergometrie und 6-MWT werden in der Humanmedizin als sich ergänzende Diagnostika eingesetzt. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurden Parameter der Ausdauerleistungsfähigkeit, nämlich die $VO_2\text{max}$ und die Gehstrecke erfasst, da diese Parameter bei Patienten mit PAH reduziert sind (D'Alonzo *et al.* 1987) und eine enge Korrelation zwischen der $VO_2\text{max}$ und dem zuvor festgelegten Schweregrad nach NYHA bei Patienten mit PAH besteht (Sun 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein alleiniges Training zu einer tendenziellen Verbesserung in der Gehstrecke führt. Darüber hinaus bot körperliches Training einen synergistischen Effekt zur Therapie unter Sildenafil (Revatio®), Sildenafil alleine führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Gehstrecke.

Sildenafil stellt ein Standardtherapeutikum in der Behandlung der PH dar (Galie *et al.* 2005). In verschiedenen randomisierten, doppelt-geblindeten und placebo-kontrollierten klinischen Studien wurde eine signifikante Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit (6-MWT) in einer mit Sildenafil (Revatio®) therapierten Gruppe im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe beschrieben (Bharani *et al.* 2003; Sastry *et al.* 2004; Galie *et al.* 2005; Singh *et al.* 2006). Der Fokus dieser Untersuchungen lag ausschließlich auf möglichen therapieabhängigen Verbesserungen in der körperlichen Belastbarkeit und schloss den Einfluss eines kontinuierlich durchgeführten körperlichen Trainings aus. In der bisher einzigen Studie, die den Fokus auf den Effekt körperlichen Trainings und Atemtrainings bei Patienten mit schwerer PAH unter stabiler Therapie legte, konnte eine signifikante Verbesserung in der Gehstrecke ermittelt werden (Mereles *et al.* 2006). Das Patientengut und die medikamentöse Behandlung dieser Patienten stellten sich allerdings sehr inhomogen dar.

In der vorliegenden Arbeit führte nur die Kombination der Standardtherapie (Sildenafil) mit einer Trainingsintervention zu einer Verbesserung in der Gehstrecke. Ob körperliches Training einen additiven Effekt zu alleiniger Standardtherapie unter Sildenafil bieten kann, ist auf Basis dieser Daten dennoch schwer einzuschätzen, da die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums auch von dessen Motivation abhängig ist (Bernstein 2003). Aus diesem Grund ist die Beurteilung der Gehstrecke im Tiermodell kein eindeutig verlässlicher Parameter. Das Tiermodell besitzt durch fehlende quantifizierbare und qualifizierbare

Feed-back-Möglichkeiten den grundlegenden Nachteil der genauen Erfassung eines gesteigerten Wohlbefindens und einer gesteigerter Motivation. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf deren Aussagekraft über synergistische Effekte in Bezug auf die Gehstrecke nur begrenzt möglich ist und sinnvoll erscheint. Darüber hinaus wird die Gehstrecke nicht, wie z.B. strukturelle und hämodynamische Parameter, als eine harte Kenngröße bewertet.

Der relative VO_2max -Wert ($\text{mlO}_2/\text{min}/\text{kg}$) gibt an, wie viel Milliliter Sauerstoff der Körper im Zustand der Ausbelastung maximal pro Minute verwerten kann und gilt als Kriterium für die Bewertung der Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums (Benzo *et al.* 2007). Er gibt Rückschlüsse über die Effizienz der Sauerstoffzufuhr (Atmung), des Sauerstofftransports (Herz-Kreislaufsystem) und der Sauerstoffverwertung (Muskelzelle). Bei Patienten mit PH führt ein erhöhter Perfusionswiderstand in der Lunge zu einer erhöhten Nachlast und einer gesteigerten Herzstätigkeit. Das daraus resultierende verminderte HZV führt zu einer Unterversorgung der Arbeitsmuskulatur. Die Leistungsfähigkeit von Patienten mit PH ist demnach durch eine beeinträchtigte Steigerung des HZV an den erhöhten peripheren O_2 -Bedarf bei körperlicher Belastung limitiert. Gegenüber der Gehstrecke bietet dieser Parameter den Vorteil, dass er weniger durch Motivation beeinflussbar und daher zuverlässiger in dessen Aussage ist (Bernstein 2003). Die korrekte ergometrische Bestimmung des VO_2max -Wertes setzt eine hohe Auslastung voraus, die anhand verschiedener Kriterien beurteilt wird. Am eindeutigsten ist das so genannte „levelling-off“, eine konstant bleibende Sauerstoffaufnahme trotz zunehmender äußerer Belastung (Howley *et al.* 1995; Duncan *et al.* 1997). Der Zeitpunkt, der mit einer offensichtlichen Auslastung des Tieres einherging, wurde als Endzeitpunkt der Datenaufzeichnungen definiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ein alleiniges körperliches Training die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max) signifikant verbessert werden konnte. Körperliches Training bietet keinen synergistischen Effekt gegenüber Tieren, die ausschließlich mit Sildenafil therapiert wurden.

Es ist bekannt, dass Sildenafil zu einer Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit unter akuter Hypoxie führt. Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen konnten allerdings noch nicht ausreichend geklärt werden (Faoro *et al.* 2007). Weitere Studien zeigten, dass der Höhen-induzierte Abfall des $VO_2\text{max}$ -Wertes unter der Therapie mit Sildenafil geringer ausfiel. Sildenafil verbessert den Gasaustausch und limitiert die Höhen-induzierte Hypoxämie und den Abfall der Ausdauerleistungsfähigkeit (Richalet *et al.* 2005). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus liegen Studien vor, die eine ausschließlich Trainings-induzierte Optimierung der maximalen Sauerstoffaufnahme unter chronischer moderater Hypoxie (10 Wochen) im Tiermodell der Ratte zeigen (Henderson *et al.* 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine ausschließlich Trainings-induzierte Verbesserung des $VO_2\text{max}$ -Wertes gezeigt werden. Im Unterschied zu der Henderson Studie wurde in der vorliegenden Arbeit hingegen eine starke Hypoxie (F_{iO_2}) von 0,10 über einen kürzeren Zeitraum gewählt. In einer anderen Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Gasaustausches bei hypoxisch gehaltenen Ratten durch ein Training, das unter Normoxie durchgeführt wurde, verbessert werden konnte (Favret *et al.* 2006). Bis heute existieren noch keine langfristigen Studien über synergistische Effekte von körperlichem Training in Kombination mit einer Standardtherapie. Hinweise dafür liefert allein eine kürzlich erschienene Studie, in der eine Verbesserung in den Variablen des Gasaustausches, wie z. B. dem $VO_2\text{max}$ -Wert, gezeigt wurde (Mereles *et al.* 2006). Zusätzlich besteht durch eine verbesserte Sauerstoffverwertung und einen verbesserten Metabolismus der Arbeitsmuskulatur sowie Effizienz der Atmung (Coats *et al.* 1992) ein weiterer Grund zur Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit. Die Bestimmung der $VO_2\text{max}$ ist gegenüber der Gehstrecke vergleichsweise zuverlässiger in der Aussage über die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums. Im Folgenden wird nun auf den Einfluss des körperlichen Trainings auf die strukturellen und hämodynamischen Parameter eingegangen.

4.2.4 Effekte körperlichen Trainings auf den Muskularisierungsgrad im Vergleich zu einer Standardtherapie

Durch die Ätiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie wird schnell ersichtlich, dass eine Therapie nur dann wirkungsvoll ist, wenn diese sich gegen die progressiven Umbauprozesse in der Lunge richtet und zu einer Revertierung des Gefäßumbaus führt.

Die Hauptaufgabe des Lungenendothels besteht in der Erhaltung des Gefäßtonus, der Produktion von Wachstumsfaktoren, der Homöostase, der Signaltransduktion und der Barrierefunktion. Bei Patienten mit PAH wird angenommen, dass eine initiale Schädigung des Endothels durch Hypoxie, vermehrte Scherkräfte oder Entzündungen in Verbindung mit einer genetischen Disposition ausgelöst werden kann (Nicod 2007). Der genaue ursächliche Stimulus, welcher zu Imbalancen zwischen Vasokonstriktoren und -dilatoren führt, bleibt unbekannt (Budhiraja *et al.* 2004).

Im präventiven Ansatz der Hypoxie-induzierten PH im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass körperliches Training einen hemmenden Effekt auf den Muskularisierungsgrad der kleinen Lungengefäße bietet. Training besitzt keinen additiven Effekt zu alleiniger Therapie unter Sildenafil.

PDE-5 stellt einen attraktiven Angriffspunkt bei der Behandlung der PH durch PDE-5-Inhibitoren (z.B. Sildenafil) dar, da Patienten mit PH eine Überexpression der PDE-5 in der Lunge zeigen (Sanchez *et al.* 1998; Murray *et al.* 2002). Die Lokalisation entspricht dem von Sebki *et al.* dargelegten glattmuskulären Verteilungsmuster und bestätigt die These, dass PDE-5 in PAH überexprimiert wird. Die positiven Zellen in der Gefäßmedia sind deckungsgleich mit den positiven Bereichen des „alpha-smooth-muscle-aktins“. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion des Muskularisierungsgrades in den Sildenafil-therapierten Gruppen gegenüber der Placebo-Gruppe gezeigt werden. Es ist bekannt, dass Sildenafil sowohl antiproliferative als auch vasodilative Eigenschaften besitzt, da es die Aktivität von cGMP verstärkt (Raja *et al.* 2006). Die immunohistochemische Doppelfärbung (alpha-Aktin/vWF) ist eine verlässliche Methode zur Darstellung und Differenzierung des Muskularisierungsgrades (Weissmann *et al.* 2007). In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass Sildenafil den Lungengefäßumbau in

präventiven Tiermodellen hemmen kann (Zhao *et al.* 2001; Itoh *et al.* 2004; Rondelet *et al.* 2004). Dies wurde auch durch die eigenen Ergebnisse bestätigt und belegt somit die Effektivität dieses Therapieansatzes. Daher kann dieser Therapieeffekt als Vergleich gegenüber einem Trainings-induzierten Effekt dienen.

Der Einfluss körperlichen Trainings auf den Muskularisierungsgrad der kleinen Lungenarterien im Krankheitsbild der PH war bis zum jetzigen Zeitpunkt Inhalt nur weniger Untersuchungen, da man annimmt, dass es zu einer Verschlimmerung der Krankheit führen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass körperliches Training im präventiven Ansatz einen hemmenden Effekt auf die Ausbildung des Muskularisierungsgrades ausübt. Aus dieser Verminderung folgt für den Gesamtorganismus eine Reduktion des Perfusionswiderstandes in der Lunge bei zusätzlich erleichterter Herztätigkeit. In der Literatur stellt körperliches Training in Verbindung mit dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie ein kontrovers diskutiertes Thema dar. Abgesehen von einer randomisierten Studie bei Patienten mit schwerer PH unter stabiler Therapie (Mereles *et al.* 2006), existieren nur wenige Studien, in denen Training als Therapieansatz bei kardio-respiratorischen Erkrankungen, einschließlich der pulmonalen Hypertonie, angewandt wird (Rogers u. Howard 1992; Mador *et al.* 2004). In einigen Studie konnte zwar bereits gezeigt werden, dass körperliches Training die progressive Entwicklung der PH in chronischen und akuten Tiermodellen begrenzt (Veras-Silva *et al.* 1997; Henderson *et al.* 2001). Allerdings wurde keine detaillierte morphometrische Analyse der Lungengefäße durchgeführt, sondern ausschließlich hämodynamische Parameter und O₂-Transport-Variabeln erfasst. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig der Einfluss körperlichen Trainings auf die Morphologie der kleinen Lungenarterien untersucht.

Eine andere Studie schloss eine positive Beeinflussung körperlichen Trainings auf die Vasoreaktivität der Pulmonalarterien aus (Goret *et al.* 2005). Hier wurden zwar auch Lungenarterien nach einer Trainingsintervention untersucht, aber im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit fand nur eine isolierte Betrachtung der Gefäße statt. Das in der Studie von Goret gewählte Modell spiegelt demnach nicht die komplexen physiologischen Interaktionen eines intakten Organismus wider. Daher können die uneinheitlichen Ergebnisse durch den Einsatz unterschiedlicher

Methodiken resultieren. *Ex-vivo* Untersuchungen können verschiedene Mechanismen einschließen, die zu einer Änderung im Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und -relaxation führen.

Die morphologischen Umbauprozesse, insbesondere der kleinen pulmonalen Gefäße, sind von besonderer Bedeutung in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung. Die Beobachtung, dass Training im präventiven Ansatz zu einer Verminderung des Muskularisierungsgrades führt, lässt die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen aufkommen, die auf molekularbiologischer Ebene weiter untersucht werden müssten, was aber nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit ist.

Über den Einfluss körperlichen Trainings auf die systemischen Gefäße ist bereits bekannt, dass vermehrte Scherkräfte (Green *et al.* 1996) eine erhöhte Aktivität der e-NOS bewirken (Graham u. Rush 2004), was zu einer Verstärkung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation führen kann (Chen *et al.* 1996). Es existieren bereits Untersuchungen, die zeigen, dass Scherkräfte und eine erhöhte Lungendurchblutung auch zu einer Hochregulierung der pulmonalen e-NOS führen können (Black *et al.* 1998). Deshalb könnte der NO-cGMP-Signaltransduktionsweg eine Rolle in dem zugrunde liegenden Mechanismus spielen.

4.2.5 Effekte körperlichen Trainings auf den RVSP und die Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zu einer Standardtherapie

Körperliches Training führte zu einer Reduzierung des RVSP unter Belastung (0,20 m/s). Die Therapie unter Sildenafil bot keinen zusätzlichen synergistischen Effekt.

Patienten mit PH zeigen Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit und Benommenheit (Sun *et al.* 2001). Unter normalen physiologischen Bedingungen steigt der PAP unter Belastung durch Dehnung der Lungenarterien und der Rekrutierung vorher nicht genutzter Gefäße nur minimal. Bei Patienten mit PH kann dieser adaptative

Mechanismus durch die Umbauprozesse in der Lunge beeinträchtigt werden und es kommt schon in Ruhe und unter geringer Belastung zu einem Anstieg im PAP (Desai u. Channick 2008).

Diese eigene Studie konnte zeigen, dass eine alleinige präventive Therapie unter Sildenafil während einer Belastung von 0,20 m/s den Anstieg des RVSP im Vergleich zu der Kontrollgruppe verhinderte. In verschiedenen randomisierten, doppelt-geblindeten klinischen Studien konnte eine Reduzierung des PAP unter Ruhebedingungen nach 6- bis 16-wöchiger Behandlung gezeigt werden (Sastry *et al.* 2004; Galie *et al.* 2005; Singh *et al.* 2006). Sildenafil reduzierte den PAP in Ruhe und unter Belastung im Rahmen moderater und starker Hypoxie bei gesunden Probanden (Ghofrani *et al.* 2004). Die chronische Sildenafilgabe zeigte im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH (Zhao *et al.* 2001) und im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH (Schermuly *et al.* 2004) eine Reduzierung des RVSP. Jedoch lassen alle oben angeführten Studien den Aspekt eines kontinuierlich durchgeführten Trainings auf die Entwicklung der PH außer Acht. Die in den eigenen Untersuchungen verwendete Dosis Sildenafil bot die Möglichkeit synergistische Effekte des Trainings zu bestimmen. Interessanterweise hatte das Training allein einen sehr starken RVSP-Anstieg verhindernden Effekt. Eine Kombination mit Sildenafil war tendenziell schlechter. In der bisher einzigen randomisierten Studie konnte am Ende eines 15-wöchigen körperlichen Trainings bei den untersuchten Probanden keine signifikante Reduktion des PAP, sowohl in Ruhe als auch unter körperlicher Anstrengung, beobachtet werden (Mereles *et al.* 2006). Es war lediglich eine nicht signifikante Reduktion im Verlauf der Studiendauer zu beobachten. Es bleibt anzumerken, dass das Patientengut inhomogen war und die Probanden bereits unter einer manifesten PH erkrankt waren, und diese Studie demnach, im Gegensatz zu vorliegender Arbeit, einen kurativen Ansatz hatte. Zusätzlich besaß diese Studie nur eine limitierte Untersuchungsdauer.

Körperliches Training, Sildenafiltherapie und deren Kombinationen bewirken keine Prävention vor der Rechtsherzhypertrophie.

Es ist allgemein anerkannt, dass chronische Hypoxie zur Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie führt (Rabinovitch *et al.* 1979; Meyrick u. Reid 1983; Weissmann *et al.* 2003; Dumitrascu *et al.* 2006). Interessanterweise korrelieren in der vorliegenden Studie die Rechtsherzratio, der RVSP und die Muskularisierung der kleinen pulmonal-arteriellen Gefäße zeitlich nicht miteinander. Die Annahme, dass Ausbildung und Aufrechterhaltung einer Rechtsherzhypertrophie *per se* durch den Einfluss einer langanhaltenden Hypoxämie auf den rechten Ventrikel hervorgehen kann, könnte die oben beschriebenen Ergebnisse stützen. Auch in einer anderen Studie, die in unserem Labor durchgeführt wurde, konnte trotz der Reduzierung des Muskularisierungsgrades und einer Druckminderung im rechten Ventrikel keine Regression der Rechtsherzhypertrophie festgestellt werden (Roth *et al.* 2009). Für die oben aufgeführte Hypothese gibt es bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nur indirekte Beweise. In einer Studie konnten bereits Unterschiede in der Antwort der beiden Ventrikel auf eine experimentelle Hypertrophie gefunden werden. Diese Unterschiede schlossen sowohl funktionelle als auch strukturelle Eigenschaften ein (Cihak *et al.* 1992).

In weiterführenden Studien sollte daher untersucht werden, ob ausschließlich ein erhöhter pulmonal-arterieller Druck für die Aufrechterhaltung einer Rechtsherzhypertrophie verantwortlich ist, oder ob begleitend weitere Mechanismen existieren, denen in der Pathogenese eine besondere Bedeutung zukommt. Darüber hinaus konnten therapieabhängige Effekte (wie z.B. durch Sildenafil und durch körperliches Training), insbesondere auf den rechten Ventrikel, in der Vergangenheit noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass PDE-5 in humanen isolierten hypertrophierten Kardiomyozyten hochreguliert ist (Nagendran *et al.* 2007) und Sildenafil innerhalb der Modulation von Kardiomyozyten eine gewisse Bedeutung zukommt (Zhang *et al.* 2008). Ebenso konnte im Kaninchenmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie eine Reduktion der Rechtsherzhypertrophie nach therapeutischer Intervention gezeigt werden (Weissmann *et al.* 2007). Auch in einer anderen Studie konnte im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH eine Trainings-induzierte Reduzierung der Rechtsherzhypertrophie gezeigt werden (Souza-Rabbo *et al.* 2008). Ob diese Effekte durch Spezies- und Dosisabhängigkeiten begrenzt sind, konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden. In weiteren Untersuchungen an Myozyten und in verschiedenen

Tiermodellen müsste der Einfluss chronischer Hypoxie in Kombination mit verschiedenen Therapieinterventionen, unter Berücksichtigung des rechten Ventrikels, weiterführend untersucht werden.

Ein weiterer Punkt zur Erklärung der oben beschriebenen Unregelmäßigkeiten könnte in der Druckmessung unter Narkose gesehen werden. Hämodynamische Messungen am wachen Tier können von denen unter Narkose abweichen. Allerdings bleibt anzumerken, dass das Herzzeitvolumen unbekannt bleibt, wobei Gefäßwiderstand und Perfusionsdruck des Herzens modulieren können.

Körperliches Training stellt in Verbindung mit dem Krankheitsbild der PH ein kontrovers diskutiertes Thema dar, zumal angenommen wird, dass es auch zu einer Verschlimmerung der Symptomatik führen könnte. Deswegen scheint es nicht verwunderlich, dass nur wenige Studien zu dieser Fragestellung vorliegen. Zwar ist im pathologischen Verlauf der PH zunächst nur die Lunge bzw. das pulmonale Gefäßbett betroffen, jedoch mündet ein progressiver Krankheitsverlauf aufgrund des chronisch erhöhten peripheren Widerstandes in eine Überlastung des rechten Ventrikels und im schlimmsten Fall in ein Cor pulmonale. Es existiert die Annahme, dass regelmäßiges körperliches Training einen Nutzen bei Patienten mit Linksherzinsuffizienz bietet und körperliche Aktivität die Endothelfunktion und die Ausdauerleistungsfähigkeit bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen (Hambrecht *et al.* 2000) und chronischer Linksherzinsuffizienz (Hornig *et al.* 1996; Hambrecht *et al.* 1998) verbessert.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte nun schließlich ein Beitrag zu präventiven Effekten eines körperlichen Trainings bei pulmonaler Hypertonie geleistet werden. Erstmalig wurde unter kontrollierbaren Bedingungen der präventive Nutzen eines wohldosierten körperlichen Trainings im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie gezeigt. Denn nur wenn diese Frage vollständig geklärt ist, kann Patienten mit pulmonaler Hypertonie ein solches Training empfohlen werden, vorausgesetzt die an der Maus gewonnenen Daten sind auf den Menschen übertragbar. Zumindest für die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie ist jedoch davon auszugehen, da die pathophysiologischen Erkrankungen bei allen bisher daraufhin untersuchten Säugetieren, die unter normobaren Bedingungen leben, weitestgehend gleich sind.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere, meist lebensbedrohliche Erkrankung, die durch einen progressiven pulmonalen Gefäßwiderstand charakterisiert ist. Unbehandelt führt die Erkrankung zunächst zu fortschreitender Dyspnoe und eingeschränkter Leistungsfähigkeit und nach wenigen Jahren meist zum Tode durch Rechtsherzversagen. Verschiedene medikamentöse Therapieansätze konnten die Prognose dieser Krankheit, gemessen an der Lebenserwartung und -qualität, signifikant verbessern.

Ziel dieser Arbeit war 1) zu untersuchen, ob eine voll ausgeprägte Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie prinzipiell reversibel ist und 2) ob ein präventives körperliches Training die Ausbildung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie positiv beeinflusst. Mögliche Effekte sollten mit einer etablierten pharmakologischen Therapie verglichen werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Revertierung struktureller (Muskularisierungsgrad der kleinen Pulmonalgefäße) und hämodynamischer Parameter (rechtsventrikulärer-systolischer Druck) sowie der Rechtsherzhypertrophie im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie untersucht. Nach 3-wöchiger Exposition unter Hypoxie (10% O₂, normobar) entwickelten die Tiere eine voll etablierte pulmonale Hypertonie mit den charakteristischen Umbauprozessen der Pulmonalarterien, anhaltend erhöhten Drücken und Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie. Die Tiere wurden anschließend unter Normoxie gehalten und zu den Zeitpunkten 7, 14, 21, 28 und 42 Tage nach normoxischer Re-Exposition auf hämodynamische, histologische und morphologische Parameter hin untersucht. Diese Daten wurden mit einer normoxisch gehaltenen Kontrollgruppe verglichen.

Die Rückführung der Tiere in die Normoxie konnte die schweren Gefäßumbauprozesse der kleinen Pulmonalarterien bereits nach 14 Tagen vollständig rückgängig machen. Die pathologischen Veränderungen des rechtsventrikulär-systolischen Druckes und die Rechtsherzhypertrophie der pulmonalhypertensiven Tiere korrelierten dabei zeitlich eng miteinander.

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie prinzipiell reversibel und somit grundsätzlich auch verhinderbar sein sollte, wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss präventiven körperlichen Trainings auf den Verlauf der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Mausmodell untersucht und dieser im Vergleich zu einer Standardtherapie mit dem Phosphodiesterase-5-Inhibitoren Sildenafil (Revatio®) beurteilt. Darüber hinaus wurde die Frage nach synergistischen Effekten medikamentöser Therapie und körperlichen Trainings beantwortet. Dazu wurde ein tägliches Ausdauertraining von 60 % der individuell im Belastungstest ermittelten Laufbandgeschwindigkeit durchgeführt. Dies geschah in einem präventiven Ansatz während einer 3-wöchigen Hypoxieexposition. Abschließend wurden durch eine minimal invasive Operationsmethode telemetrische Transmitter für die Druckaufzeichnung in den rechten Ventrikel implantiert.

Durch das tägliche Training konnten die Parameter der Ausdauerleistungsfähigkeit, insbesondere die maximale Sauerstoffaufnahme, verbessert werden. Das tägliche körperliche Training konnte den Hypoxie-induzierten Anstieg des rechtsventrikulär-systolischen Druckes und die progressive Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien teilweise hemmen, ohne jedoch Einfluss auf die Ausbildung der Rechtsherzhypertrophie zu nehmen. Training hatte somit nahezu den gleichen aber keinen synergistischen Effekt wie die Therapie mit Sildenafil.

Bisher lagen keine Daten vor, die den präventiven Nutzen eines kontrolliert durchgeführten körperlichen Trainings auf die Entstehung der PH, insbesondere auf den schwerwiegenden Gefäßumbau, untersucht haben.

Die innerhalb dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass körperliche Aktivität bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie unter stabiler Therapie sicher sein kann und in Bezug auf einige Parameter den Effekten einer medikamentösen Therapie gleichkommen kann.

Vor diesem Hintergrund sollten die zugrunde liegenden Mechanismen des positiven Effekts von körperlichem Training in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden.

6 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a severe, life-threatening disease characterized by a sustained elevation in pulmonary arterial pressure. If untreated, PH results in progressive dyspnea and limited exercise capacity and finally leads to death due to right heart failure, normally within only a few years. Recently, new therapeutic approaches have been developed which can halt the progression but cannot cure the disease.

Against this background the aim of the present study was 1) to investigate whether a fully established hypoxia-induced pulmonary hypertension is reversible and 2) whether physical exercise can prevent the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension and if so, to compare such effects to a pharmacological therapy with the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil. The investigations were performed in a mouse model of pulmonary hypertension.

To address the question whether a fully established PH is reversible, the structural vascular remodelling (degree of vessel muscularization) and haemodynamic parameters (right ventricular pressure) as well as right heart hypertrophy were determined in a mouse model. After exposure to chronic hypoxia (10% O₂, normobaric) for three weeks, pulmonary hypertension was fully established. Subsequent re-exposure of the animals to normoxia for 7, 14, 21, 28 and 42 days revealed that a complete reversal of the remodelling of small arteries occurred already after 14 days with correlating changes in right ventricular systolic pressure and right heart hypertrophy. From this finding it could be concluded that a preventive therapeutic approach can be successful for treatment of PH. Thus, the effects of a preventive physical training on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension were investigated. Mice were exercised daily at 60% of their maximal exercise capacity. The daily exercise was performed during a three-week exposure of the animals to chronic hypoxia. Right ventricular blood pressure was determined telemetrically by transmitters.

Daily exercise improved endurance, particularly maximum oxygen consumption. Moreover, physical exercise could partly prevent the increase in hypoxia-induced right ventricular pressure and the muscularization of the pulmonary vasculature

but had no positive effect on right heart hypertrophy. A comparison with a pharmacological therapy by the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil revealed that exercise training had nearly similar but no synergistic effect compared to the pharmacological approach.

In summary the present study is the first to describe a preventive benefit by controlled physical exercise on the development of pulmonary hypertension, especially on vascular remodelling in an animal model. If transferable to the human disease, this finding suggests that physical exercise in patients with pulmonary hypertension under stable therapy could be safe. Further studies should decipher in detail the underlying mechanism of the beneficial effect of exercise on pulmonary hypertension.

7 Literaturverzeichnis

Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V and Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J. Physiol.* 2006;570 (Pt 1):53-58.

Abraham AS, Kay JM, Cole RB and Pincock AC. Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat. *Cardiovasc.Res.* 1971;5 (1):95-102.

Anand IS, Harris E, Ferrari R, Pearce P and Harris P. Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. *Thorax* 1986;41 (9):696-700.

Archer SL, Tolins JP, Raji L and Weir EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem.Biophys.Commun.* 1989;164 (3):1198-1205.

Badesch DB, Abman SH, Ahearn GS, Barst RJ, McCrory DC, Simonneau G and McLaughlin VV. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004;126 (1 Suppl):35S-62S.

Beavo JA and Brunton LL. Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 2002;3 (9):710-718.

Bennie RE, Packer CS, Powell DR, Jin N and Rhoades RA. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am.J.Physiol.* 1991;261 (2 Pt 1):L156-L163.

Benzo R, Kelley GA, Recchi, Hofman LA and Scirba F. Complications of lung resection and exercise capacity: a meta-analysis. *Respir.Med.* 2007;101 (8):1790-1797.

Bernstein D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. *Physiol. Genomics* 2003;13 (3):217-226.

Bharani A, Mathew V, Sahu A and Lunia B. The efficacy and tolerability of sildenafil in patients with moderate-to-severe pulmonary hypertension. *Indian Heart J.* 2003;55 (1):55-59.

Black SM, Fineman JR, Steinhorn RH, Bristow J and Soifer SJ. Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am.J.Physiol.* 1998;275 (5 Pt 2):H1643-H1651.

Blumberg FC, Riegger GA and Pfeifer M. Hemodynamic effects of aerosolized iloprost in pulmonary hypertension at rest and during exercise. *Chest* 2002;121 (5):1566-1571.

Budhiraja R, Tuder RM and Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;109 (2):159-165.

Butcher RW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J.Biol.Chem.* 1962;237: 1244-1250.

Campen MJ, Shimoda LA and O'Donnell CP. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J.Appl.Physiol.* 2005;99 (5):2028-2035.

Campian ME; Hardziyenka M, Michel MC and Tan HL. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2006;373(6):391-400)

Carbone R, Bossone E, Bottino G, Monselise A and Rubenfire M. Secondary pulmonary hypertension--diagnosis and management. *Eur.Rev.Med. Pharmacol.Sci.* 2005;9 (6):331-342.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F and Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001;358 (9288):1119-1123.

Cheitlin MD, Hutter AM, Brindis Jr. RG, Ganz P, Kaul S, Russell RO and Zusman RM. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. Technology and Practice Executive Committee. *Circulation* 1999;99 (1):168-177.

Chen HI and Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arterioscler.Thromb.* 1993;13 (6):852-856.

Chen HH, Chiang IP, and Jen CJ. Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *J.Biomed.Sci.* 1996;3 (6):454-460.

Cihak R, Kolar F, Pelouch V, Prochazka J, Ostadal B and Widimsky J. Functional changes in the right and left ventricle during development of cardiac hypertrophy and after its regression. *Cardiovasc.Res.* 1992;26 (9):845-850.

Coats AJ, Adamopoulos S, Radaelli SA, McCance A, Meyer TE, Bernardi L, Solda PL, Davey P, Ormerod O, Forfar C. Controlled trial of physical training in chronic heart failure. Exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation* 1992;85 (6):2119-2131.

Cohen AH, Hanson K, Morris K, Fouty B, McMurty IF, Clarke W and Rodman DM. Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *J.Clin.Invest.* 1996;97 (1):172-179.

Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC and Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ.Res.* 1996;79 (5):984-991.

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

Das M, Dempsey EC, Reeves JT and Stenmark KR. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *Am.J.Physiol.* 2002;282 (5):L976-L986.

Davidson SR, Burnett M, and Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med.Sci.Sports Exerc.* 2006;38 (2):250-255.

Delp MD and Laughlin MH. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med.Sci.Sports Exerc.* 1997;29 (11):1454-1461.

Dempsey EC, McMurtry IF and O'Brien RF. Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am.J.Physiol.* 1991;260 (2 Pt 1):L136-L145.

Desai SA and Channick RN. Exercise in patients with pulmonary arterial hypertension. *J.Cardiopulm.Rehabil.Prev.* 2008;28 (1):12-16.

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F and Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 2006;113 (2):286-295.

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

Duncan GE, Howley ET, and Johnson BN. Applicability of VO₂max criteria: discontinuous versus continuous protocols. *Med. Sci.Sports Exerc.* 1997;29 (2):273-278.

Durmowicz AG, Hofmeister S, Kadyraliev TK, Aldashev AA and Stenmark AA. Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude. *J.Appl.Physiol.* 1993;74 (5):2276-2285.

Evangelista FS and Krieger JE. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. *Physiol. Genomics* 2006;27 (3):231-236.

Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG, Hoedt-Miller M, Vidmar S, McMurtry IF and Rodman DM. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir.Res.* 2001;2 (5):306-313.

Faller A. *Der Körper des Menschen*. 12. Auflage ed. Thieme-Verlag: Stuttgart, New York; 1995

Faoro V, Lamotte M, Deboeck G, Pavelescu A, Huez S, Guenard H, Martinot JB and Naeije R. Effects of sildenafil on exercise capacity in hypoxic normal subjects. *High Alt.Med. Biol.* 2007;8 (2):155-163.

Favret F, Henderson KK, Allen J, Richalet JP and Gonzalez NC. Exercise training improves lung gas exchange and attenuates acute hypoxic pulmonary hypertension but does not prevent pulmonary hypertension of prolonged hypoxia. *J.Appl.Physiol.* 2006;100 (1):20-25.

Flaim SF, Minter WJ, Clark DP and Zelis R. Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. *J.Appl.Physiol.* 1979;46 (2):302-308.

Fried R and Reid LM. Early recovery from hypoxic pulmonary hypertension: a structural and functional study. *J.Appl.Physiol.* 1984;57 (4):1247-1253.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G and Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J.Clin.Invest.* 2000;105 (11):1631-1639.

Fulton RM, Hutchinson EC and Morgan Jones A. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br.Heart J* 1952; 4:413-420

Fushiki T, Matsumoto K, Inoue K, Kawada T and Sugimoto E. Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides. *J.Nutr.* 1995;125 (3):531-539.

Gain SP and Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998;352 (9129):719-725.

Galie N, Manes A and Branzi A. Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am.J.Respir.Med.* 2003;2 (2):123-137.

Galie N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G and Rubin LJ. Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;43 (12 Suppl S):81S-88S.

Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M and Simonneau G. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* 2005;353 (20):2148-2157.

Garg UC and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1990;171 (1):474-479.

Gewaltig MT and Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc.Res.* 2002;55 (2):250-260.

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Günther A, Walmrath D, Seeger W and Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360 (9337):895-900.

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W and Grimminger F. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann.Intern.Med.* 2002;136 (7):515-522.

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 HA, Pepke-Zaba J, Barbera JA, Channick R, Keogh AM, Gomez-Sanchez MA, Kneussl M and Grimminger F. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;43 (12 Suppl S):68S-72S.

Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W and Grimminger F. 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.* 2004;141 (3):169-177.

Giaid A and Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1995;333 (4):214-221.

Gielen S, Schuler G and Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 2001;103 (1):E1-E6.

Goret L, Reboul C, Tanguy S, Dauzat M and Obert P. Training does not affect the alteration in pulmonary artery vasoreactivity in pulmonary hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* 2005;527 (1-3):121-128.

Graham DA and Rush JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J.Appl.Physiol.* 2004;96 (6):2088-2096.

Green DJ, O'Driscoll G, Blanksby BA and Taylor RR. Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. *Sports Med.* 1996;21 (2):119-146.

Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman A, Malconian MK, Rock PB, Young PM and Houston CS. Operation Everest II: elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. *J.Appl.Physiol.* 1987;63 (2):521-530.

Gunaydin S, Imai Y, Takanashi Y, Seo K, Hagino Chang ID and Shinoka T. The effects of vasoactive intestinal peptide on monocrotaline induced pulmonary hypertensive rabbits following cardiopulmonary bypass: a comparative study with isoproterenol and nitroglycerine. *Cardiovasc.Surg.* 2002;10 (2):138-145.

Hall SM, Hislop AA, Wu Z and Haworth SG. Remodelling of the pulmonary arteries during recovery from pulmonary hypertension induced by neonatal hypoxia. *J.Pathol.* 2004;203 (1):575-583.

Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J and Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;98 (24):2709-2715.

Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, Schoene N and Schuler G. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA* 2000;283 (23):3095-3101.

Heath D, Edwards C, Winson M and Smith P. Effects on the right ventricle, pulmonary vasculature, and carotid bodies of the rat of exposure to, and recovery from, simulated high altitude. *Thorax* 1973;28 (1):24-28.

Henderson KK, Clancy RL and Gonzalez NC. Living and training in moderate hypoxia does not improve VO₂max more than living and training in normoxia. *J.Appl.Physiol.* 2001;90 (6):2057-2062.

Hess P, Clozel M and Clozel JP. Telemetry monitoring of pulmonary arterial pressure in freely moving rats. *J.Appl.Physiol.* 1996;81 (2):1027-1032.

Hislop A and Reid L. Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br.J.Exp.Pathol.* 1977;58 (6):653-662.

Hoepfer MM, Olschewski H, Ghofrani HA, Wilkens H, Winkler J, Borst MM, Niedermeyer J, Fabel H and Seeger W. A comparison of the acute hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and aerosolized iloprost in primary pulmonary hypertension. German PPH study group. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000;35 (1):176-182.

Hoepfer MM, Ghofrani HA, Grimminger F and Rosenkranz S. [Dana Point: what is new in the treatment of pulmonary hypertension?]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2008;133 Suppl 6:S191-S195.

Hornig B, Maier V and Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1996;93 (2):210-214.

Hoshi T and Lahiri S. Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* 2004;306 (5704):2050-2051.

Howley ET, Bassett DR and Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Med.Sci.Sports Exerc.* 1995;27 (9):1292-1301.

Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G and Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur.Respir.J.* 1998;11 (3):554-559.

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

Humbert M. Update in pulmonary arterial hypertension 2007. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.* 2008;177 (6):574-579.

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster M; Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO and Smith SC. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J.Am.Coll.Cardiol.* 2001;38 (7):2101-2113.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84 (24):9265-9269.

Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, Kangawa K and Kimura H. A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2004;169 (1):34-38.

Johnson LR and Laughlin MH. Chronic exercise training does not alter pulmonary vasorelaxation in normal pigs. *J.Appl.Physiol.* 2000;88 (6):2008-2014.

Johnson LR, Rush JW, Turk JR, Price EM and Laughlin MH. Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *J.Appl.Physiol.* 2001;90 (3):1102-1110.

Katayama H, Henry GW, Lucas C, Ha B, Ferreiro JI and Frantz EG. Blood flow velocity profiles in pulmonary branch arteries in lambs. *J.Biomech.Eng.* 1995;117 (2):237-241.

Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U and Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J.Appl.Physiol.* 2002;93 (4):1301-1309.

Kojda G, Cheng YC, Burchfield J and Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation* 2001;103 (23):2839-2844.

Kojda G and Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc.Res.* 2005;67 (2):187-197.

Krenzelok EP. Sildenafil: clinical toxicology profile. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* 2000;38 (6):645-651.

Kulkarni SK and Patil CS. Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.*2004;26 (10):789-799.

Kwapiszewska G, Wygrecka M, Marsh LM, Schmitt S, Trosser R, Wilhelm J, Helmus K, Eul B, Zakrzewicz A, Ghofrani HA, Schermuly RT, Bohle RM, Grimminger F, Seeger W, Eickelberg O, Fink L and Weissmann N. Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* 2008;118 (11):1183-1194.

Lalich JJ and Merkow L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* 1961;10:744-750.

Lee LS, Wang WW and Fanburg BL. Nitroprusside inhibits serotonin-induced mitogenesis and tyrosine phosphorylation of smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 1996;270 (3 Pt 1):L362-L367.

Lepore JJ, Maroo A, Pereira NL, Ginns LC, Dec GW, Zapol WM, Bloch KD and Semigran MJ. Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension. *Am.J.Cardiol.*2002;90 (6):677-680.

Lowe B, Grafe K, Ufer C, Kroenke K, Grunig E, Herzog W and Borst MM. Anxiety and depression in patients with pulmonary hypertension. *Psychosom.Med.* 2004;66 (6):831-836.

Mador MJ, Bozkanat E, Aggarwal A, Shaffer M and Kufel TJ. Endurance and strength training in patients with COPD. *Chest* 2004;125 (6):2036-2045.

Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA and Khalil RA. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2010;332 (2):455-462.

Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ and Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996;15 (5):633-644.

Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 1968;217 (5130):723-728.

Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Karger G, Buss J, Juenger J, Holzappel N, Opitz C, Winkler J, Herth FF, Wilkens H, Katus A, Olschewski H and Grunig E. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006;114 (14):1482-1489.

Meyrick B and Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am.J.Pathol.* 1980;100 (1):151-178.

Meyrick B and Reid L. Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study. *Lab.Invest.* 1980;42 (6):603-615.

Meyrick B and Reid L. Pulmonary hypertension. Anatomic and physiologic correlates. *Clin.Chest Med.*1983;4 (2):199-217.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K and Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002;105 (20):2398-2403.

Mitani Y, Maruyama J, Maruyama K and Sakurai M. Exercise training does not alter acetylcholine-induced responses in isolated pulmonary artery from rat. *Eur.Respir.J.* 1999;13 (3):622-625.

Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N and Miyatake K. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2000;161 (2 Pt 1):487-492.

Miyauchi T, Maeda S, Iemitsu M, Kobayashi T, Kumagai Y, Yamaguchi I and Matsuda M. Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. *J.Appl.Physiol.* 2003;94 (1):60-68.

Moore LG. Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt.Med.Biol.* 2001;2 (2):257-279.

Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA and Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *Int.J.Impot.Res.* 1998;10 (2):69-73.

Murray F, MacLean MR and Pyne NJ. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br.J.Pharmacol.* 2002;137 (8):1187-1194.

Naeije R, Melot C, Mols P and Halleman R. Effects of vasodilators on hypoxic pulmonary vasoconstriction in normal man. *Chest* 1982;82 (4):404-410.

Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, Aubin C, St, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR and Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 2007;116 (3):238-248.

Newman JH, Trembath RC, Morse JA, Grunig E, Loyd JE, Adnot S, Coccolo F, Ventura C, Phillips JA, Knowles JA, Janssen B, Eickelberg O, Eddahibi S, Herve P, Nichols WC and Elliott G. Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;43 (12 Suppl S):33S-39S.

Newman JH and Robbins IM. Exercise training in pulmonary hypertension: implications for the evaluation of drug trials. *Circulation* 2006;114 (14):1448-1449.

Nicod LP. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. *Swiss.Med. Wkly.* 2007;137 (31-32):437-442.

Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grunig E, Kleber FX, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J and Worth H. [Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension]. *Clin.Res.Cardiol.* 2007;96 (5):301-330.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H and Yokoyama M. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001;37 (2):322-327.

Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, Thebaud B, Wu XC, Dyck JR, Hashimoto K, Wang S, Moudgil R, Harry G, Sultanian R, Koshal A and Archer SL. In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* 2003;107 (15):2037-2044.

Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS and Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am.J.Physiol.* 1979;236 (6):H818-H827.

Rabinovitch M, Gamble WJ, Miettinen OS and Reid L. Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am.J.Physiol.* 1981;240 (1):H62-H72.

Raja SG and Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *Ann.Thorac.Surg.* 2004;78 (4):1496-1506.

Raja SG, Danton MD, Macarthur KJ and Pollock JC. Treatment of pulmonary arterial hypertension with sildenafil: from pathophysiology to clinical evidence. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 2006;20 (5):722-735.

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

Reeves JT, Wagner WW, McMurtry IF, Grover RF. Physiological effects of high altitude on the pulmonary circulation. *Int.Rev.Physiol.* 1979;20:289-310

Ressler J, Urbanova D, Widimsky J, Ostadal B, Pelouch V and Prochazka J. Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats. *Respiration* 1974;31 (1):38-46.

Rhodes J. Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J.Appl.Physiol.* 2005;98 (3):1092-1100.

Richalet JP, Gratadour P, Robach P, Pham I, Dechaux M, Joncquiert-Latarjet A, Mollard P, Brugniaux J and Cornolo J. Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2005;171 (3):275-281.

Rogers TK and Howard P. Pulmonary hemodynamics and physical training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1992;101(5 Suppl):289S-292S.

Rondelet B, Kerbaul F, Beneden R. Van BR, Motte S, Fesler P, Hubloue I, Rimmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Ketelslegers JM and Naeije R. Signaling molecules in overcirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: effects of sildenafil therapy. *Circulation* 2004;110 (15):2220-2225.

Rosenkranz S, Diet F, Karasch T, Weihrauch J, Wassermann K and Erdmann E. Sildenafil improved pulmonary hypertension and peripheral blood flow in a patient with scleroderma-associated lung fibrosis and the raynaud phenomenon. *Ann.Intern.Med.* 2003;139 (10):871-873.

Rosenkranz S. Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clin.Res.Cardiol.* 2007;96 (8):527-541.

Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M and Weissmann N. Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.*2009;180 (4):353-364.

Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1997;336 (2):111-117.

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

Runo JR and Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003;361 (9368):1533-1544.

Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM and Bloch KD. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr.Res.* 1998;43 (2):163-168.

Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK and Raju BS. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;43 (7):1149-1153.

Scheld TA. Der 6-Minuten Gehtest: Ein valides und reliables Verfahren zur Trainingssteuerung und Therapieevaluation in der stationären kardiologischen Rehabilitation. Dissertation; Köln, 2007.

Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W and Grimminger F. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.* 2004;169 (1):39-45.

Sebkhi A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J and Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003;107 (25):3230-3235.

Seeger W. Pulmonale Hypertonie. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin. 2000.

Sime F, Penaloza D and Ruiz L. Bradycardia, increased cardiac output, and reversal of pulmonary hypertension in altitude natives living at sea level. *Br.Heart J.* 1971;33 (5):647-657.

Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S and Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;43 (12 Suppl S):5S-12S.

Singh TP, Rohit M, Grover A, Malhotra S and Vijayvergiya R. A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study to evaluate the efficacy of oral sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. *Am.Heart J.* 2006;151 (4):851-855.

Solway S, Brooks D, Lacasse Y and Thomas S. A qualitative systematic overview of the measurement properties of functional walk tests used in the cardiorespiratory domain. *Chest* 2001;119 (1):256-270.

Souza-Rabbo MP, Silva LF, Auzani JA, Picoral M, Khaper N and Bello-Klein A. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 2008;35 (8):944-948.

Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff RA and Das M. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 2002;122 (6 Suppl):326S-334S.

Stenmark KR and McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circ.Res.* 2005;97 (2):95-98.

Stenmark KR, Fagan KA and Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ.Res.* 2006;99 (7):675-691.

Stenmark KR, Davie VN, Frid M, Gerasimovskaya E and Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda.)* 2006;21:134-145.

Sun XG, Hansen JE, Oudiz RJ and Wasserman K. Exercise pathophysiology in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;104 (4):429-435.

Sovorava T, Lauer N and Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004;44 (6):1320-1327.

Takahashi M, Nakamura T, Toba T, Kajiwara N, Kato H and Shimizu Y. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng.* 2004;10 (5-6):771-779.

Traub O and Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1998;18 (5):677-685.

Tucci M, Hammerman SI, Furfaro S, Saukonen JJ, Conca TJ and Farber HW. Distinct effect of hypoxia on endothelial cell proliferation and cycling. *Am.J.Physiol.* 1997;272 (5 Pt 1):C1700-C1708.

Urbanova D, Ressler J, Widimsky J, Ostadal B, Pelouch V and Prochazka J. Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat. *Beitr.Pathol.* 1973;150 (4):389-399.

van Suylen RJ, Smits JF and Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1998;157 (5 Pt 1):1423-1428.

Veras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrao CE and Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* 1997;273 (6 Pt 2):H2627-H2631.

Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D and Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir.Physiol.* 1995;100 (2):159-169.

Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A and Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am.J.Physiol.* 2001;281 (2):L314-L317.

Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ghofrani HA, Schermuly RT, Guenther A, Quanz K, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W and Grimminger F. Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am.J.Physiol.* 2003;284 (3):H931-H938.

Weissmann N, Gerigk B, Kocer O, Nollen M, Hackemack S, Ghofrani HA, Schermuly RT, Butrous G, Schulz A, Roth M, Seeger W and Grimminger F. Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir.Med.* 2007;101 (10):2125-2132.

Weitzenblum E and Chaouat A. Hypoxic pulmonary hypertension in man: what minimum daily duration of hypoxaemia is required? *Eur.Respir.J.* 2001;18 (2):251-253.

Welsh DJ, Scott P, Plevin R, Wadsworth R and Peacock AJ. Hypoxia enhances cellular proliferation and inositol 1,4, 5-triphosphate generation in fibroblasts from bovine pulmonary artery but not from mesenteric artery. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1998;158 (6):1757-1762.

Wensel R, Opitz CF, Anker SD, Winkler J, Hoffken G, Kleber FX, Sharma R, Hummel M, Hetzer R and Ewert R. Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. *Circulation* 2002;106 (3):319-324.

White J, Hopkins RO, Glissmeyer EW, Kitterman N and Elliott CG. Cognitive, emotional, and quality of life outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir.Res.* 2006;7:55.

Widimsky J, Urbanova D, Ressler J, Ostadal B, Pelouch V and Prochazka J. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc.Res.* 1973;7 (6):798-808.

Widimsky J, Ostadal B, Urbanova D, Ressler J, Prochazka J and Pelouch V. Intermittent high altitude hypoxia. *Chest* 1980;77 (3):383-389.

Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A and Evans AM. 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.* 2001;276 (14):11180-11188.

Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ and Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO_2 max and cardiac hypertrophy. *Am.J.Physiol.* 2001;280 (3):H1301-H1310.

Wolff JC, Wilhelm J, Fink L, Seeger W and Voswinckel R. Comparative gene expression profiling of postnatal and post-pneumonectomy lung growth. *Eur.Respir.J.* 2009.

Woodman CR, Muller JM, Laughlin MH and Price EM. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. *Am.J.Physiol.* 1997;273 (6 Pt 2):H2575-H2579.

Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC and Erzurum SC. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J.* 2004;18 (14):1746-1748.

Xue C and Johns RA. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 1995;333 (24):1642-1644.

Zamboni L. and DeMartino C. Buffered picric acid-formaldehyde: A new, rapid fixative for electron microscopy. *Anonymous. Anonymous. J.Cell.Biol.* 1967;35: 148A.

Zhang M, Koitabashi N, Nagayama T, Rambaran R, Feng N, Takimoto E, Koenke T, O'Rourke B, Champion HC, Crow MT and Kass DA. Expression, activity, and pro-hypertrophic effects of PDE5A in cardiac myocytes. *Cell Signal.*, 2008.

Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A and Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;104 (4):424-428.

Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ and Jacobs ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am.J.Physiol.* 2000;279 (4):H1526-H1533.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Seeger und Herrn Prof. Dr. Weissmann, Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität, für die Themenstellung der vorliegenden Arbeit und die hervorragende und engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Roth danke ich für die sehr gute fachliche Betreuung und die rasche Korrektur dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich auch für die fachliche Unterstützung bei Herrn Prof. Dr. Mooren und Dr. Karsten Krüger aus dem Institut für Sportmedizin der Justus-Liebig-Universität bedanken. Weiterhin danke ich Christian Pilat für die gute Zusammenarbeit.

Karin Quanz und Ingrid Breitenborn-Müller danke ich für die sehr gute Einarbeitung und die gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Bakytbek Egemnazarow, Dr. Rio Dumitrascu, Dr. Markus Roth, Djuro Kosanovic und Dr. Beate Fuchs für die überaus kompetente und hervorragende Unterstützung während dieser Arbeit bedanken. Mein weiterer großer Dank gilt Isabelle Schwalm, Gulsina Murzabekova und Ewa Bieniek, die immer eine helfende Hand hatten und die ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Tiermedizinern Dr. Eva Dony, Katja Helmus, Michael Behrendts danke ich für die vielen fachspezifischen Gespräche sowie für die kollegiale Unterstützung während dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Iris Dahlem für die hervorragende Betreuung der Tiere während der Versuche.

Meinen Eltern, Alexander, Simone und Linda danke ich für die moralische Unterstützung.

Carolin Eckenfels und Christiane Arsulic danke ich für die hervorragende fachliche Beratung bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Mein absolut besonderer Dank gilt Gregor Kling, der wohl am meisten Nerven in diese Arbeit gesteckt hat.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5637-7



9 783835 956377

© Sebastian Kaultzki - Fotolia.com