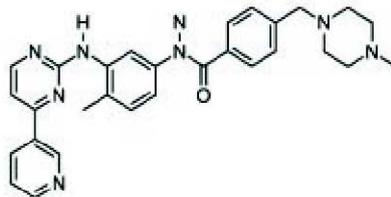


THERAPEUTISCHER EFFEKT DES PROTEIN-
TYROSINKINASEHEMMERS IMATINIB (STI 571)
IM MODELL DER MONOCROTALIN-
INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE
DER RATTE

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

EVA DONY



Aus dem
Institut für Veterinärpathologie des
Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt

und

dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly

Therapeutischer Effekt des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI 571) im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte

INAUGURALDISSERTATION

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

eingereicht von

Eva Maria Marlene Dony
Tierärztin aus Homburg (Saar)

Gießen 2006

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Burkhardt
Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 22. August 2006

Ich erkläre:

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

Eva Dony

(...) ein Blinder, der sehen möchte und weiß, daß die Nacht kein Ende hat.

Der Kampf gegen Gipfel vermag ein Menschenherz auszufüllen.

Wir müssen uns Sisyphos als einen glücklichen Menschen vorstellen.

(Albert Camus)

Für meine Eltern und für „Jean Marie“

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Meilensteine der kardiopulmonalen Medizin- als Einführung in die Thematik	1
1.2	Pulmonale Hypertonie (PH)- Definition und Vorkommen	2
1.3	Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	4
1.4	Pulmonalvaskuläres Remodelling	4
1.5	Experimentelles Tiermodell	5
1.6	Einfluß von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie	8
1.7	Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	10
1.8	PDGF in pulmonaler Hypertonie	13
1.9	Der Tyrosinkinasehemmstoff Imatinib	13
1.10	Ziel der Arbeit	17
2	MATERIALIEN UND METHODEN	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Versuchstiere	18
2.1.2	Tierversuchsgenehmigung	18
2.1.3	Injektionslösungen und Substanzen	19
2.1.4	Verbrauchsmaterial	19
2.1.5	Geräte/ Maschinen für Tierpräparation	20
2.1.6	Histologie	20
2.1.7	Antikörper	22
2.1.8	Geräte/ Software/ Makros für Gefäßmorphometrie	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Vorbereitung und Injektion von Monocrotalin	23
2.2.2	Vorbereitung und Injektion von Imatinib	23
2.2.3	Aufteilung der Tiergruppen	24
2.2.4	Hämodynamische Messungen am Ganztier	25
2.2.4.1	Narkose	25
2.2.4.2	Tracheotomie	25
2.2.4.3	Beatmung	26
2.2.4.4	Präparation der rechten <i>V. jugularis</i>	26
2.2.4.5	Präparation der linken <i>A. carotis</i>	26
2.2.4.6	Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes	27
2.2.5	Blutproben	28
2.2.6	Berechnung des Herzzeitvolumens	28
2.2.7	Entnahme der Lunge	28
2.2.8	Präparation des Herzens	29
2.2.9	Telemetrie	29
2.2.10	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	31
2.2.10.1	Einbettung des Gewebes und konventionelle Histologie	31
2.2.10.1.1	Zamboni's Fixativ	31
2.2.10.1.2	Elastica-Kernechtrot-Färbung	31
2.2.10.2	Immunhistochemische Färbemethoden	31

2.2.10.2.1	Histopuffer zur Verdünnung der Antikörper	31
2.2.10.2.2	Immunhistochemie (1): Anti- alpha actin/ Faktor VIII	32
2.2.10.2.3	Immunhistochemie (2): Anti- PDGF-B Kette (Ratte)	32
2.2.10.2.4	Immunhistochemie (3): Anti- PDGF- β Rezeptor (human)	33
2.2.10.2.5	Immunhistochemie (4): Anti- PDGF- β Rezeptor (Ratte)	33
2.2.11	Morphometrische Analyse der LungengefäÙe	33
2.2.11.1	Mittlere Wandstärke	33
2.2.11.2	Muskularisierungsgrad	34
2.2.12	Statistische Auswertung	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Zusammenfassung der ermittelten Parameter	36
3.2	Überlebensrate unter Behandlung mit STI 571 im Vergleich zu placebo- behandelten Tieren	37
3.3	Nebenwirkungen unter Therapie mit Imatinib 50 mg/kg i.p.	38
3.4	Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den einzelnen Gruppen	39
3.5	Telemetrisch bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)	40
3.6	Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)	43
3.7	Herzeitvolumen bezogen auf das Gewicht (Cardiac Index)	44
3.8	Bestimmung des Verhältnisses des rechten Ventrikels zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie	45
3.9	Morphometrische Analyse der LungengefäÙe	47
3.9.1	Muskularisierungsgrad	47
3.9.1.1	Immunhistochemische Doppelfärbung	47
3.9.1.2	Prozentualer Anteil voll, partiell und teilmuskularisierter GefäÙe	48
3.9.2	Mittlere Wandstärke	49
3.9.2.1	Elastica-Kernechtrot Färbung	49
3.9.2.2	Mittlere Wandstärke in distalen Pulmonalarterien (25 – 50 μ m)	50
3.9.2.3	Mittlere Wandstärke in mittelgroÙen und groÙen Pulmonalarterien	51
3.9.3	LumenfläÙe in μ m ² in distalen Pulmonalarterien	52
3.10	Expression von PDGF- β Rezeptor in Rattenlungen	54
3.11	Expression von PDGFR- β in humanen Lungen	55
3.12	Expression von PDGF-B (Ligand) in der <i>A. pulmonalis</i> von Ratten	56
3.13	Expression von PDGF-B (Ligand) in Rattenlungen	57
3.14	Zusammenfassung der Ergebnisse	58
4	DISKUSSION	59
4.1	Pulmonalarterielle Hypertonie- mögliche Ätiologien und gegenwärtige Therapiestrategien	59
4.2	Gegenwärtige Therapie der PAH	60
4.3	Experimentelles Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte- Vergleichbarkeit zur PAH des Menschen	63

4.4	PDGF und seine Hemmung in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie	65
4.5	Experimentelle antiproliferative Ansätze im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie	68
4.6	PDGF-Expression in humaner PAH	70
4.7	Ausblick: Anwendung von Imatinib in der pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	SUMMARY	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
8	DANKSAGUNG	88

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A.	lat. arteria (Arterie)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
bcr	breakpoint cluster region
bcr-abl	konstitutiv aktive Tyrosinkinase bei CML
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
cm	Zentimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CVP	central venous pressure (zentraler Venendruck)
d	lat. dies (Tag)
EGF	epidermal growth factor
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
GIST	gastrointestinale Stromatumoren
h	lat. hora (Stunde)
i.e.	lat. id est (das heißt)
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IC 50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IHC	Immunhistochemie
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
M	molar
M.	lat. musculus (Muskel)

MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase (MAPK)
MCT	Monocrotalin
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
MW	Mittelwert
n	number (Anzahl)
1N HCl	1 normale Salzsäure
N.	lat. nervus (Nerv)
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
°C	Grad Celsius
p.	lat. post (nach)
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck, pulmonary arterial pressure
PC	Personal Computer
PDGF	platelet derived growth factor
PDGF-A	Platelet derived growth factor A (Ligand)
PDGF-B	Platelet derived growth factor B (Ligand)
PDGFR-β	Platelet derived growth factor Rezeptor beta
PDGFR-α	Platelet derived growth factor Rezeptor alpha
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck, positive end-expiratory pressure
PH	pulmonale Hypertonie
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindungen)
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)
RVSP	rechtsventrikulär systolischer Druck, right ventricular systolic pressure
s.	siehe
s.c.	subkutan
SAP	systemisch arterieller Druck, systemic arterial pressure

SCF	stem cell factor (Stammzellefaktor)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error mean (Standardfehler)
sma	smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)
SPH	sekundäre pulmonale Hypertonie
TGF β	Transforming growth factor beta
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
V.	lat. vena (Vene)
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP	Beatmungsdruck, Ventilation pressure
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Meilensteine der kardiopulmonalen Medizin- als Einführung in die Thematik

Die moderne Ära der kardiopulmonalen Medizin begann um 1940 mit Cournand und Richards als den Pionieren der Rechtsherzkatheterisierung. Forssman, Cournand und Richards wurden für ihre Verdienste 1965 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet (Cournand, 1941; Richards, 1964; Forssmann, 1929). Bis zu dieser Zeit gab es keine direkte Messung des zentralen Gefäßdruckes bei Menschen. Die Katheterisierung des rechten Herzens gab den Ausschlag für eine regelrechte Explosion von neuen Erkenntnissen über die Funktion und Dysfunktion des Lungenkreislaufs, der Herztätigkeit, über Interaktionen zwischen Lunge und Herzen, Klappenfunktionen und kongenitale Herzerkrankungen. Es wurde festgestellt, dass pulmonale Hypertonie als Folge einer Vielzahl von Erkrankungen auftritt, welche entweder durch erhöhten Druck distal der Lungenkapillaren, durch Gefäßverengung, durch erhöhten Blutfluß durch die Lunge oder durch obstruierte Lungengefäße charakterisiert sind.

Der Ursprung der modernen westlichen Kardiologie reicht zurück bis zu William Harvey's *„Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus“* (1628). Durch sorgfältige Beobachtung des Blutflusses konnte er zeigen, dass das Blut durch die Arterien vom Herzen in die Gewebe gelangt und über die Venen und die Lunge ins Herz zurückfließt. Er postulierte, dass es Poren in der Lunge gibt, welche dem Blut ermöglichen, zum Herzen zurückzukehren. Die von Harvey postulierten Poren wurden von Malpighi 1661 im Mikroskop als Kapillaren erkannt (*De Pulmonibus*; 1661).

Umfangreiche Messungen von Druck und Fluß im Kreislauf wurden erstmals 1733 von Stephen Hales durchgeführt. Er katheterisierte Hunderte von Tieren verschiedenster Spezies und gewann wertvolle Informationen über die Druckunterschiede zwischen Lungen- und Körperkreislauf.

In den nächsten 150 Jahren gab es einzelne Berichte über eine Beteiligung des rechten Ventrikels bei Krankheitsprozessen: Morgagni (1762) und Laennec (1826) berichteten über Rechtsherzhypertrophie in zwei Fällen von Lungenemphysem. Der

große Pathologe Rudolf Virchow beschrieb mehrere Fälle multipler Lungenembolie mit dilatierten rechten Ventrikeln in seiner Monographie „Thrombose und Embolie“ (1846). Connheim fand 1880 heraus, dass sich der pulmonalarterielle Druck bei Tieren erst dann signifikant erhöht, wenn fast drei Viertel des Gefäßbettes verlegt sind.

Romberg war 1891 wahrscheinlich der erste, der eine idiopathische pulmonale Hypertonie beschrieb. David Dresdale berichtete 1951 über hämodynamische Veränderungen in Fällen ätiologisch unklarer pulmonaler Hypertonie und prägte die Bezeichnung ‚primäre pulmonale Hypertonie‘ (PPH). Dieses Krankheitsbild wird heute als ‚idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie‘ (IPAH) bezeichnet (Simoneau *et. al.*, 2004).

Der Terminus ‚*Cor pulmonale*‘ wurde erstmalig in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts benutzt.

1.2 Pulmonale Hypertonie (PH)- Definition und Vorkommen

Der physiologische Lungenkreislauf ist ein Niederdruck- und Hochflußsystem. Er zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, normalerweise nicht perfundierte Gefäße im Falle einer Hypoxie oder eines zeitweise erhöhten Blutflusses zu rekrutieren. Die Wände der Pulmonalarterien sind dünn, da in ihnen unter physiologischen Bedingungen ein niedriger transmuraler Druck herrscht.

Eine pulmonale Hypertonie ist definiert als eine chronische Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (mPAP) >25 mmHg in Ruhe und >30 mmHg bei Belastung (Rubin, 1997). Voelkel und Tuder definieren weiterhin den Schweregrad der Erkrankung: bei einem mittleren pulmonalarteriellen Druck von 25-45 mmHg handelt es sich um eine milde PH, bei einem mPAP >45 mmHg um eine schwere PH (Voelkel & Tuder, 1999).

Die pulmonale Hypertonie ist charakterisiert durch eine deutliche Erhöhung des pulmonalen Vasotonus, pathognomonische proliferative Lungengefäßveränderungen (siehe Tabelle 1) und einer Hypertrophie des rechten Ventrikels (Vergrößerung des rechten Herzens aufgrund der erhöhten Nachlast: *Cor pulmonale* im Sinne der WHO-Definition). Eine pulmonale Hypertonie ist keine Krankheit, sondern ein Syndrom, bei

welchem der Blutdruck im Lungenkreislauf erhöht ist. Obwohl die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie eine sehr seltene Erkrankung ist, tritt eine pulmonale Hypertonie bemerkenswert häufig auf, und es wird geschätzt, dass sie das dritthäufigste kardiovaskuläre Syndrom nach Koronarerkrankungen und systemischem Hochdruck darstellt. Lungenhochdruck ist deshalb häufig, weil ein erhöhter Druck im Lungenkreislauf fast alle kardialen und pulmonalen Erkrankungen begleiten kann.

Das Hauptproblem für den Kliniker stellt die häufig lange Zeitspanne (im Mittel 2 Jahre) zwischen dem Beginn der Erkrankung und ihrer Diagnose dar. Dafür gibt es mehrere Gründe:

- Pulmonale Hypertonie ist schwierig zu diagnostizieren, da die Symptome und Anzeichen vage sind und Routineuntersuchungen in der Diagnostik wenig hilfreich erscheinen.
- Bis zur neuen Behandlungsära der pulmonalen Hypertonie gab es kaum Dringlichkeit, möglichst früh eine gesicherte Diagnose zu etablieren, da die Prognose infaust war und für den Arzt keine Möglichkeit bestand, die Krankheit therapeutisch zu beeinflussen. In den letzten Jahren gab es jedoch eine regelrechte Explosion neuer Behandlungsmöglichkeiten. Die erste war intravenöses Epoprostenol (Prostazyklin), gefolgt von den Prostazyklinanaloga Iloprost, Beraprost, Treprostinil und dem Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan. Darüber hinaus erlangen nun Phosphodiesterasehemmer (z.B. Sildenafil) mehr und mehr wertvolle klinische Bedeutung.
- Pulmonale Hypertonie wurde als sehr seltene Erkrankung betrachtet und deshalb in der Diagnostik und Differentialdiagnostik unzureichend berücksichtigt.
- Messungen von Druck und Fluß konnten nur invasiv über Rechtsherzkatheterisierung erfolgen. Dies hat sich durch die weite Verbreitung der Echokardiographie als nichtinvasive Screeningmethode verbessert. Weiterhin gibt es die Magnetresonanztomographie sowie spezielle Belastungstest.

1.3 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie wurde 2003 auf der Weltkonferenz in Venedig modifiziert und umfaßt fünf Gruppen:

1. pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - idiopathisch (IPAH)
 - familiär
 - assoziiert mit bestimmten Erkrankungen (APAH) (Kollagenosen, angeborene Shunts, portale Hypertonie, HIV-assoziiert, PH durch Medikamente/ Toxine, andere Erkrankungen)
 - PH mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung (u.a. pulmonale veno-okklusive Erkrankung, pulmonale kapilläre Hämangiomatose)
 - Persistierende PAH des Neugeborenen
2. pulmonale Hypertonien bei Linksherzerkrankungen
3. pulmonale Hypertonien bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/ oder Hypoxämie
4. pulmonale Hypertonie infolge chronisch thrombotischer und/ oder embolischer Krankheiten
5. gemischte Gruppe (PH bei Sarkoidose, Histiozytose, Lymphangiomatose; PH durch Kompression von Lungengefäßen)

1.4 Pulmonalvaskuläres Remodelling

Pulmonalvaskuläres Remodelling bezeichnet strukturelle und funktionelle Veränderungen in der normalen Architektur der Wände von Pulmonalarterien.

Dieser Prozeß tritt in den Widerstandsgefäßen der Lunge als primäre Antwort auf Schädigung oder Stimuli wie Hypoxie auf. Um einem chronischen Druckanstieg im Lumen standzuhalten verdickt sich die Gefäßwand und wird stärker. Diese „Aufrüstung“ der Gefäßwand durch zusätzliche glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix führt zu einer Verkleinerung des Innendurchmessers und zu einer verminderten vasodilatorischen Kapazität. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung

des pulmonalvaskulären Widerstands und, als Konsequenz, zu einem anhaltenden Lungenhochdruck.

Diese progressive Obstruktion von Pulmonalarterien ist charakteristisch für die Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie. Ein gemeinsames Merkmal aller Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie ist die distale Ausbreitung glatter Muskelzellen in kleine, physiologischerweise nicht muskularisierte Pulmonalarterien und wird auch als ‚*de novo*-Muskularisierung‘ bezeichnet. Das pulmonalvaskuläre Remodelling umfasst jedoch alle Schichten der Gefäßwand, und viele vaskuläre Zelltypen sind in diesen Prozeß involviert.

Je größer der Grad der strukturellen Gefäßveränderungen ist, umso stärker ist die Druckerhöhung bei einem gegebenen Herzzeitvolumen.

1.5 Experimentelles Tiermodell

Das Modell der Monocrotalin- induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte ruft pathologische und pathohistologische Veränderungen hervor, die mit vielen Läsionen, die bei der (idiopathischen) pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen auftreten, direkt vergleichbar sind (siehe Tabelle 1).

Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus *Crotalaria* (Familie *Leguminosae*). Es ist seit langem bekannt, dass diese Pflanzenalkaloide ein Gesundheitsrisiko für Lebewesen darstellen (Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine Alkaloids; WHO 1988). Vergiftungsfälle von Mensch und Tier treten- oft endemisch- in vielen Teilen der Welt sporadisch auf. Kürzlich wurde erst über eine *Crotalaria retusa* Vergiftung bei Schafen in Brasilien berichtet (Nobre *et. al.*, 2005).

Die toxischen Effekte von Pyrrolizidinalkaloiden sind abhängig von ihrer Bioaktivierung (Toxifizierung) in der Leber: Die Metabolisierung der Alkaloide durch mischfunktionelle Oxidasen (Cytochrom-P540 Enzyme) führt zur Entstehung pyrrolischer Dehydro-Alkaloide (in diesem Falle Dehydromonocrotalin oder Monocrotalin-Pyrrol). Bei diesen Pyrrolen handelt es sich um sehr reaktive alkylierende Verbindungen. Die Metaboliten werden von den Leberzellen in die Blutbahn abgegeben und induzieren im nächstfolgenden Organ, der Lunge,

charakteristische Gefäßläsionen. Pyrrolizidinalkaloide werden sehr schnell verstoffwechselt; ihre aktiven Metaboliten haben sehr kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis einige Minuten) und werden innerhalb der ersten 24 Stunden fast vollständig über die Nieren ausgeschieden, so dass nach dieser Zeit keine verbleibenden Produkte in Körperflüssigkeiten oder Geweben nachgewiesen werden können (Hayashi *et. al.*, 1967).

Die pathologischen Veränderungen an anderen Organen umfassen vor allem, mit zum Teil großen qualitativen und quantitativen Unterschieden zwischen den Spezies, Leberzellnekrose und Leberzellhyperplasie, Leberzirrhose und –fibrose, veno-okklusive Lebererkrankung, Glomerulopathie und sekundäre Veränderungen am Zentralnervensystem, die vor allem auf einen Anstieg von Ammoniak durch die Leberschädigung zurückzuführen sind (Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine Alkaloids; WHO 1988).

Die antimitotische Wirkung der aktiven Pyrrole zeigt sich in der Entstehung großer, atypischer Typ II Alveolarepithelzellen mit stark vergrößerten Kernen (Wilson & Segall, 1990). Bereits 3 Tage nach dem toxischen Stimulus kommt es zu einem Auftreten von Muskelfasern in normalerweise nicht muskularisierten Lungenarterien (Meyrick & Reid, 1979).

Die Veränderungen schreiten in den nächsten Wochen nach der toxischen Schädigung fort. Die Tiere entwickeln klinische Anzeichen von Rechtsherzinsuffizienz (Dyspnoe, Zyanose, periphere Ödeme). Eine progressive Verdickung der Media in den Pulmonalarterien und –arteriolen sowie eine signifikante Hypertrophie des rechten Herzens treten auf, schließlich erfolgt eine exzentrische Dilatation des rechten Ventrikels, eine Dekompensation und die Tiere sterben an Rechtsherzversagen. Die Hypertrophie betrifft nur das rechte Herz und korreliert mit den vaskulären Veränderungen. Weiterhin kommt es zu einer Ansammlung von Mastzellen in den mediastinalen Lymphknoten und in der Umgebung von Bronchien und Pulmonalarterien (Miyata, 2000; Valdivia, 1967). Im venösen Gefäßbett finden sich keine derartigen Veränderungen (Lalich & Ehrhart, 1962; Valdivia *et. al.*, 1967; Kay & Heath, 1966; Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine alkaloids, 1988).

Der pulmonalarterielle Druck zeigt einen ersten leichten Anstieg 8 Tage nach dem toxischen Stimulus und nimmt dann kontinuierlich zu (Ghodsí & Will, 1981).

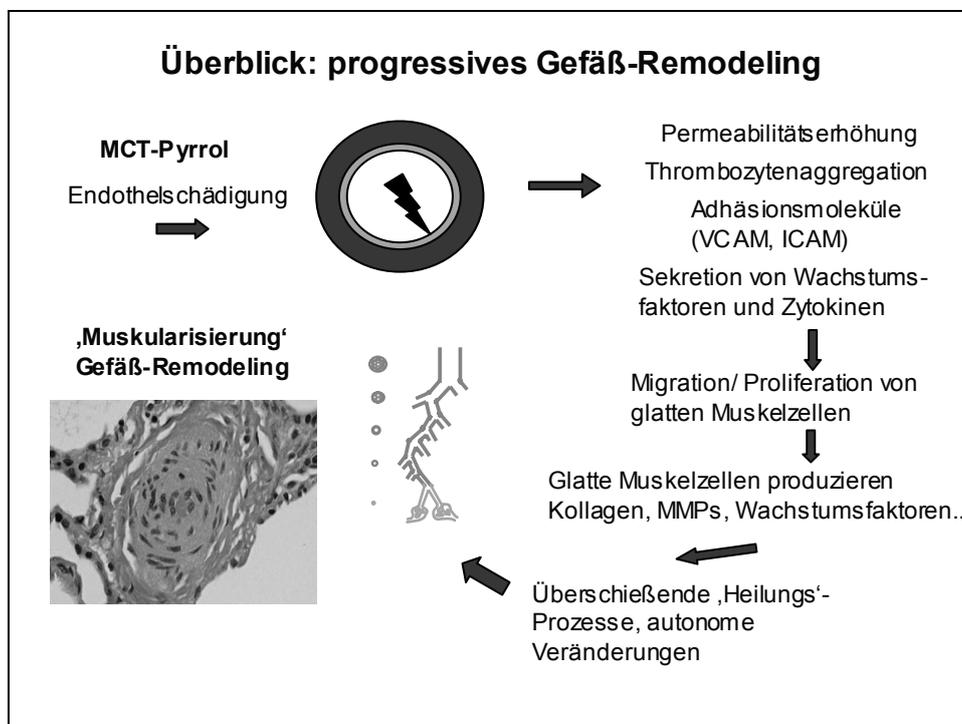
Tabelle 1: Pulmonalvaskuläres Remodelling: ein Vergleich

Veränderung	MCT-PAH der Ratte	humane PAH
Endothelschädigung	Endothelschädigung als initiierender Mechanismus, Permeabilität ↑ (Valdivia 1967, Sugita 1983, Wilson 1989, Tanaka 1996)	Dysfunktion von pulmonalen Endothelzellen (Voelkel, Tuder 1995)
Thrombosierung	Plättchensequestrierung Verminderung der MCT-PAH bei plättchendifizienten Ratten (Roth 1988, Schultze 1998) intravask. Thromben (Allen 1970, Lalich 1977, Hayashi 1984)	zirkulierende Plättchenaggregate in IPAH (Lopes 1993) in situ Thrombose in PH Läsionen (Wagenvoort 1993)
Fragmentierung der internen elast. Lamina Elastaseaktivierung	Veränderte Elastin- und Kollagensynthese (Todorovich-Hunter 1988, 1992)	bei PAH im Zusammenhang mit kongenitalen Herzerkrankungen (Rabinovitch 1986)
Inflammation	vorwiegend mononukleär perivaskulär und interstitiell (Wilson 1989, Stenmark 1985) Mastzellhyperplasie (Miyata 2000, Valdivia 1967)	vorwiegend mononukleär v.a. perivaskulär und im Bereich plexiformer Läsionen (Caslin 1990, Tuder 1994, Dorfmueller 2003)
plexiforme Läsionen	nein (in keinem gängigen Tiermodell)	bei IPAH in 80% in schweren Fällen von SPH
Neo-Muskularisierung peripherer Arterien Mediahypertrophie	pathognomonisch (z.B. Meyrick & Reid 1980)	pathognomonisch
Cor pulmonae	pathognomonisch	pathognomonisch
Neointimabildung	MCT+erhöhter Fluß (Tanaka 1996)	charakteristisch in Fällen, bei denen der PAP systemische Werte erreicht

Die langsame Entwicklung der Gefäßveränderungen legt den Schluß nahe, dass diese nicht direkt durch vorhandenes aktives Alkaloid (denn dieses wird innerhalb der ersten 24 Stunden nahezu vollständig ausgeschieden), sondern durch verschiedene biologische Pathomechanismen, die durch den initialen toxischen Stimulus aktiviert werden, verursacht sind. Methylprednisolon, welches das akute durch Monocrotalin induzierte Lungenödem verbessert, verringert auch die Gefäßveränderungen und die Rechtsherzhypertrophie (Langleben & Reid, 1985). Tägliche Gabe von Methylprednisolon in geringen Dosen über 21 Tage scheint effektiver als 2 große Dosen von Methylprednisolon, welches 2 Stunden vor und 2 Stunden nach Applikation von Monocrotalin gegeben wird. Es erscheint also, dass die sekundären

Veränderungen, obwohl durch Monocrotalin getriggert, sich selbst aufrechterhalten und dass sie für die Gefäßwandumbauprozesse die wichtigere Rolle spielen.

Abbildung 1: Pathomechanismus des Gefäß-Remodellings nach Monocrotalininjektion



Inaktives Monocrotalin wird nach Injektion in den Leberzellen zu aktiven Metaboliten (darunter MCT-Pyrrol) umgewandelt. Das Pyrrol induziert initial in den Lungengefäßen eine endotheliale Schädigung. Dies führt zu Permeabilitätserhöhung, Thrombozytenaggregation und der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und eingewanderte Entzündungszellen produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Fibroblasten und die Anhäufung extrazellulärer Matrix führen zu einer verstärkten Muskularisierung der Gefäße und zu sich selbst aufrecht erhaltenden, autonomen Umstrukturierungen der Gefäßwände, die in ihrer Gesamtheit als ‚Remodelling‘ bezeichnet werden.

1.6 Einfluß von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Peptiden und Zytokinen sind an der Modulation des vaskulären Remodellings beteiligt. Zusätzlich spielen kleine Moleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) eine wichtige Rolle. In Tabelle 2 sind die Faktoren aufgelistet, von denen man

annimmt, dass sie an der Proliferation glatter Muskelzellen und an der Kollagensynthese beteiligt sind.

Die Rezeptoren an der Zelloberfläche für die meisten Wachstumsfaktoren sind transmembranständige, tyrosinspezifische Proteinkinasen (auch bekannt als Rezeptortyrosinkinasen). Sie umfassen Rezeptoren für PDGF, FGFs, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF) und VEGF. Die Ligandenbindung führt zu einer Phosphorylierung des intrazellulären Teils des Rezeptors und zur Initialisierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden. TGF- β und Bone Morphogenetic Protein (BMP) agieren über Rezeptor-Serin- oder Threoninkinasen.

Tabelle 2: Faktoren der Proliferation glatter Muskelzellen und der Kollagensynthese

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

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind an der Proliferation von glatten Muskelzellen und an der Modulation des Remodellings beteiligt. Außerdem spielen verschiedene kleine Moleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) eine wichtige Rolle. Hier sind die Faktoren aufgelistet, von denen man annimmt, dass sie an der Proliferation glatter Muskelzellen sowie der Kollagensynthese beteiligt sind.

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

Die intrazellulären Signaltransduktionswege all dieser Rezeptoren sind komplex und in großem Maße abhängig vom untersuchten Zelltyp und Gewebe. Je nach Zelltyp kann die gleiche Rezeptorbindung verschiedene Antworten der Zelle hervorrufen. Viele der Faktoren, die an Gefäßumbauprozessen beteiligt sind, kann man jedoch in gemeinsamen „Schlüssel“-Transduktionskaskaden zusammenfassen. Zum Beispiel stimulieren eine Reihe antiproliferativer Moleküle in glatten Muskelzellen die Bildung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP und agieren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Vasokonstriktoren und Wachstumsfaktoren münden sehr häufig in einer Phosphorylierung von MAP-Kinasen.

Es scheint, dass in einem gesunden Körper ein komplexes Zusammenspiel zwischen proliferativen und antiproliferativen Molekülen herrschen muß, und dass erst eine Störung dieses subtilen Gleichgewichts zu pathologischen Vorgängen im Körper führen kann.

1.7 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Platelet derived growth factor (PDGF) ist ein wichtiges Mitogen für glatte Muskelzellen (siehe auch Tabelle 2), Bindegewebszellen und viele andere Zelltypen. PDGF besteht aus einer Familie kationischer Homo- und Heterodimere disulfidgebundener A- und B- Polypeptidketten. Sowohl die A- als auch die B- Ketten werden als Vorläufermoleküle synthetisiert, die daraufhin einer proteolytischen Reifung unterzogen werden. Humane Thrombozyten und Zellkulturlinien, die sowohl A- als auch B- Ketten exprimieren können, beinhalten alle drei möglichen PDGF-Isoformen. Dies lässt darauf schließen, dass der Zusammenbau von PDGF zu Dimeren ein zufälliger Prozeß ist (Hart *et. al.*, 1990). Außerdem produzieren Zellen, die mit A und B- Ketten transfiziert wurden, alle drei Dimer-Isoformen (Östman *et. al.*, 1998). Die meisten Zelltypen synthetisieren sowohl A- als auch B- Ketten, aber die Expression der beiden Ketten ist auf Transkriptionsebene und posttranslational unabhängig voneinander reguliert (Dirks & Bloemers, 1996).

Kürzlich wurden zwei zusätzliche PDGF-Gene identifiziert, die für PDGF-C und PDGF-D Polypeptide kodieren (Bergsten *et. al.*, 2001; LaRochelle *et. al.*, 2001; Li *et. al.*, 2000).

Die PDGF-Isoformen binden und aktivieren zwei strukturell ähnliche Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren (PDGF- α und PDGF- β Rezeptor). Da der Ligand PDGF als Dimer vorliegt, kann er zwei Rezeptoren gleichzeitig binden und diese dadurch dimerisieren. Dies führt zu einer Autophosphorylierung der Rezeptoren an Tyrosinresten. Diese Autophosphorylierung verschiedener Tyrosine verfolgt zwei wichtige Ziele: zum ersten kommt es dadurch zu einem Anstieg in der katalytischen Aktivität der Rezeptortyrosinkinasen, zum zweiten werden durch die Phosphorylierung Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle mit SH2-Domänen geschaffen.

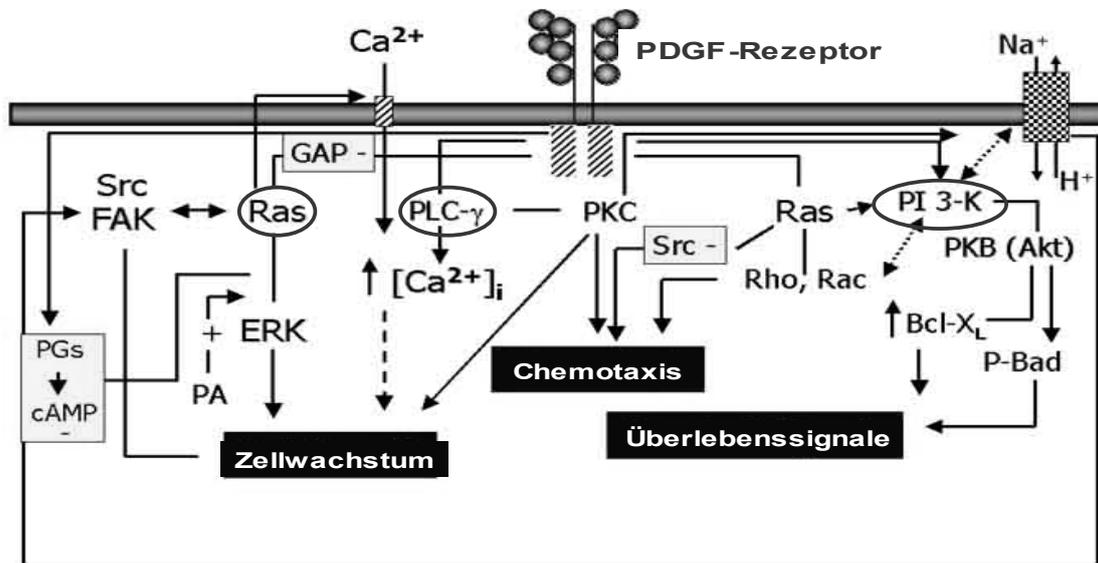
Beide Rezeptoren aktivieren die Hauptsignaltransduktionskaskaden, darunter Ras-mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (PI3K) und Phospholipase C γ (Heldin & Westmark 1998; Rosenkranz, Kazlauskas, 1999).

Die Aktivierung von PDGF-Rezeptoren führt zu einer Stimulierung des Zellwachstums, aber auch zu Veränderungen in Zellform und -motilität. Je nach aktiviertem Rezeptortyp kann die Antwort der Zelle unterschiedlich ausfallen: eine Aktivierung von PDGF- α Rezeptoren hemmt die Chemotaxis von Fibroblasten und glatten Muskelzellen; die Aktivierung des PDGF- β Rezeptors dagegen stimuliert Chemotaxis. PDGF wirkt auch antiapoptotisch. Klassischerweise exprimieren Fibroblasten und glatte Muskelzellen höhere Mengen an PDGF- β Rezeptoren. Die Synthese von PDGF ist infolge externer Stimuli oft erhöht, zum Beispiel bei niedriger Sauerstoffspannung (Kourembanas *et. al.*, 1997), unter Einfluß von Thrombin (Harlan *et. al.*, 1986) oder nach Stimulation durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (zusammengefasst von Heldin & Westmark, 1999).

In vivo besitzt PDGF wichtige Aufgaben während der Embryonalentwicklung. PDGF ist für die Entwicklung von Nieren, Blutgefäßen, Lungen und ZNS unabdingbar, was durch die Tatsache unterstützt wird, dass Mäuse, bei denen die Gene für PDGF oder seine Rezeptoren ausgeschaltet sind, entweder intrauterin oder perinatal sterben (Boström *et. al.*, 1996; Levéen *et. al.*, 1994; Soriano 1994; Soriano 1997).

PDGF ist auch bei der Wundheilung wichtig. Hier stimuliert es die Mitogenität und Chemotaxis von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen.

Abbildung 2: Signaltransduktion von PDGF



PDGF bindet an einen Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Die Rezeptordimerisierung führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors mit Schaffung hochaffiner Bindungsstellen für Signalproteine mit SH2 Domänen. Die folgenden Signaltransduktionskaskaden sind in verschiedener Weise an der Regulierung der biologischen Aktivitäten von PDGF beteiligt, darunter Chemotaxis, Zellwachstum und anti-apoptotische Wirkung. Beide Rezeptortypen aktivieren wichtige Signaltransduktionswege, darunter Ras/ MAPK, PI3K und Phospholipase C γ (eingekreist). Diese Signaltransduktionswege sind im einzelnen zusammengefasst von Heldin und Westermark, 1999.

Eine Überaktivität von PDGF ist mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang gebracht worden. Bei Glioblastomen, Sarkomen und verschiedenen epithelialen Tumoren verursacht PDGF oft eine autokrine oder parakrine Stimulierung des Tumorzellwachstums (Fleming *et. al.* 1992; Kawai *et. al.* 1997, Wang *et. al.* 1994). Eine überschießende Produktion von PDGF findet sich auch bei verschiedenen fibrotischen Zuständen, darunter Lungenfibrose, Nierenfibrose, Leberzirrhose und Myelofibrose. PDGF wird auch mit der Pathogenese nichtmaligner proliferativer Gefäßerkrankungen, wie Atherosklerose, in Verbindung gebracht (zusammengefasst von Heldin & Westermark, 1999).

1.8 PDGF in pulmonaler Hypertonie

Kürzlich wurde in einem Schafmodell der persistierenden pulmonalen Hypertonie des Neugeborenen gezeigt, dass sowohl PDGF- α als auch PDGF- β Rezeptoren bei PH erhöht sind. Eine Behandlung der Tiere mit Aptameren gegen PDGF-B brachte positive therapeutische Effekte (Balasubramaniam *et. al.*, 2003). In Lungenbiopsien von Patienten mit schwerer PAH ist die mRNA-Expression von PDGF-A signifikant erhöht (Humbert *et. al.*, 1998).

Jankov *et. al.* konnten vor kurzem zeigen, dass die Expression von PDGF- α und - β Rezeptor in Arterien neugeborener pulmonalhypertensiver Ratten stark erhöht ist. Sie konnten außerdem deutlich machen, dass PDGFR- β mit glattmuskulärem Alpha-Aktin in glatten Gefäßmuskelzellen kolokalisiert zu finden ist (Jankov *et. al.* 2005).

Eine signifikante Erhöhung des mRNA Levels von PDGF- β Rezeptor wurde außerdem in Pulmonalarterien MCT-behandelter Ratten beschrieben (Tanabe *et. al.*, 2000), wo die Arterien durch den erhöhten pulmonalarteriellen Druck mit einer zug-induzierten Überexpression von PDGF- β Rezeptor reagierten.

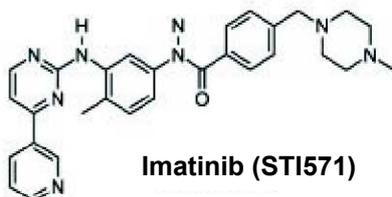
1.9 Der Tyrosinkinasehemmstoff Imatinib

Imatinib (Glivec®, STI 571, Imatinib-Mesilat) ist ein Protein-Tyrosinkinasehemmer der 2-Phenylaminopyrimidinklasse, der zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und zur Behandlung nichtresezierbarer gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) klinisch zugelassen ist (Cohen *et. al.* 2002).

Die chronisch myeloische Leukämie ist charakterisiert durch die Anwesenheit eines abnormal kurzen Chromosoms 22 (sogenanntes Philadelphia-Chromosom), welches aus einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen von Chromosom 9 und 22 hervorgeht. Das Philadelphia-Chromosom verbindet das Bcr (breakpoint cluster region) von Chromosom 22 mit dem Abl-Protoonkogen von Chromosom 9. Das normale Abl-Genprodukt ist eine reguliert exprimierte Tyrosinkinase, die an Zellteilung und Apoptose beteiligt ist. Das Produkt, das aus der Fusion von Bcr mit

Abl hervorgeht, ist dagegen eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, und ihr Vorkommen scheint auszureichen, um Leukämie in Tiermodellen und im Menschen zu induzieren.

Abbildung 3: Strukturformel von Imatinib



Bei Imatinib handelt es sich chemisch um einen Protein-Tyrosinkinasehemmer der 2-Phenylaminopyrimidinklasse. Die Substanz ist sehr gut wasserlöslich und besitzt eine hohe orale Bioverfügbarkeit (*aus: Capdeville, Buchdunger et. al., 2002*).

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

Darüber hinaus ist es ein wirksamer Inhibitor der Rezeptortyrosinkinasen von Platelet derived growth factor und c-kit (Stammzellefaktor-Rezeptor) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zelluläres Profil von Imatinib

Assay	IC ₅₀ (µM)
Inhibierung der Autophosphorylierung	
Bcr-Abl	0.25
PDGF-Rezeptor	0.1
c-Kit	0.15
EGF-Rezeptor	>100
Insulin-Rezeptor	>100
IGF1-Rezeptor	>100
Inhibierung der MAPK-Aktivierung	
PDGF-abhängig	0.1-1
SCF-abhängig	0.1-1

Hemmung der Autophosphorylierung bzw. der Signaltransduktion über MAPKinase durch Imatinib bei verschiedenen (Rezeptor)tyrosinkinasen in Zellkultur. Angegeben ist jeweils die IC₅₀, das heißt, die Konzentration in µM, die zu einer 50% Hemmung führt. Man kann erkennen, dass nur die Tyrosinkinasen für PDGF, Bcr-Abl und c-Kit selektiv in niedrigen Konzentrationen gehemmt werden. Imatinib ist somit ein spezifischer Hemmstoff dieser drei Tyrosinkinasen (*modifiziert aus: Capdeville, Buchdunger et. al., 2002*).

Imatinib blockt gezielt die ATP-Bindungstasche dieser Tyrosinkinase. Dadurch verhindert es die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase an Tyrosinresten, und der Rezeptor kann auch nach Bindung des Liganden nicht mehr aktiv werden. Die Kristallstruktur von Imatinib ist bekannt, außerdem existieren kristallographische Studien, die die Bindung von Imatinib an verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren charakterisieren (Schindler *et. al.*, 2000).

Nach oraler Aufnahme zeigt Imatinib eine Bioverfügbarkeit von 98%; die höchsten Plasmakonzentrationen werden nach 2-4 h erreicht. In klinisch relevanten Dosen besitzt Imatinib eine Plasmaproteinbindung von etwa 95% und ist vor allem an Albumin und α_1 -saures Glykoprotein gebunden. Die Halbwertszeiten von Imatinib und seinem Hauptmetaboliten, CGP74588, sind 18 und 40 Stunden. Die Metabolisierung von Imatinib geschieht vorwiegend über die Leber. Das Hauptenzym zur Verstoffwechslung stellt dabei Cytochrom P-3A4 dar.

Die Nebenwirkungen unter Therapie mit Imatinib sind dosisabhängig und in den meisten Fällen leicht bis moderat. Häufig kommt es zu Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, peripheren Ödemen, Muskelkrämpfen, erhöhter Blutungsneigung und Hautrötungen. Gelegentlich werden Zytopenien (Neutro- oder Thrombopenien) oder schwere Flüssigkeitsretentionen festgestellt. Sehr selten kommt es zu akuten toxischen Leberschädigungen.

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

Imatinib wurde bisher mit Erfolg experimentell bei einigen Krankheiten angewendet, bei denen die Überexpression von PDGF und abnorme Zellproliferation eine Rolle spielen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Experimenteller Einsatz von Imatinib bei (fibro-)proliferativen Erkrankungen

Autor/ Jahr	Erkrankung	Tierart
Gilbert 2001	mesangial-proliferative Glomerulonephritis	Ratte
Kinnman 2001	Proliferation von Kupfferschen Sternzellen nach Cholestase	Ratte
Savikko 2003	chronische Nierentransplantatabstoßung	Ratte
Daniels 2004	Bleomycin-induzierte Lungenfibrose TGF-β induzierte Lungenfibrose	Maus
Abdollahi 2005	strahleninduzierte Lungenfibrose	Maus
Aono 2005	Bleomycin-induzierte Lungenfibrose	Maus

Imatinib wurde bisher erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen proliferativer oder fibroproliferativer Erkrankungen angewendet. Besonders interessant ist der therapeutische Einsatz in drei verschiedenen experimentellen Modellen der Lungenfibrose.

1.10 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die therapeutische Wirkung des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI571, Glivec®) auf die verschiedenen pathophysiologischen und pathohistologischen Aspekte der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte untersucht werden.

Imatinib ist ein zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie klinisch zugelassenes Medikament, das selektiv die drei Tyrosinkinasen Bcr-Abl, c-kit und PDGF-Rezeptor hemmt. In dieser Dissertation sollte experimentell der therapeutische Einfluß von Imatinib auf das PDGF-System untersucht werden.

Dazu sollte unter anderem eine neuartige wenig invasive Operationsmethode zum Einbau telemetrischer Sensoren in den rechten Ventrikel von Ratten entwickelt werden.

Weiterhin sollten eine Technik der halbautomatischen morphometrischen Analyse von Lungengefäßen der Ratte sowie der dazu benötigten histologischen und immunhistologischen Färbeprotokolle etabliert werden.

Es sollte außerdem die Expression von PDGF-B (Ligand) und PDGF- β Rezeptor immunhistochemisch in Lungen Monocrotalin-behandelter Ratten sowie in Lungenschnitten von Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie dargestellt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

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

Das Gewicht der Ratten betrug bei Anlieferung 300-350 g, was einem Alter von etwa 8 Wochen entspricht. Vor Applikation von Substanzen (Monocrotalin, Imatinib, Narkose) wurde das genaue Gewicht der Tiere bestimmt und die Substanzen wurden exakt nach Gewicht verabreicht.

Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen für die Dauer der Versuche gehalten. Dabei befanden sich immer 4 - 5 Ratten in einem Käfig. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit Altromin[®] Standarddiätfutter *ad libitum*. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin beträgt 12 Stunden pro Tag; die Umgebungstemperatur beträgt im Mittel 25°C.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Der für die Versuche geltende Tierversuchsantrag „Imatinib in pulmonaler Hypertonie“ kann unter dem Aktenzeichen GI 20/ 12 Nr. 34/ 2004, Kenn- Nr. 211, eingesehen werden.

2.1.3 Injektionslösungen und Substanzen

Natronlauge 1N (1mol/l)		Merck Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1N (1mol/l)		Merck Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Forene®	Abbott Wiesbach, Deutschland
Atropinsulfat 0,5 mg/ml		Braun Melsungen, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml	Domitor®	Pfizer Karlsruhe, Deutschland
Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml	Antisedan®	Pfizer Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Liquemin N 25000®	Roche Basel, Schweiz
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin®	Pharmacia Erlangen, Deutschland
Hydroxyethylstärke	HAES®	Fresenius Kabi Bad Homburg, Deutschland
Lidocainhydrochlorid 2%	Xylocain®	Astra Zeneca Wedel, Deutschland
Monocrotalin	Crotaline®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
physiologische Kochsalzsösung	zum Spülen und Befeuchten	Baxter S.A. München, Deutschland
Beatmungsgas	50% O ₂ , 50% N ₂	Air Liquid (ehem. Messer) Siegen, Deutschland
Enrofloxacin orale Lösung für Kälber	Baytril 2,5%®	Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Einmalspritze 1 ml, 2 ml	Inject Luer®	Braun Melsungen, Deutschland
Kanüle 26 G (0,9 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Venenverweilkanüle 22 G und 20 G	Vasocan Braunüle®	Braun Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer 5 x 4 cm	Purzellin®	Lohmann und Rauscher Rengsdorf, Deutschland
Einmalhandschuhe	Transaflex®	Ansell Surbiton Surrey, UK
Mulltupfer 20 x 20 cm, pflaumengroß		Beese Barbüttel, Deutschland
Perfusor-Leitung 150 cm		Braun Melsungen, Deutschland
Combi-Stopper		Braun Melsungen, Deutschland

Dreivegehahn	Discofix [®]	Braun Melsungen, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland
Haushaltsbindfaden Nr. 12		
Zellulose-Unterlage		
Operationsbesteck		Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland
Ratten-Immobilisator	Broome Rodent Restrainer [®]	Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Wärmeunterlage	Thermo-Lux [®]	Witte und Suttor Murrhardt, Deutschland
Trachealtubus	aus BD Microlance 3 15G gekürzt auf 1,5 cm	Becton Dickinson Deutschland

2.1.5 Geräte/ Maschinen für Tierpräparation

Beatmungspumpe	SAR-830/P Ventilator [®]	IITH Inc. Life Science Woodland Hills, CA, USA
PET-Schläuche mit unterschiedlichen Durchmessern		
Blutanalysegerät ABL 330		Radiometer Copenhagen, Dänemark
Blutanalysegerät OSM2	Hemoximeter [®]	Radiometer Copenhagen, Dänemark
Schleuse Einführungsbesteck mit venös hämostatischem Ventil 5F	Intradyn [®]	Braun Melsungen, Deutschland
Computer mit Monitor		
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial Blood Pressure Measurement	Braun Melsungen, Deutschland

2.1.6 Histologie

Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Urinbecher mit Deckel, 100ml		
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objekträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Ethanol 70%, 95%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol (99,8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Formaldehyd säurefrei $\geq 37\%$		Roth Karlsruhe, Deutschland
Resorcin Fuchsin		Chroma Münster, Deutschland
Kernechtrot Aluminiumsulfat		Chroma Münster, Deutschland
Roti-Histol (Xylolersatz)		Roth Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Roth Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Deckgläser 24x36mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Universal-Einbettkassetten mit Deckel, verschiedenfarbig		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus [®]	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Mikrotomklingen S 35		Feather, Japan (über Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland)
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus [®]	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Eindeckmedium Xylol-löslich	Pertex [®]	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Natriumchlorid pro analysi		Roth Karlsruhe, Deutschland
Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Digest All 2 [®]	Zyomed Berlin, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector/ Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland

Normal Horse Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Normal Goat Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Normal Rabbit Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kits anti-mouse anti-rabbit anti-goat		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

2.1.7 Antikörper

Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:1000	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1:1000	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Anti-PDGF- β Rezeptor monoklonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:40	R&D Systems Wiesbaden, Deutschland
Anti-PDGF- β Rezeptor (Ab-1) polyklonal, rabbit anti-rat/ mouse	Verdünnung 1:20	Calbiochem Merck Über VWR International Darmstadt, Deutschland
anti-PDGF B chain (Ab-1) polyklonal, rabbit anti-human/ rat	Verdünnung 1:20	Calbiochem Merck Über VWR International Darmstadt, Deutschland

2.1.8 Geräte/ Software/ Makros für Gefäßmorphometrie

Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro -für Muskularisierungsgrad -für Wandstärke		speziell entwickelt von Informatiker Herrn Christoph Frank, Leica Microsystems

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung und Injektion von Monocrotalin

250 mg kristallines Monocrotalin wurden auf der Analysenwaage genau abgewogen, in 3 ml 1 N HCl gelöst und mit 2 ml 1 N NaOH auf einen pH von 7,3 - 7,4 gebracht. Die Ratten wurden einzeln gewogen, in einem Gefäß mit einem Wattebausch mit Isofluran bis zur Immobilisation anbetäubt und erhielten eine einmalige subkutane Injektion von 60 mg/kg Monocrotalin in die Nackenfalte. Gesunde Kontrolltiere erhielten statt Monocrotalin ein gleiches Volumen isotoner Kochsalzlösung als s.c. Injektion.

Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere in einen Käfig mit frischer Einstreu, Futter und Wasser überführt; benutzte Einstreu und Nahrung wurden zur Unschädlichmachung (Verbrennung) gesammelt. Die Tiere erhielten über die nächsten 14 Tage kontinuierlich Baytril oral 2,5% in einer Konzentration von 2 ml/ 500 ml Leitungswasser. Durch die Antibiose sollten frühe inflammatorische und pneumonische Lungenveränderungen sowie opportunistische Begleitinfektionen in den mit Monocrotalin behandelten Ratten vermieden werden.

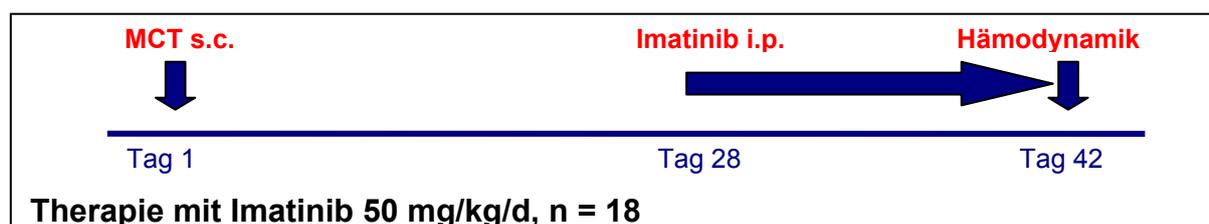
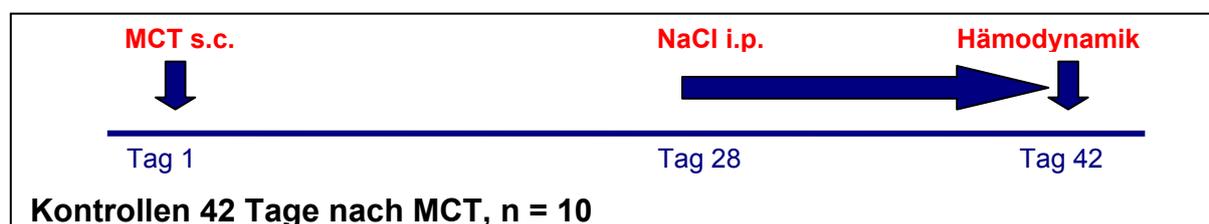
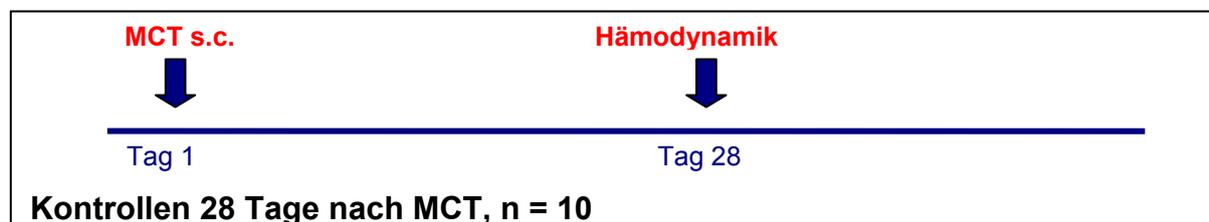
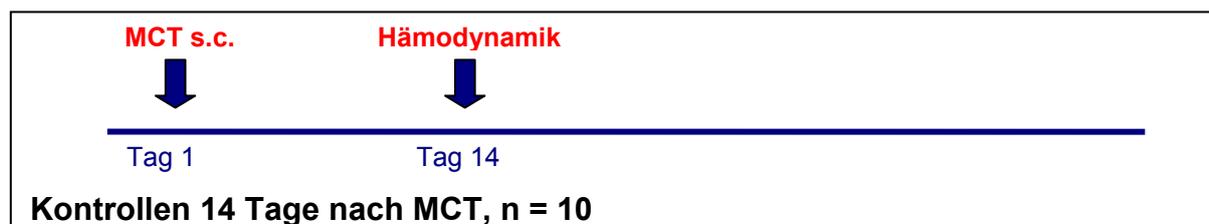
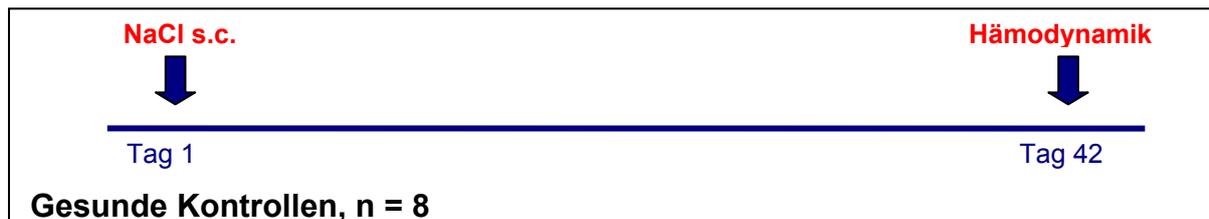
2.2.2 Vorbereitung und Injektion von Imatinib

Imatinib wurde als kristalline Reinsubstanz von Novartis Pharma (freundliche Gabe von Frau Dr. Elisabeth Buchdunger, Novartis Horsham Research Center, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 50 mg Imatinib in 1 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die Lösung wurde täglich frisch bereitet. Die Ratten erhielten über 14 Tage lang eine einmalige tägliche Injektion von 50 mg/kg Imatinib-Lösung intraperitoneal.

Das entsprach je nach Gewicht der Ratten einem Injektionsvolumen von 300 - 500 µl. Die Kontrollgruppen erhielten eine tägliche Injektion des gleichen Volumens steriler isotoner Kochsalzlösung.

2.2.3 Aufteilung der Tiergruppen

Die Versuchsanordnung bestand aus fünf verschiedenen Tiergruppen: gesunde Kontrollen, Kontrollen 14 Tage nach Monocrotalin, Kontrollen 28 Tage nach Monocrotalin, Kontrollen 42 Tage nach Monocrotalin und Therapiegruppe mit Imatinib 50 mg/kg/Tag (siehe nachfolgende Aufstellung).



2.2.4 Hämodynamische Messungen am Ganztier

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

2.2.4.1 Narkose

Die Ratten wurden in einem Kleintier-Restrainer fixiert. Sie erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Ketamin und 100 µg/kg Medetomidin in einer Mischspritze. Nach Bewußtseinsverlust wurden die Ratten auf einer vorgewärmten Heizplatte (40°C) in Rückenlage verbracht. Sie erhielten danach eine intramuskuläre Injektion von Atropinsulfat (250 µg/kg) in den *M. gluteus sinister*, um vasovagale Effekte während der Manipulationen im Halsbereich zu minimieren. Weiterhin wurden den Ratten 2 ml isotoner Kochsalzlösung, verteilt auf zwei subkutane Depots in den Inguinalfalten, verabreicht.

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

2.2.4.2 Tracheotomie

Zur Erleichterung der Präparation des ventralen Halsbereichs wurden 400 µl Xylocain s.c. injiziert, um eine Quaddel zu bilden. Das Fell der Tiere wurde zuvor mit Braunol-Lösung befeuchtet, um eine Verunreinigung des Operationsfeldes durch Haare zu vermeiden. Im Bereich der Quaddel wurde ein etwa 1 x 1 cm großes Hautstück per Scherenschlag entfernt. Durch vorsichtiges stumpfes Präparieren von Binde- und Muskelgewebe wurde die Trachea dargestellt und mittels Unterführung einer stumpfen Pinzette vorgelagert. Nach Einschalten der Beatmungspumpe wurde

die Trachea zwischen zwei Knorpelspangen inzisiert und der Beatmungstubus eingeführt. Durch eine Ligatur mit Bindfaden wurde der Tubus in seiner Lage vor der Bifurkation fixiert.

2.2.4.3 Beatmung

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

2.2.4.4 Präparation der rechten *V. jugularis*

Die rechte *V. jugularis* wurde etwa 1 cm vor dem Brusteingang isoliert, von anhängendem Bindegewebe befreit und mittels zweier unterlegter Bindfäden dargestellt. Der craniale Bindfaden wurde zugezogen und über den Kopf der Ratte hinweg mit einem Klebestreifen unter Spannung fixiert, um die Vene zu strecken und die Präparation zu erleichtern. Es erfolgte eine vorsichtige Inzision der *V. jugularis* zwischen den beiden Bindfäden. Mit Hilfe einer spitzen gewinkelten Pinzette wurde die Inzision erfasst und offen gehalten. Über einen in caudaler Richtung eingebrachten flexiblen Führungsdraht wurden Mandrin und Schleuse in die Vene eingeführt. Nach Entfernung des Führungsdrahts und Zuziehen des caudalen Bindfadens wurde die Schleuse in ihrer Lage fixiert, der Mandrin herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen durch Aspiration entfernt.

2.2.4.5 Präparation der linken *A. carotis*

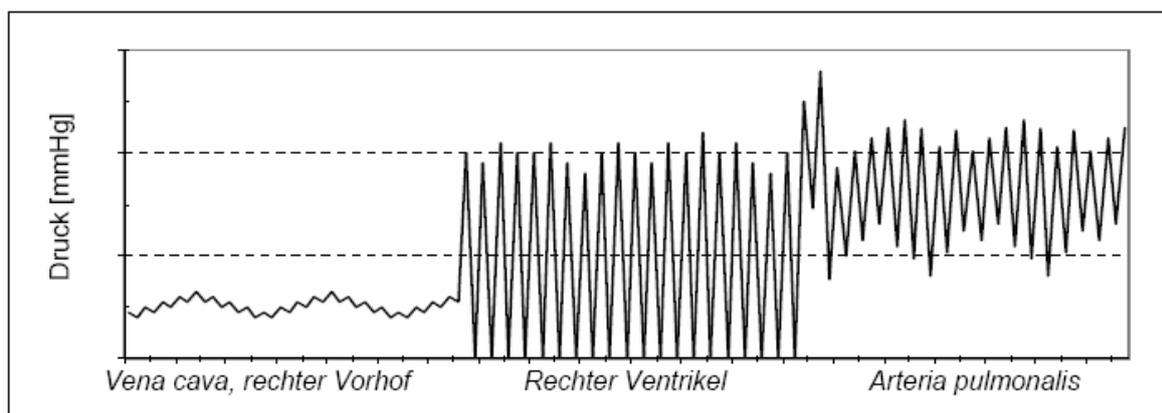
Die linke *A. carotis* wurde durch Auseinanderziehen der sie bedeckenden Muskelschichten dargestellt, mittels einer stumpfen Pinzette vorgelagert und benachbarte Anteile des *N. vagus* vorsichtig zur Seite gezogen. Es erfolgte wie bei der Präparation der *V. jugularis* ein Unterlegen mit zwei Bindfäden und Ligatur sowie Spannung des cranialen Bindfadens. Die *A. carotis* wurde vor dem Brusteingang mit einem Arterienclip abgeklemmt und inzisiert. Dann wurde eine 22 G Braunüle (Nadel

entfernt), verbunden mit einem Dreiwegehahn, mit Hilfe eines flexiblen Führungsdrahts in die *A. carotis* eingeführt und bis zu dem Gefäßclip vorgeschoben. Die Braunüle wurde mittels des caudalen Bindfadens in der Arterie fixiert, der Führungsdraht herausgezogen, der Dreiwegehahn geschlossen und der Arterienclip entfernt. Daraufhin konnte die Braunüle vollständig in das Gefäß eingeführt werden.

2.2.4.6 Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes

Arterieller und venöser Zugang wurden jeweils mit 200 μ l eines Heparin-NaCl-Gemisches (Verdünnung 1:20) gespült und der arterielle Druckabnehmer luftblasenfrei angeschlossen. Durch das Rückschlagventil der venösen Schleuse wurde ein Rechtsherzkatheter, verbunden mit dem venösen Druckabnehmer, eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die kontinuierliche Druckaufzeichnung während des Vorschiebens erleichterte dabei die Kontrolle über die Position des Katheters: bei Lage innerhalb der *V. cava* bzw. des rechten Vorhofes imponiert eine typische dreigipfelige und atemverschiebliche Druckkurve. Sobald die Katheterspitze die Tricuspidalklappe überschritten hat, erscheint die pulsatile Druckkurve des rechten Ventrikels mit systolischen Spitzenwerten von 20-25 mmHg bei gesunden Ratten (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Druckkurve bei unterschiedlicher Lage des Katheters:



Die gemessenen Drücke VP, SAP und CVP/RVP wurden als analoge Signale durch die flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert, verstärkt, mit einer Wandlerkarte im PC in digitale Signale umgewandelt und durch das Programm Labtech Pro® aufgezeichnet. Nach Kalibrierung der auf Herzhöhe angebrachten Druckabnehmer

gegen den Luftdruck wurden die Werte, sobald der Rechtsherzkatheter stabil im rechten Ventrikel eingebracht war, nach Neustart des Programmes für 10 bis 20 Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und dann abgespeichert.

2.2.5 Blutproben

Nach Messung der hämodynamischen Druckwerte wurden jeweils 400 µl arterielles (*A. carotis*) und gemischtvenöses (rechter Ventrikel) Blut entnommen. Die Blutproben wurden luftfrei verschlossen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Zeitdauer von der Entnahme bis zur Messung betrug etwa 30 Minuten. Die arteriellen und venösen Blutparameter pO_2 , pCO_2 und pH wurden mit einem ABL 330 gemessen; Hämoglobin und O_2 -Sättigung wurden mit einem OSM 2 Hemoximeter gemessen.

2.2.6 Berechnung des Herzzeitvolumens

Das Herzzeitvolumen wurde anhand des Fick'schen Prinzips berechnet. Dazu müssen arterielle Sauerstoffsättigung (C_{aO_2}), venöse Sauerstoffsättigung (C_{vO_2}) und die O_2 -Aufnahme ermittelt werden. Mit der Formel für das Fick'sche Prinzip lässt sich das Herzzeitvolumen dann aus Sauerstoffaufnahme und arteriovenöser Sauerstoffkonzentrationsdifferenz (C_a-C_v) O_2 berechnen (Schmidt & Thews 1995):

$$\text{HZV} = \text{Sauerstoffaufnahme } (V_{O_2}) / (\text{arterielle } O_2\text{-Sättigung} - \text{venöse } O_2\text{-Sättigung})$$

2.2.7 Entnahme der Lunge

Nach Befeuchtung von Thorax und cranialem Abdomen mit Braunol® wurde ein medianer Hautschnitt vom Präparationsgebiet bis zur *Regio xiphoidea* gesetzt. Nach Präparation der Haut wurde der *Processus xiphoideus* mit einer Klemme erfasst und das Abdomen im epigastrischen Winkel eröffnet. Anschließend wurde die Thoraxhöhle durch Herunterziehen des Diaphragmas dargestellt und das Sternum bis zur *Apertura thoracis cranialis* in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und mit Darmklemmen seitlich fixiert. Ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Schlauch wurde in eine Inzision der *A. pulmonalis*

eingeführt. In den linken Ventrikel wurde eine kleine Öffnung zum Abfluß der Spüllösung geschnitten. Die Lunge wurde über die *A. pulmonalis* mit isotoner Kochsalzlösung mit einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Anschließend wurde die Trachea zu einem Zeitpunkt der maximalen Inspiration mit einer Klemme verschlossen und die Beatmung ausgeschaltet. Der rechte Lungenflügel wurde am Hilus mit einem Bindfaden ligiert, entnommen, zur weiteren Verwendung für molekularbiologische Analysen schockgefrostet und bei -80°C eingefroren. Die linke Lungenhälfte wurde zur Perfusionsfixierung über die *A. pulmonalis* 5 Minuten lang bei einem Druck von 22 cm Wassersäule mit Zamboni's Fixativ (Zamboni *et. al.* 1967, s. Seite 30) gespült, in ein Gefäß mit Zamboni's Fixativ überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurde die fixierte Lungenhälfte in 0,1 M PBS verbracht und so bis zur weiteren Verwendung in der Histologie bei 4°C gelagert.

2.2.8 Präparation des Herzens

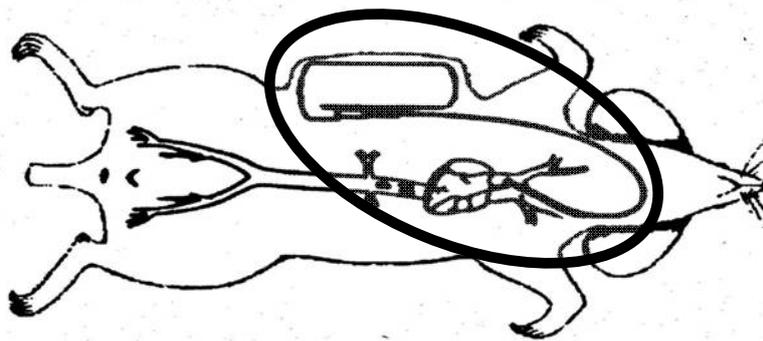
Das Herz wurde aus dem Tierkörper entnommen, die Atrien und Herzklappen abgeschnitten und der rechte Ventrikel exakt am Septum entlang von linkem Ventrikel und Septum getrennt. Rechter Ventrikel sowie linker Ventrikel mit Septum wurden 2 Wochen lang bei Raumtemperatur getrocknet, um das Trockengewicht beider Herzhälften zu bestimmen. Als Index der Rechtsherzhypertrophie wurde die Ratio der Gewichte rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum bestimmt.

2.2.9 Telemetrie

Der rechtsventrikuläre Druck von 3 Ratten wurde mit Hilfe eines implantierbaren Radiotelemetriesystems (Dataquest A.R.T.2.1; Data Sciences Inc.) bestimmt. Damit können Drücke über mehrere Monate kontinuierlich aufgezeichnet werden. Hierzu wurden gesunde Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 300 - 350 g narkotisiert wie oben beschrieben. Die Tiere wurden auf eine Platte gelegt, die die Signale des Transmitters auffängt, digital umwandelt und an ein computergesteuertes Visualisierungssystem überträgt. Die rechte *V. jugularis* wurde freipräpariert, cranial ligiert, inzisiert und ein spezieller flüssigkeitsgefüllter Katheter mit

heparinbeschichteter Spitze, der mit einem Transmitter (Modell TA 11PA) verbunden war, durch die Inzision bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Der Katheter wurde, nachdem die korrekte Lage im rechten Ventrikel durch die typischen pulsatile Drucksignale des rechten Ventrikels auf dem Monitor kenntlich gemacht worden war, sorgfältig in die Vene eingebunden und die Schlaufe des Katheters sowie der verbundene Transmitter subkutan im dorsolateralen Halsbereich festgenäht. Nach der Naht des Hautschnitts wurden die Tiere in Einzelkäfige überführt und bis zur völligen Erholung mit Infrarotlicht warm gehalten und engmaschig überwacht.

Abbildung 5: Schematische Darstellung des telemetrischen Sensors *in vivo*



Lage des Transmitters *in situ* (eingekreist) im seitlichen subkutanen Halsbereich; der flüssigkeitsgefüllte Katheter wurde über die rechte *V. jugularis* in die rechte Herzkammer vorgeschoben und in dieser Lage in der *V. jugularis* eingebunden.

Der rechtsventrikuläre Druck wurde über die folgenden 44 Tage kontinuierlich aufgezeichnet und täglich morgens und abends je eine repräsentative Aufzeichnung von 5 Minuten zur Auswertung herangezogen. Zwei Tage nach Implantation der telemetrischen Sensoren erhielten die Ratten, wie zuvor beschrieben, eine einmalige subkutane Injektion von Monocrotalin.

2.2.10 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

2.2.10.1 Einbettung des Gewebes und konventionelle Histologie

Die in PBS gelagerten Lungenhälften wurden parallel zur *Facies diaphragmatica* mit einem Trimmmesser in jeweils drei 3 – 5 mm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettkassetten überführt. Die Gewebestücke wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP 1050, Leica) entwässert. Danach wurden sie in Paraffin eingegossen. Das humane Lungengewebe wurde freundlicherweise von Dr. Walter Klepetko, Herz-Thoraxchirurgie der Universität Wien, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um in 4% igem Paraformaldehyd fixiertes Material zweier gesunder Spender sowie zweier Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie (IPAH), die einer Lungentransplantation unterzogen wurden. Es wurde jeweils eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten bzw. ihrer nächsten Verwandten eingeholt.

2.2.10.1.1 Zamboni's Fixativ

2% iges Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 15% Pikrinsäure; pH 7,3 - 7,4 (Zamboni *et. al.* 1967)

2.2.10.1.2 Elastica-Kernechtrot-Färbung

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

2.2.10.2 Immunhistochemische Färbemethoden

2.2.10.2.1 Histopuffer zur Verdünnung der Antikörper

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

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

Zwischen den einzelnen Schritten wurde (außer nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit Serum) jeweils 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dies gilt auch für alle weiteren angeführten immunhistochemischen Färbungen.

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

2.2.10.2.3 Immunhistochemie (2): Anti- PDGF-B Kette (Ratte)

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte</i>
Demaskierung der Antigene mit Digest All® Trypsin 1:3
Normal Goat Serum 1:2 mit Histopuffer verdünnt
anti-Platelet Derived Growth Factor (Ab-1) (anti-PDGF-B)
Verdünnung 1:20
Inkubation über Nacht bei +4°C
sekundärer Antikörper: goat anti-rabbit Vectastain®
Substrat: Vector VIP® (violett)
Gegenfärbung mit Methylgrün
<i>Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium</i>

2.2.10.2.4 Immunhistochemie (3): Anti- PDGF- β Rezeptor (human)

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte</i>
Normal Horse Serum 1:2 mit Histopuffer verdünnt
anti-PDGF-β Rezeptor Clone PR 7212
Verdünnung 1:40
Inkubation 1 h bei Raumtemperatur
sekundärer Antikörper: goat anti-rabbit Vectastain®
Substrat: Vector DAB® (braun)
Gegenfärbung mit Methylgrün
<i>Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium</i>

2.2.10.2.5 Immunhistochemie (4): Anti- PDGF- β Rezeptor (Ratte)

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte</i>
Normal Goat Serum 1:2 mit Histopuffer verdünnt
anti-PDGF-β Rezeptor (Ab-1)
Verdünnung 1:20
Inkubation 1 h bei Raumtemperatur
sekundärer Antikörper etc. siehe IHC Doppelfärbung
Substrat: Vector DAB® (braun)
Gegenfärbung mit Methylgrün
<i>Dehydrieren und Eindecken mit harzigem Medium</i>

2.2.11 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Zur morphometrischen Analyse der Lungengefäße wurde ein computergestütztes Analysesystem (Leica Q Win Standard Analyzing Software) mit von der Firma Leica speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros verwendet.

Die Beschriftung der Schnitte wurde abgeklebt. Die Schnitte wurden dann durchnummeriert und ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen analysiert.

2.2.11.1 Mittlere Wandstärke

Zur Bestimmung der mittleren Wandstärke wurden 5 μ m Paraffinschnitte mit Elastica-Kernechtrot gefärbt wie oben protokolliert.

Bei 400x, 200x und 100x Vergrößerung wurden pro Tier 80 - 100 intrapulmonale Gefäße ausgezählt. Die Gefäße wurden anhand des externen Gefäßdurchmessers in folgende Größenkategorien eingeteilt:

Kategorie 25 – 50 µm – ca. 40 Gefäße/ Tier

Kategorie 51 – 100 µm – ca. 30 - 40 Gefäße/ Tier

Kategorie >101 µm – ca. 10 - 20 Gefäße/ Tier

Die Mediadicke wurde definiert als der mittlere Abstand zwischen *Lamina elastica interna* und *Lamina elastica externa* (berechneter Mittelwert aus 3-5 Messungen pro Gefäß). Die mittlere Wandstärke wurde als Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers des Gefäßes angegeben. Dies wurde berechnet wie folgt:

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

Der externe Durchmesser des Gefäßes umfasste den Bereich innerhalb der *Lamina elastica externa*. Der Bereich der Adventitia konnte aus technischen Gründen nicht eingeschlossen werden. Der Lumenbereich bzw. der Innendurchmesser des Gefäßes umfasste den Bereich innerhalb des Endothels.

2.2.11.2 Muskularisierungsgrad

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

Bei 400 x Vergrößerung wurden pro Tier 100 kleine intrapulmonale Gefäße in einer Größenordnung von 25 bis 50 µm externem Gefäßdurchmesser untersucht und als voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert kategorisiert. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen, wurde der Anteil anti- alpha smooth muscle actin positiver (violetter) Gefäßwandbereiche ermittelt. Dies wurde halbautomatisch in einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung von der speziell von Leica angefertigten Software durchgeführt. Nichtmuskularisierte Gefäße

wurden in gleicher Art und Weise durch die (braune) endotheliale anti- von Willebrand Faktor-Färbung deutlich gemacht.

Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

- **nicht muskularisiert:** $\leq 4\%$ Anteil von smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **partiell muskularisiert:** $\leq 75\%$ Anteil von smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **voll muskularisiert:** $> 75\%$ Anteil von smooth muscle alpha actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia

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

2.2.12 Statistische Auswertung

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Die n-Zahl der jeweiligen Gruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, den vorausgehend im Kapitel „Aufteilung der Tiergruppen“ angegebenen Tierzahlen. Die einzelnen Werte waren normalverteilt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein *p*-Wert <0.05 wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenfassung der ermittelten Parameter

Überlebensrate unter Therapie mit STI 571 (Imatinib) im Vergleich zu placebo-behandelten Kontrollen

Nebenwirkungen unter Therapie mit STI 571 (Imatinib) im Vergleich zu placebo-behandelten Kontrollen

Hämodynamische Parameter

- Systemisch arterieller Druck
 - Telemetrisch gemessener rechtsventrikulärer Druck
 - Invasiv gemessener rechtsventrikulärer Druck
 - Herzzeitvolumen (Cardiac Index)
-

Strukturelle Parameter

- Gewichtsverhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/LV+S) als Maß für die Rechtsherzhypertrophie
 - Morphometrie der Pulmonalarterien
 - Muskularisierungsgrad (distale Pulmonalarterien)
 - Mittlere Wandstärke (3 Gefäßkategorien)
 - Lumenfläche der Pulmonalarterien
-

Histologische und immunhistochemische Darstellungen

- IHC für PDGF-B (Ligand) in Rattenlungen (periphere Arterien und Pulmonalarterie)
- IHC für PDGF- β (Rezeptor) in Ratten- und Humanlungen
- Repräsentative Fotos zu Muskularisierungsgrad und Wandstärke in gesunden, kranken und behandelten Ratten

3.2 Überlebensrate unter Behandlung mit STI 571 im Vergleich zu placebo- behandelten Tieren

In der mit steriler physiologischer Kochsalzlösung behandelten Monocrotalin-Gruppe (---○---) war die Überlebensrate am 42. Tag nach Injektion von Monocrotalin auf 50% reduziert (10 von 20 Tieren überlebten). In der mit STI 571 in einer Dosis von 50 mg/kg behandelten Gruppe (----●----) war die Überlebensrate nach 42 Tagen post MCT 100% (18 von 18 Ratten überlebten).

Die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Monocrotalin-Kontrolltiere entwickelten im Verlaufe der Erkrankung deutliche klinische Anzeichen allgemeinen Unwohlseins (Gewichtsverlust, gesträubtes Fell, verminderter Pflorgetrieb, Apathie, gekauerte Haltung) und pulmonaler Hypertonie (pumpende Atmung, gestreckter Kopf, Zyanose der Schleimhäute, Gesichtödeme). In 10 von 20 Ratten trat nach Dekompensation der Tod durch Rechtsherzversagen ein.

In der Sektion imponierten ein stark hypertrophes und dilatiertes rechtes Herz, eine Dilatation der Pulmonalarterie, eine hochgradige Stauung der *V. cava cranialis* und *V. jugularis*, in 3 von 10 Fällen ein mittel- bis hochgradiger klarer Thoraxerguß (transsudativ), in allen Fällen eine moderate bis schwere subakut-chronische Stauungsleber sowie häufig punktförmige (Asphyxie-) Blutungen auf dem Herzbeutel und der Pleura. In zwei Fällen fand sich außerdem ein mittelgradiger, klarer Erguss in der Bauchhöhle.

Weiterführende pathohistologische Untersuchungen wurden aufgrund der oftmals bereits fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen nicht durchgeführt. Waren diese nicht allzu stark ausgeprägt, wurde die Rechtsherzhypertrophie durch die Bestimmung der Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die mit Imatinib behandelten Ratten zeigten dagegen eine Überlebensrate von 100% und entwickelten deutlich geringere klinische Anzeichen einer Rechtsherz- und Lungenbelastung.

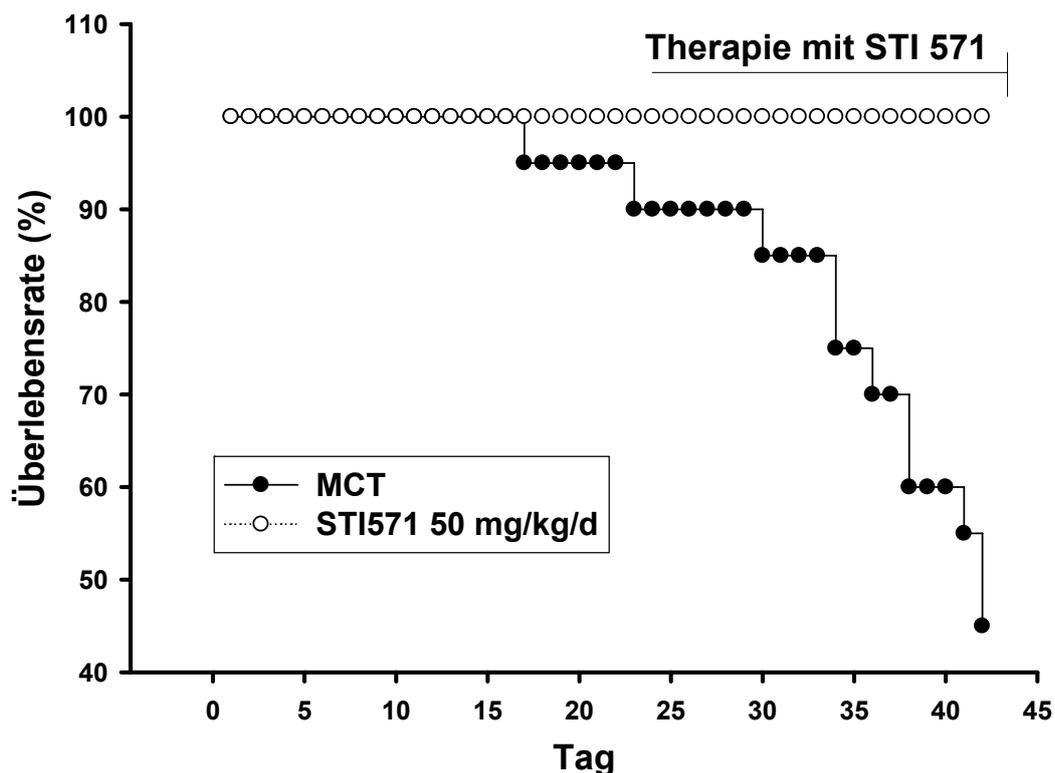


Abbildung 6: Darstellung der Überlebensrate von mit Imatinib (STI 571) in einer Dosis von 50 mg/kg/d behandelten pulmonalhypertensiven Ratten im Vergleich zu kranken mit Placebo (sterile isotonische Kochsalzlösung) behandelten Ratten. Die Therapie der Ratten fand vom Tag 28 bis Tag 42 nach MCT-Injektion (60 mg/kg s.c.) statt.

3.3 Nebenwirkungen unter Therapie mit Imatinib 50 mg/kg i.p.

In allen mit Imatinib 50 mg/kg i.p. (gelöst in steriler isotonischer Kochsalzlösung) behandelten Ratten trat eine moderate fokale serofibrinös-fibroplastische Peritonitis auf. In den mit isotonischer Kochsalzlösung i.p. behandelten Kontrolltieren wurde dies nicht beobachtet. Die Peritonitis ist somit auf eine direkte lokal reizende Wirkung des Medikamentes zurückzuführen, nicht auf die Injektion oder eine Verunreinigung der Kochsalzlösung. Es ist auch bekannt, dass Imatinib bei oraler Einnahme lokal reizenden und adstringierenden Einfluß auf die Magenschleimhaut ausübt (siehe Glivec® Fachinformation für Kliniker, Novartis Pharma).

Die fibrinös-fibroplastische Peritonitis ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass trotz Verbesserung der pulmonalen Hypertonie bei den therapierten Tieren keine

Gewichtszunahme, sondern lediglich eine Stagnation der Gewichtsabnahme unter Behandlung auftrat (Daten nicht gezeigt).

Eine leichte, vorübergehende Diarrhoe unter Imatinib-Therapie konnte bei 6 von 18 Ratten beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf die fokale Peritonitis zurückzuführen.

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

In einer Dosis von 100 mg/kg i.p. traten bei den beiden probeweise so behandelten Ratten am dritten bzw. vierten Tag nach Beginn der Therapie Erosionen an den mukokutanen Übergängen des Kopfes auf. Dies wies auf eine Überdosierung von Imatinib hin (Glivec® *Fachinformation für Kliniker*, Novartis Pharma).

Die Therapie mit einer Dosis von 100mg/kg i.p. wurde daraufhin abgebrochen.

3.4 Systemisch-arterieller Druck (SAP) in den einzelnen Gruppen

Der mittlere systemisch-arterielle Druck unterschied sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen und betrug im Mittel etwa 100 mmHg. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Imatinib keine (systemisch) vasodilative Wirkung zeigt, denn dies würde mit einer deutlichen Senkung des arteriellen Druckes einhergehen.

Die Verringerung des rechtsventrikulären Druckes in den behandelten Ratten im Vergleich zu kranken Kontrollen sowie die Verminderung der Hypertrophie des rechten Ventrikels ist demzufolge nicht auf eine akute Verringerung des pulmonalen Widerstandes durch eine allgemeine Vasodilatation, sondern vielmehr auf einen direkten positiven, antiproliferativen Effekt von Imatinib auf die Gefäßwände der Lunge (mit Zunahme der Vasoreaktivität durch Verringerung der Wandstärke und des Muskularisierungsgrades) zurückzuführen.

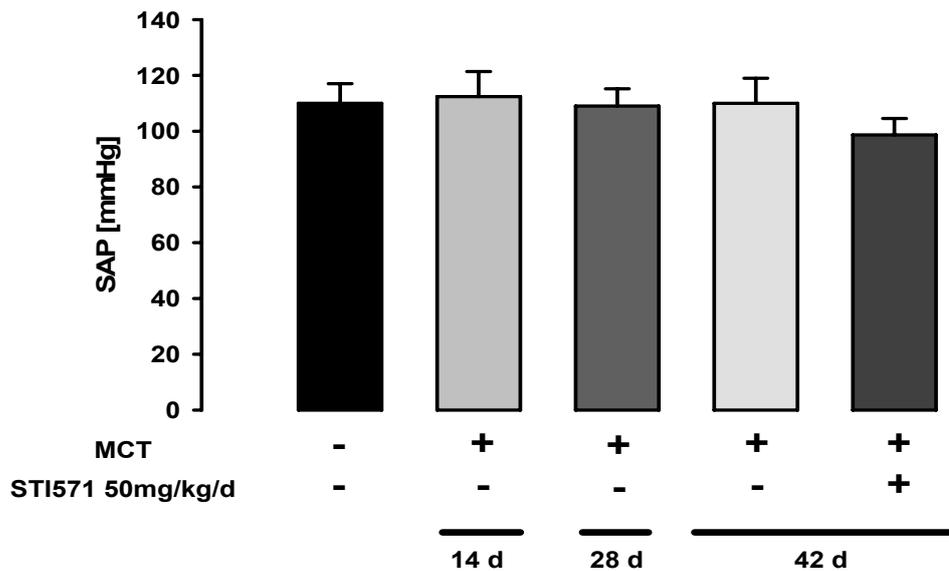


Abbildung 7: Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes in den einzelnen Gruppen: gesund, 14 Tage nach Monocrotalin, 28 Tage nach Monocrotalin, 42 Tage nach Monocrotalin, mit Imatinib (STI 571) 50 mg/kg/Tag behandelt.

3.5 Telemetrisch bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

Die telemetrische Messung des rechtsventrikulären Druckes umfasste zunächst die Etablierung einer neuartigen, wenig invasiven Operationstechnik, bei der die Messsonde über eine kleine Inzision in der Jugularvene bis ins rechte Herz vorgeschoben wird und der Drucksensor unter der Haut zu liegen kommt (siehe Materialien und Methoden). Diese Operationsmethode wird im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

Bisherige Veröffentlichungen wandten zur Implantation der Sonde die invasive Methode der Thorakotomie an und platzierten den Drucksensor in die Bauchhöhle (Hess 1996, Michelakis 2002, Pozeg 2003, Sebki 2003, Mc Murtry 2005). Der Vorteil der hier erstmalig beschriebenen Methode liegt in der komplikationslosen Durchführung und der rascheren postoperativen Erholungsphase der Ratten. Der operative Eingriff ist für das Tier mit weniger Schmerzen, Leiden und Infektionsanfälligkeit verbunden. Es gab keine Mortalität aufgrund dieses Eingriffes. Nach Thorakotomie besteht dagegen immer die Gefahr einer erhöhten Sterblichkeit

und sekundärer Infektionen. Mit der hier beschriebenen Methode kann allerdings nur der Druck im rechten Ventrikel, nicht der pulmonalarterielle Druck gemessen werden, da es nicht möglich ist, die Sonde über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie vorzuschieben. Der rechtsventrikulär-systolische Druck und der pulmonalarterielle Spitzendruck sind jedoch identisch.

Nach Implantation des telemetrischen Sensors und einer zweitägigen Erholungsphase der Ratten wurde am Tag 0 60 mg/kg Monocrotalin subkutan injiziert. Der rechtsventrikuläre Druck wurde an den wachen Tieren kontinuierlich über 42 Tage aufgezeichnet und eine zweimal tägliche (morgens und abends) repräsentative Aufzeichnung über 5 Minuten zur Auswertung herangezogen.

Die telemetrische Messung des RVSP (n=3) zeigte einen progressiven Druckanstieg im Verlauf der Erkrankung. Die Tiere entwickelten eine schwere pulmonalarterielle Hypertonie. Vor Injektion des Monocrotalins betrug der rechtsventrikuläre Druck $25,5 \pm 1,76$ mmHg. Nach 28 Tagen waren die Mittelwerte für den RVSP $87,4 \pm 10,18$ mmHg. Es erfolgte eine anschließende 14-tägige Behandlung mit STI 571 (Imatinib) in einer Dosis von 50 mg/kg/Tag. Es konnte gezeigt werden, dass unter Therapie der rechtsventrikuläre Druck kontinuierlich abnimmt und dass nach Beendigung der Therapie nahezu physiologische Werte erreicht wurden (MW $38,15 \pm 4,87$ mmHg).

Der Vorteil einer telemetrischen Messung des rechtsventrikulären Druckes besteht darin, ohne Einfluß einer Narkose und über einen längeren Zeitraum kontinuierlich den Krankheitsverlauf und den Therapieeffekt am wachen Tier unter größtmöglichen physiologischen Bedingungen zu verfolgen.

Ein Nachteil der Methode ist, dass nicht gleichzeitig an einem Individuum verschiedene Drücke (systemisch arterieller Druck *und* rechtsventrikulärer Druck) gemessen werden können.

Deshalb wurde in dieser Arbeit außerdem die konventionelle invasive hämodynamische Messung unter standardisierter Narkose vorgenommen, um zusätzlich die Bestimmung des systemisch arteriellen Druckes und der Parameter des Gasaustausches unter einer definiert-kontrollierten Beatmung vornehmen zu können. Eine definiert-kontrollierte Beatmung ist auch für die spätere Berechnung des Herzzeitvolumens nach dem Fick'schen Prinzip sinnvoll. Die Tiere wurden nach

Beendigung der Messung euthanasiert und Lungen und Herz für weitere Untersuchungen entnommen.

Die Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum wurde nach Beendigung der Therapie und Euthanasie der drei Tiere bestimmt, um die Auswirkung der Therapie auf die Rechtsherzhypertrophie zu determinieren und die Ergebnisse der telemetrischen Druckmessung zusätzlich abzusichern. Die RV/ LV+S Werte waren 0,33, 0,43 und 0,41. Der Mittelwert betrug $0,39 \pm 0,042$.

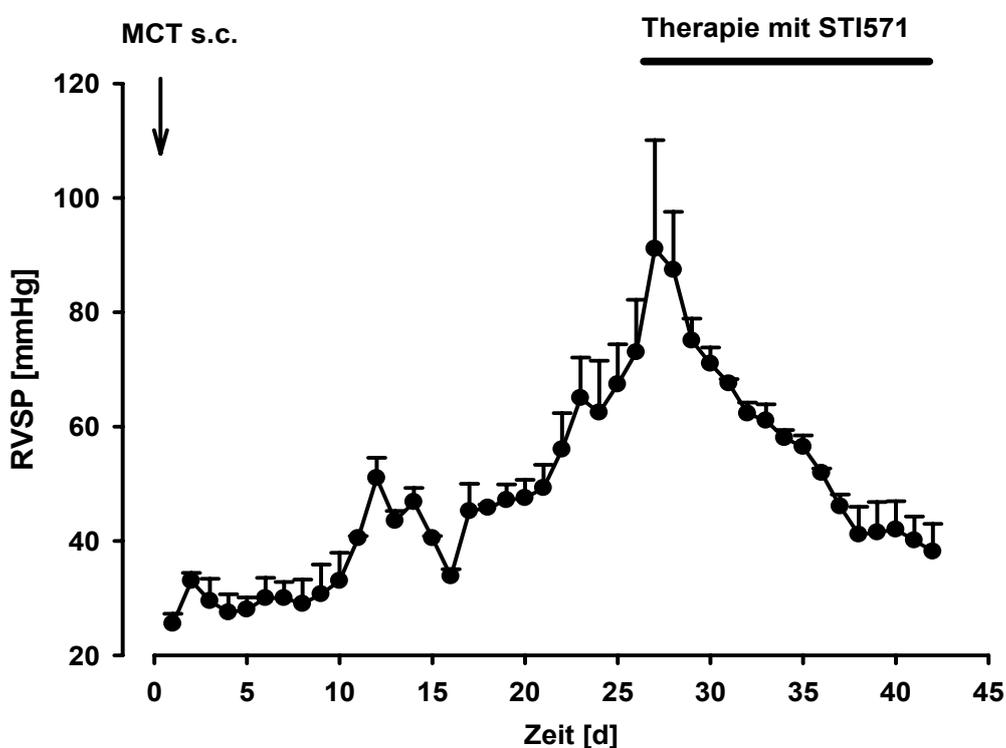


Abbildung 8: Darstellung des mittels telemetrischer Sensoren gemessenen rechtsventrikulären Druckes an drei wachen, sich frei bewegendes Ratten. Am Tag 0 (2 Tage nach Implantation des telemetrischen Sensors in den rechten Ventrikel) erfolgte die Injektion von 60 mg/kg MCT. 28 Tage nach MCT-Injektion betrug der rechtsventrikuläre Druck $87,4 (\pm 10,18)$ und die Therapie mit Imatinib (STI 571) 50 mg/kg/d wurde vom Tag 28 bis Tag 42 vorgenommen. Nach zweiwöchiger Therapie betrug der rechtsventrikuläre Druck $38,15 \pm 4,87$.

3.6 Invasiv bestimmter rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

Der Druck in der rechten Herzkammer wurde zusätzlich zur oben angeführten telemetrischen Methode auch invasiv unter standardisierter Narkose gemessen. Dabei wurde über die rechte Jugularvene ein flüssigkeitsgefüllter Katheter in die rechte Herzkammer vorgeschoben und der rechtsventrikuläre Druck über einen Zeitraum von 10 Minuten aufgezeichnet.

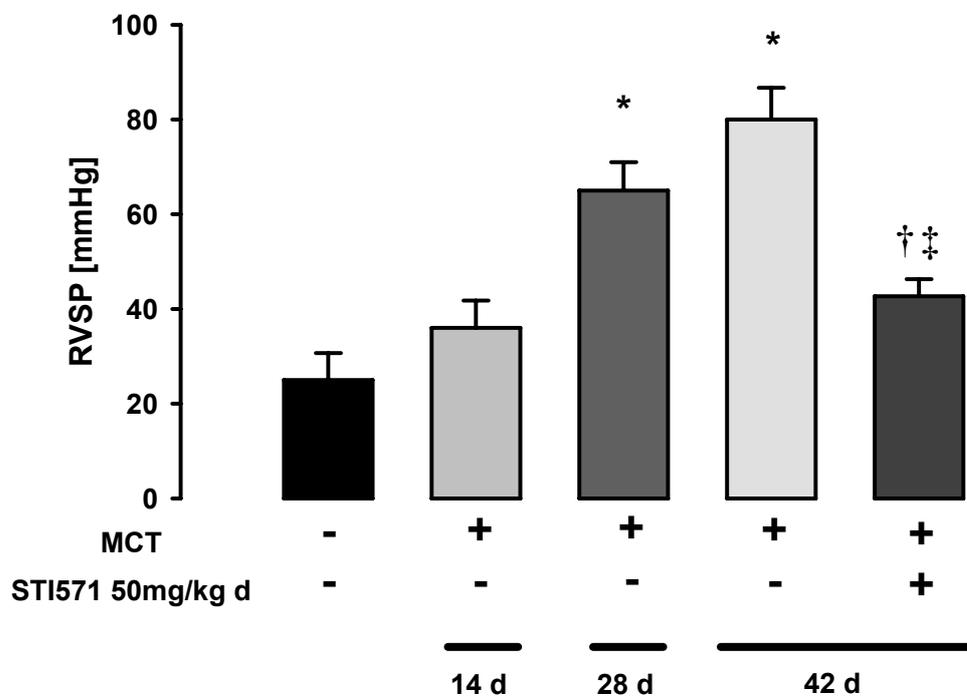


Abbildung 9: Darstellung des rechtsventrikulär systolischen Druckes (RVSP) in den verschiedenen Gruppen. Die invasive Druckmessung (Einführen eines Katheters über die Jugularvene in den rechten Ventrikel in tiefer Narkose) fand an gesunden Ratten sowie an Ratten 14, 28 und 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion statt. Die Therapiegruppe erhielt von Tag 28-42 nach MCT-Injektion Imatinib (STI 571) in der Dosis von 50 mg/kg/d (* $p < 0,05$ vs. gesund; † $p < 0,05$ vs. MCT 28 d, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

In gesunden Kontrollen betrug der Mittelwert 25,0 mmHg ($\pm 5,7$). 14 Tage nach der Injektion von Monocrotalin ließ sich bereits eine Erhöhung des Druckes feststellen (MW 36,0 \pm 5,8 mmHg). 28 Tage nach Monocrotalin erreichten die rechtsventrikulären Drücke im Mittel fast das Zweieinhalbfache der Werte gesunder Kontrollratten. Zu diesem Zeitpunkt bestand bereits eine schwere pulmonale Hypertonie (MW 65,0 \pm 6,0). 42 Tage nach MCT erreichte der rechtsventrikuläre Druck einiger Ratten schließlich sogar systemische Werte (MW 80,0 \pm 6,7 mmHg). Aus der Grafik lässt sich klar der beeindruckende Erfolg der Therapie mit Imatinib 50 mg/kg auf den rechtsventrikulären Druck ansehen (MW 42,0 \pm 3,6 mmHg). Die Werte in der Therapiegruppe sind vergleichbar mit denjenigen 14 Tage kranker Ratten. Die rechtsventrikulären Drücke der behandelten Ratten unterschieden sich nicht mehr signifikant von den Werten gesunder Ratten.

Die Therapie konnte somit nicht nur das weitere Fortschreiten der pulmonalen Hypertonie verhindern, sondern vielmehr sogar eine deutliche Regression der Druckerhöhung im rechten Ventrikel erreichen. Dies korreliert mit der deutlichen Regression der Rechtsherzhypertrophie und der Verringerung des Muskularisierungsgrades und der Wandstärke der Pulmonalarterien.

3.7 Herzzeitvolumen bezogen auf das Gewicht (Cardiac Index)

Das Herzzeitvolumen der einzelnen Gruppen wurde angegeben in ml/ min bezogen auf 100 g Körpergewicht (KG) (Cardiac Index). Es wurde nach dem Fick'schen Prinzip berechnet (siehe Materialien und Methoden).

Verglichen mit Kontrolltieren (36,0 \pm 1,4 ml/ min 100 g KG) war der Cardiac Index in den Monocrotalin-Gruppen vermindert. Nach 14 d Monocrotalin betrug der Cardiac Index 34,4 \pm 5,4 ml/ min 100 g KG; nach 28 d MCT nur noch 28,0 \pm 2,4 ml/min 100 g KG. 42 d nach der Monocrotalin-Injektion war der Cardiac Index auf einen Wert von 26,0 \pm 2,7 vermindert. Eine zweiwöchige Behandlung mit Imatinib in einer Dosis von 50 mg/kg/d von Tag 28 bis 42 nach MCT-Injektion normalisierte das Herzzeitvolumen, ausgedrückt als Cardiac Index, vollständig (MW 37,6 \pm 5,4).

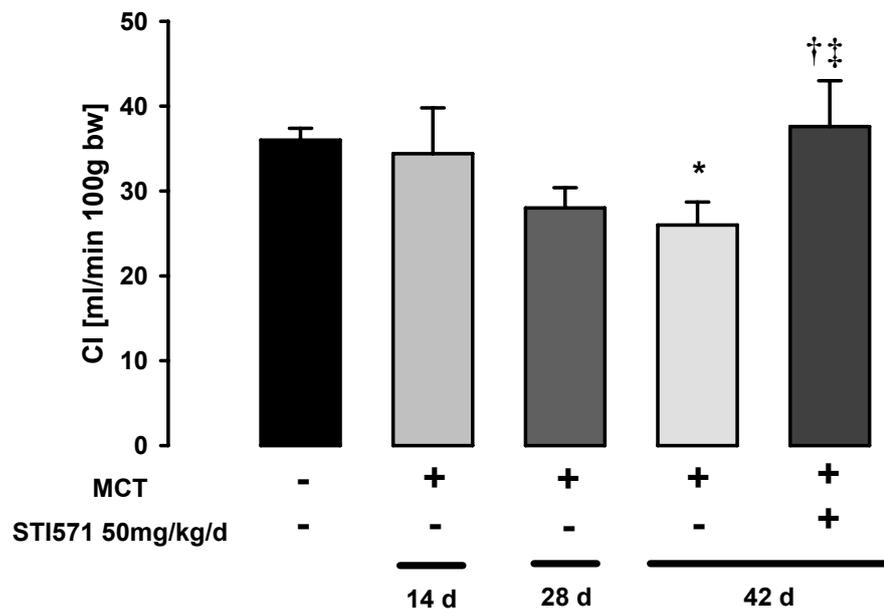


Abbildung 10: Dargestellt ist der sogenannte Cardiac Index der einzelnen Gruppen. Er entspricht dem Herzzeitvolumen in ml/ min. bezogen auf 100 g Körpergewicht (KG). Das Herzzeitvolumen wurde nach dem Fick'schen Prinzip berechnet (* $p < 0,05$ vs. gesund; † $p < 0,05$ vs. MCT 28 d, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der arteriellen Sauerstoffsättigung erzielt. Die arterielle Sauerstoffsättigung fiel in MCT-behandelten Ratten signifikant ab und erreichte unter Therapie mit Imatinib wieder normale Werte (Schermuly *et al.*, 2005).

3.8 Bestimmung des Verhältnisses des rechten Ventrikels zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Die Monocrotalin-behandelten Tiere entwickelten im Verlauf der Erkrankung eine schwere Rechtsherzhypertrophie als Folge der erhöhten pulmonalen Drücke. Die Ratio des Trockengewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) erhöhte sich von $0,30 \pm 0,02$ (gesunde Kontrollen) auf $0,71 \pm 0,03$ (28 Tage nach Monocrotalin) und $0,78 \pm 0,07$ (42 Tage nach MCT). Therapie mit Imatinib

in einer Dosis von 50 mg/kg/d führte zu einer signifikanten Reduktion dieser Ratio (MW $0,42 \pm 0,03$). Dies korreliert mit den stark verminderten pulmonalen Drücken der Therapiegruppe.

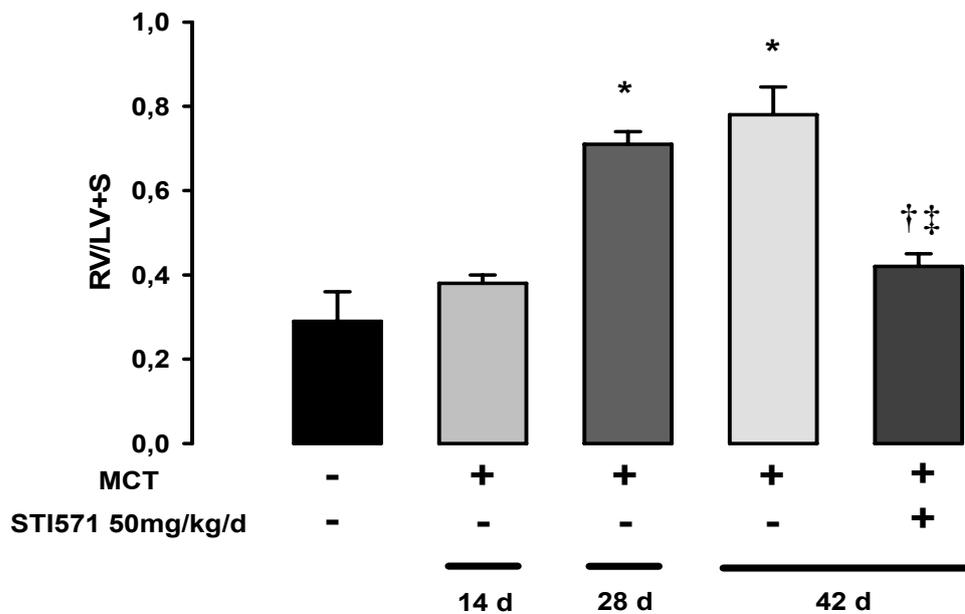


Abbildung 11: Dargestellt ist das Verhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum in den einzelnen Gruppen als Maß für die Rechtsherzhypertrophie (* $p < 0,05$ vs. gesund; † $p < 0,05$ vs. MCT 28 d, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

3.9 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

3.9.1 Muskularisierungsgrad

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

3.9.1.1 Immunhistochemische Doppelfärbung

Um den Muskularisierungsgrad in den einzelnen Gruppen sichtbar zu machen und im weiteren quantitativ bestimmen zu können, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen glattmuskuläres alpha-actin und endotheliales von Willebrand Faktor vorgenommen. Die immunhistochemische Peroxidase-Färbung gegen Alpha-actin wurde mit einem violetten Chromogen (Vector Vip®), die gegen von Willebrand Faktor mit einem braunen Chromogen (Vector DAB®) entwickelt. Im Verlauf der Progression der pulmonalen Hypertonie nach MCT-Injektion erfolgte eine starke Zunahme des Muskularisierungsgrades.

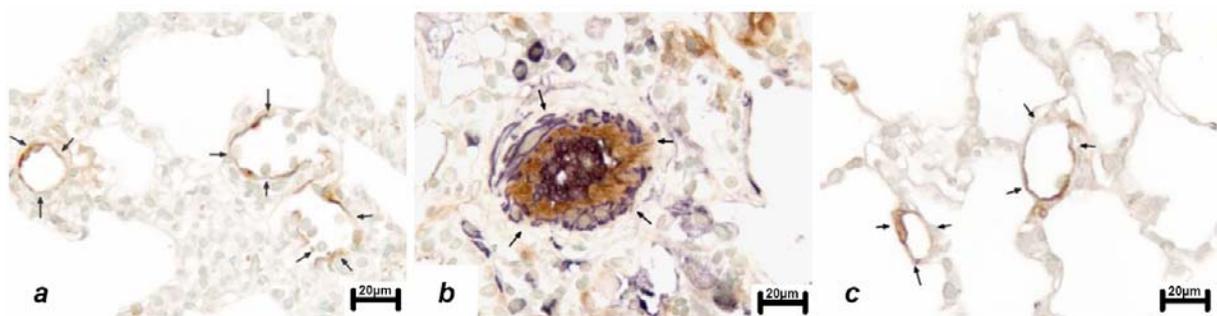


Abbildung 12 (a)–(c): Immunhistochemische Doppelfärbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (alle 400x) gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres smooth muscle alpha actin (violett). (a) in gesunden Ratten sind die kleinen peripheren Pulmonalarterien nicht oder nur teil muskularisiert. (b) im Verlaufe der Progression der pulmonalen Hypertonie nach MCT-Injektion erfolgte eine starke Zunahme der Muskularisierung. (c) nach zweiwöchiger Therapie mit Imatinib wurde eine vollständige Regression der vermehrten Muskularisierung erreicht.

3.9.1.2 Prozentualer Anteil voll, partiell und teilmuskularisierter Gefäße

Der Muskularisierungsgrad von Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 25 und 50 μm wurde quantitativ morphometrisch mit Hilfe eines speziell entwickelten Computerprogrammes (Leica Microsystems, Wetzlar) untersucht.

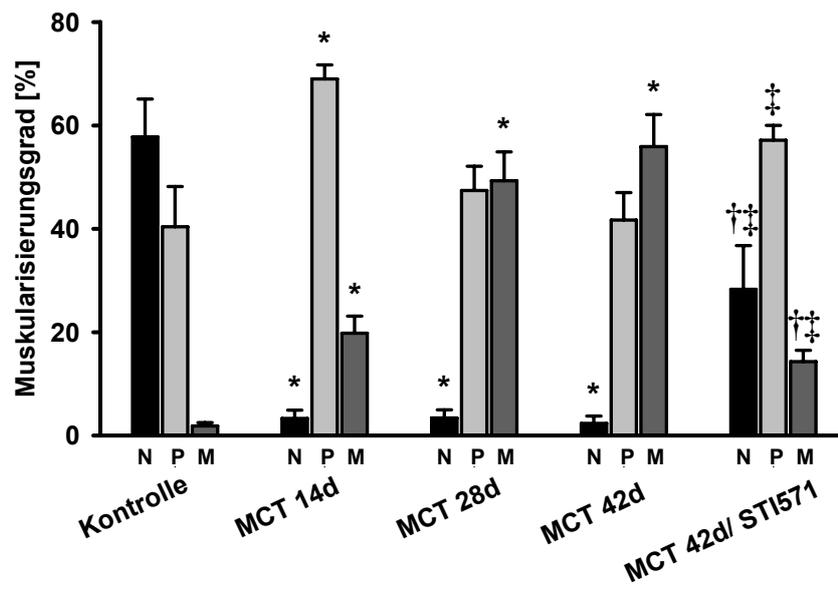


Abbildung 13: Prozentualer Anteil nicht (N), partiell (P) oder voll (M) muskularisierter peripherer Pulmonalarterien in den einzelnen Tiergruppen. Morphometrisch analysiert wurden pro Tier (n-Zahl siehe Materialien und Methoden) jeweils 100 periphere Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 25-50 μm (* $p < 0,05$ vs. gesund; † $p < 0,05$ vs. MCT 28 d, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

In gesunden Kontrollratten war mehr als die Hälfte der Gefäße in der untersuchten Kategorie nicht muskularisiert (MW 57,8% \pm 7,3). In den MCT-behandelten Ratten fiel der Anteil nicht muskularisierter Arterien im Verlauf der Erkrankung stark ab. 28 Tage nach MCT betrug der Anteil nicht muskularisierter Arterien 3,38% \pm 1,6; 42 Tage nach MCT nur noch 2,35% \pm 1,4. Der Anteil voll muskularisierter Arterien nahm dagegen stark zu. 28 Tage nach MCT konnten 49,3% \pm 5,6 und 42 Tage nach MCT sogar 55,9% \pm 6,2 voll muskularisierte Arterien erfasst werden.

Die Behandlung mit Imatinib (50 mg/kg/d) führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien (MW 14,3% \pm 2,2; $p < 0,05$ vs. MCT 28 d und

42 d). Der Anteil partiell muskularisierter Gefäße erhöhte sich (MW 57,13% \pm 2,9). Ebenso konnte eine viel höhere Anzahl nicht muskularisierter Arterien (MW 28,27% \pm 8,5) im Vergleich zu den unbehandelten Ratten erfasst werden.

3.9.2 Mittlere Wandstärke

Im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodellings verdickte sich die Gefäßmedia der Monocrotalin-behandelten Ratten.

3.9.2.1 Elastica-Kernechtrot Färbung

Um die mittlere Wandstärke der einzelnen Gruppen darzustellen und im weiteren quantitativ morphometrisch bestimmen zu können, wurde eine Elastica-Färbung vorgenommen. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot.

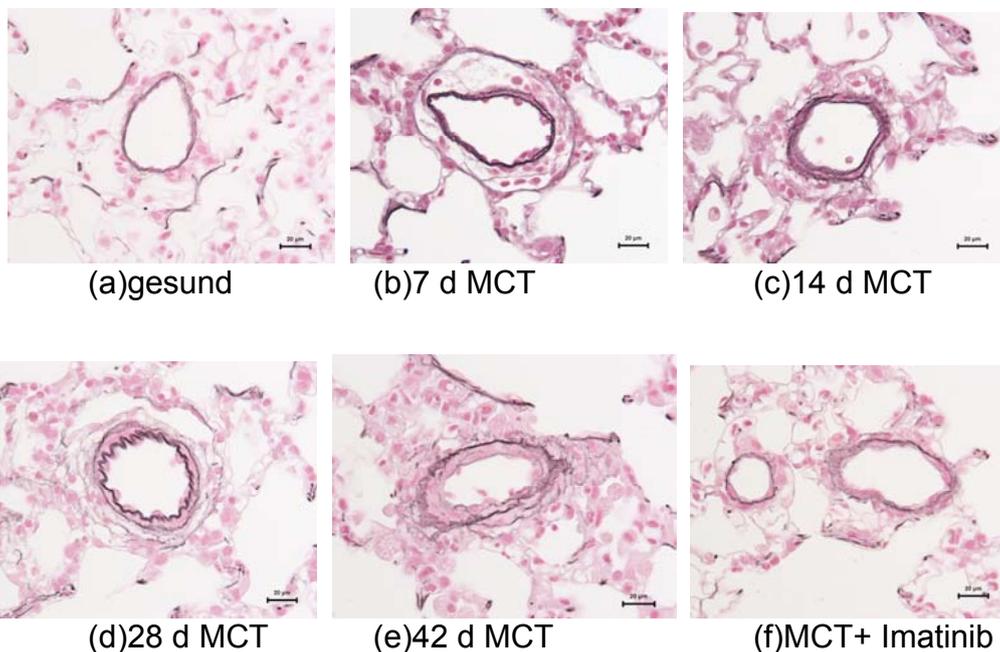


Abbildung 14 (a)-(f): Elastica-Kernechtrot-Färbung kleiner peripherer Pulmonalarterien (400x Vergrößerung) in den verschiedenen Tiergruppen zur morphometrischen Bestimmung der mittleren Wandstärke und der Lumenfläche. Lamina elastica externa und interna sind grauschwarz gefärbt. Deutlich erkennbar sind die progressive Gefäßwandverdickung und deren Regression unter Therapie.

3.9.2.2 Mittlere Wandstärke in distalen Pulmonalarterien (25 – 50 µm)

Die mittlere Wandstärke der verschiedenen Gefäßkategorien wurde ebenfalls mit einer speziell entwickelten Software untersucht (Leica Microsystems, Wetzlar).

Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 25 – 50 µm war in den MCT-Gruppen stark erhöht. Am Tag 28 nach MCT betrug sie $28,7\% \pm 0,33$ (Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers). Am Tag 42 nach MCT erhöhte sie sich weiter auf $36,83\% \pm 0,54$. In gesunden Kontrollratten betrug die mittlere Wandstärke kleiner Pulmonalarterien lediglich $18,59\% \pm 0,42$. Die Behandlung mit Imatinib in einer Dosis von 50 mg/kg/d führte zu einer vollständigen Wiederherstellung dieses Zustandes (MW $22,66\% \pm 0,23$).

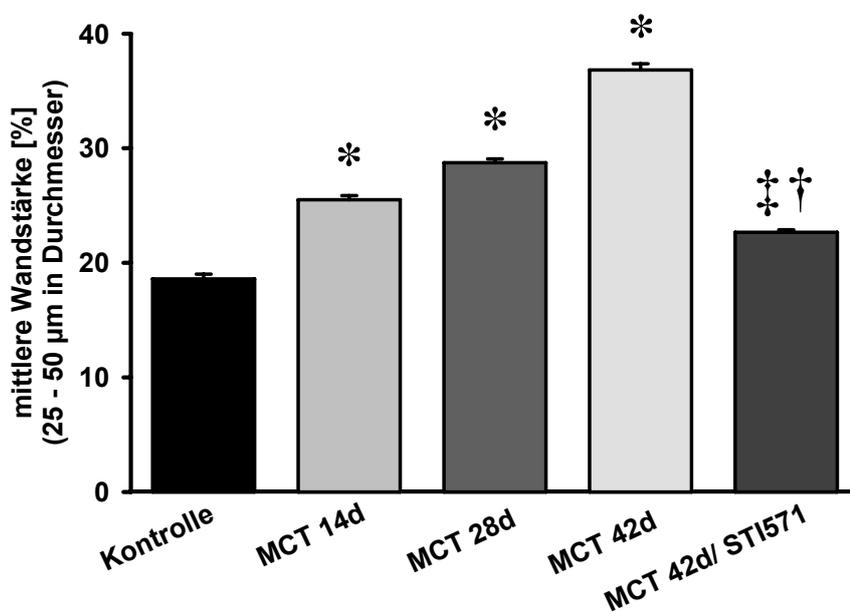


Abbildung 15: Darstellung der mittleren Wandstärke in distalen (kleinen) Pulmonalarterien (externer Durchmesser 25 - 50µm). Die histomorphometrische Untersuchung umfasste gesunde Ratten, Ratten 14, 28 und 42 d nach MCT und die mit Imatinib 50 mg/kg/d behandelte Therapiegruppe. Die mittlere Wandstärke wurde angegeben als Prozentsatz des externen Gefäßdurchmessers (*p<0,05 vs. gesund; † p<0,05 vs. MCT 28 d, ‡ p<0,05 vs. MCT 42 d).

3.9.2.3 Mittlere Wandstärke in mittelgroßen und großen Pulmonalarterien

Die mittlere Wandstärke von Pulmonalarterien mit einer Größe zwischen 51 und 100 μm bzw. größer als 101 μm wurde ebenfalls bestimmt. Wie auch in den kleinen Pulmonalarterien verdickte sich die Wand der Gefäße im Verlauf der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie. 28 Tage nach MCT betrug die mittlere Wandstärke mittelgroßer (51 – 100 μm) Pulmonalarterien $22,81\% \pm 0,31$ und 42 Tage nach MCT $26,79\% \pm 0,51$. Unter Therapie mit Imatinib normalisierte sich die Wanddicke der Gefäße fast vollständig (Imatinib: MW $19,09\% \pm 0,24$; gesunde Kontrollen: MW $17,17\% \pm 0,49$). Das gleiche wurde auch in den Pulmonalarterien $>101 \mu\text{m}$ beobachtet.

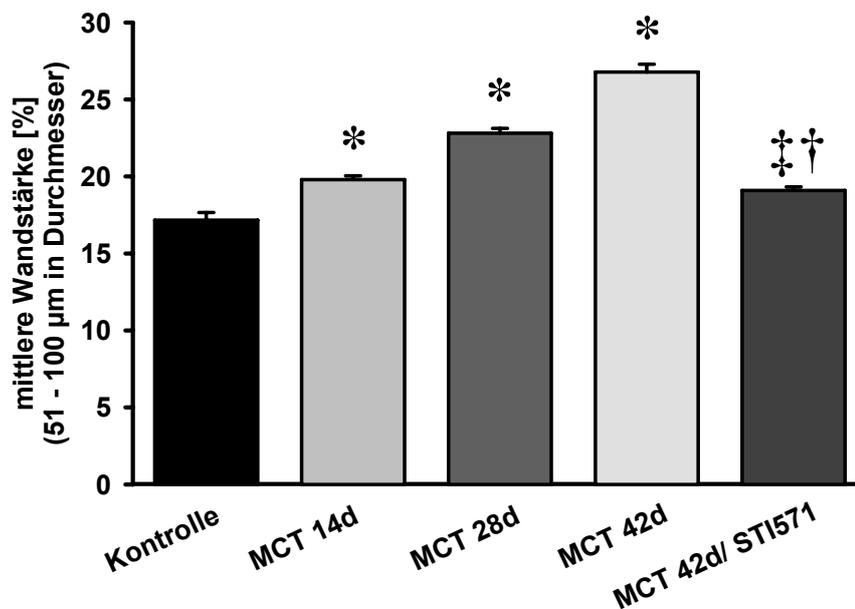


Abbildung 16: Darstellung der mittleren Wandstärke in mittelgroßen Pulmonalarterien (externer Durchmesser 51-100 μm) in den einzelnen Gruppen (* $p < 0,05$ vs. gesund; † $p < 0,05$ vs. MCT 28 d, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

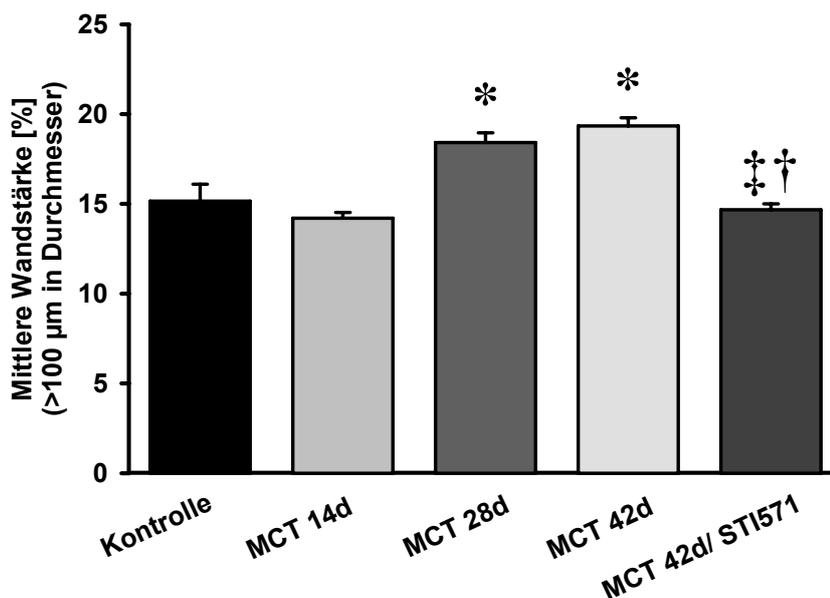


Abbildung 17: Darstellung der mittleren Wandstärke großer Pulmonalarterien (externer Durchmesser >100µm (*p<0,05 vs. gesund; † p<0,05 vs. MCT 28 d, ‡ p<0,05 vs. MCT 42 d).

3.9.3 Lumenfläche in µm² in distalen Pulmonalarterien

Die Lumenfläche kleiner Pulmonalarterien erfuhr im Verlauf der schwerwiegenden progressiven hämodynamischen und strukturellen pulmonalhypertensiven Veränderungen eine signifikante Reduktion.

42 Tage nach Injektion von Monocrotalin war die Lumenfläche kleiner Lungenarterien um nahezu zwei Drittel im Vergleich zu den Gefäßen gesunder Kontrollratten reduziert.

Eine solche konzentrische Verringerung der lichten Weite eines Gefäßes wird als „negatives“ Remodeling bezeichnet und ist typisch sowohl für die pathohistologischen Veränderungen bei der pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen wie auch bei der Monocrotalin-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie. Interessanterweise wird dieses konzentrische Remodeling bei einer rein durch Hypoxie bedingten pulmonalarteriellen Hypertonie nicht beobachtet. Hierbei handelt es sich vielmehr um ein sogenanntes „positives“ Remodeling, das heißt, um eine rein

exzentrische Dickenzunahme des Gefäßes (Kommentar von Stenmark & McMurtry 2005; van Suylen *et. al.*, 1998).

Die antiproliferative Wirkung des Tyrosinkinasehemmers Imatinib wird in der signifikanten Vergrößerung der Lumenfläche kleiner Pulmonalarterien unter Therapie deutlich. Unter zweiwöchiger Therapie mit Imatinib normalisierte sich deren Lumenfläche und unterschied sich nicht mehr signifikant von der Lumenfläche der Arterien gesunder Kontrollratten.

Eine vergleichbare, wenn jedoch merklich geringere Reduktion der Lumenfläche wurde auch bei größeren Pulmonalarterien ($>50 \mu\text{m}$) im Zuge der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie beobachtet. Auch bei diesen Arterien wurde unter Therapie mit Imatinib eine ähnliche Rekonstitution der Lumenfläche beobachtet (Daten nicht gezeigt).

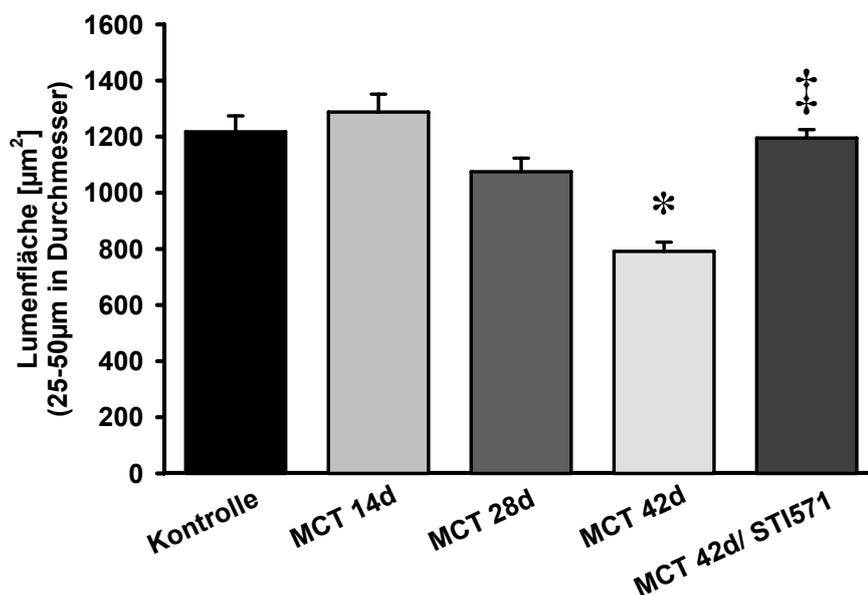
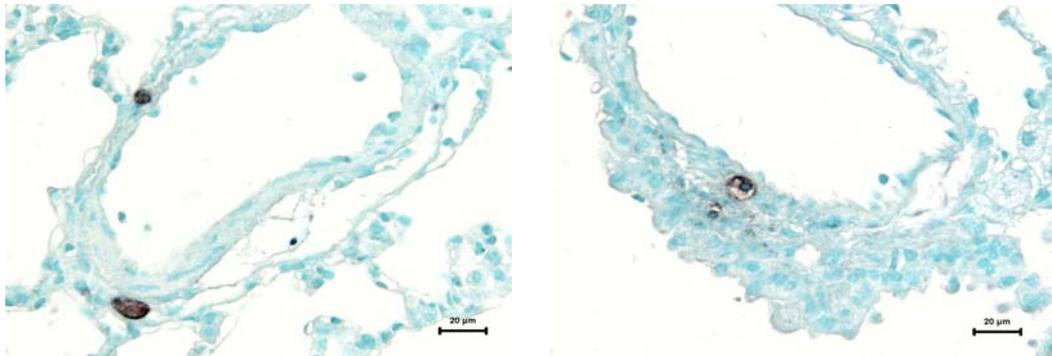
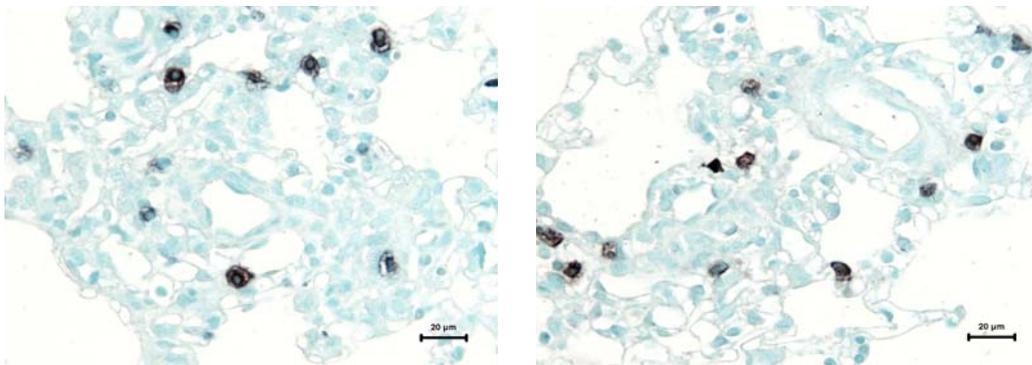


Abbildung 18: Dargestellt ist die Lumenfläche kleiner Pulmonalarterien in μm^2 (Durchmesser 25-50 μm) in den verschiedenen experimentellen Tiergruppen. Die Therapiegruppe wurde mit 50 mg/kg Imatinib (STI571) pro Tag behandelt. Die Lumenfläche stellt sich definitionsgemäß als lichte Weite innerhalb der intimalen Begrenzung des Gefäßes dar (* $p < 0,05$ vs. gesund, ‡ $p < 0,05$ vs. MCT 42 d).

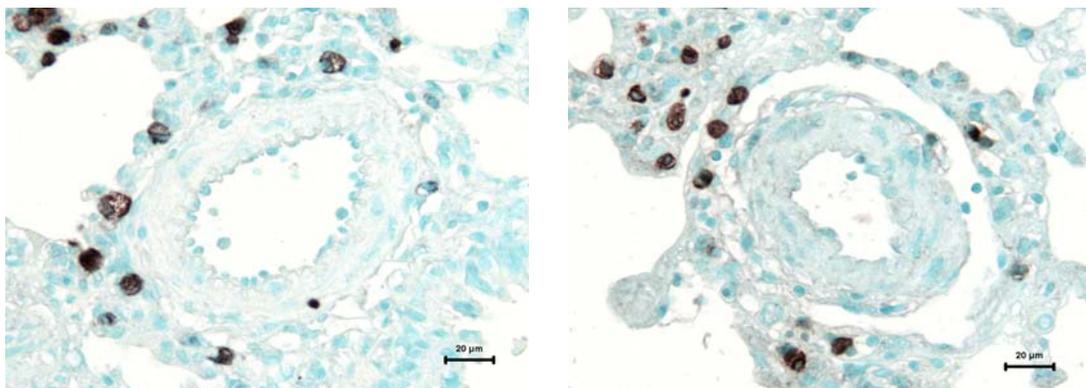
3.10 Expression von PDGF- β Rezeptor in Rattenlungen



(a) gesund; anti-PDGFR- β



(b) 28 d nach Monocrotalin; anti-PDGFR- β



(c) 42 d nach Monocrotalin; anti-PDGFR- β

Abbildung 19: immunhistochemische Färbung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) von anti-PDGFR Rezeptor- β (Substrat DAB) in gesunden Tieren und 28 bzw. 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion. Eine Zunahme der Expression im Verlauf der Erkrankung ist deutlich zu erkennen (alle 400x Vergrößerung).

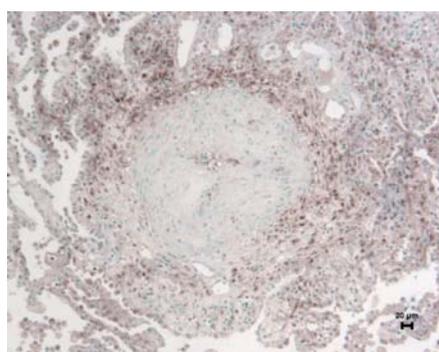
Mittels immunhistochemischer Färbung (Peroxidase-Methode) konnte die Überexpression von PDGF- β Rezeptor in Lungengefäßen Monocrotalin-behandelter

Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollratten nachgewiesen werden. Es handelt sich um ein vorwiegend perivaskuläres zytoplasmatisches Expressionsmuster von PDGFR- β . In gesunden Ratten finden sich nur wenige PDGFR- β positive Zellen. Im Verlauf der Krankheitsentwicklung kommt es zu einer verstärkten perivaskulären Anhäufung PDGF- β Rezeptor positiver Zellen.

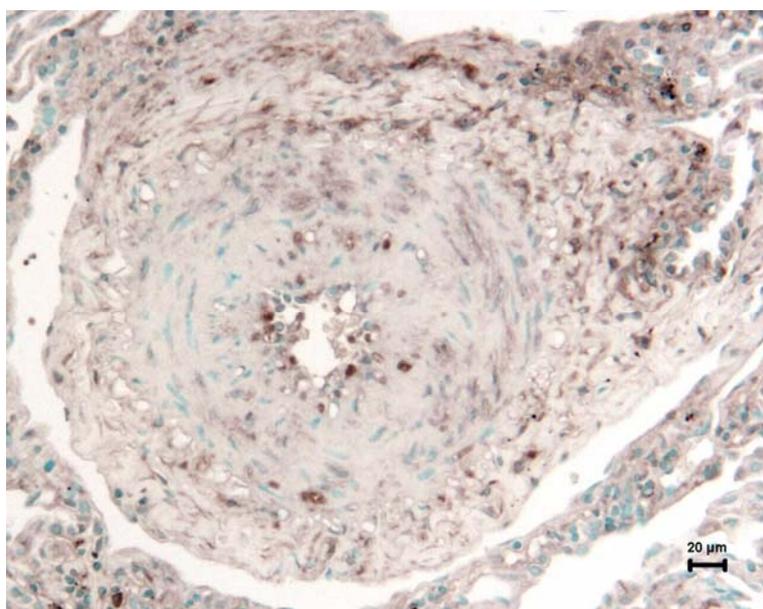
3.11 Expression von PDGFR- β in humanen Lungen



(a) Lunge Spender 10x



(b) Lunge IPAH 10x



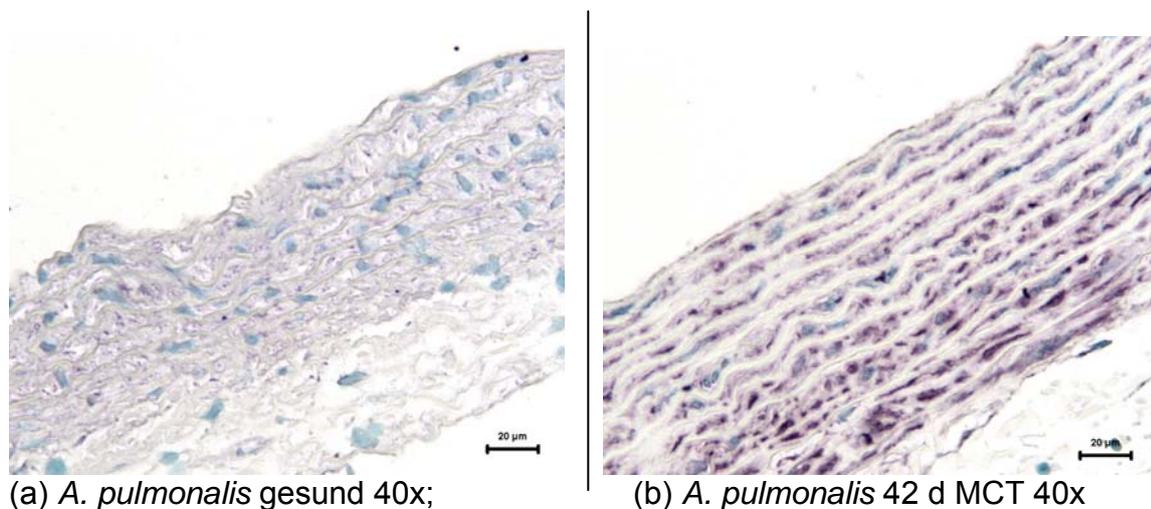
(c) Lunge IPAH 20x

Abbildung 20 (a) bis (c): Immunhistochemische Färbung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) von PDGF-Rezeptor β (Substrat DAB) in Lungenschnitten gesunder Spender bzw. Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie. PDGFR- β ist in Lungengewebe von Patienten mit IPAH stark perivaskulär exprimiert. Vergrößerung (a) und (b): 100x, Vergrößerung (c): 200x

Der Nachweis der Überexpression von PDGFR- β gelang immunhistochemisch auch in Lungenschnitten von Patienten mit idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie. Wie in den Rattenlungen imponierte auch hier ein deutliches perivaskuläres Verteilungsmuster. Zusätzlich fanden sich auch einige PDGFR- β positive Zellen in der Gefäßmedia und Adventitia. Im Vergleich zu den Lungen mit IPAH gab es in gleichartig gefärbten Schnitten von gesunden Spenderorganen fast keine PDGFR- β positiven Zellen.

Die Überexpression von PDGFR- β Rezeptor (und phosphoryliertem PDGFR- β Rezeptor) in MCT-Ratten sowie Patienten mit IPAH konnte im Rahmen der Veröffentlichung dieser Studie zusätzlich durch Western Blot Analysen bestätigt werden (Schermuly *et. al.*, 2005).

3.12 Expression von PDGF-B (Ligand) in der *A. pulmonalis* von Ratten



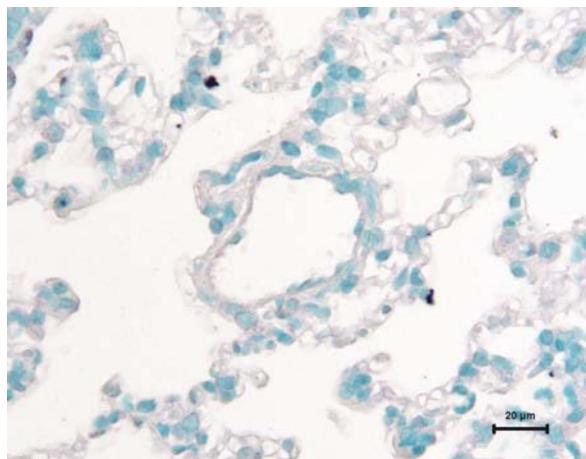
(a) *A. pulmonalis* gesund 40x;

(b) *A. pulmonalis* 42 d MCT 40x

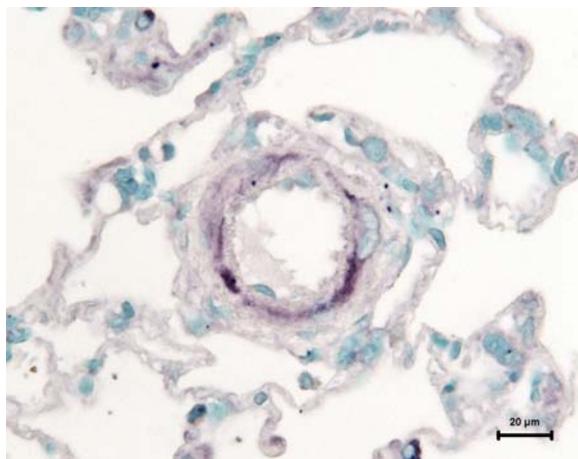
Abbildung 21 (a) und (b): Immunhistochemische Färbung (Peroxidase-Methode) von PDGF-B (Ligand) in der *A. pulmonalis* eines gesunden bzw. MCT-behandelten Tieres. Im Gegensatz zu der geringen Expression in der *A. pulmonalis* des gesunden Tieres ist PDGF-B 42 d nach MCT stark überexprimiert (Substrat VIP, Vergrößerung 400x).

Immunhistochemisch konnte in den Pulmonalarterien Monocrotalin-behandelter Ratten eine starke Überexpression von PDGF-B Protein nachgewiesen werden. Dabei war PDGF-B vorwiegend in den glatten Muskelzellen lokalisiert. In gesunden Vergleichsorganen war dagegen fast kein PDGF-B vorhanden.

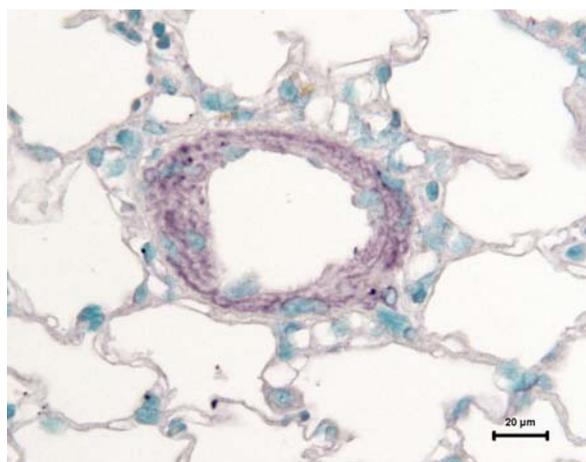
3.13 Expression von PDGF-B (Ligand) in Rattenlungen



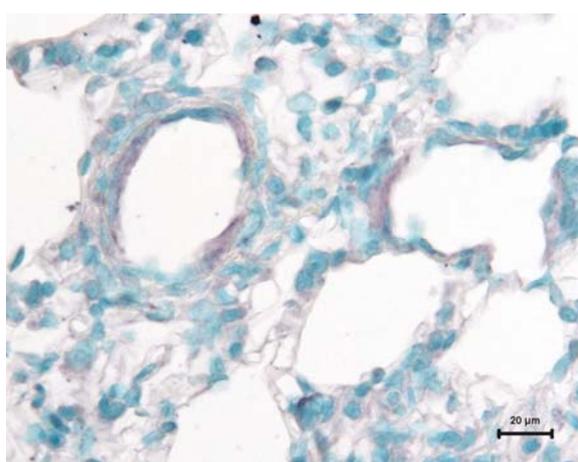
(a) gesund 40x; anti-PDGF-B



(b) 28d MCT 40x; anti-PDGF-B



(c) 42 d MCT 40x; anti-PDGF-B



(d) Imatinib 50 mg/kg/d; anti-PDGF-B

Abbildung 22 (a) bis (d): Immunhistochemische Färbung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) mit anti-PDGF-B. Dargestellt sind periphere Lungenarterien gesunder Ratten, 28 und 42 Tage nach MCT sowie Imatinib-behandelter Ratten. In den MCT-behandelten Ratten ist PDGF-B im Vergleich zu gesunden oder mit Imatinib behandelten Ratten überexprimiert (Substrat VIP, Vergrößerung 400x).

Die Überexpression von PDGF-B konnte immunhistochemisch auch in Lungengewebe MCT-behandelter Ratten nachgewiesen werden. Das Lokalisationsmuster von PDGF-B entspricht hier dem Expressionsprofil in den Pulmonalarterien. In den Gefäßen von Ratten, die 14 Tage lang mit Imatinib behandelt wurden, fand sich eine etwas schwächere Expression von PDGF-B im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

3.14 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass der PDGF-Rezeptorantagonist Imatinib (STI 571) eine effektive antiproliferative Behandlungsstrategie in einem experimentellen Tiermodell der schweren pulmonalen Hypertonie mit endothelialer Dysfunktion darstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit umfassen:

- Etablierung einer neuen, wenig invasiven Operationstechnik zur telemetrischen *in vivo online* Messung des rechtsventrikulären Druckes durch Einführen einer Messsonde über die *V. jugularis* in den rechten Ventrikel (*bisherige Veröffentlichungen: invasive Technik mit Platzierung der Sonde über eine Thorakotomie*)
- 100% Überlebensrate der therapierten Tiere im Vergleich zu 50% in kranken unbehandelten Kontrolltieren
- Signifikante Reduktion der pulmonalen Hypertonie (des RVSP), gemessen sowohl am narkotisierten (invasiv) als auch kontinuierlich am wachen Tier (Telemetrie)
- Markanter Rückgang der Rechtsherzhypertrophie
- Verbesserung des Herzzeitvolumens und des Gasaustausches
- Nahezu vollständige Rückbildung der schweren Gefäßproliferation: Reduktion des Muskularisierungsgrades distaler Pulmonalarterien; Normalisierung der Wandstärke distaler, mittlerer und proximaler Pulmonalarterien; Normalisierung der Lumenfläche distaler Pulmonalarterien
- immunhistochemische Darstellung der Überexpression von PDGF-B (Ligand) in MCT-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren
- immunhistochemische Darstellung der Überexpression von PDGF- β Rezeptor in MCT-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren
- immunhistochemische Darstellung der Überexpression von PDGF- β Rezeptor in Lungenschnitten mit humaner idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie im Vergleich zu gesundem Spenderorgan
- Keine signifikante Einwirkung der Therapie auf den systemisch arteriellen Druck (kein vasodilativer Therapieeffekt)

4 Diskussion

4.1 Pulmonalarterielle Hypertonie- mögliche Ätiologien und gegenwärtige Therapiestrategien

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist eine lebensbedrohende Erkrankung, für die es bis dato keine kurativen Therapiemöglichkeiten gibt. Die Behandlungsstrategien zielen vor allem auf eine Verbesserung der Vasoreaktivität, eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Erhöhung der Lebenserwartung hin. Die Pathomechanismen, die zur Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie führen, sind nicht genau bekannt. Die Identifizierung von Mutationen im bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR-2), einem Mitglied der Transforming Growth Factor Gruppe in der Mehrheit der Fälle mit familiärer pulmonalarterieller Hypertonie brachte neue Einsichten in einen möglichen genetisch determinierten Hintergrund (Deng, Morse *et. al.* 2000; Lane 2000). Jedoch entwickeln weniger als 20% der Individuen mit einer BMPR-2 Mutation eine familiäre pulmonale Hypertonie, und die meisten Individuen, die eine pulmonalarterielle Hypertonie entwickeln, weisen keine identifizierbare Mutation auf (Thomson 2000).

Es erscheint also sehr wahrscheinlich, dass andere Faktoren, die sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen und Umweltfaktoren umfassen, notwendig sind, um die putativen Pathomechanismen in Gang zu setzen, die zu Gefäßschädigung und einem pulmonal-hypertensiven Status führen.

Eine Anzahl Abnormalitäten in zellulären Transduktionswegen wurde bislang beschrieben, die eine wichtige Rolle in der Entstehung und Fortschreitung der PAH spielen können (Rubin und Galiè, 2004; Humbert *et. al.* 2004). Die Synthese von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin ist in Patienten mit PAH vermindert (Christman *et. al.*, 1993). Endothelin, ein stark vasokonstriktiv und mitogen wirkendes Agens, ist in den Lungen von Patienten mit PAH überexprimiert (Giaid A, 1993) und es wurde gezeigt, dass erhöhte Plasma-Endothelinspiegel mit einer Verschlechterung der Prognose korrelieren (Rubens *et. al.* 2001). Auch gestörte Kaliumkanal- und Wachstumsfaktor-Rezeptorfunktionen, veränderte Serotonintransporter-Regulierung, erhöhter oxidativer Streß sowie vermehrte Matrixsynthese tragen zur Pathogenese der PAH bei (Rubin und Galiè, 2004).

4.2 Gegenwärtige Therapie der PAH

Die neugewonnenen Einsichten, dass die PAH eine eher vasoproliferative als vasokonstriktive Erkrankung darstellt, wurden begleitet von neuen, auf diesen Erkenntnissen basierenden Therapiestrategien. Vor ungefähr 50 Jahren beobachtete Paul Wood, dass intravenös verabreichtes Acetylcholin bei einem Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie einen akuten Abfall im pulmonalarteriellen Druck bewirke. Er postulierte, dass ein „vasokonstriktiver Faktor“ an der Pathogenese beteiligt sei (Wood, 1959). Frühe Therapiestrategien gegen PAH basierten auf diesem Konzept und bestanden aus der Verabreichung systemischer Vasodilatoren, die den pulmonalen Gefäßwiderstand in einigen Patienten senken konnten. Bis zur Mitte der 1990er Jahre wurden daher vor allem „reine“ Vasodilatoren, darunter insbesondere Kalziumkanalblocker, zur Behandlung eingesetzt (Rich *et. al.* 1992).

Es ist jedoch mittlerweile bewiesen, dass nur ein geringer Prozentsatz der Patienten von diesen Substanzen profitiert (Hoepfer *et. al.* 1994). Nicht pulmonal-selektive Vasodilatoren können sogar zu einem (lebensgefährlichen) Blutdruckabfall im Körperkreislauf, einer Verschlechterung des intrapulmonalen Gasaustausches, einer Unterdrückung der Herzaktion und einer weiteren Verschlechterung des Herzzeitvolumens führen bei Patienten, bei denen eine fortgeschrittene proliferative Vaskulopathie und keine schlichte Vasokonstriktion besteht (Rubin, 1997).

Die Weiterentwicklung dieser vasodilativen Behandlungsstrategien und die Etablierung neuer Darreichungsformen haben in den letzten Jahren breite klinische Anwendung gefunden. Die Mehrzahl der Patienten profitiert davon durch eine Verbesserung der Lebensqualität und der hämodynamischen Parameter:

Prostaglandine: intravenös → subkutan → oral → inhalativ

Kontinuierliches intravenöses Epoprostenol (Prostazyklin) wurde erstmals in den frühen 1980er Jahren zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt und war das erste Medikament, das für diese Indikation in den USA und mehreren europäischen Ländern zugelassen wurde. Es besitzt sowohl vasodilatative als auch antiaggregatorische Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl die Hämodynamik als auch die Überlebensrate

verbessert (Barst, Rubin *et. al.* 1996). Die Risiken, die mit dieser Darreichungsform über einen ständigen venösen Zugang verbunden sind, können jedoch schwerwiegend sein: Infektionen, Thrombose, Sepsis, abrupte Unterbrechung der lebensnotwendigen Medikamentenzufuhr durch Verlegung des Katheters oder Versagen der Pumpe. Deshalb wurde ein stabiles Prostazyklinanalogon, Treprostinil, zur kontinuierlichen subkutanen Darreichungsform entwickelt. Weiterhin erfolgte die Etablierung eines oral verfügbaren Prostazyklins, Beraprost, welches viermal täglich eingenommen wird, sich in klinischen Studien jedoch als weniger effektiv erwiesen hat.

Inhalativ verabreichtes Iloprost hat den Vorteil, selektiv in den erkrankten Gefäßbezirken zu wirken und keine systemisch-vasodilatativen Effekte hervorzurufen (Olschewski *et. al.* 1996). Der Nachteil von inhalativem Iloprost ist die relativ kurze Halbwertszeit, die 6 bis 12 Inhalationen täglich notwendig macht. Ein weiterer Nachteil der Therapie mit Prostaglandinen ist die Tatsache, dass nach einiger Zeit eine pharmakodynamische Toleranz eintritt und die Dosis sukzessive gesteigert werden muß, um gute Behandlungsergebnisse zu erzielen.

Endothelinrezeptorantagonisten:

Bosentan ist ein oral verfügbarer Endothelinrezeptorantagonist, welcher sowohl systemisch als auch pulmonal vasodilativ wirkt und den pulmonalarteriellen Druck und das Herzzeitvolumen signifikant zu verbessern vermag. Es existieren jedoch noch keine Langzeitstudien, und in einigen Patienten wurde über erhöhte Leberenzymwerte unter Therapie berichtet, so daß Bosentan nicht bei Patienten mit portopulmonaler Hypertonie angewendet werden darf.

Phosphodiesterasehemmer:

Der PDE 5/6 Hemmer Sildenafil (Viagra[®] bzw. Revatio[®], Pfizer) ist ein wirksames vasodilatives Medikament. Oral appliziertes Sildenafil verstärkt und verlängert die vasodilatativen Effekte von inhaliertem Iloprost. Es besteht jedoch unter Langzeitmedikation das Risiko einer Retinaschädigung (durch Hemmung der Phosphodiesterase 6 im Auge).

Stickstoffmonoxid:

Inhaliertes Stickstoffmonoxid bewirkt eine akute und effektive Vasodilatation in der Lunge, muß jedoch wegen der sehr kurzen Halbwertszeit kontinuierlich verabreicht werden. Nicht alle Patienten sprechen auf Stickstoffmonoxid an.

Der Nachteil der oben genannten geläufigen Behandlungsformen besteht darin, dass bislang nur unzureichende Berichte über mögliche antiproliferative Langzeiteffekte existieren. Es ist deshalb noch unklar, ob Prostaglandine, Phosphodiesterasehemmer oder Endothelinantagonisten zusätzlich zu ihrer vasodilatativen Aktivität ein Fortschreiten der Erkrankung auf längere Sicht verhindern oder gar die schwerwiegende Gefäßproliferation rückgängig machen können.

Es wird jedoch zunehmend klar, dass eine Behandlungsstrategie, soll sie wirklich effektiv sein und eine Regression der Erkrankung bewirken, in erster Linie gegen die schweren proliferativen Gefäßumbauprozesse gerichtet sein muß.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurde die vorliegende experimentelle Therapiestudie durchgeführt. Es sollte am Rattenmodell eine bereits klinisch zugelassene Substanz getestet werden, die nachweislich keine vasodilatative Komponente (weder systemisch noch pulmonalarteriell) aufweist. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Imatinib durch Hemmung eines mitogenen Zytokins, PDGF, in der Lage ist, die Gefäßveränderungen im Verlauf der PAH direkt positiv zu beeinflussen und eine Regression der Gefäßproliferation in schwerkranken Ratten herbeizuführen.

Dabei zeigte es keinen signifikanten Einfluß auf den systemisch arteriellen Druck. Die starke Reduktion des rechtsventrikulären Druckes, die Verminderung der Rechtsherzhypertrophie und die histomorphometrisch erfasste fast völlige Regression der *de novo*-Muskularisierung und Gefäßwandverdickung ist also direkt und ausschließlich auf die antiproliferative Wirkung der Substanz zurückzuführen. Dies beweisen außerdem weiterführende *in vivo* und *in vitro* Studien zu Apoptose und Proliferation (Schermyly *et. al.* 2005).

4.3 Experimentelles Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte- Vergleichbarkeit zur PAH des Menschen

Um tiefere Einblicke in die Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie zu bekommen und um neue Therapieansätze zu testen, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, die alle in mehr oder weniger großem Ausmaß die pathophysiologischen und klinischen Veränderungen, die bei der PAH auftreten, imitieren.

Das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte ist unter den bestehenden Modellen dasjenige, welches den drastischen klinischen Verlauf und die Sterblichkeit der IPAH des Menschen am deutlichsten nachzeichnet.

Vergleicht man Monocrotalin-injizierte Ratten aus tierärztlicher Sicht mit Patienten, die je nach Schweregrad ihrer Erkrankung in NYHA-Klassen (Klassifizierung siehe Tabelle 5) eingeteilt werden, so besteht 4 Wochen nach Monocrotalin-Injektion eine PAH nach NYHA II-III. Die Tiere zeigen deutliche Anzeichen allgemeinen Unwohlseins, und unter leichter Belastung (z.B. Hochheben, Wiegen) entwickeln sie starke Dyspnoe und Zyanose.

6 Wochen nach Monocrotalin-Injektion ist der Krankheitsverlauf so weit fortgeschritten, dass eine Dyspnoe auch in Ruhe oder bei leichter körperlicher Aktivität auftritt und die Tiere jegliche Bewegung meiden (NYHA III-IV). Manifeste Anzeichen von Rechtsherzinsuffizienz äußern sich in peripheren Ödemen und Zyanose. Die Mortalität durch Rechtsherzversagen in diesem Krankheitsstadium erreicht 50%. Nicht selten besteht zu diesem Zeitpunkt ein rechtsventrikulär-systolischer Druck, der systemische Werte oder gar suprasystemische Werte erreicht, was in der Autopsie durch transsudative Thoraxergüsse ersichtlich wird (RVSP \geq 100 mmHg; eigene Beobachtungen).

Die proliferativen Gefäßveränderungen im Lungenparenchym und in den Lungengefäßen sind sehr schwerwiegend und auf den ersten Blick auch durch wenig erfahrene Personen zu erkennen.

Tabelle 5: New York Heart Association (NYHA) Klassifizierung der PH des Menschen

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, Brustschmerzen oder drohende Synkope
Klasse III
merkliche Limitierung der körperlichen Aktivität in Ruhe keine Beschwerden. Leichtere als gewöhnliche Bewegung verursacht Dyspnoe oder Ermüdung, Brustschmerz oder drohende Synkope
Klasse IV
Unfähigkeit, jegliche körperliche Aktivität ohne Symptomatik auszuführen. Diese Patienten manifestieren Anzeichen von Rechtsherzversagen. Dyspnoe und/oder Ermüdung können sogar in Ruhe vorhanden sein. Beschwerden verstärkt bei jeglicher körperlicher Aktivität

Ein Nachteil des Monocrotalin-Modells besteht darin, dass es nicht in vollem Umfange die pathognomonischen Gefäßveränderungen des Menschen nachzuvollziehen vermag (siehe dazu auch Tabelle 1, Einleitung). Es fehlen die plexiformen Läsionen und eine deutliche Neointimabildung. Eine moderate intimale Schwellung und Proliferation kann jedoch bei Monocrotalin-behandelten Ratten beobachtet werden, bei denen der RVSP systemische Werte annimmt (Tanaka *et. al.* 1996; eigene Beobachtungen).

Da die MCT-PAH durch ein Toxin induziert wird, kann es natürlich nicht exakt den (meist offensichtlich nicht toxin-bedingten) Krankheitsverlauf des Menschen widerspiegeln. Es bleibt aber zu betonen, dass die toxisch bedingten Lungenveränderungen und Endothelschädigungen nur den initiierenden Mechanismus darstellen, da das Monocrotalin nach 24 Stunden nahezu völlig aus dem Körper eliminiert ist (Hayashi *et. al.* 1967) und dass die initialen Veränderungen danach in einem sich selbst aufrecht erhaltenden Prozeß fortschreiten.

In einem Rattenmodell besteht weiterhin nicht die Möglichkeit, putative Pathomechanismen durch speziell genveränderte Tiere zu charakterisieren, wie dies bei Mäusen möglich ist.

Das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, sowohl bei der Ratte als auch vor allem bei der Maus, ist sowohl klinisch als auch pathohistologisch weniger schwerwiegend als das Monocrotalin-Modell. Es fehlen insbesondere eine erhöhte Sterblichkeitsrate und deutliche proliferative Gefäßveränderungen. Es wird außerdem

postuliert, dass die Hypoxie-induzierten vaskulären Veränderungen zum Teil vasokonstriktorischer Natur sind und es zu keinem konzentrischen Gefäßremodelling mit Verringerung der Lumenfläche kommt (van Suylen *et. al.* 1998). Die Hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozesse sind nach Verbringen der Tiere in normale Raumluft teilweise reversibel. Leider ist es jedoch bis jetzt nicht gelungen, durch Monocrotalin in der Maus eine pulmonale Hypertonie hervorzurufen. Mäuse reagieren auf die Verabreichung von Dehydromonocrotalin (dem aktiven Metaboliten) lediglich mit akut entzündlichen, ödematösen und später leichten fibrotischen Lungenparenchymveränderungen. Die Lungengefäße sind davon weniger betroffen (Dumitrascu *et. al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Da nur am Mausmodell im großen Stil genetisch veränderte Individuen untersucht werden können, bleibt bis dato die hypoxische Lungenschädigung das einzige breit anwendbare Mausmodell.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Monocrotalin-Modell der Ratte gewählt, weil es eine leicht induzierbare, schwere und gut reproduzierbare pulmonale Hypertonie verursacht, die viele pathohistologische und pathophysiologische Gemeinsamkeiten zum Menschen aufweist.

4.4 PDGF und seine Hemmung in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie

PDGF- α Rezeptor und PDGF- β Rezeptor sowie ihre Liganden werden von glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, mononukleären Entzündungszellen und Fibroblasten sowie anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs synthetisiert. Ihre Expression ist als Antwort auf verschiedene pathologische Stimuli erhöht (Heldin & Westermark, 1999).

1988 verabreichten Ganey *et. al.* in einem präventiven Therapieansatz Monocrotalinpyrrol- (Dehydromonocrotalin) behandelten Ratten einen selbst hergestellten polyklonalen Antikörper gegen PDGF. Die intravenöse Injektion des Antikörpers begann am Tag der Monocrotalinpyrrol-Applikation und wurde über die folgenden 13 Tage fortgesetzt. Die Gruppe konnte keinen positiven therapeutischen

Effekt des Antikörpers auf die Erhöhung des PAP und die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie feststellen.

Die Autoren führen in der Diskussion aus, es sei möglich, dass andere Behandlungsprotokolle zu anderen Ergebnissen führen könnten (d.h. Dosiserhöhung des Antikörpers, andere Aufbereitung des Antikörpers). Es wird außerdem diskutiert, dass der intravenös verabreichte Antikörper gegen PDGF von peripheren Thrombozyten sezerniertes PDGF blocken konnte, er aber nicht in der Lage war, PDGF, welches durch Endothel- oder glatte Muskelzellen sezerniert wurde, zu neutralisieren. Es wird weiterhin postuliert, dass Endothelzellen/ glatte Gefäßmuskelzellen in einer autokrinen und parakrinen Weise agieren (PDGF, das von einer Zelle produziert wird, interagiert mit Rezeptoren der gleichen oder benachbarter Zellen), und dass systemisch verabreichter Antikörper gegen PDGF nicht in der Lage ist, diese lokalen Stimulationswege zu hemmen. Die Autoren lassen außerdem Expressionsstudien zu PDGF in den Monocrotalin-behandelten Rattenlungen vermissen. Es besteht die Möglichkeit, dass PDGF erst in der späteren Krankheitsentwicklung eine größere Rolle spielt und erst dann im erkrankten Lungengewebe überexprimiert wird.

Es ist bekannt, dass mechanische Scherkräfte die Expression von PDGF erhöhen (Hsieh *et. al.* 1991) und dass im humanen PDGF-B Promoter von Endothelzellen ein ‚shear streß responsive element‘ existiert, welches unter erhöhtem Fluß die Transkription von PDGF fördert (Resnick, 1995). Die Verabreichung eines Antikörpers gegen PDGF zu einem Zeitpunkt, wo noch keine verstärkten Scherkräfte in den Lungengefäßen vorhanden sind (bis 2 Wochen nach MCT-Injektion) könnte somit das Ausbleiben eines Therapieerfolges erklären.

Diese These wird zusätzlich unterstützt durch die Arbeit von Tanabe *et. al.* (2000), die zeigen konnten, dass in Pulmonalarterien von Monocrotalin-behandelten Ratten PDGF- β Rezeptor durch mechanische Scherkräfte stärker exprimiert wird als in Kontrollratten. Sie konnten auch zeigen, dass Scherkräfte eine vermehrte Phosphorylierung von Tyrosinresten des PDGF- β Rezeptors in den Zellen bewirken.

In der vorliegenden Inauguraldissertation beginnt die Verabreichung des PDGF-Rezeptorantagonisten Imatinib erst 4 Wochen nach Monocrotalin-Injektion, zu einem Zeitpunkt also, wenn eine schwere pulmonale Hypertonie und ausgedehnte Gefäßproliferationen bereits vorliegen. Der Nachweis einer Überexpression von

PDGF-B in Gefäßen von Rattenlungen 42 Tage nach Monocrotalin wurde immunhistochemisch erbracht. Durch die sehr hohe Bioverfügbarkeit und lange Halbwertszeit von Imatinib ist dieses höchstwahrscheinlich in der Lage, auch die para- und autokrinen Stimulationswege glatter Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und perivaskulärer Zellen in der Lunge zu hemmen, und seine Wirkung beschränkt sich dadurch nicht auf die PDGF-Rezeptorblockade peripherer Thrombozyten. Das Medikament blockiert die ATP-Bindungstasche der Rezeptortyrosinkinase und verhindert somit die (durch Tanabe *et. al.* postulierte) durch mechanische Scherkräfte verstärkte Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors.

Mittels einer antisense-RNA gegen PDGF-A konnten Fukuda *et. al.* 1997 die arterielle Proliferation in spontan hypertensiven Ratten wirksam hemmen.

Balasubramaniam *et. al.* erzielten gute Therapieerfolge mit einem spezifischen Aptamer gegen PDGF-B in einem Schafmodell der persistierenden pulmonalen Hypertonie des Neugeborenen (Balasubramaniam *et. al.* 2003). Sie untersuchten die Expression von PDGF alpha und beta Rezeptoren und die Expression der Liganden in Lämmern mit chronischer intrauteriner PH nach partieller Ligation des Ductus arteriosus (DA). Western Blots von Lungenhomogenat pulmonalhypertensiver Tiere 8 Tage nach der DA-Ligation zeigten einen zweifachen Anstieg in PDGF alpha und beta Rezeptorproteinen im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Behandlung der Tiere vom Tag 1 bis 8 nach DA-Ligation mit einem selektiven Aptamer gegen PDGF-B reduzierte die Entstehung einer Mediahypertrophie kleiner Pulmonalarterien und die Rechtsherzhypertrophie. In diesem Tiermodell der persistierenden pulmonalen Hypertonie des Neugeborenen wirken bereits unmittelbar nach Ligation des DA erhöhte Scherkräfte auf die pulmonalen Endothelzellen ein und es herrscht ein erhöhter Blutfluß durch die Lunge, was das therapeutische Ansprechen der Lämmer auf eine unmittelbar nach DA-Ligation beginnende Therapie gegen PDGF erklärt und die These untermauert, dass bereits erhöhte Scherkräfte und ein erhöhter Blutfluß vorhanden sein müssen, um erfolgreich therapeutisch gegen PDGF intervenieren zu können.

Jankov *et. al.* konnten kürzlich in einem Rattenmodell der hyperoxischen pulmonalen Hypertonie durch Verwendung von Immunhistochemie und Western Blot Analysen eine starke Hochregulierung von alpha- und beta PDGF-Rezeptoren in den hypertensiven Tieren zeigen (Jankov *et. al.* 2005). Sie berichteten auch in einer

früheren Publikation (Buch *et. al.* 2000) über eine erhöhte PDGF-BB Expression in den Gefäßwänden im gleichen Tiermodell und über erhöhte mRNA-Level von PDGF-B, PDGF- α Rezeptor und PDGF- β Rezeptor.

Durch immunhistochemische Färbungen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass PDGF in Monocrotalin-behandelten Ratten in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen im Vergleich zu gesunden Ratten stark überexprimiert ist. PDGF- β Rezeptor ist in Monocrotalin-behandelten Ratten perivaskulär sehr stark präsent. Weiterhin wurde die starke Expression von perivaskulär lokalisiertem PDGF- β Rezeptor bei an PAH erkrankten Menschen im Vergleich zu einer gesunden Spenderlunge gezeigt. Die Überexpression von PDGF-Rezeptor bzw. Ligand als Gemeinsamkeit zwischen Rattenmodell und menschlicher pulmonalarterieller Hypertonie impliziert eine gute Anwendbarkeit dieses Tiermodelles im Hinblick auf mögliche therapeutische Einsätze von PDGF-Rezeptorantagonisten beim Menschen. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Studie außerdem nachgewiesen werden, dass auf Proteinebene (Western Blots) PDGF- β Rezeptor in Monocrotalin-Ratten und in Lungen von Patienten mit IPAH stark überexprimiert vorliegt.

Diese Arbeit ist die erste Studie, die eine erfolgreiche therapeutische Blockade von PDGF mittels eines klinisch zugelassenen und hinreichend erprobten selektiven Rezeptortyrosinkinasehemmers beschreibt. Der Therapieerfolg umfasst sehr eindrucksvoll alle ermittelten Parameter. Die vorausgehend erläuterten experimentellen Studien beschränkten sich hingegen auf die Verwendung (klinisch nicht relevanter) Antikörper, Aptamere oder antisense-RNA, um therapeutisch PDGF und seine Rezeptoren zu hemmen.

4.5 Experimentelle antiproliferative Ansätze im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie

Die Injektion von Monocrotalin führt, wie bereits erwähnt, zu schweren proliferativen Gefäßveränderungen und nach einigen Wochen zum Tod der Tiere durch Rechtsherzversagen. Um in diesem Modell wirksame therapeutische Effekte zu erzielen, wird sehr oft eine präventive Therapiestrategie oder eine therapeutische

Intervention nach nicht voll ausgebildeter pulmonaler Hypertonie gewählt (siehe Tabelle). Der in der Literatur am häufigsten beschriebene Zeitpunkt des Therapiebeginns zur Untersuchung kurativer Effekte ist 21 Tage nach Monocrotalin.

Tabelle 5: gängige Zeitpunkte des Therapiebeginns nach MCT-Injektion

Veröffentlichung	Substanz	Therapiebeginn	kurativ/ präventiv
Voelkel 1994	Interleukin-1 Rezeptorantagonist	zus. mit MCT	präventiv
Prié 1997	Endothelin A Rezeptorantagonist	2d vor MCT	präventiv
Mitani 1997	L-Arginin	3d vor MCT 9d nach MCT	präventiv kein Effekt
Nagata 1997	Thromboxan-Inhibitor	zus. mit MCT	präventiv
Cowan 2000	Serin Elastase Inhibitor	21d nach MCT	kurativ
Jasmin 2001	Endothelin Rezeptorantagonisten	14d nach MCT	früh kurativ
Nishimura 2002	Simvastatin	zus. mit MCT 14d nach MCT	präventiv früh kurativ
Abe 2003	Rho-Kinase Inhibitor	zus. mit MCT 21d nach MCT	präventiv kurativ
Nagaya 2003	endotheliale Progenitorzellen	7d nach MCT	sehr früh kurativ
Vaszar 2004	Tryptolid	zus. mit MCT	präventiv
Lu Jun 2004	MAPK-Inhibitor	1d nach MCT	präventiv
Itoh 2004	Natriuretisches Peptid (CNP)	zus. mit MCT 21d nach MCT	präventiv kurativ
Ono 2004	Gentherapie mit HGF	14d nach MCT	früh kurativ
Mc Murtry 2004	Dichloroacetat	1d nach MCT 14d nach MCT 21d nach MCT	präventiv früh kurativ kurativ
Mc Murtry 2005	Anti-Survivin-Gentherapie	zus. mit MCT 13d nach MCT	präventiv früh kurativ
Guignabert 2005	5-HTT-Blockade	zus. mit MCT 21d nach MCT	präventiv kurativ
Merklinger 2005	EGF-Rezeptorantagonist MMP-Inhibitor $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Blocker	21d nach MCT 21d nach MCT 21d nach MCT	kurativ kurativ kein Effekt

Aufgelistet sind experimentelle antiproliferative Therapieansätze im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie. Es ist ersichtlich, dass die meisten Therapiestrategien präventive oder sehr früh kurative Ansätze verfolgen, wenn die pathophysiologischen Veränderungen noch nicht stark ausgeprägt sind und ein Therapieerfolg leichter herbeizuführen ist. Der am häufigsten gewählte Zeitpunkt zur Untersuchung kurativer Effekte ist 14-21 Tage nach MCT-Injektion.

In der vorliegenden Studie dagegen beginnt die therapeutische Intervention mit Imatinib sogar erst eine Woche später, also 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion, wenn eine schwere pulmonale Hypertonie und ausgeprägte Gefäßveränderungen manifest sind. Es wird also ein spät kurativer Therapieansatz verfolgt (was am ehesten der Situation beim Menschen und der Relevanz eines experimentellen

Therapieerfolgs zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie des Menschen entspricht). Dieser späte kurative Ansatz resultierte in einer 100% Überlebensrate der Ratten unter Therapie und einer signifikanten Verbesserung aller erfassten pathophysiologischen Parameter.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie interessanterweise ein partieller Rückgang der proliferativen Gefäßveränderungen, eine Verringerung des pulmonalarteriellen Druckes und eine verbesserte Überlebensrate der Ratten unter Therapie mit einem klinisch verfügbaren Hemmstoff der Tyrosinkinase des epidermal growth factors (EGF) erzielt werden (Merklinger *et. al.* 2005).

Die Tyrosinkinase des EGF sowie deren Signaltransduktionsmechanismen ähneln stark jenen des Platelet-derived growth factors. Somit decken sich die Ergebnisse dieser Studie mit den in dieser Arbeit beschriebenen Therapieerfolgen durch Hemmung der Tyrosinkinase von PDGF.

4.6 PDGF-Expression in humaner PAH

Eine erhöhte Expression von PDGF findet sich zum Beispiel bei Patienten mit Sklerodermie, einem Leiden, das mit einer erhöhten Inzidenz für pulmonale Hypertonie einhergeht. Weiterhin ist bekannt, dass PDGF in verschiedenen fibroproliferativen Erkrankungen eine Rolle spielt, darunter Atherosklerose, idiopathische pulmonale Fibrose, Bronchiolitis obliterans, Pneumokoniosen und Lungenschädigungen durch toxische Sauerstoffkonzentrationen (zusammengefasst durch Heldin & Westmark, 1999).

Humbert *et. al.* verglichen 1998 die PDGF-Expression in Lungenbiopsien bzw. Paraffinschnitten HIV-1 seropositiver und –negativer PAH-Patienten mit derjenigen in HIV-1 seropositiven und –negativen Individuen ohne pulmonalarterielle Hypertonie. Eine (vermittels semiquantitativer PCR) nachgewiesene erhöhte pulmonale Menge PDGF-A m-RNA war in allen PAH-Patienten vorhanden, unabhängig von einer HIV-Infektion. Immunhistochemisch und mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung konnten sie außerdem bei den pulmonalhypertensiven HIV-Patienten eine Überexpression von PDGF-AB bzw. PDGF-A zeigen. Lungen von nicht-HIV-infizierten PAH-Patienten

wurden in dieser Studie nicht immunhistochemisch untersucht, da in diesen Fällen nur Biopsiematerial vorhanden war.

Die immunhistochemische Lokalisation von PDGF in den erkrankten Lungen entsprach einem perivaskulären Muster und schien entzündungszell-assoziiert. Eine perivaskuläre Anhäufung von Entzündungszellen wird auch in HIV-negativen Patienten mit PAH beschrieben (Tuder 1994, Voelkel und Tuder 1995). Die örtliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren, darunter PDGF, im Bereich der erkrankten Lungengefäße könnte somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung der charakteristischen Gefäßumbauprozesse spielen. Die Autoren postulieren, dass die erhöhte Inzidenz von PPH in HIV-1 seropositiven Individuen auf eine anormale Synthese von Wachstumsfaktoren in manchen genetisch prädisponierten Individuen zurückzuführen sein könnte.

Möglicherweise mag dies nicht nur auf HIV-1 zutreffen. Im Verlauf einer Infektion mit dem Simian Sarcoma Virus (SSV) bei Makaken kann es zu Fibrosarkomen und auch zu fibroproliferativen Prozessen und perivaskulären Entzündungen in den Pulmonalarterien kommen. Interessanterweise ist das *v-sis* Onkogenprodukt beim Simian Sarcoma Virus identisch mit dem Vorläufermolekül der PDGF-B-Kette und wird in ähnlicher Weise synthetisiert, zusammgebaut und externalisiert. *V-sis* führt dann zu einer autokrinen Transformation bei Zellen, die PDGF- β und/ oder α -Rezeptoren exprimieren (Heldin & Westmark, 1999).

Da in der beschriebenen Studie von Humbert *et. al.* PDGF-A mRNA bei allen untersuchten PAH-Patienten (unabhängig, ob HIV-1 seropositiv) erhöht war, besteht die Möglichkeit, dass eine abnorme Produktion von PDGF in allen Formen der PAH eine Rolle spielt.

In dieser Dissertation wird erstmals die Überexpression von PDGF- β Rezeptoren in Lungen von Patienten mit IPAH gezeigt. Die Lokalisation der Rezeptoren entspricht dabei dem von Humbert *et. al.* beschriebenen perivaskulären Muster des Liganden und bestätigt die These, dass PDGF und seine Rezeptoren in PAH überexprimiert sind und dass eine Therapie gegen PDGF auch beim pulmonalhypertensiven Menschen große Erfolge erzielen könnte. In unserem Therapieansatz wird durch Imatinib die perivaskuläre Überexpression von PDGF-Rezeptoren gehemmt. Dies hat zur Folge, dass die Muskularisierung und die Verdickung der medialen Wandstärke in den erkrankten Gefäßen signifikant reduziert wird und dass in Konsequenz der

pulmonalarterielle Druck sowie die Rechtsherzhypertrophie deutlich vermindert werden.

Diese Untersuchung macht die Tatsache deutlich, dass am Prozeß des pulmonalvaskulären Remodelings alle Gefäßschichten gleichermaßen beteiligt sind und dass die verschiedenen Zelltypen (Endothel, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Entzündungszellen) einer starken gegenseitigen Wechselwirkung und Beeinflussung unterliegen. Diese Studie regt zu weiteren Untersuchungen an, die diese komplizierten, nichtsdestotrotz hochinteressanten, para- und autokrinen Pathomechanismen und Wechselwirkungen weiter charakterisieren.

Interessanterweise konnten in einer Studie mit pulmonalhypertensiven Patienten keine erhöhten Spiegel von PDGF in peripheren Thrombozyten oder Blutserum nachgewiesen werden (Eddahibi *et. al.* 2000).

Dies untermauert die gerade erläuterte Hypothese, dass eine verstärkte Expression von PDGF insbesondere lokal fokussiert in den erkrankten Gefäßbereichen zu finden ist und dass die Mechanismen, die dabei zur Gefäßproliferation führen, autokrin oder parakrin bedingt sind.

Die immunhistochemischen Färbungen für PDGF Rezeptor und Ligand von Humbert *et. al.* und in dieser Dissertation lassen deutlich erkennen, dass dieses Zytokin und sein Rezeptor bei humaner PAH und im Rattenmodell peri- und endovaskulären Ursprungs sind. Dafür spricht auch die an früherer Stelle erwähnte Studie von Ganey *et. al.*, die durch einen polyklonalen Antikörper gegen PDGF zwar thrombozytäres PDGF, nicht aber die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie hemmen konnten.

4.7 Ausblick: Anwendung von Imatinib in der pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen

Für einen möglichen erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Imatinib in der PAH des Menschen sprechen zusätzlich einige praktische Tatsachen:

Der platelet-derived growth factor Rezeptorantagonist Imatinib konnte bei unseren schwerkranken Ratten einen beeindruckenden Therapieerfolg in allen untersuchten Parametern aufzeigen. Dabei entsprach die Dosis der mittleren klinischen Dosierung beim Menschen (Glivec® Fachinformation, Novartis Pharma).

Das Medikament ist klinisch bereits für zwei Indikationen (CML und gastrointestinale Stromatumoren) zugelassen; die Zulassung erfolgte vorbildlich schnell (Capdeville, Buchdunger *et. al.* 2002). Imatinib ist sehr gut oral verfügbar und hat eine lange Halbwertszeit, was im Vergleich zu Prostazyklinen oder inhaliertem NO eine bequeme Anwendung sichert (nur einmal tägliche orale Einnahme). Dies ist insbesondere für schwerkranke Patienten von Nutzen und sichert eine gute Compliance des Patienten. Die Nebenwirkungen bei bestimmungsgemäßigem Gebrauch sind mild bis moderat und es bestehen keine bekannten Kontraindikationen für Patienten mit pulmonaler Hypertonie.

Diese Arbeit macht deutlich, dass das Medikament in Monocrotalin-induzierter PAH beeindruckende antiproliferative Wirkungen ohne signifikante Beeinflussung des systemisch-arteriellen Druckes zeigt. Damit ist es auch für schwerkranke Patienten mit stark reduziertem Herzzeitvolumen geeignet, bei denen eine systemische Vasodilation kontraindiziert ist und bei denen die erkrankten Gefäße eine stark verminderte vasodilatorische Kapazität aufweisen.

Die Nebenwirkungen bei bestimmungsgemäßer Anwendung sind mild bis moderat (Cohen *et. al.* 2002).

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurde daraufhin die limitierte Anwendung von Imatinib in ausgewählten Fällen pulmonalarterieller Hypertonie in Erwägung gezogen. Ghofrani *et. al.* beschrieben kürzlich im New England Journal of Medicine den Fall des ersten Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie, der zum Zeitpunkt seines Berichtes seit über 6 Monaten mit Imatinib behandelt wurde. Ghofrani berichtet über eine signifikante Reduktion des pulmonalvaskulären Widerstandsindex und einer Erhöhung des Herzzeitvolumens unter Stagnation des mittleren pulmonalarteriellen Druckes sowie eine deutliche Verbesserung der 6 Minuten Gehstrecke des Patienten (Ghofrani *et. al.* 2005).

Die gegenwärtige Forschung fokussiert sich mehr und mehr auf neue antiproliferative Ansätze zur Bekämpfung der pulmonalarteriellen Hypertonie.

Es scheint immer deutlicher zu werden, dass die Ära der rein vasodilatorischen Therapieansätze zur Behandlung der PAH in naher Zukunft durch diese (tiefergreifenden) antiproliferativen Konzepte abgelöst werden kann, und es bleibt zu hoffen, dass diese Behandlungsmaßnahmen nicht nur die hämodynamischen Parameter und die Lebensqualität der Patienten sondern auch ihre Überlebensrate verbessern und dass die antiproliferative Strategie eine neue, wirksame Waffe im Kampf gegen das bislang tödliche Syndrom der pulmonalen Hypertonie darzustellen vermag.

5 Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwere, lebensbedrohliche Erkrankung, die durch eine deutliche, anhaltende Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes, charakteristische Umbauprozesse der Pulmonalarterien (Remodelling) und der Entwicklung eines *Cor pulmonale* gekennzeichnet ist.

Das Voranschreiten der pulmonalen Hypertonie ist unter anderem verbunden mit gesteigerter Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen der Lunge. Platelet derived growth factor (PDGF) ist ein starkes Mitogen und an diesem Prozeß beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß des PDGF Rezeptorantagonisten STI 571 (Imatinib, Glivec®) untersucht. Wir konnten zeigen, dass STI 571 in der Lage ist, in einem experimentellen Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie den schweren Krankheitsprozeß nicht nur zu stoppen sondern vielmehr sogar fast vollständig rückgängig zu machen.

Die Therapie der Ratten begann 28 Tage nach Injektion von Monocrotalin, das heißt, nach Etablierung einer schweren pulmonalen Hypertonie. Eine zweiwöchige Behandlung resultierte in einer 100% Überlebensrate, im Vergleich zu 50% bei den mit Placebo behandelten Ratten. Die pathologischen Veränderungen im rechtsventrikulären Druck (am narkotisierten Tier sowie auch kontinuierlich am wachen Tier vermittelt telemetrischer Sensoren gemessen) und die Rechtsherzhypertrophie der pulmonalhypertensiven Tiere erreichten nach zweiwöchiger Therapie mit Imatinib wieder Werte, die mit denen gesunder Ratten vergleichbar sind. Der systemisch-arterielle Druck unterschied sich in keiner Gruppe signifikant, wodurch rein vasodilative Eigenschaften von Imatinib ausgeschlossen werden können. Die schweren Gefäßumbauprozesse, hier durch den Muskularisierungsgrad, die Wandstärke und die Lumenfläche peripherer Lungenarterien charakterisiert, regenerierten sich fast vollständig. Weiterhin wurde immunhistochemisch die Überexpression des PDGF- β Rezeptors und seines Liganden PDGF-B in den Lungen der Monocrotalin-stimulierten Ratten sowie in Lungenschnitten pulmonalhypertensiver Patienten gezeigt.

Obwohl für viele gängige Therapien postuliert, fehlt bislang der direkte Beweis für eine antiproliferative Wirkung. Die meisten Behandlungsformen der PAH zielen eher auf eine Vasodilation und dadurch verminderten Gefäßwiderstand in den Lungenarterien.

Die vorliegende Arbeit stellt den ersten kurativen Ansatz in einem experimentellen Modell der pulmonalarteriellen Hypertonie dar, der durch die gezielte Hemmung der PDGF-Rezeptoren mittels eines klinisch zugelassenen Tyrosinkinasehemmers zu einem deutlichen, antiproliferativ bedingten Therapieerfolg führt und keine vasodilative Komponente aufweist.

6 Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe, life-threatening disease characterised by a sustained elevation in pulmonary arterial pressure, remodelling of the pulmonary arteries and development of *Cor pulmonale*.

The progression of pulmonary hypertension is paralleled by an increased proliferation and migration of pulmonary vascular smooth muscle cells. Platelet derived growth factor (PDGF) is a potent mitogen and is a key mediator of these processes. The aim of the present study was to investigate the impact of STI 571 (Imatinib) on hemodynamics, gas exchange, histology and survival in Monocrotaline-induced PAH. We demonstrated that STI 571 is capable of not only arresting but also reversing the disease progression in this experimental rat model of PAH.

Treatment of rats with STI 571 was initiated 28 days after MCT administration, after severe pulmonary hypertension was fully established. Two weeks of treatment with STI 571 resulted in a 100% survival compared to 50% survival in placebo-treated rats. Pathological changes in right ventricular pressure (measured in anaesthetised, as well as in fully conscious animals by implanted telemetric sensors) and right heart hypertrophy were significantly decreased after two weeks of treatment with Imatinib down to values comparable with those of normal healthy rats.

Systemic arterial pressure did not change significantly in any of the animal groups investigated, thereby ruling out mere vasodilative properties of Imatinib. The severe vascular remodeling was determined by the degree of muscularization, the medial wall thickness and the lumen area of peripheral pulmonary vessels. The treated group exhibited an almost complete regeneration of the arterial walls.

Although antiproliferative effects have been postulated for many treatment strategies currently employed for PAH, however, direct proof is still missing. Most treatment regimens are rather based on vasodilation, and thus lead to a decreased vascular resistance in the lungs.

The present study is the first to describe an antiproliferative curative approach to PAH. This approach is directed at a targeted inhibition of PDGF receptors by a clinically approved tyrosine kinase inhibitor, in an experimental model of PAH without exerting significant vasodilator effects.

7 Literaturverzeichnis

Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, Lee LB, Mc Mahon G, Grone HJ, Lipson KE, Huber PE (2005) *Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis* **J Exp Med** 2005; 201:925-935

Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshita A (2004) *Long-term treatment with a rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats* **Circ Res** 2004; 94:385-393

Allen JR, Carstens LA (1970) *Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats* **Exp Mol Pathol** 1970; 13(2):159-171

Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S (2005) *Imatinib as a novel antifibrotic agent in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice* **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 171:1279-1285

Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH (2003) *Role of platelet derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus* **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 284:L826-L833

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

Bergsten D, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostmann A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U (2001) *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor* **Nat Cell Biol** 3:512-516

Boström H, Willetts K, Pekny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C (1996): *PDGF-A signalling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis* **Cell** 85:863-873

Buch S, Han RN, Cabacungan J, Wang J, Yuan S, Belcastro R, Deimling J, Jankov R, Luo X, Lye SJ, Post M, Tanswell AK (2000) *Changes in expression of platelet-derived growth factor and its receptors in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% O₂* **Pediatr Res** 2000; 48:423-433

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

Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A (2002) *Glivec (STI 571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug* **Nature Reviews Vol 1, July 2002**

Cohen M, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, Khin Maung U, Staten AM, Pazdur R (2002)

Approval Summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia **Clin Cancer Res** **2002**; **8:935-942**

Cournand AW, Ranges HA. (1941) *Catheterization of the right auricle in man* **Proc Soc Exp Biol Med** **1941**; **46:62**

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

Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, Leof EB (2004) *Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis* **J Clin Invest** **2004**; **114:1308-1316**

Deng Z, Morse JH, Slager SL (2000) *Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene* **Am J Hum Gen** **2000**; **67:737-44**

Dirks RPH, Bloemers HPJ (1996): *Signals controlling the expression of PDGF* **Mol Biol Rep** **1996**; **22:1-24**

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

Dresdale DT, Schultz M, Michtom RJ (1951) *Primary pulmonary hypertension. 1st Clinical and hemodynamic study* **Am J Med** **1951**; **11:686**

Faul JL, Nishimura T, Berry GJ, Benson GV, Pearl RG, Kao PN (2000) *Triptolide attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats* **Am J Respir Crit Care Med** **2000**; **162:2252-2258**

Fleming T, Matsui T, Molloy CJ, Robbins KC, and Aaronson SA (1992) *Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors* **Cancer Res** **1992**; **52, 4550-4553**

Forssmann W. (1929) *Die Sondierung des rechten Herzens* **Klin Wochenschrift**, **1929**; **2085**

Fukuda N, Kubo A, Watanabe Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K (1997) *Antisense oligodeoxynucleotide complementary to platelet derived growth factor A-chain messenger RNA inhibits the arterial proliferation in spontaneously hypertensive rats without altering their blood pressures* **J Hypertens** **1997**; **15:1123-1136**

Ganey PE, Hilliker Sprugel K, White SM, Wagner JG, Roth RA (1988) *Pulmonary hypertension due to monocrotaline pyrrole is reduced by moderate thrombocytopenia* **Am J Physiol** **255 (Heart Circ Physiol 24)** **1988**; **H1165-H1172**

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

Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F (2005) *Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension* **N Engl J Med** **2005**; **353**; **13, Sept 29**

Giaid A (1998) *Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension* **Chest** 1998; **114:208S-212S**

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993) *Expression of endothelin-1 in lungs of patients with pulmonary hypertension* **N Engl J Med** 1993; **328:1732-1739**

Gilbert RE, Kelly DJ, McKay T, Chadban S, Hill PA, Cooper ME, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ (2001) *PDGF signal transduction inhibition ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis* **Kidney Int** 2001; **59:1324-1332**

Glivec ® *Fachinformation für Kliniker*, **Novartis Pharma**

Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S (2005) *Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats* **Circulation** 2005; **111:2812-2819**

Hales S. (1733) *Statical Essays: containing Haemastaticks* **Republished, New York Academy of Medicine The History of Medicine Series/ 22 Hafner Publishing, New York 1964**

Harlan JM, Thompson PJ, Ross R, Bowenpope DF (1986) *α -Thrombin induces release of platelet derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells* **J Cell Biol** 1986; **103:1129-1133**

Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW (1990) *Purification of PDGF-AA and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets* **Biochemistry** 1990; **29: 166-172**

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

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

Heath D, Yacoub M (1991) *Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy* **J Clin Pathol** 1991; **44:1003-1006**

Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998) *Signal transduction via platelet derived growth factor receptors* **Biochem Biophys Acta** 1998; **1378:F79-113**

Heldin C-H, Westermark B (1999) *Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor* **Physiological Reviews** 1999; **Vol. 79, No. 4**

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

Hoepfer MM, Wilke T, Welte T, Breuer HWM, Wagner TOF (1994) *How effective is the treatment with high-dose nifedipine for primary pulmonary hypertension?* **Semin Respir Crit Care Med** 1994; **15:490-494**

Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA (1991) *Shear stress increases endothelial platelet derived growth factor mRNA levels* **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 1991; **260:H642-H646**

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

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M (2004) *Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension* **J Am Coll Cardiol Nov** 2004 **Suppl S; 0735-1097**

Itoh T, Nagaya N, Murakami S, Fujii T, Iwase T, Ishibashi-Ueda H, Yutani C, Yamagishi M, Kimura H, Kangawa K (2004) *C-type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats* **Am J Respir Crit Care Med** 2004; **170:1204-1211**

Jankov RP, Kantores C, Belcastro R, Yin S, Rinsdale RA, Post M, Tanswell AK (2005) *A role for platelet-derived growth factor β -receptor in a newborn rat model of endothelin-mediated pulmonary vascular remodeling* **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2005; **288:L1162-L1170**

Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J (2001) *Effectiveness of a nonselective $ET_{A/B}$ and a selective ET_A antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension* **Circulation** 2001; **103:314-318**

Kameji K, Otsuka , Hayashi Y (1980) *Increase of collagen synthesis in pulmonary arteries of monocrotaline-treated rats* **Experientia** 1980; **36:441-442**

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

Kay JM, Heath D (1970) *Crotalaria spectabilis, the pulmonary hypertension plant* **Charles C Thomas. Springfield IL**

Kawai T, Hirodi S, Torikata C (1997) *Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptors* **Lab Invest** 1997; **77: 431-436**

Kinnman N, Gorla O, Wandum D, Gendron MC, Rey C, Poupon R, Housset C (2001) *Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury* **Lab Invest** 2001; **1709-1761**

Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H (1997): *Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature* **Kidney Int.** 1997; **51:438-443**

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

Lalich JJ, Ehrhard LA (1962) *Monocrotaline-induced arteritis in rats* **J Atheroscler Res** **1962**; **2**:482-498

Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW et. al. (2000) *Heterozygous germline mutations in BMP2, encoding a TGFbeta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium* **Nature Genetics** **2000**; **26**:81-4

Langleben D, Reid LM (1985) *Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy* **Lab Invest.** **1985 Mar**; **52(3)**: 298-303

LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C (2001) *PDGF-D, a new protease-activated growth factor* **Nat Cell Biol** **2001**; **3**:517-521

Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C (1994) *Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities* **Genes Dev** **1994**; **8**:1875-1887

Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H (2000) *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor* **Nat Cell Biol** **2**:302-309

Lopes AA, Maeda NY, Almeida A, Jaeger R, Ebaid M, Chamone DF (1993) *Circulating platelet aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension* **Angiology** **1993**; **44(9)**:701-706

Lu J, Shimpo H, Shimamoto A, Chong AJ, Hampton CR, Spring DJ, Yada M, Takao M, Onoda K, Yada I, Pohlman TH, Verrier ED (2004) *Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats* **J Thorac Cardiovasc Surg** **2004**; **128**:850-859

Mc Murtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED (2004) *Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis* **Circ Res** **2004**; **95**:830-840

Mc Murtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED (2005) *Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension* **J Clin Invest** **2005**; **115**:1479-1491

Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M (2005) *Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension* **Circulation** **2005**; **112**:423-431

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

Meyrick B, Gamble W, Reid L (1980) *Development of crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study* **Am J Physiol** **239**:H692-H702

Mitani Y, Maruyama K, Sakurai M (1997) *Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats* **Circulation** 1997; 96:689-697

Mitani Y, Ueda M, Maruyama K, Shimpo H, Kojima A, Matsumura M, Aoki K, Sakurai M (1999) *Mast cell chymase in pulmonary hypertension* **Thorax** 1999; 54:88-90

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

Nagata T, Uehara Y, Hara K, Igarashi K, Hazama H, Hisada T, Kimura K, Goto A, Omata M (1997) *Thromboxane inhibition and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats* **Respirology** 1997; 2:283-289

Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H (2003) *Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells* **Circulation** 2003; 108:889-895

Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN (2002) *Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats* **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 166:1403-1408

Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, Qiu D, Benson G, Pearl RG, Kao PN (2003) *Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells* **Circulation** 2003; 108:1640-1645

Nobre VM; Dantas AF; Riet-Correa F, Barbosa Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS (2005) *Acute Intoxication by Crotalaria retusa in sheep* **Toxicon** 2005 Mar 1; 45(3):347-52

Olschewski H, Walmrath D, Schermuly RT, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W (1996) *Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension* **Ann Intern Med** 1996; 124: 820-824

Ono M, Sawa Y, Mizuno S, Fukushima N, Ichikawa H, Bessho K, Nakamura T, Matsuda H (2004) *Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats* **Circulation** 2004; 110:2896-2902

Östman A, Rall L, Hammacher A, Wormstead MA, Coit D, Valenzuela P, Betzholtz C, Westermarck B, Heldin C-H (1998) *Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet derived growth factor AB heterodimer* **J Biol Chem** 1998; 263:16202-16208

Prié S, Stewart DJ, Dupuis J (1998) *Endothelin A receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension* **Circulation** 1998; 97:2169-2174

Pulmonary Circulation: *Diseases and their treatment*; edited by Andrew J Peacock, Lewis J Rubin; second edition; **Arnold Publishing London 2004**

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

Resnick N, Gimbrone MA (1995) *Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression* **FASEB J** 1995; 9:874-882

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

Richards, DW Nobel Lecture *The Contributions of Right Heart Catheterization to Physiology and Medicine with some observations of the physiopathology of pulmonary heart disease* **Nobel Lectures, Physiology or Medicine, Elsevier Publishing, Amsterdam** 1964

Romberg E. (1891) *Über Sklerose der Lungenarterien.* **Deutsch Arch Klin Med** 1891; 48; 197-206

Rosenberg HC, Rabinovitch M (1988) *Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension* **Am J Physiol** 1988; 255:H1484-1491

Rosenkranz S, Kazlauskas A (1999) *Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes* **Growth Factors** 1999; 16:201-216

Roth RA, Ganey PE (1988) *Platelets and the puzzles of pulmonary pyrrolizidine poisoning* **Toxicol Appl Pharmacol** 1988; 93(3):463-471

Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G (2001) *Big endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension* **Chest** 2001; 120:1562-1569

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

Rubin LJ, Galiè N (2004) *Pulmonary arterial hypertension: a look to the future* **J Am Coll Cardiol** Nov 12 2004 Suppl S; 0735-1097

Savikko J, Taskinen E, Von Willebrand E (2003) *Chronic allograft nephropathy is prevented by inhibition of platelet-derived growth factor receptor: tyrosine kinase inhibitors as a potential therapy* **Transplantation** 2003; 75:1147-1153

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2005) *Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition* **J Clin Invest** 2005; 115:2811-2821

Schindler T (2000) *Structural mechanism for STI571 inhibition of Abelson tyrosine kinase* **Science** 2000; 289:1938-1942

Schoental R, Head MA (1955) *Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline* **Br J Cancer** 9:229-237

Schultze AE, Roth RA (1998) *Chronic pulmonary hypertension- the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system* **J Toxicol Environ Health B Crit Rev** 1998; **1(4):271-346**

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

Simmons G, Galie N, Rubin LJ et. al. (2004) *Clinical classification of pulmonary hypertension* **J Am Coll Cardiol** 2004; **43(12):5-13S**

Soriano P (1994) *Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF- β receptor mutant mice* **Genes Dev** 1994; **8:1888-1896**

Soriano P (1997) *The PDGF α -receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites* **Development** 1997; **124:2691-2700**

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

Stenmark KR, Mc Murtry IF (2005) *Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension- a time for reappraisal?* **Circ Res** 2005; **97:95-98 (Editorial)**

Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, Mc Murtry IF, Reeves JT (1983) *Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats* **J Appl Physiol** 1983; **54(2):371-374**

Tanabe A, Saito M, Ueno A, Nakamura M, Takeishi K, Nakayama K (2000) *Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells* **Mol Cell Biochem** 2000; **215(1-2):103-113**

Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD (1996) *The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling* **J Clin Invest** 1996; **Vol 98 N^o 2, July 1996 434-442**

Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM (2001) *Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension* **FASEB J** 2001; **15:427-438**

Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW et. al. (2000) *Sporadic pulmonary hypertension is associated with germline mutation of the gene encoding BMPR-2, a receptor member of the TGF- β family* **J Med Genet** 2000; **37:741-5**

Todorovich-Hunter L, Johnson DL, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M (1988) *Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline: a biochemical and ultrastructural study* **Lab Invest** 1988; **58:184-195**

Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, Mc Cready L, Keeley FW, Rabinovitch M (1992) *Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease* **Am Rev Respir Dis** 1992; 146(1):213-223

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

Turner JH, Lalich JJ (1965) *Experimental cor pulmonale in the rat* **Arch Pathol** 1965; 79:409-418

United Nations Environment Programme, International Labour Organization and World Health Organization International Programme on chemical safety (1988) *Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine alkaloids*. **World Health Organization, Geneva**

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

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

Vaszar LT, Nishimura T, Storey JD, Zhao G, Qiu D, Faul JL, Pearl RG, Kao PN (2004) *Longitudinal transcriptional analysis of developing neointimal vascular occlusion and pulmonary hypertension in rats* **Physiol Genomics** 2004; 17:150-156

Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, Arend WP (1994) *Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline* **Am J Respir Cell Mol Biol** 1994; 11(6):664-675

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

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

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

Wang J, Coltrera MD, Gown AM (1994) *Cell proliferation in human soft tissue tumors correlates with platelet-derived growth factor B chain expression: an immunohistochemical and in situ hybridization study* **Cancer Res** 1994; 54: 560-564

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

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

Wood P (1959) *Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor* **Br Heart J** 1959; 21:557

Ye C, Rabinovitch M (1991) *Inhibition of elastolysis by SC-37696 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension* **Am J Physiol** 1991; 261 **Heart Circ Physiol** 30: H1255-1267

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

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger möchte ich für die Übernahme meiner Dissertation im Fachbereich Medizin danken; ebenso für die weiterführenden Diskussionsbeiträge und Ideen und dafür, dass er von Anfang an so fest an dieses Projekt geglaubt hat.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt danke ich ganz besonders für die Übernahme der Betreuung in der Veterinärpathologie; dafür, dass er mich so herzlich aufgenommen und unterstützt hat und dafür, dass er mit so viel Leidenschaft und Herz die Pathologie zu lehren vermag.

Meinem „externen“ Betreuer Prof. Dr. Ralph Schermuly ganz besonders lieben Dank für die vielen, vielen Stunden, die er ein offenes Ohr für meine Nöte und Probleme hatte und für seine bedingungslose Hilfe und Offenheit. Der Oscar für den ‚best boss‘ wird für alle Zeiten nur an ihn gehen.

Dr. Ardeschir Ghofrani danke ich für seine fachliche Kompetenz, und dafür, dass er darum kämpft, den Patienten ein Stückchen Lebensqualität zurückzugeben. Auch PD Dr. Norbert Weissmann sei herzlich gedankt für seine nette Unterstützung und Geduld.

Rio, Andreas, Frauke, Nadine, Anke, Tanja und Rita danke ich für die kompetente Einweisung in die Thematik und ihre Hilfe in allen schwierigen Situationen. Der ‚Schermu-Gruppe‘ und allen Mitarbeitern im Seltersberg Haus C: danke dafür, dass Ihr die allerbesten Kollegen und Freunde seid, die man sich nur wünschen kann. An alle Leute, die am ‚Imatinib-Paper‘ mitgearbeitet und mitgezittert haben: wir haben gezeigt, dass Teamgeist und sorgfältige, gute Arbeit am Ende gegen alle Missgunst siegen werden!

Der größte Dank gilt meiner Familie: Hans, Marlene, Maria und Helene- meine Liebe, mein Trost und meine Freude.

Und mein Markus: Du bist der Teil von mir, der mich jeden Tag aufs Neue glücklich macht!