

# **Dualelektive Phosphodiesterase 3 und 4 Inhibition in experimenteller pulmonaler Hypertonie**

Inauguraldissertation  
eingereicht beim Fachbereich Veterinärmedizin  
in Erfüllung der Anforderungen  
für die Erlangung des akademischen Grades eines PhD  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

von  
Dr. med. vet. Eva Maria Marlene Dony  
aus  
Homburg (Saar), Deutschland

Giessen, 2009

Aus dem Institut für Veterinärpathologie, Fachbereich Veterinärmedizin,  
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher

und der Medizinischen Klinik II, Zentrum für Innere Medizin, Fachbereich Medizin,  
Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer und Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly
Gutachter:	Prof. Dr. med. Marius Höper
Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer
Beisitzer:	Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt

Datum der Disputation: 27. Mai 2009

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

Eva Dony.

*Meiner Familie und Edgar Hornig.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. PULMONALE HYPERTONIE- DIE ERSTEN FALLBERICHTE .....	1
1.2. KLASSIFIKATION DER PULMONALEN HYPERTONIE.....	2
1.3. PATHOPHYSIOLOGIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE .....	3
1.4. cAMP/ cGMP IN PULMONALER HYPERTONIE .....	4
1.5. FAMILIE DER PHOSPHODIESTERASEN .....	6
1.6. PHOSPHODIESTERASEHEMMER ZUR THERAPIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE .....	9
1.7. ANDERE GEGENWÄRTIGE THERAPIESTRATEGIEN.....	10
1.8. DAS MONOCROTALIN-MODELL DER PULMONALEN HYPERTONIE.....	12
<b>2. AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL .....</b>	<b>15</b>
3.1. INJEKTIONSLSÖSUNGEN UND SUBSTANZEN .....	15
3.2. TIERPRÄPARATION.....	15
3.3. ISOLIERT PERFUNDIERTE LUNGE.....	16
3.4. HISTOLOGIE/ IMMUNHISTOCHEMIE/ IMMUNZYTLOGIE.....	16
3.5. ANTIKÖRPER.....	18
3.6. ZELLKULTUR .....	19
3.7. GERÄTE/ SOFTWARE/ MAKROS FÜR GEFÄßMORPHOMETRIE .....	19
<b>4. METHODEN .....</b>	<b>20</b>
4.1. VERSUCHSTIERE .....	20
4.2. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG.....	20
4.3. INJEKTION VON MONOCROTALIN .....	20
4.4. PUMAFENTRINE-HYDROCHLORID .....	21
4.5. CHRONISCHE THERAPEUTISCHE INTERVENTIONSSTUDIE.....	22
4.6. HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN AM GANZTIER .....	22
4.7. MODELL DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN UND VENTILIIERTEN RATTENLUNGE .....	27
4.8. HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN .....	28
4.9. MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER LUNGENGEFÄßE .....	31
4.10. ZELLISOLIERUNG VON PSMC .....	33
4.11. PROLIFERATIONSASSAY FÜR ISOLIERTE GLATTE MUSKELZELLEN .....	34
4.12. RADIOIMMUNOASSAY ZUR DETEKTION VON CAMP .....	34
4.13. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	35
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
5.1. ERMITTELTE PARAMETER .....	36
5.2. ÜBERLEBENSRATE UND KLINISCHE PARAMETER .....	38
5.3. SYSTEMISCH-ARTERIELLER BLUTDRUCK .....	39
5.4. RECHTSVENTRIKULÄRER DRUCK.....	40
5.5. GEWICHT DES RECHTEN HERZENS (RECHTSHERZHYPERTROPHIE) .....	42
5.6. HERZZEITVOLUMEN UND ARTERIELLE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG .....	43
5.7. VASOREAKTIVITÄTSTESTUNG .....	45
5.8. MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER LUNGENGEFÄßE .....	47
5.9. LOKALISIERUNG DER PHOSPHODIESTERASE 3A .....	54
5.10. EXPRESSION VON PHOSPHODIESTERASE 3A, 4A UND 4D.....	56
5.11. EINFLUß AUF DIE ZELLPROLIFERATION <i>IN SITU</i> .....	57
5.12. EINFLUß AUF DIE ZELLAPTOSE <i>IN SITU</i> .....	59
5.13. PROLIFERATIONSASSAY ISOLIERTER GLATTER MUSKELZELLEN .....	61
5.14. CAMP-FREISETZUNG GLATTER MUSKELZELLEN .....	62
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>

---

<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>79</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>80</b>
<b>9. CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>81</b>
<b>10. PUBLIKATIONSLISTE</b> .....	<b>82</b>
10.1. ORIGINALARBEITEN.....	82
10.2. POSTERBEITRÄGE .....	83
<b>11. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>85</b>
<b>12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
<b>13. DANKSAGUNG</b> .....	<b>105</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. PULMONALE HYPERTONIE- DIE ERSTEN FALLBERICHTE

1865 veröffentlichte Julius Klob, Professor für pathologische Anatomie in Wien, die Autopsiebefunde eines 59-jährigen Patienten, der vor seinem Tod progressive Knöchelödeme, Dyspnoe und Zyanose entwickelt hatte. Statt der erwarteten kardialen Pathologie fand Klob eine ungewöhnliche Verengung der distalen Aufzweigung der Pulmonalarterie mit lokalisierter Arteriosklerose<sup>1</sup>. 1891 griff der Leipziger Ernst von Romberg Klobs Bericht wieder auf und ergänzte ihn durch den Fallbericht eines 24-jährigen Mannes, dessen Obduktionsergebnisse identisch mit denen von Klob waren. Die Autopsie zeigte *„eine ungewöhnlich ausgedehnte, hochgradige Sklerose der Pulmonalarterien mit konsekutiver Hypertrophie der rechten Herzhälfte“*<sup>2</sup>.

Vom späten 19. Jahrhundert bis zur ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden weitere klinisch-pathologische Fallberichte über dieses Syndrom veröffentlicht, welches charakteristische obstruktive Läsionen in den kleinen Pulmonalarterien und eine Rechtsherzhypertrophie zur Folge hat und keine erkennbare Ursache aufweist<sup>2-6</sup>. Die Katheterisierung des rechten Herzens, in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt, machte es möglich, erhöhte pulmonalarterielle Drücke zu erkennen und sie mit den beschriebenen Herz- und Gefäßveränderungen in Zusammenhang zu bringen. David Dresdale berichtete 1951 über die hämodynamischen Veränderungen in Fällen ätiologisch unklarer pulmonaler Hypertonie und prägte erstmals die Bezeichnung ‚Primäre Pulmonale Hypertonie‘ (PPH)<sup>7</sup>. Dieses Krankheitsbild wird heute als ‚idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie‘ (IPAH) bezeichnet<sup>8</sup>.

Pulmonale Hypertonie wird allgemein definiert als eine Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes über 25 mmHg in Ruhe oder über 30 mmHg unter Belastung<sup>9</sup>.

## 1.2. KLASSIFIKATION DER PULMONALEN HYPERTONIE

Pulmonale Hypertonie wurde früher in zwei Kategorien eingeteilt (primäre und sekundäre pulmonale Hypertonie), je nachdem, ob es identifizierbare Gründe oder Risikofaktoren gibt. Während des zweiten WHO-Symposiums zu pulmonaler Hypertonie in Evian 1998 wurde eine mehr klinisch-therapeutisch orientierte Einteilung vorgeschlagen<sup>10</sup>. Dieses Schema wurde im Rahmen des dritten Weltsymposiums in Venedig 2003 noch einmal modifiziert. Die derzeitige Klassifikation umfasst fünf Kategorien, nach denen PH gemäß spezifischer Therapiekonzepte eingeordnet wird (Abbildung 1)<sup>8</sup>.

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li><b>1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</b><ol style="list-style-type: none"><li>1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)</li><li>2. Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH)</li><li>3. Pulmonalarterielle Hypertonie assoziiert mit (APAH)<ol style="list-style-type: none"><li>1. Bindegewebserkrankungen</li><li>2. Angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts (u.a. Herzfehler)</li><li>3. Portaler Hypertension</li><li>4. HIV-Infektion</li><li>5. Medikamenten und Giftstoffen</li><li>6. Anderen Erkrankungen (Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Splenektomie usw.)</li></ol></li><li>4. Pulmonalarterielle Hypertonie mit relevanter venöser oder kapillärer Beteiligung<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)</li><li>2. Pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)</li></ol></li><li>5. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)</li></ol></li><li><b>2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen</b><ol style="list-style-type: none"><li>1. Erkrankungen des linken Vorhofes oder Ventrikels</li><li>2. Mitral- oder Aortenklappenfehler</li></ol></li><li><b>3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/ oder Hypoxie</b><ol style="list-style-type: none"><li>1. Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung</li><li>2. Interstitielle Lungenerkrankung</li><li>3. Schlafapnoe-Syndrom</li><li>4. Alveoläre Hypoventilation</li><li>5. Chronische Höhenkrankheit</li><li>6. Anlagebedingte Fehlbildungen</li></ol></li><li><b>4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)</b><ol style="list-style-type: none"><li>1. Thrombembolischer Verschluss proximaler Lungenarterien</li><li>2. Thrombembolischer Verschluss distaler Lungenarterien</li><li>3. Nicht-thromboembolische Lungenembolien (Tumoren, Parasiten, Fremdkörper)</li></ol></li><li><b>5. Verschiedenes (Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangiomatose usw.)</b></li></ol> |
|---|

**ABBILDUNG 1.** KLASSIFIKATION DER PULMONALEN HYPERTONIE. Die Klassifikation der pulmonalen Hypertonie wurde auf der WHO-Konferenz in Venedig 2003 zum letzten Mal modifiziert und umfasst fünf verschiedene Gruppen. Die vorliegende Studie befasst sich im Wesentlichen mit den Krankheitsbildern der pulmonalarteriellen Hypertonie (Gruppe 1). Dazu gehören die idiopathische Form (früher als primäre pulmonale Hypertonie bezeichnet), die familiäre Form und die mit verschiedenen Krankheiten und Faktoren assoziierte Form.

Die erste Kategorie, pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), beinhaltet eine Gruppe von Erkrankungen, die ähnliche pathologisch-morphologische Befunde, ein ähnliches klinisches Bild und klinisches Ansprechen auf eine kontinuierliche Infusion mit Epoprostenol aufweisen<sup>11, 12</sup>. Sie sind durch einen progressiven Anstieg des pulmonalvaskulären Druckes im Zusammenhang mit einer charakteristischen proliferativen Vaskulopathie (in der Fachsprache auch als ‚pulmonalarterielles Remodelling‘ bezeichnet) der kleinen Arterien und Arteriolen des Lungengefäßbettes gekennzeichnet. Diese Gruppe beinhaltet die Untergruppen 1) idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH), 2) familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH) und 3) pulmonalarterielle Hypertonie assoziiert mit bestimmten Risikofaktoren, Medikamenten oder Krankheiten (APAH). Die Diagnose der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie wird über Ausschlußverfahren gestellt, wenn keine Ursache gefunden werden kann.

### **1.3. PATHOPHYSIOLOGIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE**

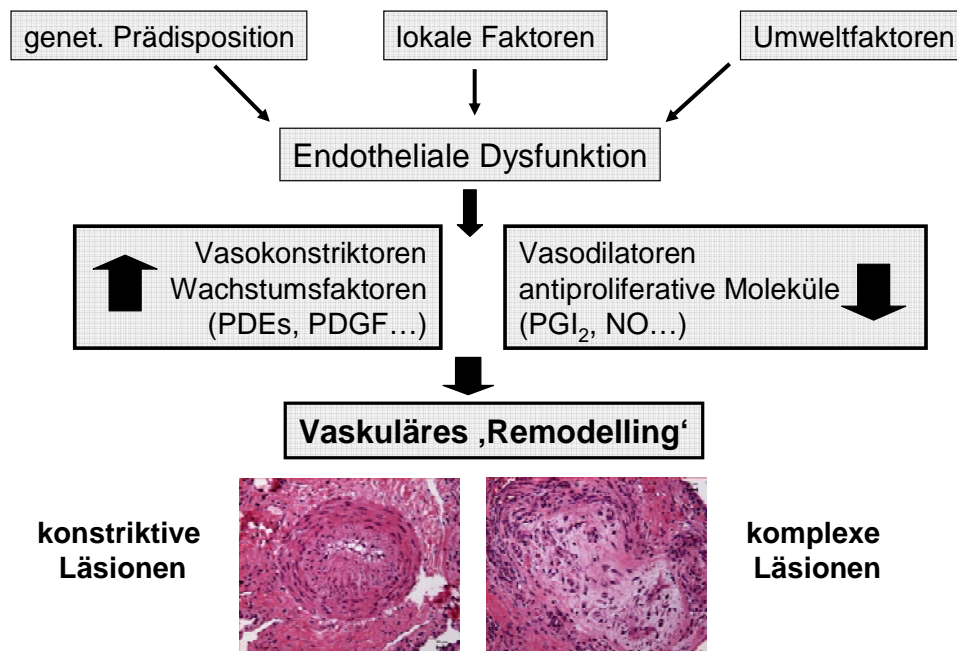
Pulmonale Hypertonie ist, vereinfacht ausgedrückt, das hämodynamische Resultat von Veränderungen in Gefäßtonus und Gefäßstruktur der Lunge. Die Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf durch diese morphologischen Veränderungen führt zu einer Drucküberlastung des rechten Ventrikels (RV) und in der Folge zu Rechtsherzhypertrophie und –dilatation (*Cor pulmonale*).

Es ist noch immer unklar, ob den verschiedenen Arten der pulmonalarteriellen Hypertonie eine gemeinsame Pathogenese zugrunde liegt. Allerdings sind die vaskulären Veränderungen, unabhängig von der Art der PAH, sehr ähnlich und charakteristisch. In Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie zeigen die kleinen Pulmonalarterien eine Bandbreite von Läsionen, die von einfacher Mediahypertrophie bei milden Krankheitsformen bis zu Intima- und Adventitiaproliferation, *in situ* Thrombose und plexiformen Läsionen reichen<sup>13, 14</sup>.

Das pulmonalvaskuläre Endothel moduliert den Gefäßtonus, die Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen, die Bildung extrazellulärer Matrix und die Thrombozytenfunktion<sup>15</sup>. Diese Effekte werden durch die Freisetzung relaxierender Mediatoren bewirkt, wie etwa Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO), welche außerdem antiproliferative Eigenschaften besitzen und die Plättchenaggregation



hemmen<sup>16, 17</sup>. Darüber hinaus spielen vasokonstriktorische und pro-proliferative Faktoren, wie Endothelin-1 (ET-1), Thromboxan oder Serotonin und Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived growth factor (PDGF) eine Rolle<sup>18, 19, 20, 21</sup>. Sie stimulieren die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen, die Kollagensynthese und die Plättchenaggregation. Eine Dysfunktion des Endothels, mit Verlust seiner vasoprotektiven Eigenschaften durch eine Verschiebung des Gleichgewichts dieser Mediatoren hin zu den vasokonstriktorischen und pro-proliferativen Faktoren, spielt eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung als auch Progression der pulmonalarteriellen Hypertonie<sup>15, 22-24</sup>, siehe auch Abbildung 2.



**ABBILDUNG 2.** PATHOGENESE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE. Gezeigt sind die drei wichtigsten pathogenetischen Mechanismen der pulmonalarteriellen Hypertonie: endotheliale Dysfunktion, Vasokonstriktion und vaskuläres ‚Remodelling‘. Sie stellen in der Hauptsache die Ziele der gegenwärtigen therapeutischen Interventionen dar. *Modifiziert nach Dandel et. al.*<sup>24</sup>.

#### 1.4. cAMP/ cGMP IN PULMONALER HYPERTONIE

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein vom Adenosintriphosphat (5'-ATP) abgeleitetes biologisches Molekül, welches als *second messenger* bei der zellulären Signaltransduktion eine Rolle spielt und insbesondere zur Aktivierung von

Proteinkinasen führt<sup>25, 26,27</sup>. Durch Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch ein Hormon (z.B. Prostazyklin), einen Neurotransmitter (z.B. Noradrenalin) oder einen Geruchsstoff wird die membranständige Adenylatzyklase stimuliert. Diese wandelt zelluläres ATP zu cAMP um. cAMP aktiviert Proteinkinasen vom Typ A (PK A)<sup>28, 29</sup>. Diese führen über eine Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine zu vielfältigen Effekten, zum Beispiel wird über die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) eine Relaxation der glatten Muskulatur herbeigeführt. Eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel cAMP-response element binding protein (CREB) bewirkt die verstärkte Transkription cAMP-induzierbarer Gene. Der Abbau von cAMP zu Adenosinmonophosphat (5'-AMP) wird durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert<sup>30</sup>.

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), ebenfalls ein *second messenger*<sup>31</sup>, spielt beim Schvorgang, der Relaxation der glatten Muskulatur von Blutgefäßen und der Regulation des Insulinspiegels eine Rolle. Die meisten seiner Wirkungen bei der Signaltransduktion entfaltet cGMP über die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PK G). cGMP entsteht aus Guanosintriphosphat (5'-GTP)<sup>32</sup>. Für diese Umwandlung sind mindestens zwei Isoenzyme der Guanylatzyklase verantwortlich: Die membranständige Guanylatzyklase wird durch die Hormone atriales natriuretisches Peptid (ANP) und brain natriuretisches Peptid (BNP) stimuliert<sup>33-35</sup>. Bei der löslichen Guanylatzyklase handelt es sich dagegen um ein Häm-Protein, das durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird<sup>36, 37</sup>. Das cGMP-Signal wird ebenfalls durch Phosphodiesterasen beendet, die den *second messenger* zu Guanosinmonophosphat (5'-GMP) hydrolysieren<sup>30</sup>.

Eine verminderte Expression von Prostazyklin und NO-Synthase, die revers korreliert ist mit dem Ausmaß morphologischer Läsionen, wurde im vaskulären Endothel von PAH Patienten nachgewiesen<sup>21-23, 38</sup>. Bei Patienten mit IPAH konnte eine verminderte Exkretion von Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und eine verstärkte Freisetzung von Thromboxan-Metaboliten gezeigt werden<sup>17</sup>. Darüber hinaus hat man verstärkte Aktivitäten von Phosphodiesterasen, die die PGI<sub>2</sub>- und NO-induzierten *second messenger* cAMP und cGMP abbauen, in experimentellen

Modellen der PAH gefunden<sup>39, 40-42</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass cAMP und sein Effektorprotein Proteinkinase A in der Lage sind, eine Proliferation von Zellen zu hemmen. Dies geschieht durch die Inhibition der cyclin-abhängigen Kinase (cdk) 4, Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) und Hochregulierung des cdk2-Inhibitors p27<sup>kip1</sup>. Der Effekt von cGMP auf die Proliferation glatter Muskelzellen ist komplexer<sup>43</sup>. Es wurde berichtet, dass cGMP (oder Substanzen, die cGMP erhöhen) eine Proliferation glatter Muskelzellen hemmen. Darüber hinaus konnte aber auch festgestellt werden, dass in primären glatten Muskelzellen von Ratten cGMP-erzeugende Substanzen eine durch Fibroblast growth factor (FGF) oder Epidermal growth factor (EGF) hervorgerufene Proliferation verstärken können. Beide Signalwege werden zur Zeit zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie untersucht.

## **1.5. FAMILIE DER PHOSPHODIESTERASEN**

Phosphodiesterasen (PDE) werden in die Klassen I, II und III eingeteilt. Die Phosphodiesterasen der Säugetiere, die zu den Klasse I PDE gehören, haben eine HD-Domäne im C-terminalen Teil und zeigen eine hohe Affinität für cAMP und/oder cGMP. Proteindomänen, die an der Regulation der enzymatischen Aktivität und der subzellulären Lokalisation beteiligt sind, befinden sich größtenteils im N-terminalen Teil. Einundzwanzig Klasse I PDE Gene wurden bei Mensch, Ratte und Maus identifiziert. Sie werden in 11 verschiedene Familien eingeteilt, basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten wie Sequenzhomologie, Proteindomänen, enzymatischen Eigenschaften (Substratspezifität, Kinetik, Sensitivität gegen endogene Regulatoren und Inhibitoren). Ungefähr 270 Aminosäuren in der C-terminalen katalytischen Domäne sind konserviert, mit einer Sequenzidentität von 35% bis 50% zwischen den verschiedenen PDE-Familien. Eine Vielzahl an Transkriptionsprodukten, die aus den meisten PDE-Genen durch alternatives Splicing oder Transkription von verschiedenen Promotoren entstehen, wurde bis jetzt identifiziert. Die einzigartigen Charakteristika jeder PDE-Genfamilie werden definiert durch Proteindomänen, die N-terminal der katalytischen Domäne lokalisiert sind.

PDE Familie	Unterfamilie/ Spleißvarianten	Substrat
1	A(4) B(1) C(5)	cAMP/cGMP
2	A(3)	cAMP/cGMP
3	A(3) B(1)	cAMP/cGMP
4	A(8) B(3) C(4) D(5)	cAMP
5	A(3)	cGMP
6	A(1) B(1) C(1)	cGMP
7	A(3) B(1)	cAMP
8	A(5) B(1)	cAMP
9	A(6)	cGMP
10	A(2)	cAMP/cGMP
11	A(4)	cAMP/cGMP

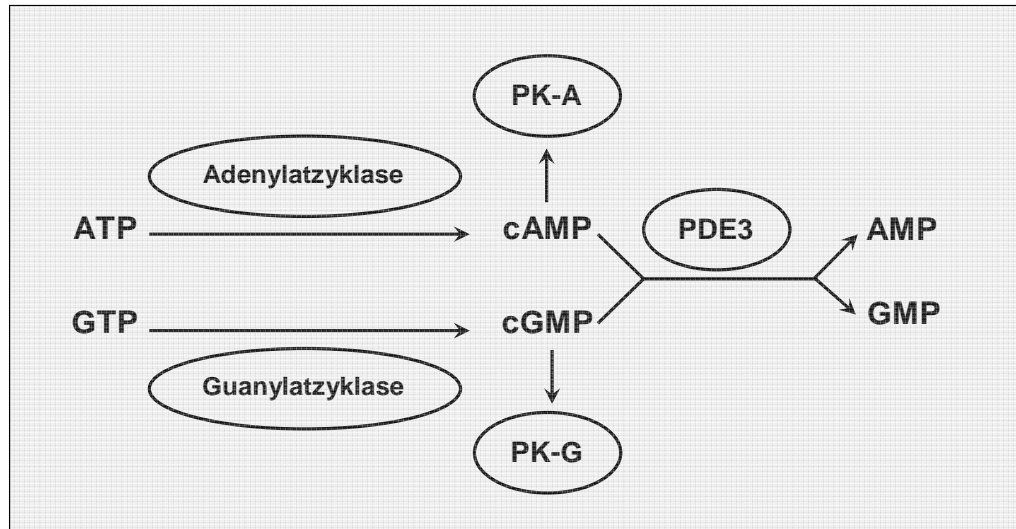
**TABELLE 1.** FAMILIE DER PHOSPHODIESTERASEN, ihre Untergruppierungen (A-D), die Anzahl der jeweiligen Spleißvarianten (in Klammern) und ihre Substratspezifität. *Nach Ghofrani et. al.* <sup>44</sup>.

### PHOSPHODIESTERASE 3 ISOENZYMFAMILIE

PDE 3A und PDE 3B sind die Genprodukte für PDE 3. Spleißvarianten wurden bis jetzt nur für die PDE 3A Isoform gefunden (PDE 3A1/2/3) <sup>45</sup>. Die PDE 3 kann von anderen Phosphodiesterasen durch ihre Eigenschaft unterschieden werden, sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren zu können. Die  $K_m$  Werte liegen zwischen 0,1-0,4  $\mu\text{M}$  ( $K_m \text{ cAMP} < 0,4 \mu\text{M}$ ,  $K_m \text{ cGMP} < 0,3 \mu\text{M}$ ) <sup>46</sup>. Jedoch ist die  $V_{\text{max}}$  für die cAMP-Hydrolyse 4-10mal höher als die  $V_{\text{max}}$  für cGMP-Hydrolyse (*siehe Abbildung 3 und Tabelle 2*). So hydrolysiert es cAMP vier- bis zehnfach schneller als cGMP <sup>47</sup>. Deshalb wirkt cGMP effektiv wie ein kompetitiver Inhibitor für cAMP und infolgedessen für PDE 3 <sup>48, 49</sup>, so dass die PDE 3 auch als ‚cGMP-inhibierte PDE‘ bezeichnet wird. Die PDE 3 Isoformen haben eine hohen Grad an Aminosäurehomologie (> 80% für die katalytische Domäne) und sehr ähnliche kinetische Eigenschaften.

Die PDE 3A liegt entweder membranassoziiert oder zytosolisch vor, abhängig von der jeweiligen Variante und dem Zelltyp, in dem sie exprimiert ist. Die PDE 3B ist fast immer membranassoziiert und lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum und in mikrosomalen Fraktionen <sup>46</sup>. Die PDE 3A wird exprimiert in Blutplättchen, glatten Gefäßmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Eizellen <sup>50</sup>. PDE 3B findet sich vor allem im Fettgewebe, der Leber, dem Pankreas und verschiedenen kardiovaskulären

Geweben<sup>50</sup>. cAMP-erhöhende Substanzen verstärken die Expression und Aktivität der PDE 3 in verschiedenen Zelltypen<sup>49</sup>, darunter auch in vaskulären glatten Muskelzellen<sup>51</sup>.



**ABBILDUNG 3.** ROLLE DER PDE 3 IN cAMP UND cGMP-MEDIERTER SIGNALTRANSDUKTION. Die PDE 3 kann von anderen Phosphodiesterasen durch ihre Eigenschaft unterschieden werden, sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren zu können. Die  $K_m$  Werte liegen zwischen 0,1-0,4  $\mu\text{M}$  ( $K_m \text{ cAMP} < 0,4 \mu\text{M}$ ,  $K_m \text{ cGMP} < 0,3 \mu\text{M}$ )<sup>46</sup>. Jedoch ist die  $V_{\max}$  für die cAMP-Hydrolyse 4-10mal höher als die  $V_{\max}$  für cGMP-Hydrolyse. *PK-A: Proteinkinase A (cAMP-abhängig), PK-G: Proteinkinase G (cGMP-abhängig).* Modifiziert nach Bender und Beavo<sup>46</sup>.

#### PHOSPHODIESTERASE 4 ISOENZYMFAMILIE

Die PDE 4 wurde zu Anfang als cAMP-spezifische PDE in Hundenerien identifiziert, die nicht von cGMP beeinflusst ist, aber durch den Inhibitor Ro 20-1724 gehemmt werden kann<sup>52,53</sup>. Bis heute sind mehr als 16 verschiedene PDE 4 cAMP-spezifische Isoformen identifiziert worden<sup>54</sup>. Vier verschiedene Gene (A, B, C, D) kodieren für diese Isoformen, wobei durch alternatives mRNA-Splicing und verschiedene Promotoren noch mehr Varianten entstehen<sup>55</sup>. PDE 4 findet sich vor allem in verschiedenen Entzündungszelltypen<sup>46</sup>.

In der Aorta von Rindern<sup>56,57</sup>, Schweinen<sup>58</sup> und Ratten<sup>59</sup> und in humanen Pulmonalarterien<sup>60</sup> wurde ebenfalls PDE 4 Aktivität beschrieben. Zwei PDE 4D

Isoformen (PDE 4D3, PDE 4D5) sind in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, und eine Stimulation mit cAMP-erhöhenden Substanzen induziert die Expression von zwei weiteren Isoformen (PDE 4D1, PDE 4D2)<sup>61, 62</sup>.

Isoform	Substratspezifität	K <sub>m</sub>		V <sub>max</sub>		Referenzen
		cGMP	cAMP	cGMP	cAMP	
		[μM]		[μmol/min/mg]		
PDE 3A	cAMP>cGMP	0,02-0,15	0,18	0,34	3,0-6	Grant & Colman (1984), Harrison <i>et. al</i> (1986)
PDE 3B	cAMP>cGMP	0,28	0,38	2,0	8,5	Degerman <i>et. al</i> (1987)
PDE 4A	cAMP>cGMP	—	2,9-10	—	0,58	Wang <i>et. al</i> (1997), Salanova <i>et. al</i> (1998), Rena <i>et. al</i> (2001), Wallace <i>et. al</i> (2005)
PDE 4B	cAMP>cGMP	—	1,5-4,7	—	0,13	Huston <i>et. al</i> (1997), Wang <i>et. al</i> (1997), Salanova <i>et. al</i> (1998)
PDE 4C	cAMP>cGMP	—	1,7	—	0,31	Wang <i>et. al</i> (1997)
PDE 4D	cAMP>cGMP	—	1,2-5,9	—	0,03-1,56	Wang <i>et. al</i> (1997), Salanova <i>et. al</i> (1998)

**TABELLE 2.** PHOSPHODIESTERASE 3 UND 4 SIND CAMP- BZW. CGMP-ABBAUENDE ENZYME. Die verschiedenen bekannten Isoformen medieren die Hydrolyse von cAMP und/oder cGMP mit unterschiedlichen Michaeliskonstanten und Umsetzungsgeschwindigkeiten. *Modifiziert nach Bender und Beavo*<sup>46</sup>.

## 1.6. PHOSPHODIESTERASEHEMMER ZUR THERAPIE DER PULMONALARTERIELLEN HYPERTONIE

Phosphodiesterasen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Entstehung der pulmonalen Hypertonie.

Die hauptsächliche Phosphodiesterase-Isoform in der Lunge ist PDE 5, eine cGMP-abbauende PDE. Sanchez *et. al.* haben gezeigt, dass die PDE 5 bei pulmonaler Hypertonie überexprimiert ist<sup>63</sup>. Sildenafil, ein wirksamer und spezifischer Inhibitor der PDE 5, ist unter dem Handelsnamen Revatio® zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie seit 2005 in Europa und den USA zugelassen.

Die Aktivität von verschiedenen anderen Phosphodiesterasen ist ebenfalls erhöht in Pulmonalarterien von Ratten mit hypoxieinduzierter pulmonaler Hypertonie, und dies korreliert mit einem Abfall in intrazellulären cAMP und cGMP Spiegeln. In den

chronisch hypoxischen, pulmonalhypertensiven Tieren ist die Genexpression der PDE 3A und B erhöht<sup>40</sup>. In pulmonalen Gefäßringen von Ratten mit Lungenhochdruck ist die PDE 3-Expression erhöht. Diese Studie zeigte außerdem, dass durch eine dualselektive Hemmung der PDE 3 und PDE 4 die pulmonale Hypertonie der Tiere verbessert werden konnte<sup>41</sup>.

Die Calcium/ Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase 1 ist ebenfalls in Lungen von Patienten mit IPAH und in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie überexprimiert, und Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der PDE 1 in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie (Monocrotalin und Hypoxie) einen positiven therapeutischen Effekt bringt<sup>64</sup>. Gegenwärtig sind jedoch noch keine anderen Phosphodiesterasehemmer außer Inhibitoren der PDE 5 zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen.

## **1.7. ANDERE GEGENWÄRTIGE THERAPIESTRATEGIEN**

Vor der Entwicklung der modernen Therapiekonzepte war IPAH eine schnell zum Tode führende Erkrankung. Die mittlere Überlebensrate von der Zeit der Diagnosestellung bei Patienten mit IPAH ohne eine zielgerichtete Behandlung beträgt nur 2,8 Jahre<sup>65, 66</sup>.

Ein großer Prozentsatz an PAH-Patienten zeigt eine bedeutende vasokonstriktorische Komponente der Erkrankung, bedingt durch eine Imbalanz zwischen endothelialen Vasorelaxantien (vor allem NO und Prostazyklin), deren Synthese verringert ist, und Vasokonstriktoren (z.B. Thromboxan und ET-1), deren Produktion erhöht ist<sup>17, 18, 24, 38</sup>. Wegen dieser pathogenetischen Bedeutung der Vasokonstriktion wurde zuallererst die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes von Vasodilatoren untersucht. Kalziumkanalblocker (CCBs) wurden bis zur Einführung von Epoprostenol in den frühen 1990er Jahren am häufigsten therapeutisch eingesetzt. Es ist jedoch mittlerweile bekannt, dass nur wenige Patienten (ungefähr 10%) mit PAH auf Kalziumkanalblocker ansprechen<sup>67, 68</sup>. Neuere Studien haben bewiesen, dass der erhöhte Gefäßwiderstand effizienter mit Prostazyklinen, NO, ET-1 Rezeptorantagonisten und PDE-Inhibitoren, welche alle auch vasodilative Eigenschaften aufweisen, gesenkt werden kann<sup>67, 68</sup>.

## PROSTAZYKLIN

Prostaglandin I<sub>2</sub> (Prostazyklin), das Hauptprodukt der Arachnidonsäure im Gefäßendothel, induziert die Relaxation glatter Muskelzellen durch die Stimulation der Produktion von cAMP und hemmt das Wachstum von glatten Muskelzellen. Darüber hinaus hemmt es effektiv die Plättchenaggregation<sup>69</sup>. Intravenöses Prostazyklin (Epoprostenol) war das erste zur Therapie der PAH zugelassene Medikament. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl die Hämodynamik als auch die Überlebensrate verbessert<sup>11</sup>. Es kann jedoch durch die Notwendigkeit der intravenösen Gabe zu schweren Nebenwirkungen kommen: Infektionen, Thrombose, Sepsis, abrupte Unterbrechung der lebenswichtigen Medikamentenzufuhr durch Verlegung des Katheters oder Versagen der Pumpe. Deshalb wurde ein stabiles Prostazyklinanalogon, Treprostinil, zur kontinuierlichen subkutanen Darreichungsform entwickelt<sup>70</sup>. Weiterhin erfolgte die Etablierung eines oral verfügbaren Prostazyklins, Beraprost, welches sich jedoch in klinischen Studien als weniger effektiv erwiesen hat. Inhalativ verabreichtes Iloprost hat den Vorteil, selektiv in den erkrankten Gefäßbezirken zu wirken und keine systemisch-vasodilatativen Effekte hervorzurufen<sup>71-74</sup>. Der Nachteil von inhalativem Iloprost ist die relativ kurze Halbwertszeit, die 6-12 Inhalationen täglich notwendig macht. Deshalb sind längerwirksame aerosolierte Prostazykline, wie inhalatives Treprostinil, in der präklinischen und klinischen Erprobung<sup>75, 76</sup>.

Ein weiterer Nachteil der Therapie mit Prostaglandinen ist die Tatsache, dass nach einiger Zeit eine pharmakodynamische Toleranz und Rezeptordesensibilisierung eintritt und die Dosis sukzessive gesteigert werden muß, um gute Behandlungsergebnisse zu erzielen<sup>11, 77, 78</sup>. Deshalb versucht man, die vasodilatativen Effekte von aerosolisierten Prostaglandinen durch eine gezielte Kombinationstherapie mit spezifischen oder unspezifischen PDE-Inhibitoren zu verstärken<sup>79-82</sup>.

## ENDOTHELINREZEPTORANTAGONISTEN

Endothelin-1 wirkt vasokonstriktorisch, stimuliert die Proliferation von Gefäßmuskelzellen, induziert Fibrose und wirkt proinflammatorisch. Die Effekte von ET-1 werden durch die ET-A und ET-B Rezeptoren vermittelt. Bosentan ist ein oral verfügbarer dualselektiver ET-A und ET-B Rezeptorantagonist (ERA), der seit 2001 zur Therapie der PAH zugelassen ist<sup>83, 84</sup>. Ambrisentan und Sitaxsentan sind



selektive Hemmstoffe des ET-A Rezeptors, die ebenfalls seit kurzem in Europa und/ oder den USA zugelassen sind <sup>84</sup>.

#### **TYROSINKINASEHEMMER**

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren wie Epidermal growth factor und Platelet-derived growth factor und ihre Tyrosinkinase-Rezeptoren in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie und in Lungengewebe von Patienten mit PAH überexprimiert sind <sup>19, 85, 86</sup> und dass Tyrosinkinasehemmer vielversprechende zukünftige Therapieoptionen darstellen könnten <sup>87-90</sup>.

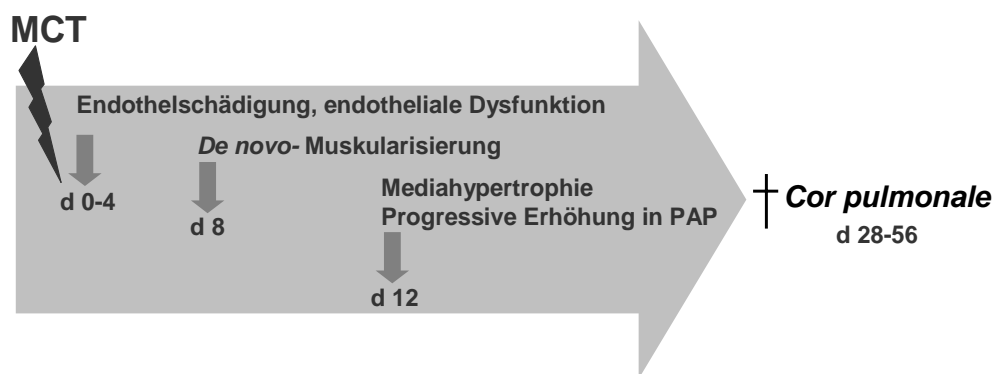
### **1.8. DAS MONOCROTALIN-MODELL DER PULMONALEN HYPERTONIE**

Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus *Crotalaria* (Familie *Leguminosae*). Die Pneumotoxizität von Pyrrolizidinen wurde erstmalig 1942 für Monocrotalin und Retronecin beschrieben <sup>91</sup>. Monocrotalin wurde das am häufigsten untersuchte Alkaloid. Es kommt in mehr als 20 verschiedenen Pflanzen vor, aber es wird typischerweise aus den Samen von *Crotalaria spectabilis* isoliert. In frühen Studien wurden gemahlene *Crotalaria*- Samen <sup>92-94</sup> oder sogar getrocknete Pflanzen <sup>95</sup> an die Tiere verfüttert. In neueren Studien wird im Allgemeinen nur noch das aufgereinigte Alkaloid verwendet.

Nach der Ingestion eines pneumotoxischen Pyrrolizidinalkaloids kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in der Lunge, die im Verlauf der folgenden zwei Wochen unaufhaltsam zu pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie führen. Dabei hat Monocrotalin selbst keinen Einfluß auf den pulmonalarteriellen Druck <sup>96</sup>, und Lungenhomogenate sind nicht in der Lage, das Alkaloid zu biotransformieren. Nach einer einzigen Injektion wird das Alkaloid größtenteils innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden <sup>97</sup>, so dass nach dieser Zeit kein unmetabolisiertes Produkt mehr im Gewebe nachgewiesen werden kann.

Die toxischen Effekte des Monocrotalins *in vivo* sind abhängig von seiner Bioaktivierung (Toxifizierung) in der Leber: die Metabolisierung des Alkaloids durch mischfunktionelle Oxidasen (Cytochrom P450) führt zur Entstehung alkylierender Verbindungen, den sogenannten Dehydro-Alkaloiden (Monocrotalin-

Pyrrrol)<sup>98, 99</sup>. Die Metaboliten werden von den Leberzellen freigesetzt und induzieren im nächstfolgenden Organ, der Lunge, charakteristische Gefäßveränderungen, die in ihrer Allgemeinheit als ‚pulmonalvaskuläres Remodelling‘ bezeichnet werden. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um Endothelschädigung und –hyperplasie, endotheliale Dysfunktion, Verdickung der Media und Adventitia von Arterien, das Auftreten von Muskelfasern in normalerweise nicht muskularisierten Arteriolen und Hypertrophie von glatten Gefäßmuskelzellen in muskularisierten Gefäßen (*siehe auch Abbildung 4*)<sup>100-105</sup>.



**ABBILDUNG 4.** DAS MONOCROTALIN-MODELL DER PULMONALEN HYPERTONIE wurde erstmals vor mehr als 40 Jahren von Lalich *et. al.* vorgestellt<sup>94, 106</sup>. Es basiert üblicherweise auf einer einzigen Injektion von MCT (meist 60 mg/kg subkutan). Danach kommt es initial zu einer Endothelschädigung mit anhaltender endothelialer Dysfunktion (Tag 0-4 nach Injektion). Diese führt progressiv zu pulmonalen Gefäßproliferationen (*De novo*-Muskularisierung, Mediahypertrophie) mit sukzessivem *Cor pulmonale* ohne intrinsische Herz- oder Lungenerkrankung. Eine endotheliale Dysfunktion und ähnliche Gefäßproliferationen spielen auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PAH des Menschen<sup>13, 15</sup>.

Die Gefäßveränderungen führen schließlich zu einer Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands<sup>100, 102, 107</sup>. Der pulmonalarterielle Druck zeigt einen ersten leichten Anstieg 8 Tage nach dem toxischen Stimulus und nimmt dann kontinuierlich zu<sup>100</sup>. Der erhöhte pulmonalarterielle Druck bedingt eine vermehrte Belastung des rechten Herzens, was zu Rechtsherzhypertrophie und letztendlich der Ausbildung eines *Cor pulmonale* führt. Das Ausmaß der Mediahypertrophie in den Arterien und die Schwere der pulmonalarteriellen Hypertonie korrelieren stark mit einem Anstieg der Ratio des Gewichtes von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht<sup>93</sup> beziehungsweise der Schwere der Rechtsherzhypertrophie<sup>102</sup>.

## 2. AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines PhD (*Philosophiae Doctor*) sollte die therapeutische Wirkung des dualselektiven, oral verfügbaren Phosphodiesterase 3/4 Inhibitors Pumafentrine-Hydrochlorid auf die verschiedenen pathophysiologischen und pathohistologischen Aspekte im experimentellen Tiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte untersucht werden. Dadurch sollten neue Erkenntnisse zu einer möglichen vasodilatativen und antiproliferativen Therapie mit Hemmstoffen gegen die PDE 3 und 4 bei humaner pulmonaler oder pulmonalarterieller Hypertonie gewonnen werden.

Es kamen sowohl tierphysiologische als auch histologisch-morphometrische, immunhistochemische und immunzytologische Methoden sowie *in vitro* Experimente zum Einsatz.

Im ersten Schritt wurde eine therapeutische Langzeitintervention im Ganztiermodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte vorgenommen, um Erkenntnisse über einen Therapieeffekt auf Hämodynamik, Gasaustausch und pulmonalvaskuläres Remodelling zu gewinnen. Dann wurde im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge die endothelabhängige und –unabhängige Vasoreaktivität nach Langzeitbehandlung mit Pumafentrine untersucht. Die tierphysiologischen Ergebnisse wurden ergänzt durch verschiedene immunhistochemische und immunzytochemische Färbungen zur Lokalisation der PDE 3A, 4A und 4D in der Lunge und in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten. Weiterhin wurde die Wirkung von Pumafentrine auf Proliferation und Apoptose *in situ* und durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in isolierten glatten Muskelzellen der Ratte charakterisiert. Außerdem wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays die cAMP-Freisetzung isolierter glatter Muskelzellen ohne oder in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Pumafentrine untersucht.

### 3. MATERIAL

*Soweit nicht im Abschnitt ‚Methoden‘ näher erläutert*

#### 3.1. INJEKTIONSLSÖSUNGEN UND SUBSTANZEN

Natronlauge 1 N (1 mol/l)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1 N (1 mol/l)	Merck, Darmstadt
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott, Wiesbach
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	Braun, Melsungen
Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml (Domitor <sup>®</sup> )	Pfizer, Karlsruhe
Atipamezolhydrochlorid (5 mg/ml) (Antisedan <sup>®</sup> )	Pfizer, Karlsruhe
Heparin (Liquemin N 25000 <sup>®</sup> )	Roche, Basel (Schweiz)
Ketaminhydrochlorid (Ketamin <sup>®</sup> )	Pharmacia, Erlangen
Hydroxyethylstärke (HAES)	Fresenius, Bad Homburg
Lidocainhydrochlorid (Xylocain <sup>®</sup> )	Astra Zeneca, Wedel
Monocrotalin (Crotaline <sup>®</sup> )	Sigma Aldrich, Steinheim
Physiologische Kochsalzlösung 0,9%	Baxter S.A., München
Beatmungsgas (50% O <sub>2</sub> , 50% N <sub>2</sub> )	Air Liquid, Siegen
Enrofloxacin (Baytril <sup>®</sup> 2,5%)	Bayer, Leverkusen

#### 3.2. TIERPRÄPARATION

Einmalspritzen (1 ml, 2 ml)	Braun, Melsungen
Kanülen, versch. Größen (BD Microlance <sup>®</sup> )	BD, Heidelberg
Medizinisches Klebeband (Durapore <sup>®</sup> )	3M, St. Paul, USA
Venenverweilkanülen (Braunüle <sup>®</sup> )	Braun, Melsungen
Zellstofftupfer (Purzellin <sup>®</sup> )	Lohmann, Rengsdorf
Einmalhandschuhe (Transaflex <sup>®</sup> )	Ansell, Surrey, UK
Mulltupfer, versch. Größen	Beese, Barbüttel
Perfusor-Leitung 150 cm	Braun, Melsungen
Combi-Stopper	Braun, Melsungen
Dreiwegehahn (Discofix <sup>®</sup> )	Braun, Melsungen

Zellulose-Handtücher	Tork, Mannheim
Haushaltsbindfaden No° 12	
Operationsbesteck	Martin, Tuttlingen
Ratten-Immobilisator (Rodent Restrainer <sup>®</sup> )	Harvard, Hugstetten
Wärmeunterlage (Thermolux <sup>®</sup> )	Witte & Suttor, Murrhardt
Beatmungspumpe (SAR-830P)	Life Science, USA
Zentraler Venenkatheter (Intradyn <sup>®</sup> )	Braun, Melsungen
Combitrans Monitoring Set Druckwandler	Braun, Melsungen

### 3.3. ISOLIERT PERFUNDIERTE LUNGE

AD/ DA Wandlerkarte	Decision Computer, Lienen
Druckaufnehmer (Pressure Transducer <sup>®</sup> )	Braun, Melsungen
Einkanal-Schreiber	Rikadenki, Freiburg
Starlingpumpe (Typ 871102)	Braun, Melsungen
Peristaltikpumpe (Masterflex 7518 <sup>®</sup> )	Novodirect, Kehl
Verstärker (Plug Sys DBA <sup>®</sup> )	Harvard, Hugstetten
Wärmepumpe (Thermo-Frigomix UB <sup>®</sup> )	Braun, Melsungen
Blutgasanalysator ABL 330	Radiometer, Kopenhagen
Gasmischung (21% O <sub>2</sub> , 5,3% CO <sub>2</sub> , 73,7% N <sub>2</sub> )	Air Liquid, Siegen
Elektrolytlösung A	Braun, Melsungen
Glucose-Lösung 10%	Braun, Melsungen
NaHCO <sub>3</sub> 0,9%	Sigma Aldrich, Steinheim
Krebs Henseleit Buffer Modified	Sigma Aldrich, Steinheim
PET-Schläuche unterschiedlicher Kaliber	

### 3.4. HISTOLOGIE/ IMMUNHISTOCHEMIE/ IMMUNZyTOLOGIE

Parafilm	über Brand, Wertheim
Rotationsmikrotom vollautomatisch (RM2165)	Leica, Nussloch
Objektträgerstrecktisch (HI1220)	Leica, Nussloch
Paraffinstreckbad (HI1210)	Leica, Nussloch
Paraffinausgießstation (EG1140H)	Leica, Nussloch

Kühlplatte (EG1150C)	Leica, Nussloch
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (TP1050)	Leica, Nussloch
Stereomikroskop, Durchlicht (DMLA)	Leica, Nussloch
Digitale Kamera (DC300F)	Leica, Nussloch
Ethanol (versch. Konzentrationen)	Fischer, Saarbrücken
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Formaldehyd, säurefrei $\geq 37\%$	Roth, Karlsruhe
Resorcin Fuchsin	Chroma, Münster
Kernechtrot Aluminiumsulfat	Chroma, Münster
Xylolersatz (Roti-Histol <sup>®</sup> )	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Deckgläser, versch. Größen	Langenbrinck, Emmendingen
Universaleinbettkassentten	Sakura, Heppenheim
Objektträger (Superfrost Plus <sup>®</sup> )	Langenbrinck, Emmendingen
Mikrotomklingen S35	Feather, Japan
Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus <sup>®</sup> )	Sigma Aldrich, Steinheim
Pikrinsäure, wässrig	Fluka, Buchs
Eindeckmedium, Xylol-löslich (Pertex <sup>®</sup> )	Medite, Burgdorf
Trypsin (DigestAll 2 <sup>®</sup> )	Zytomed, Berlin
Avidin- Biotin- Blocking Kit	Vector/ Linaris, Wertheim
Normal Horse Serum	Alexis, Grünberg
Normal Goat Serum	Alexis, Grünberg
Normal Rabbit Serum	Alexis, Grünberg
Vectastain Elite ABC Kits	
Anti- mouse	
Anti- rabbit	
Anti- goat	Vector/ Linaris, Wertheim
Vector VIP Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim
DAB Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim
Methylgrün, Kernfärbung	Vector/ Linaris, Wertheim

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger (8er Permanox Slide)	Nalge Nunc, Wiesbaden
Fluoreszenzmikroskop (Leica CTR MIC)	Leica, Nussloch
Filter I3L, AL	Leica, Nussloch
Kamera (DC300FX)	Leica, Nussloch
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg

### 3.5. ANTIKÖRPER

Anti-alpha smooth muscle actin	
Monoclonal (Clone 1A4)	
Mouse anti-human	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-alpha smooth muscle actin	
Monoclonal (Clone 1A4)	
Phycoerythrin-labelled	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-von Willebrand Faktor	
Polyclonal	
Rabbit anti-human	Dako, Hamburg
Anti-PDE 3A	
Polyclonal	
Rabbit anti-human	FabGennix, Texas, USA
Anti-PDE 4A	
Polyclonal, ab14607	
Rabbit anti-human	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PDE 4D	
Polyclonal, ab14613	
Rabbit anti-human	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PCNA (FL-261)	
Polyclonal, sc7907	
Goat anti-human	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper	
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	
Anti-rabbit Alexa Fluor 555	

Anti-goat Alexa Fluor 594	Invitrogen, Karlsruhe
<i>In situ</i> cell death detection kit (Fluorescein)	Roche, Mannheim

### 3.6. ZELLKULTUR

Medium 199	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (1%)	PAN Biotech, Aidenbach
Kollagenase Typ IV	Sigma Aldrich, Steinheim
Inkubator (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	Flow Lab., Meckenheim
Fetales Kälberserum (10%)	PAA Laboratories, Cölbe
Zellkulturflaschen (T25)	Corning, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (T75)	Greiner, Frickenhausen
beschichtete Deckgläser	Schilder, Giessen
Kollagenlösung 0,01% (Typ 1)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Trypsin/ EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Zentrifuge (Mikro 22)	Hettich, Tuttlingen
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin (37 GBq/ml)	Amersham, Freiburg
[ <sup>125</sup> I]-cAMP Radioimmunoassay	Demeditec, Kiel-Wellsee

### 3.7. GERÄTE/ SOFTWARE/ MAKROS FÜR GEFÄßMORPHOMETRIE

Computer (Q 550IW)	Leica, Nussloch
Software (Q Win, V3)	Leica, Nussloch
Makro	-Muskularisierungsgrad
	-Wandstärke
	Christoph Frank, Leica



## 4. METHODEN

### 4.1. VERSUCHSTIERE

Für die Versuche wurden männliche Ratten (*Rattus norvegicus*) des Auszuchtstammes Sprague-Dawley (Farbe albino) verwendet. Zuchtbetrieb und Lieferant der Tiere ist Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland. Die Sprague-Dawley Ratte wird bei der Firma Charles River unter dem eingetragenen Warenzeichen CD<sup>®</sup>-Ratte geführt. Das Gewicht der Ratten betrug bei Anlieferung 300-350 g, was einem Alter von etwa 8 Wochen entspricht. Vor Applikation von Substanzen (Monocrotalin, Narkose) wurde das genaue Gewicht der Tiere bestimmt und die Substanzen wurden exakt nach Gewicht verabreicht.

Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen für die Dauer der Versuche gehalten. Dabei befanden sich immer 4-5 Ratten in einem Käfig. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit Altromin<sup>®</sup> Standarddiätfutter *ad libitum*. Den Tieren stand jederzeit Leitungswasser in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin, Gaffkystraße 11, beträgt 12 Stunden pro Tag; die Umgebungstemperatur beträgt im Mittel 25° C.

### 4.2. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Der betreffende Tierversuchsantrag kann unter dem Aktenzeichen GI-20/10 Nr. 02/2003 eingesehen werden.

### 4.3. INJEKTION VON MONOCROTALIN

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

Gesunde Kontrolltiere erhielten statt Monocrotalin ein gleiches Volumen isotoner Kochsalzlösung als s.c. Injektion.

Die Tiere erhielten über die nächsten 14 Tage kontinuierlich Baytril oral 2,5% in einer Konzentration von 2 ml/ 500 ml Leitungswasser.

#### **4.4. PUMAFENTRINE-HYDROCHLORID**

Pumafentrine-Hydrochlorid (Materialnummer BYK 33043) wurde uns als hellgelbe, geruchlose, in Pulverform vorliegende Reinsubstanz von Nycomed (ehemals Altana Pharma, Byk-Gulden-Straße 2, Konstanz) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich chemisch um ein Benzonaphthyridin<sup>108</sup>. Pumafentrine wurde von Altana Pharma für die Indikationen Asthma und chronisch obstruktive Lungenerkrankung zur Entzündungshemmung und Bronchospasmolyse entwickelt und patentiert<sup>108</sup>. Die klinische Erprobung der Substanz wurde jedoch wegen ungenügender Erwartungen hinsichtlich der Halbwertszeit in Phase II gestoppt.

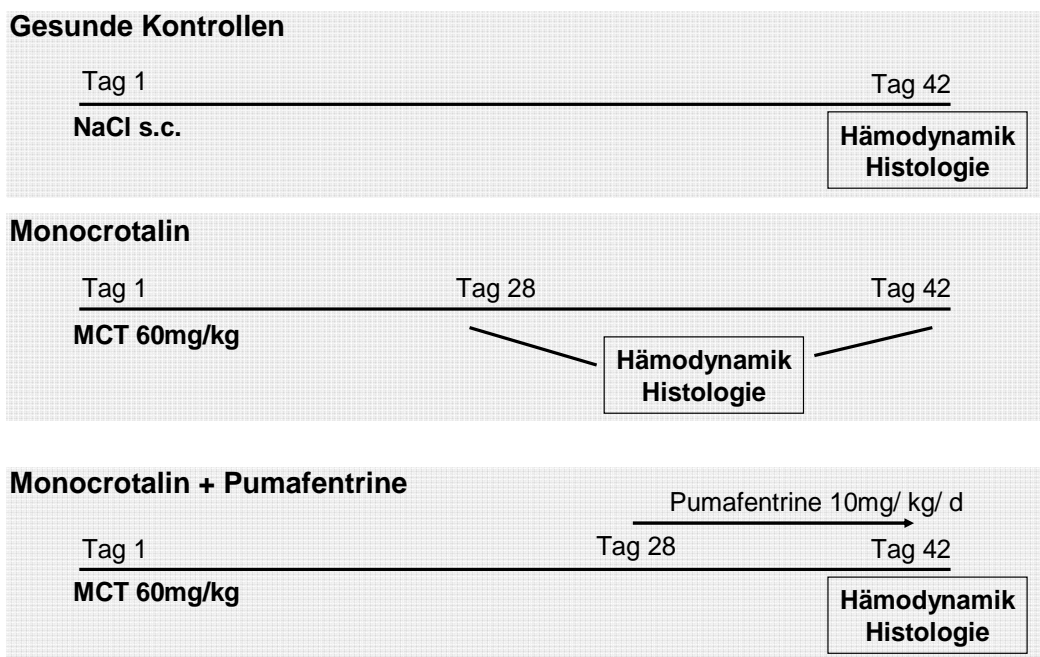
Pumafentrine-Hydrochlorid ist in Wasser gut löslich (bis ca. 10 Gew.%). In der vorliegenden Studie wurde Pumafentrine im Trinkwasser ohne weitere Zusätze gelöst. Pumafentrine ist in der hier eingesetzten Dosierung von 10 mg/kg/Tag oral zu etwa 25% bioverfügbar und hat eine mittlere Halbwertszeit von 2-4 Stunden. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit wurde nach einer therapeutisch nicht erfolgreichen Pilotstudie mit 2x täglicher oraler Gabe von 5 mg/kg per Fütterungssonde (*Daten nicht gezeigt*) für diese Studie der kontinuierlichen Gabe übers Trinkwasser den Vorzug gegeben.

Es existiert eine pharmakodynamische Studie an der Ratte mit 2x täglicher Gabe von 5 mg/kg über 3 Tage (Dr. Stefan-Lutz Wollin, persönliche Kommunikation). Die pharmakodynamische 50%-inhibitorische Dosis liegt in verschiedenen Tiermodellen nach oraler Einmalgabe bei 5 mg/kg, bei 3x täglicher Gabe bei ca. 1-3 mg/kg. Zu kontinuierlicher Applikation (wie hier übers Trinkwasser) liegen keine Daten vor. Die LD<sub>50</sub> (oral) beträgt für die Ratte 50-200 mg/kg. Als seltene Nebenwirkungen konnten in Langzeitversuchen (6 Monate) spermio gene Granulome, eine chronische Myokarditis und eine tibiale Hyperostose festgestellt werden (NOEL: 4,3 mg/kg)<sup>109</sup>. Über den Wirkstoff Pumafentrine gibt es bis dato außer der hier vorgestellten Studie<sup>110</sup> und einer Dissertation über die Wirkung von Pumafentrine in einem

Tiermodell der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung<sup>111</sup> noch keine Veröffentlichungen.

#### 4.5. CHRONISCHE THERAPEUTISCHE INTERVENTIONSSTUDIE

Die Versuchsanordnung für die chronische Interventionsstudie bestand aus fünf verschiedenen Tiergruppen: gesunde Kontrollen (n=10), Kontrollen 28 Tage und 42 Tage nach Monocrotalin (n=20) und Therapiegruppe mit Pumafentrine 10 mg/kg/Tag (n=9) (siehe nachfolgende Aufstellung).



#### 4.6. HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN AM GANZTIER

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

### **NARKOSE**

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

### **TRACHEOTOMIE**

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

### **BEATMUNG**

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

### **PRÄPARATION DER V. JUGULARIS**

Die rechte *V. jugularis* wurde etwa 1 cm vor dem Brusteingang isoliert, von anhängendem Bindegewebe befreit und mittels zweier unterlegter Bindfäden dargestellt. Der craniale Bindfaden wurde zugezogen und über den Kopf der Ratte

hinweg mit einem Klebestreifen unter Spannung fixiert, um die Vene zu strecken und die Präparation zu erleichtern. Es erfolgte eine vorsichtige Inzision der *V. jugularis* zwischen den beiden Bindfäden. Mit Hilfe einer spitzen gewinkelten Pinzette wurde die Inzision erfasst und offen gehalten. Über einen in caudaler Richtung eingebrachten flexiblen Führungsdraht wurden Mandrin und Schleuse in die Vene eingeführt. Nach Entfernung des Führungsdrahts und Zuziehen des caudalen Bindfadens wurde die Schleuse in ihrer Lage fixiert, der Mandrin herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen durch Aspiration entfernt.

#### **PRÄPARATION DER A. CAROTIS**

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

#### **MESSUNG DER VASKULÄREN DRÜCKE**

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

Druckkurve des rechten Ventrikels mit systolischen Spitzenwerten von 20-25 mmHg bei gesunden Ratten.

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

### **BLUTPROBEN**

Nach Messung der hämodynamischen Druckwerte wurden jeweils 400 µl arterielles (*A. carotis*) und gemischtvenöses (rechter Ventrikel) Blut entnommen. Die Blutproben wurden luftfrei verschlossen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Zeitdauer von der Entnahme bis zur Messung betrug etwa 20 Minuten. Die arteriellen und venösen Blutparameter Sauerstoffpartialdruck ( $P_aO_2$ ), Kohlendioxidpartialdruck ( $P_aCO_2$ ) und pH wurden mit einem ABL 330 gemessen; Hämoglobin und O<sub>2</sub>-Sättigung wurden mit einem OSM 2 Hemoximeter gemessen.

### **BERECHNUNG DES HERZZEITVOLUMENS**

Das Herzzeitvolumen wurde anhand des Fick'schen Prinzips berechnet. Dazu müssen arterielle Sauerstoffsättigung ( $C_{aO_2}$ ), venöse Sauerstoffsättigung ( $C_{vO_2}$ ) und die O<sub>2</sub>-Aufnahme bekannt sein. Mit der Formel für das Fick'sche Prinzip lässt sich das Herzzeitvolumen dann aus Sauerstoffaufnahme und arteriovenöser Sauerstoffkonzentrationsdifferenz ( $C_a - C_v$ )<sub>O<sub>2</sub></sub> berechnen (Schmidt & Thews 1995):

$$\boxed{HZV = \text{Sauerstoffaufnahme (V}_{O_2}) / (\text{arterielle O}_2\text{-Sättigung} - \text{venöse O}_2\text{-Sättigung})}$$

### ENTNAHME DER LUNGE

Nach Befeuchtung von Thorax und cranialem Abdomen mit Braunol<sup>®</sup> wurde ein medianer Hautschnitt vom Präparationsgebiet bis zur *Regio xiphoidea* gesetzt. Nach Präparation der Haut wurde der *Processus xiphoideus* mit einer Klemme erfasst und das Abdomen im epigastrischen Winkel eröffnet. Anschließend wurde die Thoraxhöhle durch Herunterziehen des Diaphragmas dargestellt und das Sternum bis zur *Apertura thoracis cranialis* in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und mit Darmklemmen seitlich fixiert. Ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Schlauch wurde in eine Inzision der *A. pulmonalis* eingeführt. In den linken Ventrikel wurde eine kleine Öffnung zum Abfluß der Spüllösung geschnitten. Die Lunge wurde über die *A. pulmonalis* mit isotoner Kochsalzlösung mit einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Anschließend wurde die Trachea zu einem Zeitpunkt der maximalen Inspiration mit einer Klemme verschlossen und die Beatmung ausgeschaltet. Der rechte Lungenflügel wurde am Hilus mit einem Bindfaden ligiert, entnommen, zur weiteren Verwendung für molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80° C eingefroren. Die linke Lungenhälfte wurde über die *A. pulmonalis* 5 Minuten lang bei einem Druck von 22 cm Wassersäule mit Zamboni's Fixativ gespült, in einen Urinbecher mit Zamboni's Fixativ überführt und über Nacht bei 4° C fixiert. Am nächsten Tag wurde die fixierte Lungenhälfte in 0,1 M PBS -/- verbracht und so bis zur weiteren Verwendung in der Histologie bei 4° C gelagert.

### PRÄPARATION DES HERZENS

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

#### **4.7. MODELL DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN UND VENTILIERTEN RATTENLUNGE**

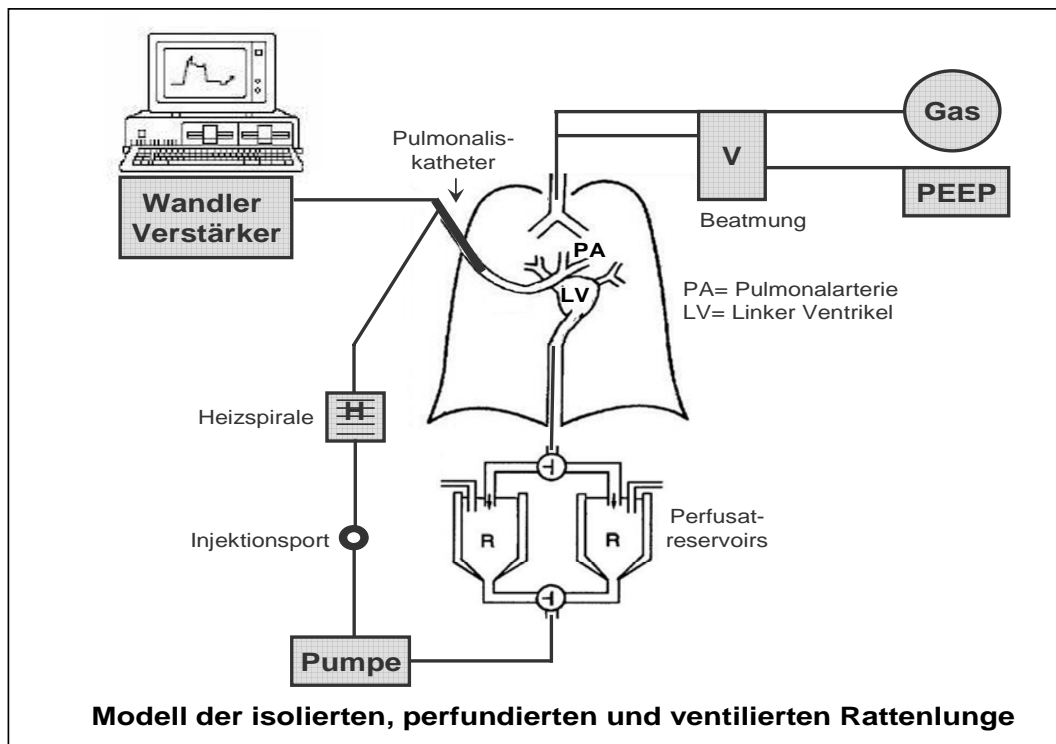
Die Versuchsanordnung für die Verwendung im Modell der isoliert perfundierten Lunge nach chronisch therapeutischer Intervention bestand aus vier verschiedenen Tiergruppen: gesunde Kontrollen (n=10), Kontrollen 42 Tage nach Monocrotalin (n=10), und Therapiegruppe mit Pumafentrine 10 mg/kg/Tag (n=10). Die Therapiegruppe erhielt vom Tag 28-42 nach MCT-Injektion die angegebene Dosis Pumafentrine im Trinkwasser. Die Narkose und Präparation der Tiere erfolgte wie im Methodenteil ‚Hämodynamische Messungen am Ganztier‘ beschrieben.

Nach Inzision des rechten Ventrikels auf Höhe des Abganges der Pulmonalarterie wurde der Pulmonalkatheter, der bereits an das Perfusionssystem angeschlossen war, in die *A. pulmonalis* eingeführt, mittels Ligatur fixiert und die Herzspitze abgesetzt. Das Herz-Lungenpaket wurde aus dem Thorax entnommen und mitsamt der Beatmungs- und Perfusionsschläuche frei hängend an einem Stativ befestigt. Zum Schließen des Perfusionskreislaufes wurde ein Katheter in den eröffneten linken Ventrikel geschoben und durch eine Ligatur fixiert. Durch ihn wurde das aus dem Lungenkreislauf kommende Perfusat in das Schlauchsystem zurückgeführt. Die Lungenperfusion erfolgte mit Hilfe einer Schlauch-Peristaltikpumpe, sodass das Organ pulsatil mit konstanter Flussgeschwindigkeit perfundiert werden konnte. Die Flußgeschwindigkeit wurde nach Anschließen der Lunge an den Kreislauf langsam auf 10 ml/min gesteigert. Die Lungen wurden mit Luft folgender Zusammensetzung ventiliert: 21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, 73,7% N<sub>2</sub>. Das Atemzugvolumen betrug 4 ml bei einer Frequenz von 65 Atemzügen pro Minute und einem PEEP von 2 cm H<sub>2</sub>O.

Als Perfusat wurde pyrogenfreier Krebs-Henseleit-Puffer mit 5% Hydroxyethylstärke (HAES) verwendet. Das Gesamtperfusatvolumen betrug 140 ml. Die Temperatur des Perfusats wurde über eine Thermopumpe reguliert und auf 40° C eingestellt. Das aus dem Reservoir kommende Perfusat gelangte durch den Katheter in der *A. pulmonalis* in die Lunge und konnte schließlich über den Katheter im linken Ventrikel wieder abfließen. Nach Passage des Herz-Lungen-Komplexes wurde die Perfusionsflüssigkeit in das zugeschaltete Vorratsgefäß zurückgeleitet (*siehe Abbildung 5*). Der pH-Wert des Perfusats betrug 7,3-7,4 und wurde bei Bedarf mit Natriumbicarbonat oder Elektrolytlösung eingestellt. Nach einer 20-minütigen *Steady state*- Phase wurde mit Acetylcholin (ACh) oder Natrium-Nitroprussid (SNP)



eine kumulative Dosis-Wirkungskurve erzeugt. Dabei wurden zuerst durch sukzessive Zugabe von Phenylephrin (PE) ( $0,1-100\mu\text{M}$ ) die Gefäße präkonstringiert und somit der pulmonalarterielle Druck in allen Gruppen auf  $10 \pm 2,4$  mmHg erhöht. Nach Erreichen eines Plateaus wurden die Lungen alle 10 Minuten mit steigenden Konzentrationen von ACh ( $1\text{nM}-100\mu\text{M}$ ) oder SNP ( $10\text{nM}-100\mu\text{M}$ ) vasodilatiert. Dazu wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe für die ACh-Versuche und 5 Tiere für die SNP-Versuche verwendet.



**ABBILDUNG 5.** SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MODELLS DER ISOLIERTEN, PERFUNDIERTEN UND VENTILIERTEN RATTENLUNGE.

#### 4.8. HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Die in PBS -/- gelagerten Lungenhälften wurden parallel zur *Facies diaphragmatica* in jeweils drei 3-5 mm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettkassetten überführt. Die Gewebestücke wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert. Danach wurden sie in Paraffin eingegossen.

**ZAMBONI'S FIXATIV**

2% iges Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 15% Pikrinsäure; pH 7,3-7,4

**ELASTICA KERNECHTROT FÄRBUNG**

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die 5 µm dicken Schnitte zur Darstellung der elastischen Fasern über Nacht in Resorcin Fuchsin gefärbt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot Aluminiumsulfat. Die Schnitte wurden nach Dehydrierung und Immersion in Xylol mit harzigem Medium (Pertex<sup>®</sup>) eingedeckt.

**IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG FÜR PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN**

Nach Entparaffinierung, Rehydrierung, Blockierung der endogenen Peroxidasen in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol, Demaskierung der Epitope mit Hitzebehandlung (10-minütiges Kochen der Schnitte in 0,01 M Citratpuffer, pH 6,0 in einem handelsüblichen Reiskocher) und Blockierung unspezifischer Bindungen mit Serum der Tierart, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde (10% Serum in PBS) wurden die 3 µm dicken Schnitte mit einem Primärantikörper gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (rabbit polyclonal PCNA, Santa Cruz Biotechnologies, Verdünnung 1:200 in 3% BSA in PBS) über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Sekundärantikörper Alexa 555 goat anti-rabbit IgG, nach Gegenfärbung der Kerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) wurden die Schnitte mit DAKO fluorescent mounting medium eingedeckt.

**IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG FÜR PDE 3A IN RATTENLUNGEN**

Prinzipiell wurde die immunhistochemische Färbung für PDE 3A wie im vorangegangenen Abschnitt für PCNA beschrieben durchgeführt. Sie unterschied sich in der Verdünnung (1:100, Inkubation über Nacht bei 4° C) des primären Antikörpers (rabbit polyclonal PDE 3A, FabGennix) und der Detektion. Zur Detektion wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-basiertes System (Vectastain Elite ABC und Vector VIP Substratkit, Vector/ Linaris) benutzt. Für die Gegenfärbung der Kerne wurde Methylgrün benutzt.

### **IMMUNHISTOCHEMISCHE DOPPELFÄRBUNG**

Prinzipiell erfolgte die immunhistochemische Doppelfärbung wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die Demaskierung der Epitope erfolgte hier proteolytisch mit Trypsin (DigestAll). Die Verdünnung des Antikörpers gegen glattmuskuläres alpha-actin (mouse monoclonal smooth muscle alpha actin, Clone 1A4, Sigma) zur Visualisierung der *Tunica Media* in muskularisierten Gefäßen war 1:1000, die Verdünnung des Antikörpers gegen endothelialen von Willebrand Faktor (vWF) (rabbit polyclonal von Willebrand Factor, Dako) war 1:900. Die Inkubation der Primärantikörper betrug jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Avidin-Biotin-Peroxidase-basierten Vectastain Elite ABC Kits. Zur Visualisierung wurden farblich unterschiedliche Chromogene benutzt: für alpha-actin Vector VIP (violett), zur Darstellung des vWF 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (braun).

### **IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG ISOLierter GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN**

Als Immunofluoreszenzfärbung wurde eine indirekte Detektionsmethode mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gewählt. Als negative Kontrolle wurde eine Färbung ohne Primärantikörper durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde eine Färbung gegen glattmuskuläres alpha-actin (Clone 1A4, Sigma-Aldrich) verwendet. Nach Beschichtung eines Objektträgers mit abnehmbaren Kammern mit Kollagen wurden Zellen gesunder Ratten oder Monocrotalin-behandelter Ratten in P1 in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Kammer ausgesät. Nach 4 Tagen wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen vorsichtig mit Waschpuffer (0,1% BSA in PBS, pH 7,4) gewaschen. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels eines eiskalten Gemisches aus Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1 folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS. Nach anschließendem Waschen wurden die polyklonalen Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden dabei wie folgt verdünnt: anti-PDE 3A (FabGennix) 1:100, anti-PDE 4A (Abcam) 1:250, anti-PDE 4D (Abcam) 1:150. Zur negativen Kontrolle wurde 3% BSA in PBS verwendet. Danach wurde erneut gewaschen und die entsprechenden fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper (Molecular Probes, 1:100 in Waschpuffer verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln appliziert. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte

mit DAPI. Die Immunfluoreszenzfärbung der PASMC wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica CTR MIC) und eines Computers mit der Software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet. Obwohl für jeden Antikörper jeweils dieselbe Belichtungszeit und Verstärkung für die PASMC gesunder Ratten und Monocrotalin-behandelter Ratten verwendet wurde, ist eine quantitative Auswertung mit der Immunfluoreszenzmethode grundsätzlich nicht möglich.

#### ***IN SITU* APOPTOSE DETEKTION IN PARAFFINSCHNITTEN**

Zur Detektierung apoptotischer Gefäßzellen wurde ein *in situ* Apoptose Detektionskit der Firma Roche, basierend auf der TUNEL-Methode (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling), angewendet<sup>112</sup>. Während des programmierten Zelltodes (Apoptose) wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die an den Bruchenden freiwerdenden Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) werden durch das Enzym TdT mit Fluorescein-markierten Nukleotiden versehen, welche im folgenden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden können. Dieses Detektionskit erkennt preferentiell apoptotische Zellen, und nicht nekrotische Zellen oder Strangbrüche durch Bestrahlung oder Zytostatika<sup>113, 114</sup>.

Nach Deparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte wurden diese in 0,1 M Citratpuffer pH 6,0 5 Minuten in der Mikrowelle bei 350 W gekocht. Nach Waschen mit PBS wurde der frisch vorbereitete TUNEL-Reaction-Mix (1 Teil TdT-Enzymlösung auf 9 Teile Label-Solution) auf die Schnitte aufgetragen und für 1 h bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Als negative Kontrolle wurde ein Gewebeschnitt in gleicher Weise mit Label-Solution, jedoch ohne Zugabe von TdT-Enzymlösung inkubiert. Nach Waschen, Gegenfärbung der Kerne mit DAPI und Eindecken wurden die Schnitte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

#### **4.9. MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER LUNGENGEFÄßE**

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

Die Schnitte wurden geblindet und numeriert und ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen analysiert.

### **MEDIALE WANDSTÄRKE**

Zur Bestimmung der medialen Wandstärke wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mit Elastica Kernechtrot gefärbt wie oben protokolliert.

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

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

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

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

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

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

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

### **MUSKULARISIERUNGSGRAD**

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte mit immunhistochemischer Doppelfärbung gegen glattmuskuläres alpha actin und von Willebrand Faktor (Faktor VIII) gefärbt wie beschrieben.

Bei 400 x Vergrößerung wurden pro Tier 100 kleine Lungengefäße in einer Größenordnung von 10 bis 50 µm externem Gefäßdurchmesser untersucht und als voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert kategorisiert. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen wurde der Anteil anti-alpha smooth muscle actin positiver (violetter) Gefäßwandbereiche bestimmt. Dies wurde

halbautomatisch in einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung von der speziell von Leica angefertigten Software getätigt. Nichtmuskularisierte Gefäße wurden in gleicher Art und Weise durch die (braune) endotheliale anti-von Willebrand Faktor Färbung deutlich gemacht.

Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

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

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

#### 4.10. ZELLISOLIERUNG VON PASMC

Zur Gewinnung von PASMC wurden gesunde Ratten und Ratten 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion (60 mg/kg) verwendet. Die Lunge wurde aus dem Tierkörper entnommen, und der Gefäßbaum wurde, an der *A. pulmonalis* beginnend, so weit nach distal wie möglich von anhängendem Lungengewebe freipräpariert. Die Gefäße wurden längs aufgeschnitten und Endothel sowie Adventitia durch Abkratzen weitestgehend von der *Tunica muscularis* entfernt. Der Gefäßbaum wurde (in Anlehnung an die Methode von MacLean *et. al.* <sup>40</sup>) in Stücke geteilt, wobei eine Trennung des proximalen und distalen Teiles des Gefäßbaumes erfolgte. Für die Versuche dieser Arbeit wurden nur PASMCs aus dem distalen Teil des Lungengefäßbettes verwendet (Durchmesser der Gefäße ca. 100-300  $\mu\text{m}$ ), dies entspricht den kleinen Widerstandsgefäßen.

Zum Kultivieren der Gefäßstücke und der PASMC wurde Medium 199 mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin verwendet.

Die isolierten Gefäßstückchen wurden in Zellkulturflaschen (T25 oder T75) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Zellkulturmedium durch neues ersetzt. Bei Konfluenz der Zellen erfolgte die Passagierung. Dazu wurden nach 1-2 minütigem Einwirken von Trypsin/ EDTA (PAN Biotech, Aidenbach) im Inkubator die abgelösten Zellen in FCS aufgenommen und die Zellkulturflasche nochmals mit PBS ausgewaschen. Mit Hilfe einer Zentrifuge (Mikro 22, Hettich, Tuttlingen) wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Aussaat erfolgte entweder für Versuchszwecke auf Kollagen-beschichtete Deckgläser oder zur weiteren Kultivierung in neue Zellkulturflaschen. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37° C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5%.

#### **4.11. PROLIFERATIONSASSAY FÜR ISOLIERTE GLATTE MUSKELZELLEN**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation gemessen. Hierzu wurden PASMC von P 2 in einer Multiwellplatte in einer Dichte von 4 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in 10% FCS/ Medium 199 kultiviert. Die Zellen wurden synchronisiert durch 2-stündige Inkubation mit serumfreiem Medium 199, gefolgt von 72 Stunden Serumentzug (0,1% FCS in Medium 199). Dann wurden sie zur Induktion des Wiedereintritts in den Zellzyklus mit 10% FCS/ Medium 199 stimuliert. Nach Behandlung mit 0, 0.01, 0.1 und 1 µM Pumafentrine während der letzten 12 Stunden des Serumentzugs und während der Stimulationsphase wurden die Zellen mit 1,5 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro Well gepulst. Dieses wird von sich teilenden Zellen in die DNA eingebaut. Nach 12 Stunden wurden die Zellen gewaschen, lysiert und über eine Filtermatte geleitet, welche hochmolekulare DNA zurückhält. Die beta-Strahlungsaktivität wurde in einem Zählgerät in Impulsen pro Minute (cpm) gemessen.

#### **4.12. RADIOIMMUNOASSAY ZUR DETEKTION VON cAMP**

Für die Analyse der cAMP-Produktion wurden PASMC in Sechs-well Platten ausgesät. Die PASMC wurden mit Pumafentrine in verschiedenen Konzentrationen (0, 0.01, 0.1 und 1 µM) 1 Stunde lang inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die Reaktion mit 96% Ethanol gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert,

getrocknet und in 500 µl RIA-Puffer (150 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) resuspendiert. cAMP im Überstand wurde mit Hilfe eines [<sup>125</sup>I]-cAMP-Radioimmunoassays (Demediatech Diagnostics) nach Angaben des Herstellers gegen eine Standardkurve (Kalibratoren im Testumfang enthalten) ermittelt, die Proteinmenge in den Proben mittels der Bradford-Methode spektrophotometrisch bei 595 nm (Coomassie Bradford Protein Assay Kit, Pierce) bestimmt und die Ergebnisse wurden als pmol cAMP/mg Protein für jede Gruppe angegeben. Pro Gruppe wurden die Mittelwerte von 3 Ansätzen in Doppelbestimmungen für die Auswertung herangezogen.

#### **4.13. STATISTISCHE AUSWERTUNG**

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



## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. ERMITTELTE PARAMETER

# **ÜBERLEBENSRATE UND KLINISCHE PARAMETER** unter Langzeittherapie mit Pumafentrine im Vergleich zu placebo-behandelten Kontrollen im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie

---

# **HÄMODYNAMISCHE PARAMETER IM GANZTIERMODELL DER MONOCROTALIN-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE**

Invasiv gemessener systemisch-arterieller Druck

Invasiv gemessener rechtsventrikulärer Druck

Herzzeitvolumen (Cardiac Index)

Arterielle Sauerstoffkonzentration

Vasoreaktivitätstestung nach chronischer Therapie mit Pumafentrine im Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Lunge

---

# **STRUKTURELLE UND HISTOMORPHOMETRISCHE PARAMETER IM MONOCROTALIN-MODELL**

Gewichtsverhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum als Maß für die Rechtsherzhypertrophie

Morphometrie der Pulmonalarterien

Muskularisierungsgrad (distale Pulmonalarterien)

Mediale Wandstärke (3 Gefäßkategorien)

Lumenfläche der kleinen Pulmonalarterien

---

# **HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE/ IMMUNZYTOCHEMISCHE  
UNTERSUCHUNGEN**

Immunhistologische Darstellung der PDE 3A in Rattenlungen

Immunzytochemische Darstellung der PDE 3A, 4A und 4D in  
isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte

Repräsentative Fotos zu Muskularisierungsgrad und Wandstärke in  
gesunden, kranken und behandelten Ratten

---

# **IN SITU PROLIFERATION UND APOPTOSE**

Darstellung der Zellproliferation *in situ* mittels immunhistochemischer  
Färbung von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Darstellung der Apoptose *in situ* mittels TUNEL-Assay

---

# **IN VITRO VERSUCHE MIT ISOLIERTEN PULMONALARTERIELLEN GLATTEN  
MUSKELZELLEN GESUNDER UND MONOCROTALIN-BEHANDELTER RATTEN**

Einfluß von Pumafentrine auf die Proliferation isolierter glatter  
Gefäßmuskelzellen der Ratte

Einfluß von Pumafentrine auf die cAMP-Freisetzung in isolierten glatten  
Gefäßmuskelzellen der Ratte

## 5.2. ÜBERLEBENSRATE UND KLINISCHE PARAMETER

In der Monocrotalin-Gruppe, welche statt Pumafentrine im Trinkwasser normales Leitungswasser erhielt, war die Überlebensrate am 42. Tag nach Injektion von Monocrotalin auf 60% reduziert (12 von 20 Tieren überlebten bis zum 42. Tag). Die Langzeittherapie mit Pumafentrine (10 mg/kg/d) verbesserte die Überlebensrate leicht auf 78% (7 der 9 mit Pumafentrine behandelten Tiere überlebten bis zum 42. Tag). Aufgrund der geringen n-Zahlen wurden jedoch keine statistischen Tests zur Signifikanz dieses Ergebnisses durchgeführt.

Klinischer Parameter	MCT	MCT+ Pumafentrine
Überlebensrate	12/20 [60%]	7/9 [77,7%]
Transsudativer Erguß	4/20 [20%]	0/9 [0%]
Gesichtsödem	9/20 [45%]	3/9 [33%]
Dilatation V. jugularis	+ +	+
Stauungsleber	+ +	+
Gewichtsverlust	+	+
Lymphödeme der Hintergliedmaße	0/20 [0%]	4/9 [44%]
Reversibler Penisprolaps	0/20 [0%]	2/9 [22%]

**TABELLE 3.** KLINISCHE PARAMETER der Monocrotalin-behandelten Ratten mit oder ohne Langzeittherapie mit Pumafentrine-Hydrochlorid.

Die unbehandelten Monocrotalin-Kontrolltiere entwickelten im Verlauf der Erkrankung deutliche klinische Anzeichen allgemeinen Unwohlseins (Gewichtsverlust, gesträubtes Fell, verminderter Pfliegetrieb, Apathie, gekauerte Haltung) und pulmonaler Hypertonie (pumpende Atmung, gestreckter Kopf, Zyanose der Schleimhäute, Gesichtsödeme). Nach Dekompensation trat der Tod durch Rechtsherzversagen ein.

In der Sektion bzw. Präparation imponierte bei allen Tieren ein stark hypertrophes und dilatiertes rechtes Herz, eine Dilatation der *A. pulmonalis*, eine hochgradige Stauung der *V. cava cranialis* und *V. jugularis*, eine mittel- bis hochgradige subakut-chronische Stauungsleber und in einigen Fällen mittel- bis hochgradige transsudative Thoraxergüsse. Das spezifische Gewicht der Ergußflüssigkeit betrug immer  $< 1015$ , es wurde mit einem Handrefraktometer (Fa. Winopal, Ahsbeck) nachgemessen.

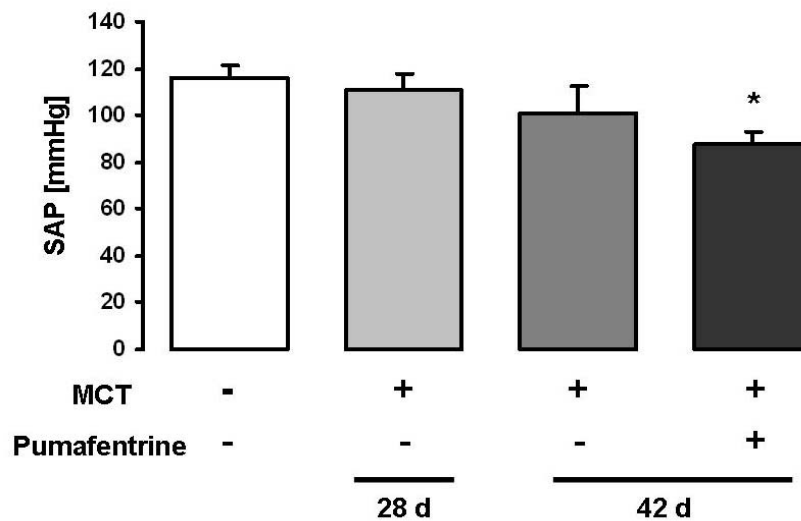
Die mit Pumafentrine behandelten Ratten zeigten dagegen deutlich geringere klinische Anzeichen einer Rechtsherz- und Lungenbelastung (*siehe Tabelle 3*).

Vier der neun mit Pumafentrine 10 mg/kg/d behandelten Ratten entwickelten in der zweiten Therapiewoche bei Palpation schmerzlose und teilweise reversible Weichteilschwellungen der Hintergliedmaßen. Es war immer nur eine Gliedmaße betroffen. Bei den Schwellungen handelte es sich vermutlich um Lymphödeme. Zwei der neun Ratten zeigten außerdem einen reversiblen Penisprolaps. Diese Nebenwirkungen sind bekannt und wurden uns als rattenspezifische Phänomene erklärt, die, soweit bekannt, bei anderen Tierarten und beim Menschen nicht aufgetreten sind und deren genaue Ursache unbekannt ist (Christian Schudt, Altana Pharma, persönliche Mitteilung). Als seltene Nebenwirkungen konnte Altana Pharma in Langzeitstudien (6 Monate) spermiogene Granulome, eine chronische Myokarditis und eine tibiale Hyperostose bei mit Pumafentrine behandelten Ratten feststellen (NOEL 4,3 mg/kg)<sup>109</sup>. Solche sichtbaren Veränderungen der Hoden, des Herzens oder der Knochen oder andere Nebenwirkungen konnten in der hier beschriebenen Studie nicht beobachtet werden.

### **5.3. SYSTEMISCH-ARTERIELLER BLUTDRUCK**

Pumafentrine wurde für die chronisch-therapeutische Interventionsstudie in einer Dosis von 10 mg/kg/d im Trinkwasser von Tag 28 bis 42 nach Monocrotalin-Injektion eingesetzt. Die Tiere zeigten nach Monocrotalin-Behandlung einen leichten, jedoch gegenüber gesunden Kontrollen nicht signifikanten Abfall im systemisch-arteriellen Druck, der wahrscheinlich durch das verminderte

Herzeitvolumen und die periphere Kongestion durch die pulmonale Hypertonie bedingt ist. Die Therapie mit Pumafentrine hatte einen zusätzlichen leichten, verglichen mit gesunden Kontrollen signifikanten, verglichen mit Monocrotalin-behandelten Ratten nicht signifikanten depressiven Einfluß auf den systemisch-arteriellen Druck, was auf die nicht-pulmonalselektive vasodilatorische Wirkung der Substanz zurückzuführen ist, da die PDE 3 und 4 nicht selektiv im Gefäßbett der Lunge, sondern auch im peripheren Gefäßsystem exprimiert werden <sup>115</sup>.

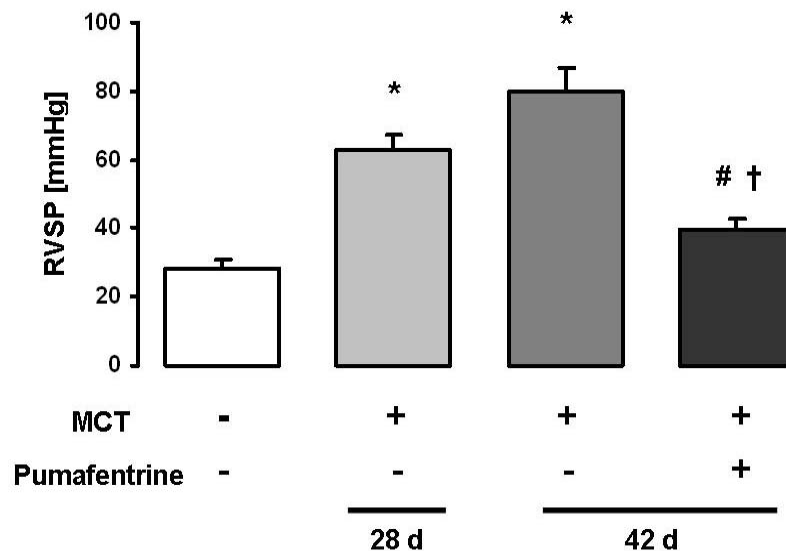


**ABBILDUNG 6.** INVASIV GEMESSENER SYSTEMISCH-ARTERIELLER DRUCK IN DEN VERSCHIEDENEN THERAPIEGRUPPEN. In Monocrotalin-behandelten Ratten kommt es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Abfall des systemisch-arteriellen Druckes gegenüber gesunden Kontrolltieren. In Pumafentrine-behandelten Ratten ist der systemisch-arterielle Druck gegenüber gesunden Kontrollen, nicht jedoch gegenüber Monocrotalin-behandelten Ratten signifikant verringert (\*  $p < 0,01$  vs. gesunden Kontrollen).

#### 5.4. RECHTSVENTRIKULÄRER DRUCK

Der Druck in der rechten Herzkammer wurde invasiv unter standardisierter Narkose gemessen. Dabei wurde über die rechte Jugularvene ein flüssigkeitsgefüllter Katheter in die rechte Herzkammer vorgeschoben und der rechtsventrikuläre Druck über einen Zeitraum von 10 Minuten aufgezeichnet. In gesunden Kontrollen betrug der Mittelwert  $28,0 \pm 3,0$  mmHg. 28 Tage nach Monocrotalin-Injektion hatte sich der

rechtsventrikuläre Druck verdoppelt ( $63,0 \pm 4,2$  mmHg). 42 Tage nach dem initialen toxischen Stimulus betrug der rechtsventrikuläre Druck  $79,8 \pm 7,0$  mmHg. Die 14-tägige Therapie mit Pumafentrine konnte den rechtsventrikulären Druck auf  $39,45 \pm 3,5$  mmHg senken, was sogar deutlich unter dem Wert der Kontrolltiere 28 Tage nach MCT-Injektion liegt.



**ABBILDUNG 7.** EINFLUSS DER CHRONISCHEN THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DEN RECHTSVENTRIKULÄR-SYSTOLISCHEN DRUCK. Die invasive Messung des rechtsventrikulär-systolischen Druckes fand an gesunden Ratten sowie an Ratten 28 und 42 Tage nach MCT-Injektion statt. Die Therapiegruppe erhielt vom Tag 28-42 nach Monocrotalin-Injektion Pumafentrine in der Dosis von 10 mg/kg/d. (\*  $p < 0,001$  vs. gesunden Kontrollen; #  $p < 0,01$  vs. MCT 28d; †  $p < 0,001$  vs. MCT 42d).

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

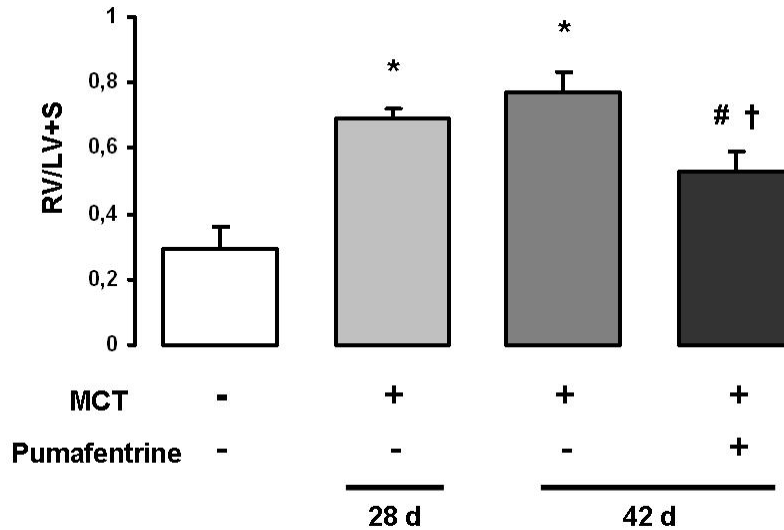
### 5.5. GEWICHT DES RECHTEN HERZENS (RECHTSHERZHYPERTROPHIE)

Durch die Drucksteigerung im Lungenkreislauf in den Monocrotalin-behandelten Ratten kam es kompensatorisch zu einer progressiven Rechtsherzhypertrophie (chronisches *Cor pulmonale*). Das Gewicht des rechten Herzens wurde als Ratio zum Gewicht des linken Herzens plus Septum angegeben, da bekannt ist, dass es bei Monocrotalin-behandelten Ratten nicht oder nur minimal zu einer Beteiligung des linken Herzens kommt. Die Ratio des Trockengewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+ S) erhöhte sich von  $0,29 \pm 0,07$  (gesunde Kontrollen) auf  $0,69 \pm 0,03$  28 Tage nach Monocrotalin-Injektion.

	SAP [mmHg]	RVSP [mmHg]	RV/LV+S [mmHg]
gesund	$116 \pm 5,0$	$28,0 \pm 3,0$	$0,29 \pm 0,07$
28 Tage nach MCT	$110,5 \pm 7,0$	$63,0 \pm 4,2$ *	$0,69 \pm 0,03$ *
42 Tage nach MCT	$100,8 \pm 12,0$	$79,8 \pm 7,0$ *	$0,77 \pm 0,06$ *
Pumafentrine 10mg/kg	$87,34 \pm 5,6$ *	$39,45 \pm 3,5$ #†	$0,53 \pm 0,04$ #†

**TABELLE 4.** EFFEKTE VON MONOCROTALIN UND PUMAFENTRINE AUF DEN SYSTEMISCH-ARTERIELLEN UND DEN RECHTSVENTRIKULÄREN DRUCK SOWIE AUF DIE RECHTSHERZHYPERTROPHIE DER RATTEN (\*  $p < 0,05$  vs. gesunden Kontrollen; #  $p < 0,05$  vs. MCT 28 d; †  $p < 0,05$  vs. MCT 42d).

Die Therapie mit Pumafentrine führte durch die Senkung des Gefäßwiderstandes im Lungenkreislauf zu einer Entlastung des rechten Herzens und somit zu einer signifikanten Reduktion dieser Ratio auf  $0,53 \pm 0,04$ . Dies korreliert mit den verbesserten pulmonalvaskulären Drücken der Therapiegruppe und der Regression des Gefäßwandumbaus unter Therapie.



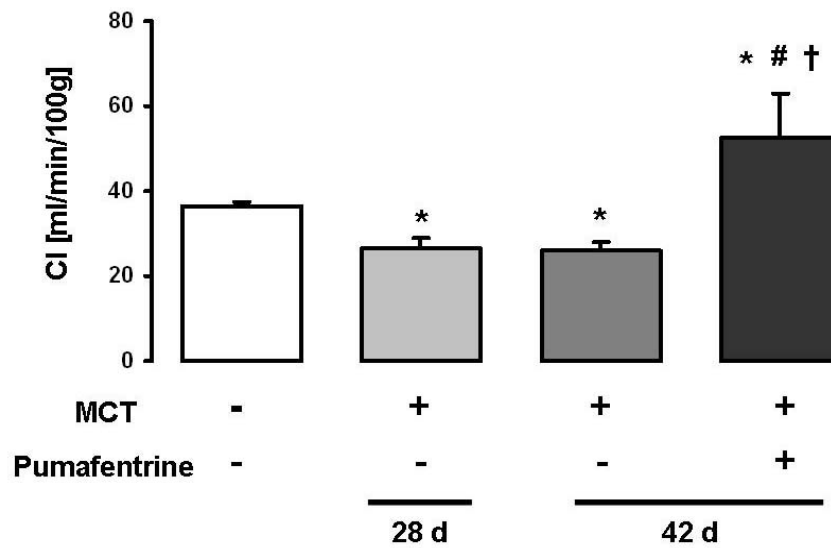
**ABBILDUNG 8.** EINFLUß DER THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DIE RECHTSHERZHYPERTROPHIE IM MONOCROTALIN-MODELL DER PULMONALEN HYPERTONIE. Dargestellt ist das Verhältnis des Trockengewichtes des rechten Ventrikels zu dem des linken Ventrikels plus Septum in den einzelnen Tiergruppen als Maß für die Rechtsherzhypertrophie (RV/LV+S). (\*  $p < 0,001$  vs. gesunden Kontrollen; #  $p < 0,05$  vs. MCT 28d; †  $p < 0,05$  vs. MCT 42d).

## 5.6. HERZZEITVOLUMEN UND ARTERIELLE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG

Das Herzzeitvolumen der einzelnen Gruppen wurde angegeben in ml/min bezogen auf 100 g Körpergewicht (KG) (Cardiac Index). Es wurde nach dem Fick'schen Prinzip aus der arteriellen Sauerstoffsättigung ( $C_{aO_2}$ ), venösen Sauerstoffsättigung ( $C_{vO_2}$ ) und der  $O_2$ -Aufnahme berechnet (siehe *Materialien und Methoden*).

Verglichen mit Kontrolltieren ( $36,4 \pm 1,3$  ml/min/100 g Körpergewicht) sank das Herzzeitvolumen durch die progressive Insuffizienz des rechten Ventrikels 6 Wochen nach Monocrotalin-Injektion signifikant ab. 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion war das Herzzeitvolumen auf zwei Drittel des Ausgangswertes der gesunden Kontrollen gesunken (siehe *Tabelle 5*). Eine zweiwöchige Behandlung der Ratten mit Pumafentrine in einer Dosis von 10 mg/kg/d hatte eine vollständige Wiederherstellung des Herzzeitvolumens zur Folge. Dabei fällt auf, dass das Herzzeitvolumen sogar gegenüber den gesunden Kontrollen gesteigert war. Dies ist wahrscheinlich auf den positiv inotropen Effekt der PDE 3-Inhibition durch Pumafentrine zurückzuführen.

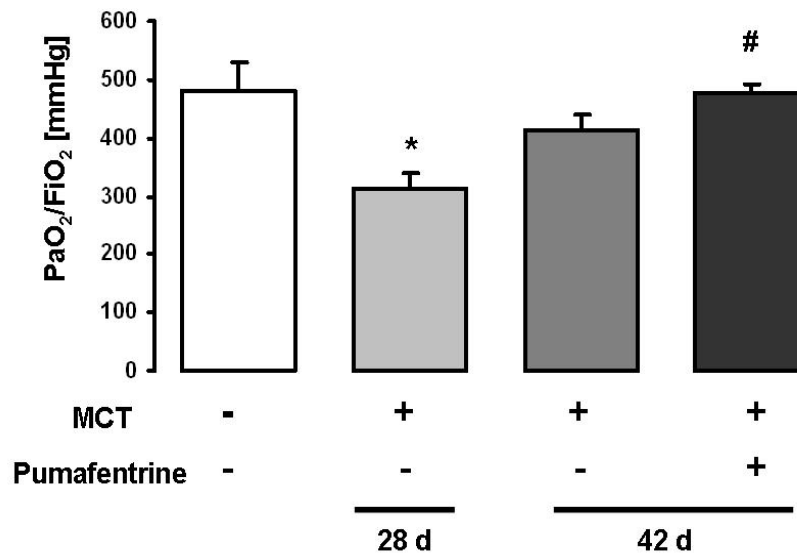




**ABBILDUNG 9.** EINFLUSS DER THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DAS HERZZEITVOLUMEN, angegeben als Cardiac Index (CI) in ml/min bezogen auf 100 g Körpergewicht. Das Herzzeitvolumen wurde nach dem Fick' schen Prinzip aus der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz errechnet. (\* p< 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p< 0,05 vs. MCT 28 d; † p< 0,05 vs. MCT 42d)

	Cardiac Index [ml/min/100g]	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> [mmHg]	Hämoglobin [g/dl]
gesund	36,4 ± 1,3	480 ± 49	10,94 ± 0,33
28 Tage nach MCT	26,6 ± 2,3 *	312 ± 28 *	11,82 ± 0,55
42 Tage nach MCT	25,8 ± 2,4 *	412 ± 28	11,53 ± 0,45
Pumafentrine 10mg/kg	52,6 ± 10,3 *#†	476 ± 17 #	10,69 ± 0,78

**TABELLE 5.** EINFLUSS VON PUMAFENTRINE UND MONOCROTALIN AUF DAS HERZZEITVOLUMEN, DIE ARTERIELLE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG UND DIE HÄMOGLOBINKONZENTRATION. (\* p< 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p< 0,05 vs. MCT 28 d; † p< 0,05 vs. MCT 42d)



**ABBILDUNG 10.** EINFLUß DER CHRONISCHEN THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DIE ARTERIELLE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG. Die arterielle Sauerstoffsättigung wird als Ratio aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>) und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) angegeben (\* p < 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p < 0,05 vs. MCT 28 d).

Der Gasaustausch verbesserte sich durch die Langzeittherapie mit Pumafentrine ebenfalls signifikant. Die arterielle Sauerstoffsättigung fiel in MCT-behandelten Ratten stark ab und erreichte unter Therapie mit Pumafentrine wieder eine vollständige Normalisierung. Die Hämoglobin-Werte unterschieden sich nicht signifikant in den einzelnen Tiergruppen (*siehe auch Tabelle 5*).

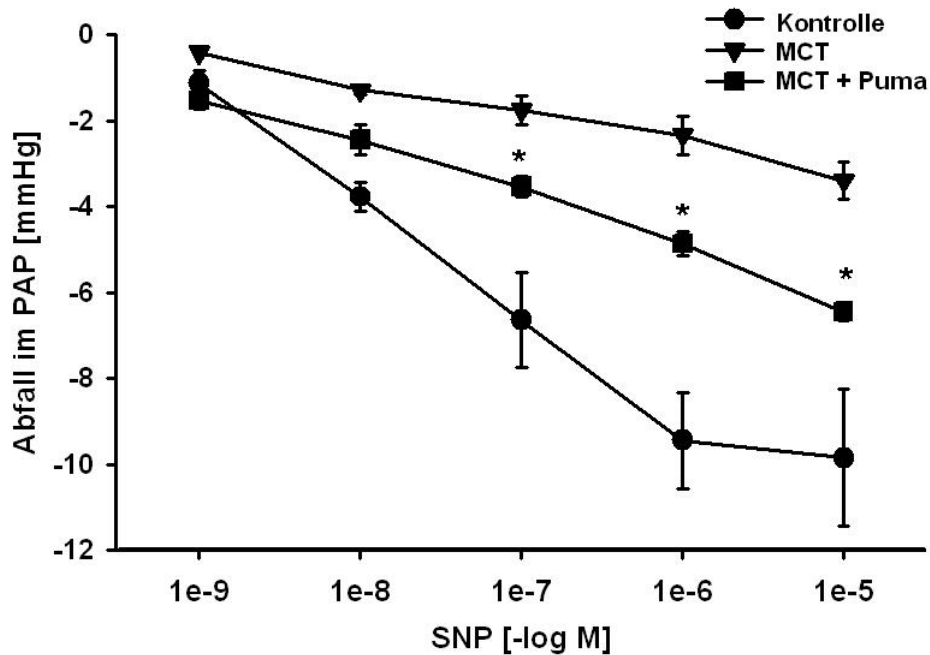
## 5.7. VASOREAKTIVITÄTSTESTUNG

Für das Modell der isoliert-perfundierten und ventilerten Rattenlunge wurden insgesamt 30 Tiere untersucht: gesunde Kontrollen + ACh (n=5), MCT<sub>42d</sub> + ACh (n=5), MCT + Pumafentrine<sub>d28-42</sub> + ACh (n=5), gesunde Kontrollen + SNP (n=5), MCT<sub>42d</sub> + SNP (n=5), MCT + Pumafentrine<sub>d28-42</sub> + SNP (n=5).

### VASODILATATION DURCH NATRIUM-NITROPRUSSID

Natrium-Nitroprussid (SNP) (10 nM-100 µM) induzierte eine kumulative, konzentrationsabhängige Vasodilatation in den isoliert perfundierten und ventilerten Lungen aller Therapiegruppen. Der vasodilative Effekt (E<sub>max</sub>) war deutlich geringer

in Monocrotalin-injizierten Ratten ( $E_{\max} 3,4 \pm 0,43$  mmHg) als in gesunden Kontrolltieren ( $E_{\max} 9,85 \pm 1,6$  mmHg). Die chronische Therapie pulmonalhypertensiver Ratten mit Pumafentrine konnte die endothelunabhängige Vasodilatation nach Gabe von SNP signifikant verbessern ( $E_{\max} 6,45 \pm 0,22$  mmHg).

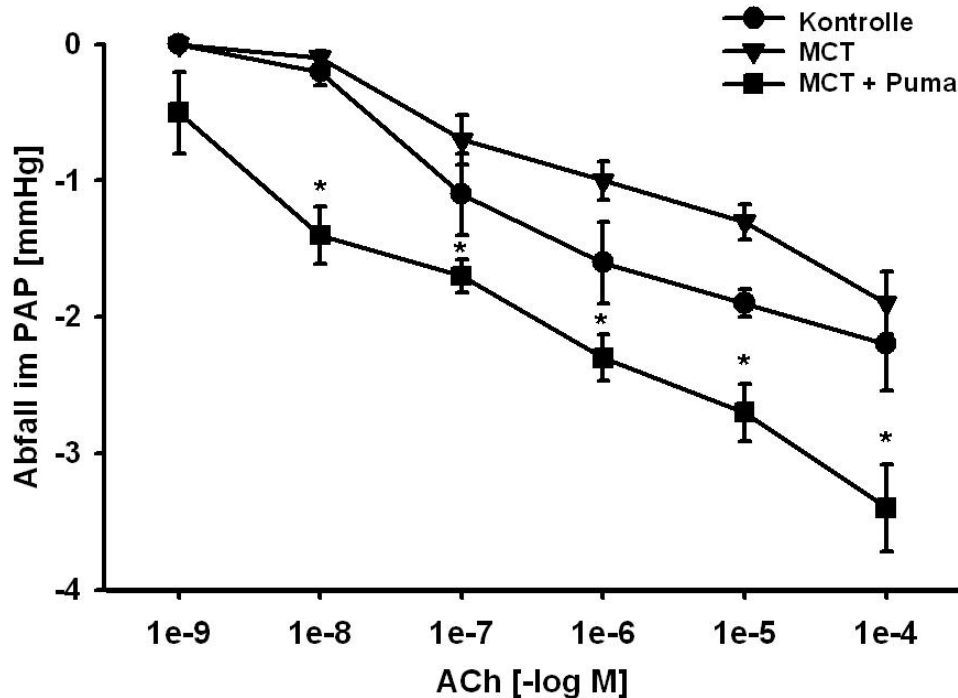


**ABBILDUNG 11.** EFFEKT DER CHRONISCHEN THERAPIE MIT PUMAFENTRINE VOM TAG 28-42 NACH MONOCROTALIN-INJEKTION AUF DIE DURCH NATRIUM-NITROPRUSSID (SNP) INDUZIERTE ENDOTHELUNABHÄNGIGE VASODILATATION im Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Rattenlunge (\*  $p < 0,05$  vs. MCT).

#### VASODILATATION DURCH ACETYLCHOLIN

Die Gabe von Acetylcholin (ACh) in steigenden Konzentrationen (1 nM-100  $\mu$ M) induzierte in allen Gruppen eine kumulative, konzentrationsabhängige Vasodilatation im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge. Die ACh-induzierte Vasodilatation in den Lungen Monocrotalin-behandelter Ratten unterschied sich nicht signifikant von der Vasodilatation in gesunden Kontrollen ( $E_{\max}$  MCT<sub>42d</sub>  $1,9 \pm 0,23$  mmHg;  $E_{\max}$  gesunde Kontrollen  $2,2 \pm 0,34$  mmHg). Die Langzeittherapie der Monocrotalin-Ratten mit Pumafentrine (10 mg/kg/d) im

Trinkwasser führte zu einer signifikanten Steigerung der endothelabhängigen, ACh-induzierten Vasodilatation ( $E_{\max}$   $3,4 \pm 0,32$  mmHg).



**ABBILDUNG 12.** EFFEKT DER CHRONISCHEN THERAPIE MIT PUMAFENTRINE VOM TAG 28-42 NACH MONOCROTALIN-INJEKTION AUF DIE DURCH ACETYLCHOLIN (ACh) INDUZIERTE ENDOTHELABHÄNGIGE VASODILATATION im Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Rattenlunge (\*  $p < 0,05$  vs. MCT).

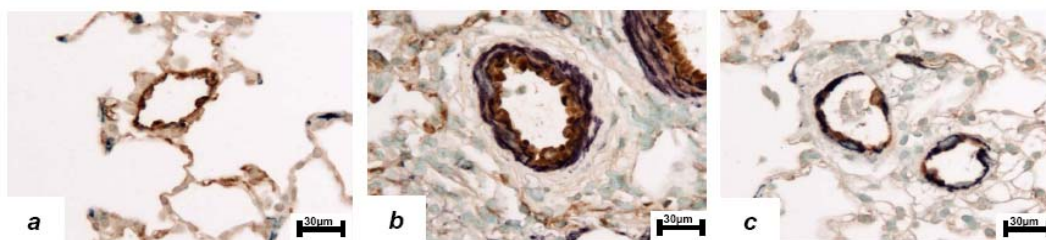
## 5.8. MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER LUNGENGEFÄßE

Die im Körper toxifizierten aktiven Pyrrol-Metaboliten des *per se* nicht toxischen Monocrotalins induzieren in der Lunge charakteristische Gefäßveränderungen, die in ihrer Allgemeinheit als ‚pulmonalvaskuläres Remodelling‘ bezeichnet werden. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um Endothelzellschädigung und -hyperplasie, endotheliale Dysfunktion, Verdickung der Media und Adventitia von Arterien, das Auftreten von Muskelfasern in normalerweise nicht muskularisierten Arteriolen und Hypertrophie von glatten Gefäßmuskelzellen in muskularisierten Gefäßen<sup>100-105</sup>.

### MUSKULARISIERUNGSGRAD

Um den Muskularisierungsgrad sichtbar zu machen und zu quantifizieren, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen glattmuskuläres alpha actin und endothelialen von Willebrand Faktor vorgenommen. Die immunhistochemische Peroxidase-Färbung gegen alpha actin wurde mit einem violetten Chromogen (Vector VIP<sup>®</sup>), die gegen von Willebrand Faktor mit einem braunen Chromogen (Vector DAB<sup>®</sup>) entwickelt, um den Unterschied zu verdeutlichen. Diese Methode ist dem in der Literatur oft beschriebenen Usus, zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades eine einfache Hämatoxylin Eosin Färbung oder eine Elastica Färbung einzusetzen (wobei man sich nur grob an der Zellmorphologie und -textur orientieren kann), weit überlegen, da durch die spezifische Färbung gegen glattmuskuläres alpha actin mit einem monoklonalen Antikörper eine deutliche Identifizierung der glatten Muskelzellen erfolgt, auch pathohistologisch ungeübte Personen die Befunde sicher interpretieren können und eine halbautomatische (und somit objektivere) computergestützte Auswertung möglich ist.

Im Verlauf der Progression der pulmonalen Hypertonie nach MCT-Injektion erfolgte eine starke Zunahme des Muskularisierungsgrades.



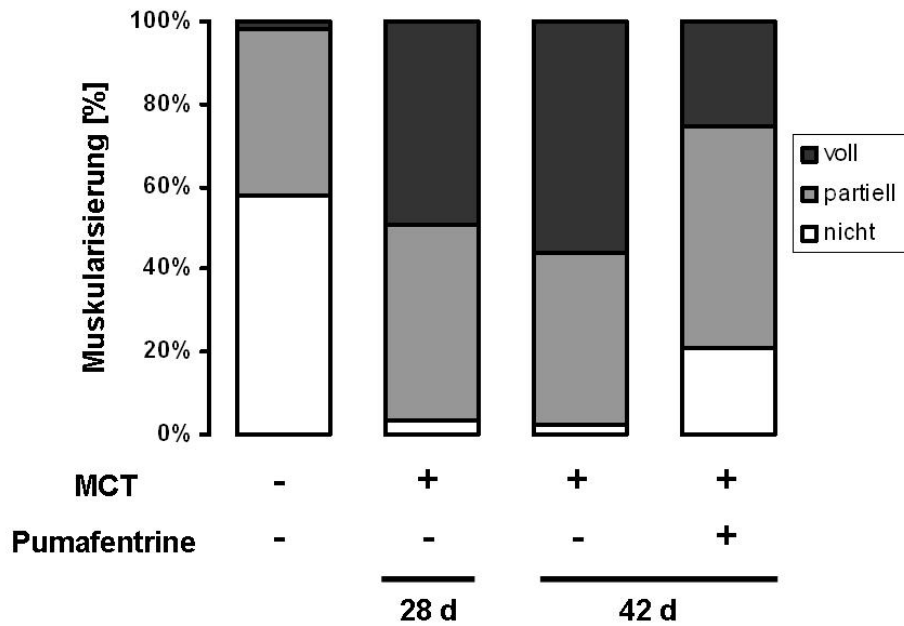
**ABBILDUNG 13.** IMMUNHISTOCHEMISCHE DOPPELFÄRBUNG KLEINER PERIPHERER PULMONALARTERIEN (alle 400 x) gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres smooth muscle alpha actin (violett). (a) In gesunden Tieren sind die kleinen Pulmonalarterien nicht oder nur teilweise muskularisiert. (b) Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer starken Zunahme des Muskularisierungsgrades. (c) Durch 14-tägige Therapie mit Pumafentrine wurde eine Regression der vermehrten Muskularisierung erzielt.

### QUANTIFIZIERUNG DES MUSKULARISIERUNGSGRADES

In gesunden Kontrollen war der Anteil der voll muskularisierten (>75% des Gefäßradius enthält alpha-actin positive Zellen) kleinen Pulmonalarterien (<50 µm) sehr gering ( $1,86 \pm 0,65$ ). In den MCT-behandelten Ratten stieg der Anteil der voll muskularisierten Arterien stark an ( $49,38 \pm 5,6$  nach 28 Tagen;  $55,9 \pm 6,2$  nach 42 Tagen). Die Therapie mit Pumafentrine führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils voll muskularisierter Arterien. Außerdem nahm der Anteil nicht muskularisierter Gefäße, der im Verlauf der Erkrankung stark abfällt, unter Therapie wieder deutlich zu.

Muskularisierung [%]	nicht	partiell	voll
gesund	$57,8 \pm 7,3$	$40,4 \pm 7,8$	$1,81 \pm 0,65$
28 Tage nach MCT	$3,38 \pm 1,6^*$	$47,4 \pm 4,7$	$49,38 \pm 5,6^*$
42 Tage nach MCT	$2,35 \pm 1,4^*$	$41,7 \pm 5,3$	$55,9 \pm 6,2^*$
Pumafentrine 10mg/kg	$21,4 \pm 3,8^{\#†}$	$54,0 \pm 4,0$	$25,3 \pm 5,5^{\#†}$

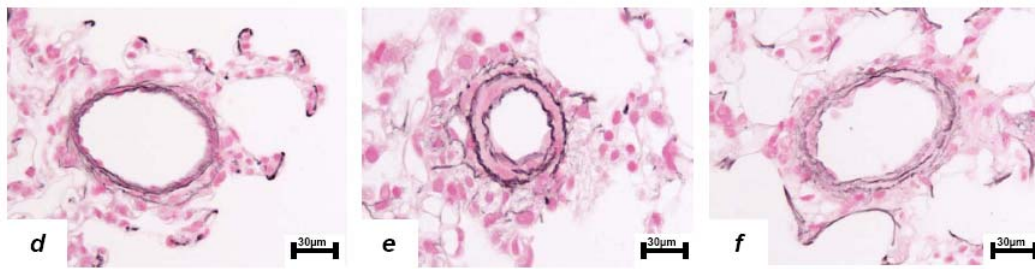
**TABELLE 6.** EFFEKT VON MONOCROTALIN UND PUMAFENTRINE AUF DIE MUSKULARISIERUNG kleiner peripherer Pulmonalarterien (<50µm externer Querdurchmesser) (\* p< 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p< 0,05 vs. MCT 28 d; † p< 0,05 vs. MCT 42d).



**ABBILDUNG 14.** CHRONISCHE THERAPIE MIT PUMAFENTRINE FÜHRT ZU EINER PARTIELLEN REGRESSION DER VERSTÄRKTEN VASKULÄREN MUSKULARISIERUNG NACH INJEKTION VON MONOCROTALIN. Dargestellt ist der prozentuale Anteil nicht, partiell und voll muskularisierter kleiner Pulmonalarterien bezogen auf die Gesamtsumme der ausgezählten Gefäße. Morphometrisch analysiert wurden pro Tier jeweils 100 periphere Pulmonalarterien mit einem externen Querdurchmesser von 10-50 µm.

### MEDIALE WANDSTÄRKE

In den Monocrotalin-behandelten Ratten verdickte sich die *Tunica media* der Pulmonalarterien im Verlauf der Progression der pulmonalarteriellen Hypertonie. Um die mittlere Wandstärke in den einzelnen Therapiegruppen darzustellen und im weiteren quantitativ morphometrisch bestimmen zu können wurde eine Elastica-Färbung durchgeführt. Somit konnten *Lamina elastica externa* und *interna* deutlich unterschieden werden. Der Bereich zwischen den beiden *Laminae* wurde für die Messungen herangezogen. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot.



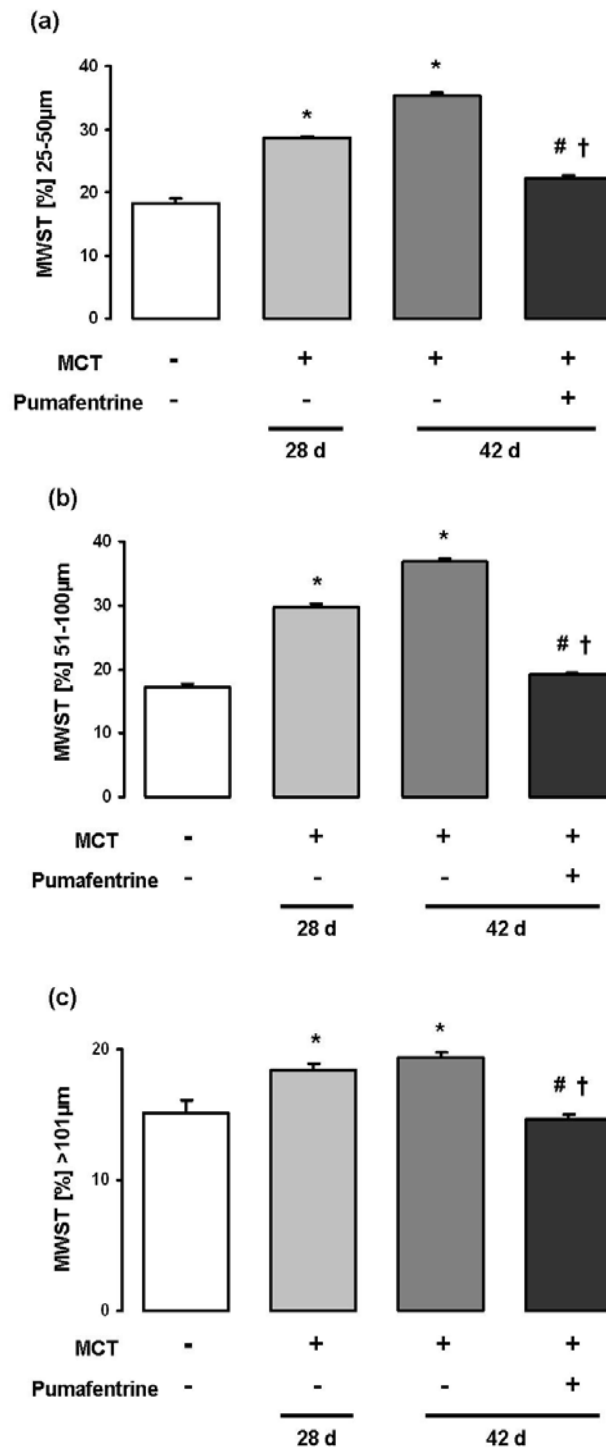
**ABBILDUNG 15 (D)- (F).** ELASTICA KERNECHTROT FÄRBUNG KLEINER PERIPHERER PULMONALARTERIEN (400 x Vergrößerung) in den verschiedenen Tiergruppen zur morphometrischen Bestimmung der medialen Wandstärke und der Lumenfläche. *Lamina elastica externa* und *interna* sind grauschwarz gefärbt. Deutlich erkennbar ist die Gefäßwandverdickung in den Monocrotalin-behandelten Ratten (e) und deren Regression unter Therapie mit Pumafentrine (f). (d) gesunde Kontrollratten.

#### QUANTIFIZIERUNG DER MEDIALEN WANDSTÄRKE

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

Die Wandstärke von Pulmonalarterien aller Größenkategorien (25- 50 µm, 51- 100 µm, >101 µm externer Querdurchmesser) war bereits 28 Tage nach MCT-Injektion stark verdickt, und nahm bis zum Tag 42 nach MCT-Injektion noch deutlich zu. Die zweiwöchige Therapie mit Pumafentrine in einer Dosis von 10 mg/kg/d konnte in allen untersuchten Gefäßkategorien eine nahezu vollständige Regression der Dickenzunahme erreichen. Die Werte unterschieden sich kaum mehr von denen gesunder Ratten (*siehe Tabelle 7*).





**ABBILDUNG 16 (A)-(C).** DARSTELLUNG DER MEDIALEN WANDSTÄRKE (MWST) IN DEN EINZELNEN GEFÄßKATEGORIEN, angegeben als Prozentsatz des externen Gefäßquerdurchmessers. (a) externer Querdurchmesser 25- 50 µm, (b) externer Querdurchmesser 51- 100 µm, (c) externer Querdurchmesser >100 µm. Die zweiwöchige Therapie mit Pumafentrine führte zu einer vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Gefäßwandstärke. (\* p< 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p< 0,05 vs. MCT 28d; † p< 0,05 vs. MCT 42d)

	Mediale Wandstärke [%] Gefäßkategorien			Lumenfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] GefäÙe <50 $\mu\text{m}$
	25-50 $\mu\text{m}$	51-100 $\mu\text{m}$	>100 $\mu\text{m}$	
gesund	18,34 $\pm$ 0,56	17,17 $\pm$ 0,49	15,15 $\pm$ 0,95	1217 $\pm$ 57
28 Tage nach MCT	28,54 $\pm$ 0,43 *	29,81 $\pm$ 0,31 *	18,42 $\pm$ 0,54 *	1075 $\pm$ 48 *
42 Tage nach MCT	35,43 $\pm$ 0,43 *	36,79 $\pm$ 0,51 *	19,34 $\pm$ 0,45 *	791 $\pm$ 33 *
Pumafentrine 10mg/kg	22,3 $\pm$ 0,31 #†	19,09 $\pm$ 0,24 #†	14,68 $\pm$ 0,32 #†	1195 $\pm$ 30 #†

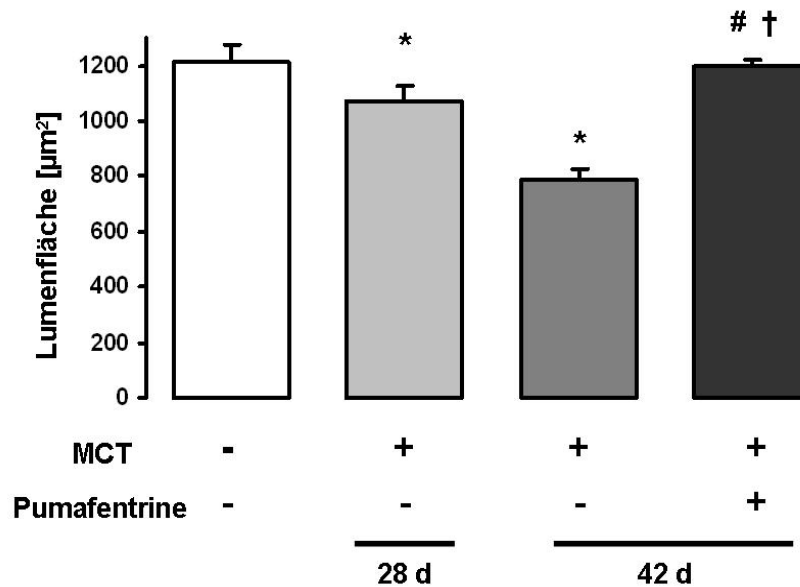
**TABELLE 9.** EINFLUß VON MONOCROTALIN UND PUMAFENTRINE AUF DIE MEDIALE WANDSTÄRKE UND DIE LUMENFLÄCHE VON PULMONALARTERIEN (\* p< 0,05 vs. gesunden Kontrollen; # p< 0,05 vs. MCT 28 d; † p< 0,05 vs. MCT 42d).

### QUANTIFIZIERUNG DER LUMENFLÄCHE

Durch die Verdickung der *Tunica media* durch proliferierende Muskelfasern sowie durch eine milde Endothelproliferation erfuhr die Lumenfläche kleiner GefäÙe im Verlauf der Erkrankung eine deutliche Reduktion. Eine solche konzentrische Verringerung der lichten Weite eines BlutgefäÙes wird als ‚negatives‘ oder ‚inward‘ Remodelling bezeichnet und ist typisch sowohl für die morphologischen Veränderungen der pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen sowie auch für die Veränderungen im Monocrotalin-Modell der Ratte.

Typischerweise kommt es außerdem zu einem sogenannten ‚pruning‘, also einem Abbruch des GefäÙbettes in der Peripherie durch eine proliferative Obliteration arterieller WiderstandsgefäÙe<sup>104, 116, 117</sup>. Dies lässt sich am besten durch das Bildnis eines entlaubten Baumes beschreiben. 6 Wochen nach Injektion von Monocrotalin war die Lumenfläche kleiner Arterien um nahezu zwei Drittel im Vergleich zu den GefäÙen gesunder Kontrolltiere reduziert. Die antiproliferative Wirkung von Pumafentrine zeigte sich deutlich in einer Wiederherstellung und Normalisierung der lichten Weite der kleinen Pulmonalarterien (*siehe Tabelle 9*).

Eine vergleichbare, jedoch merklich geringere Reduktion der Lumenfläche wurde auch bei größeren Pulmonalarterien ( $>51 \mu\text{m}$ ) gemessen. Auch in diesen Gefäßen wurde durch Therapie mit Pumafentrine eine vollständige Regression des negativen Remodellings erreicht (*Daten nicht gezeigt*).

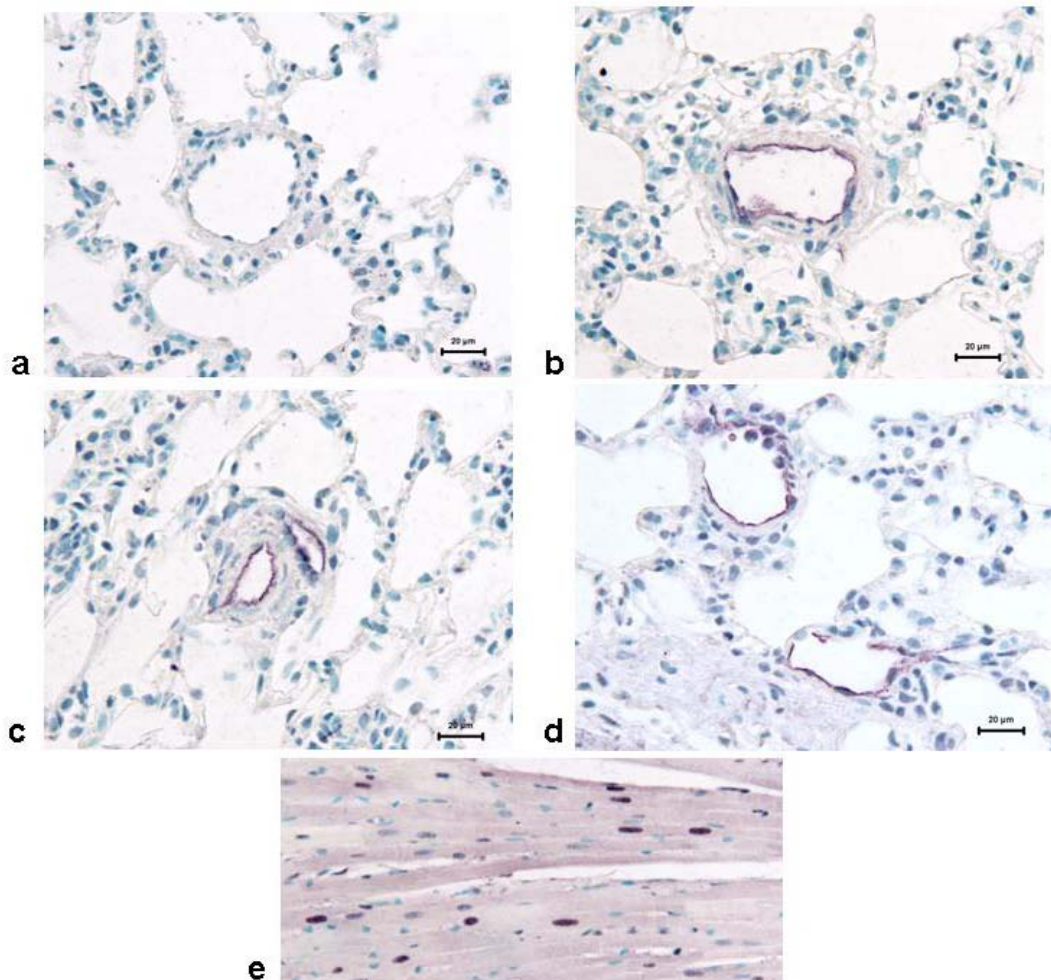


**ABBILDUNG 17.** EINFLUß DER THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DAS KONZENTRISCHE GEFÄßREMODELLING in Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie. Dargestellt ist die Lumenfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) von peripheren Pulmonalarterien ( $<50 \mu\text{m}$ ) in den einzelnen Therapiegruppen. Die Lumenfläche entspricht definitionsgemäß der lichten Weite innerhalb der intimalen Begrenzung des Gefäßes. Pro Tier wurden 100 Arterien zur morphometrischen Analyse herangezogen. (\*  $p < 0,05$  vs. gesunden Kontrollen; #  $p < 0,05$  vs. MCT 28d; †  $p < 0,05$  vs. MCT 42d)

### 5.9. LOKALISIERUNG DER PHOSPHODIESTERASE 3A

Eine immunhistochemische Färbung gegen Phosphodiesterase 3A auf Paraffinschnitten von Ratten zeigte eine deutliche, spezifisch zytoplasmatische Expression von PDE 3A im Gefäßendothel von Monocrotalin-behandelten Ratten, sowohl 28 als auch 42 Tage nach Injektion. Die Färbung war in gesunden Ratten nur sehr schwach ausgeprägt. In den Ratten, die mit dem Phosphodiesterase 3/4 Inhibitor Pumafentrine behandelt worden waren, war die Färbeintensität vergleichbar mit derjenigen in unbehandelten MCT-Ratten.

Als positives Kontrollgewebe wurde Herzmuskelgewebe der Ratte verwendet, da bekannt ist, dass die PDE 3A im Myokard exprimiert ist <sup>115</sup>.



**ABBILDUNG 18 (A)-(E).** IMMUNHISTOCHEMISCHE LOKALISIERUNG DER PHOSPHODIESTERASE 3A (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode, anti-PDE 3A von FabGennix Inc., Verdünnung 1:100, entwickelt mit dem violetten Chromogen Vector VIP<sup>®</sup>) in Paraffinschnitten von Lungen gesunder Ratten (a), Ratten 28 bzw. 42 Tage nach Monocrotalin-Injektion (b), (c), vom Tag 28-42 nach Monocrotalininjektion mit Pumafentrine behandelten Tieren (d) sowie als positive Expressionskontrolle Myokard der Ratte (e). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Methylgrün. (alle Bilder 400 x Vergrößerung).

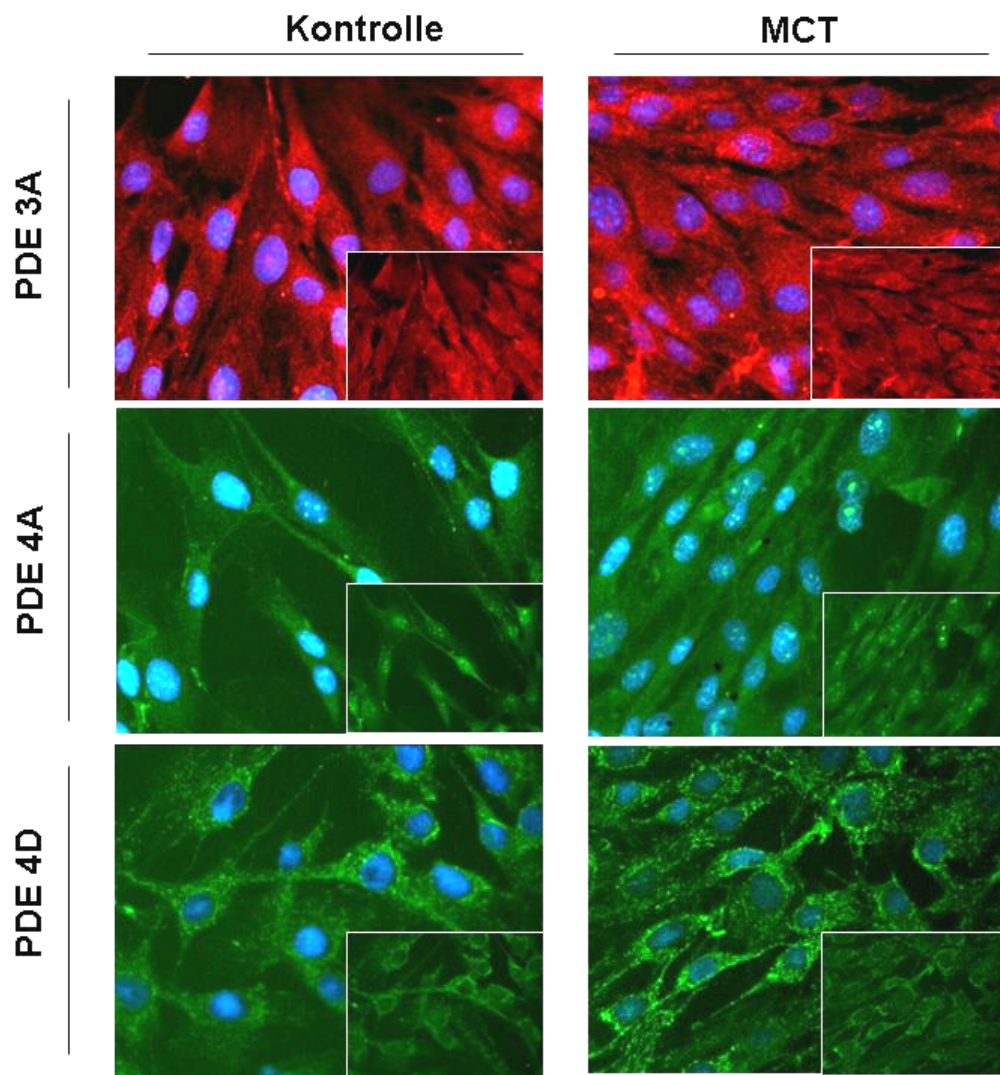
### 5.10. EXPRESSION VON PHOSPHODIESTERASE 3A, 4A UND 4D

Da laut einschlägiger Literatur außer der endothelialen Lokalisation der PDE 3A auch eine positive immunhistochemische Reaktion der glatten Gefäßmuskelzellen auf die Färbung mit anti-PDE 3A zu erwarten gewesen wäre<sup>115</sup>, wurden zusätzlich isolierte PASMC gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten mit dem gleichen Antikörper gefärbt. Es sollte überprüft werden, ob die isolierten glatten Muskelzellen PDE 3A exprimieren und ob eventuell im Verlauf des Entwässerungs- und Einbettungsprozesses des Lungengewebes das Epitop auf den glatten Muskelzellen zerstört wurde, sodaß auf den Paraffinschnitten nur noch das Epitop auf Endothelzellen gefärbt wird. Der verwendete, kommerziell erhältliche Antikörper gegen PDE 3A und die ebenfalls kommerziell erhältlichen Antikörper gegen PDE 4A und 4D sind laut Angaben der Datenblätter nur für immunzytochemische, nicht aber für immunhistochemische Färbungen getestet.

Die Färbung gegen PDE 3A, 4A und 4D zeigte eine deutliche Expression dieser Proteine im Zytoplasma der isolierten glatten Muskelzellen, Man kann also davon ausgehen, dass die betreffenden Epitope zwar auf isolierten glatten Muskelzellen ursprünglich vorhanden und von dem verwendeten Antikörper auch detektiert werden, im Verlauf des Einbettungsvorganges jedoch zerstört werden. Allerdings konnte kein Unterschied in der Färbeintensität zwischen den glatten Muskelzellen gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten festgestellt werden.

Die endothelialen und myokardialen Epitope der PDE 3A scheinen den Fixierungs- und Einbettungsprozess besser zu überstehen und sind nach Hitzedemaskierung des Gewebes einer spezifischen Färbung zugänglich.

Eine probeweise Färbung von Paraffinschnitten unter Verwendung verschiedener Epitopdemaskierungsmethoden (Hitze, Trypsinierung), Inkubationszeiten und Verdünnungen mit den für die Immunzytochemie verwendeten Antikörpern gegen PDE 4A und D brachte keine spezifischen Färbeergebnisse, außer einer positiven Färbung in Entzündungszellen (Alveolarmakrophagen, Lymphozyten) (*Bilder nicht gezeigt*), sodaß angenommen werden kann, dass diese Antikörper ebenfalls nur für die Immunzytochemie geeignet sind und die betreffenden Epitope durch die Fixierung und Einbettung zerstört werden.



**ABBILDUNG 19.** IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ISOLIERTER PASMC GESUNDER UND MONOCROTALIN-BEHANDELTER RATTEN MIT ANTIKÖRPERN GEGEN PDE 3A, 4A UND 4D (rot fluoreszierender rabbit anti-goat für PDE 3A, grün fluoreszierender goat anti-rabbit für PDE 4A und 4D). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (blau fluoreszierend). Die Expression der untersuchten Phosphodiesterasen ist vor allem zytoplasmatisch. (Alle Bilder 400 x).

### 5.11. EINFLUß AUF DIE ZELLPROLIFERATION *IN SITU*

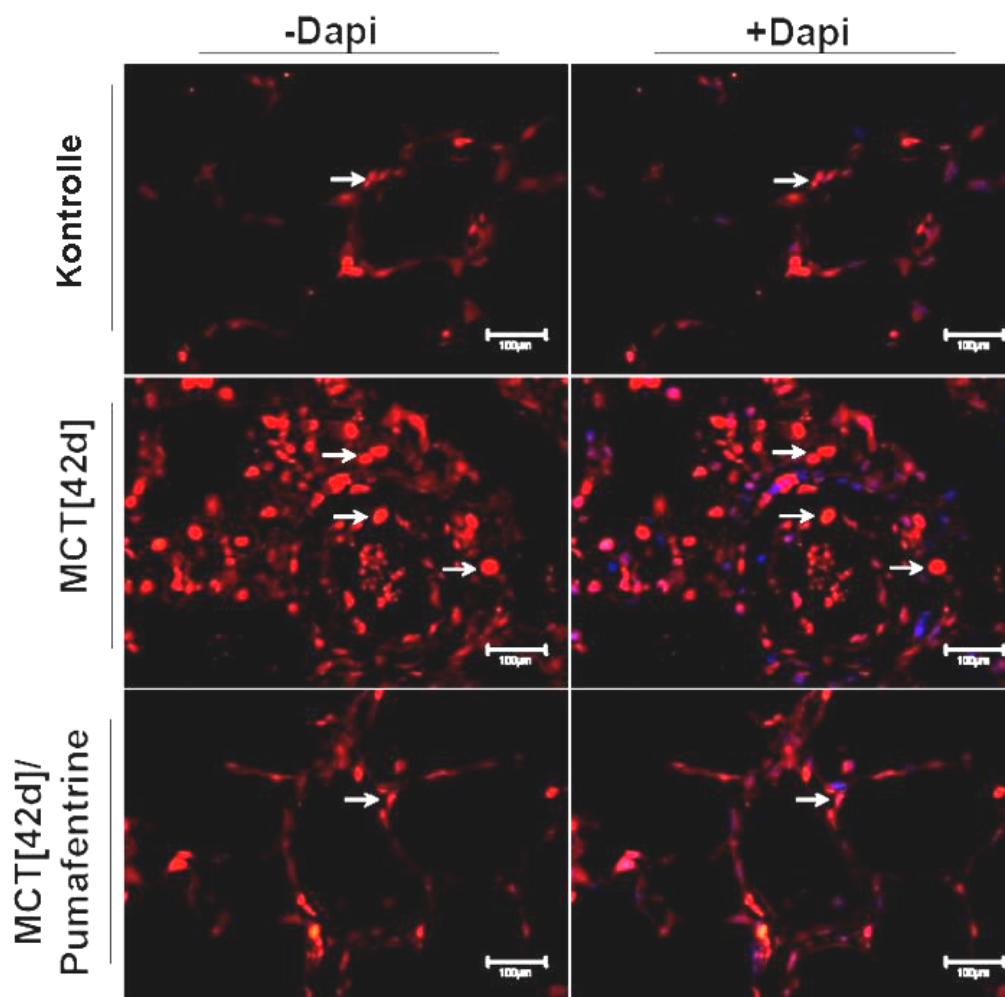
Um proliferierende Zellen im Lungengewebe nachweisen zu können, wurden Paraffinschnitte der Lungen gesunder, Monocrotalin-behandelter Kontrollratten und

MCT-Ratten, die 14 Tage lang mit Pumafentrine behandelt worden waren, mit einem Antikörper gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) gefärbt.

PCNA wurde ursprünglich identifiziert als Antigen, welches in den Zellkernen während der Synthesephase des Zellzyklus exprimiert wird<sup>118</sup>. Es steigt in der G<sub>1</sub> und S-Phase auf einen Maximalwert an und sinkt in der G<sub>2</sub>-Phase wieder auf einen Basalwert ab. PCNA ist ein Kofaktor der DNA Polymerase Delta in Eukaryoten. Es bildet eine Klammer um die DNA und hilft bei der Prozessivität der *leading* Strang Synthese. Außerdem ist PCNA an DNA-Reparaturprozessen beteiligt, welche ebenfalls in Geweben mit hoher Teilungsaktivität verstärkt vorhanden sind.

PCNA existiert in zwei Formen, wobei nur eine spezifisch in die DNA-Replikation involviert und im Kern lokalisiert ist<sup>119</sup>. Interessanterweise wird die zweite, für DNA-Replikation unspezifische Form durch organische Lösungsmittel und Fixanzien zerstört, und ist somit in konventionellen histologischen Untersuchungen nicht detektierbar, so daß nur die spezifische Form immunhistochemisch nachgewiesen wird. Der verwendete polyklonale Antikörper ist gegen Aminosäuren 1- 261 (*full length*) des humanen Epitopes gerichtet. Das Epitop ist speziesübergreifend stark konserviert.

Die immunhistochemische Färbung gegen PCNA zeigte nur wenig positive Immunoreaktivität im Lungengewebe gesunder Ratten. In Ratten, die 6 Wochen zuvor eine Injektion von Monocrotalin erhalten hatten war die Expression von PCNA sehr stark und umfasste primär vaskuläre Zellen, hier vor allem glatte Muskelzellen aus der *Tunica media*, aber auch Endothel- und Adventitiazellen, da alle Wandschichten am pulmonalvaskulären Remodeling beteiligt sind. Die zweiwöchige Therapie mit Pumafentrine führte zu einer starken Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen im Lungengewebe, vergleichbar mit der von gesunden Ratten.



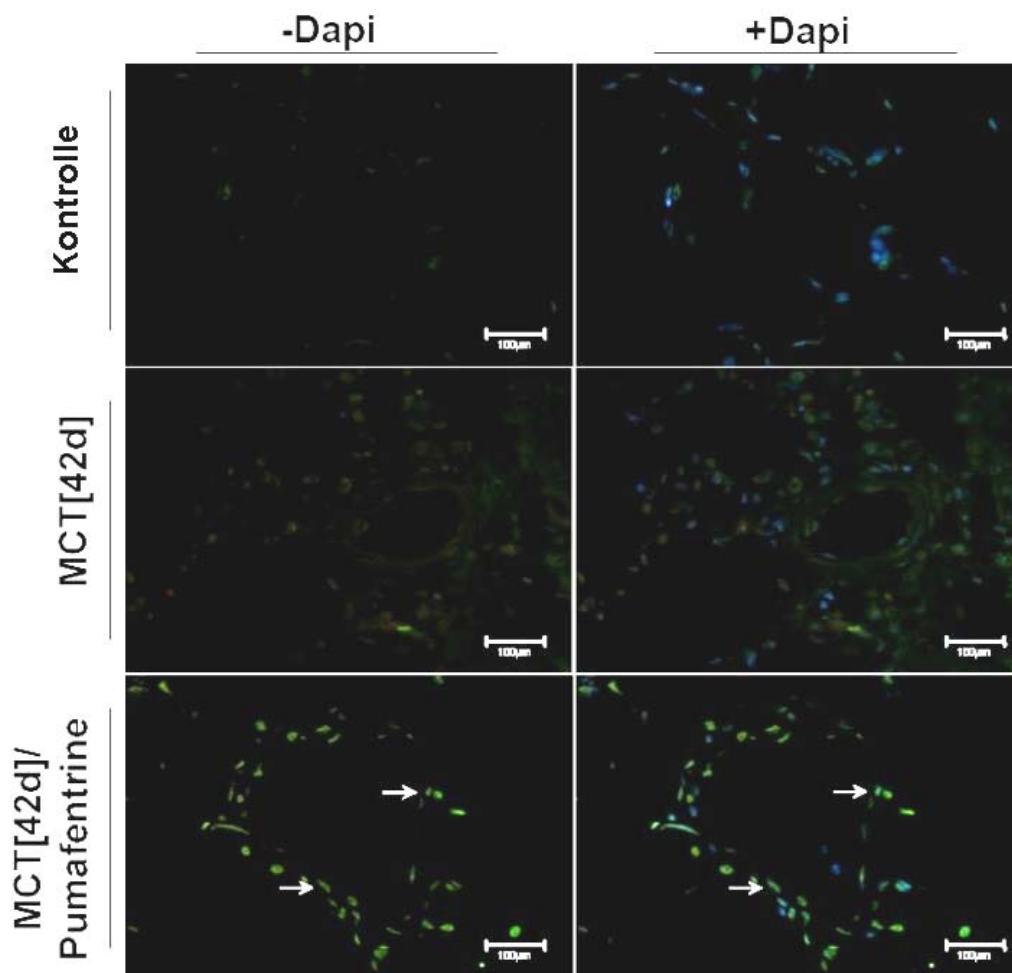
**ABBILDUNG 20.** EFFEKT DER THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DIE PROLIFERATION PULMONALARTERIELLER GEFÄßZELLEN im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Dargestellt sind mit einem Antikörper gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) gefärbte Lungenschnitte gesunder, MCT-injizierter und Pumafentrine-behandelter Ratten (rot fluoreszierende Zellkerne). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (blau fluoreszierend). (Alle Bilder 400 x).

### 5.12. EINFLUß AUF DIE ZELLAPOPTOSE *IN SITU*

Zur *in situ*-Visualisierung der Apoptose in Paraffinschnitten von Lungen gesunder oder mit Monocrotalin behandelter Ratten und von Tieren, die vom Tag 28- 42 nach Monocrotalin-Injektion mit Pumafentrine therapiert wurden, wurde ein fluorescein-basierter TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin



nick end labelling) Kit benutzt. Dieser Detektionskit erkennt preferentiell apoptotische Zellen, und nicht nekrotische Zellen oder Strangbrüche durch Bestrahlung oder Zytostatika<sup>113, 114</sup>.



**ABBILDUNG 21.** EINFLUß DER THERAPIE MIT PUMAFENTRINE AUF DIE APOPTOSE IN PULMONALARTERIELLEN GEFÄßZELLEN im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Dargestellt sind mit einem fluorescein-basierten TUNEL-Detektionskit gefärbte Lungenschnitte gesunder, MCT-injizierter und Pumafentrine-behandelter Ratten (Zellkerne apoptotischer Zellen fluoreszieren grün). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (blau fluoreszierend). (Alle Bilder 400 x).

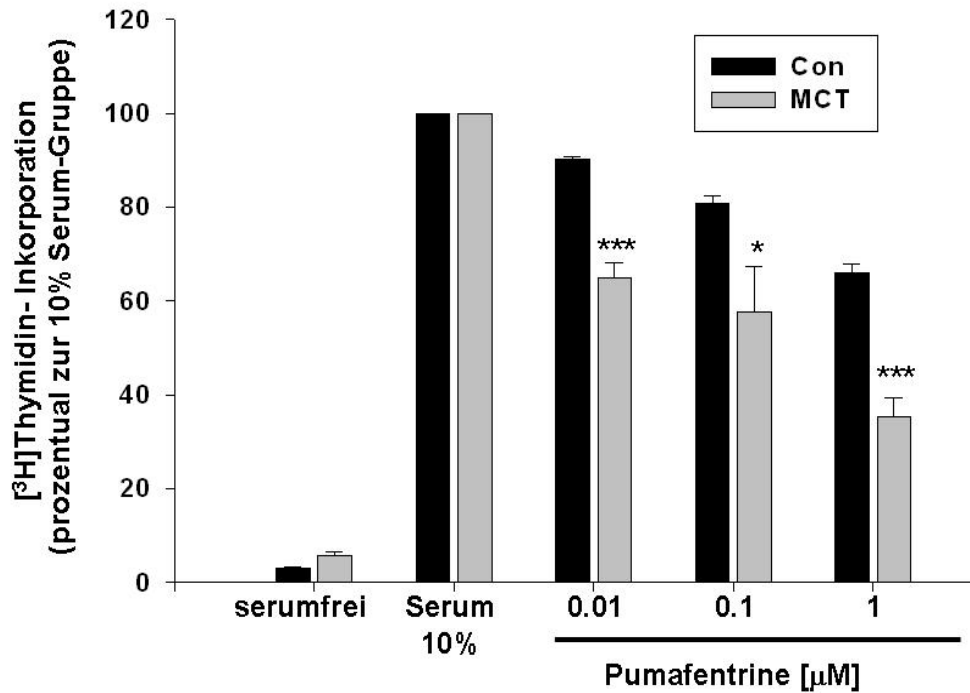
In gesunden Kontrolltieren finden sich in der Lunge nur wenige apoptotische Zellen. Nach Behandlung mit Monocrotalin kommt es zu einer verstärkten Proliferation und

zu einer Apoptosehemmung. Die Langzeittherapie der Ratten mit Pumafentrine erhöhte deutlich sichtbar den Anteil apoptotischer, TUNEL-positiver Zellen in den untersuchten Lungenschnitten.

Bei den apoptotischen Zellen handelt es sich von der Zellmorphologie und-lokalisierung her vor allem um Zellen aus der *Tunica media*, es finden sich jedoch auch TUNEL-positive Zellen in Endothel und Adventitia. Der verstärkte Zelluntergang unter Therapie mit Pumafentrine erklärt anschaulich die morphometrisch gezeigte Regression des pulmonalvaskulären Remodellings (mediale Wandstärkenverdickung, Zunahme des Muskularisierungsgrades nach Injektion von Monocrotalin) und damit die Verbesserung des rechtsventrikulären Druckes sowie der Rechtsherzhypertrophie. Der Anteil TUNEL-positiver Zellen in den verschiedenen Therapiegruppen konnte jedoch durch die verwendete Methode nicht quantifiziert werden.

### **5.13. PROLIFERATIONSASSAY ISOLIERTER GLATTER MUSKELZELLEN**

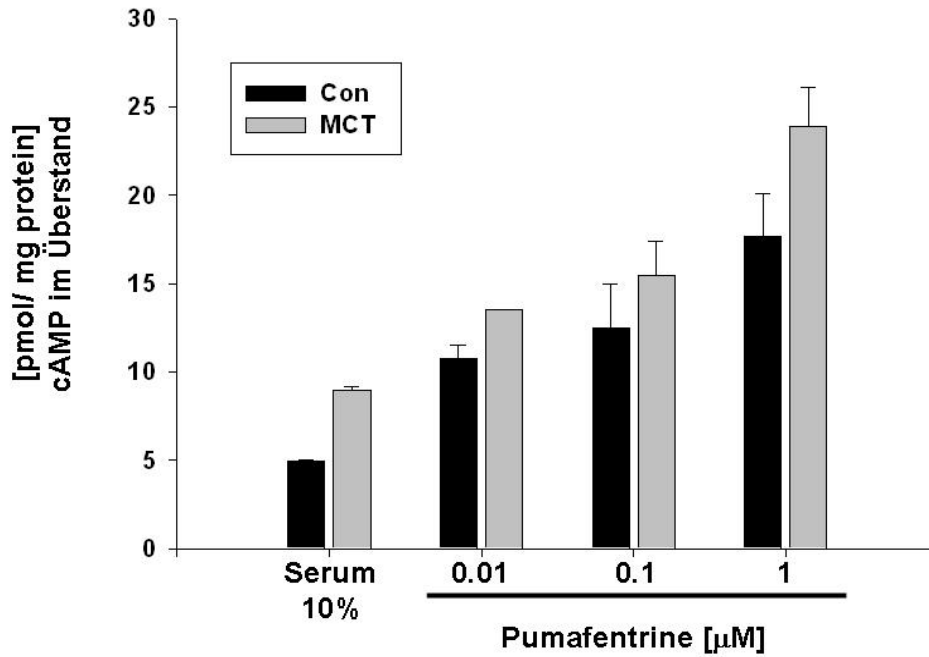
Nach Synchronisierung der PASMC gesunder oder Monocrotalin-behandelter Ratten aus Passage 2 durch Serumentzug für 72 Stunden wurde die Proliferation der mit 10% FCS stimulierten Zellen ohne oder mit Zugabe verschiedener Konzentrationen an Pumafentrine (0.01, 0.1 und 1  $\mu$ M Pumafentrine) während der letzten 12 Stunden des Serumentzuges und während der Stimulationsphase untersucht. Dazu wurde quantitativ der Einbau [ $^3$ H]-markierten Thymidins in die Zellen gemessen. Die Behandlung der Zellen mit Pumafentrine hemmte dosisabhängig sowohl die Proliferation von PASMC gesunder als auch Monocrotalin-behandelter Ratten. Die Proliferationshemmung durch Pumafentrine unterschied sich jedoch deutlich zwischen den Zellen gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten: die PASMC Monocrotalin-behandelter Ratten waren signifikant sensitiver gegenüber der antiproliferativen Wirkung von Pumafentrine.



**ABBILDUNG 22.** EFFEKT VON PUMAFENTRINE AUF DIE PROLIFERATION VON PASM C gesunder (Con) und Monocrotalin-behandelter (MCT) Ratten. Pumafentrine hemmt dosisabhängig den Einbau [ $^3\text{H}$ ]-markierten Thymidins in mit 10% Serum stimulierte Zellen. Zum Vergleich wurden Kontrollzellen gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten in 0,1% Serum (serumfrei) gehalten. Die Werte von jeweils sechs bis acht verschiedenen Zellisolierungen wurden prozentual zu den mit 10% serum-stimulierten, nicht mit Pumafentrine behandelten Zellen angegeben. (\*  $p < 0,05$  vs. gesunde Kontrollzellen; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. gesunde Kontrollzellen)

#### 5.14. cAMP-FREISETZUNG GLATTER MUSKELZELLEN

Für die Analyse der cAMP-Produktion wurden PASM C gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten mit Pumafentrine in verschiedenen Konzentrationen (0, 0.01, 0.1 und 1  $\mu\text{M}$ ) 1 Stunde lang inkubiert. cAMP im Überstand wurde mit Hilfe eines [ $^{125}\text{I}$ ]-cAMP-Radioimmunoassays (Demeditech Diagnostics) nach Angaben des Herstellers gegen eine Standardkurve ermittelt, die Proteinmenge in den Proben mittels der Bradford-Methode spektrophotometrisch bei 595 nm bestimmt und die Ergebnisse wurden als pmol cAMP/mg Protein für jede Gruppe angegeben.



**ABBILDUNG 23.** RADIOIMMUNOASSAY DER cAMP-FREISETZUNG ISOLIERTER PASMC gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten. Die Behandlung mit Pumafentrine erhöhte dosisabhängig die Produktion von cAMP in den Zellen gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten. Dabei wurde durch Behandlung der Zellen mit Pumafentrine die cAMP-Produktion im Überstand von PASMC Monocrotalin-behandelter Ratten tendenziell, jedoch nicht signifikant, stärker angeregt als die gesunder PASMC.

Pro Gruppe wurden die Mittelwerte von 3 Ansätzen in Doppelbestimmungen für die Auswertung herangezogen. Pumafentrine erhöhte dosisabhängig die Abgabe von cAMP durch die Zellen. Dabei wurden tendenziell im Überstand der von MCT-Ratten stammenden PASMC höhere cAMP-Spiegel gemessen als im Überstand der gesunden Kontroll-PASMC. Dies war jedoch nicht signifikant.

Die cAMP-Spiegel in den Zellysaten wurden ebenfalls bestimmt. Intrazellulär konnte jedoch durch Stimulation mit Pumafentrine keine signifikante Erhöhung der cAMP-Spiegel erzielt werden (*Daten nicht gezeigt*).

## 6. DISKUSSION

Diese Arbeit charakterisiert die Langzeittherapie mit einem dualselektiven, oral verfügbaren PDE 3/4 Inhibitor (Pumafentrine) in einem Rattenmodell der pulmonalarteriellen Hypertonie. Nach einmaliger Injektion von Monocrotalin (60 mg/kg) entwickelten die Ratten im Verlauf von 4-6 Wochen eine schwere, irreversible pulmonale Hypertonie mit Proliferation der glatten Muskelzellen in den Lungenarterien und konsekutiver Dickenzunahme der *Tunica media*.

Das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte ist unter den bestehenden Tiermodellen dasjenige, welches den klinischen Verlauf und die Mortalität der IPAH des Menschen am deutlichsten nachzeichnet. Die proliferativen Gefäßveränderungen im Lungenparenchym sind sehr schwerwiegend und ohne zielgerichtete Therapie progressiv und irreversibel, so daß die Tiere spätestens 6-8 Wochen nach der initialen Injektion an Rechtsherzversagen sterben.

Das Monocrotalin-Modell der Ratte hat den Nachteil, dass es nicht in vollem Umfang die pathognomonischen Gefäßveränderungen des Menschen nachvollziehen vermag<sup>120</sup>. Es fehlen die plexiformen Läsionen und eine deutliche Neointimabildung. Eine moderate intimale Schwellung und Endothelproliferation kann jedoch bei Monocrotalin-behandelten Ratten beobachtet werden, bei denen der RVSP systemische Werte annimmt oder denen eine Lungenhälfte entfernt wurde<sup>121-123</sup>. Da die Monocrotalin-induzierte PH ‚artifizial‘ durch ein Pflanzenalkaloid hervorgerufen wird, kann sie nicht genau die Pathogenese der PAH des Menschen imitieren. Es ist aber zu betonen, dass die toxisch bedingten Endothelschädigungen nur den initiierenden Mechanismus darstellen, da Monocrotalin und seine aktiven Metabolite nach etwa 24 Stunden vollständig renal eliminiert sind<sup>97</sup>. Die weiteren Gefäßveränderungen schreiten danach in einem sich selbst aufrechterhaltenden Prozeß fort. Die endotheliale Dysfunktion spielt sowohl bei der PAH des Menschen als auch im Monocrotalin-Modell eine zentrale pathogenetische Rolle. Ähnlich wie beim Menschen ruft Monocrotalin eine Proliferation und Hyperkontraktion von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen hervor, vor allem in kleinen, intra-azinären Pulmonalarterien, sowie eine Entzündungsreaktion in der Lunge<sup>16, 106, 124-127</sup>.

Weiterhin ist es nicht möglich, das Monocrotalin-Modell bei spezifisch genveränderten Mäusen anzuwenden, da die Maus auf die Injektion von Monocrotalin oder seiner aktiven Metaboliten im Gegensatz zu der Ratte nur mit akut entzündlichen und ödematösen Veränderungen des Lungenparenchyms reagiert, die später fibrotisch umgebaut werden<sup>128</sup>. Die charakteristischen proliferativen Gefäßveränderungen (verstärkte Muskularisierung, Mediahypertrophie) und die Ausbildung einer dem Menschen ähnlichen pulmonalarteriellen Hypertonie fehlen bei der Maus<sup>129, 130</sup>. Es existieren vereinzelte Berichte über die Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie bei Mäusen nach Verabreichung meist sehr hoher Dosen von Monocrotalin, jedoch dürfte es sich in diesen Studien eher um einen postkapillären Lungenhochdruck durch die Ausbildung eines toxischen Lungenödems handeln<sup>131, 132</sup>. Da jedoch bis jetzt nur in Mausmodellen routinemäßig genetisch veränderte Tiere untersucht werden können, bleibt das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie das einzige breit anwendbare Mausmodell für Lungenhochdruck.

Ein weiterer Nachteil ist die Verwendung von Ratten (Nagetieren) als Versuchsobjekte und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Anatomie und Physiologie des Menschen. Die Anatomie der Rattenlunge unterscheidet sich in einigen Punkten grundlegend von der des Menschen<sup>120, 133</sup>. Auch ist die Expressionsstärke der PDE 4 generell in Rattengeweben höher als beim Menschen<sup>134</sup>.

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

#### **KURATIVES LANGZEITTHERAPIESCHEMA**

Eine zweiwöchige orale Therapie der Ratten mit Pumafentrine in einer Dosis von 10 mg/kg/d vom Tag 28 bis 42 nach Injektion von Monocrotalin machte die hämodynamischen und proliferativ-vaskulären Veränderungen größtenteils rückgängig. Es ist anzumerken, dass die chronischen Therapieversuche erst 4 Wochen nach dem initialen toxischen Stimulus der Monocrotalin-Injektion begannen, zu einem Zeitpunkt also, als bereits eine schwere pulmonalarterielle

Hypertonie vorlag und strukturelle Gefäßveränderungen bereits voll ausgeprägt waren. Die Arbeit umfaßt somit einen kurativen, nicht nur präventiven Therapieansatz.

Die Injektion von Monocrotalin führt, wie bereits erwähnt, zu irreversiblen proliferativen Veränderungen, die nach einigen Wochen zum Tod der Tiere führen. Um in diesem Modell wirksame therapeutische Effekte zu erzielen wird deshalb sehr oft eine präventive Therapiestrategie oder der Beginn der therapeutischen Intervention lange vor der vollen Ausprägung der pulmonalen Hypertonie und der proliferativen Gefäßveränderungen gewählt, da es in den frühen Stadien der Erkrankung leichter ist, medikamentöse Erfolge zu erzielen<sup>135-139</sup>. Dies entspricht jedoch nicht der klinischen Situation. Pulmonalarterielle Hypertonie ist eine schwierig zu diagnostizierende, sehr seltene Krankheit, deren Anzeichen und Symptome vage sind. Routineuntersuchungen sind zur Diagnosestellung wenig hilfreich und aufgrund ihrer Seltenheit wird die Differentialdiagnose ‚pulmonalarterielle Hypertonie‘ zu wenig berücksichtigt. Oft vergeht so eine relativ lange Zeitspanne (im Mittel 2 Jahre) vom Beginn der Erkrankung bis zu ihrer Diagnose, so daß die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits chronisch erkrankt sind. In der vorliegenden experimentellen Studie wird ein sehr spät kurativer Therapieansatz verfolgt, was eher der Situation des Menschen und der möglichen Relevanz des tierexperimentellen Therapieerfolgs für die Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen entspricht.

#### **PUMAFENTRINE VERBESSERT DIE VASOREAKTIVITÄT**

Das Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge hat den Vorteil, dass der Lungenkreislauf funktionell gut evaluiert werden kann, mit einer guten Kontrolle über die verwendeten pharmakologischen Substanzen und ohne Effekte auf Herzfrequenz, Schlagkraft oder systemischen Druck. Die Lungen wurden mit Phenylephrine (PE) vorkonstringiert, um gleiche basale pulmonalarterielle Anfangsdrücke in den einzelnen Gruppen zu erhalten und die Tiergruppen direkt vergleichen zu können.

In Monocrotalin-behandelten Ratten war die SNP-induzierte endothelunabhängige Vasodilation vermindert, die endothelabhängige, ACh-induzierte Vasodilation jedoch nicht signifikant eingeschränkt. Die chronische Therapie der Ratten mit

Pumafentrine verbesserte sowohl die (endothelabhängige) Acetylcholin-induzierte als auch die (endothelunabhängige) Natrium-Nitroprussid-induzierte Vasodilationskapazität der Lungen im Vergleich zu unbehandelten Ratten.

Es ist bekannt, dass isoliert perfundiert und ventilierte Lungen Monocrotalin-behandelter Ratten eine verminderte pulmonale Vasodilation auf Gabe von Natrium-Nitroprussid (SNP) aufweisen. Dies lässt auf ein reduziertes Ansprechen des Lungengewebes auf NO schließen, bedingt entweder durch eine Erhöhung im basalen Gefäßtonus oder aufgrund von abnormalem vaskulärem Remodeling<sup>140, 141</sup>.

Obwohl von mehreren Autoren überzeugend dargelegt wurde, dass die vasodilative Antwort des hypertensiven Lungenkreislaufs auf NO-Donoren wie SNP abgeschwächt ist<sup>142-146</sup>, haben verschiedene Studien deutlich gemacht, dass die Empfindlichkeit auf endothelabhängige Vasodilatoren wie ACh und A23187 im Monocrotalin-Modell und in hypoxischen Ratten beibehalten ist<sup>147, 148</sup>. In der vorliegenden Studie reagierten die Lungen von Ratten mit MCT-induzierter PH mit einer milden, jedoch nicht signifikanten Abnahme der vasodilatorischen Response auf ACh und einer stark und signifikant gegenüber gesunden Kontrollen abgeschwächten Reaktion auf den NO-Donor SNP. Die Langzeittherapie MCT-behandelter Ratten mit dem Phosphodiesterase 3/4 Inhibitor Pumafentrine reduzierte die Mediahypertrophie und Muskularisierung der Lungengefäße, so dass die verbesserte Vasoreaktivität (sowohl auf ACh als auch auf SNP) im Modell der isolierten Lunge zumindest teilweise durch diese antiproliferative Wirkung bedingt sein dürfte. Ein verringerter basaler Gefäßtonus (Vasorelaxation) durch die Pumafentrine-Behandlung kann ebenfalls zur gesteigerten endothelabhängigen und -unabhängigen Vasodilation beigetragen haben.

#### **PUMAFENTRINE VERBESSERT HÄMODYNAMIK, HERZZEITVOLUMEN UND GASAUSTAUSCH**

Durch die Langzeittherapie mit Pumafentrine konnte im Ganztiermodell die etablierte pulmonale Hypertonie der Ratten teilweise rückgängig gemacht werden. Dies gilt für den rechtsventrikulären Druck, den Abfall im Herzzeitvolumen in den Monocrotalin-behandelten Ratten und die arterielle Sauerstoffsättigung. Interessanterweise verursachte die Therapie mit Pumafentrine einen bedeutenden Anstieg im Herzzeitvolumen der Tiere, der sogar deutlich über die gemessenen



Werte gesunder Tiere hinausging. Diese Beobachtung passt jedoch zu einer früheren Studie, in der durch den PDE 3/4 Inhibitor Tolafentrine das Herzzeitvolumen nach Kurzzeitinfusion des Inhibitors in einem Akutmodell der U4669-induzierten pulmonalen Hypertonie des Kaninchens<sup>81</sup> und im Monocrotalin-Rattenmodell<sup>149</sup> ähnlich gesteigert wurde. Jedoch ist Tolafentrine nicht oral bioverfügbar und die weitere Entwicklung wurde gestoppt.

Verschiedene Hemmstoffe der PDE 3 sind klinisch zugelassen zur intravenösen Therapie der akuten Herzinsuffizienz und des kardiogenen Schocks, wenn das Myokard durch Downregulation der Rezeptordichte nicht mehr auf Katecholamine anspricht. Phosphodiesterase 3 Hemmstoffe haben eine positiv inotrope Wirkung auf den Herzmuskel. Über den second messenger cAMP wird die Proteinkinase A aktiviert, die zu einer Aktivitätssteigerung der L-Typ-Kalziumkanäle, dadurch zu einem verstärkten transsarkolemmalen Calciumstrom im Myokard und somit zu einer Zunahme der Kontraktionsamplitude und Geschwindigkeit des Konzentrationsanstiegs führt<sup>150</sup>.

Die zweiwöchige Therapie mit Pumafentrine hatte außerdem einen positiven Effekt auf die Rechtsherzhypertrophie der Ratten, welche signifikant verbessert wurde. Dies ist durch die Druckentlastung des rechten Ventrikels im Rahmen der Widerstandssenkung im Lungenkreislauf durch die vasodilative und antiproliferative Wirkung von Pumafentrine bedingt. Zusätzlich kann der direkt herzstärkende Effekt der PDE 3-Inhibition eine Verbesserung des *Cor pulmonale* bewirkt haben: durch eine beschleunigte Wiederaufnahme des Kalziums in intrazelluläre Speicher (sarkoplasmatisches Retikulum) wirken Hemmstoffe der PDE 3 positiv lusitrop, das heißt, sie erleichtern die Relaxationsfähigkeit des Myokards<sup>150, 151</sup>.

Im Gegensatz zu PDE 3-Hemmstoffen sind PDE 4-Hemmer eher schwache Relaxatoren glatter Muskelzellen und hemmen nicht *in vitro* eigenständig die Proliferation glatter Muskelzellen<sup>55</sup>. Wenn jedoch PDE 4-selektive Hemmstoffe *in vitro* mit PDE 3-Hemmern kombiniert werden, oder in Versuchen, in denen noch eine Endothelzellschicht vorhanden ist, stellen PDE 4-Hemmer effiziente Vasodilatoren dar. Die kombinierte Inhibition von PDE 3 und 4 kann somit effektiver eine pulmonale Vasodilation auslösen als eine Hemmung der PDE 3 (oder 4) alleine, sowohl in Tiermodellen als auch in isolierten humanen Pulmonalarterien<sup>60, 79, 80</sup>. Dies ist auf die überlappenden, jedoch unterschiedlichen

cAMP-Pools in glatten Muskelzellen, die durch PDE 3 bzw PDE 4 reguliert werden, zurückzuführen.

Die kombinierte Hemmung der Phosphodiesterasen 3 und 4 durch Pumafentrine führte in der Lunge zu einer signifikanten Verbesserung der arteriellen Sauerstoffsättigung. In einem Modell der U4669-induzierten Lungenschädigung konnte eine kombinierte PDE 3/4 Hemmung den Shuntfluß und das Ventilations-Perfusions-Mismatch in der Lunge sowie den arteriellen Gasaustausch signifikant verbessern<sup>80,81</sup>.

In der vorliegenden Studie normalisierte die zweiwöchige Therapie mit Pumafentrine die hämodynamischen Parameter der Ratten fast vollständig und hatte nur vernachlässigbare depressive Effekte auf den systemisch-arteriellen Druck.

In früheren Studien wurde bereits der positive synergistische Therapieeffekt einer chronischen intravenösen Therapie mit einem PDE 3/4-Hemmstoff (Tolafentrine) und gleichzeitiger Inhalation von Iloprost in einem Monocrotalin-Rattenmodell beschrieben<sup>149</sup>. Allerdings war in dieser Studie die alleinige Anwendung des PDE-Hemmstoffes kaum effektiv. Eine weitere Studie beschreibt die positiven therapeutischen Effekte im gleichen Tiermodell durch zweiwöchige, spät-kurative Therapie mittels Inhalation von Tolafentrine<sup>152</sup>. Die vorliegende Studie ist jedoch die erste, die in diesem Tiermodell mit einem oral verfügbaren PDE 3/4 Hemmstoff deutliche spät-kurative hämodynamische und antiproliferative Effekte erzielen kann. Die Route der oralen Anwendung ist dabei einer mehrmals täglichen Inhalation oder einer intravenösen Therapie weit überlegen.

#### **PUMAFENTRINE FÜHRT ZU EINEM ANTI-REMODELING DER LUNGENGEFÄßE**

Es ist mittlerweile bekannt, dass nur ein geringer Prozentsatz der Patienten von rein vasodilativen Therapiestrategien wie etwa Kalziumkanalblockern profitiert. Starke, nicht pulmonalselektive Vasodilatoren können sogar zu einem (lebensgefährlichen) Blutdruckabfall in der systemischen Zirkulation, einer Verschlechterung des intrapulmonalen Gasaustauschs, einer Unterdrückung der Herzaktion und einer weiteren Verschlechterung des Herzzeitvolumens bei den Patienten führen, bei denen eine fortgeschrittene pulmonale Vaskulopathie und keine schlichte Vasokonstriktion besteht<sup>9</sup>.

Die Therapie mit Pumafentrine zeigte zusätzlich zur vasodilatorischen Wirkung auch deutliche antiproliferative Effekte. Dies wird durch die nahezu vollständige Regression des pulmonalvaskulären Remodelings (Abnahme der medialen Wandstärke, des Muskularisierungsgrades und der Lumenobstruktion) deutlich.

Pumafentrine hatte nur einen leichten, gegenüber MCT-behandelten Ratten nicht signifikanten, depressiven Einfluß auf den systemisch-arteriellen Druck und verbesserte sowohl Herzzeitvolumen und Gasaustausch der Tiere.

Durch Therapie mit Pumafentrine kam es zu einer deutlichen Abnahme proliferierender Zellen im Lungengewebe, was durch die Verwendung eines Antikörpers gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) direkt gezeigt werden konnte. Durch diese einfache immunfluoreszenzbasierte Methode ist jedoch eine Quantifizierung der zellulären Proliferation nicht möglich. Weiterhin ist es nicht möglich, eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch Pumafentrine zu zeigen. Deshalb, und um festzustellen ob die PASMC gesunder Tiere und Monocrotalin-behandelter Tiere in unterschiedlicher Weise auf die Behandlung mit Pumafentrine reagieren, wurde außerdem ein *in vitro* Proliferationsassay isolierter PASMCs vorgenommen.

#### **PUMAFENTRINE HEMMT DOSISABHÄNGIG DIE ZELLULÄRE PROLIFERATION**

Durch Therapie mit Pumafentrine kam es zu einer deutlichen Abnahme der proliferativen Aktivität isolierter pulmonalarterieller glatter Muskelzellen *in vitro*, was durch ein auf [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau basierendes Proliferationsassay gezeigt wurde. Dabei sprachen die PASMC Monocrotalin-behandelter Ratten signifikant stärker auf die inhibitorische Wirkung von Pumafentrine an.

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PASMC von Monocrotalin-behandelten Ratten in Anwesenheit von PDGF BB eine höhere migratorische Aktivität aufweisen als Zellen von gesunden Kontrolltieren. Der Phosphodiesterasehemmer 3/4 Tolafentrine hemmte dosisabhängig die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen<sup>152</sup>.

Die Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Pumafentrine werden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Es wäre jedoch naheliegend, dass die antiproliferativen Effekte mit Regulationsmechanismen der extrazellulären Matrix zusammenhängen. Es ist bekannt, dass in Monocrotalin-behandelten Ratten

verschiedene Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen<sup>19, 85, 86</sup>. Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen wird durch Wachstumsfaktoren und erhöhte Scherkräfte durch erhöhte Drücke reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass unter Langzeittherapie mit dem PDE 3/4 Inhibitor Tolafentrine die Expression der meisten dieser Matrix-Metalloproteinasen und Adhäsionsmoleküle in Monocrotalin-behandelten Ratten wieder herunterreguliert wird, was einen positiven Einfluß von PDE 3/4 Inhibitoren auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nahelegt.

#### **THERAPIE MIT PUMAFENTRINE INDUZIERT DIE APOPTOSE VON GEFÄßZELLEN**

Gleichzeitig induzierte die Therapie mit Pumafentrine eine Apoptose von pulmonalarteriellen Gefäßzellen, was somit nicht nur die Stagnation, sondern auch den fast vollständigen Rückgang der Mediahypertrophie, der Lumenobstruktion und der verstärkten Muskularisierung der Gefäße unter Therapie erklärt. Durch die verwendete Methode konnte die Apoptoserate der behandelten Tiere nicht quantifiziert werden.

Es ist seit langem bekannt, dass hohe intrazelluläre Konzentrationen von cAMP *in vitro* effektiv eine Apoptose verschiedener Zelltypen auslösen können. Theophyllin, ein unspezifischer Phosphodiesterase-Hemmstoff, ist in der Lage, durch eine Herunterregulierung von Bcl-2 eine Apoptose von verschiedenen Karzinomzelllinien auszulösen<sup>153</sup>.

Ein pro-apoptotischer Effekt kann außerdem durch eine cAMP-abhängige Hemmung des extracellular-related Kinase (ERK)-Signaltransduktionsweges durch die Erhöhung von cAMP und Stimulation der Kaspase 3-Aktivität erklärt werden<sup>154, 155</sup>. Koffein, das ebenfalls (unspezifische) Phosphodiesterase-Hemmwirkung besitzt, kann Apoptose in Zellkulturlinien auslösen, ebenfalls über eine p53/ Kaspase 3-Aktivierung<sup>156</sup>. Es ist außerdem bekannt, dass PDE 4-Isoformen durch ERK reguliert werden<sup>54, 157</sup>. Chen *et. al.* konnten eine Apoptose verschiedener Gliomzelllinien durch Behandlung mit dem PDE 4-Inhibitor Roflumilast erzielen<sup>158</sup>.

Growcott *et. al.* untersuchten den pro-apoptotischen Effekt verschiedener PDE 3 oder PDE 4-Inhibitoren sowie von Iloprost auf isolierte humane PASMC<sup>159</sup>. Eine pro-apoptotische Wirkung auf PASMC konnte jedoch, in Abwesenheit eines

mitogenen Stimulus, nicht von einem der untersuchten PDE 3 oder PDE4-Hemmstoffe alleine, sondern nur in Kombination mit Iloprost erzielt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Autoren keine Kombinationen von PDE 3/4-Inhibitoren untersucht haben, was die cAMP-Freisetzung ebenso wie bei der gezeigten Kombination mit Iloprost hätte steigern und so eventuell eine Apoptose auslösen können. Dafür spricht die folgende Überlegung: In Leukämiezellen, die resistent gegen eine durch Roflumilast erzeugte pro-apoptotische Wirkung wurden, konnte in einer Studie durch Kombination mit einem PDE 3-Inhibitor (Cilostamide) wieder eine Apoptose der Zellen herbeigeführt werden<sup>160</sup>. Die alleinige Verwendung eines PDE 3-Hemmstoffes löste interessanterweise dagegen in keiner der untersuchten Zelllinien eine Apoptose aus. Die starke pro-apoptotische Wirkung der Therapie mit Pumafentrine ist also vor allem auf einen synergistischen Effekt der kombinierten PDE 3/4-Hemmung zurückzuführen.

#### **DIE PDE 3A IST IM ENDOTHEL MONOCROTALIN-BEHANDELTER RATTEN ÜBEREXPRIMIERT**

Obwohl manche Gewebe sowohl PDE 3A als auch PDE 3B exprimieren, ist in Geweben, die beide Isoformen exprimieren, normalerweise die PDE 3A die vorherrschende Isoform. Es ist außerdem bekannt, dass die PDE 3A, nicht aber die PDE 3B vor allem in Blutgefäßen und im Herzmuskel exprimiert ist<sup>115</sup>. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie nur die Expression der PDE 3A in den Rattenlungen untersucht.

In der vorliegenden Studie ist die PDE 3A im Gefäßendothel von Monocrotalin-behandelten Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollen überexprimiert. Diese Überexpression stellt ein mögliches interessantes Ziel der PDE 3-Hemmung dar:

Unabhängig von der Ursache spielt die Endothelzelle eine wichtige Rolle in der Pathobiologie der pulmonalen Hypertonie. Sie kann sowohl ein Initiator als auch eine Zielzelle im Voranschreiten der Erkrankung sein<sup>18, 20, 161</sup>. Ähnlich den Veränderungen der pulmonalarteriellen Hypertonie verursacht Monocrotalin eine Endothelzellschädigung und -proliferation. Es wurde berichtet, dass Erhöhungen von cAMP oder cGMP in Endothelzellen einen Rückgang der mikrovaskulären Hyperpermeabilität begünstigen<sup>162-164</sup>. Die erhöhte Permeabilität humaner Endothelzell-Monolayer kann sowohl durch Inhibitoren der PDE 3 oder 4 als auch

durch dualselektive PDE 3/4 Inhibitoren verhindert werden<sup>165</sup>. Inhibitoren der PDE 3 hemmen die Proliferation von Endothelzellen und senken die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen.

Es ist jedoch insgesamt wenig über die Expression der verschiedenen PDE 3 Varianten in diesen Zellen bekannt<sup>48, 115</sup>. Wagner *et. al.* beobachteten eine Erhöhung der PDE 3A mRNA in Pulmonalarterienringen hypoxischer Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Sie unterschieden jedoch nicht zwischen der Expression in Endothel und glatten Muskelzellen<sup>41</sup>.

Es wurde bereits im Ergebnisteil diskutiert, dass das Fehlen der erwarteten positiven Immunreaktivität in den glatten Gefäßmuskelzellen in den Paraffinschnitten durch eine durch die Fixation und Einbettung des Gewebes zurückzuführende Zerstörung der glattmuskulären Epitope für die PDE 3 bedingt sein kann. Dafür wurde die erhaltene positive Immunreaktivität der isolierten PASMC sprechen.

#### **PDE 3A, 4A UND 4D SIND IN GLATTEN MUSKELZELLEN LOKALISIERT**

In dieser Studie wurde außerdem die immunhistochemische und immunzytochemische Lokalisation der PDE 3A, 4A und 4D im Lungengewebe und in isolierten PASMC gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten vorgestellt.

Dabei ergab sich kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität (Expressionsstärke) oder subzellulären Lokalisation zwischen den PASMC gesunder und MCT-behandelter Ratten. Die Expressionsstärke sagt jedoch nicht notwendigerweise etwas über die Aktivität der PDE in den PASMC aus. MacLean *et. al.* fanden eine erhöhte cAMP-PDE-Aktivität sowie eine erhöhte PDE 3-Aktivität in den großen und mittelgroßen Pulmonalarterien (5 mm- 0,2  $\mu$ m) hypoxischer Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, jedoch keine erhöhte Aktivität in den kleinen Widerstandsarterien (100- 300  $\mu$ m)<sup>40</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich die kleinen Widerstandsarterien (100- 300  $\mu$ m) zur Isolation der PASMC benutzt. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Expressionsstärke und/ oder Aktivität der untersuchten PDE-Isoformen in den kleineren oder größeren Pulmonalarterien der Monocrotalin-behandelten Ratten unterschiedlich ist.

In humanen PASMC werden bekanntermaßen alle 4 Isoformen der PDE 4 exprimiert<sup>159</sup>. Die PDE 4 stellt dabei etwa 36% der cAMP-spezifischen

hydrolytischen Aktivität, die PDE 3 ungefähr 22%. Die PDE 3 und 4 sind somit die wichtigsten cAMP-abbauenden PDE in humanen PASMC. Über die Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen der PDE 4 in PASMC von Ratten ist weniger bekannt, außer für Varianten der PDE 4D, die bekanntermaßen in PASMC von Ratten exprimiert werden<sup>115</sup>. In der vorliegenden Studie wird außerdem immunzytochemisch gezeigt, dass auch eine weitere Isoform, die PDE 3A, in PASMC von Ratten vorhanden ist und ein zytosolisches Expressionsmuster aufweist.

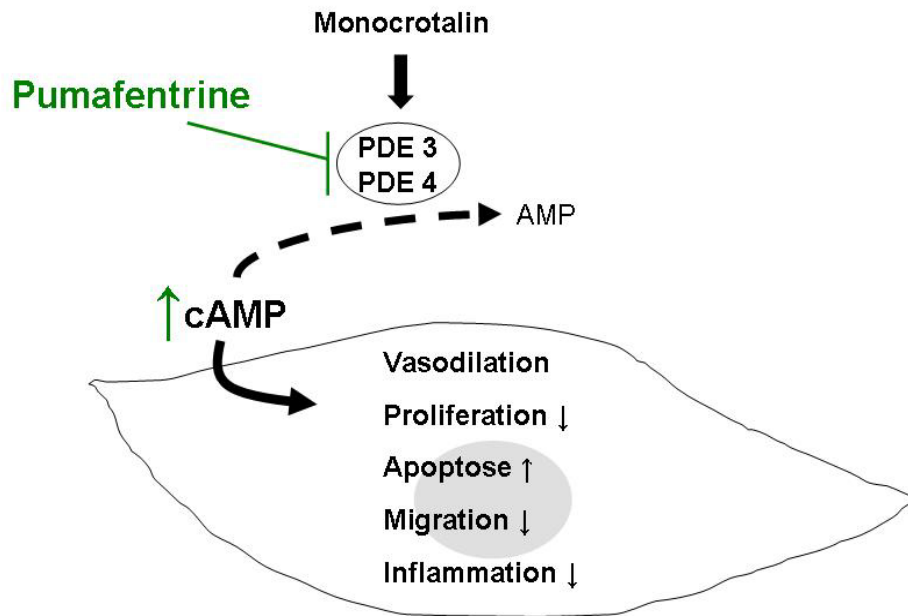
#### **PUMAFENTRINE ERHÖHT DIE cAMP-FREISETZUNG GLATTER MUSKELZELLEN**

PDE 3 und PDE 4 sind relevante cAMP-abbauende Phosphodiesterasen in den meisten Körpergeweben, darunter auch der Lunge<sup>47, 48, 166, 167</sup>. Obwohl die PDE 3 cAMP und cGMP mit gleicher Michaeliskonstante umsetzt, ist die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit für cAMP fünffach höher als für cGMP, deshalb wird die PDE 3 auch als cGMP-inhibierte PDE bezeichnet. Funktional bevorzugt PDE 3 also cAMP als Substrat und ist somit funktional ein cAMP-abbauendes Enzym<sup>47, 49</sup>.

Um dies zu untersuchen wurde die cAMP-Bildung in PASMCs gesunder und Monocrotalin-behandelter Ratten gemessen. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Pumafentrine erhöhte dosisabhängig die Abgabe von cAMP an das Kulturmedium. Der protektive Mechanismus von Pumafentrine ist daher zu einem großen Teil auf die cAMP-medierte Effekte zurückzuführen. Es ist bekannt, dass cAMP verschiedene, in die Zellproliferation involvierte Signaltransduktionswege beeinflusst<sup>168-170</sup>. Es wurde gezeigt, dass cAMP cdk4 und Erk-Aktivierung in Schilddrüsenepithelzellen hemmt<sup>171</sup> und den cdk2-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> in glatten Muskelzellen hochreguliert<sup>172, 173</sup>.

Die cAMP-Abgabe der Zellen Monocrotalin-behandelter Ratten an das Kulturmedium war leicht, jedoch nicht signifikant höher als die gesunder Kontrollen. In den Zellysaten war keine Steigerung von cAMP durch eine Vorbehandlung mit Pumafentrine festzustellen. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die erhöhten intrazellulären Mengen an cAMP direkt an das Kulturmedium abgegeben werden, sodaß in den Zellen selbst keine erhöhten Spiegel an cAMP mehr verbleiben. Zum anderen existieren in der Zelle verschiedene cAMP-„Pools“, was durch eine Kompartimentalisierung der cAMP-Produktion innerhalb der Zelle bedingt

ist <sup>174</sup>. Somit müssen diese nur geringen Änderungen in den cAMP-Spiegeln nicht notwendigerweise auch mit den beobachteten physiologischen Effekten von Pumafentrine korrelieren.



**ABBILDUNG 24:** DIE PHOSPHODIESTERASEN 3 UND 4 MEDIIEREN DIE HYDROLYSE VON cAMP zum inaktiven Nukleotid. cAMP vermittelt in der Zelle vasodilatorische, anti-inflammatorische und antiproliferative Vorgänge und verhindert die Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Eine Verringerung von cAMP, etwa durch eine Imbalanz von Prostazyklin und Thromboxan, führt zu Vasokonstriktion, Entzündungsvorgängen und pulmonalvaskulärem Remodelling. Pumafentrine hemmt die PDE 3 und 4 und führt somit zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel und in der Folge zu einer partiellen Reversion der pulmonalarteriellen Hypertonie.

Widersprüchlich zu den vorliegenden Ergebnissen verhält sich eine Studie von Growcott *et. al.*, die zeigen konnten, dass die Inkubation humaner PASMC mit einem PDE 3- oder einem PDE 4-Hemmstoff die intrazellulären cAMP-Spiegel signifikant zu steigern vermag <sup>159</sup>. In dieser Studie konnte dagegen nur eine Steigerung der cAMP-Spiegel im Kulturmedium der Zellen (also eine verstärkte Ausschleusung von cAMP aus den Zellen) beobachtet werden.



### **PDE 3 UND 4 ALS ZUKÜNFTIGE ZIELE IN PULMONALER HYPERTONIE**

Die kombinierte Therapie mit einem Hemmstoff gegen PDE 3 und 4 adressiert die beiden wichtigsten cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen in glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Lunge. Darüber hinaus sind die PDE 3 und 4 die vorherrschenden PDE in Entzündungszellen. In T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, neutrophilen und basophilen Granulozyten werden Isoenzyme der PDE 3 und 4 mit einem Überwiegen der PDE 4 exprimiert. Wie schon erwähnt führt die dualselektive Inhibition der PDE 3/4 zu sehr günstigen synergistischen bzw. additiven Therapieeffekten, zum Beispiel in der Induktion der Apoptose resistenter Zellen oder in der Potenzierung der Vasodilation und Verbesserung des Gasaustausches und Shuntflusses im Lungengewebe. Eine chronische Entzündungsreaktion spielt ebenfalls eine große Rolle in der Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie<sup>175</sup>. Diese könnte durch den Einsatz von entzündungshemmenden PDE 3/4-Inhibitoren ebenfalls günstig beeinflusst werden. Der *second messenger* cAMP und sein Zielprotein Proteinkinase A können, wie bereits erwähnt, effektiv die Proliferation von Zellen hemmen, so dass zusätzlich zur vasodilatorischen Komponente eine langfristige antiproliferative Wirkung durch Therapie mit PDE 3/4-Inhibitoren zu erwarten ist.

Limitierend für den Einsatz der genannten PDE-Inhibitoren sind derzeit noch die Nebenwirkungen. Es ist bekannt, dass Hemmstoffe der PDE 4 bestimmte ‚ratten-spezifische‘ Nebenwirkungen wie Arteriopathien, Myokarddegeneration, Endokardfibrose und Hodenveränderungen hervorrufen. All diese Effekte, vor allem die Arteriopathien, traten dagegen nicht oder nur bei Verwendung extrem hoher Konzentrationen bei anderen Spezies und beim Menschen auf<sup>176</sup>.

Bian *et. al.* untersuchten die Expressionslevel und die Aktivität der verschiedenen PDE 4-Isoformen in verschiedenen Körpergeweben von Ratten, Affen und Menschen und die Wirkung von PDE 4-Inhibitoren. Sie fanden eine generell weit höhere Expression der PDE 4-Isoformen in Ratten im Vergleich zum Menschen. Ein PDE 4-Inhibitor zeigte sich etwa 10 x potenter in der Inhibition der PE-stimulierten Kontraktion von Arterien bei Ratten als bei Menschen. PDE 4-Hemmstoffe waren sicherer in Menschen und auch Affen und verursachten andere und weniger Nebenwirkungen als bei den untersuchten Ratten<sup>134</sup>. Diese erhöhten Expressions-

und Aktivitätsspiegel der PDE 4 in Ratten könnten die relativ erhöhte Empfindlichkeit der Ratte auf die Toxizität von PDE 4-Hemmstoffen erklären.

PDE 3-Hemmstoffe können ebenfalls bei Hunden und Ratten Arteriopathien und Mesenterialarteriennekrosen auslösen<sup>177</sup>. Dies scheint ebenfalls ein Phänomen darzustellen, das beim Menschen bis jetzt nicht beobachtet wird<sup>176</sup>.

Systemisch applizierte PDE 3-Inhibitoren können Arrhythmien im Myokard und eine extreme Vasodilation von Gefäßen auslösen. Es ist außerdem bekannt, dass die Langzeittherapie mit PDE 3-Inhibitoren zu einer erhöhten krankheitsbedingten Mortalität führen kann<sup>178</sup>.

PDE 4-Inhibitoren verursachen beim Menschen Übelkeit, Erbrechen und sekretorische Durchfälle durch Erhöhung der cAMP-Spiegel im Gastrointestinaltrakt, Beeinflussung des Brechzentrums im ZNS und durch Hypersekretion von Magensäure durch Parietalzellen. Auch bei kombinierten PDE 3/4 Inhibitoren tritt häufig Übelkeit auf<sup>178</sup>.

Diese Nebenwirkungen sowie ungenügende Erwartungen hinsichtlich der Halbwertszeit dieser Substanzen verhinderten bislang eine erfolgreiche klinische Anwendung. Eine Lösungsmöglichkeit stellt zum einen die dualselektive PDE 3/4 Hemmung dar, da durch die dadurch erreichte Potenzierung der cAMP-Erhöhung eine niedrigere Gesamtdosis der Substanz verabreicht werden kann.

Eine weitere elegante Lösung zur Minimierung von Nebenwirkungen ist die Kombination geringer Dosen von PDE 3/4-Inhibitoren mit Prostazyklinen. Inhalativ verabreichte Vasodilatoren führen zu einer selektiven pulmonalen Vasorelaxation in gut ventilerten (und somit durch den Vasodilator erreichbaren) Regionen in der Lunge und verbessern Gasaustausch, pulmonalarteriellen Druck und Ventilations-Perfusions-Matching. Die Prostanoiden besitzen jedoch relativ kurze biologische Halbwertszeiten bei physiologischen pH-Werten, und mehrmalige Inhalationen pro Tag sind notwendig. Es konnte jedoch sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien gezeigt werden, dass bereits sehr geringe, *per se* nicht effektive Dosen von PDE 3, PDE 4, PDE 5 und kombinierten PDE 3/4-Inhibitoren die pulmonale Vasodilation durch inhaliertes PGI<sub>2</sub> durch eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel<sup>159</sup> erheblich verlängern und verstärken können<sup>79-81, 179, 180</sup>. Ein weiteres Problem bei der Anwendung von Prostaglandinen ist (wie bereits

in der Einleitung erwähnt) die Entwicklung einer pharmakodynamischen Toleranz durch Rezeptordesensibilisierung, wobei die Dosis des Prostaglandins sukzessive erhöht werden muß. Dies könnte durch eine Kombinationstherapie mit Phosphodiesterasehemmern ebenfalls vermieden werden. Dabei sind oral verfügbare (wie Pumafentrine) oder durch Ko-Inhalation mit dem Prostanoid verabreichbare PDE-Hemmer in der Anwendung zweckmäßiger als systemisch applizierte Inhibitoren. Die Kombinationstherapie von PGI<sub>2</sub>-Abkömmlingen und Phosphodiesterasehemmern sollte deshalb als mögliche günstige therapeutische Strategie zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie in Betracht gezogen werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Phosphodiesterasehemmer sind zur Zeit in der Erprobung zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie. Einige PDE 5-Inhibitoren sind bereits zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie zugelassen, jedoch ist bisher weniger über den therapeutischen Nutzen von PDE 3-, PDE 4- und insbesondere dualselektiven PDE 3/4-Inhibitoren bekannt.

Die vorliegende Studie untersucht die chronisch-therapeutischen Effekte von Pumafentrine, einem oral verfügbaren, gemischtselektiven PDE 3/4-Hemmstoff, in einem Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Nach einmaliger subkutaner Injektion von Monocrotalin (60 mg/kg) wurde Pumafentrine vom Tag 28 bis 42 nach Monocrotalin-induzierter Lungenschädigung verabreicht (10 mg/kg/d). Die Behandlung mit Pumafentrine konnte teilweise die pulmonale Hypertonie und die Rechtsherzhypertrophie der Ratten rückgängig machen. Zusätzlich wurden die progressive Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien, die Mediahypertrophie und die Abnahme der Lumenfläche größtenteils rückgängig gemacht. Die chronische Therapie der Ratten mit Pumafentrine potenzierte die endothelabhängige Acetylcholin-induzierte Vasodilation und verbesserte die endothelunabhängige vasodilatorische Reaktion auf Natrium-Nitroprussid im Modell der isolierten Rattenlunge.

*In vivo* wurde die Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen in der Lunge gezeigt. Pumafentrine übte weiterhin einen pro-apoptotischen Effekt auf Gefäßzellen aus. Darüber hinaus erhöhte Pumafentrine dosisabhängig die Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat und hemmte die Proliferation kultivierter pulmonalarterieller glatter Muskelzellen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Pumafentrine teilweise die Monocrotalin-induzierte pulmonale Hypertonie, den proliferativen Gefäßwandumbau und die Rechtsherzhypertrophie rückgängig machen kann.

Dies ist die erste Studie, die einen therapeutischen Effekt eines oral verfügbaren PDE 3/4 Hemmers in einem experimentellen Modell der pulmonalen Hypertonie zeigt. Die Hemmung der Phosphodiesterasen 3/4 könnte eine neue Therapieoption zur Behandlung der humanen pulmonalarteriellen Hypertonie darstellen.

## 8. SUMMARY

Phosphodiesterase (PDE) inhibitors are currently under investigation for the therapy of pulmonary hypertension. Several PDE 5-inhibitors are approved for the treatment of pulmonary arterial hypertension, but less is known about the therapeutical impact of PDE 3-, PDE 4- or dual-selective PDE 3/4-inhibitors.

The present study was designed to investigate chronic effects of oral pumafentrine, a mixed selective PDE 3/4-inhibitor, in monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension in rats. After a single subcutaneous injection of monocrotaline (60 mg/kg), when chronically administered from day 28 to 42 after monocrotaline-induced lung injury, pumafentrine (10 mg/kg/d) partially reversed pulmonary hypertension and right heart hypertrophy in rats. In addition, small pulmonary arterial muscularisation, medial hypertrophy and decrease in lumen area were largely reversed. Chronic pumafentrine treatment potentiated endothelial-dependent acetylcholine-induced vasodilation and improved the endothelial-independent vasodilatory response to sodium nitroprusside in an isolated rat lung preparation.

Inhibition of smooth muscle cell proliferation under pumafentrine was demonstrated *in vivo* and *in vitro* as was a pro-apoptotic effect of pumafentrine on vascular cells. Moreover, pumafentrine dose-dependently increased cyclic adenosine monophosphate levels and inhibited proliferation of cultured pulmonary arterial smooth muscle cells.

In conclusion, oral pumafentrine partially reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension, lung vascular remodelling and right heart hypertrophy in rats.

This study is the first one which shows a therapeutical effect of an orally bioavailable PDE 3/4 inhibitor in experimental pulmonary hypertension. Phosphodiesterase 3/4 inhibition might be a useful therapeutic option to treat human pulmonary arterial hypertension.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

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

## 10. PUBLIKATIONSLISTE

### 10.1. ORIGINALARBEITEN

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

Dumitrascu R, Köbrich S, **Dony E**, Weissmann N, Savai R, Ghofrani HA, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, and Schermuly RT: '*Pneumotoxicity effects of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline are species-dependent*'; Medizinische Klinik 2006; 101(4): A75-A76

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, **Dony E**, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, and Grimminger F: '*Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling*'; Circulation 2006; Jan 17; 113(2): 286-295

Zakrzewicz A, Kouri FM, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Sandu R, **Dony E**, Seeger W, Schermuly RT, Eickelberg O and Morty RE: '*The TGF- $\beta$ / Smad 2,3 signalling axis is impaired in experimental pulmonary hypertension*'; Eur Respir J 2007; Jun 29 (6): 1094-1104

Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, **Dony E**, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Reza Hoda MA, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger W, Schmidt H, and Weissmann N: '*Hypoxia-dependent regulation of non-phagocytic NADPH oxidase NOX4 in the pulmonary vasculature*'; Circ Res 2007; Aug 3; 101 (3): 258-267

**Dony E**, Dumitrascu R, Lai YJ, Pullamsetti S, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Flockerzi D, Seeger W, Grimminger F, and Schermuly RT: '*Anti-remodeling*

*potency of the phosphodiesterase 3/4 inhibitor pumafentrine in experimental pulmonary hypertension*'; Eur Respir J 2008; 31:1-13

Lai YJ, Pullamsetti SS, **Dony E**, Weissmann N, Butrous G, Banat GA, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: *Role of the prostanoid EP4 receptor in iloprost-mediated vasodilatation in pulmonary hypertension*'; Am J Respir Crit Care Med. 2008 Jul 15; 178(2):188-96

Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, **Dony E**, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schäfer S: *Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling*'; Circulation 2008 Nov 11; 118(20):2081-90

Dumitrascu R, Koebrich S, **Dony E**, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, Ghofrani HA, Samidurai A, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: *Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury*'; BMC Pulm Med. 2008 Dec 17; 8:25

Revermann M, Barbosa-Sicard E, **Dony E**, Schermuly RT, Morisseau C, Geisslinger G, Fleming I, Hammock BD, Brandes RP: *Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*'; J Hypertens 2009 Feb; 27(2): 322-31

Klein M, Vogelsberger S, de Graaf K, Schäfer M, Schermuly RT, Grimminger F, Seeger W, **Dony E**, Pullamsetti SS, Steioff K, Lohn M, Wohlfart P, Schindler U, Strobel H, Rütten H, van Eickels M: *Soluble Guanylyl Cyclase Activation Reduces Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats*'; in Revision

## 10.2. POSTERBEITRÄGE

**Dony E**, Dumitrascu R, Lai YJ, Pullamsetti S, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Flockerzi D, Seeger W, Grimminger F, and Schermuly RT: *Partial*



*reversal of experimental pulmonary hypertension by phosphodiesterase 3/4 inhibition*

European Respiratory Society, Annual Congress September 2006, *Präsentation*

Schermuly RT, **Dony E**, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F: *'Tyrosine kinase inhibition in pulmonary hypertension: the anti-proliferative approach'*

European Respiratory Society, Annual Congress September 2006, *Posterbeitrag*

Schermuly RT, Dumitrascu R, Koebrich S, Traupe H, **Dony E**, Pullamsetti S, Savai R, Weissmann N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F: *'Acute lung injury induced by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline in mice'*

European Respiratory Society, Annual Congress September 2006, *Posterbeitrag*

**Dony E**, Dumitrascu R, Ghofrani HA, Weissmann N, Klepetko W, Seeger W, Schermuly RT: *'Histomorphometrical analysis of experimental and clinical pulmonary emphysema'*

American Thoracic Society, Annual Congress Mai 2007, *Posterbeitrag*

Lai YJ, Pullamsetti SS, **Dony E**, Weissmann N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: *'Role of prostanoid EP4 receptor in Iloprost-mediated vasodilation in pulmonary hypertension'*

American Thoracic Society, Annual Congress Mai 2007, *Posterbeitrag*

Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, **Dony E**, Scherer A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Kwapiszewska G, Kummer W, Schmidt H, Seeger W, Grimminger F, Hänze J, Weissmann N: *'Hypoxia-driven upregulation of the catalytic NADPH oxidase subunit, Nox 4, in pulmonary hypertension'*

American Thoracic Society, Annual Congress Mai 2007, *Posterbeitrag*

## 11. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Klob J. Endarteriitis pulmonalis deformans. *Wien Wochenblatt* 1865;(31):45.
- (2) Romberg E. Über Sklerose der Pulmonalarterie. *Dtsch Arch Klin Med* 1891;(48):197-206.
- (3) Moenckeberg JG. über die genuine arteriosklerose der lungenarterie. *Dtsch Med Wochenschr* 1907;(33):1243-6.
- (4) Brenner O. Pathology of the vessels of the pulmonary circulation. *Arch Intern Med* 1935;(56):211-37.
- (5) Brill I.C., Krygier C.K. Primary pulmonary vascular sclerosis. *Arch Intern Med* 1941;(68):560-77.
- (6) Larrabee W.F, Parker R.L., Edwards J.E. Pathology of intrapulmonary arteries and arterioles in mitral stenosis. *Proc Mayo Clin* 1949;(24):316-26.
- (7) DRESDALE DT, SCHULTZ M, MICH TOM RJ. Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *Am J Med* 1951 December;11(6):686-705.
- (8) Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16;43(12 Suppl S):5S-12S.
- (9) Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997 January 9;336(2):111-7.
- (10) Fishman AP. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 2001 September;22(3):385-91, vii.
- (11) Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 1996 February 1;334(5):296-302.
- (12) Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, Rich S, Barst RJ, Barrett PS, Kral KM, Jobsis MM, Loyd JE, Murali S, Frost A, Girgis R, Bourge RC, Ralph DD, Elliott CG, Hill NS, Langleben D, Schilz RJ, McLaughlin VV, Robbins IM, Groves BM, Shapiro S, Medsger TA, Jr. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary

- hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000 March 21;132(6):425-34.
- (13) Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994 February;144(2):275-85.
- (14) Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tudor RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16;43(12 Suppl S):25S-32S.
- (15) Loscalzo J. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992 July 9;327(2):117-9.
- (16) Olschewski H, Rose F, Grunig E, Ghofrani HA, Walmrath D, Schulz R, Schermuly R, Grimminger F, Seeger W. Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *J Lab Clin Med* 2001 December;138(6):367-77.
- (17) Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension [see comments]. *N Engl J Med* 1992 July 9;327(2):70-5.
- (18) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993 June 17;328(24):1732-9.
- (19) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005 October;115(10):2811-21.
- (20) Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16;43(12 Suppl S):13S-24S.
- (21) Tudor RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. *Clin Chest Med* 2001 September;22(3):405-18.
- (22) Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 June;159(6):1925-32.
- (23) Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci* 2000 October;320(4):223-32.

- (24) Dandel M, Lehmkuhl HB, Hetzer R. Advances in the medical treatment of pulmonary hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2005;28(5-6):311-24.
- (25) RALL TW, SUTHERLAND EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 1958 June;232(2):1065-76.
- (26) SUTHERLAND EW, RALL TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958 June;232(2):1077-91.
- (27) Bourne H, Rall T.W, Gallagher GL. Getting the message across. *J NIH Res* 1990;2:77-8.
- (28) Brostrom MA, Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG. A cyclic 3',5'-amp-stimulated protein kinase from cardiac muscle. *Adv Enzyme Regul* 1970;8:191-203.
- (29) Tao M, Salas ML, Lipmann F. Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970 September;67(1):408-14.
- (30) Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 September;3(9):710-8.
- (31) SHMAN DF, LIPTON R, MELICOW MM, PRICE TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1963 May 22;11:330-4.
- (32) Hardman JG, SUTHERLAND EW. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1969 December 10;244(23):6363-70.
- (33) Waldman SA, Rapoport RM, Murad F. Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* 1984 December 10;259(23):14332-4.
- (34) Winqvist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F, Rapoport RM. Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 December;81(23):7661-4.
- (35) Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989 March 2;338(6210):78-83.
- (36) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 December;84(24):9265-9.

- (37) Buga GM, Gold ME, Wood KS, Chaudhuri G, Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1989 February 14;161(1):61-72.
- (38) Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995 July 27;333(4):214-21.
- (39) Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 2002 December;137(8):1187-94.
- (40) MacLean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 November;283(2):619-24.
- (41) Wagner RS, Smith CJ, Taylor AM, Rhoades RA. Phosphodiesterase inhibition improves agonist-induced relaxation of hypertensive pulmonary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 September;282(3):1650-7.
- (42) Rondelet B, Kerbaul F, Van BR, Motte S, Fesler P, Hubloue I, Rummelink M, Brimiouille S, Salmon I, Ketelslegers JM, Naeije R. Signaling molecules in overcirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: effects of sildenafil therapy. *Circulation* 2004 October 12;110(15):2220-5.
- (43) Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007 December;213(3):589-602.
- (44) Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2006 August;5(8):689-702.
- (45) Choi YH, Ekholm D, Krall J, Ahmad F, Degerman E, Manganiello VC, Movsesian MA. Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem J* 2001 January 1;353(Pt 1):41-50.
- (46) Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006 September;58(3):488-520.
- (47) Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995 October;75(4):725-48.
- (48) Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 2006 March;109(3):366-98.

- (49) Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 1997 March 14;272(11):6823-6.
- (50) Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;66:241-77.
- (51) Rose RJ, Liu H, Palmer D, Maurice DH. Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 1997 September;122(2):233-40.
- (52) Thompson WJ, Epstein PM, Strada SJ. Purification and characterization of high-affinity cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from dog kidney. *Biochemistry* 1979 November 13;18(23):5228-37.
- (53) Epstein PM, Strada SJ, Sarada K, Thompson WJ. Catalytic and kinetic properties of purified high-affinity cyclic AMP phosphodiesterase from dog kidney. *Arch Biochem Biophys* 1982 October 1;218(1):119-33.
- (54) Houslay MD, Sullivan M, Bolger GB. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv Pharmacol* 1998;44:225-342.
- (55) Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:403-27.
- (56) Ivorra MD, Le BA, Lugnier C. Characterization of membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine aortic smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992 April;19(4):532-40.
- (57) Prigent AF, Fougier S, Nemoz G, Anker G, Pacheco H, Lugnier C, Lebec A, Stoclet JC. Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms from rat heart and bovine aorta. Separation and inhibition by selective reference phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1988 October 1;37(19):3671-81.
- (58) Saeki T, Saito I. Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochem Pharmacol* 1993 September 1;46(5):833-9.
- (59) Komasa N, Lugnier C, Stoclet JC. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1991 October;104(2):495-503.
- (60) Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am J Physiol* 1994 May;266(5 Pt 1):L536-L543.

- (61) Liu H, Maurice DH. Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem* 1999 April 9;274(15):10557-65.
- (62) Liu H, Palmer D, Jimmo SL, Tilley DG, Dunkerley HA, Pang SC, Maurice DH. Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *J Biol Chem* 2000 August 25;275(34):26615-24.
- (63) Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res* 1998 February;43(2):163-8.
- (64) Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, Dumitrascu R, Tian X, Weissmann N, Ghofrani HA, Kaulen C, Dunkern T, Schudt C, Voswinckel R, Zhou J, Samidurai A, Klepetko W, Paddenberg R, Kummer W, Seeger W, Grimminger F. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 2007 May 1;115(17):2331-9.
- (65) D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991 September 1;115(5):343-9.
- (66) McLaughlin VV, Presberg KW, Doyle RL, Abman SH, McCrory DC, Fortin T, Ahearn G. Prognosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004 July;126(1 Suppl):78S-92S.
- (67) Galie N, Branzi A. Pulmonary arterial hypertension: therapeutic algorithm. *Ital Heart J* 2005 October;6(10):856-60.
- (68) Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004 September 30;351(14):1425-36.
- (69) Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976 October 21;263(5579):663-5.
- (70) Chattaraj SC. Treprostinil sodium Pharmacia. *Curr Opin Investig Drugs* 2002 April;3(4):582-6.
- (71) Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 1996 May 1;124(9):820-4.

- (72) Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Hoper MM, Behr J, Kleber FX, Seeger W. Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group [see comments]. *Ann Intern Med* 2000 March 21;132(6):435-43.
- (73) Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoeper MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002 August 1;347(5):322-9.
- (74) Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, Seeger W. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2004 May;102(2):139-53.
- (75) Channick RN, Olschewski H, Seeger W, Staub T, Voswinckel R, Rubin LJ. Safety and efficacy of inhaled treprostinil as add-on therapy to bosentan in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2006 October 3;48(7):1433-7.
- (76) Sandifer BL, Brigham KL, Lawrence EC, Mottola D, Cuppels C, Parker RE. Potent effects of aerosol compared with intravenous treprostinil on the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2005 December;99(6):2363-8.
- (77) Schermuly RT, Pullamsetti SS, Breitenbach SC, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Nilius SM, Schror K, Kirchrath JM, Seeger W, Rose F. Iloprost-induced desensitization of the prostacyclin receptor in isolated rabbit lungs. *Respir Res* 2007;8:4.
- (78) McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Rich S. Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension [see comments]. *N Engl J Med* 1998 January 29;338(5):273-7.
- (79) Schermuly RT, Ghofrani HA, Enke B, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schudt C, Walmrath D. Low-dose systemic phosphodiesterase inhibitors amplify the pulmonary vasodilatory response to inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 November;160(5 Pt 1):1500-6.
- (80) Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Schudt C, Tenor H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 February;292(2):512-20.
- (81) Schermuly RT, Krupnik E, Tenor H, Schudt C, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D, Ghofrani HA. Coaerosolization of Phosphodiesterase Inhibitors Markedly Enhances the Pulmonary Vasodilatory Response to Inhaled Iloprost in Experimental Pulmonary



- Hypertension. Maintenance of lung selectivity. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 November 1;164(9):1694-700.
- (82) Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Leuchte H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 December;281(6):L1361-L1368.
- (83) Thompson CA. Bosentan enters market with risk management program. *Am J Health Syst Pharm* 2002 March 15;59(6):506.
- (84) Dupuis J, Hoepfer MM. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2008 February;31(2):407-15.
- (85) Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 2005 July 19;112(3):423-31.
- (86) Barst RJ. PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005 October;115(10):2691-4.
- (87) Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005 September 29;353(13):1412-3.
- (88) Ghofrani HA, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. [Reverse remodeling -- paradigm shift in the treatment of pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 2006 April 21;131(16):871-4.
- (89) Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW. Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med* 2006 July 18;145(2):152-3.
- (90) Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M. Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2006 August;61(8):736.
- (91) Harris P.N., Anderson R.C., Chen K.K. The action of monocrotaline and retronecine. *J Pharmac exp Ther* 1942;75:78-82.
- (92) TURNER JH, LALICH JJ. EXPERIMENTAL COR PULMONALE IN THE RAT. *Arch Pathol* 1965 April;79:409-18.
- (93) Kay JM, Heath D. Observations on the pulmonary arteries and heart weight of rats fed on *Crotalaria spectabilis* seeds. *J Pathol Bacteriol* 1966 October;92(2):385-94.
- (94) LALICH JJ, MERKOW L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* 1961 July;10:744-50.

- (95) Burns J. The heart and pulmonary arteries in rats fed on *Senecio jacobaea*. *J Pathol* 1972 March;106(3):187-94.
- (96) Gillis CN, Huxtable RJ, Roth RA. Effects of monocrotaline pretreatment of rats on removal of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline by perfused lung. *Br J Pharmacol* 1978 July;63(3):435-43.
- (97) Hayashi Y, LALICH JJ. Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967 February;124(2):392-6.
- (98) Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 1968 February 24;217(5130):723-8.
- (99) Mattocks AR. Acute hepatotoxicity and pyrrolic metabolites in rats dosed with pyrrolizidine alkaloids. *Chem Biol Interact* 1972 September;5(4):227-42.
- (100) Ghodsi F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* 1981 February;240(2):H149-H155.
- (101) Langleben D, Reid LM. Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy. *Lab Invest* 1985 March;52(3):298-303.
- (102) Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980 November;239(5):H692-H702.
- (103) Todd L, Mullen M, Olley PM, Rabinovitch M. Pulmonary toxicity of monocrotaline differs at critical periods of lung development. *Pediatr Res* 1985 July;19(7):731-7.
- (104) Meyrick B. Structure function correlates in the pulmonary vasculature during acute lung injury and chronic pulmonary hypertension. *Toxicol Pathol* 1991;19(4 Pt 1):447-57.
- (105) Rabinovitch M. Investigational approaches to pulmonary hypertension. *Toxicol Pathol* 1991;19(4 Pt 1):458-69.
- (106) LALICH JJ, EHRHART LA. Monocrotaline-induced pulmonary arteritis in rats. *J Atheroscler Res* 1962 November;2:482-92.
- (107) Hilliker KS, Bell TG, Roth RA. Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline. *Am J Physiol* 1982 April;242(4):H573-H579.
- (108) Flockerzi D, et al; Benzonaphthyridines as bronchial therapeutics. patent WO98/21208. 1998.

- (109) Pumafentrine-Hydrochlorid, Materialnummer BYK 33043. EG Sicherheitsdatenblatt. 2001. Byk Gulden.  
Ref Type: Data File
- (110) Dony E, Lai YJ, Dumitrascu R, Pullamsetti SS, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Flockerzi D, Seeger W, Grimminger F, Schemmly RT. Partial reversal of experimental pulmonary hypertension by phosphodiesterase 3/4 inhibition. *Eur Respir J* 2007 November 21.
- (111) Rieder F. Wirkung der spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren Roflumilast und Pumafentrine im Mausmodell der Dextran-Natrium-Sulfat induzierten Kolitis Abteilung klinische Pharmakologie, Med. Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München; 2004.
- (112) Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 1994 February;10(2):41-2.
- (113) Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 1993 May;7(5):659-70.
- (114) Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994 August;71(2):219-25.
- (115) Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 2003 September;64(3):533-46.
- (116) Meyrick B, Reid L. Pulmonary hypertension. Anatomic and physiologic correlates. *Clin Chest Med* 1983 May;4(2):199-217.
- (117) Gray HH, Morgan JM, Kerr IH, Miller GA. Clinical correlates of angiographically diagnosed idiopathic pulmonary hypertension. *Thorax* 1990 June;45(6):442-6.
- (118) Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla PP, Barbareschi M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992 May;45(5):416-9.
- (119) Bravo R, Donald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987 October;105(4):1549-54.
- (120) Heath D. The rat is a poor animal model for the study of human pulmonary hypertension. *Cardioscience* 1992 March;3(1):1-6.

- (121) Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD. The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest* 1996 July 15;98(2):434-42.
- (122) White RJ, Meoli DF, Swarhout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 September;293(3):L583-L590.
- (123) Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD. Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1997 October;151(4):1019-25.
- (124) Haworth SG. Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 2006 November;45(5):317-25.
- (125) Ito K, Nakashima T, Murakami K, Murakami T. Altered function of pulmonary endothelium following monocrotaline- induced lung vascular injury in rats. *Br J Pharmacol* 1988 August;94(4):1175-83.
- (126) Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Port CD, Solliday NH. Monocrotaline-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984 May;176(1):88-94.
- (127) Olschewski H, Olschewski A, Rose F, Schermuly R, Schutte H, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Physiologic basis for the treatment of pulmonary hypertension. *J Lab Clin Med* 2001 November;138(5):287-97.
- (128) Hayashi S, Mitsumori K, Imaida K, Imazawa T, Yasuhara K, Uneyama C, Hayashi Y. Establishment of an animal model for pulmonary fibrosis in mice using monocrotaline. *Toxicol Pathol* 1995 January;23(1):63-71.
- (129) Dumitrascu R, Kobrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Ghofrani HA, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Pneumotoxicity effects of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline are species-dependent. *Medizinische Klinik* 2006;101(4):A75-A76.
- (130) Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NH. Monocrotaline pneumotoxicity in mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989;57(3):149-55.
- (131) Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S, Vainchenker W, Adnot S, Eddahibi S, Maitre B. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res* 2007;8:8.
- (132) Goto J, Ishikawa K, Kawamura K, Watanabe Y, Matumoto H, Sugawara D, Maruyama Y. Heme oxygenase-1 reduces murine monocrotaline-induced

- pulmonary inflammatory responses and resultant right ventricular overload. *Antioxid Redox Signal* 2002 August;4(4):563-8.
- (133) Phillips CG, Kaye SR. On the asymmetry of bifurcations in the bronchial tree. *Respir Physiol* 1997 January;107(1):85-98.
- (134) Bian H, Zhang J, Wu P, Varty LA, Jia Y, Mayhood T, Hey JA, Wang P. Differential type 4 cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) expression and functional sensitivity to PDE4 inhibitors among rats, monkeys and humans. *Biochem Pharmacol* 2004 December 1;68(11):2229-36.
- (135) Kodama K, Adachi H. Improvement of mortality by long-term E4010 treatment in monocrotaline- induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 August;290(2):748-52.
- (136) Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy- pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphe nyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 September;282(3):1312-8.
- (137) Sakuma F, Miyata M, Kasukawa R. Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *Lung* 1999;177(2):77-88.
- (138) Lu J, Shimpo H, Shimamoto A, Chong AJ, Hampton CR, Spring DJ, Yada M, Takao M, Onoda K, Yada I, Pohlman TH, Verrier ED. Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 December;128(6):850-9.
- (139) Vaszar LT, Nishimura T, Storey JD, Zhao G, Qiu D, Faul JL, Pearl RG, Kao PN. Longitudinal transcriptional analysis of developing neointimal vascular occlusion and pulmonary hypertension in rats. *Physiol Genomics* 2004 April 13;17(2):150-6.
- (140) Prie S, Stewart DJ, Dupuis J. EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1998 June 2;97(21):2169-74.
- (141) Madden JA, Keller PA, Choy JS, Alvarez TA, Hacker AD. L-arginine-related responses to pressure and vasoactive agents in monocrotaline-treated rat pulmonary arteries. *J Appl Physiol* 1995 August;79(2):589-93.
- (142) Altieri RJ, Olson JW, Gillespie MN. Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 February;236(2):390-5.

- (143) Maruyama J, Maruyama K. Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Am J Physiol* 1994 June;266(6 Pt 2):H2476-H2488.
- (144) Mathew R, Zeballos GA, Tun H, Gewitz MH. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 1995 November;30(5):739-46.
- (145) Wanstall JC, Hughes IE, O'Donnell SR. Reduced relaxant potency of nitroprusside on pulmonary artery preparations taken from rats during the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 1992 October;107(2):407-13.
- (146) Wanstall JC, O'Donnell SR. Responses to vasodilator drugs on pulmonary artery preparations from pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1992 January;105(1):152-8.
- (147) Archer SL, Rist K, Nelson DP, DeMaster EG, Cowan N, Weir EK. Comparison of the hemodynamic effects of nitric oxide and endothelium-dependent vasodilators in intact lungs. *J Appl Physiol* 1990 February;68(2):735-47.
- (148) Russ RD, Walker BR. Maintained endothelium-dependent pulmonary vasodilation following chronic hypoxia in the rat. *J Appl Physiol* 1993 January;74(1):339-44.
- (149) Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolfenrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004 April 30;94(8):1101-8.
- (150) Endoh M. The effects of various drugs on the myocardial inotropic response. *Gen Pharmacol* 1995 January;26(1):1-31.
- (151) Vila PM, Vittone L, Mundina C, Chiappe de CG, Alicia M. Positive lusitropic effect and diminished myofibrillar sensitivity to calcium produced by cAMP on toad (*Bufo arenarum* Hensel) ventricle. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1992;42(2):61-73.
- (152) Pullamsetti S, Krick S, Yilmaz H, Ghofrani HA, Schudt C, Weissmann N, Fuchs B, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Inhaled tolfenrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration. *Respir Res* 2005;6:128.
- (153) Hirsh L, Dantes A, Suh BS, Yoshida Y, Hosokawa K, Tajima K, Kotsuji F, Merimsky O, Amsterdam A. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol* 2004 September 15;68(6):981-8.
- (154) Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, Aoki M, Yamamoto K, Higaki J, Ogihara T. Cyclic AMP

- inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension* 2000 January;35(1 Pt 2):237-43.
- (155) Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN, Sellers LA. Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 2004 April 2;94(6):759-67.
- (156) He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res* 2003 August 1;63(15):4396-401.
- (157) Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 2003 February 15;370(Pt 1):1-18.
- (158) Chen TC, Wadsten P, Su S, Rawlinson N, Hofman FM, Hill CK, Schonthal AH. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram induces expression of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1), resulting in growth inhibition, increased differentiation, and subsequent apoptosis of malignant A-172 glioma cells. *Cancer Biol Ther* 2002 May;1(3):268-76.
- (159) Growcott EJ, Spink KG, Ren X, Afzal S, Banner KH, Wharton J. Phosphodiesterase type 4 expression and anti-proliferative effects in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Respir Res* 2006;7:9.
- (160) Moon E, Lee R, Near R, Weintraub L, Wolda S, Lerner A. Inhibition of PDE3B augments PDE4 inhibitor-induced apoptosis in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002 February;8(2):589-95.
- (161) Celermajer DS, Cullen S, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in children with congenital heart disease and abnormal pulmonary hemodynamics. *Circulation* 1993 February;87(2):440-6.
- (162) Seibert AF, Thompson WJ, Taylor A, Wilborn WH, Barnard J, Haynes J. Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *J Appl Physiol* 1992 January;72(1):389-95.
- (163) Stelzner TJ, Weil JV, O'Brien RF. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol* 1989 April;139(1):157-66.
- (164) Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Podzuweit T. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 1996 March;270(3 Pt 1):C778-C785.

- (165) Suttorp N, Ehreiser P, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Tenor H, Schudt C. Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung* 1996;174(3):181-94.
- (166) Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 1995 September 10;322(1):1-13.
- (167) Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 February;157(2):351-70.
- (168) Bornfeldt KE, Campbell JS, Koyama H, Argast GM, Leslie CC, Raines EW, Krebs EG, Ross R. The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. Dependence on the availability of downstream targets. *J Clin Invest* 1997 August 15;100(4):875-85.
- (169) Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 1999 July;11(7):465-77.
- (170) Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Roger PP. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of cyclin D3-bound CDK4 determines the passage through the cell cycle restriction point in thyroid epithelial cells. *J Biol Chem* 2003 July 18;278(29):26533-40.
- (171) Coulonval K, Bockstaele L, Paternot S, Dumont JE, Roger PP. The cyclin D3-CDK4-p27kip1 holoenzyme in thyroid epithelial cells: activation by TSH, inhibition by TGFbeta, and phosphorylations of its subunits demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis  
1. *Exp Cell Res* 2003 November 15;291(1):135-49.
- (172) Klemm DJ, Watson PA, Frid MG, Dempsey EC, Schaack J, Colton LA, Nesterova A, Stenmark KR, Reusch JE. cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration  
9. *J Biol Chem* 2001 December 7;276(49):46132-41.
- (173) Kothapalli D, Stewart SA, Smyth EM, Azonobi I, Pure E, Assoian RK. Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression  
3. *Mol Pharmacol* 2003 August;64(2):249-58.
- (174) Fischmeister R, Castro LR, bi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006 October 13;99(8):816-28.



- (175) Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003 August;22(2):358-63.
- (176) Giembycz MA. Phosphodiesterase-4: selective and dual-specificity inhibitors for the therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(4):326-33.
- (177) Joseph EC, Rees JA, Dayan AD. Mesenteric arteriopathy in the rat induced by phosphodiesterase III inhibitors: an investigation of morphological, ultrastructural, and hemodynamic changes. *Toxicol Pathol* 1996 July;24(4):436-50.
- (178) Giembycz MA. Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2005 June;5(3):238-44.
- (179) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 2002 April 2;136(7):515-22.
- (180) Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Wiedemann R, Weissmann N, Schudt C, Tenor H, Seeger W, Grimminger F. Amplification of the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost by subthreshold phosphodiesterase types 3 and 4 inhibition in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2002 November;30(11):2489-92.

## 12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	<i>arteria</i>
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
APAH	pulmonalarterielle Hypertonie assoziiert mit bestimmten Faktoren
ANP	atriales natriuretisches Peptid
5'-ATP	5'-Adenosintriphosphat
BNP	brain natriuretisches Peptid
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C <sub>aO<sub>2</sub></sub>	arterielle Sauerstoffsättigung
CCBs	Kalziumkanalblocker
cdk	cyclin-abhängige Kinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
CREB	cAMP-response element binding protein
CTEPH	chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
C <sub>vO<sub>2</sub></sub>	venöse Sauerstoffsättigung
CVP	zentraler Venendruck
d	Tag
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
5'-GTP	5'-Guanosintriphosphat

---

EGF	epidermal growth factor
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
<i>et. al.</i>	und Mitarbeiter
ET-1	Endothelin-1
ERA	Endothelinrezeptorantagonist
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FPAH	familiäre Form der pulmonalarteriellen Hypertonie
Gew. %	Gewichtsprozent
g	Gramm
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HZV	Herzzeitvolumen
IBMX	3-isobutyl 1-methyl- xanthine
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
kg	Kilogramm
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante, ein Maß für die Enzymaffinität
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
LV	Linker Ventrikel
<i>M.</i>	<i>musculus</i>
MCT	Monocrotalin
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
MW	Mittelwert
MWST	mediale Wandstärke

---

N.	nervus
n	Anzahl
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOEL	No Effect Observed Level
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P	Passage
PA	Pulmonalarterie
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PDE	Phosphodiesterase(n)
PDGF	platelet derived growth factor
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck
PE	Phenylephrin
PET	Polyethylenterephthalat
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (Prostazyklin)
PH	pulmonale Hypertonie
PhD	Doctor of Philosophy
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
PPHN	persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen
PVOD	pulmonale veno-okklusive Erkrankung
RIA	Radioimmunoassay
RV	rechter Ventrikel

---

RV/ LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	rechtsventrikulärer Druck
RVSP	rechtsventrikulär-systolischer Druck
SAP	systemisch-arterieller Druck
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler
SNP	Natrium-Nitroprussid
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V.	<i>vena</i>
V <sub>max</sub>	maximum velocity (maximale Umsatzgeschwindigkeit)
VP	Ventilationsdruck
vWF	von Willebrand Faktor
W	Woche(n)
WHO	World Health Organisation

## 13. DANKSAGUNG

Ohne die finanzielle Unterstützung durch Altana Pharma und die Bereitstellung eines Postdocstipendiums durch das Exzellenzcluster ‚Kardiopulmonale Medizin‘ der DFG wäre diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation im Fachbereich Medizin danken.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt danke ich ganz besonders für die nette Übernahme der Betreuung in der Veterinärpathologie.

Meinem direkten Betreuer Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly ganz besonders lieben Dank für die vielen Stunden weiterführender Diskussionen und mentaler Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem den Initiatoren und Organisatoren des PhD-Programmes, sowie den ‚Köpfen‘ des Graduiertenkollegs ‚MBML‘, Dr. Oliver Eickelberg, Dr. Melanie Königshoff, Dr. Rory Morty und Dr. Grazyna Kwapiszewska.

Ying-Ju Lai danke ich für die kompetente Unterstützung bei den *in vitro*-Experimenten. Karin Quanz danke ich für die Durchführung der radioaktiven Arbeiten in dieser Studie. Carmen Homberger sei gedankt für die technische Hilfe bei den Zellkulturexperimenten. Nadine Faulstich danke ich für die technische Assistenz bei den Versuchen zur isolierten Rattenlunge. Dr. Rajkumar Savai danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsprotokolls für die *in situ*-Apoptose-Detektion. Dr. Rio Dumitrascu sei gedankt für die anregenden Diskussionen. Der ‚Schermuly-Gruppe‘ und allen Mitarbeitern im Seltersberg Haus C: danke dafür, dass Ihr die allerbesten Kollegen und Freunde seid, die man sich nur wünschen kann.

Der größte Dank und meine Liebe gelten meiner Familie und meinem Mann Markus, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die mich in allen Situationen auf nur erdenkliche Art unterstützt haben.