

Charakterisierung Hypoxie-induzierter pulmonalvaskulärer Veränderungen in adulten und fetalen Schafslungen

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

vorgelegt von Ushanthan Uthayanan
aus Jaffna, Sri Lanka

Gießen, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin,

Medizinische Klinik II

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann

Gutachter: PD. Dr. med. Stefan Guth

Tag der Disputation: 01. Juni 2023

Für meine Eltern

– Die mich gefördert haben –

Für meine Seelenverwandte und Frau

– TeamTU –

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in die Thematik.....	1
1.2	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.....	2
1.3	Pulmonale Hypertonie.....	3
1.3.1	Definition	3
1.3.2	Klassifikation	3
1.3.3	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen.....	5
1.3.4	Pathophysiologie und vaskuläres <i>Remodeling</i>	6
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies.....	9
1.5	Antioxidantien.....	10
1.6	Experimentelle Tiermodelle	12
1.7	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Versuchstiere.....	15
2.2	Materialien für die Histologie.....	17
2.2.1	Geräte	17
2.2.2	Verbrauchsmaterialien/-chemikalien	17
2.2.3	Kits	20
2.2.4	Antikörper	20
2.2.5	Software	21
2.3	Materialien für die Molekularbiologie	22
2.3.1	Geräte	22
2.3.2	Verbrauchsmaterialien/-chemikalien	23
2.3.3	Kits	24
2.3.4	Primer	24
2.3.5	Software	25

2.4	Methoden.....	26
2.4.1	Bestimmung des Herzwandvolumens	26
2.4.2	Histologische Untersuchungen.....	26
2.4.2.1	<i>Histochemische Färbungen.....</i>	<i>27</i>
2.4.2.2	<i>Immunhistochemische Färbung.....</i>	<i>28</i>
2.4.2.3	<i>Histologische Analysen</i>	<i>31</i>
2.4.3	Molekularbiologische Untersuchungen.....	33
2.4.3.1	<i>qPCR – Lungenhomogenat.....</i>	<i>33</i>
2.4.3.2	<i>qPCR – Lasermikrodissektion.....</i>	<i>40</i>
2.4.4	Statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Stereologische Ergebnisse	43
3.2	Histologische Ergebnisse.....	44
3.2.1	Wandstärke.....	44
3.2.2	Muskularisierungsgrad	51
3.2.3	Fibrosierung	57
3.3	Molekularbiologische Ergebnisse.....	63
3.3.1	Etablierung des Referenzgens	63
3.3.2	Genexpression im Lungenhomogenat.....	64
3.3.2.1	<i>Produktion von ROS.....</i>	<i>64</i>
3.3.2.2	<i>Abbau von ROS</i>	<i>67</i>
3.3.2.3	<i>NO-Signalweg</i>	<i>70</i>
3.3.2.4	<i>Andere</i>	<i>75</i>
3.3.3	Genexpression in den Gefäßen.....	80
3.3.4	Detektion von NOS3 im Gewebe.....	81
4	Diskussion.....	83
4.1	Limitierung und Generalisierbarkeit	83
4.2	Wahl des Tiermodells.....	86

4.3	Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die histomorphologischen Veränderungen in der Lunge	88
4.4	Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die rechtsventrikuläre Herzwand	90
4.5	Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die molekularbiologischen Veränderungen in der Lunge	92
4.6	Weiterführende Untersuchungen.....	102
5	Ausblick	104
6	Zusammenfassung	106
7	Summary.....	107
8	Verzeichnis	108
8.1	Abkürzungsverzeichnis	108
8.2	Abbildungsverzeichnis	111
8.3	Tabellenverzeichnis	113
8.4	Literaturverzeichnis	115
8.5	Publikationsverzeichnis	135
9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	136
10	Danksagung	137

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

In der Lunge erfolgt der Gasaustausch des Körpers. Sauerstoff (O₂) wird dabei aus der Luft aufgenommen, woraufhin im Körper anfallendes Kohlenstoffdioxid (CO₂) abgeatmet wird. Die eingeatmete Luft gelangt in die Lunge über Trachea und Bronchien, wobei sich Letztere kontinuierlich Richtung Peripherie unter Abnahme ihres Durchmessers verzweigen. In den Alveolen an der Endverzweigung des Bronchialbaumes findet der eigentliche Gasaustausch mittels Diffusion in die benachbarten Kapillaren statt, die wiederum dem pulmonalen Kreislauf entstammen.

Darüber hinaus ist der eigenständige pulmonale Kreislauf vom Körperkreislauf abzugrenzen. Beide Kreisläufe laufen im Herzen zusammen. Jedoch beträgt der Druck in den Gefäßen des Lungenkreislaufes lediglich 1/5 bis 1/7 des Körperkreislaufes¹², bedingt durch den großen Gesamtquerschnitt der Pulmonalgefäße, der daher einem Niederdrucksystem entspricht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lungen von Schafen charakterisiert. Im Aufbau der Lunge unterscheiden sich Schafe und Menschen in wenigen Punkten. In beiden Fällen sind die Lungen segmentiert: mit zwei linken und drei rechten Lappen. Beim Menschen werden die jeweiligen Lungenhälften dabei von einem rechten bzw. linken Hauptbronchus, dem *Bronchus principalis* versorgt¹². Bei den Schafen existiert jedoch noch ein dritter Bronchus, der *Bronchus trachealis*, durch den das obere rechte Lungensegment belüftet wird⁹¹. Hauptunterschied zwischen Schaf und Mensch ist in diesem Zusammenhang die Ausrichtung der Lunge. Durch den aufrechten Gang des Menschen liegt die Lunge hier in der frontalen bzw. coronaren Ebene. In Folge des Niederdrucksystems in der Lunge kommt es aufgrund der Schwerkraft zu einer Ungleichverteilung des Blutflusses, sodass ein Perfusionsgefälle beobachtet werden kann. Die basalen Lungenabschnitte werden besser perfundiert als die apikalen, was dazu führt, dass Letztere besser ventiliert werden als die basalen Abschnitte. So entsteht in den jeweiligen Lungenabschnitten ein unterschiedliches Ventilations-Perfusions-Verhältnis, das von kranial nach kaudal abnimmt¹². Bei den Schafen liegt die Lunge hingegen in der transversalen Ebene, wo ein kranial-kaudales Gefälle nicht zu beobachten ist. Diskutiert wird hier ein dorsal-ventrales Gefälle, das bedeutend geringer ausgeprägt ist¹¹⁵.

In beiden Fällen wird das Ventilations-Perfusions-Verhältnis an die jeweiligen Anforderungen angepasst, sodass eine optimale Sauerstoffsättigung des Blutes erreicht werden kann. Eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff wird dabei als Hypoxie bezeichnet. Diese entsteht bei verschiedenen Lungenerkrankungen oder bei Aufenthalt in großer Höhe. Beide Spezies reagieren auf Hypoxie mit einer hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)³⁷ und im Körperkreislauf mit einer Vasodilatation¹.

1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Die im Jahre 1946 von Euler und Liljestränd⁴⁵ beschriebene HPV ist die physiologische Antwort des Körpers auf wechselnde Ventilationsverhältnisse. In schlecht belüfteten Lungenarealen bewirkt die HPV eine Verminderung der Perfusion. Hingegen kommt es in gut ventilerten Lungenarealen zu einer Dilatation und somit Perfusionssteigerung. Ohne die HPV könnte die Lunge eine optimale Oxygenierung des Blutes nicht gewährleisten.

Des Weiteren wird die HPV unterteilt in eine akute (innerhalb von Sekunden), protrahierte (innerhalb von Minuten bis Stunden) sowie chronische Phase^{204,205}. Dabei sind die entsprechenden biochemischen Prozesse bisher nicht eindeutig geklärt. In verschiedenen Theorien und Ansätze wird thematisiert, wie es zu den drei Phasen der HPV kommt. Fakt ist, dass es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt und so die Kontraktion der Gefäße eingeleitet wird^{110,120,206}. In diesem Zusammenhang konnte in Modellen gezeigt werden, dass die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) sowohl als Effektor- als auch Sensorzellen fungieren^{174,204}. Weiterhin wird vermutet, dass die präkapillären Widerstandsgefäße in der HPV eine dominante Rolle spielen^{75,174,204}.

Zudem bringt die anhaltende chronische Hypoxie das physiologische Gleichgewicht von vasokontraktiven und vasodilatativen Substanzen durcheinander^{21,42,63,100}. Ebenso kann beobachtet werden, dass es zu einer Dysbalance von proliferativen und antiproliferativen Substanzen kommt^{62,101,132}. Neben weiteren Faktoren führt dieses Ungleichgewicht zu einem pulmonalen Gefäßumbau, der als vaskuläres *Remodeling* bezeichnet wird¹⁵⁹ (s. Kap. 1.3.4). Die damit einhergehende Verringerung des Gefäßquerschnitts führt zu einem dauerhaft erhöhten pulmonalarteriellen Druck und charakterisiert die pulmonale Hypertonie (PH)^{79,159}.

1.3 Pulmonale Hypertonie

Die PH, von der weltweit über 100 Millionen Menschen betroffen sind, ist eine erstmals 1891 von Ernst von Romberg^{53,153} beschriebene schwerwiegende Lungenerkrankung, die als Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf verstanden wird. Hervorgerufen wird dieser Hypertonus im pulmonalen Kreislauf durch eine anhaltende Vasokonstriktion und das vaskuläre *Remodeling* in den Gefäßen. Diese Druckbelastung führt im Laufe der Zeit zu einer Volumenbelastung im rechten Ventrikel, die in einer Rechtsherzhypertrophie mündet. Schlussendlich stellt die Herzinsuffizienz bei den entsprechenden Patienten*innen die häufigste Todesursache dar⁵⁷.

Dabei äußert sich die PH durch Symptome wie Kurzatmigkeit, geringe Belastbarkeit sowie Müdigkeit. Im fortgeschrittenem Stadium sind hierbei auch Brustschmerzen, Synkopen und periphere Ödeme festzustellen⁵⁷. Aufgrund dieser teils unspezifischen Symptome suchen Patienten*innen ärztliches Fachpersonal erst sehr spät auf, sodass bei knapp 21 % der Patienten*innen die Diagnose PH erst nach über zweijähriger Symptomatik gestellt wird⁵⁷. Nach Hoepfer et al.⁷⁶ sind die allermeisten dieser Patienten*innen nach der funktionalen WHO-Klassifikation der PH den Gruppen III und IV zuzuordnen. Ohne weitere Therapie liegt die Lebenserwartung bei knapp drei Jahren ab Diagnosestellung³¹.

1.3.1 Definition

Die PH wurde bis 2018 definiert als eine Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (mPAP) > 25 mmHg in Ruhe, gemessen durch eine Rechtsherz-Katheter-Untersuchung⁷⁶. Der Normwert des mPAP liegt dabei zwischen 12–16 mmHg⁷⁶. Infolge des 6. *Weltsymposium zur PH in Nizza 2018* soll jedoch die hämodynamische Definition der PH angepasst werden. Ein mPAP > 20 mmHg, abhängig vom pulmonalen Gefäßwiderstand und pulmonalarteriellen Verschlussdruck, würde dann eine PH definieren. Dieser Vorschlag wurde im *European Respiratory Journal* veröffentlicht und muss noch als Leitlinie durch die zuständigen Gremien validiert werden^{58,170}.

1.3.2 Klassifikation

Ursprünglich wurde in eine primäre (idiopathische) und sekundäre (durch andere Grunderkrankungen hervorgerufene) PH unterteilt. Die Klassifikation wurde nach Erkenntnissen in Hinblick auf verschiedene Pathomechanismen jedoch 2003 grundlegend

geändert¹⁶⁸, sodass eine Unterteilung in fünf verschiedene Untergruppen erfolgte. Mit der Dana-Point-Klassifikation aus dem Jahre 2008¹⁷¹, der Nizza-Klassifikation von 2013¹⁶⁹ sowie der aktuellen Nizza-Klassifikation aus dem Jahre 2018¹⁷⁰ kamen diesbezüglich Erneuerungen hinzu. Die aktuelle Nizza-Klassifikation, die auf der 6. *Weltkonferenz der PH* vorgestellt wurde, ist folgendermaßen beschaffen¹⁷⁰:

Tab. 1-1 Nizza-Klassifikation (2018) der PH¹⁷⁰

<p>1. Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH)</p> <ul style="list-style-type: none">1.1. Idiopathische PAH1.2. Hereditäre PAH1.3. Arzneimittel- und Toxin-induzierte PAH1.4. PAH assoziiert mit definierten Erkrankungen (Kollagenosen, HIV-Infektion, portale Hypertension, angeborener Herzfehler, Schistosomiasis)1.5. PAH mit <i>Long-Term-Responder</i> auf Kalziumkanalblocker1.6. Pulmonale veno-okklusive Erkrankungen und/oder pulmonal-kapilläre Hämangiomatose1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
<p>2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen</p> <ul style="list-style-type: none">2.1. Linksventrikuläre systolische Dysfunktion2.2. Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion2.3. Klappenerkrankungen2.4. Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Erkrankungen, mit Folge einer postkapillären PH
<p>3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie</p> <ul style="list-style-type: none">3.1. Obstruktive Lungenerkrankungen3.2. Restriktive Lungenerkrankungen3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem/obstruktivem Muster3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung3.5. Entwicklungsbedingte Lungenfehlbildung
<p>4. Pulmonale Hypertonie durch Obstruktion der Pulmonalarterie</p> <ul style="list-style-type: none">4.1. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)4.2. Andere Obstruktionen der Pulmonalarterie
<p>5. Pulmonale Hypertonie bei unklaren multifaktoriellen Mechanismen</p> <ul style="list-style-type: none">5.1. Hämatologische Erkrankungen5.2. Systemisch metabolische Erkrankungen5.3. Andere5.4. Komplexe angeborene Herzfehler

In der vorliegenden Arbeit steht die persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN) im Mittelpunkt, die als Unterpunkt der PAH in der aktuellen Nizza-Klassifikation aufgeführt wird.

1.3.3 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

Die PPHN ist eine schwerwiegende Lungenerkrankung des Neugeborenen, die eine von 500 Lebendgeburten betrifft. Bleibt eine Anpassung des Lungenkreislaufes an die postnatale Situation aus, kommt es zur entsprechenden Ausbildung.

Während der Fetalperiode gelangt das oxygenierte Blut von der Plazenta über die Nabelvene und untere Hohlvene zum rechten Vorhof des Herzens. Ein Teil des sauerstoffreichen Blutes gelangt dann über eine Shunt-Verbindung auf Vorhofebene (*Foramen ovale*) in den linken Vorhof und damit in den Körperkreislauf. Das restliche Blut aus dem rechten Vorhof gelangt in den rechten Ventrikel und von dort aus über eine weitere Shunt-Verbindung (*Ductus arteriosus*) in die absteigende Aorta. Aufgrund des hohen Gefäßwiderstands in der fetalen Lunge gelangen lediglich 13–25 % des rechtsventrikulären Schlagvolumens in den Lungenkreislauf⁶⁰. Bei der Geburt kommt es mit dem ersten Atemzug zum abrupten Abfall des Lungengefäßwiderstandes, wodurch es zu einem erhöhten Lungenblutfluss kommt.

Die PPHN tritt als Folge einer solchen fehlenden Relaxation der pulmonalen Gefäße mit einem Rechts-Links-Shunt von nicht oxygeniertem Blut über den *Ductus arteriosus* und/oder *Foramen ovale* auf¹⁴⁴. Je nach Literatur liegt die Mortalitätsrate der PPHN bei 10–50 %¹⁸². Bei Überlebenden liegen in 7–20 % der Fälle Langzeitschäden vor wie u. a. chronische Lungenerkrankungen, intrakranielle Blutungen, Hörverlust¹⁸².

Die Ursachen der PPHN lassen sich in drei Gruppen einteilen: Unter- und Fehlentwicklung sowie Fehlanpassung. Beispiele für eine Unterentwicklung, die zur PPHN führen können, sind die Lungenhypoplasie und Zwerchfellhernie. Fehlentwicklungen wie die fetale Anämie, der vorzeitige Verschluss des *Ductus arteriosus* und die chronische fetale Hypoxie können ebenfalls zur PPHN führen. Eine Fehlanpassung als Ursache der PPHN liegt hingegen vor durch z. B. Asphyxie, Pneumonie, Sepsis, Mekoniumaspirationssyndrom (MAS) oder Atemnotsyndrom^{133,154}. Das MAS ist dabei die häufigste Ursache der PPHN⁹⁰. Des Weiteren wird die chronische fetale Hypoxie als zweithäufigste Ursache aufgezählt⁹⁰.

Risikofaktoren, die eine Ausbildung der PPHN begünstigen, sind laut epidemiologischen Studien: das männliche Geschlecht, afroamerikanische oder asiatische Abstammung, mütterliches Übergewicht, Diabetes oder Asthma, Kaiserschnitt sowie Frühgeburt und

Makrosomie^{72,211}. Weitere Risikofaktoren sind Chorioamnionitis²¹³, die Einnahme von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (zur Behandlung von z. B. Depressionen⁹²) sowie Infektionen vorwiegend mit Streptokokken der Gruppe B²⁸. Nichtsteroidale Antiphlogistika wie *Ibuprofen* standen zudem unter Verdacht, das Risiko für die Ausbildung einer PPHN zu erhöhen⁵, der jedoch in einer umfangreichen Studie nicht bestätigt werden konnte¹⁸⁸.

Die Diagnosesicherung der PPHN gelingt zum einen klinisch und zum anderen echokardiografisch. Klinisch ist eine schlechte Sauerstoffsättigung messbar, die sich trotz Sauerstofftherapie nicht verbessert. Dies tritt aber auch bei zyanotischen Herzfehlern auf¹⁴⁴. Mittels Echokardiografie können hingegen eine schwache Myokard-Kontraktilität, schwache Bewegungen des intraventrikulären Septums, eine Verschiebung des intraatrialen Septums nach links, eine Trikuspidalklappeninsuffizienz sowie ein Blutfluss über den *Ductus arteriosus* diagnostiziert werden, die kennzeichnend für die PPHN sein können¹⁸².

Dabei wird die Therapie der PPHN unterschiedlich gehandhabt, da keine starke evidenzbasierte Datenlage vorliegt¹⁴⁴. Neben Allgemeinmaßnahmen (wie Temperatur, Herzfrequenz und Blutdruck aufrecht sowie stabil zu halten) werden weitere apparative und medikamentöse Maßnahmen zur Therapie herangezogen. Bei unzureichender Ventilation wird eine maschinelle Beatmung angesetzt. Unterschiedliche Studien konnten jedoch zeigen, dass eine starke hyperoxische Therapie das *Outcome* der Kinder verschlechtern kann⁹⁰. Die schon vorhandene Vasokonstriktion im Gefäßbett kann sich durch Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) aus Stickstoffmonoxid (NO), durch die hyperoxische Therapie, verstärken^{60,90}. Neben gängigen medikamentösen Therapien wie der Gabe von *Surfactant* stehen auch zum Teil experimentelle medikamentöse Ansätze zur Verfügung. So wird versucht, die Vasodilatation der Lungengefäße durch Gabe von NO, Phosphodiesterase-Inhibitoren, Prostaglandin-Analoga oder Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zu fördern. Sind durch diese Maßnahmen weiterhin keine ausreichenden Sauerstoffsättigungen möglich, muss eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) erwogen werden¹⁴⁴.

1.3.4 Pathophysiologie und vaskuläres *Remodeling*

Pathophysiologisch ist die PPHN ähnlich komplex wie die PH im Allgemeinen, umfasst jedoch einige Besonderheiten und Schlüsselrollen von bestimmten Stoffen sowie Enzymen in der Entwicklung und Reaktion des neonatalen Lungengefäßsystems. PH und

PPHN haben gemeinsam, dass sie eine starke Vasokonstriktion sowie ein abnormales vaskuläres *Remodeling* aufweisen¹⁸⁶. Bei Letzterem kommt es u. a. zu einer Proliferation der PASMC, die zu einer Media-Verdickung führt. Ebenso kommt es zur Muskularisierung von kleinen Arterien, die physiologisch nicht muskularisiert sind, was als *de novo* Muskularisierung bezeichnet wird^{39,82,176}. Dieser Gefäßumbau beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Media, denn auch Intima und Adventitia werden durch *Remodeling*-Prozesse verändert⁷⁹. Vor allem in hypoxischen Versuchsmodellen konnte nachgewiesen werden, dass sich die Fibroblasten, die sich in der Adventitia befinden, als eine der ersten Zellen aktiveren lassen und Matrixproteine synthetisieren. Diese können Richtung Media und Intima wandern sowie vasoaktive Stoffe sezernieren¹⁷⁷. Diese anhaltende Vasokonstriktion und die proliferativen Prozesse in den pulmonalarteriellen Gefäßen führen letztendlich zu einer Gefäßobstruktion. Dabei wird das *Remodeling* vor allem durch die Dysbalance verschiedener Systeme hervorgerufen, was in Abb. 1-1 grafisch dargestellt wird:

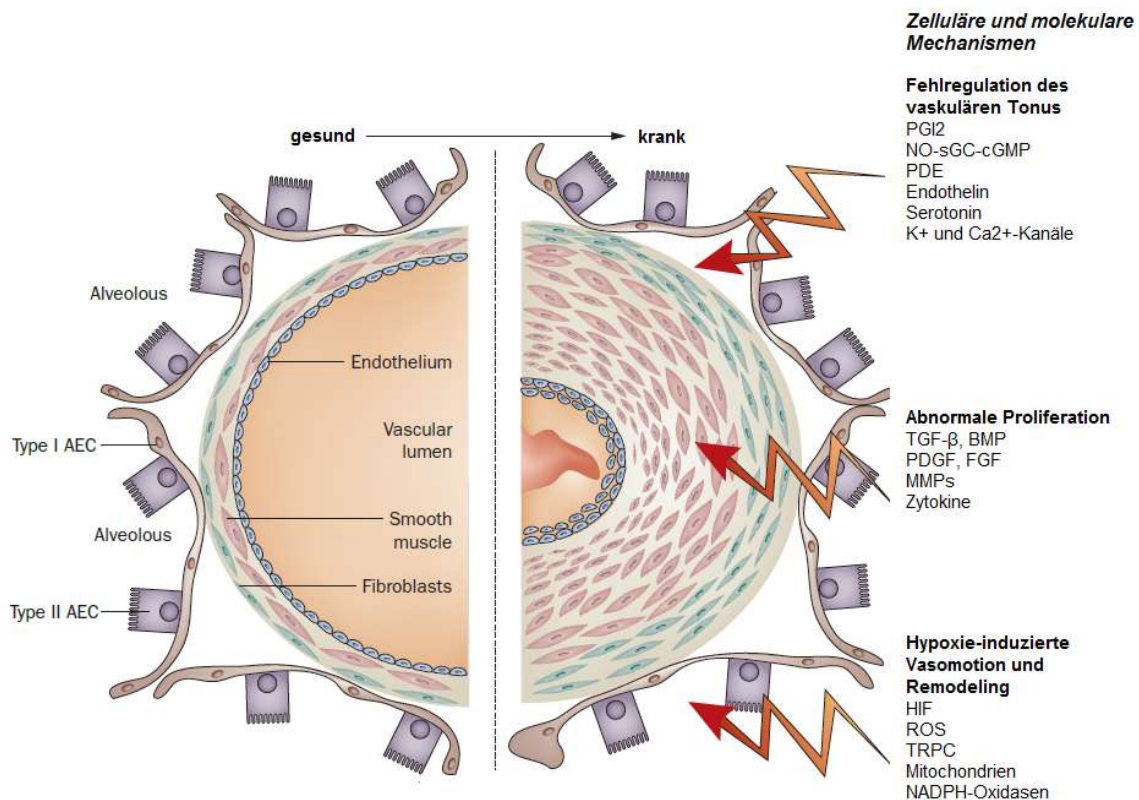


Abb. 1-1 Zelluläre und molekulare Mechanismen des vaskulären Remodeling

AEC = alveoläre Epithelzellen; PGI₂ = Prostaglandin I₂; NO = Stickstoffmonoxid; sGC = lösliche Guanylatzyklase; cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat; PDE = Phosphodiesterase; K⁺ = Kalium; Ca²⁺ = Calcium; TGF-β = Transforming Growth-Factor β; BMP = bone morphogenetic protein; PDGF = platelet derived growth factor; FGF = fibroblast growth factor; MMP = Matrixmetalloproteinasen; HIF = Hypoxie-induzierter Faktor; ROS = reaktive Sauerstoffspezies; TRPC = transient receptor potential cation channel; NADPH = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; modifiziert nach Schermuly et al.¹⁵⁹

Hier liegt ein Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen vor. Dabei sind vasodilative Substanzen herunterreguliert, wohingegen die vasokontraktiven Substanzen hochreguliert sind. Insbesondere Prostaglandin I₂^{25,94} sowie die Konzentration von NO sind in diesem Zusammenhang erniedrigt. Beim NO-Signalweg wurden zudem nicht nur erniedrigte Konzentrationen von cGMP nachgewiesen, sondern es wurde auch die Herunterregulierung der NO-Synthase (NOS) beobachtet, die eine Gefäßdilataion bewirkt^{63,207}. Auf der anderen Seite konnten erhöhte Werte von Thromboxan A₂ (TXA₂), Endothelin-1 (ET-1) und Serotonin (5-HT), die gefäßverengend wirken, belegt werden^{25,94}.

Vasoaktive Substanzen können auch Einfluss auf die Zellproliferation haben. Dabei wirkt NO stark anti-proliferativ, wohingegen ET-1 und 5-HT pro-proliferativ wirken^{33,42,100}. Weiterhin sind potente mitogene Substanzen wie VEGF^{4,62,187} (*vascular endothelial growth factor*), TGF- α ^{4,83,101} (*transforming growth factor alpha*), FGF^{4,14,104} (*fibroblast growth factor*) und PDGF^{4,66,158,221} (*platelet derived growth factor*) in der PH verstärkt vorzufinden. Die erhöhte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen und vaskulären Elastasen, die die Extrazellulärmatrix umbauen, führt zu Dysbalance zwischen anti- und pro-proliferativen Systemen^{103,146}.

Bei der Pathogenese der PPHN ist hervorzuheben, dass VEGF und NO das prä- sowie postnatale Gefäßwachstum der Lunge entscheidend beeinflussen. Dabei wird der perinatale Gefäßtonus vor allem durch die vasoaktiven Stoffe NO und ET-1 reguliert. Störungen innerhalb dieser Signalkette können vor oder nach der Geburt zur Ausbildung einer PPHN beitragen^{52,56,209}.

Ebenso trägt die Signalkette der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) zum Krankheitsbild der PH bei. So wurde in Studien ermittelt, dass HIF-Inhibitoren signifikant den *Remodeling*-Prozess und die damit assoziierte chronisch Hypoxie-induzierte PH verringern^{9,24,160,219}. In anderen Studien wurde vermutet, dass der Aktivitätsverlust von HIF z. B. durch eine hyperoxische Therapie die pulmonale Vasokonstriktion in der unreifen Lunge fördert^{47,184}.

Zudem spielt oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Schwere der PH bzw. PPHN^{198,199,203}. Da die Auswirkungen von ROS vielfältig sind, werden diese im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

In den subzellulären Kompartimenten werden in geringen Konzentrationen ROS produziert. Diese sind an mehreren Signalkaskaden und regulatorischen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt, wobei mehrere negative Rückkopplungsmechanismen greifen, um eine übermäßige Produktion zu vermeiden^{80,102}. Unter ROS lassen sich diverse reaktive Sauerstoffderivate zusammenfassen, z. B. das Hydroperoxid-Anion (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Verbindet sich das O_2^- mit NO, entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), das zur Gruppe der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) gezählt wird^{35,212}.

Die Produktion der ROS ist abhängig von der Enzymexpression und Aktivität, aber auch von der Substratmenge. Bei einer hyperoxischen Therapie, bei der die Sauerstofffraktion in der Atemluft stark erhöht ist, konnten erhöhte ROS Konzentrationen nachgewiesen werden¹⁰⁸. Die bedeutendsten ROS produzierenden Enzyme sind die NADPH-Oxidasen (NOX), wobei es sich um Membranproteine handelt, die Elektronen von NADPH auf molekularen Sauerstoff übertragen²⁰². Damit produzieren sie das O_2^- intra- bzw. extrazellulär, abhängig von ihrer Isoform und subzellulären Lokalisation. Die endotheliale NOS (eNOS), die vordergründig NO synthetisiert, kann auch ROS produzieren, wenn sie sich im sogenannten entkoppelten Zustand befindet, bei dem Sauerstoff inkomplett zu Superoxid reduziert wird^{50,95,97}. Es wird angenommen, dass die erhöhte NOX-Aktivität der zentrale Trigger für die eNOS-Entkopplung darstellt^{36,96}. Darüber hinaus werden ROS auch in den Mitochondrien produziert. Dabei kann Superoxid, das an den mitochondrialen Komplexen I, II und III generiert wird, zu oxidativem Stress in der mitochondrialen Matrix bzw. im Intermembranraum führen⁶⁸ und diese Kompartimente unter bestimmten Umständen verlassen¹⁰⁹. Dabei konnte beobachtet werden, dass mitochondriale ROS die NOX-Aktivität in hypoxischen Pulmonalarterien steigert¹⁴⁹.

Des Weiteren können Änderungen in der Bildung und den antioxidativen Prozessen dazu führen, dass es durch Konzentrationserhöhungen zu Interaktionen mit Proteinen, DNA, RNA sowie Lipiden und damit zu Gefäßschädigungen kommt¹⁵¹. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte NOX2-Expression mit einem erhöhten Spiegel von Superoxid korreliert und damit zu einer verminderten pulmonalen Vasorelaxation im Tiermodell der neonatalen PH führt^{19,51}. Bei der PPHN wiederum korreliert die ebenfalls erhöhte NOX4-Expression mit erhöhten H_2O_2 -Werten in den Pulmonalarterien¹⁹⁹. Hingegen ist das

Level von NOX1 bei der chronischen intrauterinen PH in den fetalen Schafslungen unverändert¹⁹⁹.

Um die ROS in einem intakten Organismus zu regulieren, stehen dem Körper verschiedene endo- und exogene Antioxidantien zur Verfügung, die im folgenden Kapitel thematisiert werden sollen.

1.5 Antioxidantien

Antioxidative Enzyme spielen eine wesentliche Rolle bei der Eliminierung der ROS. Enzyme, die diese Rolle übernehmen, sind die Superoxiddismutasen (SOD), Glutathionperoxidasen (GPX) und Katalasen (CAT)

Dabei kommen SOD in verschiedenen Kompartimenten vor und werden unterteilt in Cu/ZnSOD (SOD1), die im Zytoplasma, MnSOD (SOD2), die in den Mitochondrien, und EC-SOD (SOD3), die extrazellulär exprimiert werden⁴. Alle drei Isoformen kommen in der Lunge vor⁴. SOD konvertieren O_2^- zu H_2O_2 , das dann im nächsten Schritt von GPX zu 2 H_2O reduziert werden kann. CAT können ebenfalls H_2O_2 zu 2 H_2O reduzieren⁴.

Neben diesen endogenen Antioxidantien sind noch Vitamine zu nennen, denen ebenfalls eine antioxidative Wirkung zugeschrieben wird. Dabei sind die Vitamine C und E hervorzuheben, die schützend auf Proteine, DNA, RNA und Lipide wirken¹²⁴.

Vitamin C wurde durch Albert Szent-Györgyi 1928 aus Paprikaschoten und Kohl isoliert⁸⁹. Wenige Jahre später konnte Szent-Györgyi nachweisen, dass Hexuronsäure gegen die Ausbildung von Skorbut wirksam ist¹⁷⁹. Im Jahr 1933 wurde die entsprechende chemische Struktur durch Norman Haworth entschlüsselt, und zusammen mit Szent-Györgyi wurde der Name in L-Ascorbinsäure geändert⁶⁹. Im Jahr 1937 erhielten Szent-Györgyi und Haworth für ihre Entdeckungen den Nobelpreis für Medizin und Chemie. Die meisten Wirbeltiere können aus Glucose über mehrere Reaktionsschritte Vitamin C produzieren. Jedoch hat der Mensch diese Funktion im Laufe der Evolution verloren, sodass die genannte Substanz über die Nahrung aufgenommen werden muss.

Vitamin C ist ein äußerst hydrophiles Antioxidans, das vor allem Hydroxylradikale, Hydroperoxyanionen und Hydrogenperoxide reduziert. Vitamin E hingegen reduziert als ausgeprägt lipophiles Antioxidans vor allem Lipidperoxide¹⁴¹. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Ascorbinsäure (Vitamin C) nicht nur selbst als Antioxidans fungiert, sondern auch als ein Synergist für Tocopherol (Vitamin E) agiert^{125,126}. Das

Tocopherol-Radikal, das beim Einfangen von ROS entsteht, wird durch Vitamin C regeneriert und steht dem Körper somit wieder zur Verfügung¹²⁴. Das nun entstandene Ascorbyl-Radikal wird dann durch NADH-abhängige Systeme zu Ascorbinsäure reduziert und steht so ebenfalls dem Körper wieder zur Verfügung¹²⁴. So können die Vitamine C und E ROS eliminieren.

Außerdem ist Vitamin C als Co-Faktor an verschiedenen Signalwegen beteiligt. Unter anderem wird Vitamin C bei der Umwandlung von Dopamin in Noradrenalin als Co-Faktor benötigt¹⁷. Besonders interessant in Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist die Wirkung von Vitamin C auf den HIF-Signalweg. Die Aktivität der Prolylhydroxylasen (PHD) kann durch Vitamin C als Co-Faktor gesteigert werden, sodass PHD vermehrt HIF-1 α abbauen können⁸⁵. Durch diesen Schritt könnten zahlreiche HIF-induzierte Signalwege unterbunden werden. Darüber hinaus ist Vitamin C auch bei epigenetischen Prozessen involviert, indem es Enzyme reguliert, die für die Demethylierung der DNA und Histone verantwortlich sind¹¹⁶.

Die Wirkung von Vitamin C wurde vor allem in den 1970er und 1980er Jahren, bezogen auf fortgeschrittene Tumorerkrankungen, erforscht. Federführende Untersuchungen dazu führten Linus Pauling und Ewan Cameron durch, die postulierten, dass die tägliche Gabe von hohen Dosen Vitamin C (hier 10 g) als Zusatz zu den konventionellen Chemotherapeutika die Überlebensdauer von Tumorpatienten*innen deutlich verlängerte^{22,140}. Im Jahr 1979 wurde diese These durch eine randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie von Edward Creagan und Charles Moertel widerlegt, wobei ebenfalls 10 g Vitamin C verabreicht wurden^{27,89}. Die beiden Studien unterscheiden sich jedoch relevant in Bezug auf die Verabreichungsform. In der Doppelblindstudie von Creagan und Moertel wurden die 10 g Vitamin C peroral verabreicht, wohingegen Pauling und Cameron diese in den ersten zehn Tagen intravenös applizierten.

Die intestinale Resorption von Vitamin C wird durch Natrium-abhängige Vitamin C-Transporter reguliert, die nach Überschreiten einer Maximalschwelle überschüssiges Vitamin C nicht mehr resorbieren. Durch die perorale Gabe konnte eine maximale Plasmakonzentration von 0,22 mmol/l nachgewiesen werden, wohingegen die Plasmakonzentration durch die intravenöse Gabe auf mehr als 13 mmol/l gesteigert werden konnte¹³⁵.

Neben der Regulierung des HIF-Signalwegs sowie der antioxidativen Wirkung konnte durch Vitamin C eine prooxidative Wirkung nachgewiesen werden¹²⁹. Vitamin C begünstigt in sehr hohen Dosen die Bildung von Wasserstoffperoxid, durch starke Reduktion von Metallkationen. Diese sind wiederum in der Lage, Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen⁸⁹. Dies führt dann zur Bildung von Wasserstoffperoxid^{89,129}. Tumorzellen scheinen im Gegensatz zu normalen Zellen wenige bis keine antioxidativen Gene aufzuweisen. Wasserstoffperoxid scheint somit die Tumorzellen spezifisch zu schädigen¹²⁹. Dieser Mechanismus sowie die Inhibierung des HIF-Signalweges könnten im Zusammenspiel die Tumorzellen angreifen bzw. an ihrem Wachstum hindern^{106,194}. Maligne Zellen brauchen für die Proliferation neue Gefäßverbindungen. Dies wird VEGF-vermittelt initiiert, das wiederum ein Gen des HIF-Signalwegs ist⁴⁶.

Die Kausalkette zwischen Vitamin C, HIF-Signalweg und Tumorwachstum wurde von Campbell et al.²³ untersucht. Sie schalteten bei Mäusen das Gulo-Gen aus, das im letzten Reaktionsschritt aus Glucose Vitamin C bildet, und beobachteten eine erhöhte HIF-Aktivität sowie eine verstärkte Tumorpheriferation. Die intravenöse Gabe von Vitamin C verhinderte dabei diesen Prozess. Zudem existieren zahlreiche kleinere Studien, in denen dieser positive Effekt von Vitamin C beschrieben wurde^{107,117,134}. Große Studien fehlen bisher – möglicherweise aufgrund des mangelnden Interesses der großen Pharmafirmen, deren Unterstützung in diesem Zusammenhang nötig wäre.

Die antioxidative Therapie stellt, so eine interessante Therapiemöglichkeit der PH dar. In den im folgenden Kapitel beschriebenen Modellen der PH wird dies näher beleuchtet.

1.6 Experimentelle Tiermodelle

Modelle der PPHN sind bisher in Schafen etabliert. Meist wurde dabei die PPHN in fetalen Schafen durch Ligation, mechanische Okklusion oder pharmakologische Konstriktion des fetalen *Ductus arteriosus* erzeugt^{2,16,118,175,210}. Die fetalen Schafe zeigten dann in den histologischen Untersuchungen eine Wandstärkenzunahme der peripheren Pulmonalarterien sowie eine *de novo* Muskularisierung von zuvor nicht muskularisierten Pulmonalgefäßen^{16,210}. Eine weitere Methode zur Induktion der PPHN ist die akute bzw. chronische Hypoxie-Exposition an neonatalen Ferkeln^{122,127} und Ratten²¹⁷.

Untersuchungen der PH im Zusammenspiel mit Vitamin C wurden vor allem an Hähnen^{155,215}, Schweinen¹⁰⁵ und Ratten²¹⁴ durchgeführt. In Forschungen an Hähnen

wurde darüber hinaus gezeigt, dass die exogene Gabe von Vitamin C und E die Inaktivierung von NO durch ROS zu ONOO⁻ verringert, wodurch sich die Bioverfügbarkeit von NO erhöht. Außerdem wurden Kofaktoren von eNOS, die NO produziert, vor der Oxidation geschützt¹⁵⁵. Untersuchungen an Schweinen ergaben zudem, dass Vitamin C bei der inhalativen Therapie von NO die Bildung von Stickstoffdioxid (NO₂) verhindern kann. So konnte auch hier die Bioverfügbarkeit von NO erhöht werden¹⁰⁵. Des Weiteren konnte Vitamin C die Wirkung von Phosphodiesterase-Inhibitoren wie *Sildenafil* in Raten verbessern, indem die Hypoxie-induzierte ROS Produktion inhibiert wurde²¹⁴.

Ein Tiermodell, durch das das Zusammenspiel von PPHN und Vitamin C auf pulmonaler Ebene untersucht, wurde von Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe, in der ich die vorliegende Doktorarbeit durchgeführt habe, entwickelt. Diese Arbeitsgruppe wird von Prof. Dino A Giussani, *Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Vereinigtes Königreich*, geleitet. Dazu hielten sich trächtigen Schafe im letzten Drittel der Schwangerschaft nach der Anlage von zentralvenösen und zentralarteriellen Kathetern u. a. in hypoxischen Kammern auf (s. Kap. 2.1). Durch diesen Ansatz wurden die Feten chronischer Hypoxie ausgesetzt, ohne mechanische oder pharmakologische Manipulation am fetalen *Ductus arteriosus*, die in anderen etablierten Modellen durchgeführt wird^{2,16,118,175,210}. Die Kooperationspartnern aus Cambridge haben bei der schon beschriebenen Methode^{7,18} bisher lediglich kardiovaskuläre Untersuchungen durchgeführt.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Zusammenspiel von Vitamin C und PPHN in Schafen auf pulmonaler Ebene zu untersuchen. Das entsprechende Lungengewebe wurde von Prof. Dino A. Giussani, *University of Cambridge*, Vereinigtes Königreich, in Kooperation zur Verfügung gestellt.

Dabei wurden nicht nur die Lungen von fetalen, sondern auch von adulten Schafen untersucht, die in ihrer fetalen Phase unter hypoxischen Bedingungen herangewachsen waren. Hier sollte erforscht werden, ob sich die PPHN noch in den Lungen der adulten Schafe persistiert und ob die Vitamin-C-Therapie während der Schwangerschaft ausreichend war, um eine PH im adulten Leben zu verhindern.

Entsprechende Untersuchungen sollten auf histologischer und molekularbiologischer Ebene erfolgen. Auf histologischer Ebene sollten dafür die Wandstärke und der Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße untersucht werden, während auf molekularbiologischer Ebene der Fokus auf mögliche Veränderungen in oxidativen und antioxidativen Signaltransduktionswegen gelegt werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde Lungengewebe von Schafen verwendet, das vom *Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge*, Vereinigtes Königreich zur Verfügung gestellt wurde. Von dieser Arbeitsgruppe wurden herangezüchtete trächtige Schafe im letzten Drittel ihrer Schwangerschaft (zwischen Tag 105 und 138 bei einer durchschnittlichen Schwangerschaftsdauer von etwa 145 Tagen) in verschiedene Gruppen eingeteilt. Ähnlich wie in schon beschriebenen Versuchen ^{7,18} wurden die dauerhaft katheterisierten schwangeren Schafe entweder normoxischer Luft (21 % O₂) oder hypoxischer Luft (10 % O₂ für 24 Std./Tag) ausgesetzt. Ergänzend dazu wurden sie täglich intravenös mit 200 mg/kg Körpergewicht Vitamin C behandelt. Als Kontrolle dienten Schafe, denen Kochsalzlösung (NaCl) appliziert wurde. Somit ergaben sich vier verschiedene Gruppen.

Am 138. Tag wurde ein Teil der Feten per Kaiserschnitt entbunden und Gewebe entnommen (Anzahl N = 32, nachfolgend fetale Schafe genannt). Die restlichen neugeborenen Schafe wurden für weitere neun Monate unter normoxischen Bedingungen ohne jegliche Behandlung herangezüchtet, woraufhin wieder Gewebe entnommen wurde (Anzahl N = 37, nachfolgend adulte Schafe genannt). Alle Prozeduren unterlagen den Bestimmungen der *UK Animals Scientific Procedures Act 1986* und wurden von der *Animal Welfare and Ethical Review Committee of the University of Cambridge* unter dem *Home Office Project Licences PL70/7645* und *PL80/2232* genehmigt ^{7,18}. Versuchsaufbau und -ablauf sowie die Gruppenkonstellation sind in den nachfolgenden Abbildungen und Tabellen dargestellt (s.Abb. 2-1, Tab. 2-1).

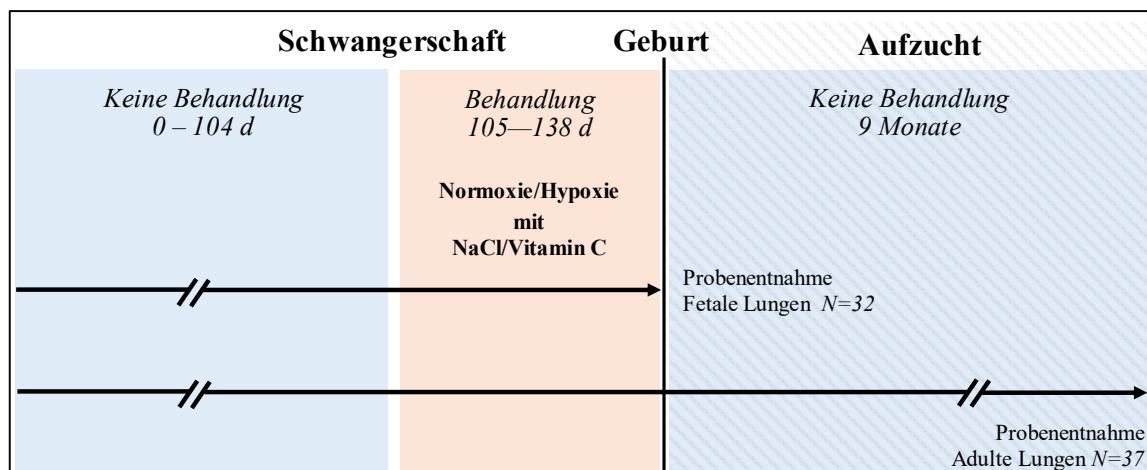


Abb. 2-1 Grafische Darstellung des Versuchsaufbaus

Tab. 2-1 Gruppenkonstellation der Versuchstiere

Gruppen	Anzahl Tiere	
	Fetal	Adult
Normoxie mit NaCl	N = 8	N = 9
Normoxie mit Vitamin C	N = 8	N = 9
Hypoxie mit NaCl	N = 8	N = 9
Hypoxie mit Vitamin C	N = 8	N = 10

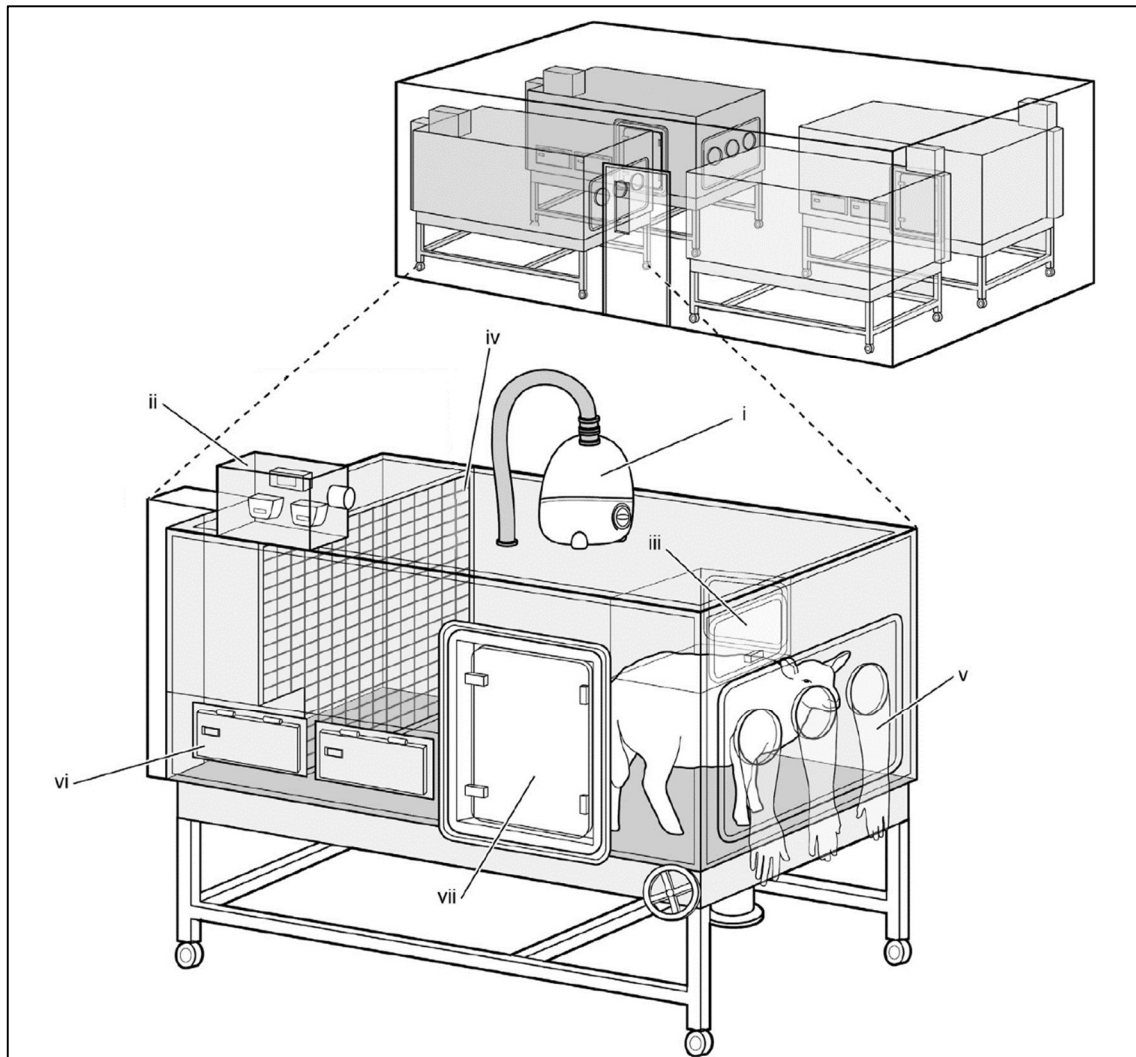


Abb. 2-2 Aufbau der Hypoxie-Kammern

Ein speziell entwickeltes stickstoffbildendes System lieferte für vier verschiedene Kammern isobare hypoxische Luft. Jede Kammer war mit einem elektrisch gesteuerten Kühldampf-Injektionssystem ausgestattet, um die Feuchtigkeit an die Inspirationsluft anzupassen (i). Die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen sowie die Feuchtigkeit und Temperatur in sämtlichen Kammern wurden mithilfe von Sensoren überwacht (ii). Für experimentelle Prozeduren hatte jede Kammer eine Transferöffnung (iii), um Material in der Kammer platzieren zu können (z. B. für Blutentnahmen). Über eine manuell bewegbare Gleitplatte (iv) konnte das Mutterschaf in eine Position gebracht werden, um z. B. Blutentnahmen durch die Handschuhfächer (v) durchzuführen. Jede Kammer enthielt eine Trinkschale zur kontinuierlichen Wasserzufuhr und ein rotierendes Futterfach (vi) zur Bestimmung der Nahrungsaufnahme. Ein versiegelter Transferisolationswagen konnte an dem Seitenausgang befestigt werden (vii), um Kammern miteinander koppeln und reinigen zu können. Modifiziert nach Brain et al.¹⁸

2.2 Materialien für die Histologie

2.2.1 Geräte

Tab. 2-2 Materialien für die Histologie – Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Modell</i>	<i>Herstellfirma</i>
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträger Strecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

2.2.2 Verbrauchsmaterialien/-chemikalien

Tab. 2-3 Materialien für die Histologie – Verbrauchsmaterialien/-chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
Anilinblau-Färbelösung		Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Biebrich „scharlachrot“ Säurefuchsin-Lösung		Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Blockierungsreagenz		Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Bouin-Lösung		Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Citratpuffer	pH 6,0	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm		R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Eindeckmedium	Pertex ®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Einmalhandschuhe	Touch N Tuff® Nitrile Gloves	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, Belgien
Eisen-Hämatoxylin	Weigert A und B	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Eisen-Hämatoxylin	Weigert A und B	Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Essigsäure (100 %)	C ₂ H ₄ O ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70 %, 96 %, 99,6 %)	C ₂ H ₆ O	Otto Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
Falconröhrchen		Corning Science Mexico, Tamaulipas, Mexico
Filterpapier	Folded Filters Grade: 3	Sartorius Stedium, Göttingen, Deutschland
Hämatoxylin	CAT Hematoxylin	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Isopropanol (99,8 %)	C ₃ H ₈ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst	CH ₄ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mikrotomklingen	MX35 Premier Blade	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA

Natriumazid	NaN_3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Superfrost Ultra Plus®	R.Langensbrinck, Emmendingen, Deutschland
Papiertücher	Tork® Hand Towel H3	SCA Hygiene Products, Mannheim, Deutschland
Phosphorwolfram- Phosphormolybdänsäure- Lösung		Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K		Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
<i>Bovine serum albumin</i>	BSA	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure	HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Waschpuffer	TBS	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Verdünnungspuffer für Antikörper		Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Vorbehandlungsreagenz	Rodent Decloaker	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Wasserstoffperoxid (30 %)	H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert		Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Xylol	C ₈ H ₁₀	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.2.3 Kits

Tab. 2-4 Materialien für die Histologie – Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
Anti- α -glattmuskuläre- Aktin-Chromogen- Färbung	Betazoid DAB Chromogen Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Anti-Von-Willebrand- Faktor-Chromogen- Färbung	Warp Red™ Chromogen Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Polymer-Detektion-Kit	MACH 2 Double Stain Polymer 1	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Polymer-Detektion-Kit	ZytoChem Plus AP Polymer System	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

2.2.4 Antikörper

Tab. 2-5 Materialien für die Histologie – Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
Anti- α -glattmuskuläres Aktin	Verdünnung 1:800	Mouse, monoklonal Sigma-Aldrich, München, Deutschland (Art. No A2547)
Anti-von-Willebrand- Faktor	Verdünnung 1:1000	Kaninchen, polyklonal, Dako, Hamburg, Deutschland (Art. No A0082)

Anti-NOS3	Verdünnung 1:400	Kaninchen, polyklonal, CavaLab, Umeå, Schweden (Art. No. pab74759)
IgG2a kappa Isotypkontrolle (eBM2a)	Verdünnung 1:200 (entspricht der Konzentration des verwendeten α -Aktin Antikörpers)	Maus, ThermoFisher Scientific (Art. No. 14-4724-82)
IgG Isotypkontrolle	Verdünnung 1:1750 bzw. 1:800 (entspricht der Konzentration des verwendeten vWF/NOS3 Antikörpers)	Kaninchen, Merckmillipore, Burlington, Massachusetts, USA (Art. No. PP64)

2.2.5 Software

Tab. 2-6 Materialien für die Histologie – Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
Datenanalyse und -darstellung	GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, USA
Bestimmung des Herzwandvolumens	ImageJ	NIH
Morphometrische Analyse	QWin	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Makro	Wandstärke Muskularisierungsgrad	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

2.3 Materialien für die Molekularbiologie

2.3.1 Geräte

Tab. 2-7 Materialien für die Molekularbiologie – Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Modell</i>	<i>Herstellfirma</i>
Aufnahmegerät nach Gelelektrophorese	Molecular Imager® Chemidoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Kryomikrotom	CM 1850 UV	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Lasermikroskop	LMD6000	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
qPCR	Stratagene Mx3000P	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Stromzufuhr für die Gelelektrophorese	Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech, GE Healthcare, München, Deutschland
Thermozykler	Tpersonal 48	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Mikro	Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge qPCR Platte	Mini Plate Spinner MPS 1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.3.2 Verbrauchsmaterialien/-chemikalien

Tab. 2-8 Materialien für die Molekularbiologie – Verbrauchsmaterialien/-chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
96-Well-Platte	Multiplate™ 96-Well Unskirted PCR Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Abdeckfolie für 96-Well- Platte	Optically Clear Heat Seal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarosegel-Färbung	Sybr® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Oregon, USA
Eppendorf-Tube	DNAase/RNase free	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Tube	8er-Strips	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Ethanol für die Molekularbiologie		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun		Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Keramikkugeln		Bertin, Montigny-le- Bretonneux, Frankreich
Ladepuffer im Agarosegel	6x Loading Dye Solution	ThermoFisher Scientific Schwerte, Deutschland
Mercaptoethanol		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger für die Lasermikrodissektion	PEN-Membrane Slides 2,0 µm	Leica Mikrosystems, Nussloch, Deutschland
Pipettenspitzen	DNAase/RNase free	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland

Probenfixierungsmittel	Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Probenfixierungsschalen	Tissue-Tek® Cryomold® Intermediate Disposable Specimen Molds	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Referenzbanden im Agarosegel	Generuler 100bp Plus	ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Reinigungsspray in der Molekularbiologie	DNAzap™	ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RNase-freies Wasser		ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Tubes zum Homogenisieren		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Hier wurden nur die Verbrauchsmaterialien/-chemikalien aufgeführt, die in der Molekularbiologie zusätzlich verbraucht worden sind.

2.3.3 Kits

Tab. 2-9 Materialien für die Molekularbiologie – Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
cDNA-Synthese-Kit	iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mastermix für die qPCR	iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
RNA-Extraktions-Kit Lungenhomogenat	RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNA-Extraktions-Kit Lasermikrodissektion	RNeasy® Mikro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.3.4 Primer

Tab. 2-10 Materialien für die Molekularbiologie – Primer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma</i>
Primer für die qPCR		Metabion International AG, Planegg, Deutschland

2.3.5 Software

Tab. 2-11 Materialien für die Molekularbiologie – Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Details</i>	<i>Herstellfirma/Internetseite</i>
Auswertung der qPCR	MxPro [®]	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Auswertung Gelelektrophorese	Image Lab [™]	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Blastn [®] -Datenbank	Blastn [®]	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
Datenanalyse und -darstellung	GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, USA
Genom-Datenbank der NCBI	Nucleotide Database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide
Genom-Datenbank Ensembl	e!Ensembl [©]	http://www.ensembl.org/
Primer-Software der NCBI	Primer Blast [®]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer-Software zur manuellen Herstellung	Primer3 [©]	http://primer3.ut.ee/
Spektralphotometer- Software für ND-1000	NanoDrop 1000 [©]	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.4 Methoden

2.4.1 Bestimmung des Herzwandvolumens

Die Bestimmung des Herzwandvolumens wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dino A. Guissani (*Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Vereinigtes Königreich*) durchgeführt. Die fixierten Herzen wurden dazu transversal vollständig in 5mm Scheiben geschnitten und fotografiert. Zur Bestimmung des absoluten Herzvolumens wurde ein Punktraster mit der ImageJ Software über die Bilder der Herzschnitte gelegt. Die Punkte, die auf der Ventrikelwand und dem Lumen lagen, wurden gezählt. Um das Volumen zu bestimmen wurde das Cavalieri Prinzip mit folgender Formel angewendet ⁶⁷:

$$V_{(obj)} = t \times \sum a = t \times a_{(p)} \times \sum P$$

$V_{(obj)}$ ist dabei das Volumen des Herzkompiments; t ist die totale Wanddicke des Herzens (Anzahl der Schnitte x Dicke der Schnitte); $a_{(p)}$ ist die Fläche, die mit jedem Punkt assoziiert ist und $\sum P$ ist die Summe der Punkte für dieses spezifische Kompartiment.

2.4.2 Histologische Untersuchungen

Um den pulmonalvaskulären Gefäßumbau der Schafe zu beurteilen, die in der pränatalen Phase unter Normoxie bzw. Hypoxie unter Gabe von NaCl oder Vitamin C aufwuchsen, wurden histochemische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Sämtliche Färbungen wurden sowohl im Lungengewebe der fetalen und adulten Schafe der verschiedenen Behandlungsgruppen durchgeführt.

Aus den in Paraffin eingebetteten Lungen wurden 3 μ m dünne Schnitte hergestellt. Diese wurden in einem warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger gezogen und anschließend auf einer Heizplatte getrocknet.

2.4.2.1 Histochemische Färbungen

Elastica-Färbung

Die Schnitte wurden, wie bereits beschrieben ^{29,30,158}, entsprechend einem üblichen histopathologischen Verfahren nach Elastica-van-Gieson gefärbt, um die Wandstärke der Gefäße zu bestimmen (s. Tab. 2-12).

Tab. 2-12 Protokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren</i>	
16 Std	Resorcin-Fuchsin
15 min	Leitungswasser
abspülen	Aqua dest.
5 min	Fe – Hämatoxylin nach Weigert A und B – 1:1
abspülen	Aqua dest.
15 min	Leitungswasser
abspülen	Aqua dest.
10 min	Van-Gieson-Lösung
abspülen (kurz)	Aqua dest.
<i>Dehydrieren und Eindecken</i>	

Die Färbung erlaubte die Differenzierung der Gewebsbestandteile. So färbten sich elastische Fasern braunschwarz, Bindegewebe rot, Muskulatur und Epithel gelbbraun sowie Zellkerne braunschwarz.

Trichrom-Färbung

Um den Kollagengehalt des Lungengewebes bestimmen und so Rückschlüsse auf eventuelle fibrotische Veränderungen ziehen zu können, wurde eine Trichromfärbung nach Masson durchgeführt (s. Tab. 2-13).

Tab. 2-13 Protokoll der Trichrom-Färbung

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren</i>	
abspülen	Aqua dest.
60 min	Bouin's Fluid bei 59°C
5 min	Leitungswasser
10 min	Fe-Hämatoxylin nach Weigert A und B – 1:1
10 min	Leitungswasser
5 min	Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin
30 sek	Aqua dest.
5 min	Phosphotungstic-Phosphomolybdic Acid
10 min	Aniline-Blue
1 min	Essigsäure 1 %

30 sek	Aqua dest.
<i>Dehydrieren und Eindecken</i>	

Im Zuge der Färbung stellten sich Zellkerne schwarz, Zytoplasma und Muskulatur rot sowie Kollagen blau dar.

2.4.2.2 Immunhistochemische Färbung

Doppelfärbung – α -Aktin und von-Willebrand-Faktor

Durch die immunhistochemische Methode der Doppelfärbung konnte spezifisch die glatte Muskulatur durch einen anti- α -glattmuskulären Aktin-Antikörper bzw. das Endothel durch einen Anti-von-Willebrand-Faktor(vWF)-Antikörper abgebildet werden. Mithilfe dieser Färbung konnte der Grad der Gefäßmuskularisierung dargestellt und ausgewertet werden. Das bereits beschriebene Färbeprotokoll^{29,148} wurde für das Gewebe der Schafslungen angepasst und optimiert (s. Tab. 2-14).

Tab. 2-14 Protokoll der Doppelfärbung α -Aktin und vWF

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren</i>	
abspülen	Aqua dest.
20 min	Kochen in Rodent Decloaker (ph 6,0)
10 min	Warmhalten in Rodent Decloaker
30 min	Kühlen in Rodent Decloaker
abspülen	Aqua dest.
20 min	H ₂ O ₂ -Methanol-Gemisch 15 %
2 x 5 min	Aqua dest.
2 x 5 min	TBS
15 min	Proteinase K
abspülen	Aqua dest.
4 x 5 min	TBS
20 min	BSA 10 %
4 x 5 min	TBS
15 min	Background-Sniper
4 x 5 min	TBS
30 min	Primärantikörper 1: α -Aktin 1:800 (Maus, monoklonal) bzw. IgG2a kappa Isotypkontrolle 1:200
4 x 5 min	TBS

30 min	Primärantikörper 2: vWF 1:1000 bei 37 °C inkubieren (Kaninchen, polyklonal) bzw. IgG Isotypkontrolle 1:1750
4 x 5 min	TBS
30 min	MACH 2 Double Stain Polymer 1
4 x 5 min	TBS
ca. 15 sek	DAB Betazoid
abspülen	Aqua dest.
ca. 1 min 30 sek	WARP Red
abspülen	Aqua dest.
ca. 10 sek	Hämatoxylin
abspülen	Aqua dest.
1 min	TBS
5 min	Leitungswasser
1 min	Aqua dest.
<i>Kurzes Dehydrieren und Eindecken</i>	

Nach dieser indirekten immunhistochemischen Färbung zeigten sich das Endothel braunschwarz, die glatte Muskulatur rot und die Zellkerne blau. Zur Überprüfung der Primärantikörspezifität bei der Doppelfärbung wurden Schnitte anstelle der Primärantikörper gegen α -Aktin und vWF mit den jeweils spezifischen Isotypkontrollantikörpern inkubiert. Wie in Abb. 2-3 ersichtlich kam es unter Verwendung der Isotypkontrollantikörpern weder zur immunhistochemischen Anfärbung des Endothels noch der glatten Muskulatur. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle die Milz und die Niere des Schafes mit den Primärantikörpern gegen α -Aktin bzw. vWF inkubiert. Es zeigte sich auch hier das klassische Bild der Doppelfärbung. Die glatte Muskulatur wurde durch den α -Aktin-Antikörper in rot und das Endothel durch den vWF-Antikörper in braun angefärbt (s. Abb. 2-4).

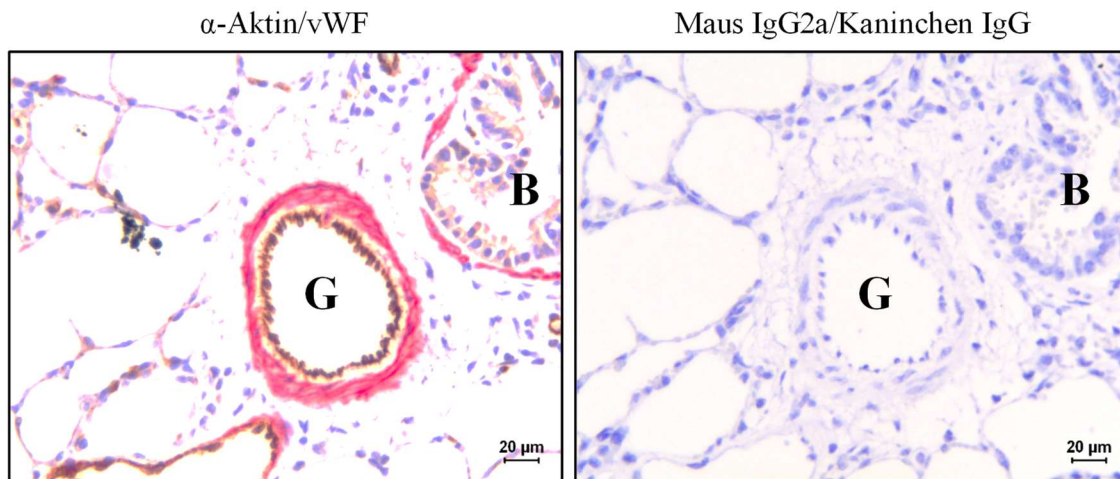


Abb. 2-3 Exemplarische, histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades eines peripheren Pulmonalgefäßes des adulten Schafes
 Rechts: Doppelfärbung gegen glattmuskuläres α -Aktin (rot) und vWF (braun), links: Isotypkontrollfärbung (analysiert bei 400-facher Vergrößerung). G = Gefäß, B = Bronchus.

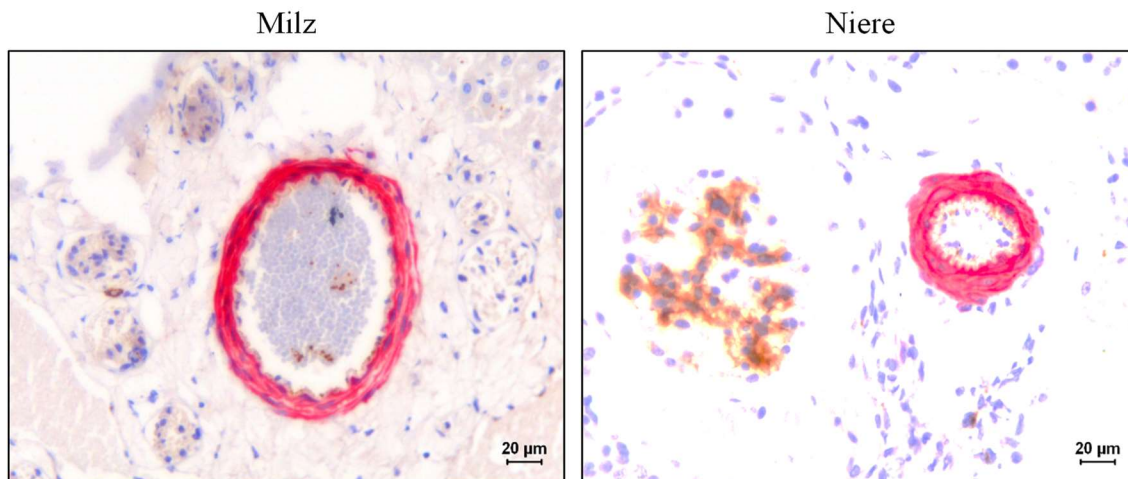


Abb. 2-4 Exemplarische, histologische Darstellung der Muskularisierung eines Gefäßes in der Schaf-Milz und -Niere
 Doppelfärbung gegen glattmuskuläres α -Aktin (rot) und vWF (braun), links Milz, rechts Niere.

Einfachfärbung – NOS3

Für weiterführende Untersuchungen wurde NOS3 durch einen Anti-NOS3-Antikörper spezifisch dargestellt. Nachfolgend ist das Färbeprotokoll dargestellt (s. Tab. 2-15):

Tab. 2-15 Protokoll der Einfachfärbung – NOS3

<i>Entparaffinieren und Rehydrieren</i>	
abspülen	Aqua dest.
25 min	Kochen in Citratpuffer (ph 6,0)
10 min	Warm halten in Citratpuffer
30 min	Kühlen in Citratpuffer
abspülen	Aqua dest.
20 min	H ₂ O ₂ -Methanol-Gemisch 15 %

Material und Methoden

2 x 5 min	Aqua dest.
2 x 5 min	TBS
15 min	Proteinase K
abspülen	Aqua dest.
4 x 5 min	TBS
20 min	BSA 10 %
4 x 5 min	TBS
15 min	Background-Sniper
4 x 5 min	TBS
30 min	Primärantikörper: NOS3 1:400 (Kaninchen, polyklonal) bzw. IgG Isotypkontrolle 1:800
4 x 5 min	TBS
30 min	AP Polymer System
4 x 5 min	TBS
ca. 20 sek	WARP Red
abspülen	Aqua dest.
Ca. 10 sek	Hämatoxylin
abspülen	Aqua dest.
1 min	TBS
5 min	Leitungswasser
1 min	Aqua dest.
<i>Kurzes Dehydrieren und Eindecken</i>	

Nach dieser indirekten immunhistochemischen Färbung zeigte sich NOS3 rot und die Zellkerne blau. In der Negativkontrolle konnte NOS3 nicht detektiert werden (Abb. 3-38, Seite 82).

2.4.2.3 Histologische Analysen

Alle Schnitte wurden geblindet ausgewertet.

Eine von *Leica* speziell entwickelte Software namens *QWin* wurde für die morphometrische Analyse der Lungengefäße verwendet. Die Ergebnisse wurden automatisch in eine *Excel*-Tabelle übertragen und abgespeichert.

Morphometrische Analyse der Wandstärke

Für die Bestimmung der mittleren Wanddicke wurden pro Schafslunge mindestens 100 Gefäße nach der histochemischen Elastica-Färbung bei 400- und 630-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Gefäße wurden zudem anhand des externen Durchmessers in die Größenkategorien **0–69 µm** (ca. 85 % aller Gefäße), **70–99 µm** (ca. 10 % aller Gefäße) und **> 100 µm** (ca. 5 % aller Gefäße) eingeteilt.

Die mittlere Wanddicke eines Gefäßes wurde definiert als Abstand zwischen *Lamina elastica interna* und *Lamina elastica externa*, errechnet aus ca. 5–8 Messpunkten. Die mediale Wandstärke wurde wie bereits beschrieben¹⁴⁸ in Bezug zum externen Durchmesser der Gefäße angegeben. Sie wurde wie folgt berechnet und in Prozent angeführt:

$$\text{Mediale Wandstärke (\%)} = \frac{2 \times \text{mittlere Wanddicke}}{\text{externer Gefäßdurchmesser}} \times 100$$

Die Adventitia konnte aus technischen Gründen beim Bestimmen des externen Gefäßdurchmessers nicht berücksichtigt werden, sodass der Querdurchmesser die Strecke bis zur *Lamina elastica externa* umfasste.

Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Um den Muskularisierungsgrad der Schafslungen zu ermitteln, wurden pro Gewebeschnitt mindestens 100 Gefäße nach immunhistochemischer Doppelfärbung bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden die Gefäße in die oben bereits genannten Kategorien nach dem externen Durchmesser zusammengefasst:

Innerhalb dieser Kategorien wurden die Gefäße nach ihrem Grad der Muskularisierung, wie bereits beschrieben^{29,158}, folgendermaßen unterteilt:

nicht muskularisiert: ≤ 5 % Anteil an positivem glattmuskulärem α-Aktin in der Gefäßmedia

teil muskularisiert: ≤ 70 % Anteil an positivem glattmuskulärem α-Aktin in der Gefäßmedia

voll muskularisiert: > 70 % Anteil an positivem glattmuskulärem α-Aktin in der Gefäßmedia

Der Anteil an positivem glattmuskulärem α-Aktin wurde durch die Software kolorimetrisch-spektrometrisch analysiert und erkannt. Vorausgehend wurde das α-Aktin

durch die immunhistochemische Färbung rot dargestellt und konnte so von der Software detektiert werden.

Visuelle Beurteilung der Fibrosierung

Für die visuelle Beurteilung der Fibrosierung diente die histochemische Trichromfärbung, durch die spezifisch das Kollagen angefärbt wurde. Eine Fibrosierung des Gewebes korreliert dabei mit einem erhöhten Kollagengehalt. Alle Lungenschnitte wurden unter verschiedenen Vergrößerungen betrachtet, wobei u. a. der Lungenschnitt als Ganzes sowie die Umgebung der jeweiligen Gefäße beurteilt wurden.

Visuelle Beurteilung der Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbungen von NOS3 wurden unter dem Mikroskop bezüglich der Lokalisation von NOS3 in der Schafslunge unter verschiedenen Vergrößerungen beurteilt.

2.4.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Neben der histologischen Charakterisierung wurden auch molekularbiologische Untersuchungen mithilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Die qPCR erlaubt es, die *messenger RNA* (mRNA) Expression von entsprechenden Zielgenen zu untersuchen.

2.4.3.1 qPCR – Lungenhomogenat

Extraktion der RNA

Mittels eines Homogenisators wurde das Lungengewebe zerkleinert, sodass die Zellen aufgeschlossen wurden. Aus diesem Homogenat wurde mithilfe eines Kits (RNeasy® Mini Kit) die RNA extrahiert, was gemäß Angaben des herstellenden Unternehmens erfolgte. Anschließend wurde mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop®) die Konzentration und Qualität der gewonnenen RNA bestimmt.

Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Entsprechend dem Protokoll aus dem cDNA-Synthese-Kit (iScript™ cDNA Synthesis Kit) wurden 1000 ng RNA in cDNA mithilfe eines Thermozyklers umgeschrieben.

Anschließend wurde die cDNA mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die finale Konzentration betrug 200 ng/µl.

Herstellung der Primer

Für die Primer-Herstellung wurde die Primer3[®]-Software genutzt. Zur Kontrolle wurden die Primer mit der Primer-Blast-Software geblastet, um unspezifische Bindungen innerhalb des Primers bzw. zu anderen Sequenzen auszuschließen²¹⁸. Falls die automatische Erstellung der Primer nicht gelang, wurde die gewünschte Sequenz in der Ensembl-Datenbank analysiert und manuell über die Primer3[®]-Software hergestellt, woraufhin die Spezifität manuell durch die Blastn[®]-Datenbank-Recherche bestätigt wurde. Lagen verschiedene Transkriptions-Spleiß-Varianten der mRNA vor, wurden die Primer so konzipiert, dass alle Spleiß-Varianten (s. verschiedene *NCBI-Reference-IDs* in der Tab. 2-16) durch den Primer abgedeckt wurden (s. Ausnahmen in der Tab. 2-16).

Die Schmelztemperatur aller Primer wurde zwischen 61 und 63 °C gewählt, wobei die Länge des PCR-Produktes 100–150 bp (Basenpaare) betrug. Außerdem wurden die Primer immer Intron-überspannend designt, d. h. der Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer lag auf verschiedenen Exons. Die Länge des Introns betrug hierbei mindestens 1000 bp (s. Ausnahmen in der Tab. 2-16). Diese Methode sowie die relative Kürze des PCR-Produkts verhindern die Amplifikation von genomischer DNA. Nachfolgend findet sich eine Übersicht aller Primer, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (s. Tab. 2-16).

Tab. 2-16 Liste der verwendeten Primer für die qPCR

<i>NCBI-Referenz-ID</i>	<i>Gen</i>	<i>Primer Sequenz</i>	<i>Produktlänge</i>
XM_004018745.2/ XM_012100477.1	RPS18	F: 5'-ATGGGCGGCGGAAAATTGC-3'	120 bp
		R: 5'-CAGTGAGCTCTCCTGCCCTC-3'	
XM_004008676.3	CYC C	F: 5'-GACTTCACCCGGGAGATGG-3'	105 bp
		R: 5'-CATGCTGACCCACCCAATGC-3'	
XM_004014630.1	KCNB1	F: 5'-GAAGCCCAATTCCTCTGTGGC-3'	136 bp
		R: 5'-GTCTGTGGTCTGGCCGAAC-3'	
NM_001009810.1	EDN1	F: 5'-AGAAAGCCTGGGACAACCGA-3'	120 bp
		R: 5'-TGCTGTTGCTGATGGTCTCCA-3'	
XM_004012488.1	NOS2	F: 5'-CGATGTCAGTGGCAAGCACC-3'	143 bp
		R: 5'-CAGGCTTGGCGTGCATACTG-3'	
NM_001129901.1	NOS3	F: 5'-GCACCTACCACCTCCGAGAG-3'	112 bp
		R: 5'-GCATCGAACACCTGCAGCTT-3'	
NM_001280682.1	UCP2	F: 5'-AGGCCTCAGTGTGGGACCTA-3'	124 bp
		R: 5'-ACGATTCCTGCAACCTCCCA-3'	

XM_004003285.1 /-86.1	TRPC1	F: 5'-GCTTGGCCAGTCCAGCTCTA-3' R: 5'-CTGCCGGGCTAGTTCCTCAT-3'	137 bp
XM_004015978.1	TRPC6	F: 5'-AAGTTCCTCGTGGTCCTCGC-3' R: 5'-GAGGCAGCATGTGCCACAAA-3'	131 bp
XM_004022477.1 /-78.1	NOX1	F: 5'-TGCAAGCCTCCCCAGTTTGA-3' R: 5'-AACCTTCTGCTGAGAGCGGT-3'	117 bp
XM_004019392.1	NOX4	F: 5'-TGGAAGAGCCCAGGTTCCAA-3' R: 5'-GGTGA CTGGCTTATTGCTCCG-3'	119 bp
XM_004016296.1 /-97.1	PDE2A	F: 5'-TCATAAGCCGGGCCACTGAC-3' R: 5'-CGTGCTGGTGTAGTGGAAGC-3'	122 bp
XM_004007550.1	PDE3A	F: 5'-CAGGCCATT CACAAGCCCAG-3' R: 5'-AACCAGGGGGCAA ACTCCTC-3'	136 bp
XM_004016587.1	PDE3B	F: 5'-GGACCCCGCTGAGAAAGGAG-3' R: 5'-TGGTTCGATAGGTGGCAGACC-3'	117 bp
XM_004023436.1	PDE4A	F: 5'-GCAGCAGCCTCAACGATTCC-3' R: 5'-TCAGGCCCCACTTGTT CAGG-3'	102 bp
XM_004016956.1 /-57.1/-58.1/-59.1/ 60.1/-61.1	PDE4D	F: 5'-TCACGCTGCAGATGTCGTCC-3' R: 5'-TCAACGTCATGGATTGCACTGG-3'	120 bp
XM_004009586.1 /-87.1	PDE5A	F: 5'-CGGAAGAGCGTCGCCTATCA-3' R: 5'-TCTCTAGGTCCGTCAGCCTCT-3'	109 bp
XM_004011555.1	PDE10A	F: 5'-CAAGGACCGGGGAGGTTCTG-3' R: 5'-GCAGAGAATGTTGCGGGTTCG-3'	104 bp
XM_004020488.1	ROCK1	F: 5'-TGGTTTTGTGCGTGCATCCC-3' R: 5'-AGGCACTAGGTCACGTGGTT-3'	118 bp
XM_004007209.1	ROCK2	F: 5'-GCTCCAGGCCTTGACATTG-3' R: 5'-TCGCACAGGCAATGAAAGCC-3'	121 bp
NM_001024737.1	EPO	F: 5'-TGCTGTTTCTCTGGGCCTC-3' R: 5'-CTTCTGCACAGCCATCGTG-3'	126 bp
XM_004006045.1	XDH	F: 5'-AGCTTGTCTGCCACTGGGTT-3' R: 5'-CAAGCCACCCCGTAGGTGAA-3'	101 bp
XM_004016396.1	CAT	F: 5'-AGCAGAGGAAACGCCTGTGT-3' R: 5'-AAAAGAGCCTGGATGCGGGA-3'	130 bp
XM_004021459.1 /-60.1/-61.1	P4HA1	F: 5'-CAAAACCAAGGCTGAGGCGAG-3' R: 5'-CGTGACACCACAGGGTTTTTCAT-3'	121 bp
XM_004008639.1 /-40.1	P4HA2	F: 5'-AGGAGTTGCTGGCCTAGTGG-3' R: 5'-CCCAGGACACCAAGCCAGG-3'	134 bp
XM_004016711.1	P4HA3	F: 5'-AATGAACTCGGGGAACCGGG-3' R: 5'-CAGGAACGCTGAAGTTGCCG-3'	101 bp
NM_001025110.1	VEGFA	F: 5'-GGCAGAAACCCCATGAAGTGATG-3' R: 5'-GCACACAGGACGGCTTGAAA-3'	135 bp
NM_001145185.1 <i>kein Intron spanning möglich, da nur ein Exon vorhanden</i>	SOD1	F: 5'-TCCTTGTCTGCTTGGTGGGG-3' R: 5'-CTTTGCCCTCGAAGCGGATGG-3'	134 bp
NM_001280703.1	SOD2	F: 5'-GCACATCAACGCGCAGATCA-3'	145 bp

		R: 5'-TAACGCAGGCTGCAGAGCTA-3'	
XM_004009740.1 <i>Transkript Variante 1</i>	SOD3.1	F: 5'-AAAGTGGAGCCGTGGGTAGG-3' R: 5'-CGACAGCTTGGTTCGAGGTGA-3'	113 bp
XM_004009741.1 <i>Transkript Variante 2</i>	SOD3.2	F: 5'-GTTTTCCACAGTGCCTGTCGTG-3' R: 5'-GCATGGCGAGTCGAGCAC-3'	100 bp
XM_004018462.1 <i>Intron spanning nur mit 244bp</i>	GPX1	F: 5'-CGTGCAACCAGTTTGGGCAT-3' R: 5'-GATGCGCCTTCTCGCCATTC-3'	141 bp
XM_004017293.1	sGCα1	F: 5'-AGTGACACCCACGCTGTTCA-3' R: 5'-TGACCCAGAATGCAGCCCAA-3'	120 bp
XM_004016540.1	sGCα2	F: 5'-TGTTGCTGCAGGGCTCCATA-3' R: 5'-GCACAGAGCCTGAGTGAATGC-3'	149 bp
XM_004004588.3	PDK1	F: 5'-AAGGAAAGCTTCGGGGTGGA-3' R: 5'-GCTTCCTTGCCTTTTCCACCA-3'	138 bp
XM_004007950.1	CC	F: 5'-GCTTAGAAAGCGGGACGTTTCG-3' R: 5'-GCACTGGGCACACTTCTGAAC-3'	126 bp

RPS18 = Ribosomales Protein S18; CYC C = Cyclophilin C; KCNB1 = Kv-Kanal 2.1; EDN = Endothelin; NOS = NO-Synthase; UCP = uncoupling protein; TRPC = transient receptor potential cation channel; NOX = NADPH-Oxidase; PDE = Phosphodiesterase; ROCK = Rho-Kinase; EPO = Erythropoetin; XDH = Xanthin Dehydrogenase; CAT = Katalase; P4HA = prolyl-4-hydroxylase alpha; VEGFA = vascular endothelial growth factor A; SOD = Superoxiddismutase; GPX = Glutathionperoxidase; sGCα = soluble guanylatcyclase alpha; PDK = Pyruvatdehydrogenase-Kinase; CC = Cytochrom c; F = forward (vorwärts); R = reverse (rückwärts).

Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und mit RNase-freiem Wasser aufgelöst, woraus eine Konzentration von 100 µM hervorging. Vor der Verwendung wurden die Primer 1:10 auf 10 µM verdünnt. Die Endkonzentration für die qPCR betrug 0,5 µM.

Durchführung der qPCR

Die qPCR wurden mit dem *Mx3000P-QPCR*-Gerät unter Verwendung des *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermixes* nach Angaben des herstellenden Unternehmens durchgeführt. Jede Probe wurde als Doppelprobe angesetzt, wobei aus den erhaltenen Ct-Werten (*cycle of threshold*) der Mittelwert gebildet wurde. Zur Berechnung des ΔCt Wertes wurden die Ct-Werte des Zielgens gegen den Mittelwert der Referenzgene ribosomales Protein S18 (RPS18) und Cyclophilin C (CYC C) normalisiert. Es wurden für die Normalisierung zwei Referenzgene verwendet, da ein Referenzgen zu starke interindividuelle Schwankungen aufwies. Wie schon beschrieben^{13,189} können so Fehler minimiert werden. Der ΔCt Wert für jedes Zielgen wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Referenzgen}} - Ct_{\text{Zielgen}}$$

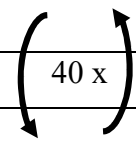
Jeder qPCR-Ansatz hatte ein Endvolumen von 20µl/Well und waren wie folgt zusammengesetzt (s. Tab. 2-17):

Tab. 2-17 Zusammensetzung des Mastermixes

Substanz	Volumen
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	10 µl
RNase-freies Wasser	7 µl
Primer F/R	je 0,5 µl
cDNA	2 µl

Die qPCR wurden nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt (s. Tab. 2-18).

Tab. 2-18 Temperaturprofil der qPCR

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung/Enzymaktivierung	95 °C	10 min	-
Denaturierung	95 °C	10 sek	
Primerhybridisierung	59 °C	20 sek	
Elongation	72 °C	10 sek	
Denaturierung	95 °C	1 min	-

Für jede qPCR-Platte wurde pro Gen eine *non-template* Kontrolle (NTC; Mastermix ohne cDNA) durchgeführt, eine Kontrolle für eine Verunreinigung mit fremder Nukleinsäure. Es wurden nur solche Primerpaare für die qPCR verwendet, die eine spezifische Produktamplifikation zeigten (s. Abb. 2-5, Abb. 2-6) und eine negative NTC (Abb. 2-7) aufwiesen. Die Spezifität der Primerpaare und mögliche Verunreinigungen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Agarose-Gelelektrophorese

Die qPCR Produkte wurden in einem SYBR-Safe-DNA-Gel-Stain-haltigem 1,5%-igem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Zur Detektion wurde der *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+* verwendet. Pro Tasche im Gel wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl *6x Loading Dye Solution* aufgetragen. Als Referenz diente ein *100 bp GeneRuler*.

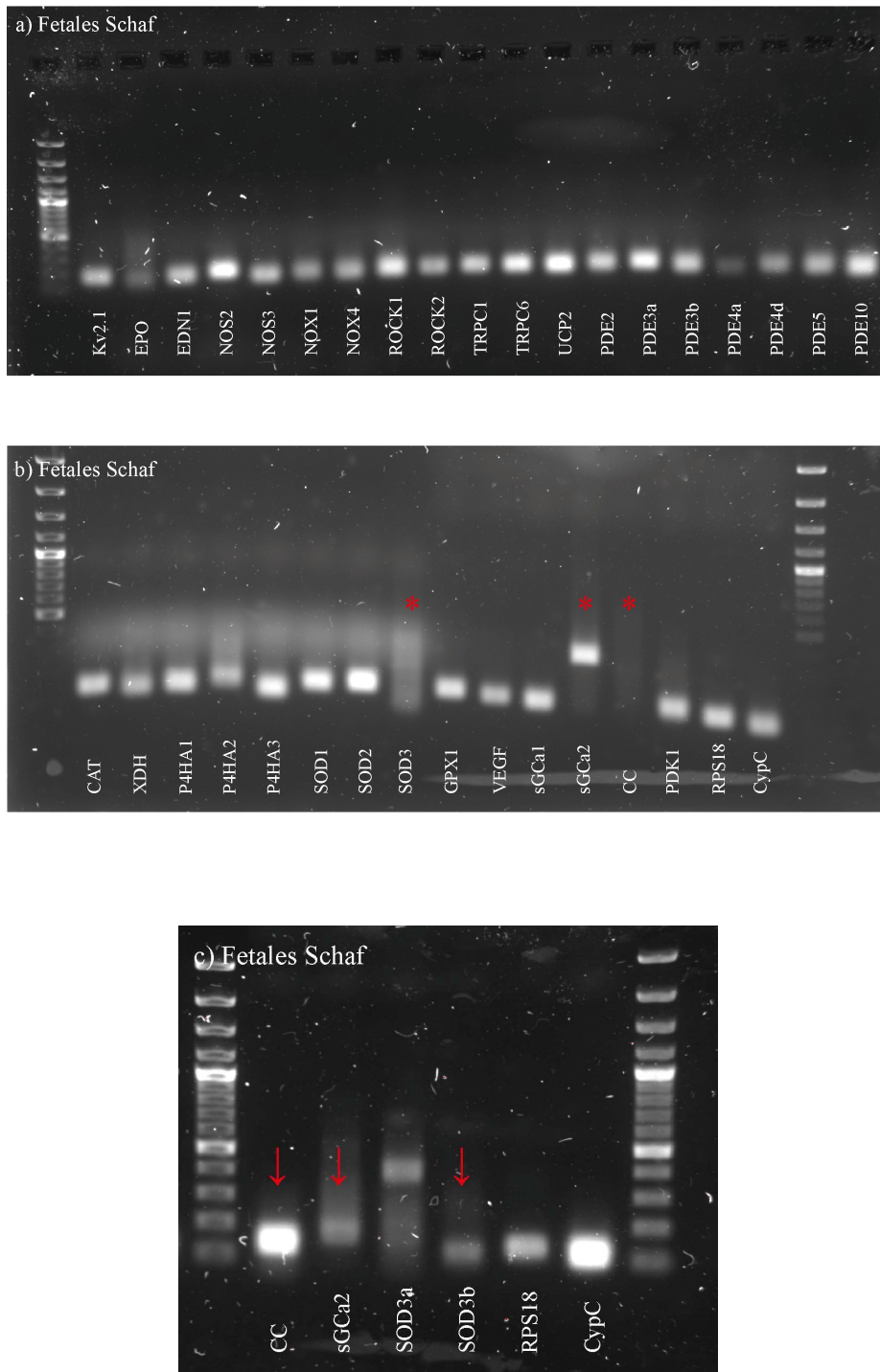


Abb. 2-5 Primer-Optimierung für die qPCR im Lungenhomogenat von fetalen Schafen
a-c) Agarose-Gelelektrophorese von qPCR Produkten. b und c) Die Primer für SOD3, sGCa2 und CC wurden re-designed. * - nicht-funktionierendes Primerpaar; ↓ - neues-funktionierendes Primerpaar. Der 100 bp GeneRuler wurde benutzt, um die Größe der qPCR Produkte abschätzen zu können.

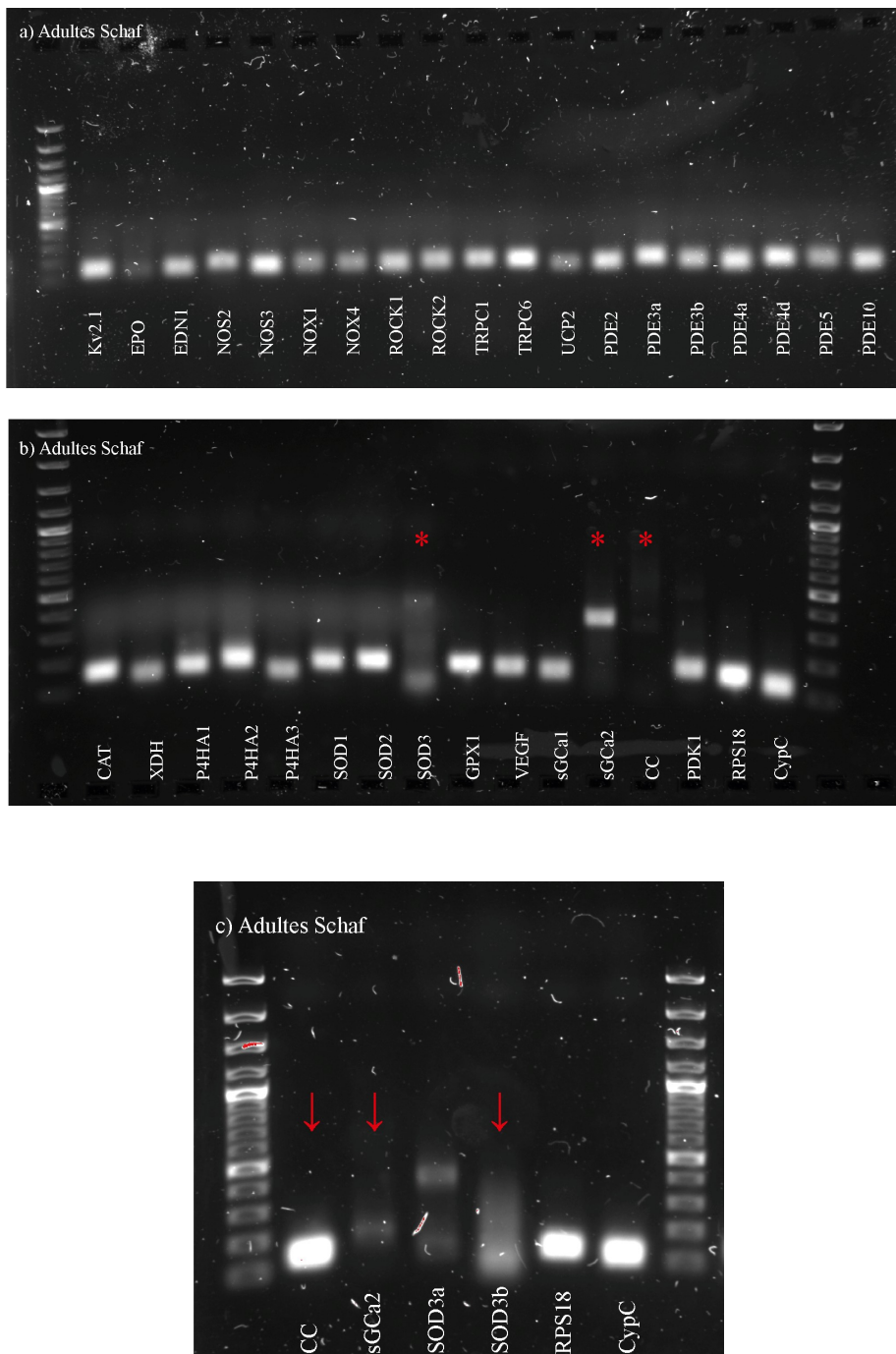
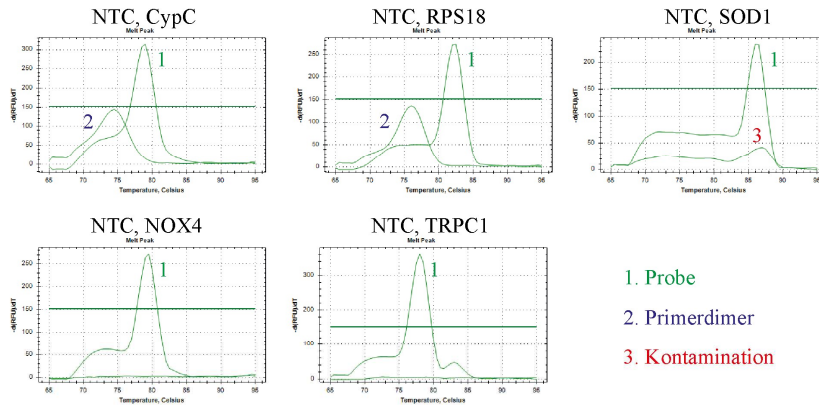


Abb. 2-6 Primer-Optimierung für die qPCR im Lungenhomogenat von adulten Schafen
 a-c) Agarose-Gelelektrophorese von qPCR Produkten. b) und c) Die Primer für SOD3, sGCa2 und CC wurden re-designed. * - nicht-funktionierendes Primerpaar; ↓ - neues-funktionierendes Primerpaar. Der 100 bp GeneRuler wurde benutzt, um die Größe der qPCR Produkte abschätzen zu können.

a) Schmelzkurve



b) Agarose-Gelelektrophorese nach qPCR

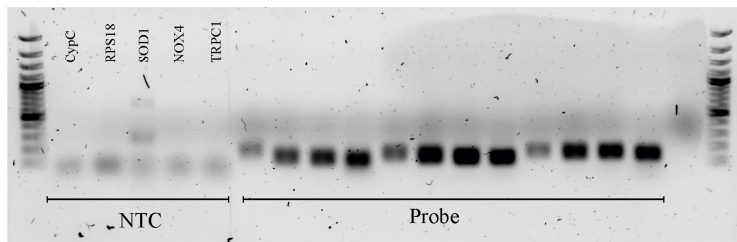


Abb. 2-7 Non-template Kontrolle der qPCR

a) Analyse der Schmelzkurven. Abkürzungen: 1. Schmelzkurve eines spezifischen qPCR Produkts im Lungenhomogenat von adulten Schafen. 2. Schmelzkurve von Primerdimeren. 3. Beispiel für eine Kontamination. b) Agarose-Gelelektrophorese der qPCR Produkte. Der 100 bp GeneRuler wurde benutzt, um die Größe der qPCR Produkte abschätzen zu können.

2.4.3.2 qPCR – Lasermikrodissektion

Mithilfe der Lasermikrodissektion (LMD) können spezifische Strukturen (im vorliegenden Fall Pulmonalgefäße) in einem histologischen Präparat herausgeschnitten werden. Nach RNA-Isolation lässt sich die Expression von Zielgenen dann speziell in den entsprechenden Kompartimenten der Lunge untersuchen.

Für die LMD wurden, wie bereits beschrieben¹²³, aus der zuvor in *Tissue-Tek* fixierten Lunge 8 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Diese wurden auf Polyethylenaphthalat(PEN)-Membran-beschichtete Objektträger gezogen, mit Hämalaun gefärbt und in Ethanol mit aufsteigender Konzentration (70 %, 96 %, 99,6 %) entwässert. Anschließend wurden mithilfe des Lasermikroskops 40 Pulmonalgefäße pro Lunge ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Tube aufgefangen. Aus dem so vorbereiteten Material wurde die RNA mithilfe des *RNeasy® Mikro Kits* extrahiert. Dies erfolgte gemäß Protokoll des herstellenden Unternehmens. Die darauffolgende Synthese zur cDNA sowie die qPCR wurden wie in den Kapiteln zuvor beschrieben durchgeführt.

2.4.4 Statistische Auswertung

Alle Daten der histologischen und molekularbiologischen Auswertungen wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Um mehrere Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Two-Way-ANOVA durchgeführt, die die Interaktion (unter der Abbildung angegeben) zwischen Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) vergleicht. Bei einer signifikanten Interaktion wurde ein *Tukey's posthoc test* durchgeführt, um die statistischen Unterschiede zu ermitteln (in der Abbildung angegeben). Auch bei kleinen Stichprobenumfängen, wie den molekularbiologischen Untersuchungen, wurde dieses parametrische Verfahren angewendet. Im Gegensatz zu nichtparametrischen (Rang-basierten) Verfahren können bei den parametrischen Verfahren Interaktionen (nicht-additive Effekte) untersucht werden. Durch die Rang-Bildung würden diese nicht-additiven Effekte eliminiert werden ²⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant definiert und ist mit einem in den Abbildungslegenden definierten Symbol gekennzeichnet. Zur Auswertung der Daten wurde die *GraphPad-Prism*-Software genutzt.

Die Anzahl der Tiere wurde mit einem „N“ und die der Gefäße mit einem „n“ gekennzeichnet.

Im Folgendem findet sich eine Übersicht über die berücksichtigten Tiere bei der statistischen Auswertung der histologischen Färbungen (s. Tab. 2-19, Tab. 2-20). Für die Auswertung des Muskularisierungsgrades mussten bei den fetalen Schafslungen einige Proben ausgeschlossen werden, bedingt durch die ungenügende Färbung bei der immunhistochemischen Doppelfärbung. Dabei wurden solche Proben ausgeschlossen, die nicht eindeutig die definierte Färbung vom Endothel (braunschwarz), glatte Muskulatur (rot) bzw. Zellkern (blau) aufwiesen. Die Variationen der N-Zahlen ergaben sich aufgrund dieser technischen Probleme, bzw. durch ungleiche Gruppengrößen im Versuchsdesign.

Tab. 2-19 Statistische Auswertung der fetalen Schafslungen – Histologie

Fetale Schafslungen				
Gruppen	Σ Tiere	Wandstärke	Muskularisierungsgrad	Fibrotisierung
Nox	N = 8	N = 8	N = 4	N = 8
Nox + VitC	N = 8	N = 8	N = 4	N = 8
Hox	N = 8	N = 8	N = 5	N = 8
Hox + VitC	N = 8	N = 8	N = 8	N = 8
		Σ n = 3210	Σ n = 2101	

Tab. 2-20 Statistische Auswertung der adulten Schafslungen – Histologie

Adulte Schafslungen				
Gruppen	Σ Tiere	Wandstärke	Muskularisierungsgrad	Fibrotisierung
Nox	N = 9	N = 9	N = 9	N = 9
Nox + VitC	N = 9	N = 9	N = 9	N = 9
Hox	N = 9	N = 9	N = 9	N = 9
Hox + VitC	N = 10	N = 10	N = 10	N = 10
		Σ n = 3700	Σ n = 4643	

Nachfolgend wird die Zusammenfassung der molokularbiologischen Auswertung angeführt (s. Tab. 2-21). Pro Behandlungsgruppe wurden je drei bzw. vier Schafe ausgewählt, wobei jene herangezogen wurden, die in der histologischen Auswertung bereits aussagekräftige Ergebnisse zeigten.

Tab. 2-21 Statistische Auswertung – Molekularbiologie

Gruppen	qPCR Lungenhomogenat		qPCR Lasermikrodissektion
	Fetale Schafslungen	Adulte Schafslungen	Adulte Schafslungen
Nox	N = 3	N = 3	N = 4
Nox + VitC	N = 3	N = 3	N = 4
Hox	N = 3	N = 3	N = 4
Hox + VitC	N = 3	N = 3	N = 4

3 Ergebnisse

3.1 Stereologische Ergebnisse

Nachfolgend finden sich die stereologischen Ergebnisse, die zur Bestimmung des rechtsventrikulären Herzwand-Volumens durchgeführt wurden. Diese Resultate wurden von den Kooperationspartnern in Cambridge generiert.

Fetale Schafe

Wie schon in Kapitel 2.1 beschrieben, waren die Feten im letzten Drittel der Schwangerschaft normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, entweder mit oder ohne Vitamin-C-Behandlung.

Die stereologischen Untersuchungen am fetalen Herzen ergaben ein signifikant vermindertes rechtsventrikuläres Herzwand-Volumen in der hypoxischen Gruppe im Vergleich zur normoxischen Gruppe. Durch die gleichzeitige Gabe von Vitamin C wurde dieser Effekt aufgehoben. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-1).

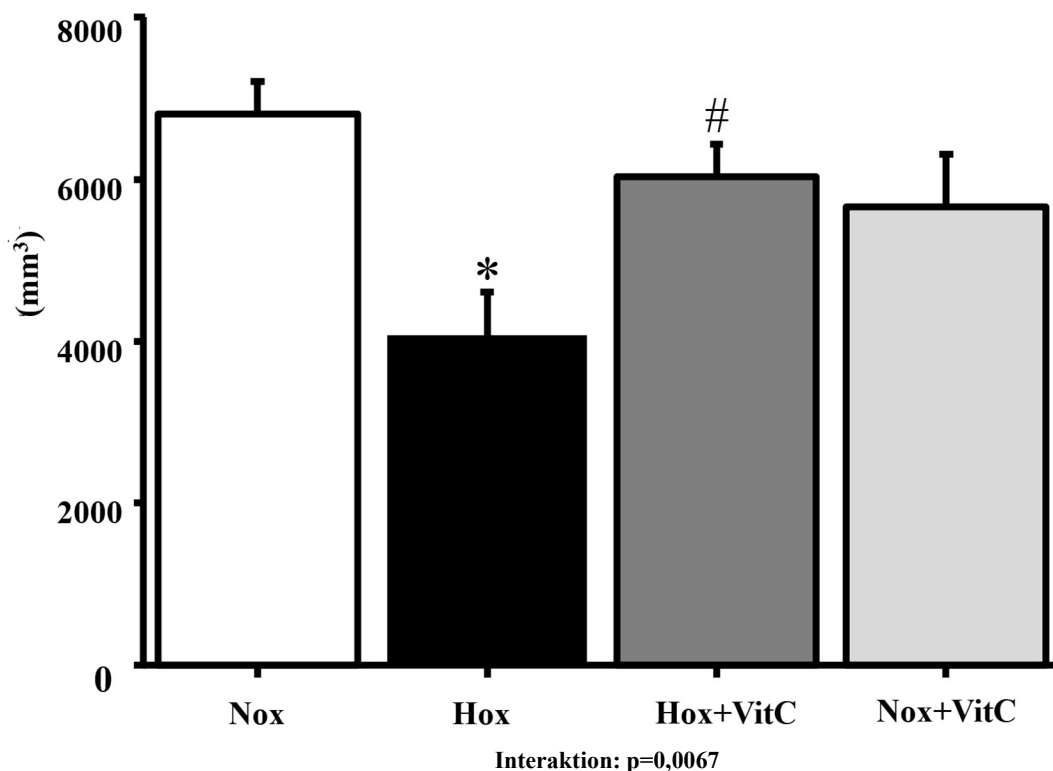


Abb. 3-1 Bestimmung des rechtsventrikulären Herzwand-Volumens der fetalen Schafe mittels stereologischer Untersuchungen

Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C; Nox: N = 5; Hox: N = 6; Hox + VitC: N = 7; Nox + VitC: N = 6; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC); Ergebnisse generiert durch die AG Giussani, Cambridge.

Adulte Schafe

Die Herzen der adulten Schafslungen, die in der Fetalperiode hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten ein signifikant erhöhtes rechtsventrikuläres Herzwand-Volumen. Dabei hob die gleichzeitige Gabe von Vitamin C diese Volumenzunahme auf. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-2).

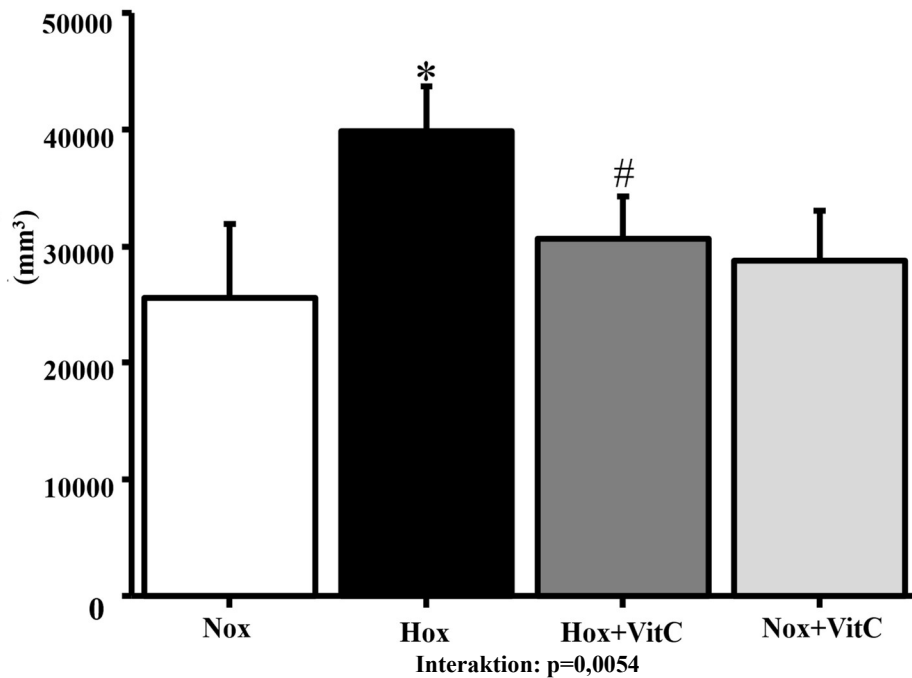


Abb. 3-2 Bestimmung des rechtsventrikulären Herzwand-Volumens der adulten Schafe mittels stereologischer Untersuchungen

Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C; Nox: $N = 10$; Hox: $N = 9$; Hox + VitC: $N = 8$; Nox + VitC: $N = 9$; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC); Ergebnisse generiert durch die AG Giussani, Cambridge.

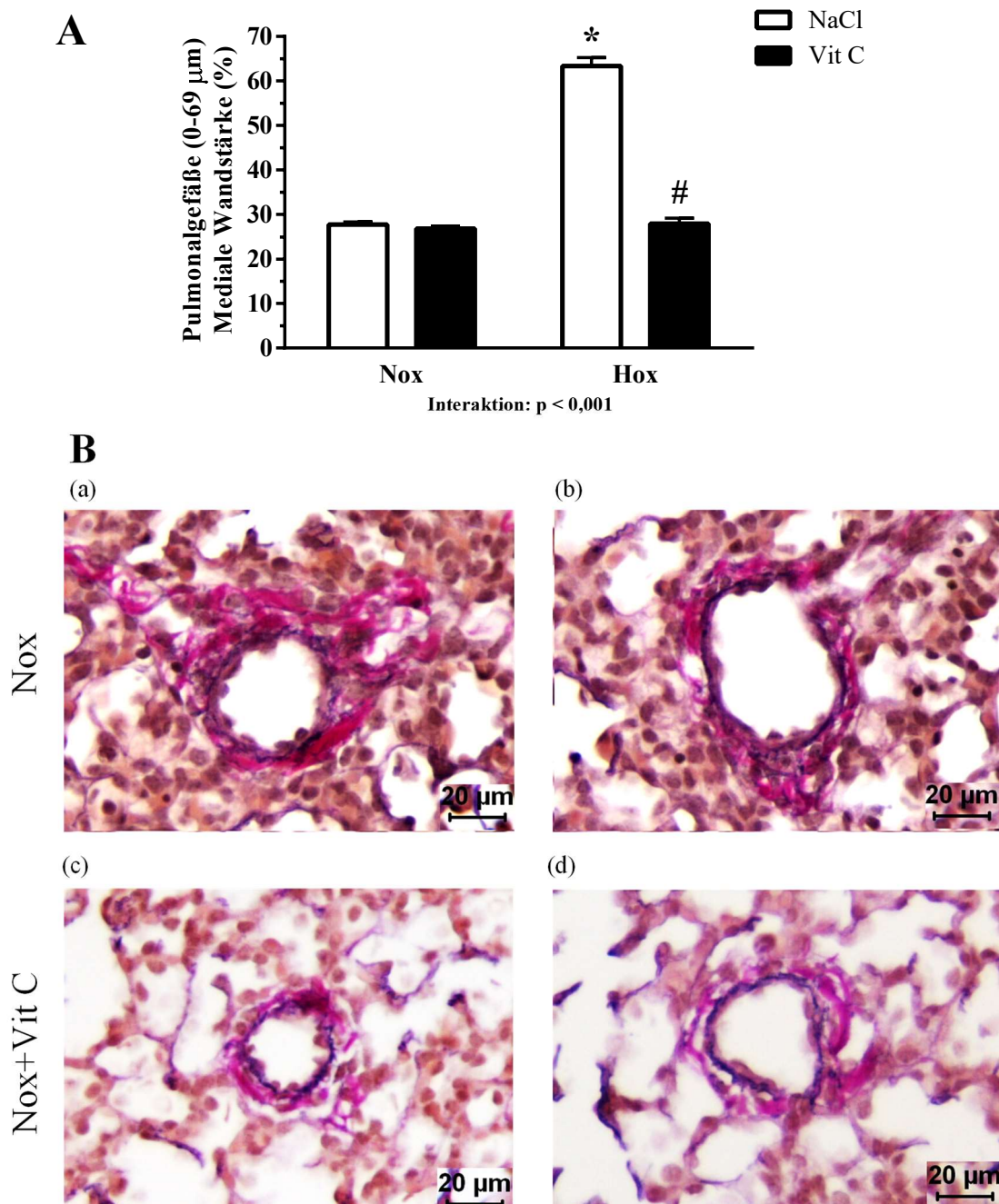
3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 Wandstärke

Nachfolgend finden sich die eigenen Ergebnisse in Hinblick auf die Wandstärke der Lungengefäße von fetalen und adulten Schafen. Nach der histochemischen Elastica-Färbung wurden die Gefäße morphometrisch analysiert und zu kleinen (0–69 μm), mittleren (70–99 μm) und großen (> 100 μm) Gefäßen zusammengefasst (s. Kap. 2.4.2).

Fetale Schafslungen

Die Wandstärke der kleinen (0–69 µm äußerer Gefäßdurchmesser) peripheren Pulmonalgefäße der Normoxie-Gruppe betrug $27,7 \pm 0,6$ %. Ähnlich verhielt es sich bei der Behandlungsgruppe Normoxie und Vitamin C mit $26,8 \pm 0,6$ %. Fetale Schafe, die unter hypoxischen Bedingungen aufwuchsen, zeigten einen signifikanten Anstieg der Wandstärke auf $63,3 \pm 1,9$ %. In den Feten, die zusätzlich zur Hypoxie Vitamin C bekamen, lag die Wandstärke im Bereich der zwei Normoxie-Gruppen. Dabei betrug die mediale Wandstärke hier $27,9 \pm 1,2$ %. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-3).



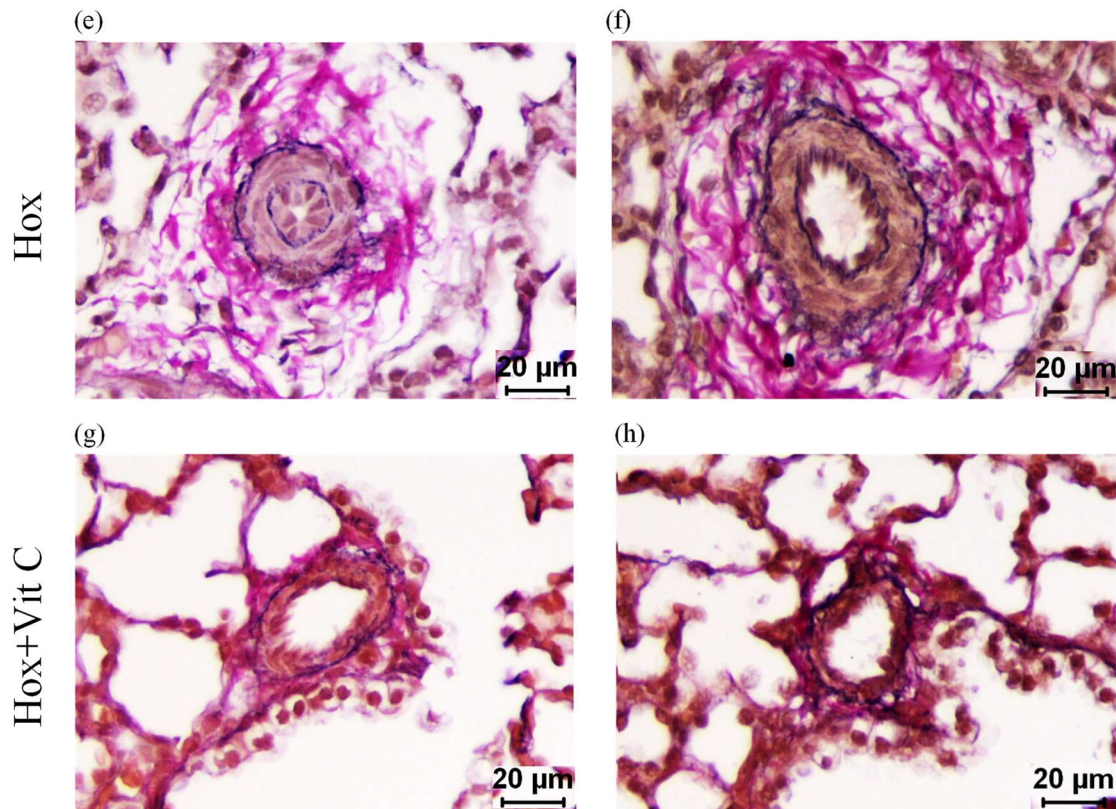


Abb. 3-3 Grafische und histologische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 0–69 µm
A (Nox), (Nox + VitC), (Hox), (Hox + VitC) mit jeweils $N = 8$; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC); **B** Elastica-Färbung (analysiert bei 400-facher Vergrößerung), (a)+(b) Nox, (c)+(d) Nox + VitC, (e)+(f) Hox, (g)+(h) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Ähnlich zeigte sich dies bei den mittleren Pulmonalgefäßen (70–99 µm äußerer Gefäßdurchmesser). Die mediale Wandstärke in der normoxischen Gruppe ergab $24,3 \pm 1,9 \%$ und bei zusätzlicher Gabe von Vitamin C unter Normoxie $23,0 \pm 3,1 \%$. Unter Hypoxie kam es auch in dieser Gefäß-Kategorie zu einer signifikanten Zunahme der medialen Wandstärke auf $47,6 \pm 5,1 \%$. Bei gleichzeitiger Gabe von Vitamin C betrug die Wandstärke $22,0 \pm 2,1 \%$ und war somit vergleichbar mit der der normoxischen Gruppen. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-4).

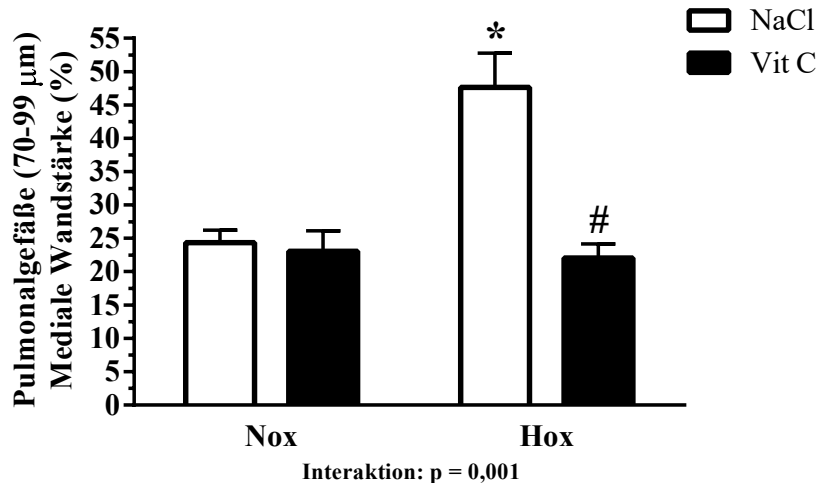


Abb. 3-4 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 70–99 µm

(Nox), (Nox + VitC), (Hox), (Hox + VitC) mit jeweils N = 8; * p < 0,05 (Nox) vs. (Hox); # p < 0,05 (Hox) vs. (Hox + VitC); Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Bei den großen Pulmonalgefäßen (> 100 µm äußerer Gefäßdurchmesser) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die mediale Wandstärke bei den normoxischen Feten lag bei 24,1 ± 3,0 % und mit Vitamin C bei 22,4 ± 2,8 %. Bei den hypoxischen Feten betrug sie 31,9 ± 5,4 % und mit Vitamin C 22,0 ± 3,2 %. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) zeigte keine statistische Signifikanz (s. Abb. 3-5).

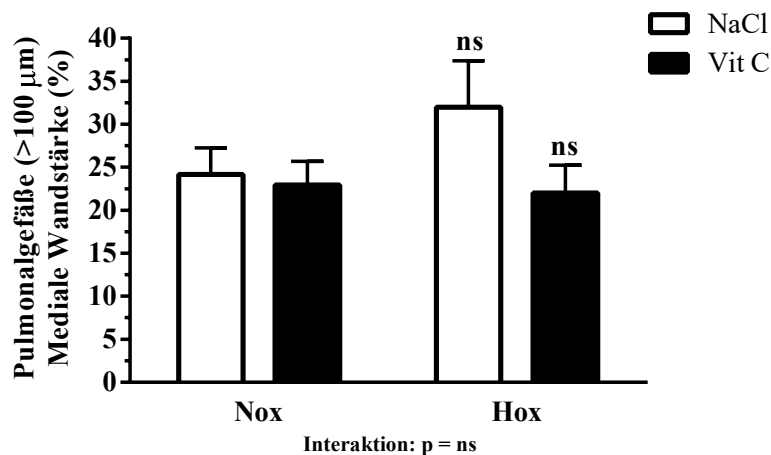
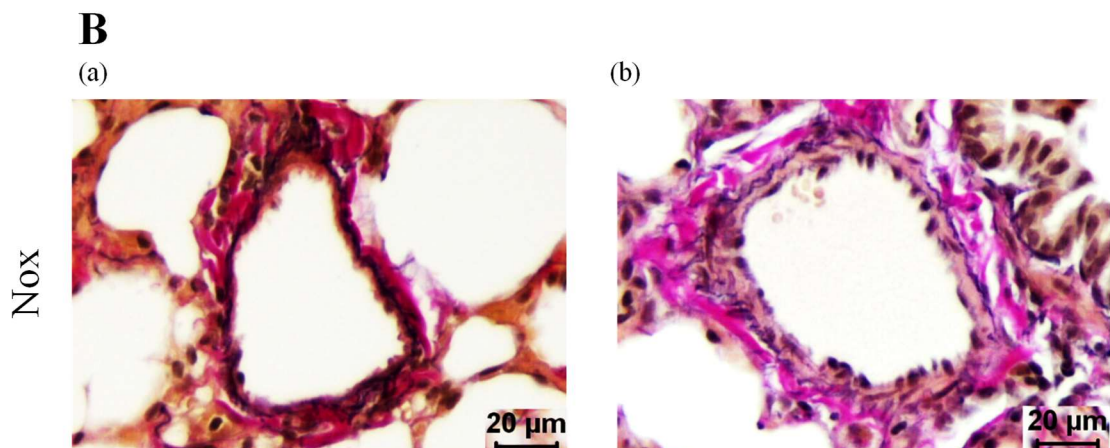
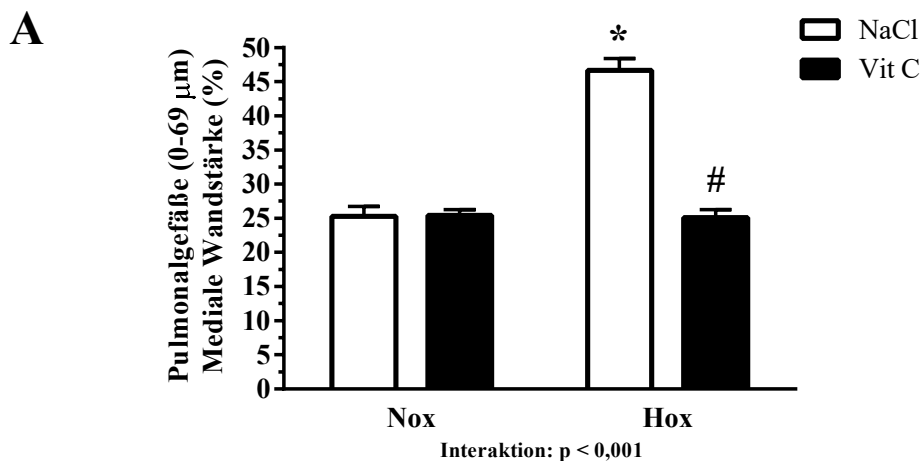


Abb. 3-5 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie > 100 µm

(Nox), (Nox + VitC), (Hox), (Hox + VitC) mit jeweils N = 8; ns = nicht signifikant; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Adulte Schafslungen

Nach der Geburt wuchsen alle Schafe unter normoxischen Bedingungen ohne jegliche Behandlung auf (s. Kap. 2.1). Dabei zeigte die morphologische Untersuchung der Pulmonalgefäße, dass die Zunahme der Wandstärke durch die fetale Hypoxie-Exposition auch im adulten Schaf persistierte. Die mediale Wandstärke der kleinen (0–69 μm äußerer Gefäßdurchmesser) peripheren Pulmonalgefäße der ehemals Hypoxie-ausgesetzten Schafe betrug nach neunmonatigem Aufwachsen unter Normoxie $46,7 \pm 1,7$ %. Dies ist signifikant gegenüber den adulten Schafen, die in der Fetalperiode normoxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Die mediale Wandstärke in der NaCl-Gruppe betrug hier $25,2 \pm 1,5$ % und in der Vitamin-C-Gruppe $25,4 \pm 0,9$ %. Ähnlich war die mediale Wandstärke der adulten Schafe, die während der Fetalperiode zusätzlich zur Hypoxie mit Vitamin C behandelt wurde. Der entsprechende Wert betrug hier $25,0 \pm 1,2$ %. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-6).



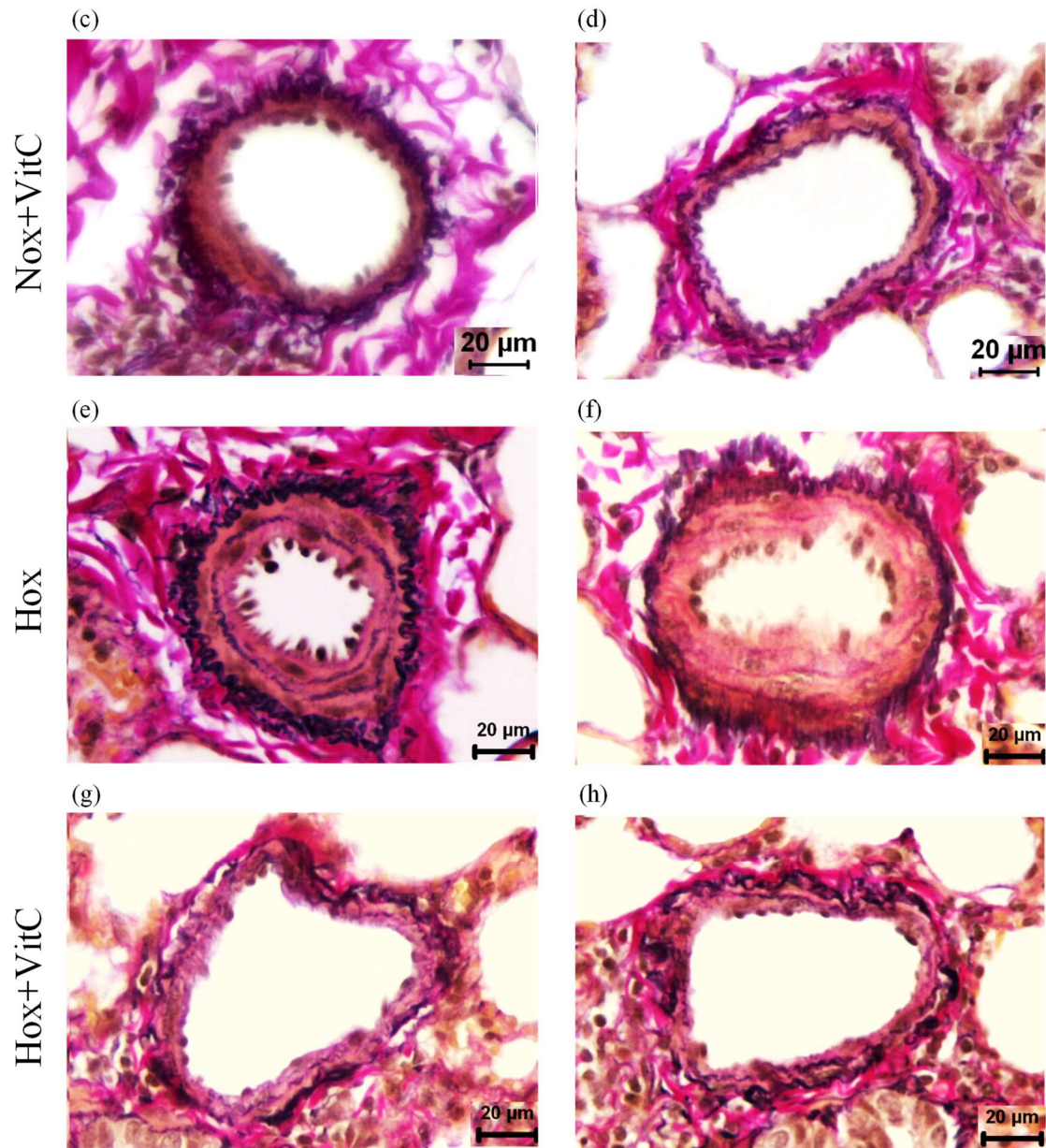


Abb. 3-6 Grafische und histologische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 0–69 μ m

A (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils $N = 9$, (Hox + VitC) mit $N = 10$; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC); **B** Elastica-Färbung (analysiert bei 400-facher Vergrößerung), (a)+(b) Nox, (c)+(d) Nox + VitC, (e)+(f) Hox, (g)+(h) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Auch in den mittleren Pulmonalgefäßen (70–99 μ m äußerer Gefäßdurchmesser) persistierte der Gefäßumbau, der durch die fetale Hypoxie induziert wurde. Die Wandstärke unter Normoxie lag bei $18,6 \pm 1,7$ % und bei zusätzlicher Gabe von Vitamin C in der Fetalperiode bei $20,4 \pm 1,1$ %. Unter fetaler Hypoxie-Exposition betrug die signifikante Zunahme der medialen Wandstärke der adulten Schafe $34,9 \pm 1,0$ %. Unter Vitamin-C-Gabe blieb die Zunahme der Wandstärke aus, sodass diese $18,9 \pm 1,7$ %

betrug. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-7).

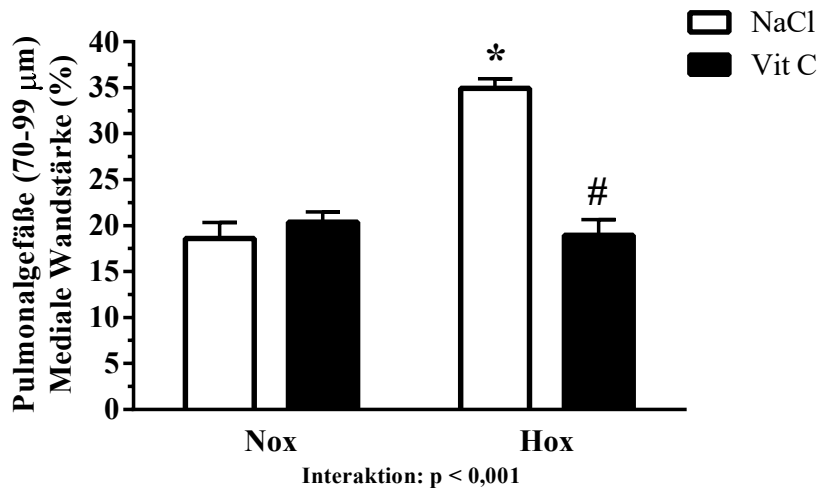


Abb. 3-7 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 70–99 µm
 (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils $N = 9$, (Hox + VitC) mit $N = 10$; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC); Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich bezogen auf die großen Pulmonalgefäße ($> 100 \mu\text{m}$ äußerer Gefäßdurchmesser) ermitteln. Unter Normoxie lag die Wandstärke bei $16,7 \pm 1,4 \%$ bzw. unter Normoxie und Vitamin-C-Gabe bei $17,4 \pm 1,1 \%$. Unter Hypoxie betrug die signifikante Zunahme $26,4 \pm 1,2 \%$ und unter Hypoxie in Verbindung mit Vitamin-C-Gabe $16,3 \pm 1,1 \%$. Die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) war statistisch signifikant (s. Abb. 3-8).

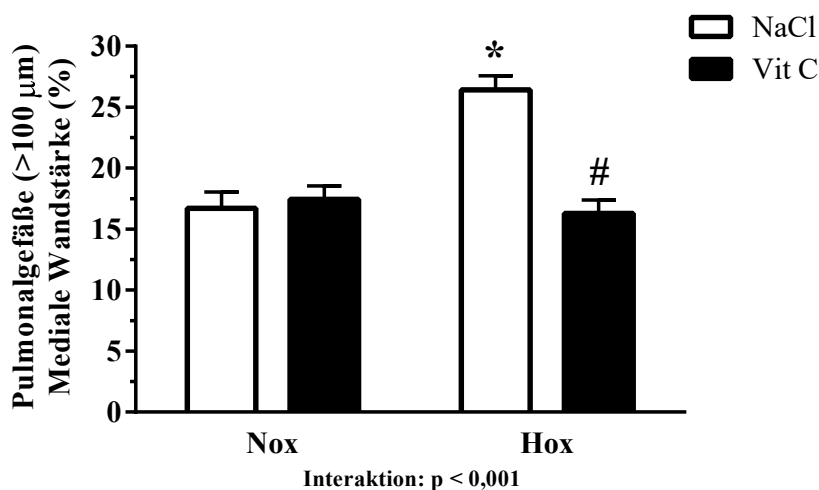


Abb. 3-8 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie $> 100 \mu\text{m}$
 (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils $N = 9$, (Hox + VitC) mit $N = 10$; * $p < 0,05$ (Nox) vs. (Hox); # $p < 0,05$ (Hox) vs. (Hox + VitC), Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

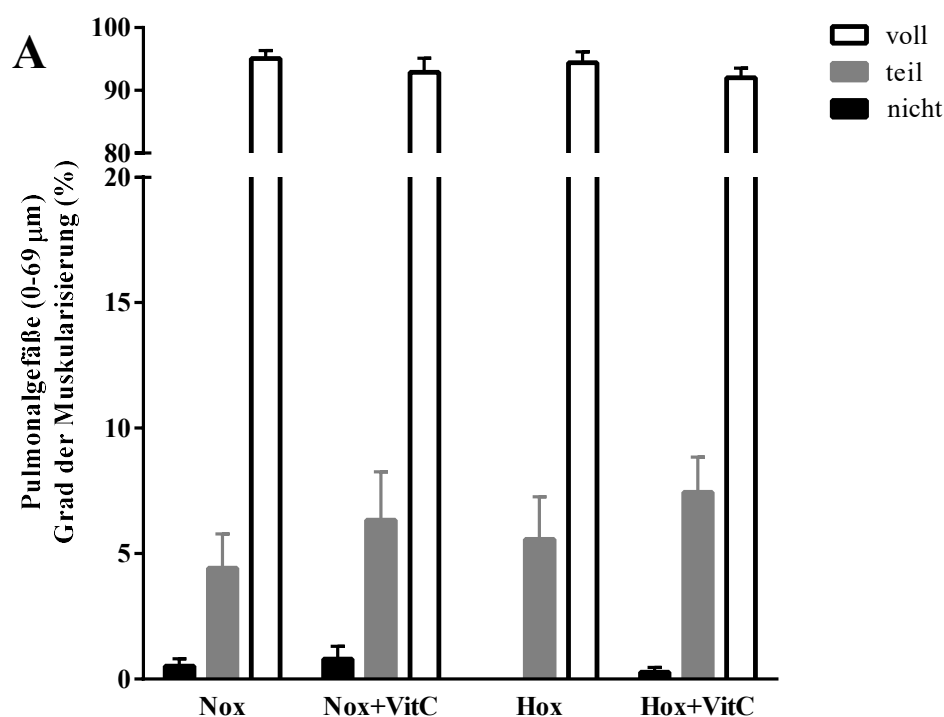
3.2.2 Muskularisierungsgrad

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße beschrieben. Nach der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen glattmuskuläres α -Aktin und vWF wurden die Pulmonalgefäße morphometrisch analysiert sowie in kleine (0–69 μm), mittlere (70–99 μm) und große (> 100 μm) Pulmonalgefäße zusammengefasst (s. Kap. 2.4.2).

Fetale Schafslungen

Nach der Doppelfärbung fiel auf, dass die Feten, die unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen, eine hohe Dichte an voll muskularisierten Pulmonalgefäßen in allen Gefäßkategorien vorwiesen. Lediglich die Dicke der Muskularisierung änderte sich (s. Abb. 3-9).

Die voll Muskularisierung der peripheren Pulmonalgefäße mit einem äußeren Durchmesser von 0–69 μm der Feten, die unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen, betrug $95,0 \pm 1,3$ %. Der Anteil an nicht muskularisierten Gefäßen lag bei $0,5 \pm 0,3$ %, während der Anteil von teil muskularisierten Gefäßen bei $4,4 \pm 1,4$ % lag. Im Vergleich dazu hatten die Feten, die unter hypoxischen Bedingungen aufwuchsen, einen Anteil an voll muskularisierten Gefäßen von $94,4 \pm 1,7$ %. Der Anteil an nicht muskularisierten Gefäßen lag bei 0 % und der von teil muskularisierten bei $5,6 \pm 1,7$ %. Ähnlich verhielt es sich in den Gruppen mit Vitamin-C-Behandlung (s. Abb. 3-9).



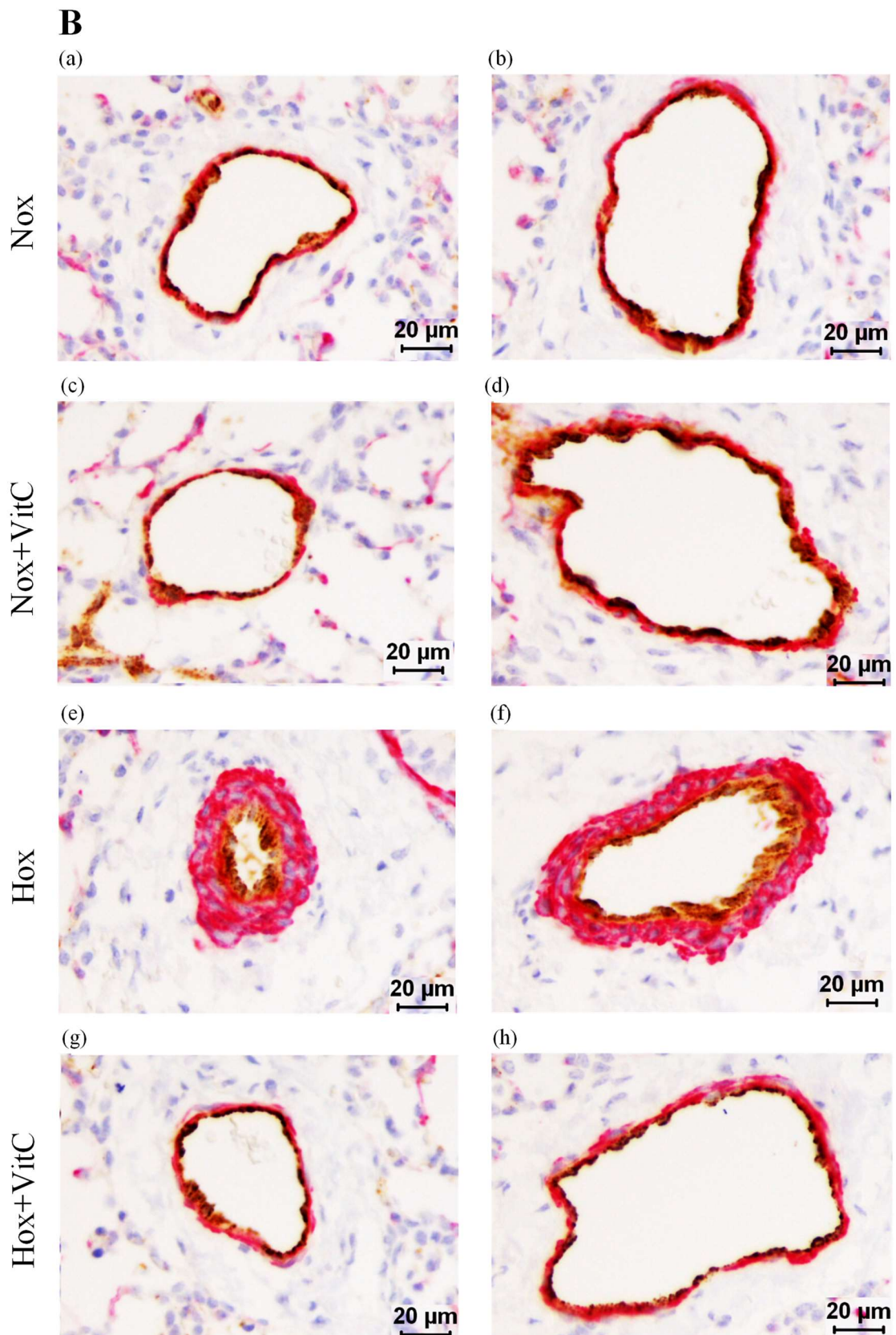


Abb. 3-9 Grafische und histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 0–69 μ m

A; (Nox), (Nox + VitC) mit jeweils $N = 4$; (Hox) mit $N = 5$, (Hox + VitC) mit $N = 8$; **B** Doppelfärbung gegen glattmuskuläres α -Aktin (rot) und vWF (braun) (analysiert bei 400-facher Vergrößerung), (a)+(b) Nox, (c)+(d) Nox + VitC, (e)+(f) Hox, (g)+(h) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Bei den mittleren Pulmonalgefäßen (70–99 µm äußerer Gefäßdurchmesser) traten keine nicht muskularisierten und wenige teil muskularisierte Gefäße auf (s. Abb. 3-10).

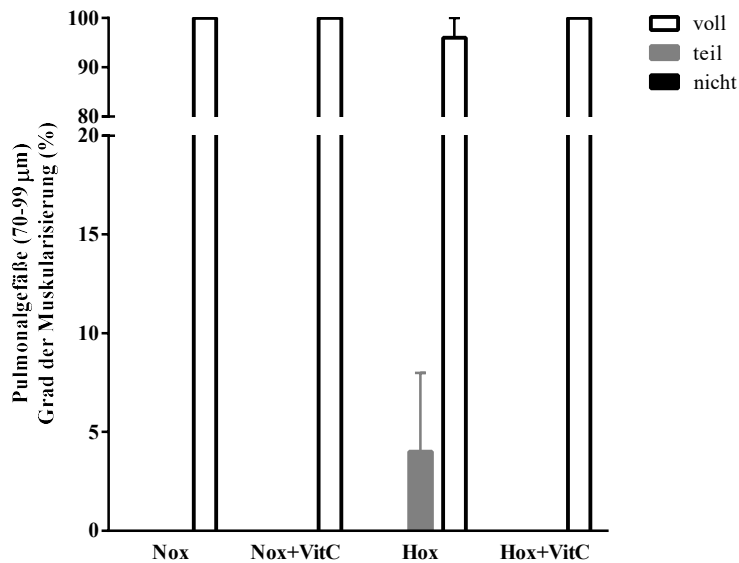


Abb. 3-10 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 70–99 µm

(Nox), (Nox + VitC) mit jeweils N = 4; (Hox) mit N = 5, (Hox + VitC) mit N = 8; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei den großen Pulmonalgefäßen (> 100 µm äußerer Gefäßdurchmesser) (s. Abb. 3-11).

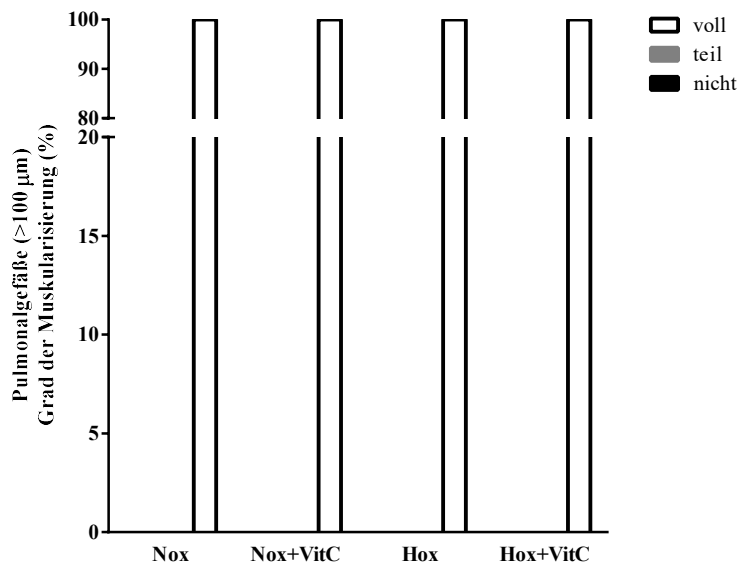
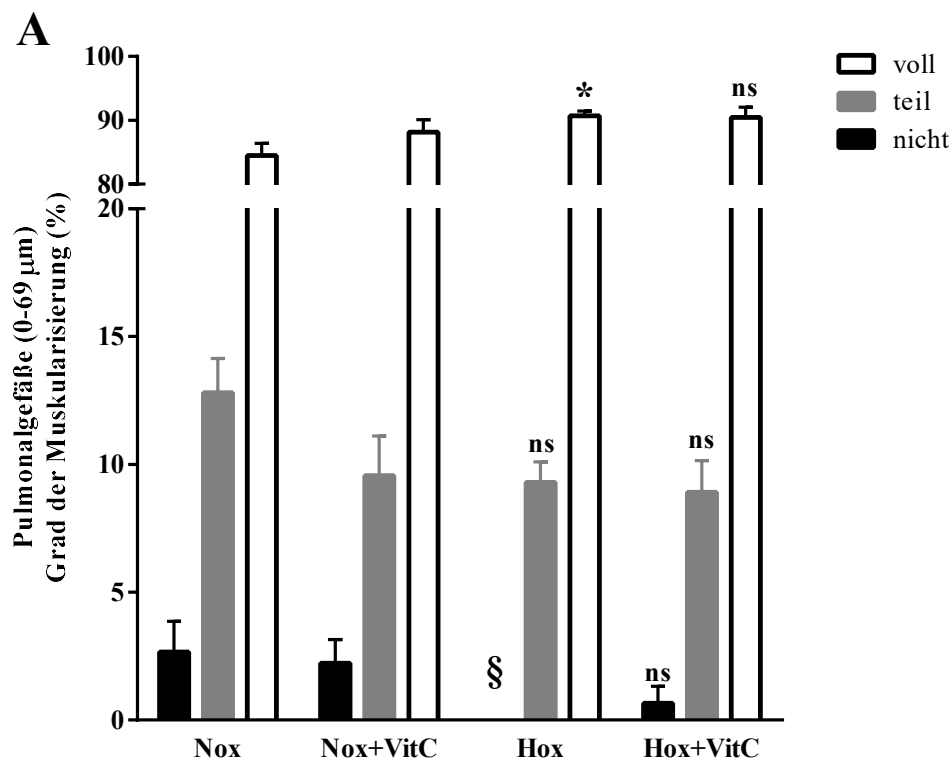


Abb. 3-11 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie > 100 µm

(Nox), (Nox + VitC) mit jeweils N = 4; (Hox) mit N = 5, (Hox + VitC) mit N = 8; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Adulte Schafslungen

Bei den kleinen peripheren Pulmonalgefäßen der adulten Schafslungen aus der Größenkategorie 0–69 µm ließen sich Unterschiede im Muskularisierungsgrad feststellen. Die adulten Schafe, die in der Fetalperiode normoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, wiesen im Vergleich zu den normoxischen Feten nun vor allem mehr teil muskularisierte Gefäße auf mit $12,8 \pm 1,3$ %. Dadurch sank der Anteil an voll muskularisierten Gefäßen auf $84,5 \pm 1,9$ %. Der Anteil an nicht muskularisierten Gefäßen lag bei $2,7 \pm 1,2$ %. Die adulten Schafe, die in der Fetalperiode hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten ähnliche Muskularisierungsgrade wie zur Fetalzeit. So betrug der Anteil an voll muskularisierten Gefäßen $90,7 \pm 0,8$ %, der an teil muskularisierten Gefäßen $9,3 \pm 0,8$ % und der an nicht muskularisierten Gefäßen 0 %. Folglich ergab die statistische Auswertung der Daten eine Signifikanz zwischen voll muskularisierten Gefäßen der normoxischen Gruppe und den voll muskularisierten Gefäßen der hypoxischen Gruppe. Außerdem annähernd signifikant mit $p = 0,0556$ waren die Gruppen der nicht muskularisierten Gefäße zwischen Normoxie und Hypoxie. Die Vitamin-C-Gabe in der Fetalperiode unter hypoxischen Bedingungen zeigte bei den adulten Schafen keine signifikanten Veränderungen und war mit den normoxischen Gruppen vergleichbar (s. Abb. 3-12).



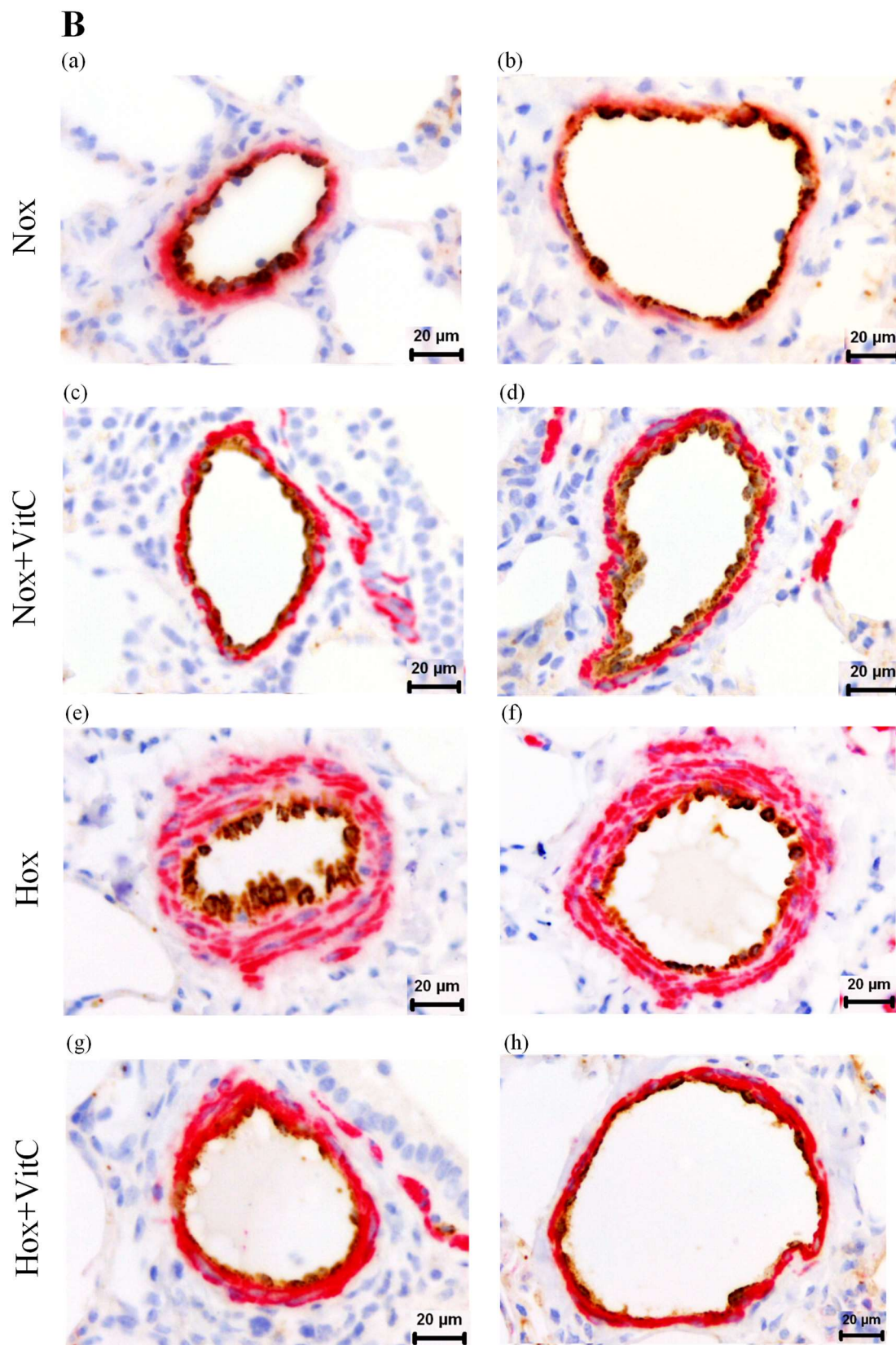


Abb. 3-12 Grafische und histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 0–69 μm

A: (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils $N = 9$; (Hox + VitC) mit $N = 10$; $\S p = 0,0556$ (Nox) nicht muskularisiert vs. (Hox) nicht muskularisiert; $* p < 0,05$ (Nox) voll muskularisiert vs. (Hox) voll muskularisiert; **B** Doppelfärbung gegen glattmuskuläres α -Aktin (rot) und vWF (braun) (analysiert bei 400-facher Vergrößerung), (a)+(b) Nox, (c)+(d) Nox + VitC, (e)+(f) Hox, (g)+(h) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, ns = nicht signifikant.

Keine signifikanten Ergebnisse ergaben sich bei den mittleren Pulmonalgefäßen (70-99 µm äußerer Gefäßdurchmesser) (s. Abb. 3-13).

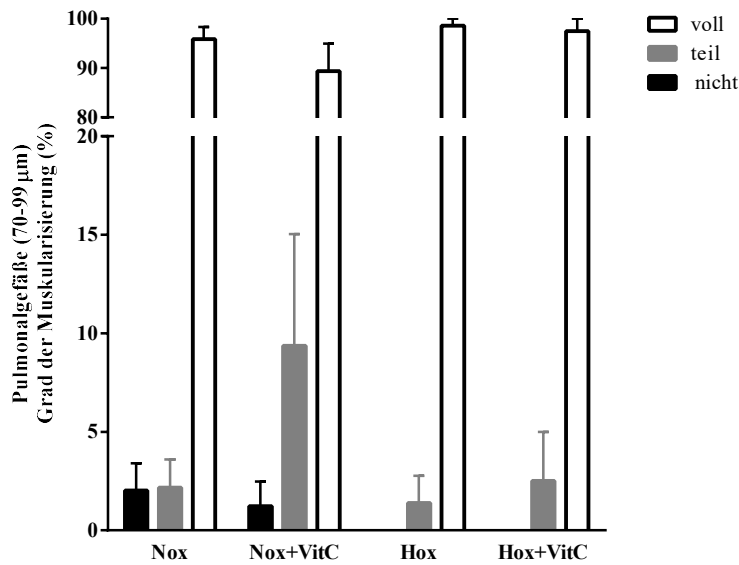


Abb. 3-13 Grafische Darstellung des von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 70–99 µm (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils N = 9; (Hox + VitC) mit N = 10; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Ebenso konnten bei den großen Pulmonalgefäßen (> 100 µm äußerer Gefäßdurchmesser) keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (s. Abb. 3-14).

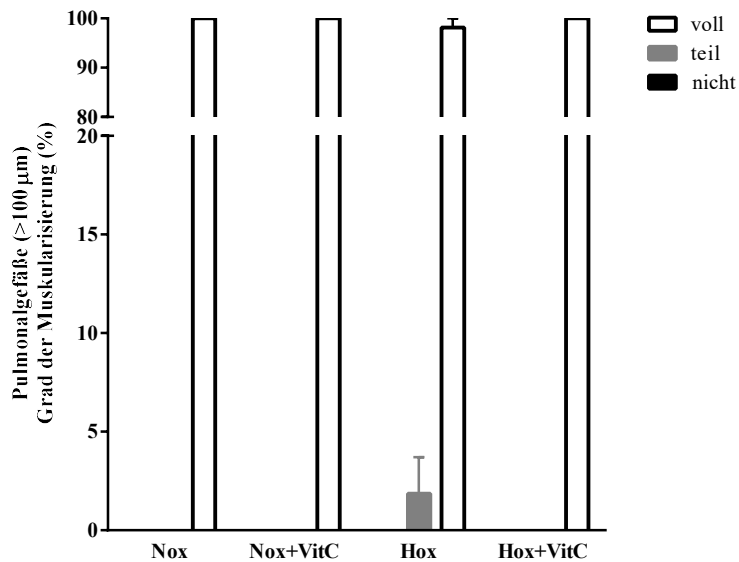


Abb. 3-14 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie > 100 µm (Nox), (Nox + VitC), (Hox) mit jeweils N = 9; (Hox + VitC) mit N = 10; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

3.2.3 Fibrosierung

Lungenerkrankungen, die durch einen fibrotischen Bindegewebsumbau charakterisiert sind, können auch Veränderungen im Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße aufweisen. Um diese fibrotischen Veränderungen auszuschließen, wurde eine Trichromfärbung durchgeführt. Diese Methode erlaubt die spezielle Einfärbung des Kollagens, dem Hauptbestandteil des Bindegewebes, in einer blauen Farbe.

Fetale Schafslungen

Die fetalen Lungen zeigten eine deutliche kollagenhaltige Septen-Zeichnung. Ebenso fanden sich unmittelbar um die Pulmonalgefäße Kollagenfasern. Diejenigen fetalen Schafe, die unter hypoxischen Bedingungen heranwuchsen, zeigten eine vermehrte Kollagenzeichnung um deren Gefäße (s. Abb. 3-15). Im Vergleich dazu wiesen Schafe, die unter hypoxischen Bedingungen aufwuchsen und gleichzeitig Vitamin C bekamen, weniger Kollagenfasern um die Gefäße auf, ähnlich zu denen, die unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen (s. Abb. 3-15). Außer diesen zwei Auffälligkeiten war die Lunge homogen und es ließ sich keine weitere Fibrosierung nachweisen (s. Abb. 3-16)

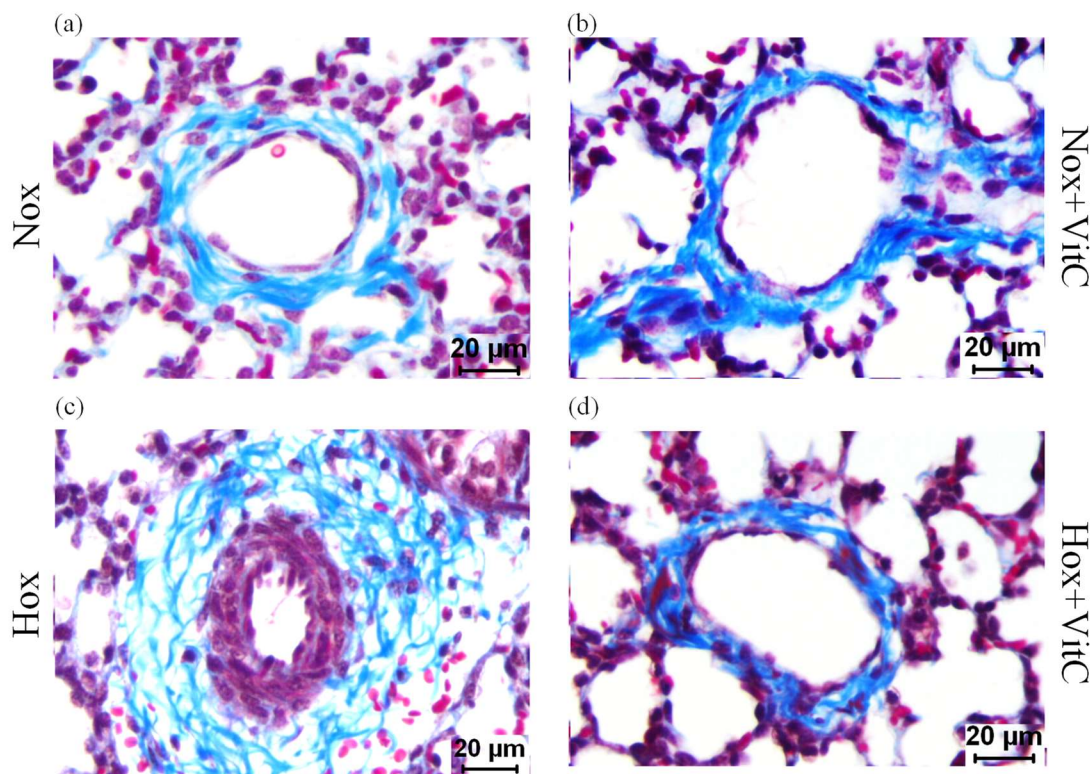
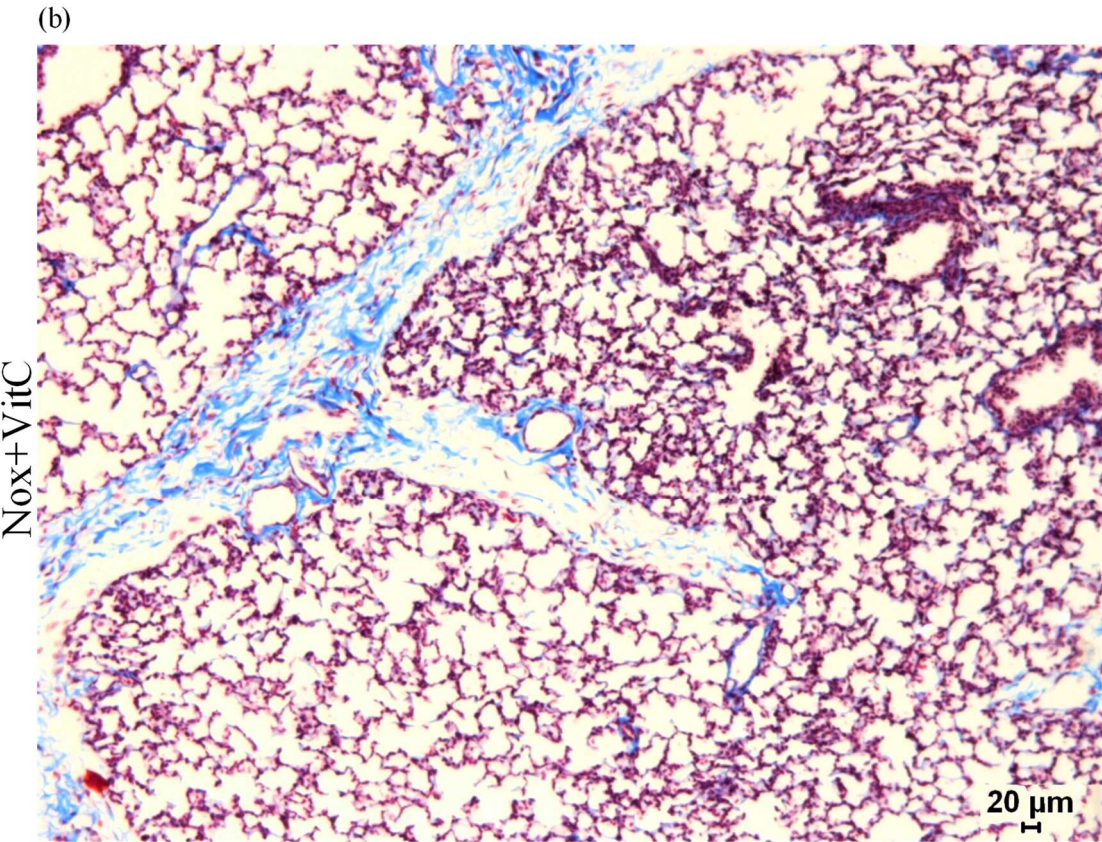
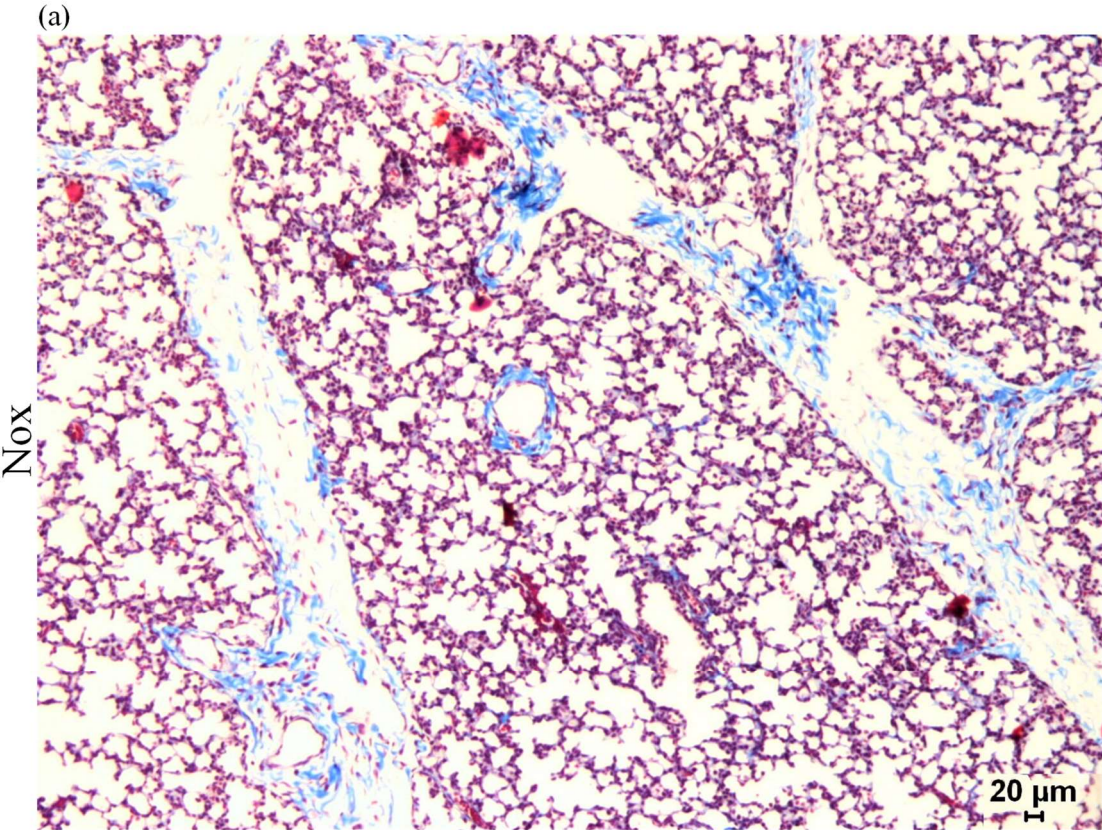


Abb. 3-15 Kollagen um die Gefäße bei den fetalen Schafen nach Trichromfärbung (beurteilt bei 400-facher Vergrößerung, Kollagen = blau); (a) Nox, (b) Nox + VitC, (c) Hox, (d) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.



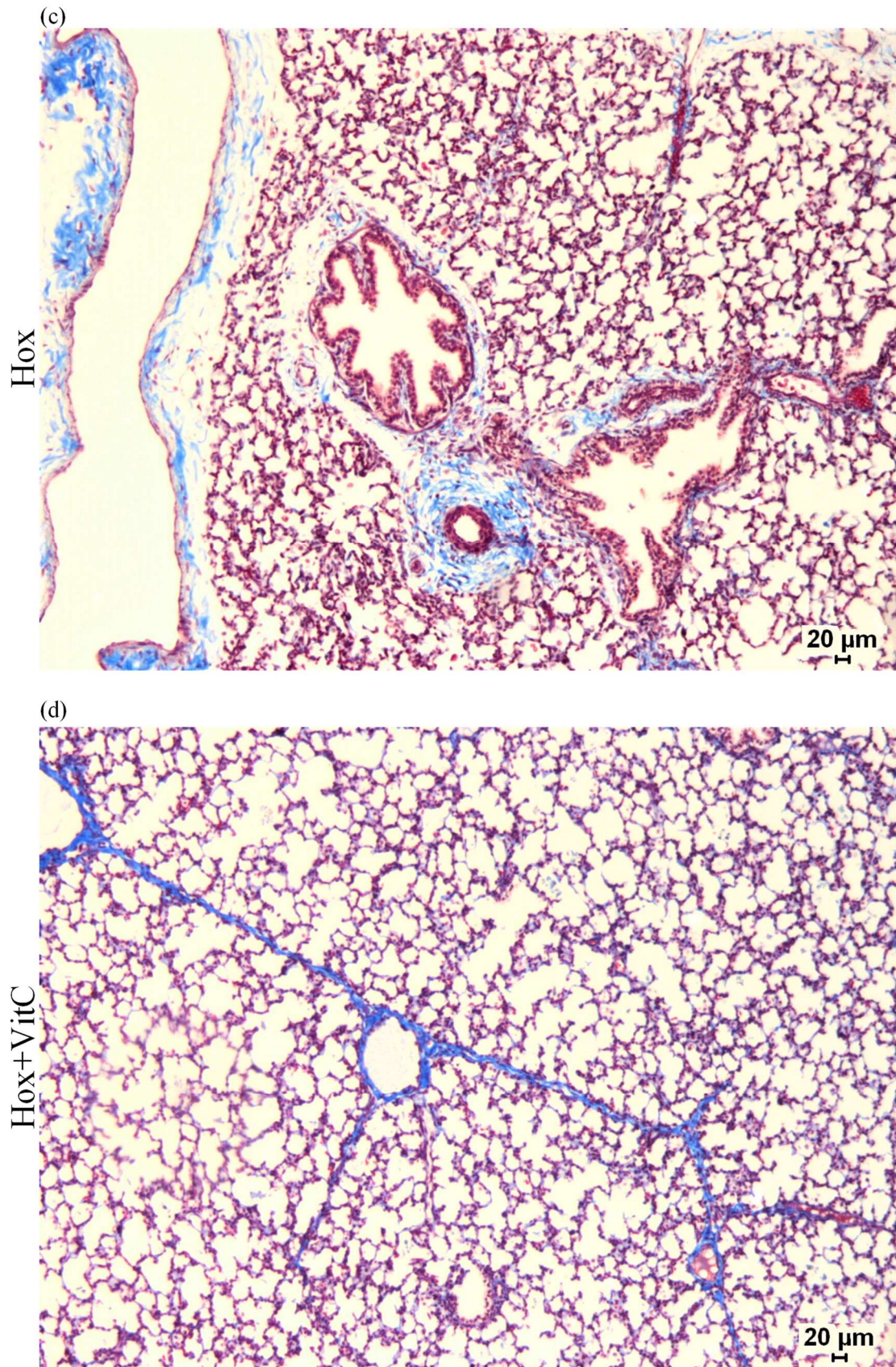


Abb. 3-16 Übersicht über die Kollagenverteilung bei den fetalen Schafslungen
(beurteilt bei 100-facher Vergrößerung, Kollagen = blau); (a) Nox, (b) Nox + VitC, (c) Hox,
(d) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Adulte Schafslungen

Auch bei den adulten Schafslungen zeigten sich um die Pulmonalgefäße eingefärbte Kollagenfasern. Dabei persistierte die verdickte Kollagenschicht um die Gefäße bei den adulten Schafen mit fetaler Hypoxie-Exposition (s. Abb. 3-17). Die anderen Gruppen der adulten Schafslungen (die entsprechenden Tiere erhielten Vitamin C zusätzlich zu der fetalen Hypoxie-Exposition bzw. wuchsen unter fetaler Normoxie auf) zeigten einen schmalen Kollagenfaserrand um die Gefäße (s. Abb. 3-17). In den adulten Schafslungen waren keine kollagenhaltigen Septen nachweisbar. Ansonsten war auch hier die Lungen homogen strukturiert, sodass sich keine Fibrosierung nachweisen ließ (s. Abb. 3-18).

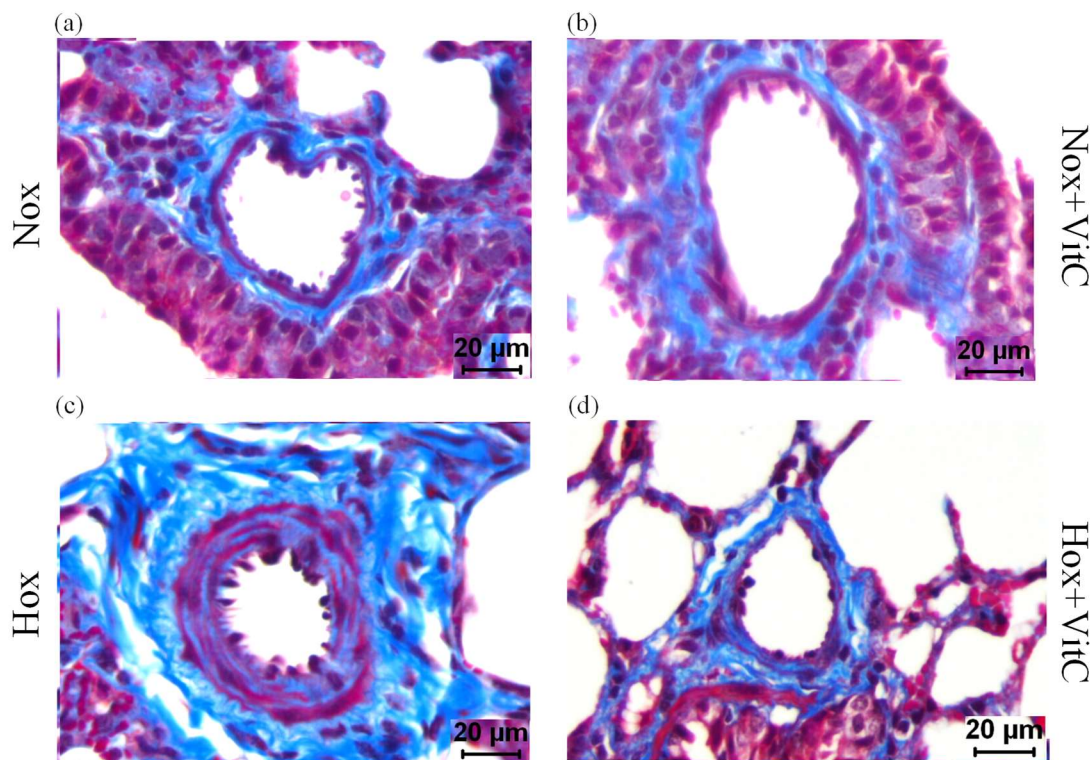
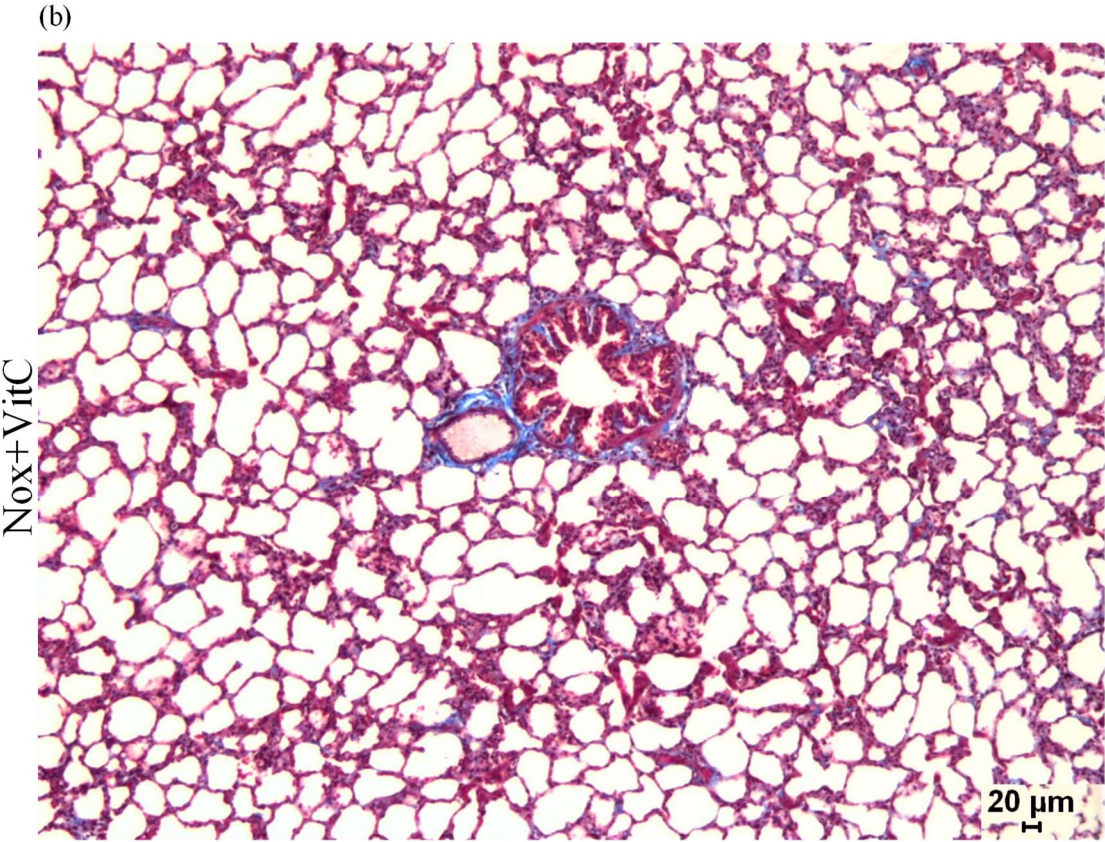
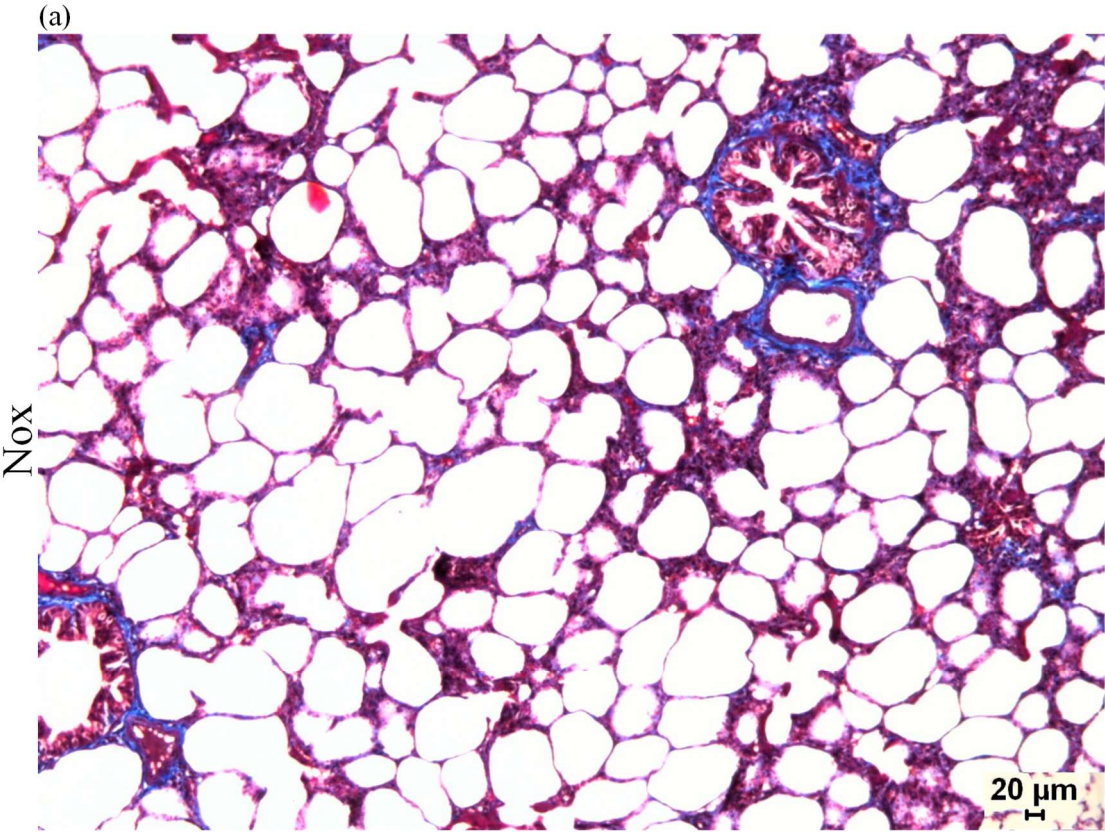
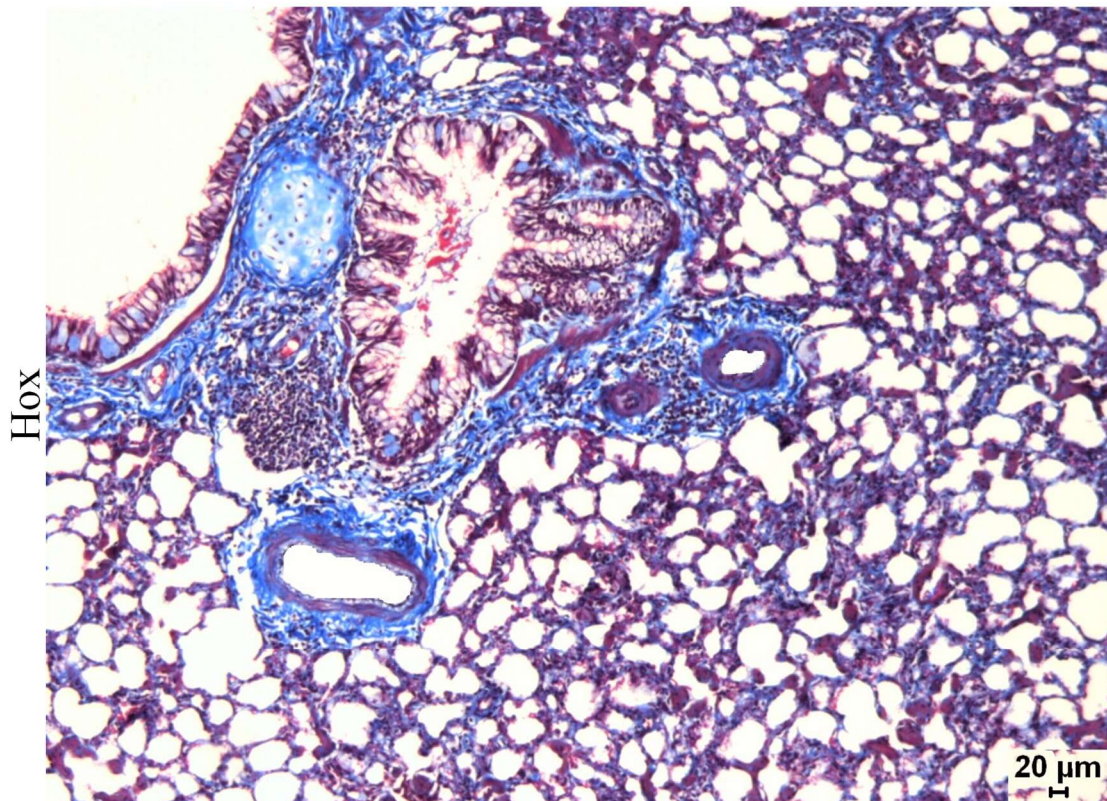


Abb. 3-17 Kollagen um die Gefäße bei den adulten Schafen nach Trichromfärbung
 (beurteilt bei 400-facher Vergrößerung, Kollagen = blau); (a) Nox, (b) Nox + VitC, (c) Hox, (d) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.



(c)



(d)

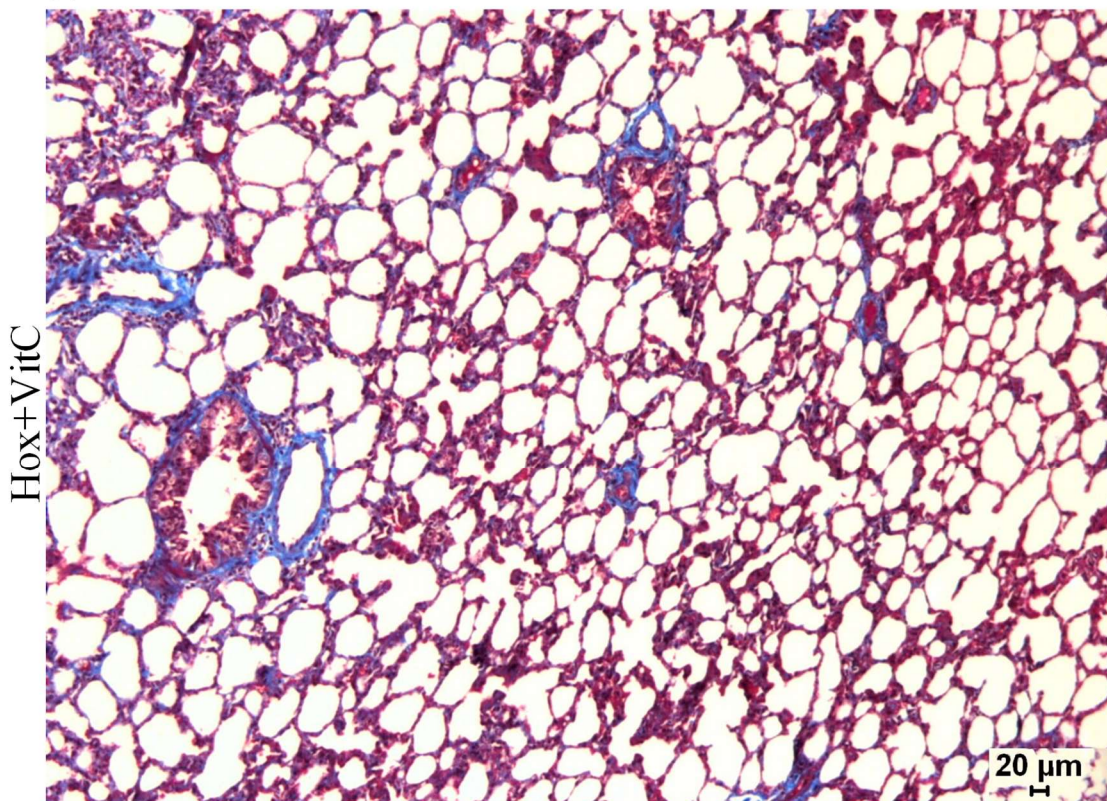


Abb. 3-18 Übersicht über die Kollagenverteilung bei den fetalen Schafslungen

(beurteilt bei 100-facher Vergrößerung, Kollagen = blau); (a) Nox, (b) Nox + VitC, (c) Hox, (d) Hox + VitC; Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

Bemerkung: optisch scheint es sich bei dem Bild unter a) um eine andere Vergrößerung zu handeln. Eine Überprüfung hat die hier angegebene Vergrößerung bestätigt. Mögliche optische Unterschiede könnten auf die Fixierung zurückzuführen sein.

3.3 Molekularbiologische Ergebnisse

Um die molekularen Mechanismen der PPHN in Schafen zu untersuchen, wurde die Genexpression von Schlüsselgenen der PH untersucht. Insgesamt wurden 8 Gene für die Etablierung des Referenzgens und 33 Zielgene in den fetalen sowie adulten Schafen gescreent.

3.3.1 Etablierung des Referenzgens

Für die qPCR-Untersuchungen wurde im ersten Schritt nach einem Referenzgen gesucht, da die qPCR mit Schafproben in der Arbeitsgruppe, in der diese Doktorarbeit durchgeführt wurde, nicht etabliert war. Hierzu wurden folgende Gene, die in anderen Spezies als Referenzgen bei der qPCR verwendet wurden, analysiert:

Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), β 2-Mikroglobulin (B2M), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Tubulin Beta-2A (TUBB2A), Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase-aktivierendes Protein Zeta (YWHAZ), Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), ribosomales Protein S18 (RPS18), Cyclophilin C (CycC)

Dabei waren die Referenzgene RPS18 und CycC am vielversprechendsten und wiesen die geringste interindividuelle Streuung auf. Um diese Streuung darüber hinaus so gering wie möglich zu halten, wurde, wie bereits beschrieben^{13,189}, ein Mittelwert aus den beiden Referenzgenen gebildet (s. Abb. 3-19). Dieser Wert diente dann als Referenzwert, gegen die die mRNA-Expression der untersuchten Gene normalisiert wurde.

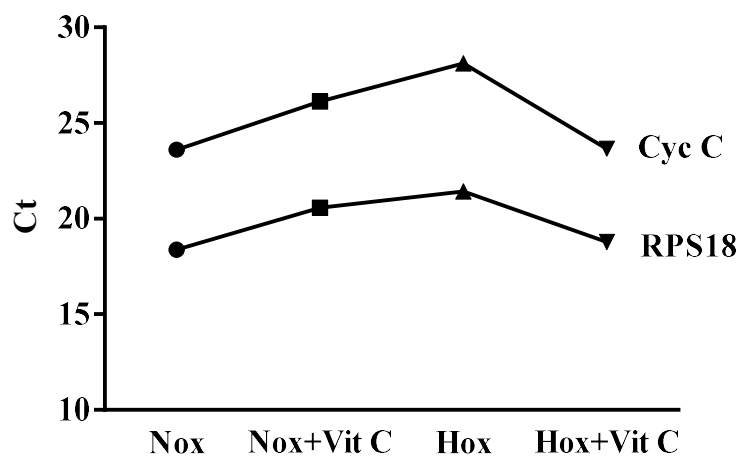


Abb. 3-19 Grafische Darstellung der mittleren mRNA-Expression der Referenzgene RPS18 und CycC
 CycC = Cyclophilin C, RPS18 = ribosomales Protein S18, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C.

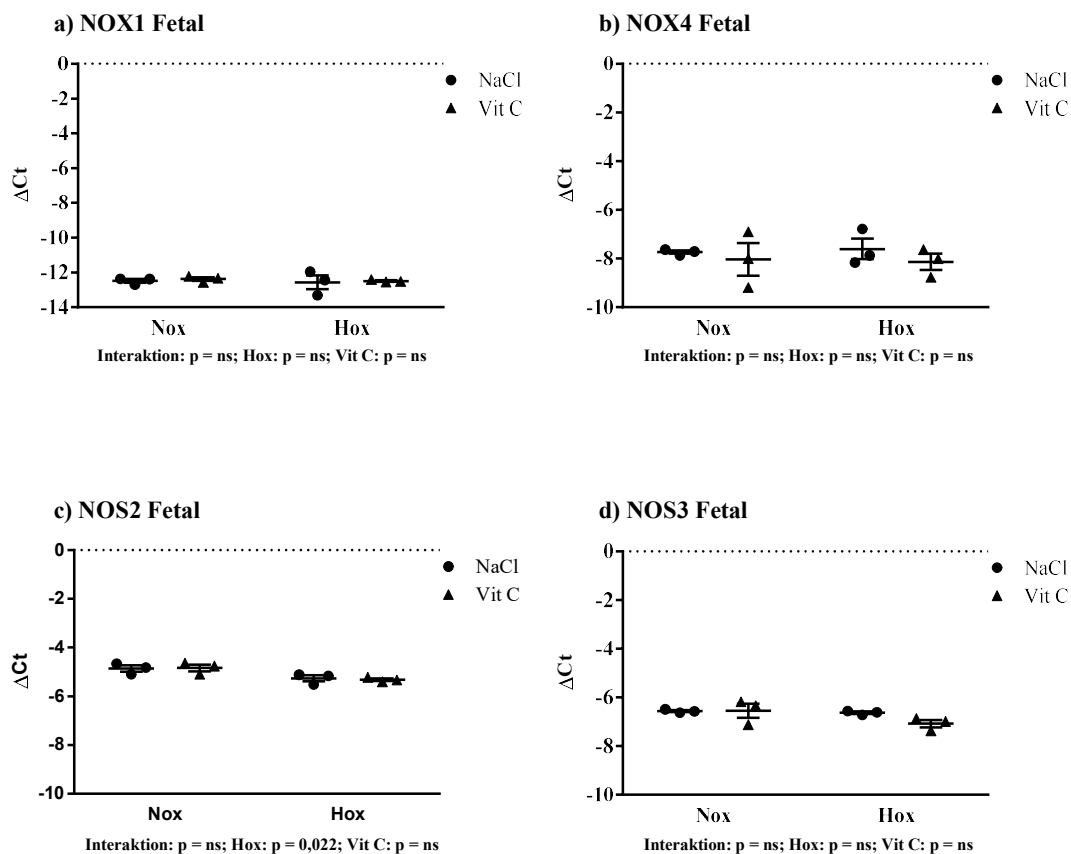
3.3.2 Genexpression im Lungenhomogenat

3.3.2.1 Produktion von ROS

Nachfolgend wurden folgende Gene zusammengefasst, die bei der Produktion von ROS beteiligt sind: die NADPH-Oxidasen (NOX), die NO-Synthasen (NOS), das *uncoupling protein 2* (UCP2) und die Xanthin Dehydrogenasen (XDH).

Fetale Schafslungen

Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von NOX1, NOX4, NOS3, bzw. XDH im Lungenhomogenat isoliert aus fetalen Schafen waren statistisch nicht signifikant. Es konnte hier weder ein Hypoxie- noch ein Vitamin C-Effekt beobachtet werden. Die NOS2 und UCP2 mRNA-Expression hingegen wurde durch Hypoxie-, nicht aber durch Vitamin C beeinflusst (s. Abb. 3-20).



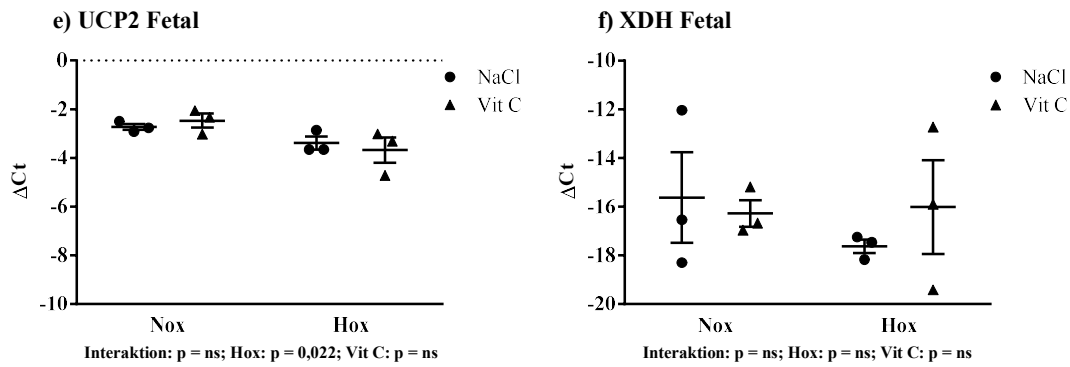


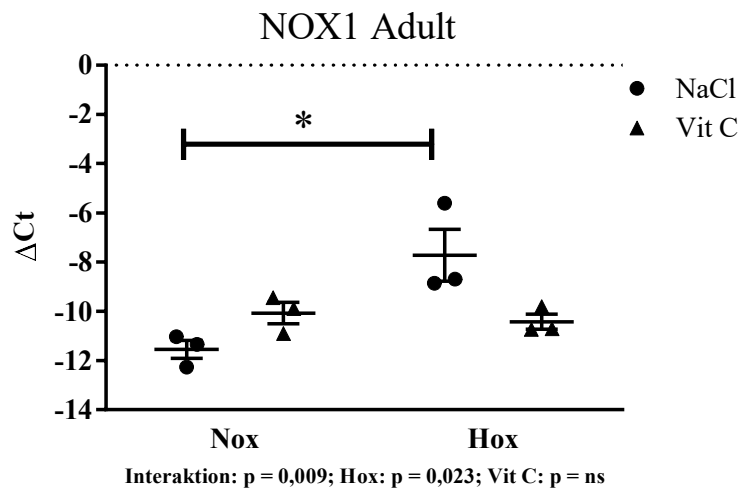
Abb. 3-20 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-produzierenden Proteinen in den fetalen Schafslungen

a) NOX1 = NADPH-Oxidase 1, b) NOX4 = NADPH-Oxidase 4, c) NOS2 = NO-Synthase 2, d) NOS3 = NO-Synthase 3, e) UCP2 = uncoupling protein 2, f) XDH = Xanthin Dehydrogenase; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Adulte Schafslungen

Die adulten Schafslungen zeigten infolge der fetalen Aufzuchtbedingungen signifikante Unterschiede bezogen auf die mRNA-Expression von NOX1 und NOS3.

Die mRNA-Expression von NOX1 wurde in der NaCl-Gruppe durch Hypoxie signifikant induziert. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant, mit einem weniger starken Effekt in der Vitamin C-Gruppe (s. Abb. 3-21).

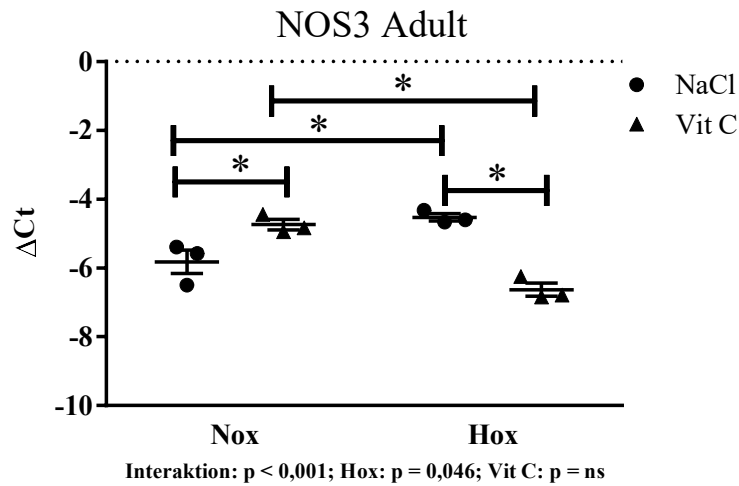


ruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
Δ Ct	-11,6	-10,1	-7,7	-10,4

Abb. 3-21 mRNA-Expression von NOX1 in adulten Schafslungen

NOX1 = NADPH-Oxidase 1, * p < 0,05, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Wie NOX1 wurde auch die mRNA-Expression von NOS3 (auch eNOS genannt) in der NaCl-Gruppe durch die Hypoxie-Exposition signifikant induziert. In der Vitamin C-Gruppe wurde die Expression durch die Hypoxie-Exposition inhibiert. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant, mit einem weniger starken Effekt in der Vitamin C-Gruppe (s. Abb. 3-22).



Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
Δ Ct	-5,8	-4,7	-4,5	-6,6

Abb. 3-22 mRNA-Expression von NOS3 in adulten Schafslungen

NOS3 = NO-Synthase 3, *p < 0,05, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von NOS2, UCP2 bzw. XDH im Lungenhomogenat isoliert aus adulten Schafen waren statistisch nicht signifikant. Es konnte hier weder ein Hypoxie- noch ein Vitamin C-Effekt beobachtet werden. NOX4 wies eine signifikante Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) auf (s. Abb. 3-23).

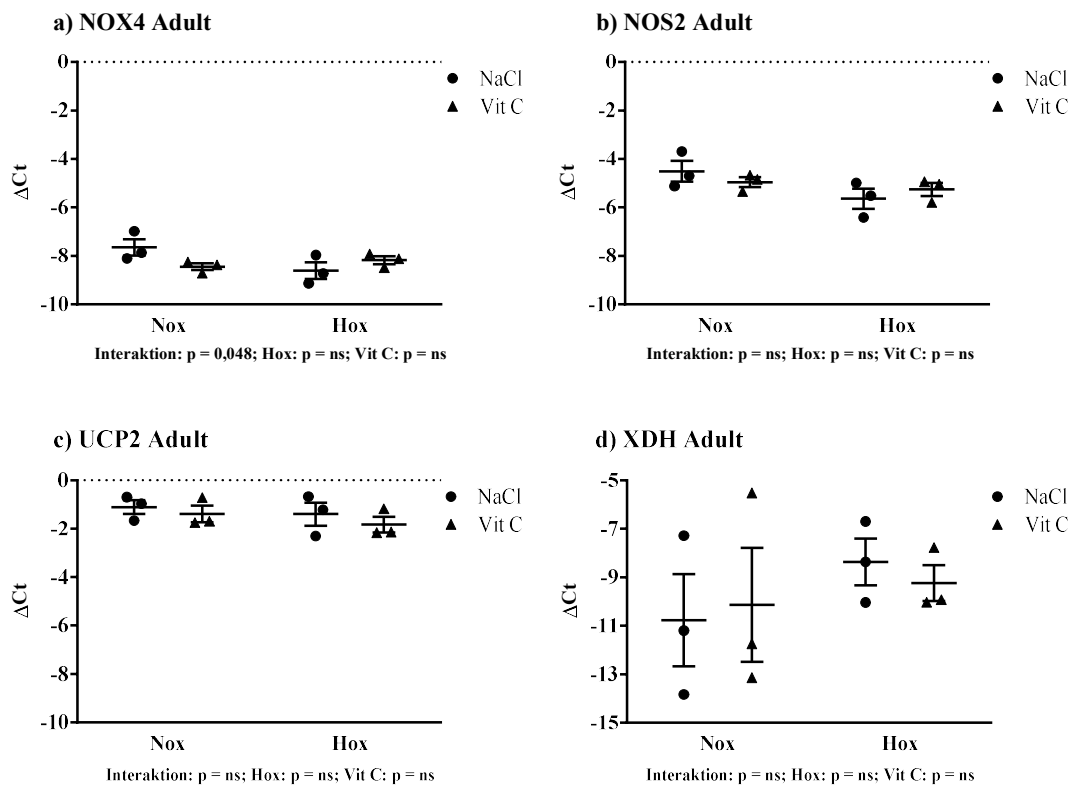


Abb. 3-23 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-produzierenden Proteinen in den adulten Schafslungen

a) NOX4 = NADPH-Oxidase 2, b) NOS2 = NO-Synthase 2, c) UCP2 = uncoupling protein 2, d) XDH = Xanthin Dehydrogenase; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

3.3.2.2 Abbau von ROS

Nachfolgend wurden Gene zusammengefasst, die am Abbau von ROS beteiligt sind. Dabei wurden die Gene Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPX1) und Katalase (CAT) untersucht.

Fetale Schafslungen

Zunächst wurden hier Gene untersucht, die eine Rolle beim Abbau von ROS spielen können. Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von SOD1, SOD2, der SOD3 Transkriptionsvariante 1 (SOD3.1), GPX1 bzw. CAT im Lungenhomogenat isoliert aus fetalen Schafen waren statistisch nicht signifikant. Es konnte hier weder ein Hypoxie- noch ein Vitamin C-Effekt beobachtet werden. Die mRNA-Expression der SOD3 Transkriptionsvariante 2 (SOD3.2) wurde durch Hypoxie beeinflusst. Eine Interaktion zwischen Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) bestand nicht (s. Abb. 3-24).

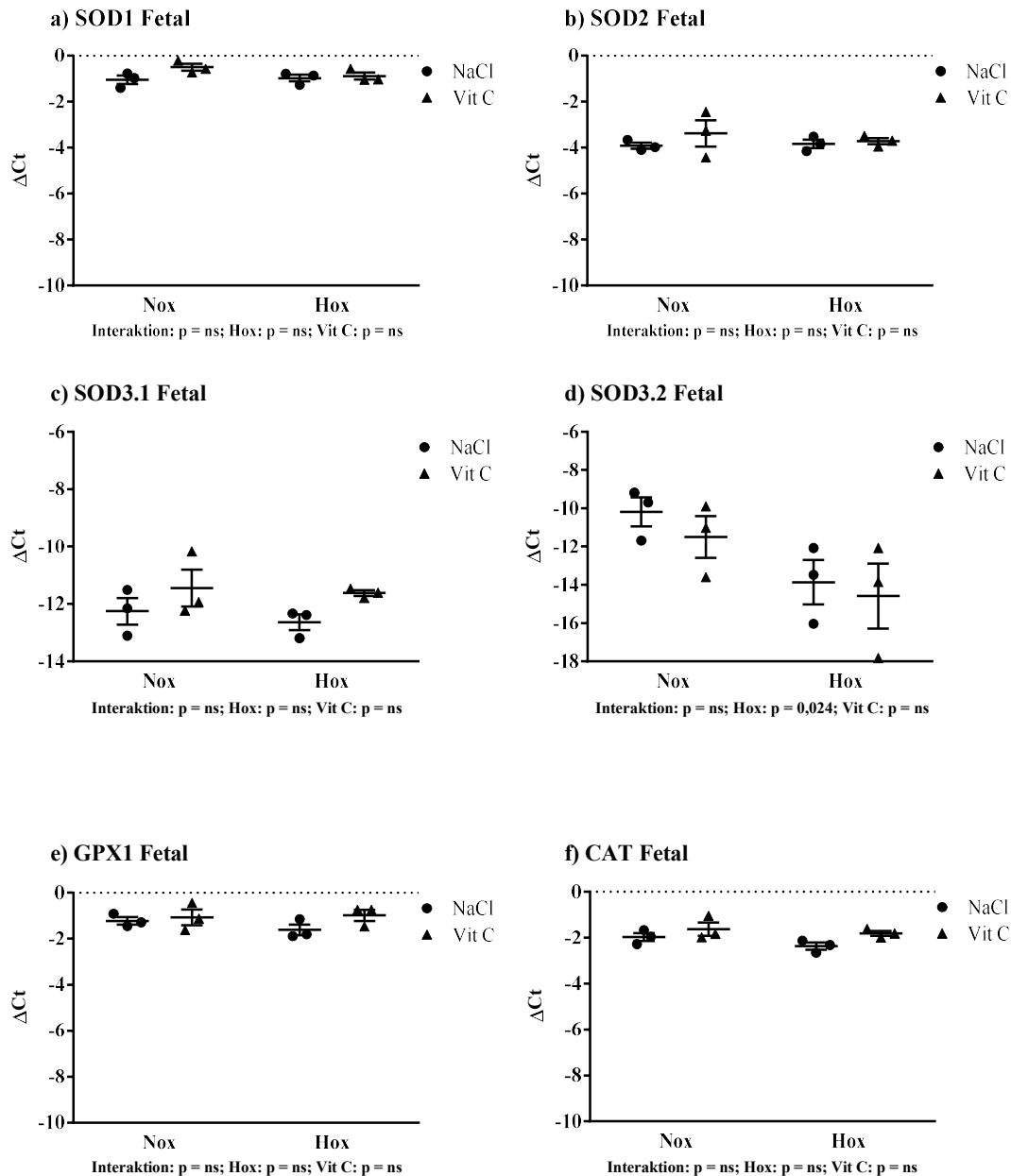
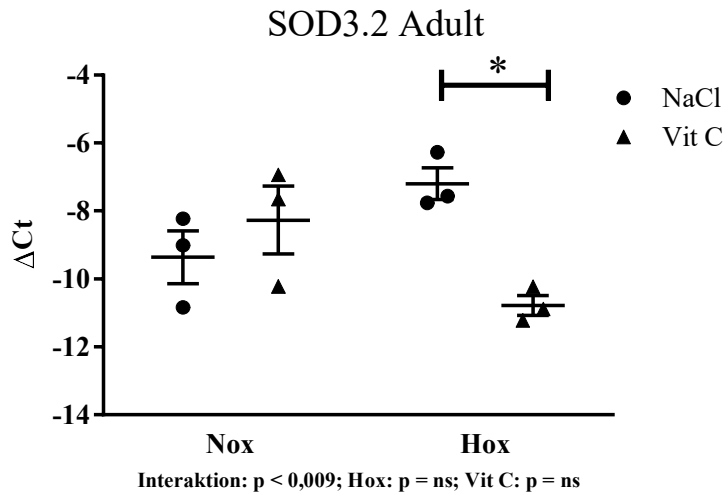


Abb. 3-24 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-abbauenden Proteinen in den fetalen Schafslungen

a) SOD1 = Superoxiddismutase 1, b) SOD2 = Superoxiddismutase 2, c) SOD3.1 = Superoxiddismutase 3 Transkriptionsvariante 1, d) SOD3.2 = Superoxiddismutase 3 Transkriptionsvariante 2, e) GPX1 = Glutathionperoxidase 1, f) CAT = Katalase; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Adulte Schafslungen

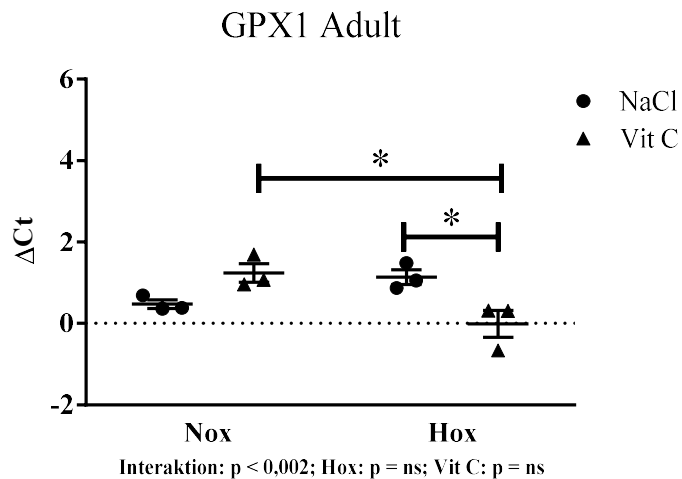
Die mRNA-Expression von SOD3.2 und GPX1 wurde durch die fetalen Aufzuchtbedingungen in den adulten Schafslungen signifikant beeinflusst. Die mRNA-Expression von SOD3.2 wurde durch die Vitamin C-Gabe unter Hypoxie signifikant inhibiert. Darüber hinaus war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-25).



Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-9,4	-8,3	-7,2	-10,8

Abb. 3-25 mRNA-Expression von SOD3, Transkriptionsvariante 2, in adulten Schafslungen
 SOD = Superoxiddismutase, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

Die mRNA-Expression von GPX1 wurde in der Hypoxie-Gruppe durch die Vitamin C-Behandlung signifikant inhibiert. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-26).



Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	0,5	1,2	1,1	-0,01

Abb. 3-26 mRNA-Expression von GPX1 in adulten Schafslungen
 GPX1 = Glutathionperoxidase 1, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von SOD2 und CAT im Lungenhomogenat isoliert aus adulten Schafen waren statistisch nicht signifikant. Es konnte hier weder ein Hypoxie- noch ein Vitamin C-Effekt beobachtet werden. Die SOD1 und die SOD3.1 mRNA-Expression zeigte eine signifikante Interaktion (s. Abb. 3-27).

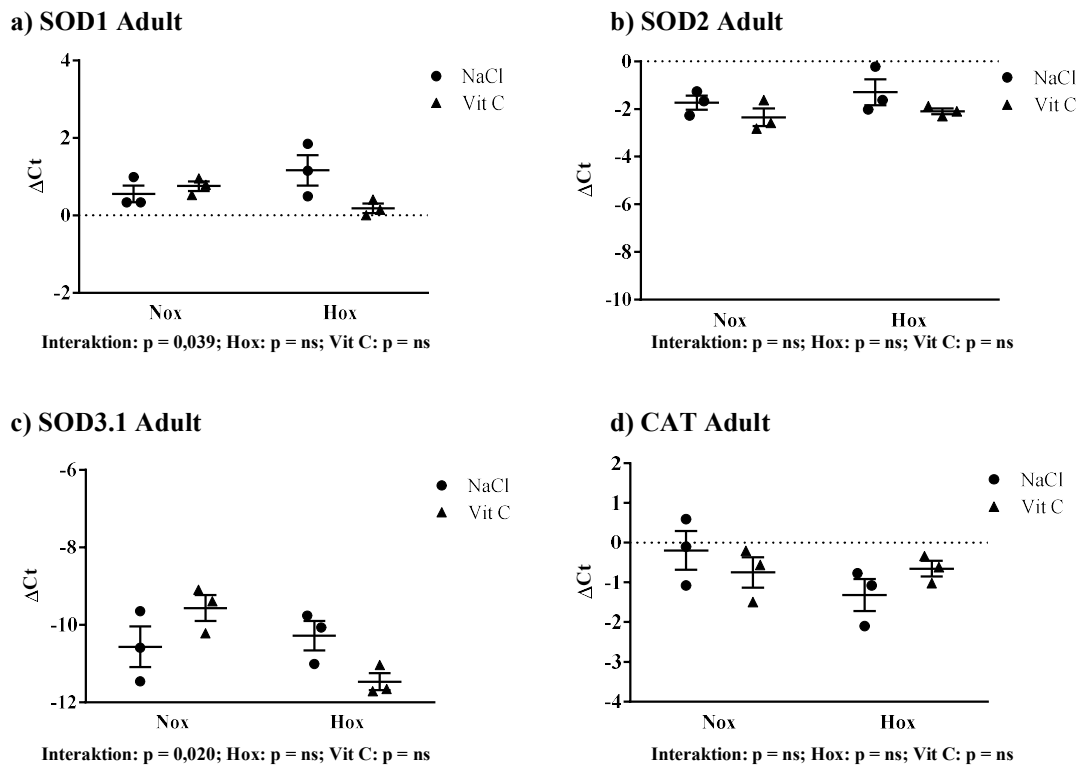


Abb. 3-27 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-abbauenden Proteinen in den adulten Schafslungen

a) SOD1 = Superoxiddismutase 1, b) SOD2 = Superoxiddismutase 2, c) SOD3.1 = Superoxiddismutase 3 Transkriptionsvariante 1, d) CAT = Katalase; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

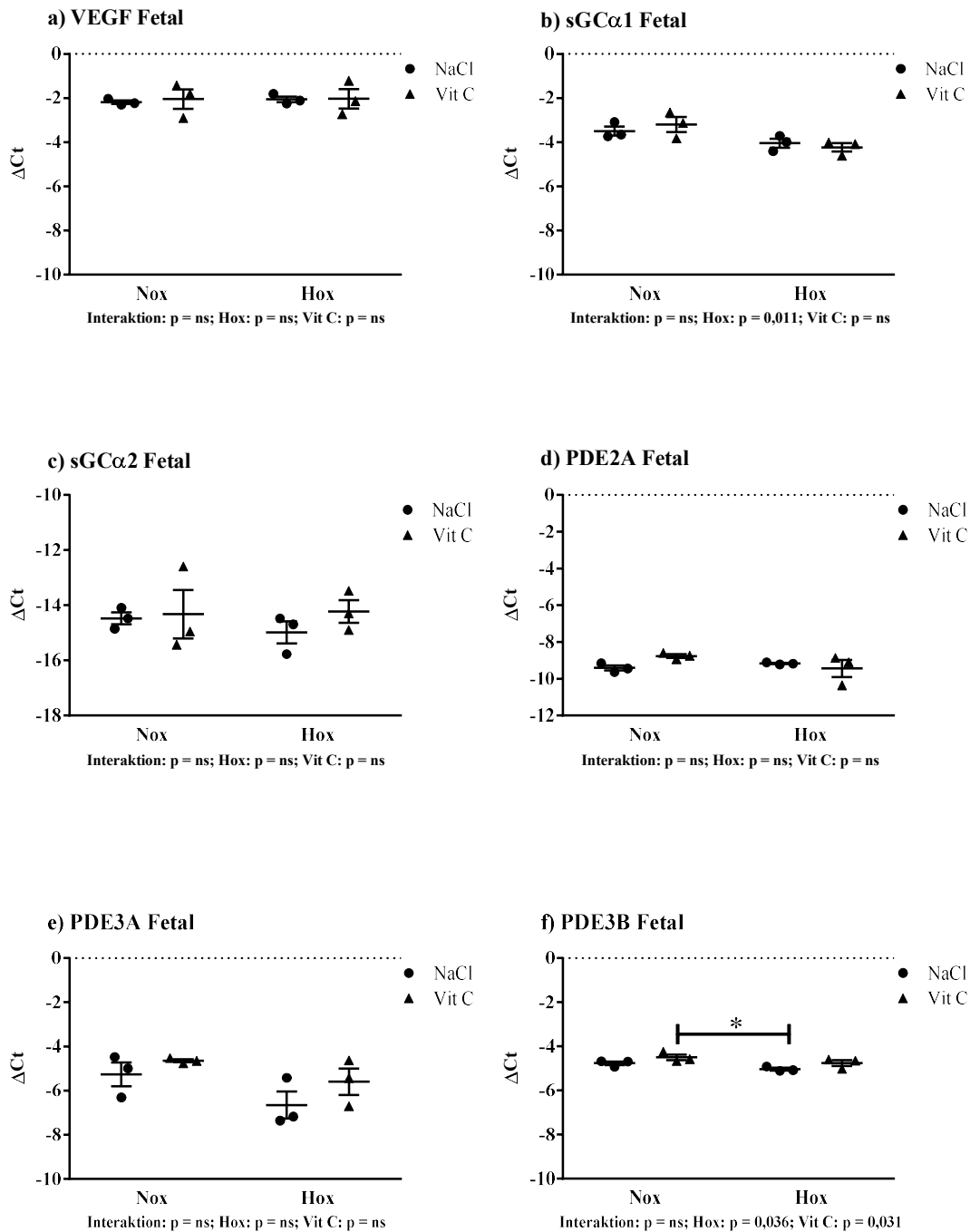
3.3.2.3 NO-Signalweg

Nachfolgend wurden folgende Gene zusammengefasst, die am NO-Signalweg beteiligt sind: die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF), die NO-Synthasen (NOS), die löslichen Guanylylcyclasen (sGC) mit den zwei verschiedenen Isoformen (sGC α 1, sGC α 2) und die Phosphodiesterasen (PDE).

Fetale Schafslungen

Die mRNA-Expression der NO-Synthase in den fetalen Schafslungen wurde bereits in Kap. 3.3.2.1 auf S. 64 vorgestellt. Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von VEGF, sGC α 2, PDE2A, PDE3A, PDE4D bzw. PDE5A im Lungenhomogenat isoliert aus fetalen Schafen waren statistisch nicht signifikant. Die sGC α 1 und PDE10A mRNA-

Expression zeigte keine Interaktion, aber einen signifikanten Hypoxie- und einer wenigen starken Vitamin C-Effekt. Die PDE3B mRNA-Expression zeigte ebenso keine Interaktion, aber einen vergleichbar starken Effekt der Exposition und Behandlung. Die PDE4A mRNA-Expression zeigte keine Interaktion, allerdings einen Vitamin C-Effekt und einen weniger starken Hypoxie-Effekt (s. Abb. 3-28).



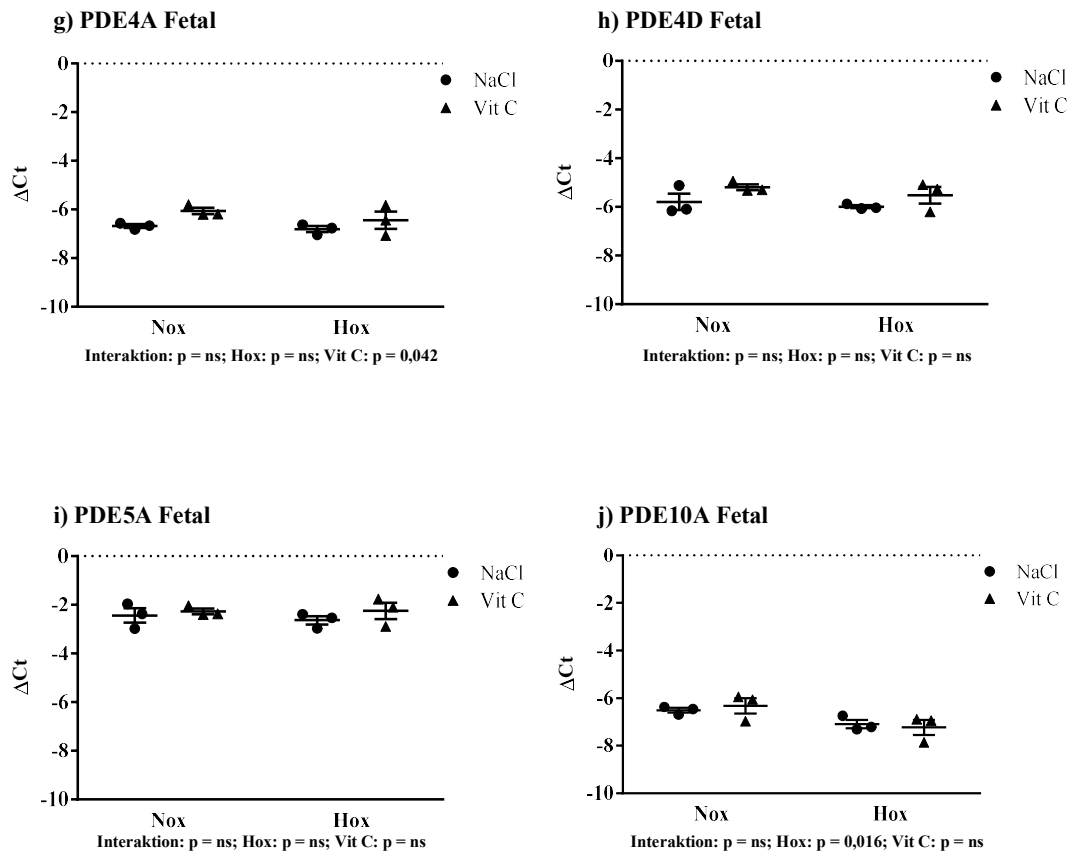
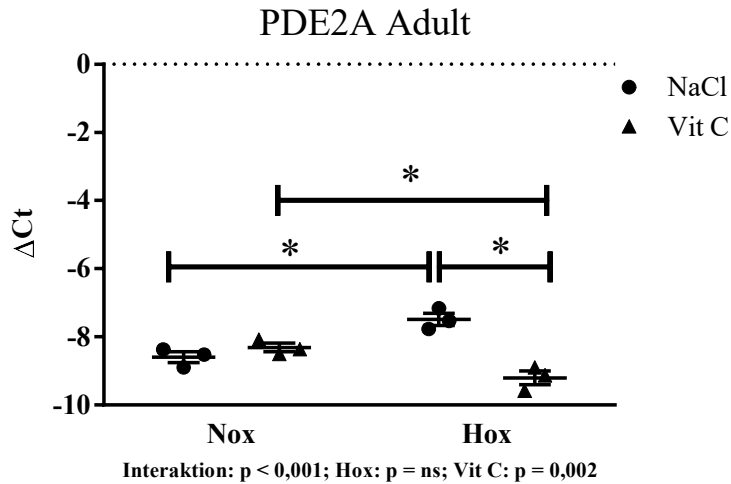


Abb. 3-28 Übersicht der mRNA-Expression von am NO-Signalweg beteiligten Genen in den fetalen Schafslungen

a) VEGF = vascular endothelial growth factor, b) sGCα1 = Soluble Guanylyl-Cyclase, Isoform 1, c) sGCα1 = Soluble Guanylyl-Cyclase, Isoform 2, d) PDE2A = Phosphodiesterase 2A, e) PDE3A = Phosphodiesterase 3A, f) PDE3B = Phosphodiesterase 3B, g) PDE4A = Phosphodiesterase 4A, h) PDE4D = Phosphodiesterase 4D, i) PDE5A = Phosphodiesterase 5A, j) PDE10A = Phosphodiesterase 10A; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Adulte Schafslungen

Die mRNA-Expression von PDE2A und PDE4A wurde durch die fetalen Aufzuchtbedingungen in den adulten Schafslungen signifikant beeinflusst. Die mRNA-Expression von PDE2A wurde in der NaCl-Gruppe durch Hypoxie signifikant induziert und durch die gleichzeitige Vitamin C-Gabe unter Hypoxie inhibiert. In der Vitamin C-Gruppe wurde die Expression durch die Hypoxie-Exposition inhibiert. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant, mit einem weniger starken Effekt in der Hypoxie-Gruppe (s. Abb. 3-29).

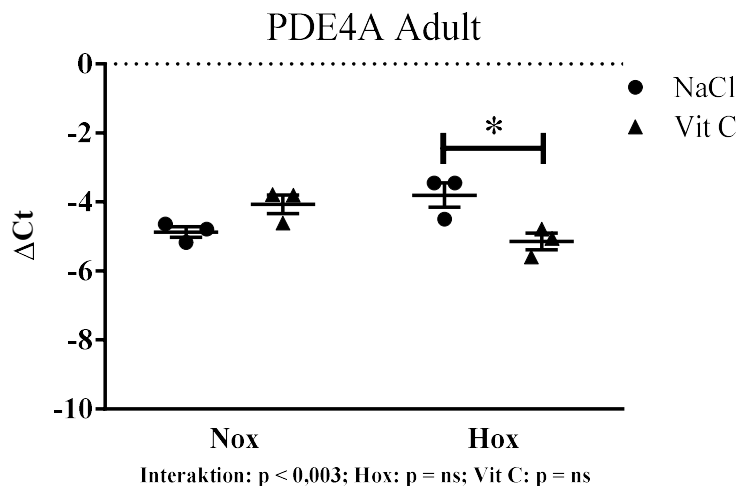


Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-8,6	-8,3	-7,5	-9,2

Abb. 3-29 mRNA-Expression von PDE2A in adulten Schafslungen

PDE2A = Phosphodiesterase 2A, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Die mRNA-Expression von PDE4A wurde durch die Vitamin-C-Gabe unter Hypoxie signifikant inhibiert. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-30).



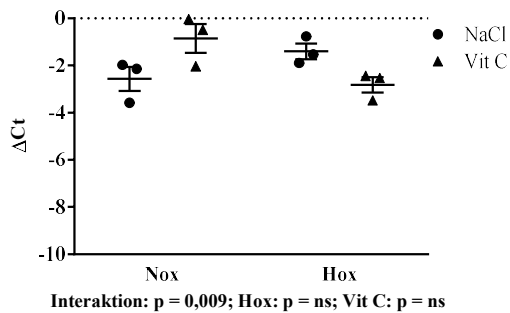
Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-4,9	-4,0	-3,8	-5,2

Abb. 3-30 mRNA-Expression von PDE4A in adulten Schafslungen

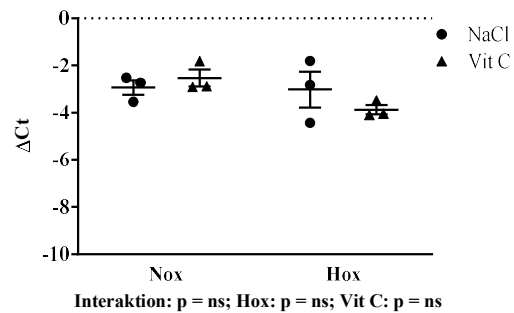
PDE4A = Phosphodiesterase 4A, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von sGC α 1, PDE3B, PDE4D, PDE5A bzw. PDE10A im Lungenhomogenat isoliert aus adulten Schafen waren statistisch nicht signifikant. Die VEGF, sGC α 2 bzw. PDE3A mRNA-Expression zeigte eine signifikante Interaktion (s. Abb. 3-31). Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression der NO-Synthese in den adulten Schafslungen bereits in Kap. 3.3.2.1, S. 65 vorgestellt.

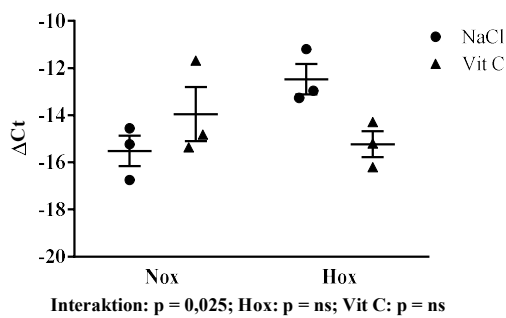
a) VEGF Adult



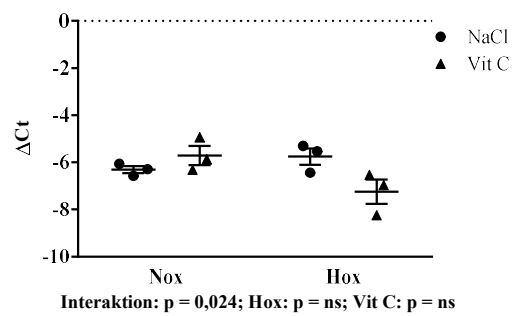
b) sGC α 1 Adult



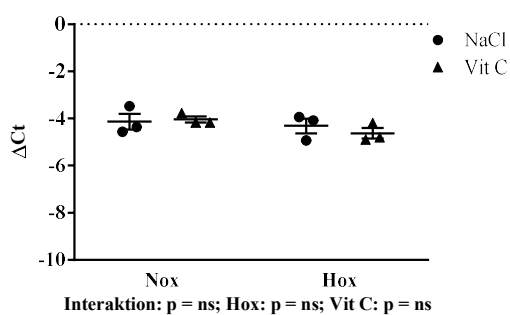
c) sGC α 2 Adult



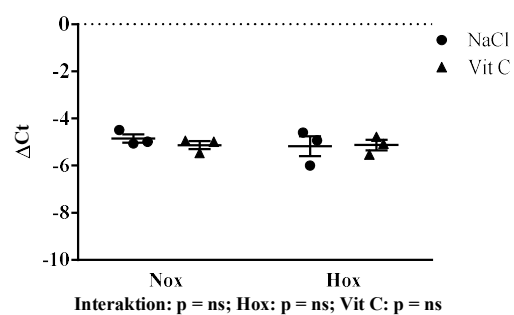
d) PDE3A Adult



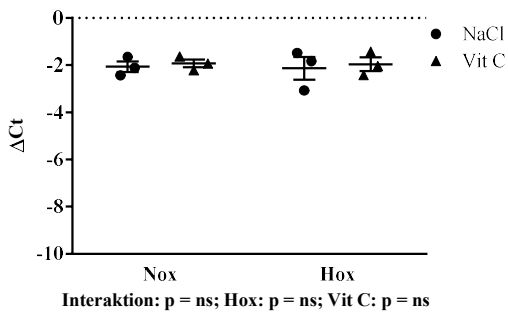
e) PDE3B Adult



f) PDE4D Adult



g) PDE5A Adult



h) PDE10A Adult

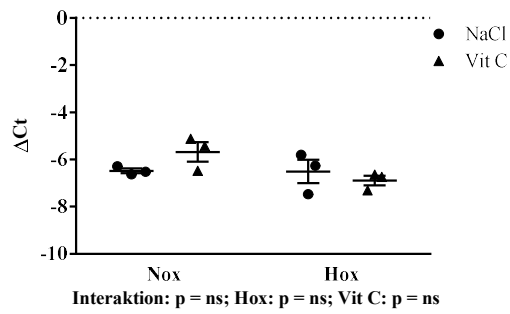


Abb. 3-31 Übersicht der mRNA-Expression von am NO-Signalweg beteiligten Genen in den adulten Schafslungen

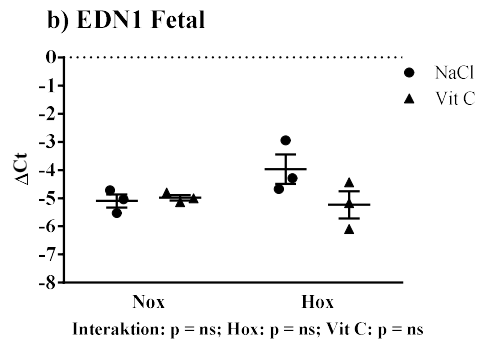
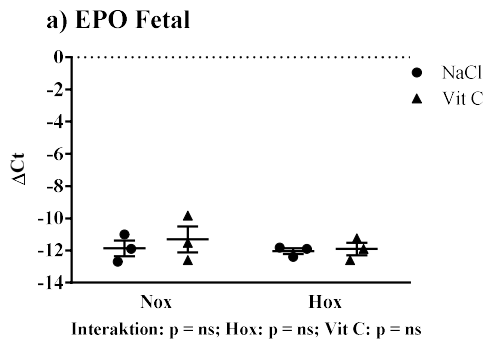
a) VEGF = vascular endothelial growth factor, b) sGCα1 = Soluble Guanylyl-Cyclase, Isoform 1, c) sGCα1 = Soluble Guanylyl-Cyclase, Isoform 2, d) PDE3A = Phosphodiesterase 3A, e) PDE3B = Phosphodiesterase 3B, f) PDE4D = Phosphodiesterase 4D, g) PDE5A = Phosphodiesterase 5A, h) PDE10A = Phosphodiesterase 10A; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

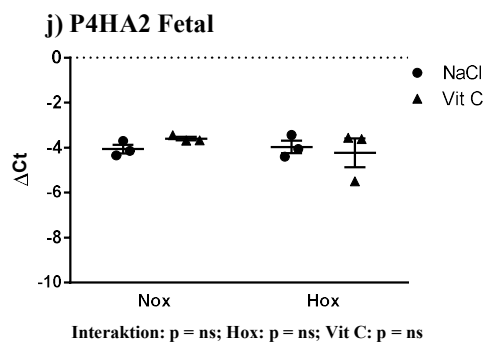
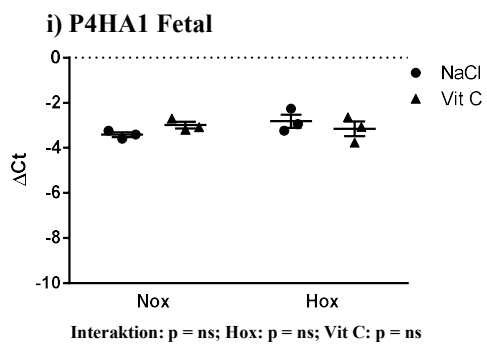
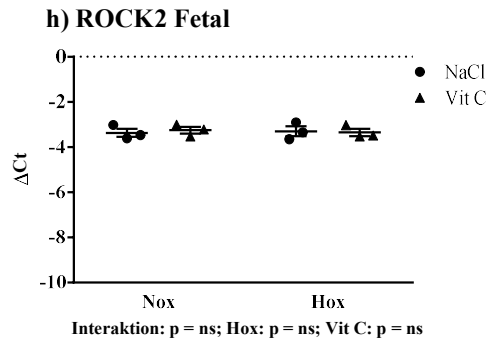
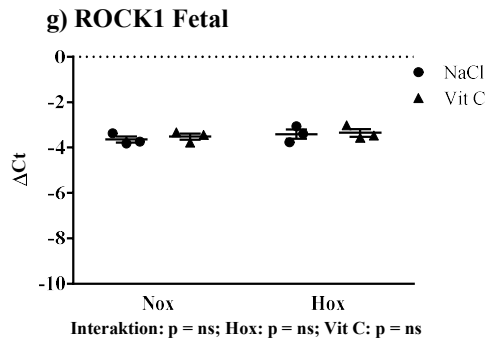
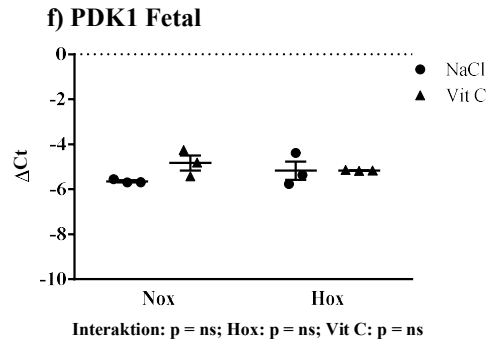
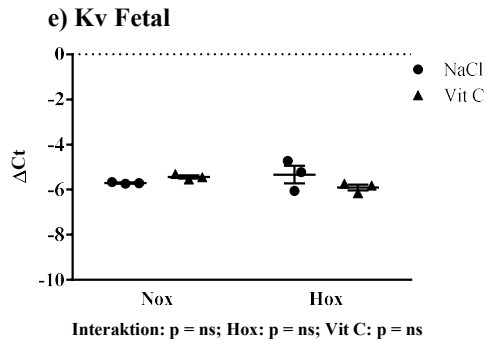
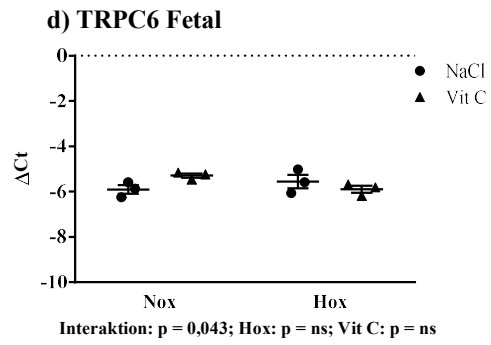
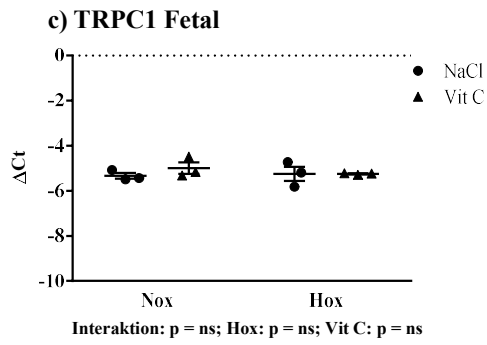
3.3.2.4 Andere

Nachfolgend finden sich die Expressionen von diversen Genen, die bei der pulmonalen Hypertonie dysreguliert sind: Erythropoetin (EPO), Endothelin 1 (EDN1), *transient receptor potential cation channel* (TRPC1, TRPC6), Kalium-Kanal 2.1 (Kv), Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (PDK), Rho-Kinasen (ROCK), *prolyl-4-hydroxylase alpha* (P4HA) und Cytochrom C (CC).

Fetale Schafslungen

Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsdaten von EPO, EDN1, TRPC1, Kv, PDK1, ROCK1, ROCK2, P4HA1, P4HA2, P4HA3 bzw. CC. im Lungenhomogenat isoliert aus fetalen Schafen waren statistisch nicht signifikant. Es konnte hier weder ein Hypoxie- noch ein Vitamin C-Effekt beobachtet werden. Die TRPC6 mRNA-Expression zeigte eine signifikante Interaktion (s. Abb. 3-32).





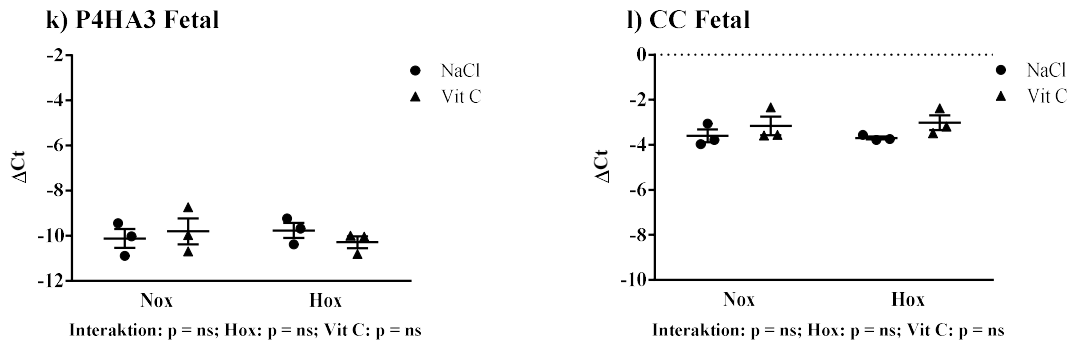


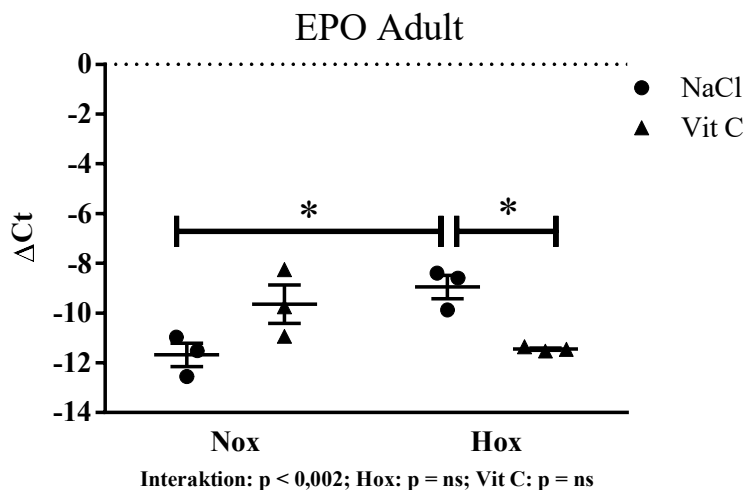
Abb. 3-32 Übersicht der mRNA-Expression von Genen in den fetalen Schafslungen, die in der PH dysreguliert sind

a) EPO = Erythropoetin, b) EDN1 = Endothelin 1, c) TRPC1 = transient receptor potential cation channel 1, d) TRPC6 = transient receptor potential cation channel 6, e) Kv = Kalium-Kanal 2.1, f) PDK1 = Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1, g) ROCK1 = Rho-Kinase 1, h) ROCK2 = Rho-Kinase 2, i) P4HA1 = prolyl-4-hydroxylase alpha 1, j) P4HA2 = prolyl-4-hydroxylase alpha 2, k) P4HA3 = prolyl-4-hydroxylase alpha 3, l) CC = Cytochrom C; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Adulte Schafslungen

Die mRNA-Expression von EPO, TRPC1 und CC wurde durch die fetalen Aufzuchtbedingungen in den adulten Schafslungen signifikant beeinflusst.

Die mRNA-Expressionsdaten von EPO zeigten in der NaCl-Gruppe eine signifikante Induktion in Folge der Hypoxie-Exposition. Bei gleichzeitiger Gabe von Vitamin C fielen sie auf das Normoxie-Niveau ab. Weiterhin war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-33).

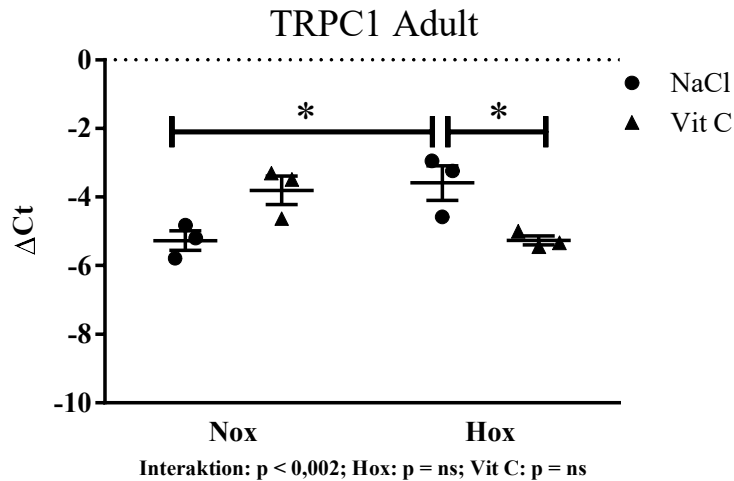


Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
Δ Ct	-11,7	-9,7	-8,9	-11,5

Abb. 3-33 mRNA-Expression von EPO in adulten Schafslungen

EPO = Erythropoetin, * p < 0,05, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

Die mRNA-Expressionsdaten von TRPC1 zeigten ein ähnliches Bild wie EPO. In der NaCl-Gruppe wurde die TRPC1 Expression signifikant durch Hypoxie induziert und fiel durch gleichzeitige Gabe von Vitamin C auf das Normoxie-Niveau ab. Weiterhin war auch hier die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-34).

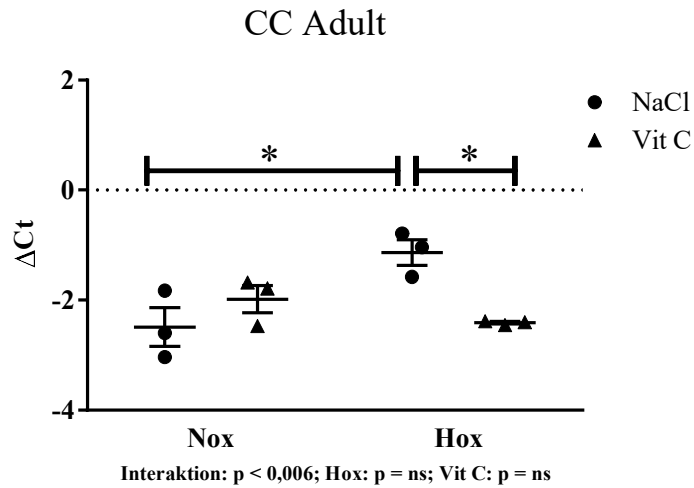


Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-5,3	-3,8	-3,6	-5,3

Abb. 3-34 mRNA-Expression von TRPC1 in adulten Schafslungen

TRPC1 = transient receptor potential cation channel 1, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

Auch die mRNA-Expressionsdaten von CC ähnelten denen von EPO und TRPC1. In der NaCl-Gruppe wurde die CC Expression signifikant durch Hypoxie induziert und fiel durch gleichzeitige Gabe von Vitamin C auf das Normoxie-Niveau ab. Weiterhin war auch hier die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-35).

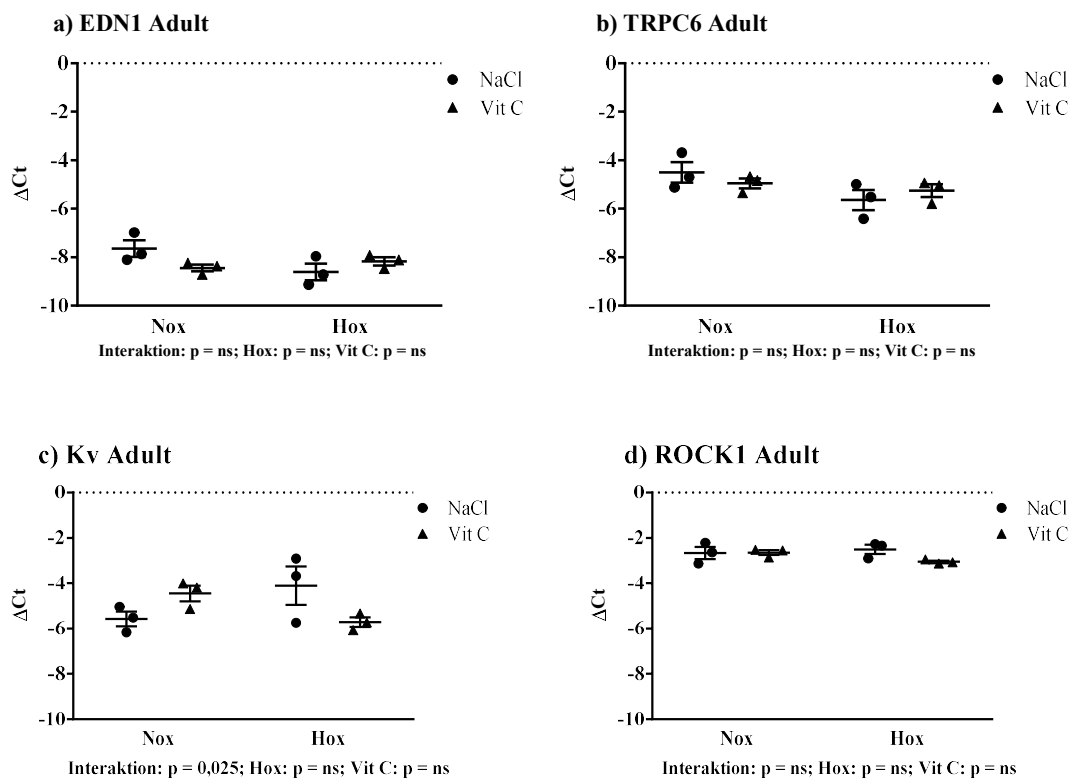


Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-2,5	-1,9	-1,1	-2,4

Abb. 3-35 mRNA-Expression von CC in adulten Schafslungen

CC = Cytochrom C, * $p < 0,05$, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils $N = 3$.

Die Unterschiede der mRNA-Expressionsdaten von EDN1, TRPC6, ROCK1, ROCK2, P4HA1, P4HA2 bzw. P4HA3 im Lungenhomogenat isoliert aus adulten Schafen waren statistisch nicht signifikant. Bei Kv und PDK1 war die Interaktion von Exposition (Normoxie/Hypoxie) und Behandlung (NaCl/Vit C) statistisch signifikant (s. Abb. 3-36).



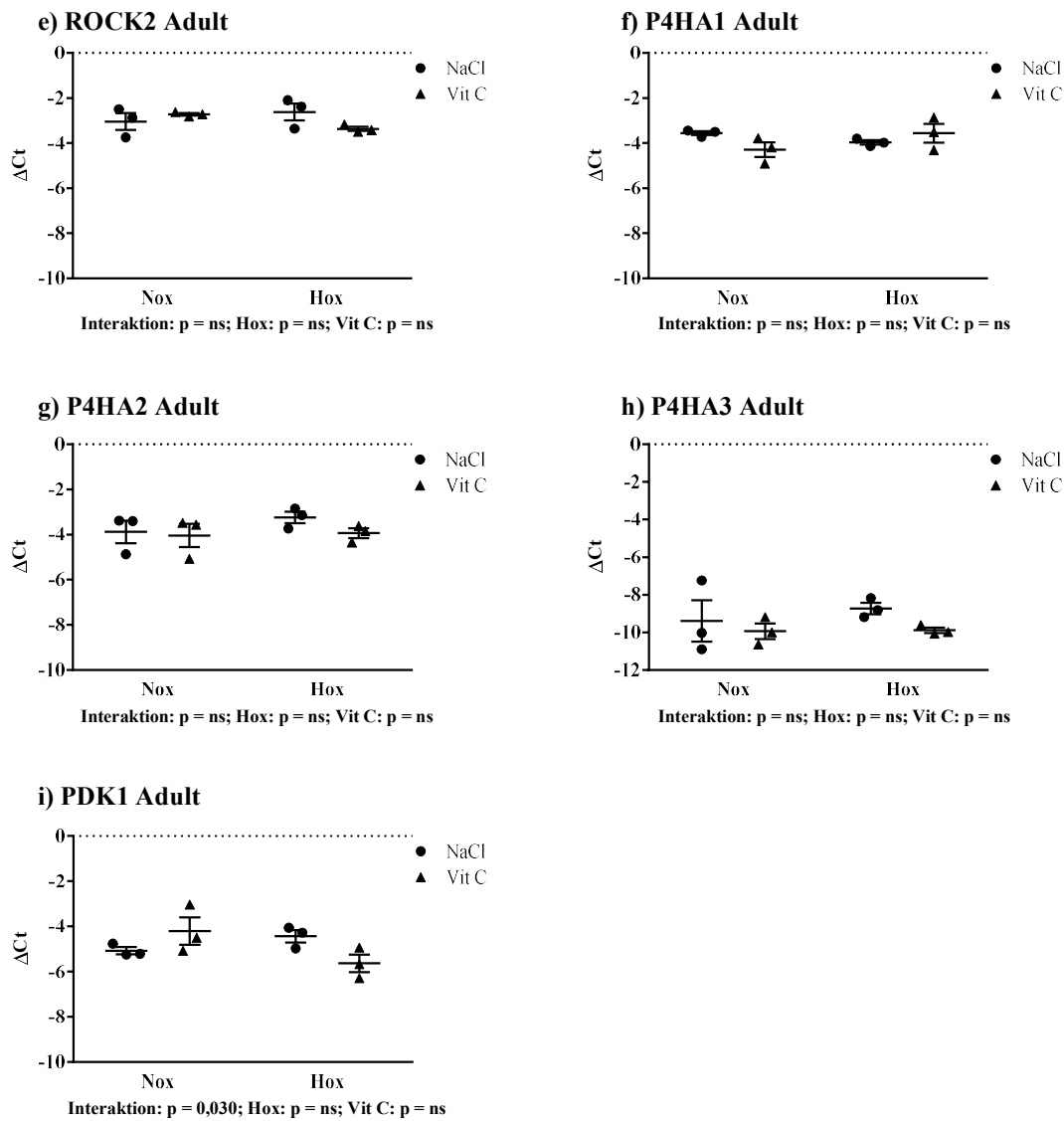


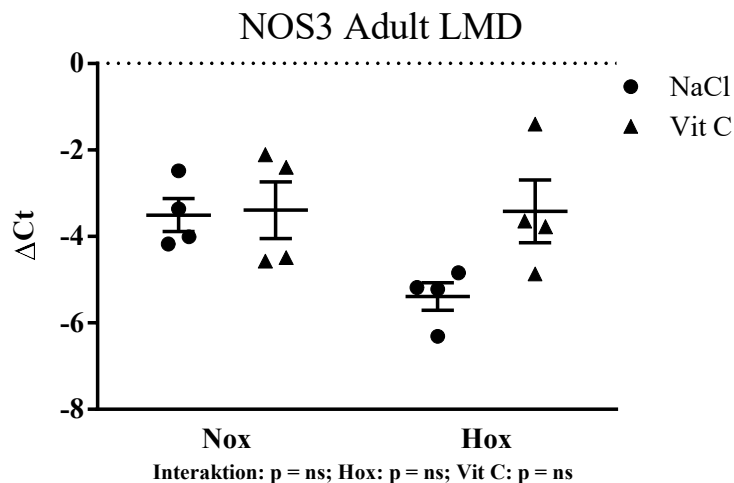
Abb. 3-36 Übersicht der mRNA-Expression von Genen in den adulten Schafslungen, die in der PH dysreguliert sind

a) EDN1 = Endothelin 1, b) TRPC6 = transient receptor potential cation channel 6, c) Kv = Kalium-Kanal 2.1, d) ROCK1 = Rho-Kinase 1, e) ROCK2 = Rho-Kinase 2, f) P4HA1 = prolyl-4-hydroxylase alpha 1, g) P4HA2 = prolyl-4-hydroxylase alpha 2, h) P4HA3 = prolyl-4-hydroxylase alpha 3, i) PDK1 = Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1; Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 3.

3.3.3 Genexpression in den Gefäßen

Um die mRNA-Expression von Zielgenen speziell in einem Kompartiment der Lunge untersuchen zu können, wurde eine laser-assistierte Mikrodisektion (LMD) durchgeführt. Mit dieser etablierten Methode konnte die Zielgenexpression im Modell der PPHN spezifisch in den Pulmonalgefäßen analysiert werden. Hierfür wurde NOS3 ausgewählt, da bereits ein etablierter Antikörper für die Doppelfärbung zur Verfügung stand.

Im Folgenden finden sich exemplarisch die mRNA-Expressionsdaten von NOS3 in den Pulmonalgefäßen der adulten Schafslungen, die mittels LMD isoliert wurden. Die Unterschiede der Daten waren statistisch nicht signifikant. Weiterhin konnte weder eine Interaktion noch ein Einfluss der Exposition (Normoxie/Hypoxie) bzw. Behandlung (NaCl/Vit C) auf die Interaktion beobachtet werden (s. Abb. 3-37).



Gruppen	Nox	Nox + VitC	Hox	Hox + VitC
ΔCt	-3,5	-3,4	-5,4	-3,4

Abb. 3-37 mRNA-Expression von NOS3 aus der LMD der adulten Schafslungen

NOS3 = NO-Synthase 3, LMD = Lasermikrodissektion, Ct = cycle of threshold, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, VitC = Vitamin C, jede Gruppe mit jeweils N = 4.

3.3.4 Detektion von NOS3 im Gewebe

Ausgehend von den LMD-Ergebnissen bezogen auf NOS3 wurde eine histologische Darstellung mittels Antikörperfärbung gegen NOS3 durchgeführt. Bei der visuellen Beurteilung der Färbung zeigten die normoxischen adulten Schafslungen nur eine schwache Positivität gegen NOS3, unabhängig davon, ob es sich um Pulmonalgefäße oder Bronchien handelte. Hingegen ließen die hypoxischen adulten Schafslungen eine starke Positivität gegen NOS3 im Epithel der Bronchien erkennen und eine etwas schwächere Färbung im Endothel der Pulmonalgefäße. In der Negativkontrolle konnte NOS3 nicht detektiert werden (s. Abb. 3-38).

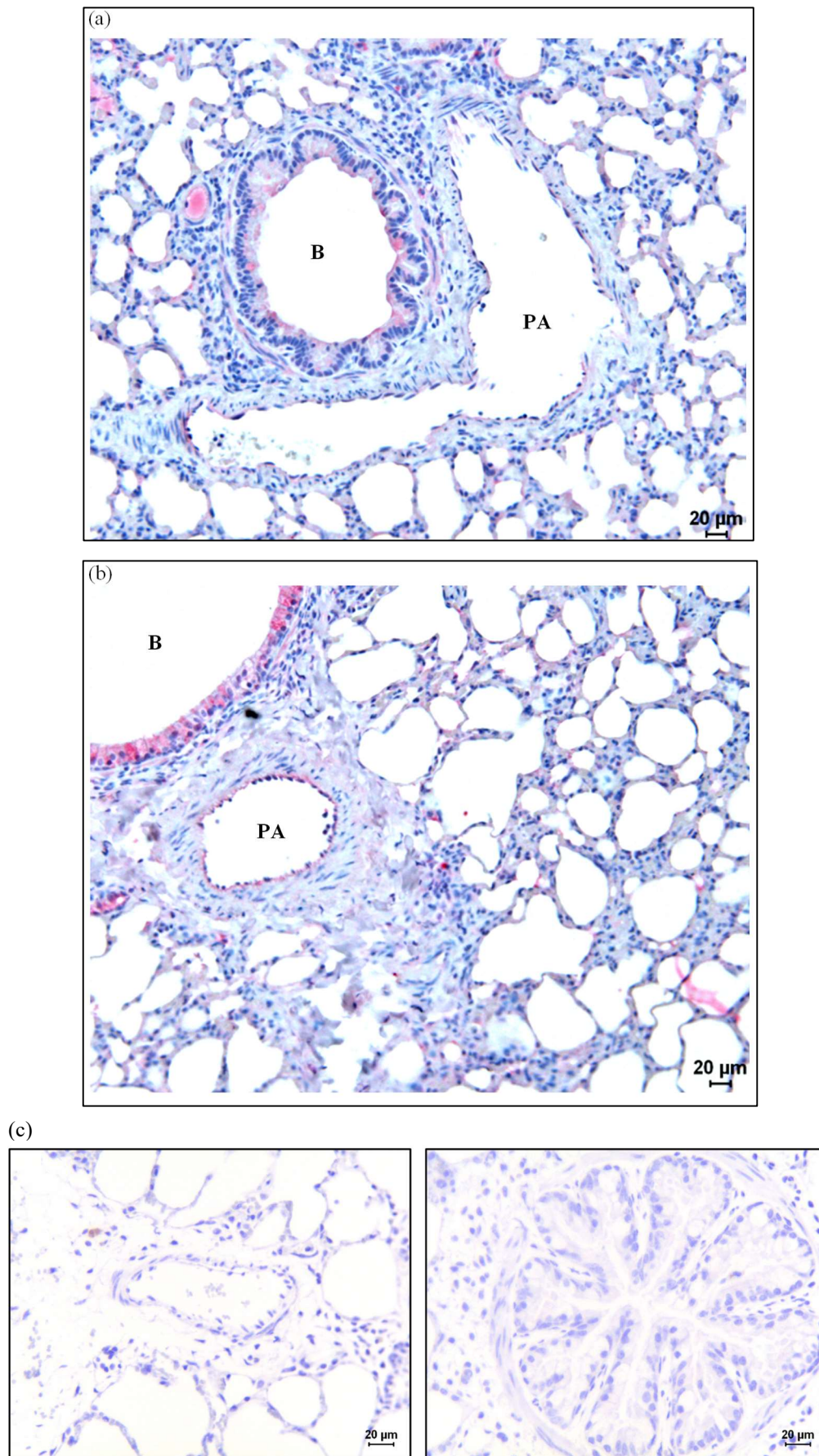


Abb. 3-38 Antikörperfärbung gegen NOS3 in adulten Schafslungen
(beurteilt bei 100-facher Vergrößerung). (a) Normoxie, (b) Hypoxie, (c) Negativkontrolle; links: Pulmonalgefäß; rechts: Bronchus. Abkürzungen: B = Bronchus; PA = Pulmonalgefäß; rot = NOS3.

4 Diskussion

4.1 Limitierung und Generalisierbarkeit

Sowohl Methodik als auch Ergebnisse dieser Studie unterliegen Limitierungen bezüglich Generalisier- und Interpretierbarkeit. Zunächst sollen dahingehend der Versuchsaufbau und -ablauf bezogen auf die vorliegende Arbeit erörtert werden. Die Hypoxie-Kammern hatten für die trächtigen Schafe Vorteile in Hinblick auf die Ausbildung einer PPHN, gegenüber der Manipulation vom Ductus arteriosus (s. Kap. 4.2). Jedoch wird der Effekt der Hypoxie bzw. der hohen intravenösen Dosen Vitamin C in der vorliegenden Arbeit lediglich bezogen auf Lunge und Herz diskutiert. Dabei ist in diesem Zusammenhang der Gesamtorganismus sowohl von der Hypoxie als auch den Vitamin-C-Gaben betroffen. Gerade unter dem Gesichtspunkt, dass Vitamin C in hohen Dosen auch oxidativ wirken kann^{88,129}, ist dies bezogen auf den Gesamtorganismus zu berücksichtigen. Dadurch könnten die Hypoxie und Vitamin-C-Gaben indirekte Veränderungen in Lunge und/oder Herz herbeigeführt haben aufgrund extrapulmonaler und/oder -kardialer Ursachen, die hier nicht untersucht wurden¹⁷⁸. Zudem wurden die trächtigen Schafe im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich im letzten Drittel der Schwangerschaft der Hypoxie ausgesetzt, um die frühfetale Entwicklung nicht zu stören. Die Zeitpunkte, zu denen die chronische Hypoxie, als Ursache der PPHN beim Menschen⁹⁰, wiederum in der Entwicklung von Feten vorliegt, unterscheiden sich beträchtlich, sodass die hier vorliegende Methodik und auch die entsprechenden Ergebnisse nur eingeschränkt generalisierbar sind. So kann bereits eine chronische Hypoxie im ersten Drittel der Schwangerschaft bestehen, z.B. durch ungenügende Sauerstoffversorgung über eine uteroplazentäre Dysfunktion^{65,138}. Daneben gibt es aber auch zahlreiche andere Ursachen für eine chronische fetale Hypoxie im letzten Drittel der Schwangerschaft, wie in der vorliegenden Arbeit, z.B. durch den Gestationsdiabetes. Dieser wird vor allem im zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft beobachtet, der wiederum zu einer chronischen fetalen Hypoxie führen kann^{44,65,166}. Einen weiteren Unterschied im Vergleich von Versuchsaufbau/Tiermodell und dem Menschen bildet das Ventilations-Perfusions-Verhältnis der Lunge. Bedingt durch den Körperaufbau der Schafe liegt deren Lunge in der Transversalebene, bei Menschen in der Frontalebene. Dadurch ist in den Schafslungen kein bzw. nur ein wenig ausgeprägtes Ventilations-Perfusions-Verhältnis zu beobachten im Gegensatz zum Menschen¹¹⁵, was bei der Betrachtung der Resultate

berücksichtigt werden sollte, wobei jedoch keine gravierenden Auswirkungen auf die Ergebnisse zu erwarten sind.

Auch technische/methodische Limitierungen müssen in Bezug auf die vorliegende Arbeit kritisch betrachtet werden:

1) das in der vorliegenden Arbeit verwendete Untersuchungsmaterial stammte aus Schafen. Dieses hatte zur Folge, dass die histologischen Untersuchungen (insbesondere die immunhistochemische Färbetechnik zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Pulmonalgefäße) im Rahmen der vorliegenden Arbeit eigens etabliert werden mussten. In der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, waren entsprechende Färbungen nur für die menschliche sowie die Maus- und Ratten-Lungen etabliert. Für die Etablierung der Färbung wurden verschiedene Antikörper und Protokolle getestet, um das bestmögliche Färbeergebnis zu erzielen. Trotzdem konnten nicht alle Präparate gleichermaßen eindeutig gefärbt werden, sodass diese aus der Analyse ausgeschlossen werden mussten, was insbesondere fetale Schafslungen zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades betraf. Dabei wurden solche Proben ausgeschlossen, die nicht eindeutig die definierte Färbung vom Endothel (braunschwarz), glatte Muskulatur (rot) bzw. Zellkern (blau) aufwiesen (s. Kap. 2.4.4).

2) möglicherweise befand sich nach der Kaiserschnitt-Entbindung noch Restfruchtwasser in den Lungen^{81,114}, sodass diese nicht ausreichend fixiert werden konnten. In der Arbeitsgruppe Weißmann wird eine blutfrei Perfusion und Fixierung über das Gefäß- und Bronchialsystem für all diejenigen Lungen durchgeführt, die für histologische Fragestellungen verwendet werden sollen. Es wird hierzu ein standardisiertes Protokoll angewendet, welches die immunhistochemische Charakterisierung der Lungen, ohne Einschränkungen, erlaubt. Eine solche Perfusion und Fixierung wurde bei den Schaflungen durch die Arbeitsgruppe Prof. Dino A. Giussani (*Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Vereinigtes Königreich*) nicht durchgeführt.

3) es wurde nur ein kleiner Teil der Schaflunge histologisch untersucht, welches eine Einschränkung der Generalisierbarkeit im Hinblick auf das Gesamtorgan darstellen könnte. Dies betrifft auch die molokularbiologischen Untersuchungen, wo ebenfalls nur ein kleiner Teil der Lunge zu einem Homogenat verarbeitet und analysiert wurde, sodass eventuell auftretende regionale Unterschiede innerhalb der Lunge erfasst bzw. nicht

erfasst werden. Bedingt ist dies durch die große Lunge des Schafes, im Gegensatz zu anderen Tiermodellen z.B. der Mäuse. So könnte ein Lungenhomogenat extrahiert aus einer Maus, im Gegensatz zum Schaf, ein zuverlässigeres Gesamtbild der Genexpression widerspiegeln.

4) die Verwendung eines Lungenhomogenats liefert keinen Aufschluss über die jeweilige Expression in den unterschiedlichen Lungenkompartimenten. Die Genexpressionsmuster in den Septen, Bronchien bzw. Gefäßen/Gefäßschichten (s. Kap. 4.6) können sich deutlich unterscheiden^{77,161}. Dadurch könnten Schwankungen der Ergebnisse innerhalb der Gruppen erklärt werden.

Um weitere mögliche Störfaktoren in Hinblick auf die Ergebnisse zu minimieren, wurden standardisierte Protokolle eingehalten und wann immer möglich wurde die Auswertung geblindet durchgeführt. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die molekularbiologischen Untersuchungen jene Schafe ausgewählt wurden, die schon histologisch aussagekräftige Ergebnisse geliefert hatten. Durch diesen Schritt erfolgte bereits eine Vorselektion, was wiederum eine Limitation bezogen auf die Generalisierbarkeit darstellt.

Des Weiteren wurden zur Analyse der molekularbiologischen Veränderung in der Lunge 33 verschiedene Gene gescreent, die im Zusammenhang mit der Ausbildung der PH stehen. Signifikante Signalwege wurden weiter untersucht, um eine Kausalität innerhalb des komplexen Systems aufzeigen zu können. Jedoch konnte nicht der gesamte Signalweg analysiert werden, sodass hier Ungewissheit in Bezug auf die mögliche Kausalität festzuhalten ist, da andere Signalkaskaden oder Störfaktoren nicht ausgeschlossen werden können. Ebenfalls sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass hier mittels qPCR die mRNA-Regulation untersucht wurde. Hingegen wurde keine Analyse auf Proteinebene mittels *Western Blot* durchgeführt. Eine Regulation auf mRNA-Ebene führt in Folge nicht immer zu einer Regulation auf Proteinebene und umgekehrt, wodurch eine Limitation bezüglich der Generalisierbarkeit entsteht. Außerdem wurde bei der Auswertung der Ergebnisse das Geschlecht des Schafes aufgrund fehlender Angaben nicht berücksichtigt. Geschlechtsspezifische Unterschiede bedingt durch die Sexualhormone Östrogen und Testosteron können jedoch verschieden starke histologische und molekularbiologische Antworten ergeben⁷⁴. Dies sollte bei der Betrachtung der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

Weitere Arbeiten (insbesondere mit einer erhöhten Anzahl an Versuchstieren) sowie *Western-Blot*-Analysen sind daher notwendig, um die vorliegenden Ergebnisse replizieren, auf Proteinebene bestätigen sowie in Hinblick auf intersexuelle Unterschiede untersuchen zu können.

4.2 Wahl des Tiermodells

Die pulmonale Hypertonie (hier im Speziellen die PPHN) ist ein Krankheitsbild mit komplexer Pathophysiologie. Um dies besser zu verstehen, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert.

In diesem Zusammenhang stellt die bekannteste Technik die Manipulation am *Ductus arteriosus* dar. So wurde in der Arbeit von Abman et al.² eine mechanische Okklusion in Form eines aufblasbaren Okkluders im *Ductus arteriosus* der Lämmer durchgeführt. Black et al.¹⁶, Wild et al.²¹⁰ und Morin et al.²¹⁰ hingegen führten eine Ligation des *Ductus arteriosus* durch. All diese Maßnahmen führen durch den Verschluss vom *Ductus arteriosus*, der in der Fetalperiode einen natürlichen Rechts-Links-Shunt gewährleistet, zu einem erhöhten Blutdruck im pulmonalen Kreislauf. Dieser künstlich erzeugte Vorgang führt sekundär zu einer Wandstärkenzunahme der pulmonal-arteriellen Gefäße und somit u. a. dem histologischen Korrelat der pulmonalen Hypertonie⁷⁹. In anderen Arbeiten wie denen von Noguchi et al.¹²⁷ und Nelin et al.¹²² wurden neonatale Ferkel einer akuten bzw. chronischen Hypoxie ausgesetzt, wodurch diese im Verlauf eine PPHN entwickelten. Weiterhin wurde ein PPHN-Modell bezogen auf Ratten von Xu et al. beschrieben. Dabei werden die Tiere in der neonatalen Phase chronischer Hypoxie ausgesetzt²¹⁷. Auch eine intratracheale Mekoniuminstallation an Ferkeln³², ein aorto-pulmonaler Shunt an Lämmern¹⁵⁰ und die pharmakologische Konstriktion des *Ductus arteriosus* durch nichtsteroidale Antirheumatika bzw. selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren¹⁷⁵ sind als PPHN-Tiermodelle beschrieben worden.

Anhand dieser Tiermodelle werden durch die verschiedenen Ansätze ähnliche Veränderungen der Lungenarchitektur deutlich, wie sie auch bei Menschen mit PPHN auftreten. Jedes dieser Modelle weist Vor- und Nachteile bedingt durch die Komplexität der PPHN auf, da diese durch verschiedenste Ursachen hervorgerufen werden kann (s. Kap. 1.3.3). Der Hauptvorteil der oben genannten Tiermodelle besteht in der unkomplizierten Induktion der PPHN durch Manipulation am *Ductus arteriosus* oder postnatale chronische Hypoxie. Jedoch ist die chronische intrauterine fetale Hypoxie, die

als zweithäufigste Ursache der PPHN genannt wird ⁹⁰, in diesen Modellen nur unzureichend vertreten, was somit den bedeutendsten Nachteil in diesem Zusammenhang darstellt.

Frühere Versuche zur Induktion der PPHN durch chronische intrauterine fetale Hypoxie durch Geggle et al. ⁶¹ an Ratten und Murphy et al. ¹¹⁹ an Schweinen sind gescheitert, denn die erwarteten physiologischen und histologischen Veränderungen konnten nicht nachgewiesen werden. Zwar konnte eine chinesische Arbeitsgruppe von Xu et al. ²¹⁶ ein Rattenmodell etablieren, in deren Rahmen durch die chronische intrauterine Hypoxie eine PPHN ausgelöst wurde. Jedoch gelang dies nur, indem den trächtigen Ratten zusätzlich *Indometacin* verabreicht wurde. Dieses gehört zu den nichtsteroidalen Antirheumatika und führt zum Verschluss des *Ductus arteriosus* ¹⁶⁴. Damit ist dieses Modell vergleichbar mit den anderen Tiermodellen der PPHN, bei denen eine Manipulation am Ductus arteriosus durchgeführt wird.

Aus den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen geht hervor, dass das hier vorgestellte Modell, bei dem trächtige Schafe im letzten Drittel der Schwangerschaft chronischer Hypoxie ausgesetzt werden, als PPHN-Modell bezogen auf Feten dienen kann. Zudem persistierte die in der Fetalperiode durch Hypoxie ausgelöste PPHN auch in den adulten Schafen, auch wenn diese unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden. Demnach ist das in dieser Arbeit verwendete Modell vergleichbar mit anderen etablierten Modellen der PPHN, wobei jedoch ein wesentlicher Unterschied festzustellen ist. Das vorliegende Modell bildet die chronische intrauterine Hypoxie als Ursache der PPHN ab, ohne jegliche Manipulation am *Ductus arteriosus*. Da die genannte Hypoxieform die zweithäufigste Ursache der menschlichen PPHN darstellt ⁹⁰, trägt das in dieser Arbeit vorgestellte Modell entscheidend dazu bei, die Pathomechanismen der PPHN weiter zu verstehen, da es die *in vivo* Bedingungen des Menschen widerspiegeln kann. Außerdem wurde in dieser Arbeit die Unterlegenheit der peroralen Vitamin-C-Zufuhr gegenüber der intravenösen Gabe berücksichtigt (s. Kap. 1.4). Die trächtigen Schafe erhielten abhängig von ihrem Körpergewicht täglich 200 mg/kg Vitamin C intravenös verabreicht.

Die Folgen der PPHN beschränkten sich jedoch nicht nur auf die Lunge, sondern konnten auch im Herzen festgestellt werden. Nachfolgend werden diesbezüglich die stereologischen, histologischen und molekularbiologischen Ergebnisse des vorliegenden Tiermodells näher diskutiert.

4.3 Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die histomorphologischen Veränderungen in der Lunge

Dass eine chronische Hypoxie eine PH verursacht und diese sich histologisch in Form von Wandstärkenzunahme und vermehrter Muskularisierung, ausgelöst durch eine PASMC Hyperproliferation widerspiegelt, ist hinreichend untersucht worden, u. a. an Ratten^{3,147,208} und Mäusen^{38,64,128}.

Die Gefäßwandzunahme der Pulmonalgefäße von Schafen in anderen Modellen der PPHN, wie oben beschrieben (s. Kap. 4.2), wurde bereits nachgewiesen^{2,73,210}. Dabei konnten diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mithilfe der chronischen fetalen Hypoxie von Schafen, induziert durch die Haltung in Hypoxie-Kammern, bestätigt werden. Diese Veränderungen an den Pulmonalgefäßen waren persistierend in den adulten Schafslungen nachweisbar, auch wenn diese nach der Geburt unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen.

Zugleich konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass eine Hypoxie-induzierte Wandstärkenzunahme der Pulmonalgefäße durch die Gabe von Vitamin C in der Fetalperiode verhindert werden kann (s. Abb. 3-3). Diese protektive Wirkung von Vitamin C in der Fetalperiode war ausreichend und persistierend, sodass die adulten Schafe, die unter weiterer Normoxie aufwuchsen, keine sekundäre Wandstärkenzunahme verzeichneten (s. Abb. 3-6).

Dass die Gabe von Vitamin C die Ausbildung der pulmonalen Hypertonie verringert, wurde u. a. in Hühnern nachgewiesen. Xiang et al.²¹⁵ konnten dabei zeigen, dass die Gabe von Vitamin C die Wandstärke und Gefäßmuskularisierung negativ beeinflusste.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich zwar ein signifikanter Unterschied bezogen auf den Grad der Muskularisierung unter hypoxischen Bedingungen nachweisen, jedoch nur bei adulten Schafen (s. Abb. 3-12). Durch die Gabe von Vitamin C kommt es zu tendenziell weniger voll muskularisierten Pulmonalgefäßen in den adulten Schafen, jedoch ist dies nicht signifikant. Außerdem zeigten die Schafe der Kontrollgruppe, die unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen, einen hohen Anteil an voll muskularisierten peripheren Pulmonalgefäßen. Diese Beobachtung zieht sich durch alle Gefäßkategorien

in Hinblick auf die fetalen sowie adulten Schafe. Diese Ergebnisse unterscheiden sich demnach von den bisher publizierten Tiermodellen der PPHN ²¹⁰.

Fibrotische Veränderungen der Lunge, die schon in der normoxischen Gruppe zu dieser deutlichen Mehrheit an voll muskularisierten Gefäßen geführt haben könnten, wurden durch eine Trichromfärbung ausgeschlossen. Anderweitige Lungenerkrankungen der Kontrollgruppe, die sich mit einem bindegewebigen Umbau manifestieren würden, würden den Grad der Muskularisierung beeinflussen ²²³, wodurch die divergenten Ergebnisse erklärbar gewesen wären.

Dass die peripheren Pulmonalgefäße der Schafe schon in der Kontrollgruppe relativ zahlreich voll muskularisierte Gefäße aufweisen, ist bekannt ²¹⁰. Doch in der vorliegenden Arbeit war dieser Anteil deutlich erhöht.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den Untersuchungen an anderen Tieren wie Ratten ^{29,158,190}. Diese Arbeiten zeigten eine deutliche Mehrheit von nicht muskularisierten Gefäßen bzw. in absteigender Reihenfolge teil muskularisierten und voll muskularisierten Gefäßen unter normoxischen Bedingungen. Die Hypoxie induzierte wiederum einen Umbau der peripheren Pulmonalgefäße mit einer Mehrheit von voll muskularisierten Gefäßen und in absteigender Reihenfolge teil muskularisierten und nicht muskularisierten Gefäßen, was demnach umgekehrt verlief.

Ähnlich zu den oben genannten Tiermodellen verhält es sich im Menschen. Beim gesunden Menschen ist der pulmonale Gefäßbaum nur bis zu einem Gefäßdurchschnitt von ca. 80 µm voll muskularisiert. Danach nimmt die Muskularisierung ab bis hin zu nicht muskularisierten Gefäßen ¹⁵⁷.

Darauf bezogen erscheint eine nähere Betrachtung der Methodik in den jeweiligen Modellen lohnenswert. Zunächst werden diesbezüglich die bisherigen Schafsmodelle der PPHN betrachtet, bei denen der Grad der Muskularisierung untersucht wurde. Bei Wild et al. ²¹⁰ wurde die Unterteilung zwischen nicht muskularisierten und muskularisierten Pulmonalgefäßen rein visuell getroffen, mit der Unterscheidungshilfe, ob lediglich nur eine *Lamina elastica* oder sowohl eine *Lamina elastica interna* als auch *-externa* vorhanden war. Wie die Unterteilung zwischen teil- und voll muskularisierten Gefäßen getroffen wurde, ist nicht beschrieben worden. Üblicherweise wird hier differenziert, ob die *Lamina elastica interna* vollständig oder nur teilweise vorhanden ist, z. B. bei Xiang et al. ²¹⁵. Bei teil- und voll muskularisierten Gefäßen ist die *Lamina elastica externa*

komplett ausgebildet. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Anteil der Muskulatur in der Gefäßwand kolorimetrisch-spektrometrisch erfasst, nach Anfärbung der Pulmonalgefäße mit α -Aktin (s. Kap. 2.4.2.3). Durch dieses Verfahren ergibt sich eine Unabhängigkeit von der visuellen Beurteilung der *Lamina elastica* und sich daraus ergebenden Fehlern. Bei der kolorimetrisch-spektrometrischen Analyse ist z. B. ein nicht muskularisiertes Gefäß definiert mit einem Anteil von $< 5\%$ an positivem glattmuskulärem α -Aktin im Verhältnis zum gesamten Gefäß. Diese Angaben sind vor allem in Maus- und Rattenmodellen der PH beschrieben^{30,64,128,158}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Doppelfärbung der Pulmonalgefäße in Schafen neu etabliert, wobei für die Auswertung bereits vorhandene Richtwerte verwendet wurden. Tucker et al.¹⁸⁵ zeigten jedoch anschaulich in ihrer Übersichtsarbeit, dass bezogen auf die Ausbildung der pulmonalen Hypertonie (hier durch die Exposition in extremer Höhenlage) deutliche Unterschiede zwischen den Tierspezies existieren. Daher stellt sich hier die Frage, ob die hier verwendeten Richtwerte übertragbar sind auf Schafe.

Trotz aller methodischen Überlegungen dominierte der Anteil an voll muskularisierten Gefäßen in der vorliegenden Arbeit deutlich. Ob diese Veränderung infolge des Aufbaus des Modells, der Wahl der Spezies oder durch eine anderweitige Beeinträchtigung aufgetreten ist, konnte nicht abschließend geklärt werden.

4.4 Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die rechtsventrikuläre Herzwand

Im vorliegenden Modell konnten anhand der stereologischen Untersuchung des rechten Herzens, durch Prof. Dino A Giussani, *Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Vereinigtes Königreich*, die Folgen einer persistierenden PH in den fetalen und adulten Schafen gezeigt werden.

Dass in den hypoxischen fetalen Herzen signifikant erniedrigte Volumina der rechtsventrikulären Herzwand vorlagen, obwohl sie histologisch eine PH aufwiesen, lässt sich eventuell durch den Umgehungskreislauf der Feten über den *Ductus arteriosus*⁶⁰ erklären (s. Abb. 3-1). Der infolge der PH im Lungengefäßbett erhöhte Widerstand würde zu einer Nachlasterrhöhung im rechten Ventrikel führen. Diese wiederum kann in den Feten über die Shunt-Verbindung, den *Ductus arteriosus*, in die absteigende Aorta umgangen werden, sodass das Blut dem Weg des geringsten Widerstandes folgt. Die

damit fehlende Nachlastserhöhung kann somit keine rechtsventrikuläre Hypertrophie induzieren.

Mit der Geburt verschließt sich jedoch der *Ductus arteriosus* und somit der Rechts-Links-Shunt. Im Vergleich zu den normoxischen Gruppen war das Volumen der rechtsventrikulären Herzwand der adulten Schafe, die in der Fetalperiode unter hypoxischen Bedingungen aufwuchsen, im vorliegenden Modell erhöht (s. Abb. 3-2). Dies entspricht dem *Cor pulmonale*, das im Rahmen der PH entsteht. Durch den erhöhten Lungenwiderstand steigt die Nachlast im rechten Ventrikel an, da die Shunt-Verbindung fehlt, die kompensatorische Mechanismen induziert, die zur Hypertrophie des rechten Ventrikelmyokards und im Verlauf zu einer Dilatation führen¹⁶⁷. Diese Aussage kann durch die Arbeit von Abman et al.² bekräftigt werden. Abman et al. führten bei Schafen im letzten Drittel der Schwangerschaft 3 bis 14 Tage lang eine Okklusion des *Ductus arteriosus* durch. Die fetalen Schafe bildeten schon nach diesem kurzen Intervall der Okklusion signifikant höhere rechtsventrikuläre Herzwand-Volumina aus. Wie oben beschrieben, fehlt hiermit der Rechts-Links Shunt, und die Nachlastserhöhung führt zur Hypertrophie des rechten Ventrikels.

Ähnliche pathophysiologische Überlegungen sind bei Tiermodellen anzustellen, bei denen neugeborene Tiere unter chronischer Hypoxie gehalten werden, wie bei Saini-Chohan et al.¹⁵⁶ an Schweinen. Zwar bilden diese Schweine nach kurzer Hypoxie-Phase eine rechtsventrikuläre Hypertrophie aus, jedoch sind diese und andere Tiermodelle^{122,127,217} allesamt an Neugeborenen durchgeführt worden und widersprechen nicht den hier präsentierten Ergebnisse bezogen auf fetale Schafe. Denn in der Literatur wird beschrieben, dass sich durch den Atemzug des Tieres bzw. Menschen der *Ductus arteriosus* durch verschiedenste Mechanismen physiologisch innerhalb weniger Stunden bzw. Tagen verschließt^{41,143}, sodass auch hier die Ergebnisse vergleichbar sind, z. B. bezogen auf die intrauterine Ligation vom *Ductus arteriosus*.

Die Frage, die sich in Bezug auf das vorliegende Modell stellt, ist, ob diese Nachlastsenkung über den *Ductus arteriosus* in den fetalen hypoxischen Schafen so effektiv war, dass es dadurch sogar zu signifikant erniedrigten Herzwand-Volumina kam, oder ob hier andere Mechanismen eine Rolle gespielt haben (s. Abb. 3-1). Dies konnte nicht abschließend geklärt werden.

Bei der präventiven Gabe von Vitamin C unter hypoxischen Bedingungen zeigten die fetalen Schafe ähnliche Herzwand-Volumina wie die normoxischen Schafe. Die adulten Schafe bildeten unter Vitamin-C-Therapie keine rechtsventrikuläre Hypertrophie aus (s. Abb. 3-2). Pathophysiologisch bleibt die Ausbildung des *Cor pulmonale* aus, da sich keine PH entwickelt. Nachfolgend wird diese näher diskutiert.

4.5 Effekt von Hypoxie und Vitamin C auf die molekularbiologischen Veränderungen in der Lunge

Es wird angenommen, dass bei der Ausbildung der PH ein Ungleichgewicht zwischen vasoaktiven und vasodilatativen Substanzen sowie zwischen proliferativen und anti-proliferativen Substanzen vorhanden ist. ROS, deren Ungleichgewicht auch als einer der Auslöser der PH diskutiert wird ^{136,191}, könnten mittels Vitamin C als Antioxidans reguliert werden. Um diese Hypothese auch darauf bezogen weiter zu erörtern, inwiefern dies im Modell der PPHN zu finden ist, wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden.

Es wurden 33 Gene ausgewählt, die bei der Ausbildung der PH eine Rolle spielen. Diese lassen sich zusammenfassen in Gene, die bei der Produktion sowie dem Abbau von ROS bzw. am NO-Signalweg und anderen Signalwegen beteiligt sind.

Nachfolgend wird zunächst der Effekt von Hypoxie auf die molekularbiologischen Veränderungen der Lunge diskutiert. In den adulten Schafen sind 10 der 33 untersuchten Gene unter Hypoxie reguliert. Diese Ergebnisse sind in der Hinsicht als interessant zu interpretieren, da die Schafe nach ihrer Geburt alle ohne Therapie unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen (s. Kap. 2.1). Zunächst werden die regulierten Gene diskutiert, die bei der Produktion von ROS beteiligt sind.

Die bedeutendsten Enzyme, die ROS produzieren können, sind NOX. In der vorliegenden Arbeit war die Expression von NOX1 in den adulten Schafslungen der hypoxischen Gruppe signifikant erhöht (s. Abb. 3-21). Die pulmonalen Gefäße exprimieren NOX1, 2, 4 und 5, wobei NOX5 nur im Menschen vorkommt ¹¹². Berkelhamer et al. ¹⁵ und Dennis et al. ³⁴ zeigten eine erhöhte Expression von NOX1 in neonatalen Mäusen bzw. Schweinen mit PH. Veit et al. ¹⁹² und Yu et al. ²²⁰ diskutierten, ob NOX1 auch bei der Monocrotalin-induzierten PH eine Rolle spielt. In der Übersichtsarbeit von Bedard et

al.¹¹ wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Expression von NOX1 in den Gefäßen durch PDGF, Prostaglandin $F_{2\alpha}$, EGF und Angiotensin II stimuliert wird, die wiederum werden unter der Hypoxie u. a. durch den HIF-Signalweg exprimiert⁷¹.

Ein weiteres Enzym, das, neben vasodilatativ wirkendem NO, ROS produzieren kann, ist die eNOS. In den adulten Schafslungen der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression von NOS3 (eNOS) in der Hypoxie-Gruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 3-22). Wedgwood et al.²⁰² beschrieben in diesem Zusammenhang, dass eine erhöhte NOX-Aktivität den entscheidenden Trigger darstellen könnte, weshalb NOS3 sich entkoppelt. Die Entkopplung beschreibt einen Zustand, wo NOS3 (anstelle von NO) ROS in Form von O_2^- produziert. Die bedeutendsten Co-Faktoren von NOS3 sind das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) und Tetrahydrobiopterin (BH4). O_2^- reagiert mit NO zu ONOO⁻, das die Verfügbarkeit von HSP90 verringert^{181,201} sowie BH4 abbaut^{163,197}. Der Mangel an diesen Co-Faktoren führt ebenfalls zu einer Entkopplung von NOS3. Überschreitet also die Entkopplung eine Schwelle, unterhält sie sich von alleine: ein *Circulus vitiosus*⁵⁴.

Ein weiterer Ort, wo ROS entstehen können, sind die Mitochondrien¹³⁶. Brookes et al.²⁰ beschrieben, dass ein Ungleichgewicht des Ca^{2+} -Haushalts (s. TRPC1, S. 94) zu einer Störung der mitochondrialen Atmungskette und der einzelnen Atmungskomplexe führt und dies der zentrale Trigger für die mitochondriale ROS(mROS)-Produktion ist, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht analysiert wurde. Rathore et al.¹⁴⁹ konnten jedoch zeigen, dass die mitochondriale ROS die NOX1-Aktivität in den PASMC triggern kann, sodass noch mehr ROS durch NOX1 produziert wird. Somit könnten NOX1 und NOS3, die in den adulten Schafen eine signifikant erhöhte Expression zeigen, die Produktionsstellen von ROS in diesem Tiermodell der PPHN darstellen.

Als nächstes sollen die Gene diskutiert werden, die beim Abbau von ROS beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten SOD 3.2 und GPX1 tendenziell höhere Expressionen in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe, was jedoch nicht signifikant war (s. Abb. 3-25, Abb. 3-26). Karlenius et al.⁸⁷ wiesen in ihrer Arbeit nach, dass oxidativer Stress über den Nrf2/ARE-Signalweg zur Expression von antioxidativen Genen wie SOD und GPX1 führt. In der Folge konvertiert SOD O_2^- zu H_2O_2 , das dann im nächsten Schritt von GPX1 zu 2 H_2O reduziert werden kann. In Studien wurde gezeigt, dass sich die Expression von SOD1 abhängig von der Dauer der Hypoxie verändert. So verringerte sich im Schafmodell die mRNA-Expression von SOD1 in den ersten Wochen

der Hypoxie, woraufhin ein Anstieg in den nächsten Wochen folgte¹⁶². Ebenso ist der Wirkmechanismus von CAT in der PH unklar, da die Expression beim Menschen mit PH nicht verändert ist^{84,113}. Die exogene Gabe von SOD oder CAT zeigte in unterschiedlichen Tiermodellen die Normalisierung von ROS^{49,200}. Die in der vorliegenden Arbeit tendenziell erhöhte Expression von SOD 3.2 und GPX ist dabei gestützt von der These von Karlenius et al.⁸⁷ durch das Vorliegen eines möglichen oxidativen Stresses in Form von ROS erklärbar.

Nachfolgend werden die regulierten Gene diskutiert, die in Zusammenhang mit der Vasokonstriktion und dem damit verbundenem NO-Signalweg sowie weiteren Signalwegen stehen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe eine signifikant höhere Expression von TRPC1 (s. Abb. 3-34). Malczyk et al.¹¹¹ konnten nachweisen, dass es vor allem bei der chronischen Hypoxie über TRPC1 zur Ausbildung/Triggerung einer PH kommt, hingegen spielt TRPC6 vor allem bei der akuten Hypoxie eine zentrale Rolle. Somit könnte TRPC1 auch in dem vorliegenden Modell der PPHN bedeutsam sein. Die TRPC1-Expression wird indes durch HIF reguliert¹⁶⁵. Durch die erhöhte Expression von TRPC1 kann vermehrt Ca^{2+} in die Zelle einströmen, sodass ein gestörter Ca^{2+} -Haushalt die mitochondriale ROS Bildung begünstigt.

Calcium, ist relevant für eine Vasokonstriktion und wird u. a. durch die TRPC reguliert. Die Vasokonstriktion bzw. -dilatation ist ein komplexer Mechanismus und wird durch verschiedene *Second Messenger* und Phosphodiesterasen (PDE) reguliert. In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich eine signifikant erhöhte Expression von PDE2A in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 3-29).

Für die Kontraktion von glatten Muskelzellen, wie sie in den Blutgefäßen vorkommen, wird die Myosin-leicht-Ketten-Kinase (MLCK) benötigt. Dieses Enzym führt durch die Phosphorylierung vom Myosin, in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration, zur Kontraktion der Zelle. Gegenstück der MLCK ist die Myosin-leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP), die eine Dephosphorylierung vom Myosin vornimmt, sodass sich die Zelle relaxiert⁸⁶. Diese Enzyme werden in ihrer Aktivität durch *Second Messenger* wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gesteuert. So konnten Murthy et al.¹²¹ und Offermanns et al.¹³⁰ zeigen, dass

cAMP, gebildet aus Adenosintriphosphat (ATP), die Aktivität von MLCK durch Proteinkinase A (PKA) inhibieren kann, sodass es zu einer verminderten Kontraktion kommt. Aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildetes cGMP hingegen kann die Aktivität von MLCP durch Proteinkinase G (PKG) steigern, sodass es zur vermehrten Relaxation kommt^{121,130}.

Dabei regulieren sich cAMP und cGMP u. a. allosterisch durch die Aktivierung von PDE. Von den bekannten 11 PDE-Typen können einige spezifisch cAMP oder cGMP abbauen. Andere PDE können cGMP und cAMP gleichermaßen gut abbauen¹⁹⁵. Dabei konnten Omori et al.¹³¹ zeigen, dass cGMP u. a. durch PDE2A abgebaut wird bzw. cAMP durch PDE2A und PDE4A. Durch den Abbau beider *Second Messenger* kommt es folglich zur vermehrten Vasokonstriktion. Auch ROS können die Aktivität von PDE steigern. Fetale PASMC vom Schaf, die H₂O₂ ausgesetzt wurden, zeigten dabei eine erhöhte Aktivität von PDE5 mit konsekutiver verminderter cGMP-Aktivität⁴⁸.

Weitere vasodilative Signalwege wie der NO-Signalweg könnten durch die möglicherweise vermehrte Bildung von ROS in ihrer Expression eingeschränkt sein. Ein essenzielles NO-produzierendes Enzym ist NOS3. Wie bereits oben erwähnt (s. S. 93) wird NOS3 bei vermehrter Expression von NOX1 und fehlenden/destabilisierten Co-Faktoren entkoppelt und kann somit selbst ROS produzieren. Daher würde dieses elementare Enzym für die Produktion von NO ausfallen. Das vorhandene NO reagiert zudem schnell mit O₂⁻ zu ONOO⁻, einer RNS. Somit würde NO fehlen, die über sGC den *Second Messenger* cGMP produziert und vasodilativ auf MLCP reagieren könnte⁹⁹.

Folglich könnte die vermehrte Vasokonstriktion durch die signifikante Expression von PDE2A, durch erhöhte ROS Konzentrationen bedingt sein. Zudem würde NO mit dem nachfolgendem Signalweg für die Vasorelaxation fehlen. All dies würde das vaskuläre *Remodeling* begünstigen.

Thenappan et al.¹⁸³ konnten beschreiben, dass für das vaskuläre *Remodeling* vermutlich ein Zusammenspiel aus Proliferation, Vasokonstriktion und Apoptose-Resistenz entscheidend ist. In den adulten Schafslungen der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression von Cytochrom C (CC) in der Hypoxie-Gruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 3-35). Der Austritt von CC aus den Mitochondrien ins Zytosol würde in der Zelle zur Einleitung der Apoptose führen. Eine erhöhte mROS-Bildung kann den Austritt von CC aus den Mitochondrien gemäß Madamachi et al. begünstigen¹⁰⁹. Hu et al.⁷⁸ jedoch

konnten zeigen, dass die Hypoxie mitochondriale Kalium-Kanäle öffnen kann, die den CC-Austritt und somit die Apoptose verhindern können, der als möglicher Signalweg für die Apoptose-Resistenz diskutiert wird. Da in der vorliegenden Arbeit das Lungenhomogenat im Gesamten untersucht wurde, kann dahingehend keine Aussage getroffen werden, ob die erhöhte Expression von CC in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe zytosolisch oder mitochondrial vorkommt und ob dies einen möglichen Signalweg für die Apoptose-Resistenz in den Schafen darstellt.

Dass in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe weiterhin hypoxische Bedingungen herrschen bzw. der HIF-Signalweg aktiviert ist, wird anhand der signifikant erhöhten EPO-Expression deutlich (s. Abb. 3-33). Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF- α nicht abgebaut und verbindet sich mit HIF- β . Im Nukleolus wird die Expression von EPO durch HIF aktiviert¹⁶⁵. Außerdem kann HIF die bereits beschriebenen Gene TRPC1¹⁶⁵ und NOX1⁷¹ aktivieren. Mitochondriale ROS und ROS können, gemäß Guzy et al.⁶⁸, auch den Abbau von HIF- α verhindern, indem sie die Aktivität von *prolylhydroxylase domain containing protein* (PHD) inhibieren. Die HIF- α -Untereinheit kann sich somit mit der HIF- β -Untereinheit zu HIF vereinen und infolgedessen auch den HIF-Signalweg aktivieren.

Zusammenfassend könnte die Hypoxie durch den HIF-Signalweg über verschiedene oben genannte Gene die vermehrte Bildung von ROS begünstigt, die vermehrte Vasokonstriktion und Apoptose-Resistenz gefördert sowie schließlich zum vaskulären *Remodeling* beigetragen haben. In der Literatur wird zwischen der akuten und chronischen Hypoxie unterschieden, wobei die damit einhergehende ROS-Produktion kontrovers diskutiert wird. Einerseits wird beschrieben, dass es in der akuten Hypoxie zur verminderten und in der chronischen Hypoxie zur vermehrten Bildung von ROS kommt. Andere Autoren*innen haben hingegen das Gegenteil ausgeführt, wonach es in der akuten Hypoxie zur vermehrten und in der chronischen zur verminderten Bildung von ROS kommt^{55,172,173,180,196}. Abschließend kann dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, da keine Konzentrationsmessungen von ROS durchgeführt wurden.

Nachfolgend finden sich mögliche Signalwege in den adulten Schafslungen der hypoxischen Gruppe unter der Hypothese, dass die chronische Hypoxie zur vermehrten Bildung von ROS geführt hat (s. Abb. 4-1).

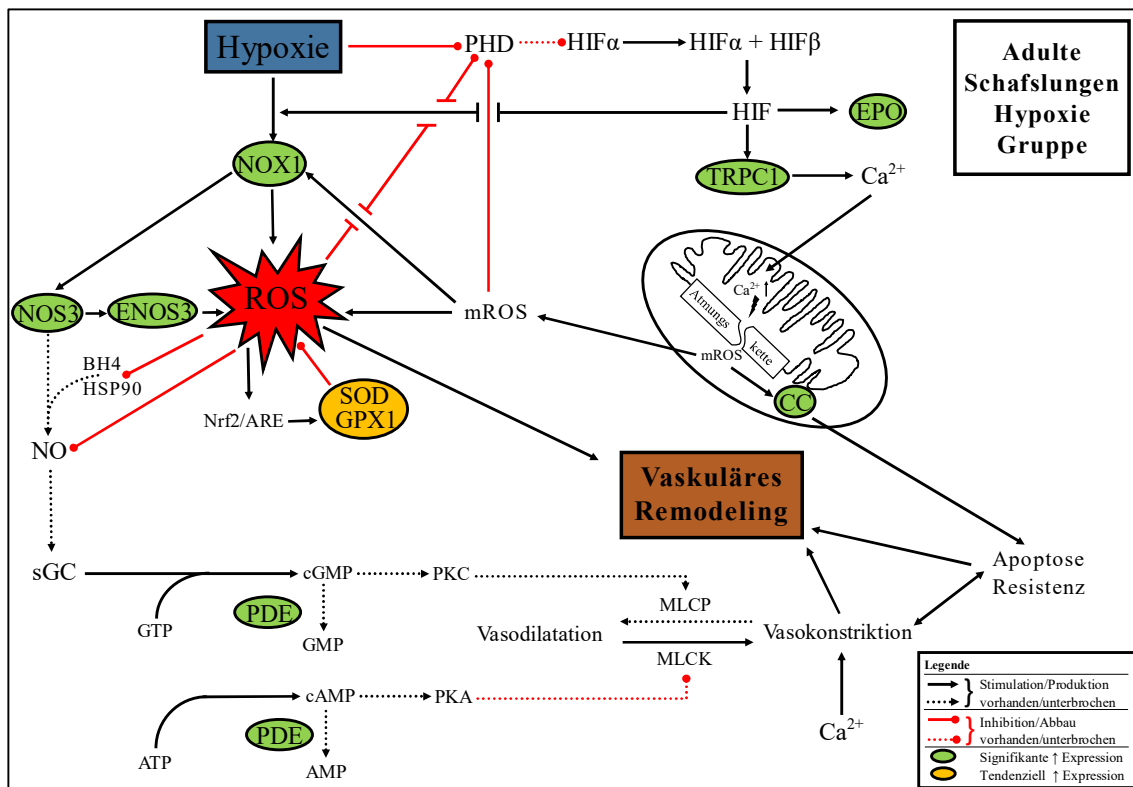


Abb. 4-1 Übersicht über den möglichen Signalweg in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe
 Hypoxie könnte die Aktivität von PHD gehemmt haben, sodass es durch die HIF α -HIF β Dimerisierung zur Aktivierung nachgeschaltete Signalkaskaden gekommen sein könnte, u. a. EPO, TRPC1 und über Zwischenschritte NOX1. Durch die vermehrte Expression von TRPC1 könnte vermehrt Ca²⁺ in die Zelle eingeströmt sein. Das Ungleichgewicht des Ca²⁺-Haushalts könnte zur Störung der mitochondrialen Atmungskette führen. Dadurch könnte vermehrt mROS aus den Mitochondrien freigesetzt worden sein, und es würde zur Störung des Cytochrom C-Signalweges kommen. Zudem könnten mROS sowie ROS die Aktivität von PHD hemmen. Außerdem könnte mROS die Aktivität von NOX1 gesteigert haben. NOX1 selbst könnte ROS produzieren sowie NOS3 zur Entkopplung triggern, sodass das entkoppelte NOS3 ebenfalls ROS produzieren würde. Die Entkopplung würde dabei durch die Hemmung/Abbau der Co-Faktoren von NOS3, BH4 und HSP90 gesteigert werden. Auch das Produkt von NOS3 (NO) würde durch ROS abgebaut werden. ROS würden über den Nrf2/ARE-Signalweg antioxidative Gene wie SOD und GPX1 aktivieren, die in diesem Modell in der Hypoxie tendenziell vermehrt exprimiert waren. Durch das Fehlen von NO würden weitere Signalwege unterbrochen worden. So würde sGC weniger cGMP herstellen, das über PKC die MLCP stimulieren würde, die zur Vasodilatation geführt hätte. Das vorhandene cGMP wiederum würde durch PDE abgebaut werden, wie auch cAMP. Dieses hätte sonst über PKA die MLCK gehemmt, sodass es zur verminderten Kontraktion gekommen wäre. Durch die fehlende Hemmung von MLCK und die fehlende Stimulierung von MLCP käme es zur vermehrten Vasokonstriktion. Für die Vasokonstriktion wäre dabei genügend Ca²⁺ vorhanden durch TRPC1. Die Vasokonstriktion im Zusammenspiel mit der Apoptose-Resistenz, die durch den möglichen fehlenden Übertritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien ausgelöst werden würde, endet schließlich im ROS-vermittelten vaskulären Remodeling.

PHD = prolylhydroxylase domain containing protein, HIF = Hypoxie-induzierter Faktor, EPO = Erythropoetin, TRPC = transient receptor potential cation channel, mROS = mitochondriale ROS, CC = Cytochrom C, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, NOX = NADPH-Oxidase, NOS3 = NO-Synthase 3, ENOS3 = entkoppelte NO-Synthase 3, BH4 = Tetrahydrobiopterin, HSP90 = Hitzeschockprotein 90, NO = Stickstoffmonoxid, SOD = Superoxiddismutase, GPX1 = Glutathionperoxidase; sGC = Soluble Guanylatzyklase, GTP = Guanositriphosphat, GMP = Guanositriphosphat, cGMP = cyclisches Guanositriphosphat, PKC = Proteinkinase C, ATP = Adenosintri-phosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA = Proteinkinase A, PDE = Phosphodiesterase, MLCP = Myosin-leicht-Ketten-Phosphatase, MLCK = Myosin-leicht-Ketten-Kinase.

Nachdem der Effekt von Hypoxie auf die adulten Schafe diskutiert wurde, soll im Folgenden die Auswirkung von Vitamin C während der Hypoxie auf die molekularbiologischen Veränderungen der adulten Schafslungen diskutiert werden.

Zunächst sind die an der Produktion von ROS beteiligten regulierten Gene zu diskutieren, auch in Hinblick darauf, wie diese verändert sind unter Hypoxie mit Vitamin-C-Therapie. Die Expression von NOX1 und NOS3 waren unter der Therapie von Vitamin C gegenüber der rein hypoxischen Gruppe in den adulten Schafslungen signifikant erniedrigt (s. Abb. 3-21, Abb. 3-22). Heller et al.⁷⁰ konnten nachweisen, dass Vitamin C den Co-Faktor von NOS3 (BH4) stabilisieren kann und somit dessen Abbau durch ROS verhindert. Ähnliche Ergebnisse beschrieben auch Baker et al.⁸, d'Uscio et al.⁴⁰ und Panday et al.¹³⁷. Durch diese Arbeiten könnte auch erklärt werden, weshalb die Vitamin-C-Therapie in der normoxischen Gruppe der adulten Schafe eine signifikant erhöhte Expression von NOS3 zeigte, verglichen mit der normoxischen Gruppe mit NaCl-Gabe (s. Abb. 3-22). Mit der Stabilisierung von BH4 durch Vitamin C könnte die Expression/Aktivität von NOS3 unter normoxischen Bedingungen bereits erhöht worden sein.

Durch die Stabilisierung von NOS3 könnte nun vermehrt NO produziert werden. Außerdem kann Vitamin C als Antioxidans vorhandenes ROS wie O_2^- reduzieren, sodass dieses nicht mit NO zu $ONOO^-$ reagieren kann. Plesková et al.¹⁴² konnten wiederum feststellen, dass NO sowohl die Expression als auch die Aktivität von NOX1 in renalen Mesangiumzellen vermindern kann, was in ähnlicher Form auch Qian et al.¹⁴⁵ nachwies. Dabei kann NO mittels Nitrosylierung (einer posttranslationalen Modifikation) die Aktivität von NOX vermindern, was vor allem bei NOX1 und in absteigender Reihenfolge bei NOX5 und NOX2 erfolgt. Die verminderte Expression/Aktivität von NOX1 könnte somit auch die Entkopplung von NOS3 verhindern. Die bedeutendsten ROS-Produktionsstellen in der vorliegenden Arbeit könnten somit durch die Gabe von Vitamin C herunterreguliert worden sein.

Als nächstes werden die regulierten Gene diskutiert, die beim Abbau von ROS beteiligt sind, wiederum bezogen auf deren Veränderung unter der Hypoxie mit Vitamin-C-Therapie. Antioxidative Gene, SOD 3.2 und GPX1, waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter der Vitamin-C-Therapie gegenüber der rein hypoxischen Gruppe signifikant erniedrigt (s. Abb. 3-25, Abb. 3-26). In der Literatur findet sich bisher keine Arbeit, in der der Einfluss von Vitamin C auf antioxidative Gene im Zusammenhang mit PH/PPHN aufgezeigt wird. Rodrigues et al.¹⁵² untersuchten die Expression von SOD und Katalase

in fibrotischen Lungen, was durch ein Herbizid induziert wurde. Hierbei zeigten die fibrotischen Lungen der Mäuse eine erhöhte Expression von Katalasen, jedoch nicht von SOD. Beide Gene waren jedoch unter der Vitamin-C-Therapie in ihrer Aktivität signifikant erhöht und verhinderten so die Ausbildung der Fibrose. Albokhadaim et al. ⁶ untersuchten des Weiteren an Hühnern die Auswirkung von Stress in Form von Hitze. Infolgedessen litten diese an oxidativem Stress und damit verbundener Bildung von ROS. Als Resultat konnte eine gesteigerte Aktivität von SOD, GPX und CAT nachgewiesen werden. Jedoch verhinderte die Substitution von Vitamin C die genannte Aktivitätssteigerung.

Somit werden in der Literatur verschiedene Expressionsmuster der antioxidativen Gene beschrieben, zum Teil mit einer Expressionssteigerung unter Vitamin-C-Therapie ¹⁵² sowie teilweise einer Normalisierung der antioxidativen Gene unter gleichen Bedingungen ⁶. Aufgrund fehlender vergleichbarer Studien lässt sich hier nur vermuten, wie SOD und GPX in diesem Zusammenhang wirken. In der vorliegenden Arbeit ist die Hypothese aufzustellen, dass die Vitamin-C-Gaben unter hypoxischen Bedingungen einen antioxidativen Effekt haben könnten und folglich die antioxidativen Gene nicht reguliert werden. Unterstützend dafür ist anzuführen, dass die reine Substitution von Vitamin C in der normoxischen Gruppe in den Schafen zu keiner vermehrten Expression der antioxidativen Gene führte. Diese Hypothese stellten auch Albokhadaim et al. ⁶ in ihrer Studie mit Hühnern auf.

Nachfolgend werden die regulierten Gene diskutiert, die in Zusammenhang mit dem HIF-Signalweg, der Vasokonstriktion und dem damit verbundenem NO-Signalweg sowie weiteren Signalwegen stehen, wieder bezogen auf entsprechende Veränderungen unter der Hypoxie mit Vitamin-C-Therapie.

Vitamin C kann als Co-Faktor von PHD dessen Aktivität steigern, sodass vermehrt HIF-1 α abgebaut wird ⁸⁵. Durch diesen Schritt könnten zahlreiche HIF-induzierte Signalwege unterbunden werden. EPO als HIF-induziertes Gen sowie TRCP1 und NOX1 waren dabei in ihrer Expression durch die Gabe von Vitamin C signifikant erniedrigt gegenüber der rein hypoxischen Gruppe (s. Abb. 3-21, Abb. 3-33, Abb. 3-34). Durch die verminderte Expression von TRPC1 könnte der Ca²⁺-Einstrom verringert und somit eine geringere Vasokonstriktion vorliegen ¹¹¹. Außerdem ergibt sich an dieser Stelle wahrscheinlich kein Ungleichgewicht im Ca²⁺-Haushalt, sodass auch die mitochondriale Atmungskette und die Expression von CC nicht gestört werden. In der vorliegenden

Arbeit war die CC-Expression unter Vitamin C signifikant erniedrigt gegenüber der rein hypoxischen Gruppe (s. Abb. 3-35) und somit vergleichbar zu der der normoxischen Gruppe, sodass CC nicht zur vermuteten Apoptose-Resistenz führen würde^{78,109}. Die Relaxation der glatten Muskelzellen könnte, neben dem verringertem Ca^{2+} Einstrom, durch die Regulation von PDE unterstützt worden sein. PDE verstärken durch ihren Abbau von *Second Messengern* die Vasokonstriktion⁸⁶. Unter Vitamin-C-Therapie war die Expression von PDE2A und PDE4A signifikant gegenüber der rein hypoxischen Gruppe reduziert (s. Abb. 3-29, Abb. 3-30). Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Arbeit von Farrow et al.⁴⁸. Dort war die erhöhte PDE5-Expression in fetalen PASMC von Schafen durch ROS in Form von H_2O_2 unter dem chemischen Antioxidans N-Acetylcystein signifikant supprimiert. Vitamin C könnte als Antioxidans in der vorliegenden Arbeit ROS eliminiert haben, sodass die Expression von PDE verringert wurde und die *Second Messenger* cAMP und cGMP durch Proteinkinase A und C die Relaxation der glatten Muskelzellen initiierten.

Zusammenfassend könnte Vitamin C in diesem Modell der PPHN in den hypoxischen Schafen, als Modulator von Genen, durch Stabilisierung anderer Co-Faktoren, sowie als Antioxidans, die Bildung von ROS verhindert bzw. eliminiert haben. Das vaskuläre *Remodeling* in den adulten Schafen bleibt demnach aus. Nachfolgend finden sich mögliche Signalwege in den adulten Schafslungen der hypoxischen Gruppe mit Vitamin-C-Therapie, die hier diskutiert wurden (s. Abb. 4-2).

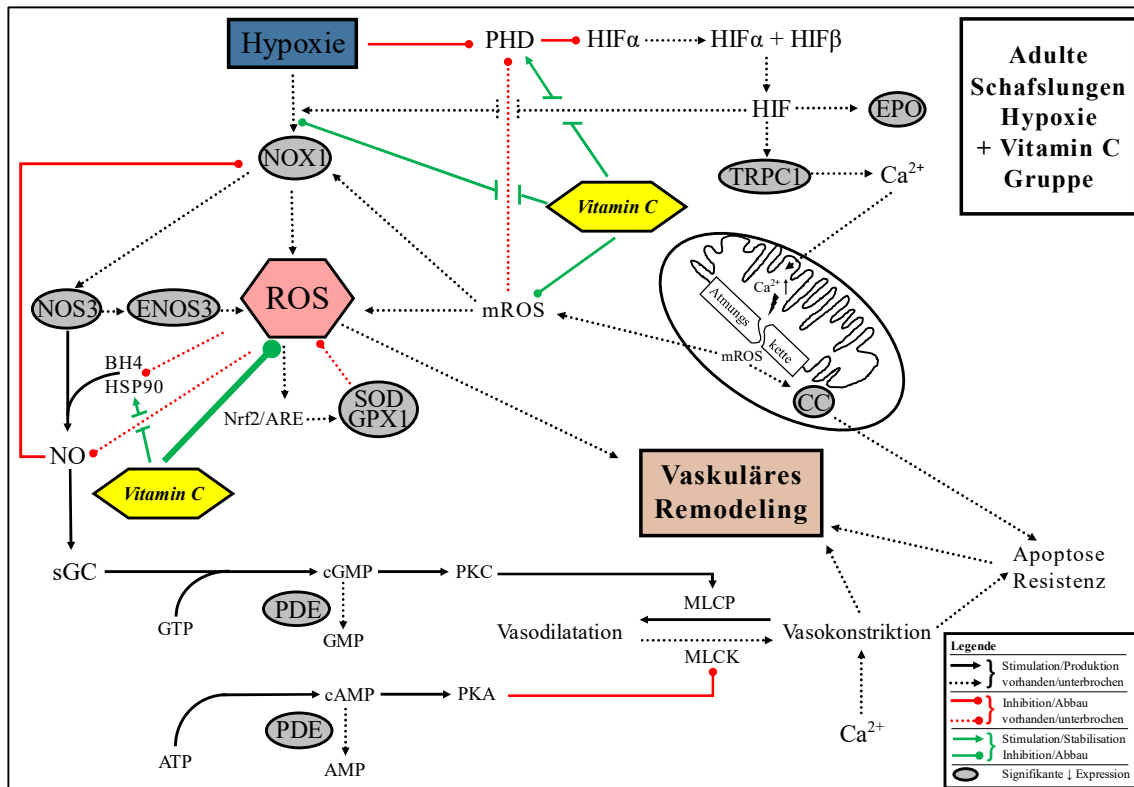


Abb. 4-2 Übersicht über den möglichen Signalweg in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe mit Vitamin-C-Therapie

Vitamin C als Radikalfänger würde hauptsächlich die freien ROS eliminieren, die durch die Hypoxie gebildet werden würden. Aufgrund der fehlenden ROS würden die Co-Faktoren von NOS3 nicht destabilisiert/abgebaut werden, und NO würde nicht zu ONOO⁻ reagieren. Auch der Nrf2/ARE-Signalweg zur Produktion von antioxidativen Genen wie SOD und GPX1 würde in diesem Zusammenhang nicht stimuliert werden. Des Weiteren würde Vitamin C den Co-Faktor BH4 stabilisieren und damit zur Aktivitätssteigerung von NOS3 beitragen. Außerdem würde Vitamin C die Aktivität von PHD stimulieren, sodass trotz Hypoxie HIFα (PHD-vermittelt) abgebaut werden würde. Es käme dabei nicht zur Aktivierung vom HIF-Signalwegs, wie es hier in der signifikant verminderten Expression von EPO, TRPC1, sowie über Zwischenschritte von NOX1 sichtbar war. Durch die verminderte Expression von TRPC1 käme es vermutlich auch nicht zum Ungleichgewicht im Ca²⁺-Haushalt, sodass die Atmungskette nicht gestört und es somit zu keinem Austritt von mROS und Cytochrom C käme. Vorhandenes mROS könnte zudem durch Vitamin C eliminiert werden. Durch die verminderte Expression von NOX1 würde NOS3 nicht entkoppelt werden, sodass dieses mit den stabilisierten Co-Faktoren NO produzieren könnte. NO wiederum könnte die Expression von NOX1 hemmen. Nachfolgend würde NO-vermittelt über sGC, cGMP produziert werden, das über PKC die MLCP stimulieren würde, die eine Vasodilatation verursachen könnte. Diese würde außerdem durch Hemmung der MLCK über den cAMP-PKA-Signalweg verstärkt werden. Die Second Messenger würden dann nicht vermehrt durch PDE abgebaut werden. Durch die fehlende Vasokonstriktion sowie die Apoptose-Resistenz würde das vaskuläre Remodeling ausbleiben.

PHD = prolylhydroxylase domain containing protein, HIF = Hypoxie-induzierter Faktor, EPO = Erythropoetin, TRPC = transient receptor potential cation channel, mROS = mitochondriale ROS, CC = Cytochrom C, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, NOX = NADPH-Oxidase, NOS3 = NO-Synthase 3, ENOS3 = entkoppelte NO-Synthase 3, BH4 = Tetrahydrobiopterin, HSP90 = Hitzeschockprotein 90, NO = Stickstoffmonoxid, SOD = Superoxiddismutase, GPX1 = Glutathionperoxidase; sGC = Soluble Guanylatzyklase, GTP = Guanositriphosphat, GMP = Guanosinmonophosphat, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKC = Proteinkinase C, ATP = Adenosintri-phosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA = Proteinkinase A, PDE = Phosphodiesterase, MLCP = Myosin-leicht-Ketten-Phosphatase, MLCK = Myosin-leicht-Ketten-Kinase.

Nachfolgend wird der Effekt von Hypoxie auf die molekularbiologischen Veränderungen der fetalen Schafslungen diskutiert. In diesen waren 0 der 33 untersuchten Gene unter Hypoxie bzw. Hypoxie mit Vitamin C reguliert. Angesichts der deutlichen histologischen Veränderungen unter Hypoxie und der Therapie von Vitamin C stellt sich hier die Frage, ob die Ausbildung der PPHN in den Feten außerhalb dieser untersuchten 33 Gene reguliert wird. Nicht alle Gene, die in adulten Lungen reguliert sind, können auf die fetalen Lungen übertragen werden. So zeigten Wedgwood et al.¹⁹⁹, dass die Expression von NOX1 in den fetalen Schafslungen mit PPHN nicht erhöht ist. Jedoch ist eine erhöhte Expression von NOX1 in adulten Lungen gut beschrieben²⁰². Außerdem sollte an dieser Stelle betont werden, dass hier ein neues Tiermodell für die PPHN etabliert wurde, die keine Manipulation am *Ductus arteriosus* beinhaltet. Daher sind die gewonnenen Erkenntnisse aus bisherigen Tiermodellen der PPHN nur begrenzt übertragbar. Aber auch andere Faktoren wie methodische Fehler bei der Lungenfixierung sollten diskutiert werden. Wie bereits in Kap. 4.1 erörtert, könnte z. B. Restfruchtwasser in den Lungen der fetalen Schafe^{81,114} zur unzureichenden Fixierung geführt haben, was abschließend nicht geklärt werden konnte.

4.6 Weiterführende Untersuchungen

Um die mRNA-Expressionsanalyse weiter zu verifizieren, wurde eine LMD durchgeführt. Dabei wurden Pulmonalgefäße dissektiert, um die mRNA-Expression spezifisch in diesem Kompartiment untersuchen zu können.

Die mRNA-Expression von NOS3 war in den Pulmonalgefäßen nicht signifikant durch Hypoxie oder Vitamin-C-Gabe verändert. Eine visuelle Auswertung der Antikörperfärbung gegen NOS3 zeigte, dass unter Hypoxie ein stärkeres Signal in den Bronchien und ein etwas schwächeres im Endothel der Pulmonalgefäßen zu finden war (s. Abb. 3-37, Abb. 3-38). Die Lokalisation von NOS3 im Epithel der Bronchien und/oder im Endothel der pulmonalen Gefäße wurde bereits in mehreren Spezies beschrieben^{10,43,139,222} und bestätigt daher die Beobachtungen (Lokalisation von NOS3 im Epithel der Bronchien und Endothel der Pulmonalgefäße) in dieser Arbeit. Das stärkere Signal in den Bronchien könnte (als mögliche Hypothese) eine parakrine Wirkung auf die Pulmonalgefäße haben. Bronchien, die in diesem Fall womöglich als Sensorzellen fungieren, könnten dabei über parakrine Signalkaskaden das vaskuläre *Remodeling* in den Gefäßen aufrechterhalten bzw. initiieren.

Ähnliche Untersuchungen wurden schon in Hinblick auf das Krankheitsbild der COPD ⁹³, aber auch bei der PPHN ⁹⁸ durchgeführt. In diesen Studien wurde das Expressionsverhalten von VEGF und dessen dazugehörigem Rezeptor untersucht. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass VEGF vermehrt in den Bronchien bzw. der VEGF-Rezeptor verstärkt in den Gefäßen vorzufinden ist.

Mögliche parakrine Wirkungen zwischen Endothelzellen und den PASMC wurden von Gao et al. analysiert. Hierbei wurden die verschiedenen vasoaktiven Stoffe wie NO und ET-1 untersucht, die über parakrine Wirkung die Aktivität der PASMC beeinflussen, ausgeschüttet durch die Endothelzellen ⁵⁹. Auch in einer jüngsten Publikation der Arbeitsgruppe Weißmann wurde ein solcher parakriner Wirkmechanismus beobachtet. In diesem Fall induzierte die Sekretion eines marizellulären Proteins aus den Endothelzellen die Proliferation der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen ¹⁹³.

Die Ergebnisse der genannten Studien sowie die Resultate der LMD und Antikörperfärbung aus der vorliegenden Arbeit zeigen interessante Ansätze auf, um das Krankheitsbild der PH (hier der PPHN) besser zu verstehen und zu therapieren. So könnten bestimmte Medikamente besser über die Luft und andere besser über das Blut wirken.

5 **Ausblick**

Ausgehend von den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit sollten weitere Untersuchungen folgen. So sollte im vorliegenden Tiermodell einerseits die minimale Vitamin C Konzentration eruiert werden, die intravenös appliziert werden muss um den gewünschten Effekt in den Schafslungen unter Hypoxie zu erzielen. Dabei sollten besonders Systeme außerhalb des kardiopulmonalen Systems betrachtet werden, dies in Hinblick auch auf die mögliche prooxidative Wirkung vom Vitamin C. Andererseits sollten Untersuchungen folgen in der die fetalen Schafe eine längere Zeit Hypoxie ausgesetzt werden (bisher nur im letzten Drittel der Schwangerschaft) und in weit dies die histologischen und molekularbiologischen Ergebnisse verändert. Wie schon in Kap. 4.2 beschrieben, stellt dieses Modell zielführender die *in vivo* Verhältnisse dar, sodass sich dies besser auf den Menschen übertragen lässt. Ausgehend von einem permanenten Venenverweilkatheter, den die maternalen Schafe im Versuchsaufbau hatten, könnten verschiedenste Parameter im Blut bestimmt und analysiert werden, unter anderem die Halbwertszeit von Vitamin C.

In weiteren Untersuchungen sollte die Muskularisierung der peripheren Pulmonalgefäße eruiert werden. Die bereits beschriebenen unterschiedlichen Muskularisierung von peripheren Pulmonalgefäßen in Schafslungen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Demnach sollte geklärt werden, ob sich die hier beschriebenen Ergebnisse wiederholen lassen und ob dies durch das hier beschriebene Tiermodell zu erklären ist, bei dem keine Manipulation am *Ductus arteriosus* durchgeführt wird, was bisher etabliert war. Zudem ist zu klären, ob sich die Ergebnisse der Muskularisierung in Bezug auf die angewandte Methodik unterscheiden, die hier kolorimetrisch-spektrometrisch war und in anderen Arbeiten rein visuell getroffen wurde (s. Kap. 4.3).

Da mit den molekularbiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Übersicht über bzw. ein Einblick in die bekannten Signalwege vermittelt werden sollte, könnte in nachfolgenden Arbeiten die Anzahl der Schafe pro Gruppe erhöht werden, wobei die untersuchten Signalwege zu komplettieren wären. Insbesondere sollte mittels *Western Blot* die Regulation auf Proteinebene untersucht werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei den fetalen Schafslungen, wo keine signifikanten Ergebnisse zu beobachten waren. Ebenso sollten weitere LMD-Untersuchungen und Antikörperfärbungen erfolgen, um die Expression in den Bronchien zu analysieren, damit

weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel zwischen Bronchien und Gefäßen ermittelt werden können.

Zuletzt sollten die Konzentrationen von ROS und Vitamin C im Lungengewebe bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde u. a. angenommen, dass Vitamin C seine bekannteste Aufgabe als Radikalfänger wahrnimmt und so durch die Minimierung der ROS die Ausbildung und Persistenz der PH unterbindet. Diese Eliminierung von ROS im Lungengewebe gilt es demnach in weiteren Untersuchungen nachzuweisen. In diesem Zuge könnten auch zusätzliche Experimente folgen, in denen das Zusammenspiel von Vitamin C und Vitamin E genauer betrachtet wird, was bereits in der Einleitung erläutert wurde.

6 Zusammenfassung

Die persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN) stellt eine schwerwiegende Lungenerkrankung des Neugeborenen dar. Dabei wird die chronische fetale Hypoxie als zweithäufigste Ursache aufgezählt, wobei dies nur unzureichend in den bisher etablierten Tiermodellen untersucht worden ist. Ziel dieser Arbeit war es demnach, durch chronische fetale Hypoxie induzierte pulmonalvaskuläre Veränderungen sowie deren mögliche Reversibilität durch Vitamin C zu charakterisieren. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass eine chronische Hypoxie-Exposition im letzten Drittel der Schwangerschaft eine PPHN in fetalen Schafen induzierte. Diese PPHN persistierte auch nach der Geburt in adulten Schafen, die unter normoxischen Bedingungen aufwuchsen. Infolge der fetalen Hypoxie kam es zu einer Wandstärkenzunahme der Pulmonalgefäße. Vermutlich führt dies zu einem erhöhten pulmonal-arteriellen Widerstand mit einer Nachlasterhöhung im rechten Ventrikel. Tatsächlich wiesen die adulten Schafe eine rechtsventrikuläre Hypertrophie auf und bildeten so ein *Cor pulmonale* aus. Somit sind die hier beschriebenen Ergebnisse vergleichbar mit denen, bisher etablierten Methoden zur Ausbildung der PPHN. Lediglich der Muskularisierungsgrad der peripheren Pulmonalgefäße unterschied sich mit Blick auf andere Studien. In den adulten Schafslungen konnten verschiedene Signalwege identifiziert werden, anhand derer die persistierende PPHN erklärt werden könnte. Dabei lassen sich reaktive Sauerstoffspezies (ROS), als mögliches Schlüsselement vermuten. Gene, die ROS produzieren oder abbauen können, Gene des HIF-Signalweges sowie Gene, die bei der Kontraktion/Relaxation der Pulmonalgefäße beteiligt sind, sind in ihren Expressionen verändert. Zusätzlich zeigte sich eine mögliche mitochondriale Beteiligung bei der Entstehung der PPHN. Wie genau diese in adulten Schafen persistierenden Mechanismen in den fetalen Schafen reguliert wurden, konnte jedoch nicht aufgezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen an lasermikrodissezierten Gefäßen sowie Antikörperfärbungen zeigten eine mögliche parakrine Aktivität der Bronchien, die das vaskuläre *Remodeling* der Pulmonalgefäße verstärkt / initiiert haben könnten. Vitamin C könnte als Radikalfänger in die Dysbalance der vasoaktiven Substanzen eingegriffen haben und unter der Eliminierung von ROS das Gleichgewicht wiederherstellt haben. Die pränatale Vitamin-C-Gabe verhinderte die Ausbildung der PPHN sowohl in den fetalen als auch heranwachsenden adulten Schafen, das sich anhand der stereologischen, histologischen und molekularbiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen lässt und scheint in dem hier vorliegenden Modell somit protektiv zu wirken.

7 Summary

Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) is a serious lung disease affecting newborns. Chronic fetal hypoxia is listed as the second most common cause of PPHN, although this has only been insufficiently investigated in the animal models established to date. The aim of this work was to characterize pulmonary vascular changes induced by chronic fetal hypoxia and their potential reversibility by vitamin C. The present thesis shows that chronic hypoxia exposure in the last trimester of pregnancy induced PPHN in the fetal sheep. This PPHN persisted after birth in the adult sheep growing up under normoxic conditions. The wall thickness of pulmonary vessels increased as a result of fetal hypoxia. This may lead to an increased pulmonary arterial resistance and concomitantly increased afterload of the right ventricle. This suggestion is supported by the fact of the presence of right ventricular hypertrophy and *Cor pulmonale*. The results described here are comparable with the previously established models of PPHN. Except the degree of muscularization of the peripheral pulmonary vessels differed from previous studies. Potential dysregulation of various signaling involved in PH pathogenesis were screened in sheep model of PPHN. Reactive oxygen species (ROS) are assumed to be a possible key element. Genes involved in ROS homeostasis, HIF signaling, and PASMC contraction and relaxation were expressed differently. Moreover, there was evidence that mitochondria might be involved in the model of PPHN in sheep. How exactly these persistent mechanisms in adult sheep were regulated in fetal sheep was, unfortunately, not identified. Further investigations on laser microdissected vessels and antibody staining revealed a possible paracrine activity in the bronchi, which might have induced or triggered pulmonary vascular remodeling. As a scavenger of free radicals, vitamin C possibly restored the imbalance of vasoactive substances by eliminating ROS. The protective effect of prenatal vitamin C administration prevented the formation of PPHN in both, fetal and adult sheep, which was proven by the stereological, histological, and molecular biological results in the present study.

8 Verzeichnis

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Katalase
CC	Cytochrom C
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Ct	<i>cycle of threshold</i>
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CYC C	Cyclophilin C
d	Tag
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
EDN1	Endothelin-1
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ENOS3	entkoppelte NO-Synthase 3
EPO	Erythropoetin
ET-1	Endothelin-1
GPX1	Glutathionperoxidase
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O	Wasser

Verzeichnis

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
Hox	Hypoxie
HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HSP90	Hitzeschockprotein 90
KCNB1	Kv (spannungsabhängiger Kalium) - Kanal 2.1
kg	Kilogramm
l	Liter
LMD	Lasermikrodissektion
MAS	Mekoniumaspirationssyndrom
mg	Milligramm
min	Minuten
MLCK	Myosin-leicht-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leicht-Ketten-Phosphatase
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mPAP	<i>mean pulmonary arterial pressure</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mROS	mitochondriale ROS
MW	Mittelwert
N	Anzahl an Tieren
n	Anzahl an Gefäßen
NaCl	Kochsalz
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOS3	NO-Synthase 3
NOX	NADPH-Oxidase
Nox	Normoxie
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion

Verzeichnis

ONOO ⁻	Peroxynitrit
P4HA	<i>prolyl-4-hydroxylase alpha</i>
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PASMC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cells</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase
PH	pulmonale Hypertonie
PHD	<i>prolylhydroxylase domain containing protein</i>
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PPHN	persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROCK	Rho-Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPS18	Ribosomales Protein S18
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
Std	Stunden
TRPC	<i>transient receptor potential cation channel</i>
UCP	<i>uncoupling protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VitC	Vitamin C
vWF	von-Willebrand-Faktor
XDH	Xanthin Dehydrogenase

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Zelluläre und molekulare Mechanismen des vaskulären Remodeling.....	7
Abb. 2-1 Grafische Darstellung des Versuchsablaufes	15
Abb. 2-2 Aufbau der Hypoxie-Kammern	16
Abb. 2-3 Exemplarische, histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades eines peripheren Pulmonalgefäßes des adulten Schafes.....	30
Abb. 2-4 Exemplarische, histologische Darstellung der Muskularisierung eines Gefäßes in der Schaf-Milz und -Niere	30
Abb. 2-5 Primer-Optimierung für die qPCR im Lungenhomogenat von fetalen Schafen	38
Abb. 2-6 Primer-Optimierung für die qPCR im Lungenhomogenat von adulten Schafen	39
Abb. 2-7 Non-template Kontrolle der qPCR.....	40
Abb. 3-1 Bestimmung des rechtsventrikulären Herzwand-Volumens der fetalen Schafe mittels stereologischer Untersuchungen.....	43
Abb. 3-2 Bestimmung des rechtsventrikulären Herzwand-Volumens der adulten Schafe mittels stereologischer Untersuchungen.....	44
Abb. 3-3 Grafische und histologische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 0–69 µm	46
Abb. 3-4 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 70–99 µm	47
Abb. 3-5 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie > 100 µm.....	47
Abb. 3-6 Grafische und histologische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 0–69 µm	49
Abb. 3-7 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 70–99 µm	50
Abb. 3-8 Grafische Darstellung der medialen Wandstärke von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie > 100 µm	50
Abb. 3-9 Grafische und histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 0–69 µm	52
Abb. 3-10 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie 70–99 µm	53

Abb. 3-11 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des fetalen Schafes, Kategorie > 100 µm.....	53
Abb. 3-12 Grafische und histologische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 0–69 µm	55
Abb. 3-13 Grafische Darstellung des von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie 70–99 µm	56
Abb. 3-14 Grafische Darstellung des Muskularisierungsgrades von peripheren Pulmonalgefäßen des adulten Schafes, Kategorie > 100 µm	56
Abb. 3-15 Kollagen um die Gefäße bei den fetalen Schafen nach Trichromfärbung.....	57
Abb. 3-16 Übersicht über die Kollagenverteilung bei den fetalen Schafslungen	59
Abb. 3-17 Kollagen um die Gefäße bei den adulten Schafen nach Trichromfärbung	60
Abb. 3-18 Übersicht über die Kollagenverteilung bei den fetalen Schafslungen	62
Abb. 3-19 Grafische Darstellung der mittleren mRNA-Expression der Referenzgene RPS18 und CycC.....	63
Abb. 3-20 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-produzierenden Proteinen in den fetalen Schafslungen.....	65
Abb. 3-21 mRNA-Expression von NOX1 in adulten Schafslungen.....	65
Abb. 3-22 mRNA-Expression von NOS3 in adulten Schafslungen.....	66
Abb. 3-23 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-produzierenden Proteinen in den adulten Schafslungen.....	67
Abb. 3-24 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-abbauenden Proteinen in den fetalen Schafslungen.....	68
Abb. 3-25 mRNA-Expression von SOD3, Transkriptionsvariante 2, in adulten Schafslungen	69
Abb. 3-26 mRNA-Expression von GPX1 in adulten Schafslungen.....	69
Abb. 3-27 Übersicht der mRNA-Expression von ROS-abbauenden Proteinen in den adulten Schafslungen.....	70
Abb. 3-28 Übersicht der mRNA-Expression von am NO-Signalweg beteiligten Genen in den fetalen Schafslungen	72
Abb. 3-29 mRNA-Expression von PDE2A in adulten Schafslungen	73
Abb. 3-30 mRNA-Expression von PDE4A in adulten Schafslungen	73
Abb. 3-31 Übersicht der mRNA-Expression von am NO-Signalweg beteiligten Genen in den adulten Schafslungen	75

Abb. 3-32 Übersicht der mRNA-Expression von Genen in den fetalen Schafslungen, die in der PH dysreguliert sind.....	77
Abb. 3-33 mRNA-Expression von EPO in adulten Schafslungen.....	77
Abb. 3-34 mRNA-Expression von TRPC1 in adulten Schafslungen.....	78
Abb. 3-35 mRNA-Expression von CC in adulten Schafslungen	79
Abb. 3-36 Übersicht der mRNA-Expression von Genen in den adulten Schafslungen, die in der PH dysreguliert sind.....	80
Abb. 3-37 mRNA-Expression von NOS3 aus der LMD der adulten Schafslungen	81
Abb. 3-38 Antikörperfärbung gegen NOS3 in adulten Schafslungen.....	82
Abb. 4-1 Übersicht über den möglichen Signalweg in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe.....	97
Abb. 4-2 Übersicht über den möglichen Signalweg in den adulten Schafslungen der Hypoxie-Gruppe mit Vitamin-C-Therapie.....	101

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Nizza-Klassifikation (2018) der PH	4
Tab. 2-1 Gruppenkonstellation der Versuchstiere.....	16
Tab. 2-2 Materialien für die Histologie – Geräte	17
Tab. 2-3 Materialien für die Histologie – Verbrauchsmaterialien/-chemikalien	17
Tab. 2-4 Materialien für die Histologie – Kits	20
Tab. 2-5 Materialien für die Histologie – Antikörper	20
Tab. 2-6 Materialien für die Histologie – Software	21
Tab. 2-7 Materialien für die Molekularbiologie – Geräte.....	22
Tab. 2-8 Materialien für die Molekularbiologie – Verbrauchsmaterialien/- chemikalien	23
Tab. 2-9 Materialien für die Molekularbiologie – Kits.....	24
Tab. 2-10 Materialien für die Molekularbiologie – Primer.....	24
Tab. 2-11 Materialien für die Molekularbiologie – Software	25
Tab. 2-12 Protokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung	27
Tab. 2-13 Protokoll der Trichrom-Färbung.....	27
Tab. 2-14 Protokoll der Doppelfärbung α -Aktin und vWF.....	28
Tab. 2-15 Protokoll der Einfachfärbung – NOS3	30
Tab. 2-16 Liste der verwendeten Primer für die qPCR.....	34
Tab. 2-17 Zusammensetzung des Mastermixes	37

Tab. 2-18 Temperaturprofil der qPCR	37
Tab. 2-19 Statistische Auswertung der fetalen Schafslungen – Histologie	42
Tab. 2-20 Statistische Auswertung der adulten Schafslungen – Histologie	42
Tab. 2-21 Statistische Auswertung – Molekularbiologie.....	42

8.4 Literaturverzeichnis

1. **Aaronson, P.I., Robertson, T.P. & Knock, G.A. et al.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies, *The Journal of physiology* 570, 53–58 (2006).
2. **Abman, S.H., Shanley, P.F. & Accurso, F.J.** Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs, *The Journal of clinical investigation* 83, 1849–1858 (1989).
3. **Abraham, A.S., Kay, J.M. & Cole, R.B. et al.** Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat, *Cardiovasc Res* 5, 95–102 (1971).
4. **Aggarwal, S., Gross, C.M. & Sharma, S. et al.** Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling, *Comprehensive Physiology* 3, 1011–1034 (2013).
5. **Alano, M.A., Ngougma, E. & Ostrea, E.M., JR et al.** Analysis of nonsteroidal antiinflammatory drugs in meconium and its relation to persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Pediatrics* 107, 519–523 (2001).
6. **Albokhadaim, I.F., Althnaian, T.A. & El-Bahr, S.M.** Gene expression of heat shock proteins/factors (HSP60, HSP70, HSP90, HSF-1, HSF-3) and antioxidant enzyme activities in heat stressed broilers treated with vitamin C, *Polish journal of veterinary sciences* 22, 565–572 (2019).
7. **Allison, B.J., Brain, K.L. & Niu, Y. et al.** Fetal in vivo continuous cardiovascular function during chronic hypoxia, *The Journal of physiology* 594, 1247–1264 (2016).
8. **Baker, T.A., Milstien, S. & Katusic, Z.S.** Effect of vitamin C on the availability of tetrahydrobiopterin in human endothelial cells, *Journal of cardiovascular pharmacology* 37, 333–338 (2001).
9. **Ball, M.K., Waypa, G.B. & Mungai, P.T. et al.** Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1alpha, *Am J Respir Crit Care Med* 189, 314–324 (2014).
10. **Barberà, J.A., Peinado, V.I. & Santos, S. et al.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers, *Am J Respir Crit Care Med* 164, 709–713 (2001).
11. **Bedard, K. & Krause, K.-H.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiological reviews* 87, 245–313 (2007).

12. **Behrends, J., Bischofberger, J. & Deutzmann, R. et al.** Duale Reihe Physiologie. 4th ed. *Thieme, Stuttgart* (2021).
13. **Belteki, G., Kempster, S.L. & Forhead, A.J. et al.** Paraoxonase-3, a putative circulating antioxidant, is systemically up-regulated in late gestation in the fetal rat, sheep, and human, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 3798–3805 (2010).
14. **Benisty, J.I., McLaughlin, V.V. & Landzberg, M.J. et al.** Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension, *Chest* 126, 1255–1261 (2004).
15. **Berkelhamer, S.K., Kim, G.A. & Radder, J.E. et al.** Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung, *Free radical biology & medicine* 61, 51–60 (2013).
16. **Black, S.M., Johengen, M.J. & Soifer, S.J.** Coordinated regulation of genes of the nitric oxide and endothelin pathways during the development of pulmonary hypertension in fetal lambs, *Pediatric research* 44, 821–830 (1998).
17. **Bornstein, S.R., Yoshida-Hiroi, M. & Sotiriou, S. et al.** Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2), *FASEB J* 17, 1928–1930 (2003).
18. **Brain, K.L., Allison, B.J. & Niu, Y. et al.** Induction of controlled hypoxic pregnancy in large mammalian species, *Physiological reports* 3 (2015).
19. **Brennan, L.A., Steinhorn, R.H. & Wedgwood, S. et al.** Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase, *Circulation research* 92, 683–691 (2003).
20. **Brookes, P.S., Yoon, Y. & Robotham, J.L. et al.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *American journal of physiology. Cell physiology* 287, C817-33 (2004).
21. **Budhiraja, R., Tuder, R.M. & Hassoun, P.M.** Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension, *Circulation* 109, 159–165 (2004).
22. **Cameron, E.** Cancer and vitamin C *Linus Pauling Institute of Science and Medicine* (1979).
23. **Campbell, E.J., Vissers, M.C.M. & Wohlrab, C. et al.** Pharmacokinetic and anti-cancer properties of high dose ascorbate in solid tumours of ascorbate-dependent mice, *Free radical biology & medicine* 99, 451–462 (2016).

24. **Carmeliet, P., Dor, Y. & Herbert, J.M. et al.** Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature* 394, 485–490 (1998).
25. **Christman, B.W., McPherson, C.D. & Newman, J.H. et al.** An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension, *N Engl J Med* 327, 70–75 (1992).
26. **Conroy, R.M.** What Hypotheses do “Nonparametric” Two-Group Tests Actually Test?, *The Stata Journal* 12, 182–190 (2012).
27. **Creagan, E.T., Moertel, C.G. & O'Fallon, J.R. et al.** Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial, *N Engl J Med* 301, 687–690 (1979).
28. **Curtis, J., Kim, G. & Wehr, N.B. et al.** Group B Streptococcus, phospholipids and pulmonary hypertension, *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 31 Suppl 1, S24-8 (2011).
29. **Dahal, B.K., Cornitescu, T. & Tretyn, A. et al.** Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension, *American journal of respiratory and critical care medicine* 181, 158–167 (2010).
30. **Dahal, B.K., Kosanovic, D. & Pamarthi, P.K. et al.** Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension, *The European respiratory journal* 36, 808–818 (2010).
31. **D'Alonzo, G.E., Barst, R.J. & Ayres, S.M. et al.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry, *Ann Intern Med* 115, 343–349 (1991).
32. **Dargaville, P.A., Mills, J.F. & Headley, B.M. et al.** Therapeutic lung lavage in the piglet model of meconium aspiration syndrome, *Am J Respir Crit Care Med* 168, 456–463 (2003).
33. **Davie, N., Haleen, S.J. & Upton, P.D. et al.** ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells, *Am J Respir Crit Care Med* 165, 398–405 (2002).
34. **Dennis, K.E., Aschner, J.L. & Milatovic, D. et al.** NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L596-607 (2009).

35. **Dikalov, S., Griending, K.K. & Harrison, D.G.** Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies, *Hypertension* 49, 717–727 (2007).
36. **Dikalova, A.E., Gongora, M.C. & Harrison, D.G. et al.** Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, H673-9 (2010).
37. **Dumas, J.P., Bardou, M. & Goirand, F. et al.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Gen Pharmacol* 33, 289–297 (1999).
38. **Dumitrascu, R., Weissmann, N. & Ghofrani, H.A. et al.** Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling, *Circulation* 113, 286–295 (2006).
39. **Durmowicz, A.G. & Stenmark, K.R.** Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension, *Pediatr Rev* 20, 91–102 (1999).
40. **d'Uscio, L.V., Milstien, S. & Richardson, D. et al.** Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity, *Circulation research* 92, 88–95 (2003).
41. **Echtler, K., Stark, K. & Lorenz, M. et al.** Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus, *Nat Med* 16, 75–82 (2010).
42. **Eddahibi, S., Guignabert, C. & Barlier-Mur, A.-M. et al.** Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia, *Circulation* 113, 1857–1864 (2006).
43. **Ermert, M., Ruppert, C. & Günther, A. et al.** Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 425–441 (2002).
44. **Escobar, J., Teramo, K. & Stefanovic, V. et al.** Amniotic fluid oxidative and nitrosative stress biomarkers correlate with fetal chronic hypoxia in diabetic pregnancies, *Neonatology* 103, 193–198 (2013).
45. **Euler, U.S. & Liljestrang, G.** Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat, *Acta Physiologica Scandinavica* 12, 301–320 (1946).
46. **Fallah, J. & Rini, B.I.** HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development, *Current oncology reports* 21, 6 (2019).

47. **Farrell, M.R., Rogers, L.K. & Liu, Y. et al.** Thioredoxin-interacting protein inhibits hypoxia-inducible factor transcriptional activity, *Free radical biology & medicine* 49, 1361–1367 (2010).
48. **Farrow, K.N., Groh, B.S. & Schumacker, P.T. et al.** Hyperoxia increases phosphodiesterase 5 expression and activity in ovine fetal pulmonary artery smooth muscle cells, *Circulation research* 102, 226–233 (2008).
49. **Farrow, K.N., Lakshminrusimha, S. & Reda, W.J. et al.** Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 295, L979-87 (2008).
50. **Fike, C.D., Dikalova, A. & Slaughter, J.C. et al.** Reactive oxygen species-reducing strategies improve pulmonary arterial responses to nitric oxide in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, *Antioxidants & redox signaling* 18, 1727–1738 (2013).
51. **Fike, C.D., Slaughter, J.C. & Kaplowitz, M.R. et al.** Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 295, L881-8 (2008).
52. **Fineman, J.R., Soifer, S.J. & Heymann, M.A.** Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period, *Annual review of physiology* 57, 115–134 (1995).
53. **Fishman, A.P.** Primary pulmonary arterial hypertension. A look back, *J Am Coll Cardiol* 43, 2S-4S (2004).
54. **Förstermann, U.** Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal, *Biological chemistry* 387, 1521–1533 (2006).
55. **Fuchs, B., Sommer, N. & Dietrich, A. et al.** Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Respir Physiol Neurobiol* 174, 282–291 (2010).
56. **Furchgott, R.F. & Vanhoutte, P.M.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3, 2007–2018 (1989).
57. **Gaine, S.P. & Rubin, L.J.** Primary pulmonary hypertension, *Lancet* 352, 719–725 (1998).

58. **Galiè, N., McLaughlin, V.V. & Rubin, L.J. et al.** An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension, *The European respiratory journal* 53 (2019).
59. **Gao, Y., Chen, T. & Raj, J.U.** Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension, *Am J Respir Cell Mol Biol* 54, 451–460 (2016).
60. **Gao, Y. & Raj, J.U.** Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn, *Physiological reviews* 90, 1291–1335 (2010).
61. **Geggel, R.L., Aronovitz, M.J. & Reid, L.M.** Effects of chronic in utero hypoxemia on rat neonatal pulmonary arterial structure, *The Journal of Pediatrics* 108, 756–759 (1986).
62. **Geiger, R., Berger, R.M. & Hess, J. et al.** Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease, *J Pathol* 191, 202–207 (2000).
63. **Ghofrani, H.A., Osterloh, I.H. & Grimminger, F.** Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond, *Nat Rev Drug Discov* 5, 689–702 (2006).
64. **Gierhardt, M., Pak, O. & Sydykov, A. et al.** Genetic deletion of p66shc and/or cyclophilin D results in decreased pulmonary vascular tone, *Cardiovasc Res* 118, 305–315 (2022).
65. **Giussani, D.A.** The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms, *The Journal of physiology* 594, 1215–1230 (2016).
66. **Grimminger, F. & Schermuly, R.T.** PDGF receptor and its antagonists: role in treatment of PAH, *Adv Exp Med Biol* 661, 435–446 (2010).
67. **Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F. & Korbo, L. et al.** Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 96, 379–394 (1988).
68. **Guzy, R.D. & Schumacker, P.T.** Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia, *Experimental physiology* 91, 807–819 (2006).
69. **Haworth, W.N.** The constitution of ascorbic acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, 482–485 (1933).

70. **Heller, R., Unbehaun, A. & Schellenberg, B. et al.** L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin, *J Biol Chem* 276, 40–47 (2001).
71. **Henze, A.-T. & Acker, T.** Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology, *Cell Cycle* 9, 2821–2835 (2010).
72. **Hernandez-Diaz, S., van Marter, L.J. & Werler, M.M. et al.** Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Pediatrics* 120, 272-282 (2007).
73. **Herrera, E.A., Ebensperger, G. & Krause, B.J. et al.** Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep, *Pediatric research* 63, 169–175 (2008).
74. **Hester, J., Ventetuolo, C. & Lahm, T.** Sex, Gender, and Sex Hormones in Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure, *Comprehensive Physiology* 10, 125–170 (2019).
75. **Hillier, S.C., Graham, J.A. & Hanger, C.C. et al.** Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules, *J Appl Physiol (1985)* 82, 1084–1090 (1997).
76. **Hooper, M.M., Bogaard, H.J. & Condliffe, R. et al.** Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension, *Journal of the American College of Cardiology* 62, 50 (2013).
77. **Hoffmann, J., Marsh, L.M. & Pieper, M. et al.** Compartment-specific expression of collagens and their processing enzymes in intrapulmonary arteries of IPAH patients, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308, L1002-13 (2015).
78. **Hu, H., Zhang, Z. & Chen, C. et al.** Effects of mitochondrial potassium channel and membrane potential on hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 661–666 (2010).
79. **Humbert, M., Morrell, N.W. & Archer, S.L. et al.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension, *Journal of the American College of Cardiology* 43, 13 (2004).
80. **Irrcher, I., Ljubcic, V. & Hood, D.A.** Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells, *American journal of physiology. Cell physiology* 296, C116-23 (2009).
81. **Jain, L. & Eaton, D.C.** Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor, *Seminars in Perinatology* 30, 34–43 (2006).

82. **Jeffery, T.K. & Wanstall, J.C.** Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension, *Pharmacol Ther* 92, 1–20 (2001).
83. **Jones, P.L. & Rabinovitch, M.** Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation, *Circ Res* 79, 1131–1142 (1996).
84. **Joppa, P., Petrasova, D. & Stancak, B. et al.** Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension, *Wiener klinische Wochenschrift* 119, 428–434 (2007).
85. **Kaelin, W.G. & Ratcliffe, P.J.** Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Molecular cell* 30, 393–402 (2008).
86. **Kamm, K.E. & Stull, J.T.** The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle, *Annual review of pharmacology and toxicology* 25, 593–620 (1985).
87. **Karlenius, T.C. & Tonissen, K.F.** Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation, *Cancers* 2, 209–232 (2010).
88. **Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszewska, K. & Adamus-Grabicka, A. et al.** Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent, *Nutrients* 12 (2020).
89. **Kleuser, B.** Vitamin C: Klassiker im neuen Licht, *Pharmazeutische Zeitung online*, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/klassiker-im-neuen-licht/> (2019).
90. **Konduri, G.G. & Kim, U.O.** Advances in the diagnosis and management of persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Pediatric clinics of North America* 56, 579-600 (2009).
91. **König, H.E. & Liebig, H.G.** Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis + Anatomie online: die Bilddatenbank mit dem Plus. 5th ed. *Schattauer, Stuttgart* (2011).
92. **Koren, G. & Nordeng, H.** Antidepressant use during pregnancy: the benefit-risk ratio, *American journal of obstetrics and gynecology* 207, 157–163 (2012).
93. **Kranenburg, A.R., Boer, W.I. de & Alagappan, V. et al.** Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* 60, 106–113 (2005).

94. **Kreymborg, K.g., Uchida, S. & Gellert, P. et al.** Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction, *J Mol Cell Cardiol* 49, 598–605 (2010).
95. **Lakshminrusimha, S., Russell, J.A. & Wedgwood, S. et al.** Superoxide dismutase improves oxygenation and reduces oxidation in neonatal pulmonary hypertension, *American journal of respiratory and critical care medicine* 174, 1370–1377 (2006).
96. **Landmesser, U., Dikalov, S. & Price, SR et al.** Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension, *The Journal of clinical investigation* 111, 1201–1209 (2003).
97. **Lassegue, B. & Griendling, K.K.** Reactive oxygen species in hypertension; An update, *American journal of hypertension* 17, 852–860 (2004).
98. **Lassus, P., Turanlahti, M. & Heikkila, P. et al.** Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn, *American journal of respiratory and critical care medicine* 164, 1981–1987 (2001).
99. **Lau, K.S., Grange, R.W. & Chang, W.-J. et al.** Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide, *FEBS Letters* 431, 71–74 (1998).
100. **Launay, J.-M., Herve, P. & Peoc'h, K. et al.** Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension, *Nat Med* 8, 1129–1135 (2002).
101. **Le Cras, T.D., Hardie, W.D. & Fagan, K. et al.** Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-alpha, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, 54 (2003).
102. **Lee, C., Miura, K. & Liu, X. et al.** Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite, *The Journal of biological chemistry* 275, 38965–38972 (2000).
103. **Lepetit, H., Eddahibi, S. & Fadel, E. et al.** Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Eur Respir J* 25, 834–842 (2005).
104. **Li, P., Oparil, S. & Sun, J.-Z. et al.** Fibroblast growth factor mediates hypoxia-induced endothelin-- a receptor expression in lung artery smooth muscle cells, *J Appl Physiol (1985)* 95, 643 (2003).

105. **Lovich, M.A., Bruno, N.K. & Plant, C.P. et al.** Use of ultra pure nitric oxide generated by the reduction of nitrogen dioxide to reverse pulmonary hypertension in hypoxemic swine, *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 24, 204–212 (2011).
106. **Ma, E., Chen, P. & Wilkins, H.M. et al.** Pharmacologic ascorbate induces neuroblastoma cell death by hydrogen peroxide mediated DNA damage and reduction in cancer cell glycolysis, *Free radical biology & medicine* 113, 36–47 (2017).
107. **Ma, Y., Chapman, J. & Levine, M. et al.** High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy, *Science translational medicine* 6 (2014).
108. **Mach, W.J., Thimmesch, A.R. & Pierce, J.T. et al.** Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung, *Nursing Research and Practice* 2011 (2011).
109. **Madamanchi, N.R. & Runge, M.S.** Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis, *Circulation research* 100, 460–473 (2007).
110. **Madden, J.A., Vadula, M.S. & Kurup, V.P.** Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells, *Am J Physiol* 263, 93 (1992).
111. **Malczyk, M., Veith, C. & Fuchs, B. et al.** Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension, *American journal of respiratory and critical care medicine* 188, 1451–1459 (2013).
112. **Martyn, K.D., Frederick, L.M. & Loehneisen, K. et al.** Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases, *Cellular signalling* 18, 69–82 (2006).
113. **Masri, F.A., Comhair, S. & Dostanic-Larson, I. et al.** Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Clinical and translational science* 1, 99–106 (2008).
114. **Mehandru, P.L., Assel, B.G. & Nuamah, I.F. et al.** Catecholamine response at birth in preterm newborns, *Biology of the neonate* 64, 82–88 (1993).
115. **Melsom, M.N., Flatebo, T. & Sjaastad, O.V. et al.** Minor redistribution of ventilation and perfusion within the lung during exercise in sheep, *Acta Physiol Scand* 165, 283–292 (1999).

116. **Minor, E.A., Court, B.L. & Young, J.I. et al.** Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine, *J. Biol. Chem.* 288, 13669–13674 (2013).
117. **Monti, D.A., Mitchell, E. & Bazzan, A.J. et al.** Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer, *PLoS ONE* 7 (2012).
118. **Morin, F.C.** Ligating the ductus arteriosus before birth causes persistent pulmonary hypertension in the newborn lamb, *Pediatric research* 25, 245–250 (1989).
119. **Murphy, J.D., Aronovitz, M.J. & Reid, L.M.** Effects of chronic in utero hypoxia on the pulmonary vasculature of the newborn guinea pig, *Pediatric research* 20, 292–295 (1986).
120. **Murray, R., Shipp, E. & FitzGerald, G.A.** Prostaglandin endoperoxide/thromboxane A2 receptor desensitization. Cross-talk with adenylate cyclase in human platelets, *J Biol Chem* 265, 21670–21675 (1990).
121. **Murthy, K.S.** Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut, *Annual review of physiology* 68, 345–374 (2006).
122. **Nelin, L.D., Thomas, C.J. & Dawson, C.A.** Effect of hypoxia on nitric oxide production in neonatal pig lung, *Am J Physiol* 271, H8-14 (1996).
123. **Nieß, G.** Die Rolle von TGFBR3 in der pulmonalen Gefäßentwicklung. 1st ed. *Laufersweiler, Giessen* (2014).
124. **Niki, E.** Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol, *Annals of the New York Academy of Sciences* 498, 186–199 (1987).
125. **Niki, E., Saito, T. & Kamiya, Y.** The role of vitamin c as an antioxidant, *Chem. Lett.* 12, 631–632 (1983).
126. **Niki, E., Saito, T. & Kawakami, A. et al.** Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C, *J. Biol. Chem.* 259, 4177–4182 (1984).
127. **Noguchi, Y., Hislop, A.A. & Haworth, S.G.** Influence of hypoxia on endothelin-1 binding sites in neonatal porcine pulmonary vasculature, *Am J Physiol* 272, H669-78 (1997).
128. **Novoyatleva, T., Kojonazarov, B. & Owczarek, A. et al.** Evidence for the Fucoidan/P-Selectin Axis as a Therapeutic Target in Hypoxia-induced Pulmonary

- Hypertension, *American journal of respiratory and critical care medicine* 199, 1407–1420 (2019).
129. **Oberley, T.D. & Oberley, L.W.** Antioxidant enzyme levels in cancer, *Histology and histopathology* 12, 525–535 (1997).
130. **Offermanns, S.** Pharmaka mit Wirkung auf die glatte Muskulatur. *Pharmakologie und Toxikologie Springer, Heidelberg* (2016).
131. **Omori, K. & Kotera, J.** Overview of PDEs and their regulation, *Circulation research* 100, 309–327 (2007).
132. **Ono, M., Sawa, Y. & Mizuno, S. et al.** Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats, *Circulation* 110, 2896–2902 (2004).
133. **Ostrea, E.M., Villanueva-Uy, E.T. & Natarajan, G. et al.** Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn, *Pediatric Drugs* 8, 179–188 (2006).
134. **Padayatty, S.J., Riordan, H.D. & Hewitt, S.M. et al.** Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases, *CMAJ : Canadian Medical Association journal* 174, 937–942 (2006).
135. **Padayatty, S.J., Sun, H. & Wang, Y. et al.** Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use, *Ann Intern Med* 140, 533–537 (2004).
136. **Pak, O., Scheibe, S. & Esfandiary, A. et al.** Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension, *The European respiratory journal* (2018).
137. **Panday, S., Kar, S. & Kavdia, M.** How does ascorbate improve endothelial dysfunction? - A computational analysis, *Free radical biology & medicine* 165, 111–126 (2021).
138. **Pardi, G., Cetin, I. & Marconi, A.M. et al.** Diagnostic value of blood sampling in fetuses with growth retardation, *N Engl J Med* 328, 692–696 (1993).
139. **Parker, T.A., Le Cras, T.D. & Kinsella, J.P. et al.** Developmental changes in endothelial nitric oxide synthase expression and activity in ovine fetal lung, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L202-8 (2000).
140. **Pauling, L. & Moertel, C.** A proposition: megadoses of vitamin C are valuable in the treatment of cancer, *Nutrition reviews* 44, 28–32 (1986).
141. **Percival, M.** Antioxidants, *Clinical nutrition insights* (1998).

142. **Plesková, M., Beck, K.-F. & Behrens, M.H. et al.** Nitric oxide down-regulates the expression of the catalytic NADPH oxidase subunit Nox1 in rat renal mesangial cells, *FASEB J* 20, 139–141 (2006).
143. **Poets, K.F.** Controversies around treatment of the open duct *Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg* (2011).
144. **Puthiyachirakkal, M. & Mhanna, M.J.** Pathophysiology, management, and outcome of persistent pulmonary hypertension of the newborn: a clinical review, *Frontiers in pediatrics* 1, 23 (2013).
145. **Qian, J., Chen, F. & Kovalenkov, Y. et al.** Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation, *Free radical biology & medicine* 52, 1806–1819 (2012).
146. **Rabinovitch, M.** Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension, *Chest* 114, 213 (1998).
147. **Rabinovitch, M., Gamble, W. & Nadas, A.S. et al.** Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features, *Am J Physiol* 236, H818-27 (1979).
148. **Rabinovitch, M., Gamble, W.J. & Miettinen, O.S. et al.** Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery, *The American journal of physiology* 240, 72 (1981).
149. **Rathore, R., Zheng, Y.-M. & Niu, C.-F. et al.** Hypoxia activates NADPH oxidase to increase ROS_i and Ca²⁺_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells, *Free radical biology & medicine* 45, 1223–1231 (2008).
150. **Reddy, V.M., Meyrick, B. & Wong, J. et al.** In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs, *Circulation* 92, 606–613 (1995).
151. **Rhoades, R.A., Packer, C.S. & Roepke, D.A. et al.** Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 68, 1581–1589 (1990).
152. **Rodrigues da Silva, M., Schapochnik, A. & Peres Leal, M. et al.** Beneficial effects of ascorbic acid to treat lung fibrosis induced by paraquat, *PLoS ONE* 13 (2018).
153. **Romberg, E.** Ueber sklerose der lungen arterie, *Dtsch Arch Klin Med*, Pages 197-206 (1891).

154. **Roofthoof, M.T.R., Elema, A. & Bergman, K.A. et al.** Patient characteristics in persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Pulmonary medicine* (2011).
155. **Ruiz-Feria, C.A.** Concurrent supplementation of arginine, vitamin E, and vitamin C improve cardiopulmonary performance in broilers chickens, *Poultry science* 88, 526–535 (2009).
156. **Saini-Chohan, H.K., Dakshinamurti, S. & Taylor, W.A. et al.** Persistent pulmonary hypertension results in reduced tetralinoleoyl-cardiolipin and mitochondrial complex II + III during the development of right ventricular hypertrophy in the neonatal pig heart, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1415-24 (2011).
157. **Schäfers, H.-J.** Pulmonale Hypertonie *Blackwell Wiss.-Verl., Berlin* (2001).
158. **Schermuly, R.T., Dony, E. & Ghofrani, H.A. et al.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition, *The Journal of clinical investigation* 115, 2811–2821 (2005).
159. **Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A. & Wilkins, M.R. et al.** Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension, *Nature reviews. Cardiology* 8, 443–455 (2011).
160. **Schultz, K., Fanburg, B.L. & Beasley, D.** Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, 34 (2006).
161. **Seimetz, M., Sommer, N. & Bednorz, M. et al.** NADPH oxidase subunit NOXO1 is a target for emphysema treatment in COPD, *Nature metabolism* 2, 532–546 (2020).
162. **Sharma, S., Grobe, A.C. & Wiseman, D.A. et al.** Lung antioxidant enzymes are regulated by development and increased pulmonary blood flow, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293, L960-71 (2007).
163. **Shaul, P.W., Yuhanna, I.S. & German, Z. et al.** Pulmonary endothelial NO synthase gene expression is decreased in fetal lambs with pulmonary hypertension, *The American journal of physiology* 272, 12 (1997).
164. **Shelton, E.L., Singh, G.K. & Nichols, C.G.** Novel drug targets for ductus arteriosus manipulation: Looking beyond prostaglandins, *Seminars in Perinatology* 42, 221–227 (2018).

165. **Shimoda, L.A.** 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1, *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 113, 1343–1352 (2012).
166. **Shu, L.-P., Zhang, R.-H. & Cai, Y.-H. et al.** Maternal Diabetes Mellitus and Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Accumulated Evidence From Observational Studies, *Canadian journal of diabetes* 44, 327-334.e3, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31902718/> (2020).
167. **Shujaat, A., Minkin, R. & Eden, E.** Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD, *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2, 273–282 (2007).
168. **Simonneau, G., Galie, N. & Rubin, L.J. et al.** Clinical classification of pulmonary hypertension, *J Am Coll Cardiol* 43, 5 (2004).
169. **Simonneau, G., Gatzoulis, M.A. & Adatia, I. et al.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension, *Journal of the American College of Cardiology* 62, 41 (2013).
170. **Simonneau, G., Montani, D. & Celermajer, D.S. et al.** Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension, *The European respiratory journal* 53 (2019).
171. **Simonneau, G., Robbins, I.M. & Beghetti, M. et al.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension, *J Am Coll Cardiol* 54, 54 (2009).
172. **Sommer, N., Dietrich, A. & Schermuly, R.T. et al.** Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms, *The European respiratory journal* 32, 1639–1651 (2008).
173. **Sommer, N., Strielkov, I. & Pak, O. et al.** Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *The European respiratory journal* 47, 288–303 (2016).
174. **Staub, N.C.** Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Chest* 88, 240 (1985).
175. **Steinhorn, R.H., Morin, F.C. & Fineman, J.R.** Models of persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) and the role of cyclic guanosine monophosphate (GMP) in pulmonary vasorelaxation, *Seminars in Perinatology* 21, 393–408 (1997).
176. **Stenmark, K.R., Fagan, K.A. & Frid, M.G.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms, *Circ. Res.* 99, 675–691 (2006).

177. **Stenmark, K.R., Gerasimovskaya, E. & Nemenoff, R.A. et al.** Hypoxic activation of adventitial fibroblasts. Role in vascular remodeling, *Chest* 122, 326–334 (2002).
178. **Sutendra, G. & Michelakis, E.D.** The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension, *Cell metabolism* 19, 558–573 (2014).
179. **Svirbely, J.L. & Szent-Györgyi, A.** The chemical nature of vitamin C, *The Biochemical journal* 26, 865–870 (1932).
180. **Sylvester, J.T.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view, *Circ. Res.* 88, 1228–1230 (2001).
181. **Teng, R., Wu, T. & Bisig, C. et al.** Nitrotyrosine impairs angiogenesis and uncouples eNOS activity of pulmonary artery endothelial cells isolated from developing sheep lungs, *Pediatric research* 69, 112–117 (2011).
182. **Teng, R.-J. & Wu, T.-J.** Persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Journal of the Formosan Medical Association* 112, 177–184 (2013).
183. **Thenappan, T., Ormiston, M.L. & Ryan, J.J. et al.** Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management, *BMJ* 360, j5492 (2018).
184. **Tipple, T.E., Welty, S.E. & Nelin, L.D. et al.** Alterations of the thioredoxin system by hyperoxia: implications for alveolar development, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41, 612–619 (2009).
185. **Tucker, A. & Rhodes, J.** Role of vascular smooth muscle in the development of high altitude pulmonary hypertension: an interspecies evaluation, *High altitude medicine & biology* 2, 173–189 (2001).
186. **Tuder, R.M., Abman, S.H. & Braun, T. et al.** Development and pathology of pulmonary hypertension, *J Am Coll Cardiol* 54, 9 (2009).
187. **Tuder, R.M., Chacon, M. & Alger, L. et al.** Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis, *J Pathol* 195, 367–374 (2001).
188. **van Marter, L.J., Hernandez-Diaz, S. & Werler, M.M. et al.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs in late pregnancy and persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Pediatrics* 131, 79–87 (2013).
189. **Vandesompele, J., Preter, K. de & Pattyn, F. et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology* 3 (2002).

190. **Veeroju, S., Kojonazarov, B. & Weiss, A. et al.** Therapeutic Potential of Regorafenib-A Multikinase Inhibitor in Pulmonary Hypertension, *International journal of molecular sciences* 22 (2021).
191. **Veit, F., Pak, O. & Brandes, R.P. et al.** Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels, *Antioxid Redox Signal* 22, 537–552 (2015).
192. **Veit, F., Pak, O. & Egemnazarov, B. et al.** Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling, *Antioxidants & redox signaling* 19, 2213–2231 (2013).
193. **Veith, C., Vartürk-Özcan, I. & Wujak, M. et al.** SPARC, a Novel Regulator of Vascular Cell Function in Pulmonary Hypertension, *Circulation* 145, 916–933 (2022).
194. **Visser, M.C.M. & Das, A.B.** Potential Mechanisms of Action for Vitamin C in Cancer: Reviewing the Evidence, *Frontiers in Physiology* 9, 809 (2018).
195. **Wang, J., Bingaman, S. & Huxley, V.H.** Intrinsic sex-specific differences in microvascular endothelial cell phosphodiesterases, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298, H1146-54 (2010).
196. **Ward, J.** Point: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species, *J Appl Physiol (1985)* 101, 993-5; (2006).
197. **Wedgwood, S. & Black, S.M.** Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 288, L480-7 (2005).
198. **Wedgwood, S., Dettman, R.W. & Black, S.M.** ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281, 67 (2001).
199. **Wedgwood, S., Lakshminrusimha, S. & Czech, L. et al.** Increased p22(phox)/Nox4 expression is involved in remodeling through hydrogen peroxide signaling in experimental persistent pulmonary hypertension of the newborn, *Antioxidants & redox signaling* 18, 1765–1776 (2013).
200. **Wedgwood, S., Lakshminrusimha, S. & Fukai, T. et al.** Hydrogen peroxide regulates extracellular superoxide dismutase activity and expression in neonatal pulmonary hypertension, *Antioxidants & redox signaling* 15, 1497–1506 (2011).

201. **Wedgwood, S., McMullan, D.M. & Bekker, J.M. et al.** Role for endothelin-1-induced superoxide and peroxynitrite production in rebound pulmonary hypertension associated with inhaled nitric oxide therapy, *Circulation research* 89, 357–364 (2001).
202. **Wedgwood, S. & Steinhorn, R.H.** Role of reactive oxygen species in neonatal pulmonary vascular disease, *Antioxidants & redox signaling* 21, 1926–1942 (2014).
203. **Wedgwood, S., Steinhorn, R.H. & Bunderson, M. et al.** Increased hydrogen peroxide downregulates soluble guanylate cyclase in the lungs of lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289, L660-6 (2005).
204. **Weissmann, N., Grimminger, F. & Olschewski, A. et al.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281, 7 (2001).
205. **Weissmann, N., Grimminger, F. & Walmrath, D. et al.** Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs, *Respiration physiology* 100, 159–169 (1995).
206. **Weissmann, N., Sommer, N. & Schermuly, R.T. et al.** Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Cardiovasc Res* 71, 620–629 (2006).
207. **Wharton, J., Strange, J.W. & Moller, G.M. et al.** Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells, *Am J Respir Crit Care Med* 172, 105–113 (2005).
208. **Widimský, J., Urbanová, D. & Ressler, J. et al.** Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat, *Cardiovasc Res* 7, 798–808, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4274229/> (1973).
209. **Wiklund, N.P., Persson, M.G. & Gustafsson, L.E. et al.** Modulatory role of endogenous nitric oxide in pulmonary circulation in vivo, *European journal of pharmacology* 185, 123–124 (1990).
210. **Wild, L.M., Nickerson, P.A. & Morin, F.C.3.** Ligating the ductus arteriosus before birth remodels the pulmonary vasculature of the lamb, *Pediatric research* 25, 251–257 (1989).
211. **Winovitch, K.C., Padilla, L. & Ghamsary, M. et al.** Persistent pulmonary hypertension of the newborn following elective cesarean delivery at term, *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal*

- Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 24, 1398–1402 (2011).
212. **Witko-Sarsat, V., Rieu, P. & Descamps-Latscha, B. et al.** Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80, 617–653 (2000).
213. **Woldesenbet, M. & Perlman, J.M.** Histologic chorioamnionitis: an occult marker of severe pulmonary hypertension in the term newborn, *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 25, 189–192 (2005).
214. **Wu, J., Kao, L. & Wu, B. et al.** Buffered l-ascorbic acid, alone or bound to KMUP-1 or sildenafil, reduces vascular endothelium growth factor and restores endothelium nitric oxide synthase in hypoxic pulmonary artery, *The Kaohsiung journal of medical sciences* 31, 241–254 (2015).
215. **Xiang, R.P., Sun, W.D. & Wang, J.Y. et al.** Effect of vitamin C on pulmonary hypertension and muscularisation of pulmonary arterioles in broilers, *British poultry science* 43, 705–712 (2002).
216. **Xu, X., Ma, X. & Shen, Z. et al.** Epigenetic regulation of the endothelial nitric oxide synthase gene in persistent pulmonary hypertension of the newborn rat, *Journal of hypertension* 28, 2227–2235 (2010).
217. **Xu, Y.-P., Zhu, J.-J. & Cheng, F. et al.** Ghrelin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension via phospho-GSK3 β/β -catenin signaling in neonatal rats, *Journal of molecular endocrinology* 47, 33–43 (2011).
218. **Ye, J., Coulouris, G. & Zaretskaya, I. et al.** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics* 13, 134 (2012).
219. **Yu, A.Y., Shimoda, L.A. & Iyer, N.V. et al.** Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha, *J Clin Invest* 103, 691–696 (1999).
220. **Yu, W., Ji, W. & Mi, L. et al.** Mechanisms of N-acetylcysteine in reducing monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: Inhibiting the expression of Nox1 in pulmonary vascular smooth muscle cells, *Molecular medicine reports* 16, 6148–6155 (2017).

221. **Yu, Y., Sweeney, M. & Zhang, S. *et al.*** PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression, *Am J Physiol Cell Physiol* 284, 30 (2003).
222. **Zhan, X., Li, D. & Johns, R.A.** Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51, 81–87 (2003).
223. **Zhang, Z., Yu, X. & Fang, X. *et al.*** Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Scientific reports* 5 (2015).

8.5 Publikationsverzeichnis

Vortrag

Programmed Pulmonary Hypertension in Adulthood by Prenatal Hypoxia: Molecular Mechanisms and Intervention.

K L Brain, U Uthayanan, B J Allison, Y Niu, E J Camm, K M Mathew, C M Cross, N Itani, K L Skeffington, C Beck, N Weissmann, D A Giussani (*63rd Annual Scientific Meeting of Society of Reproductive Investigation, Montreal, Canada, 2016*)

Poster

Antioxidant therapy by vitamin C prevents the programming of pulmonary hypertension in the adult offspring of hypoxic pregnancy in sheep.

U. Uthayanan, C. Veith, O. Pak, F. Veit, D. Kosanovic, R.T. Schermuly, W. Seeger, B.J. Allison, Y. Niu, K.L. Brain, D.A. Giussani and N. Weissmann (*5. DZL Jahrestreffen, Hannover, Deutschland, 2016*)

9 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, durch deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit entstehen, reifen und zum Abschluss gebracht werden konnte.

Herrn Prof. Dr. Weißmann danke ich herzlich für die Themenvergabe dieser Arbeit und das Stellen der Arbeitsgeräte und des Arbeitsplatzes. Danke für das Ermöglichen der Teilnahme am DZL Jahrestreffen, bei der ich ein Poster meiner Arbeit vorstellen konnte. Ich habe dadurch einen Einblick in die wissenschaftliche Arbeitsweise erhalten dürfen, die mich in meinem weiteren beruflichen Werdegang begleiten wird. Darüber hinaus möchte ich einen großen Dank für die, bis zum Ende, anhaltende Betreuung aussprechen, die mehrere Jahre angedauert hat.

Herrn Prof. Dino A Giussani vom *Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, United Kingdom* möchte ich danken für das Ermöglichen dieser Arbeit durch das Bereitstellen der Lungengewebe von Schafen. Vielen Dank auch für die stereologischen Ergebnisse der Schafherzen, sodass diese in der Arbeit präsentiert und diskutiert werden konnten.

Herrn Dr. Florian Veit danke ich für die initiale Co-Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Oleg Pak und Frau Dr. Christine Veith danke ich für die Übernahme der „täglichen“ Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für die Unterstützung beim molekularbiologischen Teil. Vielen Dank Oleg für die wertvollen Einblicke in das *designen* von Primern und die komplexen Excel Tabellen. Vielen Dank Oleg und Christine für die Unterstützung bei der Umsetzung von Poster und Abstrakt.

Frau Dr. Christine Veith nochmals ein großes und herzliches Dankeschön für die Betreuung bis zum Ende der Doktorarbeit und ganz besonders für das mehrfache Korrekturlesen der gesamten Arbeit. Danke auch für die unproblematischen Diskussionen und den Austausch, auch per Online-Meetings.

Frau Ingrid Breitenborn-Müller ein großes Dankeschön für die Hilfsbereitschaft, Genauigkeit und Expertise beim molekularbiologischen Teil dieser Arbeit. Danke, dass Du mich als ahnungslosen Medizinstudenten an die Hand genommen hast und mir die verschiedenen Techniken so gut beigebracht hast. Ich freue mich, dass ich Dich mit meiner Faszination für diese Arbeit anstecken konnte.

Frau Ewa Bieniek danke ich für die stets hilfreichen Tipps und Tricks beim histomorphologischen Teil dieser Arbeit. Insbesondere der immunhistochemische Teil mit Etablierung einer Doppelfärbung bei den Schafen über mehrere Tage und Stunden war aufregend und hat Spaß gemacht. Mit Dir war das stundenlange Mikroskopieren nie langweilig.

Herrn Dr. Jochen Wilhelm danke ich für die statistischen Überlegungen und wertvollen Hilfestellungen.

Herzliches Dankeschön an die komplette Arbeitsgruppe Weißmann für die rasche Eingliederung in die Arbeitsgruppe und für die gute Zusammenarbeit.

Von Herzen danke ich meiner kompletten Familie für die Förderung und Unterstützung meines Lebensweges, sodass ich meinen Traum als Arzt verwirklichen konnte.

Und zum Schluss will ich mein Wort an meine Frau und Seelenverwandte Tugce richten. Danke für die aufmunternden und tiefen Gespräche. Ohne dich wäre diese Arbeit nie zu seinem Abschluss gekommen. Danke für die mahnenden Worte, die mir (und dir) den Antrieb gaben, die Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen. *Team TU forever...*