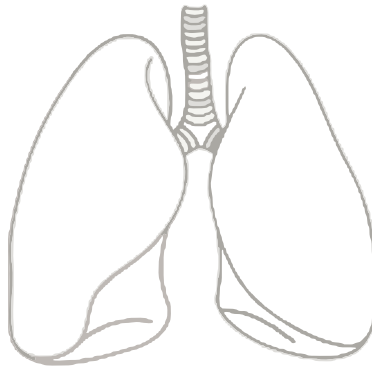


Philipp Christian Kriechling

---

Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der  
P38 $\alpha$ -mitogen-aktivierten Proteinkinase auf die  
experimentelle pulmonale Hypertonie und  
Rechtsherzhypertrophie



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

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

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2017

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

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

**Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der  
P38 $\alpha$ -mitogen-aktivierten Proteinkinase auf die  
experimentelle pulmonale Hypertonie und  
Rechtsherzhypertrophie**

**INAUGURALDISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Philipp Christian Kriechling**

aus Suhl

Gießen 2017

Aus dem  
Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System,  
Zentrum für Innere Medizin (Medizinische Klinik II)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 27.06.2017

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Pulmonal arterielle Hypertonie.....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Geschichte .....	2
1.1.2	Klassifikation.....	3
1.1.3	Definition und Vorkommen.....	4
1.1.4	Physiologie des Lungenkreislaufes und Pathophysiologie der PAH .....	5
1.1.5	Genetik .....	7
1.1.6	Histopathologie.....	8
1.1.7	Klinik.....	9
1.1.8	Prognose .....	9
1.1.9	Therapie.....	9
1.1.9.1	Allgemein.....	9
1.1.9.2	Medikamentöse Therapie .....	10
1.1.9.3	Erweiterte Therapie.....	12
<b>1.2</b>	<b>Das rechte Herz .....</b>	<b>13</b>
1.2.1	Anatomie und Physiologie.....	13
1.2.2	Cor pulmonale .....	13
<b>1.3</b>	<b>Tiermodelle .....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Überblick .....	16
1.3.2	Hypoxiemodell .....	16
1.3.3	Stenosemodell der Arteria pulmonalis.....	18
<b>1.4</b>	<b>P38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase und Inhibition .....</b>	<b>19</b>
1.4.1	Ziel der Arbeit .....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Studiendesign.....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Tiermodell 1 – Hypoxiemodell.....	24
2.1.2	Tiermodell 2 – Stenosemodell der Arteria pulmonalis .....	25
<b>2.2</b>	<b>Material.....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Versuchstiere .....	26
2.2.2	Tierversuchsgenehmigung.....	26
2.2.3	Mausmodell – Geräte und Material .....	27
2.2.3.1	Injektionslösungen/Gase .....	27

2.2.3.2	Operationsbesteck .....	27
2.2.3.3	Material und Geräte – Operation, Therapie und Hämodynamik-Messung .....	28
2.2.3.4	Geräte Hypoxie – Anlage .....	29
2.2.3.5	Geräte – Echokardiographie .....	29
2.2.3.6	Verbrauchsmaterial .....	30
2.2.4	Histologie – Geräte und Material .....	31
2.2.4.1	Geräte und Software .....	31
2.2.4.2	Allgemeine Materialien .....	32
2.2.4.3	Verbrauchsmaterial .....	32
2.2.4.4	Chemikalien .....	33
<b>2.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.3.1	Hypoxie-Anlage .....	35
2.3.2	Stenosemodell – Operation .....	36
2.3.2.1	Allgemein .....	36
2.3.2.2	Vorbereitung .....	37
2.3.2.3	Intubation .....	37
2.3.2.4	Operation .....	37
2.3.2.5	Nachsorge .....	38
2.3.3	Therapie .....	38
2.3.4	Echokardiographie .....	39
2.3.4.1	Echokardiographie allgemein .....	39
2.3.4.2	Echokardiographische Untersuchung im Versuchsaufbau .....	40
2.3.4.3	Cardiac output / Herzminutenvolumen .....	41
2.3.4.4	Herzindex .....	41
2.3.4.5	Myocardial performance index / TEI – Index .....	41
2.3.4.6	Tricuspid annular plane systolic excursion .....	42
2.3.5	Hämodynamik-Messung .....	42
2.3.5.1	Allgemein .....	42
2.3.5.2	Durchführung .....	42
2.3.5.3	Erhobene Parameter .....	43
2.3.6	Proben .....	44
2.3.6.1	Blutprobe .....	44
2.3.6.2	Entnahme der Lungen und des Herzens .....	44
2.3.6.3	Bestimmung der Tibialänge .....	45
2.3.7	Histologie .....	45
2.3.7.1	Analyse der Muskularisierung und Wandstärke der Lungengefäße .....	45
2.3.7.2	Analyse des rechtskardialen Fibrosegrades .....	48
<b>2.4</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>49</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Übersicht der Messparameter .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse Hypoxiemodell .....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Invasive hämodynamische Messung.....	51
3.2.1.1	Systemisch arterieller Blutdruck in der Systole .....	51
3.2.1.2	Systemisch arterieller Blutdruck in der Diastole.....	52
3.2.1.3	Rechtsventrikulärer Blutdruck in der Systole.....	53
3.2.2	Strukturelle Parameter .....	54
3.2.3	Echokardiographie.....	56
3.2.3.1	Herzfrequenz.....	56
3.2.3.2	Herzminutenvolumen.....	57
3.2.3.3	Herzindex .....	58
3.2.3.4	Myocardial performance index / Tei-Index.....	59
3.2.3.5	Tricuspid annular plane systolic excursion .....	60
3.2.4	Histologie.....	61
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse Stenosemodell.....</b>	<b>62</b>
3.3.1	Invasive hämodynamische Messung.....	62
3.3.1.1	Systemisch arterieller Blutdruck in der Systole .....	62
3.3.1.2	Systemisch arterieller Blutdruck in der Diastole.....	63
3.3.1.3	Rechtsventrikulärer Blutdruck in der Systole.....	64
3.3.2	Strukturelle Parameter .....	65
3.3.3	Echokardiographie.....	67
3.3.3.1	Herzfrequenz.....	67
3.3.3.2	Herzminutenvolumen.....	68
3.3.3.3	Herzindex .....	69
3.3.3.4	Myocardial performance index / Tei-Index.....	70
3.3.3.5	Tricuspid annular plane systolic excursion .....	71
3.3.4	Histologie.....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiermodelle .....</b>	<b>74</b>
4.1.1	Hypoxiemodell .....	74
4.1.2	Stenosemodell der Arteria pulmonalis.....	76
<b>4.2</b>	<b>Versuchsaufbau, Echokardiographie, hämodynamische Messung und Histologie ....</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>79</b>
4.3.1	Diskussion der Ergebnisse im Hypoxiemodell .....	79

4.3.2	Diskussion der Ergebnisse im Stenosemodell .....	82
<b>4.4</b>	<b>Die Ergebnisse im Kontext aktueller Studien .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>
<b>12</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>122</b>



# 1 Einleitung

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine lebensbedrohliche, unheilbare Krankheit der arteriellen Lungengefäße mit einer Prävalenz von 10,6 / 1 Million Menschen (Lai et al. 2014). Charakteristisch finden sich progrediente Veränderungen der Intima, Media und Adventitia mit Obliteration des Lumens, Vasokonstriktion und gesteigerter Thrombozyten-Aggregation, was eine Erhöhung der Nachlast des rechten Herzens verursacht. Dies kann über die Stadien der rechtskardialen Hypertrophie, der kompensierten Rechtsherzhypertrophie und des dekompenzierten, dilatativen Rechtsherzversagens den Tod des Patienten bedeuten. Die Ursachen, Pathophysiologie und Klinik der PAH wurde in bislang fünf Weltkonferenzen thematisiert und in einer Klassifikation vereint. Die wissenschaftliche Bestrebung, neue Medikamente und Therapien zu etablieren sind vor dem Hintergrund einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 65% (Benza et al. 2012) immens. Die Erkrankten leiden an unspezifischen Beschwerden wie Belastungsdyspnoe, Schwindel, Müdigkeit, Zyanose und Brustschmerzen sowie Symptomen der Rechtsherzinsuffizienz wie Ödemen, sichtbarer Venenstauung und Stauungsleber. Gegenwärtig werden zur Therapie langwirksame Prostazyklinanaloga, Endothelin-Rezeptor (ETR)-Antagonisten, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase und Phosphodiesterase (PDE)-5-Hemmer eingesetzt. Diese Therapeutika wurden mit Fokus auf die pulmonalarteriellen Veränderungen etabliert und in klinischen Studien untersucht. In den letzten Jahren nahm das Interesse an rechtsventrikulären Veränderungen zu, was ein Umdenken nach sich zog. Etablierte und neue Pharmaka wurden und werden zusätzlich auf ihre rechtsventrikuläre Wirksamkeit analysiert, da dies den prognostisch limitierenden Faktor der Erkrankung darstellt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der neuen Entwicklung Rechnung getragen und eine Medikamentenstudie in einem Hypoxie- und einem Modell der Pulmonalstenose durchgeführt. Die Anwendung von zwei Modellen lässt Rückschlüsse auf die kardiale sowie pulmonale Wirksamkeit der Medikamente zu. Die Therapie der Mäuse erfolgte durch tägliche Gabe eines P38 $\alpha$ -Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Inhibitors. Anschließend wurden die Tiere echokardiographisch sowie mittels Links- und Rechtsherzkatheter untersucht. Das Lungen- und Herzgewebe wurde post mortem histologisch aufgearbeitet.

Als Therapeutikum wurde ein von der Firma Pfizer zur Verfügung gestellter Inhibitor der P38 $\alpha$ -MAPK eingesetzt. Die P38-MAPK wird in Folge zellulären Stresses durch inflammatorische Zytokine, oxidativen Stress, radioaktive Strahlung, Wachstumsfaktoren und osmotische Einflüsse exprimiert. Es ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern in eine Vielzahl Signalkaskaden involviert. P38 wurde in den letzten Jahren in Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), neurodegenerativen Veränderungen und kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, Myokardinfarkt und kardialem Remodeling intensiv beforscht.

Den Inhalt dieser Dissertation bildet die Etablierung eines Hypoxiemodells und eines pulmonalarteriellen Banding-Modells mit anschließender Wirksamkeitsprüfung des P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitors PH-797804 auf pulmonalarterielle und kardiale Veränderungen.

## **1.1 Pulmonal arterielle Hypertonie**

### **1.1.1 Geschichte**

Die PAH ist medizinhistorisch ein junges Krankheitsbild, das im Laufe der letzten 30 Jahre intensiv erforscht wurde. Dies ist unter anderem auf die Einführung neuer, aussichtsreicher Medikamente zurückzuführen. 1891 beschrieb der Arzt Ernst von Romberg erstmals den Symptomkomplex, während er in Leipzig Arbeiten zur „isolierten Sklerose der Lungenarterien“ durchführte (Ernst von Romberg 1891). 1897 erwähnte der Wiener Mediziner Victor Eisenmenger ähnliche pathologische Merkmale bei Patienten mit Ventrikelseptumdefekt (Victor Eisenmenger 1897). Ein aus dem Vitium resultierender, irreversibler Rechts-Links-Shunt trägt bis heute die Bezeichnung Eisenmenger-Reaktion. Beide Mediziner beschrieben ein histopathologisches Remodeling, welches sie in Zusammenhang mit dem erhöhten pulmonalarteriellen Druck sahen (Wood 1958b). Ein halbes Jahrhundert später erfuhr die pulmonale Hypertonie (PH) durch Brenner et al. eine detailliertere Klassifikation, die erstmals den Begriff der plexiformen Läsionen beinhaltet (Brenner 1931). Unter dem Begriff der „Primären pulmonalen Hypertonie“ schrieben Brenner und Dresdale in den 1930er bis 1950er Jahren ihre Abhandlungen (Brenner 1931; Dresdale et al. 1951).

Eine sichere Diagnosestellung gelang erst Mitte des 20. Jahrhunderts durch André Cournands Einführung des Rechtsherzkatheters. Basierend auf dieser technologischen

Grundlage lieferte Paul Wood eine Dekade später die erste allgemein gültige Definition. Bis heute wird der Rechtsherzkatheter zur klinischen Diagnostik angewandt. Wood legte mit 20 mmHg einen oberen Normwert des pulmonalen Kreislaufs fest. Er definierte außerdem den bis heute verwendeten, pathologischen Grenzwert von 25 mmHg (Cournand et al. 1945; Wood 1958a; Galiè et al. 2009).

Die PAH erregte mit Bekanntwerden als Nebenwirkung von Appetitzüglern großes mediales Aufsehen. Das in Deutschland 1966 eingeführte Menocil wurde in Deutschland, Österreich und der Schweiz mit einer erhöhten Zahl PAH-Erkrankter in Zusammenhang gebracht. Zwei Jahre später wurde das Medikament vom Markt genommen (Greiser E; Harmjanz et al. 1968; Gurtner 1970, 1972).

### 1.1.2 Klassifikation

Die erste internationale Klassifikation wurde 1973 durch ein Expertengremium der World Health Organization (WHO) erarbeitet. Weitere Klassifikationen folgten im Zuge der Weltsymposien in den Jahren 1998, 2003 und 2008 (Simonneau et al. 2009). Derzeit erfolgt die Einteilung der pulmonalen Hypertonie (PH) anhand der WHO-Klassifikation von Nizza, Frankreich, welche 2013 im Rahmen des „5th World Symposium on Pulmonary Hypertension“ festgelegt wurde. Die Zuordnung zu einer der fünf Hauptgruppen richtet sich nach pathologischen, pathophysiologischen und therapeutischen Kriterien und ist in Tabelle 1 dargestellt (Hoepfer et al. 2010; Simonneau et al. 2013). Die vorliegende Arbeit beschreibt überwiegend die PAH, da der Großteil der Medikamente für PAH zugelassen wurde und eine Betrachtung aller PH-Formen den Umfang übersteigen würde.

Tabelle 1: Klassifikation Pulmonale Hypertonie nach der 5. Weltkonferenz, 2013

Abkürzungen: ALK-1 - Activin receptor-like kinase type 1, BMPR2 - bone morphogenic protein receptor type 2, CAV1 - Caveolin-1, ENG - Endoglin, HIV - Humanes Immundefizienz-Virus, KCNK3 - Potassium channel subfamily K member 3, SMAD9 – Mothers against decapentaplegic homolog 9, PAH – Pulmonal arterielle Hypertonie

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pulmonal arterielle Hypertonie<ol style="list-style-type: none"><li>1.1. Idiopathische PAH</li><li>1.2. Hereditäre PAH<ol style="list-style-type: none"><li>1.2.1. BMPR2-Mutationen</li><li>1.2.2. ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3</li><li>1.2.3. Unbekannte Mutationen</li></ol></li><li>1.3. Ursächlich sind Medikamente oder Drogen</li><li>1.4. Assoziiert mit:<ol style="list-style-type: none"><li>1.4.1. Bindegewebserkrankungen</li></ol></li></ol></li></ol>
---

- 1.4.2. HIV-Infektionen
- 1.4.3. Portaler Hypertension
- 1.4.4. Angeborenen Herzfehlern
- 1.4.5. Schistosomiasis
- 1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
- 1". Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
- 2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankung
  - 2.1. Systolische Dysfunktion
  - 2.2. Diastolische Dysfunktion
  - 2.3. Valvuläre Erkrankungen
  - 2.4. Kongenitale/erworbene, den Einfluss/Ausfluss betreffende Obstruktion oder Kardiomyopathie
- 3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
  - 3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
  - 3.2. Interstitielle Lungenerkrankungen
  - 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster
  - 3.4. Schlafbezogene Atemstörungen
  - 3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome
  - 3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
  - 3.7. Fehlentwicklungen
- 4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
- 5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus
  - 5.1. Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
  - 5.2. Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden
  - 5.3. Metabolische Störungen: Glykogen-Speicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
  - 5.4. Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Hämodialyse, Segmentale pulmonale Hypertonie

### 1.1.3 Definition und Vorkommen

Die Definition der PAH erfolgt klinisch durch die Bestimmung des mittleren pulmonal-arteriellem Drucks (mPAP), welcher standardisiert mittels Rechtsherzkatheter erhoben wird. Nach aktuellem Expertenkonsens besteht eine PAH ab einem mPAP von 25 mmHg unter Ruhebedingungen. Messwerte kleiner als 20 mmHg schließen eine PAH aus. Der Messbereich zwischen 21 und 24 mmHg stellt eine Grauzone dar. Bislang existiert keine einheitliche Meinung bezüglich der Klassifikation und des Managements dieser „Borderline-PH“ (Simonneau et al. 2013).

Die PAH ist ein sehr seltenes Krankheitsbild, deren epidemiologische Daten anhand regionaler, multizentrischer Register gewonnen werden. In dieser Arbeit werden die Erhebungen der US-amerikanischen REAVEAL-Datenbank (EVALuate Early And Long-term pulmonary arterial hypertension disease management), mit 3515 Patienten aus 55 Zentren, sowie des französischen Nationalregisters, mit 674 Patienten aus 17 Zentren, berücksichtigt. Die Prävalenz der PAH betrug 10,6 / 1 Million Einwohner in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) beziehungsweise 15 / 1 Million Einwohner in Frankreich. Die Inzidenz lag bei 2,3 / 1 Million Einwohner in den USA und bei 2,4 / 1 Million Einwohner in Frankreich. Die Erhebung der Geschlechterverteilung ergab ein Verhältnis weiblich zu männlich von 4,1:1 in den USA und 1,9:1 in Frankreich. Das Durchschnittsalter betrug bei Diagnosestellung 50 Jahre in beiden Kollektiven (Humbert et al. 2006; Badesch et al. 2010; Benza et al. 2012; Lai et al. 2014).

#### **1.1.4 Physiologie des Lungenkreislaufes und Pathophysiologie der PAH**

Die Lunge des Menschen dient dem Austausch von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) mit der Umgebung. Sie ist als System niedrigen Blutdrucks und hohen Blutflusses dem rechten Herz nachgeschaltet und versorgt den Organismus über das linke Herz mit oxygeniertem Blut. Der Gasaustausch findet im Bereich der Alveolen statt, welche über den Respirationstrakt O<sub>2</sub> aufnehmen und CO<sub>2</sub> abgeben. Der Bronchialbaum und die Lungengefäße verjüngen ihren Durchmesser konsekutiv bis zum Ort des Gasaustausches. Im Bronchialbaum erfolgt dies über 23 Generationen und im Gefäßbaum über 28 Generationen (Weibel und Gomez 1962; Mandegar et al. 2004).

Die Pathogenese der PAH ist multifaktoriell und in Ihrer Komplexität bis zum heutigen Tage unvollständig verstanden. Der bei PAH-Patienten charakteristisch gesteigerte mPAP entsteht durch ein Zusammenwirken von Vasokonstriktion, als Remodeling bezeichneten Umbauvorgängen sowie in-situ Thrombosierung der kleinen, pulmonalarteriellen Gefäße. Es resultiert ein verengtes bis komplett obliteriertes Gefäßlumen mit konsekutiv reduziertem Gesamtquerschnitt arterieller Lungengefäße, wodurch die Belastung des rechten Herzens zunimmt. Die Erkrankung verläuft progredient und endet aufgrund von Rechtsherzversagen häufig letal (Schermuly et al. 2011; Montani et al. 2013). Das Verständnis der zugrunde liegenden biologischen, molekularbiologischen und genetischen Vorgänge ist Gegenstand intensiver Erforschung. Im Folgenden wird kurz auf den medizinisch wissenschaftlichen Stand eingegangen.

Der Lungenkreislauf unterliegt empfindlichen Regulationsmechanismen, deren Kenntnis die Grundlage für zielgerichtete Therapieoptionen definiert. Der mPAP bestimmt sich aus der Auswurfleistung des Herzens (Cardiac output - CO) und des peripheren Widerstandes (Peripheral vascular resistance - PVR):

$$\text{mPAP} = \text{CO} \times [\text{PVR}_{\text{arteriell}} + \text{PVR}_{\text{kapillär}} + \text{PVR}_{\text{venös}}]$$

Auf einen Anstieg des CO<sub>2</sub>, beispielsweise infolge körperlicher Anstrengung, folgt physiologisch eine nur minimale Steigerung des Drucks im Gefäßsystem. Ursächlich dafür ist einerseits die druckpassive Perfusion von in Ruhe geschlossenen, vermehrt apikal lokalisierten Gefäßen, das sogenannte Recruitment. Andererseits passen sich die Gefäße durch den Mechanismus der Distension druckpassiv höheren Drücken an und beugen einem übermäßigen Blutdruckanstieg vor (Mandegar et al. 2004).

Als wesentlicher Faktor der PAH-Pathogenese gilt eine Störung der Tonusregulation im Gefäßsystem. Es wurden abnorme Expressionsmuster der vasodilatativen Metaboliten Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) sowie der vasokonstriktiven Substanzen Thromboxan A<sub>2</sub>, Endothelin (ET) E<sub>1</sub> und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) nachgewiesen. Die Inhibition beziehungsweise Stimulation dieser Substanzen und der zugehörigen Stoffwechselwege ist fester Bestandteil der PAH-Therapie (Schermuly et al. 2011).

Zudem beeinflusst der Euler-Liljestrand-Mechanismus den Vasotonus, indem die Perfusion schlecht belüfteter Lungenareale durch Vasokonstriktion reduziert wird. Der 1956 beschriebene Mechanismus tritt physiologisch beispielsweise bei Aufenthalt in großer Höhe, COPD oder Schlafapnoe auf (Euler und Liljestrand 1946; Mandegar et al. 2004). Die Konsequenz fehlgesteuerter, vasokonstriktiver Vorgänge ist eine Verminderung des Gefäßquerschnittes mit konsekutiver Steigerung des mPAP.

Neben vasoaktiven Vorgängen nehmen proliferative Vorgänge Einfluss auf das Gefäßsystem. Eine Ungleichgewichts der Wachstumsfaktoren Vascular endothelial growth factor (VEGF), Fibroblast growth factor, Transforming growth factor (TGF) alpha und beta (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), Platelet derived growth factor (PDGF) sowie Bone morphogenetic protein, Activin receptor-like kinase type 1 (ALK-1) und Endoglin (Eng) konnte nachgewiesen werden. Weiterhin wurde eine veränderte Aktivität der Matrix-Metalloproteasen bei PAH-Patienten beschrieben (Schermuly et al. 2011).

Inflammatorischen Prozessen wird in der Pathogenese der PAH eine wesentliche Bedeutung beigemessen. Die genaue Ursache-Wirkungs-Beziehung dieser Pathologien ist bislang ungeklärt. Die Inflammation wird exogen, durch virale oder parasitäre Mikroorganismen, getriggert oder wird unabhängig von äußeren Einflüssen durch endogene Prozesse verursacht. In Lungenpräparaten erkrankter Menschen sowie in Tiermodellen konnte eine erhöhte Zahl immunkompetenter Zellen im perivaskulären Bereich nachgewiesen werden. An diesen Vorgängen ist das angeborene Immunsystem, repräsentiert durch Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen sowie das erworbene Immunsystem, zu welchem T- und B-Zellen zählen, maßgeblich beteiligt. Überdies konnten im Plasma veränderte Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen nachgewiesen werden (Rabinovitch 2012; Price et al. 2012; Tuder et al. 2013b; Tuder et al. 2013a).

Die einleitend erwähnte in-situ-Thrombosierung ist anhand typischer gerinnungsassoziierter Parameter nachvollziehbar. Es wurden veränderte Plasmakonzentrationen der Fibrinopeptide A, der D-Dimere, des Von-Willebrand-Faktors und des Tissue factors festgestellt. Zudem gelten erhöhte Thromboxan- sowie erniedrigte NO- und Prostazyklinkonzentrationen als prokoagulatorisch (Humbert et al. 2004).

### **1.1.5 Genetik**

Die Entstehung der PAH ist mit genetischen Faktoren assoziiert. Dresdale beschrieb bereits 1954 innerhalb einer Familie das gehäufte Auftreten der Erkrankung (Dresdale et al. 1954). Dies findet Niederschlag in der WHO-Klassifikation, in welcher unter Punkt 1.2 genetische Veränderungen für bone morphogenic protein receptor type (BMP2), ALK-1, ENG, Mothers against decapentaplegic homolog 9 (SMAD9), Caveolin-1 (CAV1), KCNK3 (Potassium channel subfamily K member 3) als Faktoren der PAH definiert werden (siehe 1.1.2). Der im Jahr 2000 entdeckte BMP2, Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie, ist ein Schlüsselement aktueller Forschung (Simonneau et al. 2013). Die familiäre Veranlagung für eine BMP2-Mutation betrifft bei hereditärer PAH 70% der Patienten. Idiopathische PAH (IPAH)-Patienten haben mit einer Wahrscheinlichkeit von 10 bis 20% eine heterozygote BMP2-Mutation (Rabinovitch 2012).

### 1.1.6 Histopathologie

Die PAH betrifft vorwiegend arterielle Vasa publica der Lunge. Diese werden anatomisch von außen nach innen in Adventitia, Media und Intima gegliedert. Die Adventitia ist aus extrazellulärer Matrix (EZM) sowie Zellen aufgebaut und dient der Versorgung und Innervation des Gefäßes. Die Media besteht aus einer Lamina elastica externa, glatten Muskelzellen sowie kollagenen und elastischen Fasern. Die Intima setzt sich aus einer Lamina elastica interna und dem zum Lumen gewandten, einschichtigen Endothel zusammen. Die Erkrankung manifestiert sich in allen Gefäßschichten, vorwiegend aber an kleinen Gefäßen mit einem Durchmesser  $< 80 \mu\text{m}$ . Klassischerweise zeigen diese kleinen Gefäße im Gesunden keine durchgehende Media.

Histologische Präparate von PAH-Patienten beziehungsweise aus Tiermodellen weisen spezifische Veränderungen aller Gefäßwandschichten des Lungengefäßsystems auf. Die Gesamtheit der Umbauvorgänge wird in der Literatur zusammenfassend als Remodeling bezeichnet. Das Gefäßlumen der Intima ist durch Hyperplasie und Fibrose verengt beziehungsweise vollkommen obliteriert. Ursächlich ist eine Proliferation, Dysfunktion sowie Apoptoseresistenz der Endothelzellen und eingewanderter (Myo-)Fibroblasten. Klassischerweise finden sich sogenannte plexiforme Läsionen, die durch kleine Kanälchen im hyperplastischen Gewebe den Glomeruli der Niere ähneln (Heath und Edwards 1958). Charakteristikum der mittleren Zellschicht ist eine Mediahypertrophie, welche sich bereits im frühen Krankheitsverlauf durch Proliferation und Hyperplasie glatter Muskelzellen (Smooth muscle cells - SMC) sowie eingewanderter Fibroblasten ausbildet. Histologisch ist die Darstellung von SMC und die Bestimmung des Muskularisierungsgrades durch Anfärbung mit  $\alpha$ -Actin möglich (siehe Material und Methoden). In Lungenarterien von PAH-Patienten bildet sich auch in Gefäßen kleineren Durchmessers eine Muskularisierung aus, als „De-novo-Muskularisierung“ bezeichnet. Die Adventitia unterliegt ebenfalls proliferativen Veränderungen. Ursächlich sind fehlgesteuerte Fibroblasten, die durch übermäßige Produktion von EZM zu einer Fibrose führen (Montani et al. 2013). Die adventitiellen Fibroblasten gelten als Steuerzentrale der pathologischen Geschehnisse, indem sie inflammatorische Prozesse auslösen, Progenitorzellen rekrutieren, das Wachstum der SMC durch Sekretion von Wachstumsfaktoren fördern und die Proliferation von Vasa vasorum stimulieren. Durch Transdifferenzierung in SMC und Migration in die inneren Wandschichten tragen die



Fibroblastens zum Remodeling bei (Tuder et al. 2007). Eine weitere Besonderheit der veränderten SMC ist die Apoptoseresistenz (Mandegar et al. 2004).

### **1.1.7 Klinik**

Klinisch zeigt die PAH keine pathognomonischen Merkmale. Als Charakteristikum gilt eine Dyspnoe, welche häufig verspätet wahrgenommen wird. Weiterhin können mit einer PAH Brust- und Kopfschmerzen, Synkopen, Schwäche, Müdigkeit, Tachykardie und Hämoptysen einhergehen. Als Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz klagen die Patienten stauungsbedingt über Ödeme, Anasarka, vermehrte juguläre Venenfüllung und Hepatomegalie (Montani et al. 2013).

### **1.1.8 Prognose**

Die Prognose eines an PAH erkrankten Patienten ist nach mehr als 30 Jahren intensiver Forschung weiterhin schlecht. Eine Vielzahl neuer Medikamente sowie angepasste Behandlungskonzepte steigern die Lebensqualität und Lebenserwartung. Dennoch ist die Erkrankung bislang nicht heilbar. 1980 betrug die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für die IPAH 68% und die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 34%. Heute überleben 91% der IPAH-Patienten mindestens ein Jahr nach Diagnosestellung und 65% der Patienten mindestens fünf Jahre. Die mediane Überlebenszeit stieg von 2,8 Jahren vor 30 Jahren auf derzeit mehr als 7 Jahre (Benza et al. 2012).

### **1.1.9 Therapie**

#### **1.1.9.1 Allgemein**

Die Behandlung der PAH geschieht nach einem komplexen Algorithmus, welcher seit dem ersten Weltsymposium 1973 in Genf bis heute einer stetigen Modifikation unterliegt. Das gegenwärtig etablierte Therapieschema gliedert sich in drei Bereiche. An erster Stelle stehen allgemeine Maßnahmen, supportive Therapiekonzepte, eine vasoreaktive Testung mit entsprechender Therapie durch Kalziumkanalantagonisten. Der zweite Bereich definiert die Behandlung mit speziell für PAH zugelassenen Medikamenten. Dies sind Prostanoiden, ETR-Antagonisten, lösliche Guanylatzyklen und PDE-5-Inhibitoren. Der dritte Therapiebereich umfasst die Lungentransplantation als Ultima Ratio. Die genannten Säulen der PAH-Behandlung werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Die allgemeine Therapie der PAH umfasst Basismaßnahmen, die aufgrund von kleinen und retrospektiven Studien oder Expertenmeinungen (Evidenzgrad C) verordnet werden. Konsens besteht über die Anwendung diuretischer Maßnahmen, um den Volumenstatus zu kontrollieren und negativen rechtskardialen Effekten vorzubeugen. Die Anordnung inhalativen Sauerstoffs wird von Experten empfohlen, um negative Einflüsse auf den pulmonalen Blutkreislauf gering zu halten. Sättigungswerte unter 60 mmHg gelten als dringliche Behandlungsindikation, der Zielwert sollte bei über 90 mmHg liegen (Hoepfer et al. 2010; Stamm et al. 2011). Die Antikoagulation bei PAH wird bei einem Ziel-INR von 2 bis 3 vom überwiegenden Anteil der Wissenschaftler empfohlen (Ghofrani et al. 2011). Eine Schwangerschaft sowie starkes körperliches Training beeinflussen die Krankheit negativ. Moderate, gezielte körperliche Aktivität bewirkt eine Verbesserung der Krankheitssituation (Patel et al. 2012).

### 1.1.9.2 Medikamentöse Therapie

#### *1.1.9.2.1 Kalziumkanalantagonisten*

Die Medikamente Amlodipin (Dihydropyridin-Derivat), Diltiazem (Benzothiazepin-Derivat) und Nifedipin (Dihydropyridin-Derivat) blockieren den Einstrom von Kalziumionen in die Zellen und führen zu einer Dilatation im Gefäßbett. Die 1980 zur Behandlung der PAH eingeführten Wirkstoffe werden bei Patienten angewendet, die die sogenannten Responderkriterien erfüllen. Eine Testung erfolgt durch Applikation kurzwirksamer Vasodilatoren im Rahmen der diagnostischen Rechtsherzkatheteruntersuchung. Das Patientenkollektiv vasoreagibler Personen zeigte eine signifikante Verbesserung der Prognose, wobei lediglich 12,6% dieser Patienten die Responderkriterien erfüllten (Ventetuolo und Klinger 2012; Montani et al. 2013).

#### *1.1.9.2.2 Prostazyklinanaloga*

Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) wird durch endothelständige Prostaglandin-I<sub>2</sub>-Synthasen (PGI<sub>2</sub>S) aus Arachidonsäure synthetisiert und entfaltet in der Lunge eine vasodilatative, antiproliferative, antithrombotische, antimitogene und immunmodulatorische Wirkung. PGI<sub>2</sub> aktiviert über Rezeptoren glatter Muskelzellen die Adenylatzyklase, die zyklisches Adenosinmonophosphat (AMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) herstellt. Bei Patienten mit PAH wurde ein reduzierter Spiegel der PGI<sub>2</sub>S sowie der PGI<sub>2</sub>-Metabolite im Serum

und Lungengewebe nachgewiesen. Gegenwärtig existieren die vier Wirkstoffe Beraprost, Epoprostenol, Iloprost und Treprostinil (Montani et al. 2013).

#### *1.1.9.2.3 Endothelin-Rezeptorantagonisten*

Das 1988 entdeckte ET ist der lang wirksamste und stärkste Vasokonstriktor des menschlichen Körpers. Die vasokonstriktorische Potenz entspricht der 100-fachen des Nordadrenalins. ET-1, ein aus 21 Aminosäuren bestehendes, saures Peptid stellt vor ET-2 und ET-3 das dominante Familienmitglied dar. Es entfaltet seine Wirkung an den zwei Rezeptorsubtypen ETR-1A und ETR-1B, deren Expressionsmuster und Wirkungsweise sich maßgeblich unterscheiden. Der in pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen, Atemwegsepithel, Fibroblasten und Makrophagen exprimierte ETR-1A induziert eine Vasokonstriktion und Proliferation. Der Subtyp ETR-1B reagiert gegensätzlich mit einer Inhibition von Vasokonstriktion und Proliferation in Endothelzellen. Auf glatte Muskelzellen wirkt er ebenfalls vasokonstriktorisch. Trotz der gegensätzlichen Einflüsse auf die Rezeptoren sind selektive ETR-1A-Inhibitoren und unselektive ETR-Inhibitoren zur Behandlung der PAH verfügbar. Derzeit sind die unselektiven ETR-Antagonisten Bosentan und Macitentan sowie der selektive ETR-1A-Antagonist Ambrisentan zugelassen (Montani et al. 2013).

#### *1.1.9.2.4 PDE-Hemmstoffe*

PDE sind Enzyme des menschlichen Körpers, welche die Botenstoffe zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) abbauen. Diese entstehen primär durch Zyklisierung von Adenosinmonophosphat zu cAMP beziehungsweise von Guanosinmonophosphat (GMP) zu cGMP. Die im Lungengefäßendothel sowie im Atemwegsepithel exprimierte NO-Synthase (eNOS) produziert die Substanz NO, welche über cGMP entscheidend zur Vasodilatation beiträgt. 1995 konnte gezeigt werden, dass die eNOS im Lungengewebe von Patienten mit schwerer PAH geringer exprimiert ist als bei Gesunden. Somit beeinflusst cGMP den Blutdruck und nimmt darüber hinaus auch Einfluss auf das Remodeling. Durch Blockade der PDE werden die günstigen Effekte verlängert. Für die PAH sind vor allem PDE-5-Inhibitoren bedeutsam, da PDE-5 eine erhöhte Expression in der Lunge aufweist. Im klinischen Einsatz befinden sich die PDE-5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil (Galiè et al. 2013).

#### *1.1.9.2.5 Stimulation der lösliche Guanylatzyklasen*

Riociguat, seit 2014 zugelassen, nimmt ebenfalls Einfluss auf den NO-Signalweg. Dies geschieht auf zwei Wegen. Einerseits entfaltet es zu NO analoge Wirkungen an der Zelloberfläche und andererseits stimuliert Riociguat die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase, welche über cGMP die Produktion von NO fördert (Grimminger et al. 2009).

#### **1.1.9.3 Erweiterte Therapie**

Das Versagen der spezifischen PAH-Therapie erfordert eine klinische Behandlung. Die Empfehlungen der Expertenkommission sehen die Kombinationstherapie mit mehreren Medikamenten und interventionelle Therapien vor. Zu diesen zählen eine Lungentransplantation oder eine Ballonseptostomie, das so genannte Rashkindmanöver. Bei diesem wird das interatriale Septum mit einem Ballon graduell perforiert, woraus eine Entlastung der rechten Herzhälfte mit konsekutiver Erhöhung der Vorlast des linken Vorhofs und Ventrikel resultiert (Galiè et al. 2009).

## 1.2 Das rechte Herz

### 1.2.1 Anatomie und Physiologie

Das Herz ist das zentrale Kreislauforgan unseres Körpers. Es setzt sich aus einer linken und rechten Herzhälfte zusammen, die sich jeweils in Vorhof (Atrium) und Kammer (Ventrikel) gliedern. Zwischen Atrium und Ventrikel liegen die Segelklappen, linksseitig die bikuspidale Mitralklappe und rechtsseitig die Trikuspidalklappe. Den Ventrikeln sind Taschenklappen nachgeschaltet, auf der linken Seite als Aortenklappe und auf der rechten Seite als Pulmonalklappe bezeichnet. Die Herzwand ist dreischichtig aus Endokard, Myokard und Epikard aufgebaut und in das Perikard, den Herzbeutel, gehüllt.

Beide Herzhälften arbeiten synchron nach dem Prinzip einer Druck-Saug-Pumpe in einem zweiphasigen Zyklus, welcher sich aus der Systole und der Diastole zusammensetzt. Die Vorhöfe arbeiten stets im entgegengesetzten Zyklus zu den Kammern, um einen gerichteten Blutfluss zu erzeugen. Die mechanische Herzaktion wird über ein autonomes Reizleitungssystem gesteuert.

### 1.2.2 Cor pulmonale

Die Anpassung des rechten Herzens an Lungenerkrankungen, wie es bei der PAH geschieht, wird als Cor pulmonale bezeichnet. Der rechte Ventrikel gewährleistet durch seine verhältnismäßig dünne Wand eine schnelle Anpassung. Nach dem Laplace-Gesetz (Abbildung 1) nimmt durch die erhöhte Nachlast ( $P$  in Abbildung 1) und dilatative Vorgänge der Herzkammer ( $r$  in Abbildung 1) der Stress auf die Ventrikelwand zu, worauf kompensatorisch eine Rechtsherzhypertrophie ( $h$  in Abbildung 1) folgen kann. Diese entsteht durch Hypertrophie kardialer Myozyten, Steigerung der Kollagensynthese, Ausdehnung der Fibrosierung und ist mit einer Zunahme inflammatorischer Prozesse verbunden. Dies geht häufig mit dilatativen Vorgängen einher und verstärkt die rechtskardiale Wandbelastung zusätzlich. Pathologisches Korrelat der Anpassungsvorgänge können Rhythmusstörungen und verminderte Oxygenierung des Herzgewebes sein. Dies führt über das Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz zur nicht kompensierten Herzinsuffizienz, dem dilatativen Herzversagen mit häufig letalem Ausgang (Steiner und Strauer 2009).

$$\text{Laplace Gesetz} = \sigma = \frac{P \times r}{h}$$

Abbildung 1: Laplace-Gesetz

$\sigma$  = Wandbelastung, P = Intraluminarer Druck, r = Radius, h = Wanddicke

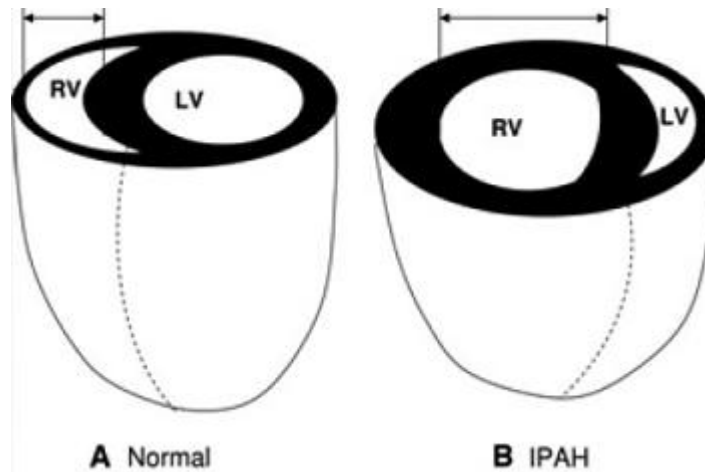


Abbildung 2: Schematische Darstellung der kardialen Anpassung an PAH-bedingte Änderungen im Lungengefäßsystem

Abbildung aus (Bogaard et al. 2009a) übernommen, Abkürzungen: IPAH – Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie

Bislang sind die Pathomechanismen eines dilatativen Herzversagens unvollständig verstanden. Der hypertrophierte rechte Ventrikel versucht durch zunehmende Dilatation und progrediente Verdickung der Wand den erhöhten Afterload auszugleichen. Diese Kompensation erschöpft zunehmend, woraus ein verminderter Auswurf des rechten Ventrikels und anschließend des linken Ventrikels folgt. Die Größe des rechten Ventrikels nimmt durch Volumenüberladung weiter zu und vermindert das linksventrikuläre Volumen, was sich in der Bildgebung als Verschiebung des Septums darstellt (schematisch in Abbildung 2 dargestellt). Der systemische Blutdruck der Patienten sinkt auf hypotone Werte. Durch den verminderten Blutdruck und den generell erhöhten Energiebedarf eines hypertrophen Herzens lässt die Perfusion des Gewebes nach und löst Ischämien aus (Ryan und Archer 2014). Gegenwärtig ist den Forschern, vor allem aus Arbeiten zu linkskardialen Pathologien, eine Anzahl möglicher Einflussfaktoren bekannt. Als wesentlicher Faktor des Rechtsherzversagens wird die bereits erwähnte erhöhte Nachlast aufgeführt, die im Banding Modell gut nachgestellt werden kann (siehe 2.1.1). Zudem gelten neurohormonale Faktoren wie die Aktivierung von Angiotensin-II, oxidativer Stress durch reactive oxygen species (ROS) und reactive nitrogen species, inflammatorische Vorgänge, myokardiale Ischämie sowie ein abnormes

apoptotisches Verhalten als ursächlich (Bogaard et al. 2009b). In Abbildung 3 ist die Kaskade als Schaubild dargestellt.

Die Funktionalität und Anpassungsfähigkeit des rechten Ventrikels an eine erhöhte Belastung definiert den wesentlichen Parameter für die Prognose der Erkrankung und schließlich die Letalität. Klinisch ist die Entwicklung schleichend und wird zu Beginn nur wenig wahrgenommen. Die Patienten klagen klassischerweise über Dyspnoe und Leistungsschwäche (Haddad et al. 2008). Pathophysiologisch führt eine druckabhängige, ventrikuläre Überlastung zu vermehrtem kardialen Schaden oder Stress. Eine rechtsventrikuläre Dysfunktion wird neben der PAH durch viele andere Auslöser wie beispielsweise Volumenüberladung, myokardiale Ischämie, myokardiale Erkrankungen und durch komplexe kongenitale Defekte wie Eisenmenger-Syndrom oder Pulmonalarterienstenose, hervorgerufen (Vonk-Noordegraaf et al. 2013).

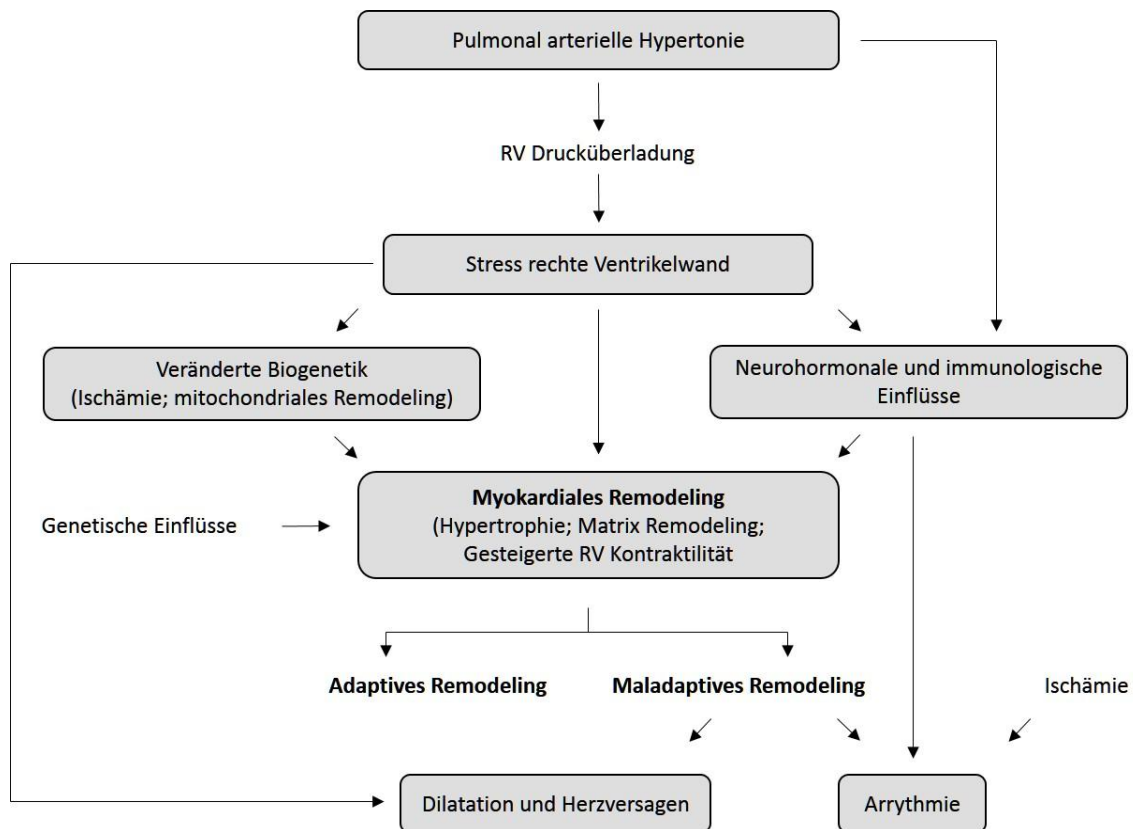


Abbildung 3: Schaubild kardiales Remodeling, adaptiert nach (Vonk-Noordegraaf et al. 2013), Abkürzungen: RV – Rechtsventrikulär

## **1.3 Tiermodelle**

### **1.3.1 Überblick**

Tiermodelle sind im Bereich der pulmonalen Grundlagenforschung ebenso unersetzlich wie in vielen anderen Fachrichtungen. Durch eine große Anzahl von Modellen konnten seit Beginn der PAH-Forschung wegweisende Erkenntnisse über Pathogenese und Therapie gewonnen werden. Dennoch ist es, trotz intensiver Forschung, bislang nicht gelungen ein Tiermodell zu etablieren, welches den komplexen Ansprüchen hinreichend gerecht wird. Das Interesse, die pathologischen Merkmale der humanen PAH reproduzierbar und valide darzustellen, ist nach wie vor sehr groß. Die Krankheit kann bei vielen Säugetieren mittels diverser Methoden induziert werden, allerdings variiert die Ausprägung stark zwischen Tierart, Rasse, Geschlecht und Alter (Ryan et al. 2011). Der Anspruch an das Tiermodell ist die Erfüllung hämodynamischer, histologischer und bildgebender Charakteristika (Gomez-Arroyo et al. 2012). Ein weiteres Merkmal der humanen PAH ist die Irreversibilität der Umbauprozesse (Ryan et al. 2011).

Zu den häufigsten PAH-Modellen bei Nagern zählen der Versuchsaufbau mit hypoxischen Umweltbedingungen oder der pflanzliche Ansatz, bei welchem subkutan Monocrotalin (MCT) injiziert wird. MCT ist ein Pflanzenalkaloid aus der Gruppe der Pyrrolizidinalkaloide und für Menschen und Tiere toxisch. Darüber hinaus kann eine Lungenseite operativ entfernt oder der hypoxische Ansatz um die Gabe eines VEGF-Inhibitors erweitert werden. Mit zunehmendem Verständnis der genetischen Manipulation ist es möglich, gezielt Genabschnitte zu verändern, um eine PAH zu induzieren (Stenmark et al. 2009).

Neben den Veränderungen im Lungengefäßsystem stellt die starke Rechtsherzbelastung einen maßgeblichen Letalitätsfaktor dar. Die kardiale Pathophysiologie kann gezielt über so genannte Banding-Modelle untersucht werden.

In dieser Dissertation finden das Hypoxie- und ein Banding-Modell Anwendung.

### **1.3.2 Hypoxiemodell**

Das Hypoxiemodell stellt, als eines von zwei Modellen, die Grundlage dieser Dissertation dar und ist ein sehr häufig angewandtes PAH-Modell (Maarman et al. 2013). In der WHO-Klassifikation werden hypoxische Bedingungen, zum Beispiel durch Aufenthalt in großer Höhe oder diverse Lungenerkrankungen, in einer eigenen Kategorie



zusammengefasst (Kapitel 1.1.2). Die Studie Mount Everest II aus dem Jahr 1987 zeigte anhand acht junger, gesunder Probanden eine Zunahme des mPAP nach 40 Tagen Aufenthalt in 8840 m Höhe über dem Meeresspiegel (Groves et al. 1987).

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden, aufgrund eines verminderten Sauerstoffgehaltes der Atemluft, Veränderungen in Rinderherzen festgestellt. Ein halbes Jahrhundert später wurde erstmals über Veränderungen in Rinderlungen als Folge der hypoxischen Belastung berichtet (Rhodes 2005). Will, Reeves, Alexander und Kollegen führten Anfang der 1960er Jahre Hypoxieversuche durch. Es gelang dem Team bei Rindern, die in über 3000 Meter Höhe gehalten wurden, einen mPAP über 100 mmHg nachzuweisen (Alexander et al. 1960; Will et al. 1962; Alexander A. und Jenssen 1963). Das erste Modell an Nagern wurde 1970 etabliert und findet bis heute häufig Anwendung. Es lässt sich zuverlässig reproduzieren und löst bei den Nagern eine PAH aus (Stenmark et al. 2009).

Die Atmosphäre des Hypoxiemodells wird mittels normobaren, hypoxischen oder mittels normoxischen, hypobaren, Bedingungen erreicht. Die erzeugten PAH-Formen beider Ansätze sind vergleichbar und durch die typische hypoxische Vasokonstriktion und ein pulmonales Remodeling gekennzeichnet. Das pathologische Korrelat der gesteigerten Vasokonstriktion sind hyperaktive SMC, welche zu einer Obliteration des Lumens und einem Anstieg des Scherstress führen. Diese Vorgänge werden durch Veränderungen an Kalzium-, Kalium- und unselektiven Kationenkanälen getriggert, sind aber unvollständig verstanden (Voelkel und Tudor 2000).

Das pulmonale Remodeling infolge hypoxischer Bedingungen ist durch Veränderungen an Endothel, Media und Adventitia gekennzeichnet. Typischerweise nehmen im Hypoxiemodell die Proliferation von Endothelzellen, SMC, Fibroblasten sowie inflammatorische Vorgänge messbar zu. Klassische Befunde sind eine gesteigerte Muskularisierung kleiner, distaler, zuvor nicht muskularisierter Arteriolen sowie ein Verlust des Gefäßquerschnittes (Stenmark et al. 2006). Der hypoxische Stimulus nimmt zudem durch unterschiedliche Substrate Einfluss auf die Veränderungen. Dies geschieht durch Inhibition antimitogener Faktoren wie NO oder PGI<sub>2</sub> oder Steigerung mitogener Stimuli wie Serotonin, ET-1, PDGF, VEGF oder inflammatorischer Zytokine (Stenmark et al. 2006). Ein interessantes Ziel der Forschung ist der Hypoxia-inducible-Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), der in abnorme Prozesse aller drei Zelltypen involviert ist (Welsh und Peacock 2013). Abhängig sowie unabhängig von HIF-1 $\alpha$  wurde eine Veränderungen der ROS, der

Proteasenaktivität und der Apoptose unter Hypoxie beobachtet (Voelkel und Tuder 2000).

### **1.3.3 Stenosemodell der Arteria pulmonalis**

Die Dysfunktion des rechten Ventrikels ist die führende Todesursache bei PAH (Bogaard et al. 2009a). Im Stenosemodell (PAB – pulmonary artery banding) wird dieser pathologische Prozess durch Anlage eines Metallclips um die Arteria pulmonalis simuliert. Das verengte Gefäßvolumen erzeugt einen rechtsventrikulär erhöhten Afterload. Das ausgeworfene Schlagvolumen nimmt primär ab und das enddiastolische Restvolumen steigt. Der nun entstandene, erhöhte Preload aktiviert den Frank-Starling-Mechanismus, der die ventrikuläre Kontraktilität durch gesteigerte  $Ca^{2+}$ -Empfindlichkeit erhöht. Dieser Mechanismus und eine durch die Belastung gesteigerte Kontraktilität erlauben dem Herz kompensatorisch das gleiche oder eine höheres Volumen auszuwerfen (Borgdorff et al. 2013).

Pulmonale Stenosemodelle wurden bereits 1924 von Forschern der John Hopkins Universität in Baltimore erwähnt. Zu Beginn wurde Hunden ein Metallclip um die Aorta gelegt, später auch um die Pulmonalarterie. In den Veröffentlichungen wird ein 1916 operierter Versuchshund beschrieben, der zweieinhalb Jahre mit geclippter Pulmonalarterie überlebte. Die Obduktion ergab ein im Verhältnis zum Körpergewicht ungewöhnlich schweres, rechtsventrikulär hypertrophiertes Herz mit normal konfigurierten Herzklappen (Reid 1924). Seit den ersten Anwendungen dieser Methodik an großen Tieren bestand das Bestreben, die Modelle auf kleinere, handlichere Tiere zu übertragen. 1936 berichteten Forscher über die Anwendung der pulmonalarteriellen Stenose bei Kaninchen (Shipley et al. 1937). 1976 bezeichnen Bishop et al. Banding-Modelle als weit verbreitete und gut etablierte Methode zur Induktion der rechtsventrikulären Hypertrophie. Für die Banding-Modelle wurden bis zu diesem Zeitpunkt vor allem große Tiere wie Schweine, Hunde, Katzen und Kaninchen verwendet (Bishop und Melsen 1976). 1994 beschrieben Rockman et al. erstmals die Anwendung im Mausmodell. Die partielle Stenose der Pulmonalarterie wurde in einem 14-tägigen Versuch an 12 Tieren durchgeführt. Es konnte eine signifikante Hypertrophie des rechten Ventrikels und Atriums beobachtet werden (Rockman et al. 1994).

Das arterielle Banding findet bis zum heutigen Tag Anwendung und gilt als etabliertes Verfahren, um pathologische Einflüsse und deren Folgen auf das linke sowie das rechte

Herz zu untersuchen (Tarnavski et al. 2004). Durch selektive Steigerung der rechtsventrikulären Nachlast und anschließende Therapie lassen sich die kardialen Auswirkungen beurteilen. Da das Hypoxiemodell eine geringere rechtsventrikuläre Hypertrophie induziert, gelingt es mit zwei Modellen die Wirkung der Intervention gezielt zu beurteilen.

#### **1.4 P38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase und Inhibition**

1986 publizierten Ray und Sturgill, dass Insulin mittels einer neu entdeckten, 35 bis 40 kDa großen Kinase, intrazelluläre Stoffwechselwege durch Phosphorylierung reguliert (Sturgill und Ray 1986; Ray und Sturgill 1988). Sie gaben ihrer Entdeckung den Namen „microtubule-associated protein kinase“, welcher mit Bekanntwerden einer Vielzahl weiterer Stimulanzen zum heute bekannten Begriff der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) geändert wurde (Avruch 2007). Im menschlichen Körper existieren circa 500 Proteinkinasen, die durch ATP-abhängige Phosphorylierung der Hydroxygruppen (-OH) von Serin, Threonin oder Tyrosin ihre Funktion erfüllen (Denise Martin et al. 2012). Die MAPK-Familie gliedert sich in die drei Hauptklassen extracellular-signal regulated kinases (ERK), c-Jun N-Terminal kinases (JNK) und P38-MAPK. Die Gruppe der ERK wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert, die Gruppen JNK und P38-MAPK durch extrazellulären Stress wie UV-Licht, osmotische Veränderungen, oxidativen Stress, Ischämie, Toxine, inflammatorische Zytokine oder mechanische Deformationen (Cuadrado und Nebreda 2010).

MAPK werden von MAPK-Kinasen (MAPKK oder MAP2K) mittels dualer Phosphorylierung an Serin und Tyrosin aktiviert, im Fall der P38-MAPK durch MAP2K 3, 4 und 6. Die MAP2K werden durch einfache Phosphorylierung von MAPKK-Kinasen (MAPKKK oder MAP3K) aktiviert. Zu den MAP3K zählen der tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 2, 3 und 6, STE20-Kinasen, Rho, Cdc42 und Rac. Der Ablauf der Kaskade aus MAP3K, MAP2K und MAPK wird in der Literatur als Weg der klassischen Aktivierung, „canonical pathway“, beschrieben. Darüber hinaus existieren alternative Aktivierungswege. Von besonderem Interesse ist eine Aktivierung durch transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1 binding protein 1 (TAB-1) sowie durch das T-Zell-Rezeptor-stimulierte ZAP70 ( $\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa) / p56<sup>lck</sup>. Beide Wege führen zu einer Autophosphorylierung der P38-MAPK,

insbesondere der  $\alpha$ -Untereinheit (siehe Abbildung 4) (Ge et al. 2002; Salvador et al. 2005; Cuadrado und Nebreda 2010).

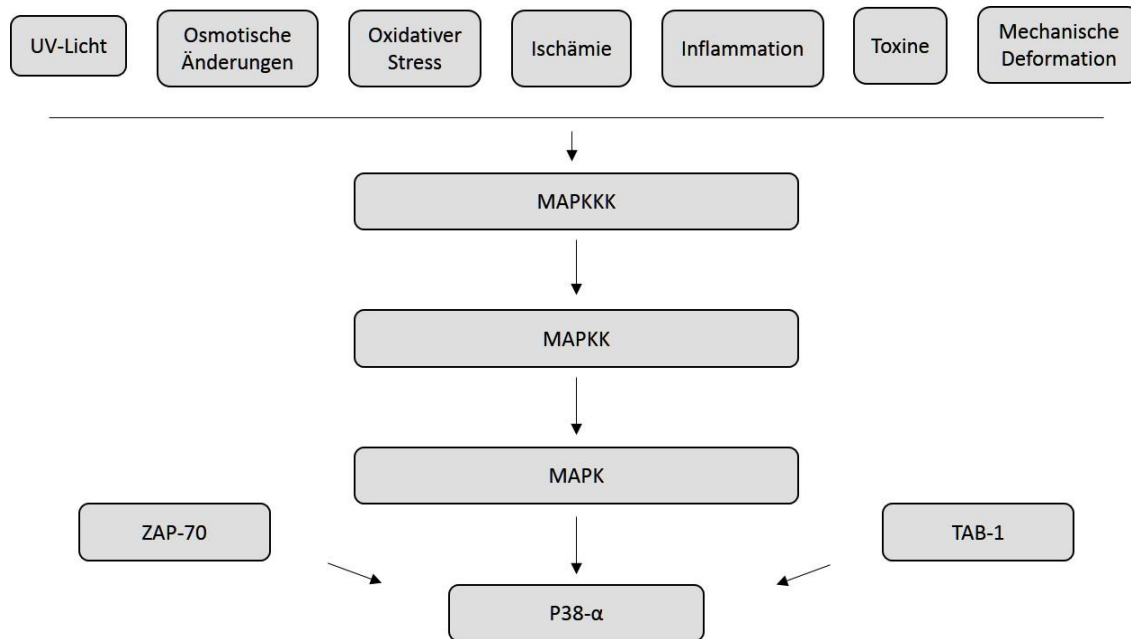


Abbildung 4: Schaubild MAPK

Abkürzungen: MAPK - Mitogen-activated protein kinase, MAPKK - MAPK-Kinase, MAPKKK - MAPKK-Kinase,

TAB1 – Transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1 binding protein 1, ZAP-70 -  $\zeta$ -chain associated protein kinase of 70 kDa

Bis heute sind die vier Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  bekannt, welche eine große Homologie eint. P38 $\alpha$ -MAPK und P38 $\beta$ -MAPK werden ubiquitär exprimiert, wohingegen die  $\gamma$ -Untereinheit vorwiegend im Skelett- und Herzmuskel und die  $\delta$ -Untereinheit in endokrinen Organen exprimiert wird (Cuadrado und Nebreda 2010). Für den Inhalt der vorliegenden Arbeit sind besonders P38 $\alpha$ -MAPK interessant, weshalb auf eine detailliertere Beschreibung der anderen Gruppen verzichtet wird. P38 $\alpha$ -MAPK wurde 1994 von Han et al. als erste P38-MAPK beschrieben (Han et al. 1994). Die Kinase wirkt durch Phosphorylierung von Serin oder Threonin (Cuadrado und Nebreda 2010).

P38 $\alpha$ -MAPK nimmt Einfluss auf eine große Zahl subzellulärer Prozesse, die sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern ablaufen. Sie reguliert unter anderem Transkriptionsfaktoren, Apoptose, Zellproliferation, Wachstum, Stabilität, Kontraktilität und Differenzierung der Zellen. Zudem ist die P38 $\alpha$ -MAPK an inflammatorischen Prozessen beteiligt, wozu eine Interaktion mit Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und Cyclooxygenase-2 zählt (Cuenda und Rousseau 2007).

In tierexperimentellen und klinischen Studien konnte ein vielfältiger Einfluss von P38 $\alpha$  nachgewiesen werden. So erfuhr die Proteinkinase seit Ihrer Entdeckung vor rund

zwanzig Jahren eine starke Erforschung, insbesondere in Bezug auf inflammatorische Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, COPD, aber auch neurodegenerativer Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Tumoren. Ebenso konnte ein Einfluss von P38 $\alpha$  auf kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz eruiert werden (Cuenda und Rousseau 2007). Aufgrund der multiplen Verflechtungen der MAPK befassten sich die Forscher mit der selektiven Inhibition von P38. Einer der ersten Inhibitoren war SB-203580, welcher hauptsächlich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit kompetitiv zu ATP blockiert. Die frühzeitige Entdeckung selektiver P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitoren führte bis heute zu einer intensiven Beforschung. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist eine Vielzahl spezifischer Inhibitoren bekannt (Young 2013). Die Internetseite [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) listet unter dem Suchbegriff „P38“ 91 klinische Studien auf (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=p38&Search=Search> (Abfrage: 20.10.2016)). Die Anzahl laufender und beendeter Tierstudien übersteigt diese Zahl deutlich.

Inhalt dieser Dissertation ist die Untersuchung P38 $\alpha$ -MAPK-abhängiger Effekte auf das Lungengefäßsystem sowie das rechte Herz. Nach gegenwärtigem Stand der Forschung ist P38 $\alpha$  in einige der bekannten, pathogenetischen Mechanismen des Lungenremodelings involviert. Ein klassischer, krankheitsbeeinflussender Faktor ist die hypoxische Vasokonstriktion, die mit einer Hochregulierung der P38-MAPK assoziiert ist und durch selektive Inhibition vermindert werden kann (Morrell et al. 2006; Zhang et al. 2012). Ebenso wird P38 in Zusammenhang mit einigen PAH-typischen Remodelingvorgängen im Lungenstromgebiet gesehen. Dazu zählt das hyperproliferative Wachstum adventitieller Fibroblasten (Welsh et al. 1998; Welsh et al. 2006; Mortimer et al. 2007, 2007), die Mediaverdickung durch Hyperproliferation von SMC (Lu et al. 2004; Dewachter et al. 2009; Yu et al. 2012; Ogo et al. 2013) sowie eine Veränderung der Intima durch abnormales Verhalten endothelialer Zellen (Yamboliev et al. 2000; Weerackody et al. 2009; Park, John E S et al. 2012; Patel et al. 2013; Yu et al. 2013). Einen weiteren Faktor der PAH-Entstehung stellt das inflammatorische Geschehen dar, das in einer Großzahl von P38-Studien untersucht wurde (Cuenda und Rousseau 2007; Young 2013). Neben der Assoziation der P38-MAPK mit dem Lungengefäßsystem wird in dieser Arbeit der Einfluss der Proteinkinase auf den rechten Ventrikel untersucht. Die Auswirkungen der P38-MAPK auf die Funktionalität des rechten Ventrikels bei PAH wurden bislang wenig analysiert. Gegenwärtig existiert keine Studie, die eine selektive P38 $\alpha$ -MAPK-

Inhibition und die damit verknüpften Auswirkungen auf den rechten Ventrikel untersucht. Chichger et al. konnten für den rechten Ventrikel zeigen, dass Angiotensin-II P38-MAPK-vermittelt die Proteinkinasen C  $\beta$ -II und  $\delta$  reguliert, wodurch die Proliferation kardialer Fibroblasten und die Kollagendeposition gesteigert wurde (Chichger et al. 2015). Die Studienlage zu anderen kardiovaskulären Krankheiten und resultierenden Effekten auf das linke Herz ist ausführlicher. Daher dient hauptsächlich dieses Wissen als Grundlage der Einleitung und Diskussion. Bei Patienten mit Atherosklerose konnte durch Inhibition mit SB-203580 (Losmapimod) eine Verminderung inflammatorischer Vorgänge sowie eine verbesserte NO-abhängige Vasodilatation gezeigt werden (Cheriyian et al. 2011). Seeger et al. wiesen bei ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen ebenfalls verminderte inflammatorische Marker sowie die Reduktion atherosklerotischer Läsionen nach (Seeger et al. 2010). Neben atherosklerotischen Veränderungen ist die P38-MAPK in kardiale Vorgänge wie Myokardinfarkt, Remodeling und Herzinsuffizienz involviert (Martin et al. 2014). Die Inhibition der P38-MAPK steigert die Kontraktilität des Herzens, vermindert den ischämischen Schaden und reduziert die Häufigkeit des Herzversagens (Marber et al. 2011). Ebenso stellt es für die Pathogenese der Rechtsherzhypertrophie und des dilatativen Herzversagens einen möglichen Signalweg dar (Wang et al. 1998a; Chen et al. 2010). Newby et al. legten 2014 in einer multizentrischen Studie mit 526 Patienten die Effekte von SB-203580 (Losmapimod) bei Myokardinfarkt ohne ST-Hebung (NSTEMI) vor. Sie bestimmten 72 Stunden nach dem Infarkt ereignis anhand des C-reaktiven Proteins (CRP) und des IL-6 verminderte inflammatorische Werte in der Therapiegruppe. Die Werte des Herzinsuffizienzmarkers brain natriuretic peptide (BNP) waren nach zwölf Wochen ebenfalls erniedrigt. In einer kleinen Unterstudie gelang MRT-gestützt der Nachweis einer verminderten Infarktgröße in der Therapiegruppe (Newby et al. 2014).

### **1.4.1 Ziel der Arbeit**

Die Zielstellung der Arbeit war die Untersuchung der medikamentösen Auswirkungen des P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitors PH-797804 auf das Herz- und Lungensystem. Dazu wurden zwei Mausmodelle verwendet. Das erste Modell sollte durch hypoxische Umgebungsbedingungen eine PAH mit konsekutiven Auswirkungen auf das rechte Herz erzeugen. Das zweite Modell sollte einen erhöhten Afterload durch eine geclippte Pulmonalarterie simulieren.

Der Untersuchung des Einflusses der P38 $\alpha$ -MAPK-Hemmung auf die Herz- und Lungengefäße erfolgte durch Analyse des Remodelings des Herz- und Lungengewebes, der rechtsventrikulären Hypertrophie und der rechtsventrikulären Funktion.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die vorgelegte Dissertation untersuchte in Zusammenarbeit mit der ECCPS Plattform „Phenotyping and Imaging“ in tierexperimentellen Modellen der PAH und der rechtsventrikulären Hypertrophie den therapeutischen Effekt von PH-797804 auf das pulmonale Gefäßsystem und das rechte Herz. In Tiermodell 1 wurden die Mäuse unter hypoxischen Umgebungsbedingungen gehalten, um eine PAH zu induzieren. In Tiermodell 2 wurde die Pulmonalarterie der Tiere durch einen Metallclip verengt, um eine Rechtsherzhypertrophie zu verursachen. Die Versuchsgruppen wurden durch zufällige Aufteilung der Tiere randomisiert erstellt.

#### **2.1.1 Tiermodell 1 – Hypoxiemodell**

Als Tiermodell 1 (Abbildung 5) wurde ein etabliertes Hypoxiemodell verwendet, in welchem die Tiere einem reduzierten O<sub>2</sub>-Partialdruck (10% Luftsauerstoff) exponiert wurden. Die Mäuse befanden sich 35 Tage in der Hypoxiekammer. Von Tag 21 bis Tag 35 erhielten die Tieren morgens und abends die jeweilige Substanz per os. Dabei handelte es sich um das Verum PH-797804 (P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitor) oder das Placebo Methylcellulose. Die bei 4°C gelagerten Therapeutika wurden zur Behandlung auf Raumtemperatur erwärmt. Die normoxische Kontrollgruppe erhielt keine Substanz. An Tag 35 wurden die Echokardiographie, die hämodynamische Messung und die Organentnahme durchgeführt.

Der Anzahlen der Versuchstiere betragen:

- Gruppe 1: Normoxie, n = 9
- Gruppe 2: Hypoxie, Behandlung mit Placebo, n = 10
- Gruppe 3: Hypoxie, Behandlung mit PH-797804, n = 10



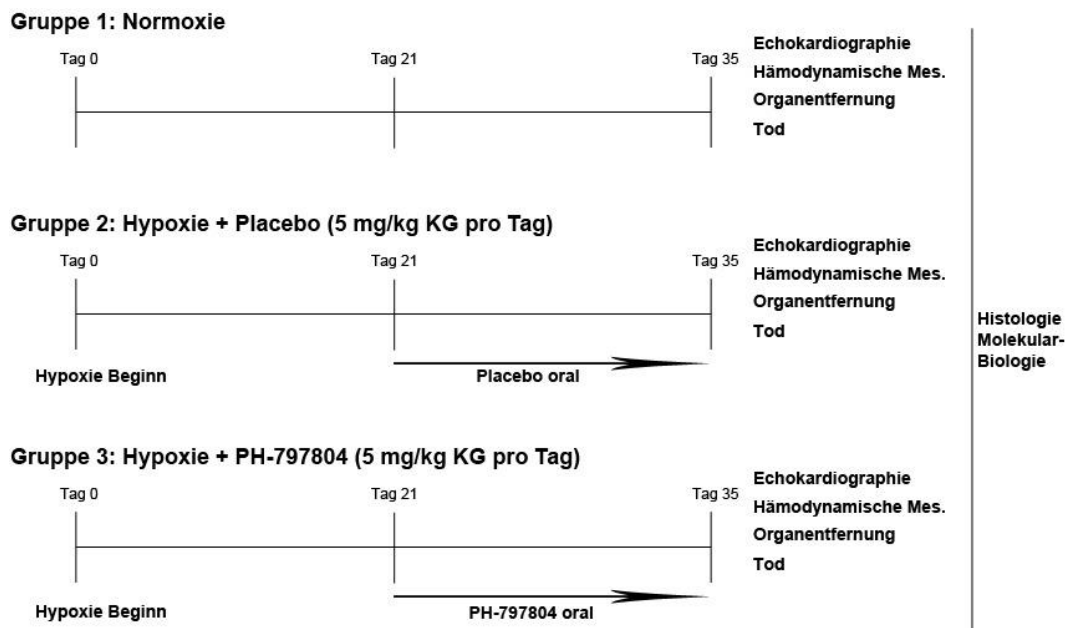


Abbildung 5: Flussdiagramm Tiermodell 1 - Hypoxiemodell

## 2.1.2 Tiermodell 2 – Stenosemodell der Arteria pulmonalis

In Tiermodell 2 wurde chirurgisch ein Clip um die Pulmonalarterie gelegt, um eine ähnliche rechtskardiale Belastung wie bei PAH-Patienten zu induzieren.

Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt, wovon jede Gruppe einer Operation unterzogen wurde. Zwei Gruppen erhielten den Pulmonalarterienclip (PAB – Gruppen), die andere Gruppe wurde ohne Anlage eines Clips operiert (Sham).

Die Versuchsdauer betrug 21 Tage und begann mit der Operation am 1. Tag. Sieben Tage später begann die Therapie mit PH-797804 oder dem Placebo. Die Substanzen wurden analog zu Modell 1 verabreicht. Die bei 4°C gelagerten Therapeutika wurden zur Behandlung auf Raumtemperatur erwärmt.

Die echokardiographische Untersuchung wurde an Tag 21 durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere nach hämodynamischer Messung getötet und die Organe zur weiteren Untersuchung vorbereitet. Der Versuchsaufbau ist nachfolgend in einem Flussdiagramm dargestellt (Abbildung 6).

Der Anzahlen der Versuchstiere betragen:

- Gruppe 4: Sham, n = 8
- Gruppe 5: PAB, Behandlung mit Placebo, n = 14
- Gruppe 6: PAB, Behandlung mit PH-797804, n = 12

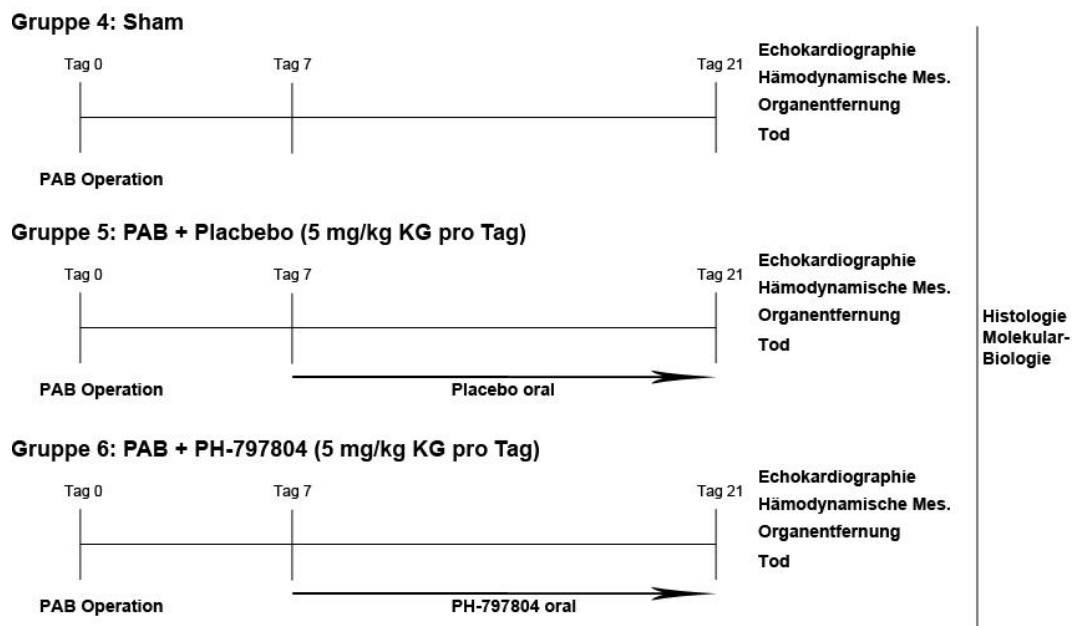


Abbildung 6: Flussdiagramm Tiermodell 2 – Pulmonalarterielles Banding

## 2.2 Material

### 2.2.1 Versuchstiere

Zur Versuchsdurchführung wurden Mäuse (*mus musculus*) der Inzuchtlinie C57BL/6N verwendet. Diese wogen zu Studienbeginn 20 g bis 22 g und waren 10 bis 12 Wochen alt. Die Tiere wurden von der Charles-River GmbH, Sulzfeld, Deutschland in Boxen mit je 20 bis 22 Tieren geliefert.

Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen in der Versuchstierhaltung Seltersberg, Gaffkystraße 11, 35392 Gießen, in 540 cm<sup>2</sup> großen Makrolonkäfigen, Typ 2 long, bei einer maximaler Gruppengröße von fünf Tieren gehalten. Futter der Firma Altromin®, Standard-Diät-Futter und Leitungswasser standen den Tieren zur freien Verfügung. Weiterhin befanden sich im Käfig ein rotes Haus mit zwei Eingängen sowie Nistmaterial. Der Tag-Nacht-Rhythmus bestand aus 12 Stunden Licht (6:00 Uhr bis 18:00 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit, inklusive Rotlicht in der Dunkelphase.

### 2.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die tierexperimentellen Versuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt. Die Kennziffer des genehmigten Antrages lautet

- GI 20/10 Nr. 32/2012 P38 - MAPK-Inhibition bei PH und RVH; genehmigt am 22.05.2012; gültig bis 25.05.2017

## 2.2.3 Mausmodell – Geräte und Material

### 2.2.3.1 Injektionslösungen/Gase

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Injektionslösungen und Gase

Analgetikum	Buprenorphin 0,3mg/ml Vetergesic® Injektionslösung	CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf
Glucose	Glucose 20% ® 1:4 verdünnt (5%)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Methylcellulose	Verdünnung zu 2% in physiologischer Kochsalzlösung	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	0,9% NaCl, 100 ml 0,9% NaCl, 1000 ml	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Narkosegas	Isofluran Baxter®	Baxter Deutschland GmbH, Melsungen, Deutschland
Nicht-Steroidale Antirheumatika	Rimadyl® (Carprofen) 50mg/ml Injektionslösung	Pfizer GmbH, Berlin
P38 $\alpha$ -Inhibitor	PH-00797804	Pfizer, USA

### 2.2.3.2 Operationsbesteck

Tabelle 3: Auflistung des verwendeten Operationsbestecks

Nadelhalter	14cm FST® 1265-14	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Anatomische gebogene Pinzette FST® 11009-13	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Kleine gebogene anatomische Pinzette FST® 11041-08	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Kleine gerade anatomische Pinzette FST® 11040-08	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere	Kleine spitze gerade Schere, 9 cm, FST® 14958-09	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Skalpell	Feather® Disposal Scalpel Größe: 10, 11, 12, 20	Pfm Medical AG Köln, Deutschland
Ohrmarkierung	Napox KN-292B Stainless 2.0	Bioscape GmbH Castrop- Rauxel, Deutschland
Wundhaken		Eigenbau
Zahnarztbesteck	2 kleine Haken	Eigenbau
Zange für Arterienclip	Hemoclip® Applier	Edward Weck, Research Triangle Park, NC, USA

### 2.2.3.3 Material und Geräte – Operation, Therapie und Hämodynamik-Messung

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte für Operation, Therapie und Hämodynamikmessung

Beatmungspumpe	MiniVent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Computer und Monitor		Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland
Datenerfassungssystem	Powerlab®	AD Instruments GmbH Germany, Spechbach, Deutschland
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II für Messung des arteriellen Blutdruckes	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Käfig	Makrolon Typ II lang	
Haarschneider	Contura®	Wella, Darmstadt, Deutschland Zweigniederlassung der Procter & Gamble GmbH
Handstaubsauger	Philips 4.8V Wet & Dry	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Intubationsvorrichtung		Eigenbau
Katheter	Millar® Katheter Mikro-Tip Catheter Transducers	Millar Instruments Inc., Houston Texas, USA
Katheter - Kontrolleinheit	Millar® Pressure Control Unit	Millar Instruments Inc., Houston Texas, USA
Mandrin Intubation	aus Spinalkanüle 20 G (0,9 mm x 75 mm)	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Messschieber	Absolute Digimatic Caliper	Mitutoyo Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Narkosekammer		von Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Operationslicht	Schwannenhalslampe, kalte Lichtquelle, 2-armig	Schott AG, Mainz, Deutschland
Operationsmikroskop	MS 5	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schieblehre	Messschieber Digital	Mitutoyo Europe GmbH, Neuss, Deutschland
Software	HSE Pulmodyn W	Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland

Spülkanüle	Pulmonalarterieller Katheter Sondenanfertigung für ILU1	Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH March- Hugstetten, Deutschland
Stativ	Halterung für Infusions- Spritzen während Operation / Perfusion	
Thermosonde	Tcat-2LV	Physitemp Instruments Inc., Clifton, USA
Trachealtubus	aus Vasofix® Safety 20 gekürzt	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Warmwasserbereiter	Lauda Ecoline Staredition	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wärmebett	Wasserbett mit Korkmatte	Eigenbau

#### 2.2.3.4 Geräte Hypoxie – Anlage

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte für die Hypoxieanlage

Atemkalk	Drägersorb® 800 Plus	Drägerwerk AG & Co. KGaA Lübeck, Deutschland
Blutgasanalysegerät	ABL 300	Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark
Filter Luftschläuche	Iso-Gard®	Teleflex Incorporated, Marke: Hudson RCI
Flasche Sauerstoff		Nachschublager ECCPS
O <sub>2</sub> -Luftfilter	4010	Labotect GmbH Göttingen, Deutschland
O <sub>2</sub> -Sensor	Teledyne Oxygen Sensor C-1	Teledyne Technologies Inc. Kalifornien, USA
Stickstoff-Generator		KnF-Neuberger GmbH Freiburg, Deutschland
Vakuumpumpe		KnF-Neuberger GmbH Freiburg, Deutschland

#### 2.2.3.5 Geräte – Echokardiographie

Tabelle 6: Auflistung der zur Echokardiographie verwendeten Geräte

Bildgebung	Micro-Imaging-System Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Isofluranverdampfer	Vet Equip Dräger-Vapor 2000	KF Technology Rom, Italien
Rektalthermometer		Indus Instruments Houston, Texas

## 2.2.3.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Arterienclips	WECK Hemoclip® small titanium ligating clips	Edward Weck, Research Triangle Park, NC, USA
Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer AG Leverkusen, Deutschland
Desinfektion	Softasept® N	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Desinfektion	Cutasept®	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Dreiwegehahn	Discofix®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe	Größe M Vasco® Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmal-Nitril-Handschuhe	Größe M Peha soft® nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Einmalspritze	Inject Luer® Größen: 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme	Elca® Med Creme	ASID BONZ GmbH Herrenberg, Deutschland
Enthaarungscreme	Veet®	Reckitt Benckiser AG Zürich, Schweiz
Eppendorf Tube	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen	Cellstar® Tubes Größe 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Falconröhrchen	BD Falcon® Konisches Röhrchen 15ml, 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fixierpflaster	Leucosilk® 5m x 2,5 cm	BSN medical GmbH & Co KG, Hamburg, Deutschland
Hämatokritkapillaren		Hirschmann GmbH & Co. KG
Hämatokrit-Versiegelungskit		Brand GmbH & Co. KG
Kanülen	BD Microlance® Größen: 24 G (0,55 mm x 25 mm) 26 G (0,9 mm x 25 mm) 30 G (0,3 mm x 25 mm)	Becton Dickinson Heidelberg, GmbH
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Monovette	S-Monovette® Lithium-Heparin	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Nahtmaterial	Ethicon Vicryl Plus 5-0 VCP303	Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland

Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Perfusor-Leitung	150 cm	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche		
Polyester Garn 5/0		FSSB Chirurgische Nadeln GmbH Jestetten, Deutschland
Seidenfäden		
Schraubdeckeltubes	Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Tupfer	Schlinggazetupfer, unsteril, 20x20cm	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Ultraschallgel	Aquagel®	Parker Laboratories Inc. Fairfield, USA
Venenverweilkanüle	Vasofix® Safety 20 G (1,1 mm x 33 mm)	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylocaingel	Xylocain®Gel 2% Lidocainhydrochlorid	Astra Zeneca GmbH Wedel, Deutschland
Zellstofftupfer	Pur-Zellin® 4 x 5 cm	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland

## 2.2.4 Histologie – Geräte und Material

### 2.2.4.1 Geräte und Software

Tabelle 8: Auflistung der zur Histologie verwendeten Geräte und Software

Produkt	Handelsname	Vertrieb
Aqua-Dest-Maschine für destilliertes Wasser		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitalkamera Mikroskop	DC 300 F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskope	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Pipetten	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Probenidentifizierung		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software – Makro	Erweiterung für Q Win V3; Makro für Muskularisierungsgrad, Wandstärke, Kollagengehalt	Einzelanfertigung von Herrn Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Instruments GmbH, Berlin, Deutschland
Wärmeplatte		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland
Wasserbad	HI1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Zentrifuge	Mikro200R,	Hettich Zentrifugen GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

## 2.2.4.2 Allgemeine Materialien

Tabelle 9: Auflistung allgemeine Materialien

Edelstahl-Einbettform		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Färbekammer		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbekasten mit Falzdeckel		Hecht Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Färberahmen für 10 Objektträger		Hecht Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Objektträgerküvette Plastik		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2.4.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 10: Auflistung der zur Histologie verwendeten Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	24 x 36 mm	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Einbettkassetten, klein	Tissue-Tek® 3 Uni-Cassette®	Sakura Finetek Germany GmbH Stauffen, Deutschland
Eindeckmedium	Pertex ® (Xylol löslich)	Medute GmbH Burgdorf, Deutschland



Mikrotomklingen	S 35 Feather	Produkte für Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus® 25x75x1mm	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus ®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland

## 2.2.4.4 Chemikalien

Tabelle 11: Auflistung der zur Histologie verwendeten Chemikalien

Albumin bovine Fraction V		Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Antikörper $\alpha$ -Actin	1A4, Maus/monoklonal, (smooth muscle actin), Aliquots à 5 µl + 10 µl, Art-Nr: A2547, Verdünnung 1:1200 mit 10% Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Antikörper von-Willebrand- Faktor	Kaninchen / polyklonal, Aliquots à 10 µl, Art-Nr: A0082	Dako GmbH Hamburg, Deutschland
Avidin Blocking Kit		Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, Vertrieb: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DAB ®Substrat Kit	Peroxidase Substrat Kit, SK- 4100	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, Vertrieb: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogen-phosphat- Dihydrat (PBS-Puffer)		Merck GmbH Darmstadt, Deutschland
Essigsäure		Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	70%, 96%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon	J.T.Baker, Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München
Formalin		Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
ImmPRESS Anti-Rabbit Ig	MP-7401	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010,

		Vertrieb: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Isopropanol	99,8%	Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	74,56 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methylgrün	H-3402	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, Vertrieb: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
MMH HRP-Polymer Kit	MM510L (Rodent Block M, MM HRP-Polymer)	BioCare Medical
Natriumchlorid (PBS-Puffer)	58,44 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	141,96 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure Lösung 1,2%		AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure 25 %		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Siriusrot		Niepötter Labortechnik, Bürstadt
Trypsin	Digest All 2 ®, 003008	Invitrogen Life Technologies GmbH
VIP® Substrat Kit	Peroxidase Substrat Kit, SK-4600	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, Vertrieb: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid	30%	Merck, Darmstadt
Xylol		VWR International S.A.S., Fontenay-sousBois, Frankreich

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Hypoxie-Anlage

Grundlage des Modelles war der Einsatz der Versuchstiere in luftdichte Hypoxiekammern. Das zugrunde liegende Prinzip (Abbildung 7) war die Erzeugung eines hypoxischen, normobaren Milieus durch Zumischen der Gase Stickstoff und Sauerstoff. Die Konzentrationen wurden mittels eines Messfühlers (Link) erfasst und an eine Regeleinheit weiter geleitet. Diese war auf eine Sauerstoffkonzentration von 10% kalibriert und leitete die Gase aus einer sauerstoffgefüllten Druckluftflasche (8) und einem Stickstoffgenerator (8) über ein Flow-Meter (6) ein. Die Luftzirkulation stellten Umluft-Pumpen sicher (3).

Die Qualität der Versuchsbedingungen wurde zusätzlich durch zwischengeschaltete Modifikationen erhöht. Die aus der Kammer strömende Luft passierte einen Luftfilter (2), welcher die Anlage vor umher wirbelnden Materialien, wie zum Beispiel Einstreu oder Kot, schützte. Gefolgt von der Pumpe schloss sich eine Luftentfeuchtungsanlage (4) an, um die Konzentration der Luftfeuchtigkeit auf einem einheitlichen Niveau zu halten. Über den Entfeuchter wurde die Atemluft konstant auf 24°C gehalten. Zudem folgte im Kreislauf ein Atemkalk-Absorber (5), welcher das produzierte Kohlenstoffdioxid absorbierte.

Die Hypoxieanlage wurde täglich gewartet und verfügte über ein automatisches Telefon-Rufsystem für den Störfall.

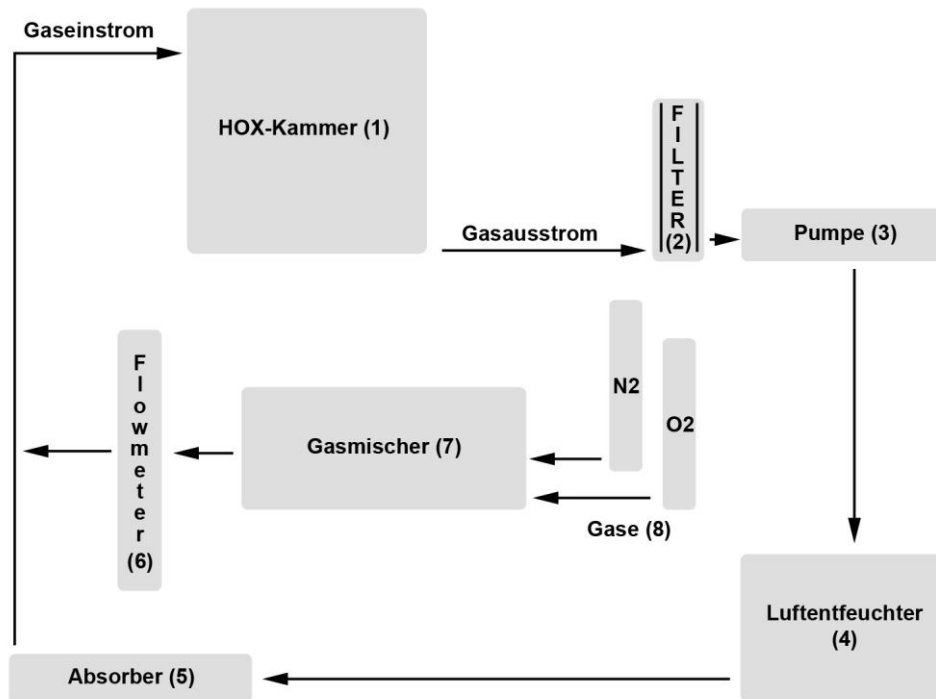


Abbildung 7: Schematische Abbildung des Aufbaus der Hypoxieanlage

Abkürzungen: N<sub>2</sub> – Stickstoff, O<sub>2</sub> - Sauerstoff, HOX – Hypoxie

In einem baugleichen System wurden die normoxischen Versuchstiere unter Raumluftbedingungen mit 21% Sauerstoff untergebracht. Alle Anlagen befanden sich im gleichen Raum.

Zu den täglichen Kontrollen zählten die Begutachtung der Versuchstiere, die Bestimmung der Partialdrücke in den Hypoxiekammern mittels Handsensor und ABL 500 – System, die Kontrolle der Atemgasflaschen, des Atemkalkes, der Temperatur und des entstanden Atemgaskondenswassers sowie die Überprüfung der Umluftpumpen auf Funktionalität.

## 2.3.2 Stenosemodell – Operation

### 2.3.2.1 Allgemein

Das PAB ist ein standardisiertes Verfahren, bei welchem ein Hemoclip® aus Titan um die Arteria pulmonalis gelegt wird. Der auf 0,3 mm eingestellte Clip verengt das Lumen auf einen Stenosegrad von 65% bis 70%.

Die Operationen wurden von erfahrener Personal durchgeführt.

### 2.3.2.2 Vorbereitung

Vor der Operation wurde jedes Tier gewogen und der Gesundheitszustand dokumentiert. Die Maus wurde in eine mit Isofluran-/Sauerstoffgemisch (3-5 Vol.-% Isofluran, 1-3 l/min Sauerstoff) geflutete Plexiglaskammer verbracht und bis zur Immobilität in dieser belassen. Die Kornea der Mäuse wurde mit Bepanthen®-Augensalbe benetzt, um dem Austrocknen der Augen vorzubeugen.

Die Arbeiten fanden unter einem Operationsmikroskop mit 1,6-facher Vergrößerung und einer Kaltlichtlampe statt.

### 2.3.2.3 Intubation

Mit Erlangen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Versuchstier aus der Narkosekammer entnommen und, mit den Schneidezähnen hängend, an einer speziell angefertigten Vorrichtung befestigt. In dieser Position erhielt der Operateur freien Blick auf die Stimmbänder und den Larynx. Die Zunge wurde nach lateral bewegt, eine Führungsschiene eingebracht und die Intubation mittels flexiblen Teil einer 20 G Braunüle durchgeführt. Anschließend wurde die Maus auf eine Wärmeplatte mit 38°C gesetzt, um ein narkosebedingtes Auskühlen zu vermeiden.

Der Tubus wurde an einen Ventilationsautomat angeschlossen und das Tier mit einer Frequenz von 200 bis 250 Atemzügen pro Minute bei einem Atemzugvolumen von 220 µl/Atemzug beatmet. Die Beatmung der Tiere erfolgte mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von ungefähr 1 cm H<sub>2</sub>O, um ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern. Die Narkose geschah mittels Isofluran/Sauerstoffgemisch (1-3 Vol.-% Isofluran, 1-3 l/min Sauerstoff).

### 2.3.2.4 Operation

Vor Operationsbeginn wurde die Maus mit 0,3 mg/kg Körpergewicht Vetalgescic® (Buprenorphin) analgisiert und durch Zwischenzehenreflextests eine ausreichende Narkosetiefe und Schmerzfreiheit verifiziert.

Um einen optimalen Zugang zum Operationsbereich zu gewährleisten, wurde die Maus mittels Leukosilk®-Streifen an der Wärmeplatte fixiert. Die rechte vordere Extremität wurde in anatomischer Normalposition gelagert und die linke vordere Extremität dorsal des Tieres fixiert. Die hinteren Gliedmaßen wurden lose in physiologischer Haltung belassen und fixiert. Vor der Inzision wurde das Operationsareal durch Rasur von Haaren

befreit und dieses dreimalig mit Cutasept® desinfiziert. Die Schnittführung mittels Schere lief vom Sternum in Richtung Axilla und betrug ungefähr 1,5 cm. Anschließend wurde die Haut gelöst, die Muskelschichten auseinander geschoben und der zweite Interkostalraum eröffnet. Das Operationsareal wurde mit Wundhaken offen gehalten. Es erfolgte die Eröffnung des Perikards, die Arteria pulmonalis wurde aufgesucht, dargestellt und der Hemoclip® mittels Spezialzange angebracht (Position des Clips siehe Abbildung 8). Dieser Clip verengte die Pulmonalarterie auf etwa 0,3 mm Durchmesser.

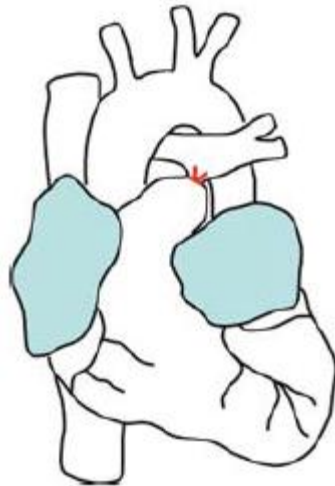


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Herzens mit großen Gefäßen  
Entnommen aus (Tarnavski et al. 2004); rote Markierung beschreibt Position des Clips

Der Thorax wurde anschließend nach Setzen einer Einzelheft-Naht zwischen 1. und 2. Rippe mit einer Kürschnernaht verschlossen.

#### 2.3.2.5 Nachsorge

In der Nachbereitung der Operation wurde die Isoflurangabe durch ein Sauerstoff-Luft-Gemisch ersetzt, um die Spontanatmung der Maus zu stimulieren. Die Extubation erfolgte bei intaktem Schluckreflex. Zusätzlich wurde eine 5% Glukoselösung verabreicht, um operationsbedingte Nachblutungen zu kompensieren.

Im Käfig wurde die operierte Maus auf eine Wärmeplatte gesetzt und in regelmäßigen Abständen untersucht. Nach fünf Stunden wurden die Tiere zurück in die Tierhaltung gebracht.

#### 2.3.3 Therapie

Die Versuchstiere wurden oral mittels Schlundsonde nach einem festen Schema therapiert. Zur Eingabe der Substanz wurde die Maus durch Fixation mittels Daumen und

Zeigefinger am Rückenfell und Reklination des Kopfes in Position gebracht. Die Sonde wurde über den Schlund in den Ösophagus eingeführt und jede Maus erhielt täglich 5 mg/kg Körpergewicht Therapeutikum oder Placebo. Nach maximal 30 Minuten Normoxie wurden die Tiere der Hypoxiegruppe zurück in die Kammern gesetzt.

## **2.3.4 Echokardiographie**

### **2.3.4.1 Echokardiographie allgemein**

Die sonographische Untersuchung des Herzens gilt als etabliertes diagnostisches Verfahren in der Kardiologie und Pulmologie. Medizinhistorisch entwickelte sich die Technologie aus der militärischen Anwendung im ersten Weltkrieg. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts hielt die Ultraschalluntersuchung zunehmend Einzug im medizinischen Bereich.

Grundlage der Sonographie ist das Senden und Empfangen von Schallwellen oberhalb der menschlichen Hörgrenze. Diese beträgt 20 kHz. Der übliche medizinische Anwendungsbereich liegt zwischen 1 MHz und 40 MHz. Technischer Mittler ist ein piezoelektrischer Kristall, welcher als Empfänger und Sender dient. Nach entsprechendem Anwendungsmodus arbeiten ein oder mehrere Kristalle parallel.

Die emittierten Strahlen werden nach physikalischen Gesetzen gebrochen, gestreut, abgeschwächt und reflektiert. Durch Laufzeitunterschiede der zurückgesendeten Signale errechnet sich ein präzises Abbild der anatomischen Gegebenheiten.

In der Echokardiographie entwickelten sich diverse Darstellungsmodi. Für das beschriebene Projekt sind der 2D-Modus, der Motion-Modus („M-Mode“) und der Dopplermodus relevant.

Der M-Modus bildet auf der y-Achse die Eindringtiefe ab, die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf dar. Dies lässt eine Beurteilbarkeit der Organbewegungen zu.

In der klinischen Diagnostik findet der 2D-Modus sehr häufig Anwendung, da im Gegensatz zum M-Modus durch automatisches Durchschwenken eine weitere Ebene dargestellt wird. Analog dem M-Modus gibt die Ordinate die Eindringtiefe wieder, auf der Abszisse ist die Organausdehnung dargestellt. Das Reflexionsverhalten des Gewebes wird durch unterschiedlich intensive Grauabstufungen abgebildet, als Echogenität bezeichnet. Der M-Modus und der 2D-Modus finden häufig kombiniert Anwendung.

Die Ultraschalluntersuchung im Doppler-Modus ermöglicht dem Untersucher die Darstellung des Blutflusses. Die technische Grundlage ist ein nach Christian Johann Doppler benannter Effekt, welcher durch Erfassung der Frequenzveränderung reflektierter Strahlen die Bestimmung von Geschwindigkeit und Richtung einer Flüssigkeit zulässt.

Während der Untersuchung werden mehrere Schnittebenen eingestellt, dokumentiert und verglichen. Die parasternal lange Achse erlaubt eine Längsdarstellung des Herzens, in welcher die rechte und linke Herzkammer, der linke Vorhof, die Septen, sowie die Ausflussbahn der Aorta beurteilt werden. Eine 90°-Drehung des Schallkopfes ergibt im Querschnitt des Herzens die parasternal kurze Achse. Ein Durchschwenken bildet von kranial nach kaudal die Aortenklappen-, Mitralklappen- sowie Papillarmuskelebene ab.

Die Ultraschall-Untersuchung in Höhe des Herzspitzenstoßes ergibt die apikalen Schnittebenen. Diese Einstellung erlaubt zusätzlich eine genaue anatomische Bestimmung des rechten Vorhofes sowie der Trikuspidalklappe.

Zur präzisen Darstellung der rechtsseitigen Herzstrukturen, vor allem des Einfluss- und Ausflusstraktes, setzt der Untersucher den Schallkopf subkostal im epigastrischen Winkel auf und kann die Einstellung durch 90°-Drehung variieren.

#### 2.3.4.2 Echokardiographische Untersuchung im Versuchsaufbau

Die echokardiographischen Untersuchungen führte Herr Dr. med. Bakytbek Kojonazarov unter standardisierten Bedingungen durch. Er besitzt langjährige Erfahrungen in der sonographischen Kleintierdiagnostik.

Die Auswahl der Mäuse geschah per Zufall, ohne die Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Vor der Untersuchung wurde jedes Tier gewogen. Die Erhebung der Daten fand stets im selben, konstant temperierten Raum statt.

Die Narkose wurde in der Narkosekammer mit Isofluran-/Sauerstoffgemisch (3-5 Vol.-% Isofluran, 1-3 l/min Sauerstoff) bis zur Immobilisierung der Maus begonnen. Anschließend wurde das Tier aus der Kammer entnommen, rüchlings auf eine Wärmeplatte gelegt und weiterhin mit Isofluran-/Sauerstoffgemisch (Isofluran 1-3 Vol.-%, Sauerstoff 1-3 l/min) per Maske beatmet. Die Wärmeplatte hielt die Körpertemperatur der Mäuse konstant bei 37°C. Mittels Rektalthermometer wurde die Körpertemperatur der Tiere bestimmt und die Temperatur der Wärmeplatte automatisch angepasst, um ein



narkosebedingtes Auskühlen der Tiere zu vermeiden. Die Funktionalität des Herzens wurde mittels Ein-Kanal-Elektrokardiogramm überwacht.

Nach Enthaarung des ventralen Thorax mittels elektrischem Handrasierer und Veet®-Enthaarungs-Creme wurde aufgewärmtes Ultraschall-Gel aufgetragen. Die Erhebung der Parameter erfolgte bei jedem Versuchstier in standardisierter Abfolge. Anschließend wurde die Narkose unter überwachten Bedingungen ausgeleitet. Die Tiere wurden bei gutem Zustand nach einer maximalen Dauer von insgesamt zwei Stunden zurück in hypoxische Umgebungsbedingungen transportiert.

Die sonographische Untersuchung ergab die im Folgenden erläuterten Parameter.

#### 2.3.4.3 Cardiac output / Herzminutenvolumen

Das Herzminutenvolumen (Cardiac output - CO) gibt an, welches Blutvolumen innerhalb einer Minute (min) durch den Kreislauf zirkuliert (Einheit ml/min). Es lässt eine Beurteilung der kardialen Pumpleistung zu. Der Wert ermittelt sich durch Multiplikation der Herzfrequenz mit dem Auswurfvolumen pro Schlag. Die Herzfrequenz wird durch Mitzählen der Herzschläge auf den Zeitraum einer Minute festgelegt.

Das Schlagvolumen errechnet sich durch Multiplikation des Durchmessers der linksventrikulären Ausflussbahn mit dem Integral der Strömungsgeschwindigkeit in der Aorta während der Systole. Die Formel für den CO lautet (Rudski et al. 2010; Howard et al. 2012; van de Veerdonk, Mariëlle C et al. 2014):

$$CO = \text{Schlagvolumen} * \text{Herzfrequenz}$$

#### 2.3.4.4 Herzindex

Der Herzindex (Cardiac index - CI) beurteilt ebenfalls die Leistungsfähigkeit des Herzens bezogen auf die Körperoberfläche. Er wird nach folgender Formel berechnet (Rudski et al. 2010; Howard et al. 2012; van de Veerdonk, Mariëlle C et al. 2014):

$$CI = \frac{CO}{\text{Körpergewicht}}$$

#### 2.3.4.5 Myocardial performance index / TEI – Index

Ein weiterer Wert zur Beurteilung der rechtsventrikulären Herzaktion ist der Myocardial performance index (MPI), auch TEI-Index genannt. Grundlage der Berechnung ist die Dauer des pulmonalen Ausstromes und der Zeitraum zwischen Ende und Beginn des

trikuspidalen Einstroms. Eine Ermittlung dieses Parameter erfolgt durch gepulste Doppler-Sonographie oder durch tissue doppler imaging (Tei et al. 1995; Howard et al. 2012; van de Veerdonk, Mariëlle C et al. 2014).

#### 2.3.4.6 Tricuspid annular plane systolic excursion

Die tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) beschreibt in Millimetern die Auslenkung der Trikuspidalklappe von der Enddiastole bis zu Endsystole. Die Messung im M-Modus wird bei eingestelltem apikalen Vierkammer-Blick durchgeführt. Der Parameter gilt als valide Größe für die Funktionsbeurteilung des rechten Ventrikels. Ein erhöhter TAPSE-Wert ist pathologisch. Dies tritt typischerweise bei einem Hinterwand- oder Septuminfarkt, einer Stenose der Pulmonalklappe oder im Rahmen einer PAH auf (Rudski et al. 2010; Howard et al. 2012; van de Veerdonk, Mariëlle C et al. 2014).

### 2.3.5 Hämodynamik-Messung

#### 2.3.5.1 Allgemein

Die Erhebung der hämodynamischen Parameter gilt klinisch und tierexperimentell als Goldstandard in der Diagnostik pulmonaler Hypertonie-Erkrankungen. Mittels invasiver Katheterisierung bestimmt der Untersucher Druckwerte aus definierten Bereichen des kardiopulmonalen Systems. Für die Inhalte dieser Arbeit ist vor allem die Darstellung rechtskardialer Parameter bedeutsam. Im klinischen Alltag findet die Untersuchung im Rechtsherzkatheterlabor ihre Entsprechung.

#### 2.3.5.2 Durchführung

Die hämodynamischen Untersuchungen wurden von erfahrenem Personal durchgeführt.

Die Auswahl der Mäuse geschah per Zufall, ohne die Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Vor der Untersuchung wurde jedes Tier gewogen.

Für die Erhebung der hämodynamischen Parameter wurden die Mäuse zu Beginn in der Narkosekammer (3-5 Vol.-% Isofluran, 1-3 l/min Sauerstoff) betäubt. Der Narkoseerhaltung diente eine speziell angefertigte Nasen-/Mundmaske, welche Isofluran-/Sauerstoffgemisch (1-3 Vol. % Isofluran, 1-3 l/min Sauerstoff) abgab. Die Narkosetiefe wurde mittels Zwischenzehenreflex geprüft. Anschließend wurden die Tiere auf einer Heizplatte durch Klebestreifen an den Extremitäten befestigt. Während der

gesamten Untersuchung zeichnete der Computer ein Elektrokardiogramm und die Körpertemperatur der Versuchsmäuse auf.

Die Operation begann mit einem Hautschnitt und Freipräparation der rechten Vena jugularis. Die Vene befindet sich im Spatium lateropharyngeum, welches nach Abpräparation der oberen Halsfaszien sowie des Musculus sternocleidomastoideus freilag. Anschließend wurden drei Seidenfäden vorgelegt und mittels Knoten im kranialen und kaudalen Faden der Blutfluss unterbunden. Im mittleren Faden wurde ein Knoten vorgelegt. Nach Lockerung des kaudalen Fadens wurde der Millar® - Tip – Katheter mit Flussrichtung des Blutes in das venöse System eingeführt und die digitale Aufzeichnung der Messparameter gestartet. Die Position im kardiovaskulären Kompartiment wurde anhand der spezifischen Druckkurven bestimmt. Mit Erreichen des rechten Ventrikels wurde der mittlere Knoten vollendet und der Katheter zur Aufzeichnung der Messdaten zwei bis drei Minuten in seiner Position belassen. Anschließend wurde der Katheter entfernt und der kaudale Knoten geschlossen, um einen letalen Blutmangel zu vermeiden.

Es schloss sich eine Katheterisierung des linken Ventrikels an. In der klinischen Diagnostik der PAH ist diese Untersuchung abdingbar, da die Daten mittels indirekter Messung des Wedge-Druckes im Rahmen der Rechtsherzkatheterisierung gewonnen werden. Dies ist im Tiermodell nicht notwendig. Die Freipräparation und Katheterisierung der Arteria carotis sinistra geschah analog dem für die Vena jugularis dextra beschriebenen Prozedere. Die Arteria carotis stellte sich als pulsierende, medial der Vena jugularis liegende Struktur dar. Beide Gefäße liegen in enger Nachbarschaft des Nervus vagus, welcher schonend frei präpariert wurde. Der Millar®-Tip-Katheter wurde gegen den Blutstrom in die Aorta vorgeschoben und ebenfalls zwei bis drei Minuten in der Arterie belassen.

Die gewonnenen Daten wurden hardwareseitig mit dem Power Lab Acquisition System® (ADInstruments) verarbeitet, verstärkt und in digitale Signale umgewandelt. Die softwareseitige Verarbeitung der Daten erfolgte durch das Programm Chart®.

### 2.3.5.3 Erhobene Parameter

Die Katheterisierung der Vena jugularis dextra lieferte eine Vielzahl Parameter zur Bestimmung der kardiopulmonalen Funktionalität. Über den Katheter wird der Druck im rechten Ventrikel während der systolischen Herzaktion (RVSP) gemessen. Bei intakter Mitralklappe entspricht dieser Wert im rechten Ventrikel den Drücken in der

Pulmonalarterie. Im Mausmodell wird eine direkte, invasive Bestimmung des mPAP nicht durchgeführt (Rosenkranz, Behr et al. 2011). Der RVSP erlaubt eine Aussage über die Kontraktionsfähigkeit des rechten Herzens während der gesamten Herzaktion.

Die Katheterisierung der linken Arteria carotis lieferte die systemischen Blutdrücke während der systolischen und diastolischen Herzaktion (SBPsys und SBPdia), deren Bestimmung den Einfluss des Tiermodells auf den großen Blutkreislauf aufzeigt.

Die Herzfrequenz wurde während der gesamten Untersuchung mittels Elektrokardiogramm abgeleitet.

Nach Abschluss der hämodynamischen Messung wurde die Narkose auf 5% Isofluran eingestellt und die Maus schmerzfrei durch Ausbluten getötet.

## **2.3.6 Proben**

### **2.3.6.1 Blutprobe**

Die Blutentnahme von ungefähr 1 ml Blut erfolgte während des Ausblutens mithilfe einer Lithium-Heparin-Monovette aus dem rechten Ventrikel.

### **2.3.6.2 Entnahme der Lungen und des Herzens**

Es schloss sich die Entnahme des Herz-Lungen-Pakets und die Aufarbeitung des entnommenen Gewebes für weitere Untersuchungen an. Die rechte Lunge wurde für histologische und die linke Lunge für molekularbiologische Auswertungen entnommen. Die notwendige Präparation des Thorax geschah durch mediane Inzision mit Schnittführung vom Umbilicus zum Processus xiphoideus, welche beidseits nach lateral fortgeführt wurde. Die ventrale Thoraxwand wurde nach kranial gekippt und mittels horizontalem Scherenschnitt entfernt.

Die Lungen lagen nun zur Bearbeitung frei. Es wurden die Halsfaszien mit der entsprechenden Muskulatur frei präpariert, die Trachea dargestellt und lose Ligaturen um den rechten Hauptstamm-Bronchus und die Trachea gelegt. Diese wurde mit einer Schere ventral punktiert und minimal nach kranial aufgeschnitten. Anschließend wurde eine Intubation mittels 20 G Kanüle vorgenommen. Der peritracheal vorgelegte Seidenfaden wurde nun fest verknotet.

Vorbereitend wurde das kardiovaskuläre Kompartiment mit PBS blutleer gespült. Dies geschah durch eine zuvor angelegte Öffnung im rechten Ventrikel mit einem

hydrostatischen Druck von 22 cm H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Ligatur um die rechte Lunge angezogen, das Organ entfernt und in einem Eppendorf-Gefäß in -210°C kalten Stickstoff eingefroren. Die linke Lunge wurde über den trachealen Zugang 20 min mit Formalin perfundiert und anschließend zusammen mit dem Herz in toto entfernt. Herz und Lunge wurden daraufhin getrennt und die linke Lunge in ein mit Formalin (Formaldehyd) gefülltes Falcon-Tube verbracht und bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurde die Lunge in PBS-Puffer überführt und an Tag 3 in 70% Ethanol. Die Proben wurden jeweils bei 4°C aufbewahrt.

Das freigelegte Herz wurde mit einer Schere in rechten und linken Ventrikel zerlegt und diese von den Atrien separiert. Die Kammern wurden einzeln gewogen und zu vergleichbaren Indizes verrechnet:

- Rechter Ventrikel (mg) zu linkem Ventrikel inklusive Septum (mg) (RV / [LV + S])
- Rechter Ventrikel (mg) zu Körpergewicht (KG) (g) (RV/Körpergewicht)

Dies gibt Hinweis auf kardiale Veränderungen. Nach der Datenerhebung wurde das Herz in ein kleines Eppendorfgefäß verbracht, in -210°C kaltem Stickstoff zwischengelagert und für spätere molekularbiologische Untersuchungen eingefroren.

### 2.3.6.3 Bestimmung der Tibialänge

Die Länge der Tibia gibt Aufschluss über den Wachstums- und den Ernährungszustand der Mäuse. Dies war besonders im hypoxischen Versuchsaufbau von Interesse. Den Tieren wurde die linke Tibia entnommen. Diese wurde proximal der Articulatio genu abgesetzt. Alle Strukturen distal der Articulatio talocruralis sowie um die Tibia wurden entfernt. Die Messung erfolgte mit einer digitalen Schieblehre.

## 2.3.7 Histologie

### 2.3.7.1 Analyse der Muskularisierung und Wandstärke der Lungengefäße

Die linke Lunge und das Herz wurden zur histologischen Färbung durch Entwässerung mit einem Vollautomat vorbereitet. Anschließend erfolgten die Einbettung mit einer Paraffinausgussstation und die Aushärtung des Paraffinblocks auf einer Kühlfläche.

Überschüssiges Paraffin wurde bis zum Erreichen des Gewebes mittels Mikrotom in 20 µm – Schritten abgetragen und anschließend in Präparate mit 3 µm Schichthöhe

geschnitten. Diese wurden mit zwei Pinseln in ein Wasserbad verbracht und auf einen Objektträger überführt, welcher zum Trocknen auf einer Wärmebank lagerte.

Das Lungengewebe wurde in zwei Teilschritten gefärbt. Begonnen wurde mit einem Marker gegen alpha-actin, welches in glatten Muskelzellen exprimiert wird (Tabelle 12).

Tabelle 12: Histologische Färbung Lungengewebe auf alpha-Actin;

Abkürzungen: BSA - Bovine serum albumin, PBS – Natriumchlorid

Nr.	Dauer (min)	Arbeitsschritt / Reagenz:
1	60	bei 58°C lagern
2	10	Waschen mit Xylol
3	10	Waschen mit Xylol
4	10	Waschen mit Xylol
5	5	Waschen mit Ethanol absolut 99,6%
6	5	Waschen mit Ethanol absolut 99,6%
7	5	Waschen mit Ethanol 96%
8	5	Waschen mit Ethanol 70%
9	15	Waschen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Methanol Gemisch 3%
10	2 x 5	Waschen mit destilliertem Wasser
11	2 x 5	Waschen mit PBS
12	15	Mit Trypsin (37°C ) benetzen
13	3 x 5	Waschen mit PBS
14	20	Waschen mit 10% BSA
15	3 x 5	Waschen mit PBS
16	30	Mit Rodent Block M benetzen
17	3 x 5	Waschen mit PBS
18	30	Mit Primäntikörper (Alpha Actin ) benetzen
19	4 x 5	Waschen mit PBS
20	20	Mit MM HRP Polymer benetzen
21	3x5	Waschen mit PBS
22	3 bis 4	Mit Vector Vip.Substrat Kit benetzen
23	5	Waschen mit Wasser

Es schloss sich eine Färbung auf Von-Willebrand-Faktor an, welcher von Epithelzellen synthetisiert wird (Tabelle 13).

Tabelle 13: Histologische Färbung Lungengewebe auf von-Willebrand-Faktor

Abkürzungen: BSA - Bovine serum albumin, PBS – Natriumchlorid

Nr.	Dauer (min)	Arbeitsschritt / Reagenz:
1	2x5	Waschen mit PBS
2	20	Waschen mit 10% BSA
3	3 x 5	Waschen mit PBS
4	20	Serumblock I
5	30	Benetzen mit Primäantikörper (37°C ) (von-Willebrand-Faktor ist aus Kaninchen )
6	4 x 5	Waschen mit PBS
7	30	Benetzen mit Sekundäantikörper
8	4 x 5	Waschen mit PBS
9	20-40 s	Benetzen mit DAB Substrat Kit
10	5	Waschen mit Wasser
11	3	Counterstoin mit Methylgrün
12	1	Waschen mit destilliertes Wasser
13	2	Waschen mit Ethanol 96%
14	2	Waschen mit Ethanol 96%
15	5	Waschen mit Isopropylalkohol
16	5	Waschen mit Isopropylalkohol
17	5	Waschen mit Xylol
18	5	Waschen mit Xylol
19	5	Waschen mit Xylol
20		Eindecken mit Pertex oder Corbit Balsam

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte durch Ermittlung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße. Die Firma Leica entwickelte eine speziell für diese Aufgabe zugeschnittene Erweiterung der histologischen Computersoftware, welche den Prozentsatz der Muskularisierung sowie den Gefäßdurchmesser berechnete. Die erhobenen Messdaten überführte die Applikation automatisch in eine Excel-Tabelle. Das mikroskopische Präparat wurde im Mikroskop mäanderförmig durchsucht und für die Auswertung relevante Gefäße markiert. Verunreinigungen und Artefakte wurden gekennzeichnet und per Software herausgerechnet. In 400-facher Vergrößerung wurden

pro Lungenschnitt 85 kleine Gefäße (Gefäßdurchmesser 20-70 µm), 10 mittel große Gefäße (Gefäßdurchmesser 71-150 µm) sowie 5 große Gefäße (Gefäßdurchmesser > 150 µm) ausgezählt. Die Software nahm eine Klassifizierung in voll, partiell oder nicht muskularisiert vor.

Die Auswertungskriterien des Muskularisierungsgrades waren definiert durch:

- nicht muskularisiert:  $\leq 5\%$  Media-Gefäßbereich mit  $\alpha$ -actin-Antikörpern (glatte Muskelzellen) gefärbt
- partiell muskularisiert:  $> 5\%$  und  $\leq 75\%$  Media-Gefäßbereich mit  $\alpha$ -actin-Antikörpern (glatte Muskelzellen) gefärbt
- voll muskularisiert:  $> 75\%$  Media-Gefäßbereich mit  $\alpha$ -actin-Antikörpern (glatte Muskelzellen) gefärbt

Die Verblindung und Randomisierung geschah durch Abkleben der Objektträger-Beschriftung. Nach Abschluss der Auszählung wurde die Beschriftung entfernt, um dem Schnitt einen eindeutigen Namen zuzuweisen.

### 2.3.7.2 Analyse des rechtskardialen Fibrosegrades

Das Herzgewebe wurde mit Siriusred, gelöst in Pikrinsäure, gefärbt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Histologische Färbung Herzgewebe mit Siriusred

Nr.	Dauer (min)	Reagenz / Arbeitsschritt:
1	60	Brutschrank 58°C
2	10	Waschen mit Xylol
3	10	Waschen mit Xylol
4	10	Waschen mit Xylol
5	5	Waschen mit Ethanol 99,6%
6	5	Waschen mit Ethanol 99,6%
7	5	Waschen mit Ethanol 96%
8	5	Waschen mit Ethanol 70%
9	kurz	Waschen mit destilliertem Wasser
10	60	Benetzen mit 0,1% Picro Sirius Red Zuvor 0,2 g Sirius Red in 200 ml Pikrinsäure (filtriert) lösen und pH-Wert auf 2,0 einstellen.
11	2	Waschen mit 1% Essigsäure
12	2	Waschen mit 1% Essigsäure
13	2	Waschen mit 1% Essigsäure
14	kurz	Waschen mit destilliertem Wasser



15	5	Waschen mit Ethanol 70%
16	5	Waschen mit Ethanol 96%
17	5	Waschen mit Ethanol 99,6%
18	5	Waschen mit Xylol
19	1	Waschen mit Xylol
20		Eindecken mit Pertex

Die Auswertung des Herzgewebes geschah nach Färbung der Schnitte mit Picrosirius-Rot. Die Messung des gefärbten Kollagenanteils wurde durch die Computersoftware Leica Q Win V3 durchgeführt, welche die Daten während der histologischen Untersuchung direkt vom Mikroskop erfasste. Pro Herz wurde ein Schnitt verwendet, in welchem nach mäanderförmigem Durchsuchen 50 unterschiedliche Bildschirmausschnitte eingestellt wurden. In diesen Ausschnitten wurde per Mausklick das Kollagen ausgewählt, welches der Computer erfasste und in einer Excel-Tabelle ausgab. Anhand dieser Daten wurden die Durchschnittswerte kalkuliert.

## 2.4 Statistik

Alle Erhebungen sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben. Der Umfang der Versuchsgruppengröße entspricht den im Studiendesign angegebenen Werten. Die Berechnung der Daten erfolgte mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc. Verwendet wurde GraphPad Prism 6.0. Das Signifikanzniveau ist mit  $p < 0,05$  definiert. Eine Normalverteilung wurde getestet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Übersicht der Messparameter

#### 1) Hämodynamische Parameter

Systemisch arterieller Blutdruck in der Systole (SBP<sub>sys</sub>)

Systemisch arterieller Blutdruck in der Diastole (SBP<sub>dia</sub>)

Rechtsventrikulärer Blutdruck in der Systole (RVSP)

#### 2) Strukturelle Parameter

Körpergewicht

Verhältnis rechter Ventrikel zu Körpergewicht (RV / KG)

Länge der Tibia

Verhältnis rechter Ventrikel zu linker Ventrikel inklusive Septum (RV / [LV+S])

#### 3) Echokardiographische Parameter

Herzfrequenz

Herzminutenvolumen (Cardiac Output, CO)

Herzindex (Cardiac Index, CI)

Myocardial performance index (MPI) / TEI-Index

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)

#### 4) Histologische Parameter

Muskularisierungsgrad (im Hypoxiemodell)

Fibrosescore (im Stenosemodell)

## 3.2 Ergebnisse Hypoxiemodell

### 3.2.1 Invasive hämodynamische Messung

#### 3.2.1.1 Systemisch arterieller Blutdruck in der Systole

Die SBPsys stellten sich nicht signifikant verändert dar. Im Durchschnitt betragen die Werte  $83,7 \pm 2,1$  mmHg (Normoxie),  $80,7 \pm 2,6$  mmHg (Placebo) sowie  $77,2 \pm 3,5$  mmHg (PH-797804) (Abbildung 9).

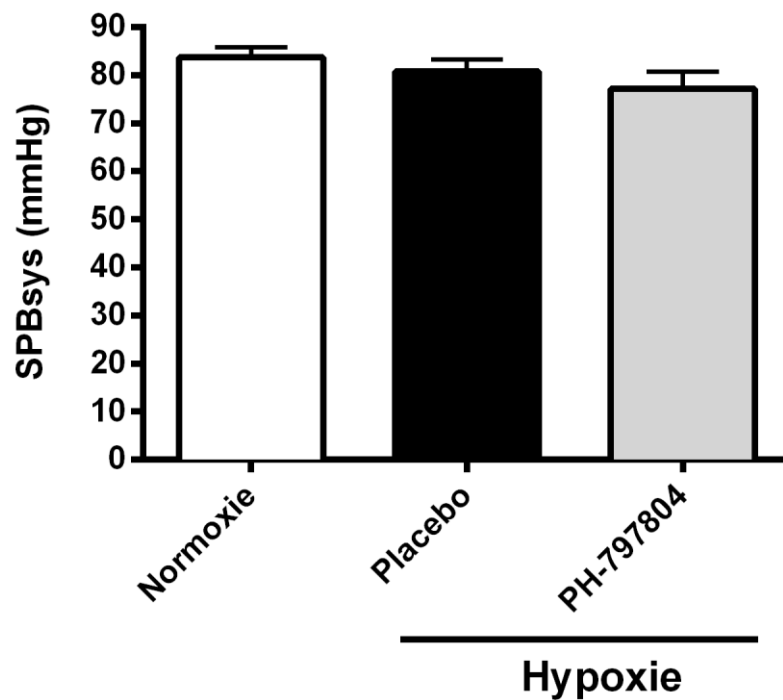


Abbildung 9: Systemischer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.2.1.2 Systemisch arterieller Blutdruck in der Diastole

Die in der Aorta erhobenen, systemischen Blutdrücke nahmen in der Phase der diastolischen Herzaktion jeweils ähnliche Werte an. Die Mittelwerte betragen  $53,8 \pm 2,7$  mmHg (Normoxie),  $56,2 \pm 2,0$  mmHg (Placebo) und  $53,3 \pm 3,3$  mmHg (PH-797804) (Abbildung 10).

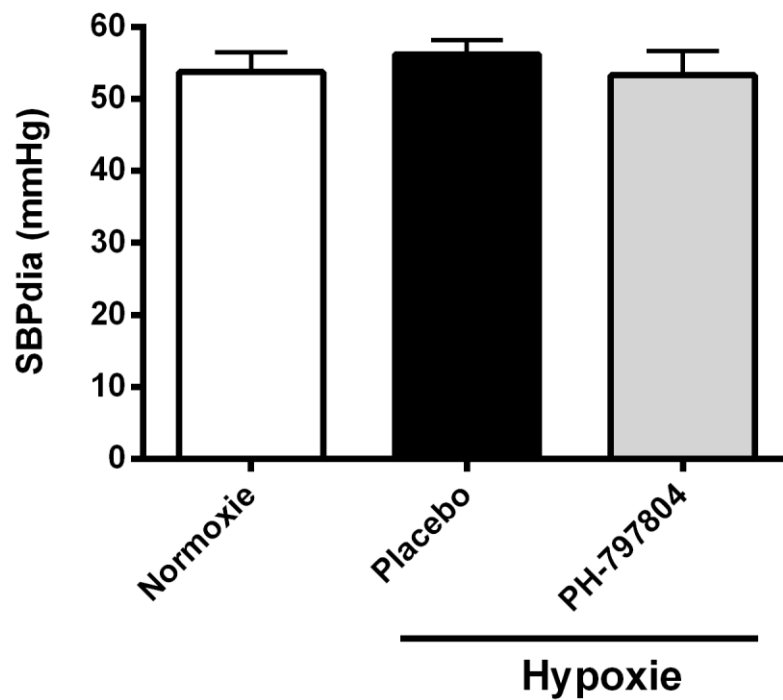


Abbildung 10: Systemischer, diastolischer Blutdruck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.2.1.3 Rechtsventrikulärer Blutdruck in der Systole

Der rechtsventrikuläre Blutdruck in der Systole unterschied sich im Vergleich der Normoxiegruppe mit der Placebogruppe ( $25,0 \pm 0,8$  mmHg vs.  $31,8 \pm 2,0$  mmHg). Der Vergleich der Hypoxietiere untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied, lediglich eine Tendenz ( $31,8 \pm 2,0$  mmHg vs.  $29,0 \pm 1,9$  mmHg) (Abbildung 11).

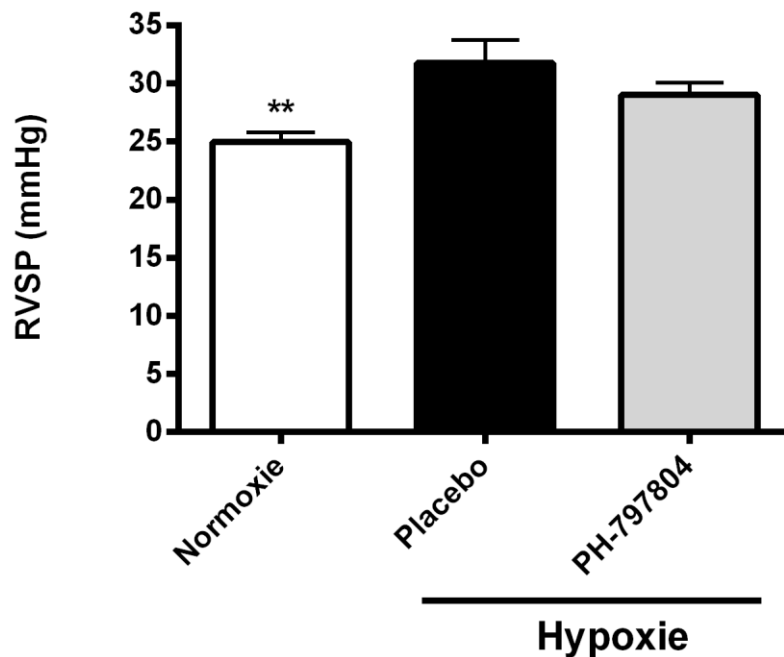


Abbildung 11: Rechtsventrikulärer, systolischer Druck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,

\*\*  $p < 0,01$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie                      Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie,  $n = 9$

Placebo                      Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose,  $n = 10$

PH-797804                    Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784,  $n = 10$

### 3.2.2 Strukturelle Parameter

Das Körpergewicht der Versuchstiere maß bei 21% Luftsauerstoff  $24,5 \pm 0,5$  g (Normoxie). In den hypoxischen Gruppen lagen die Messwerte bei  $22,0 \pm 0,4$  g in der unbehandelten Gruppe und bei  $20,9 \pm 0,3$  g in der Therapiegruppe. Ein signifikanter Unterschied bestand im Vergleich der normoxischen Gruppe mit der Placebogruppe (Abbildung 12).

Der Index aus Körpergewicht und rechtsventrikulärem Gewicht betrug bei den Normoxie-Tieren im Mittel  $0,78 \pm 0,03$  und lag in der hypoxischen Placebo-Gruppe mit  $1,22 \pm 0,06$  signifikant höher als unter normalen Umweltbedingungen. Die Therapiegruppe ( $1,08 \pm 0,07$ ) verglichen mit den Placebotieren zeigte keine Signifikanz (Abbildung 13).

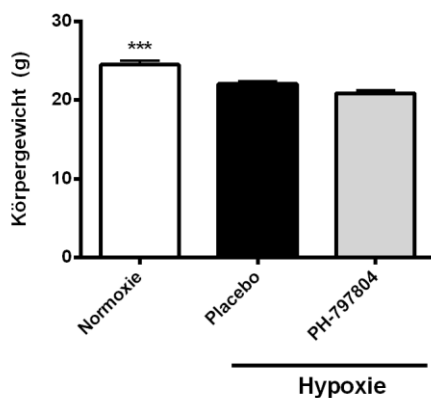


Abbildung 12: Körpergewicht der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo,

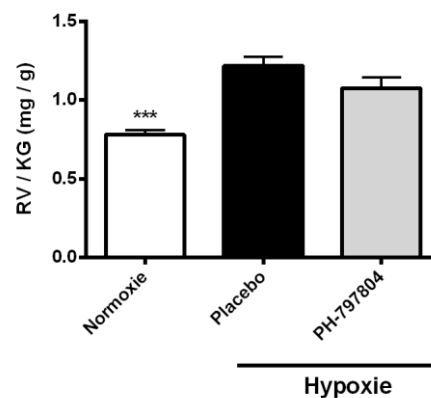


Abbildung 13: Verhältnis Gewicht des rechten Ventrikels zu Körpergewicht der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo,

Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie            Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9

Placebo            Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10

PH-797804        Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

Die Tibialängen waren unter normoxischen Bedingungen signifikant größer als bei den Tieren der hypoxischen Gruppe unter Placebothherapie ( $18,2 \pm 0,1$  mm vs.  $17,7 \pm 0,1$  mm). In der Therapiegruppe lag der Mittelwert mit  $18,0 \pm 0,2$  mm signifikant höher als in der hypoxischen Placebogruppe (Abbildung 14).

Als Parameter der kardialen Hypertrophie wurden die Massen beider Ventrikel in Verhältnis zueinander gesetzt. Die normoxische Gruppe wies mit  $0,22 \pm 0,01$  den geringsten Wert auf, welcher signifikanter niedriger war als die Ergebnisse unter hypoxischen Konditionen. Diese unterschieden sich mit  $0,33 \pm 0,01$  in der Kontrollgruppe und  $0,33 \pm 0,02$  in der Therapiegruppe nicht signifikant (Abbildung 15).

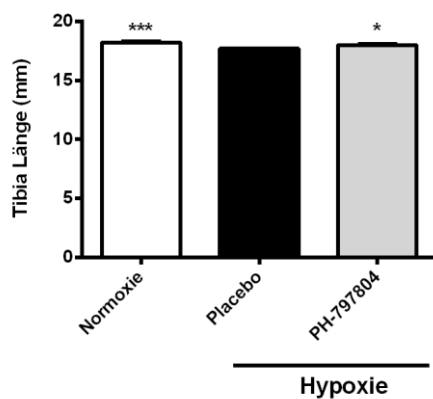


Abbildung 14: Tibialänge der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, \*\*\* p < 0,001 vs. Placebo, \* p < 0,05 vs. Placebo,

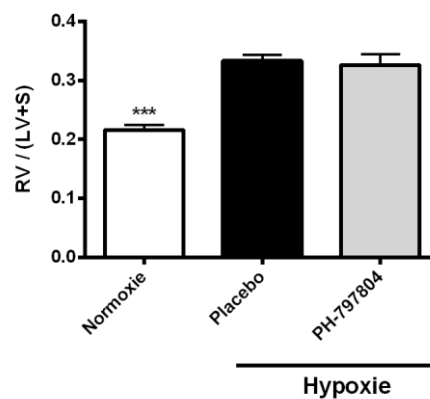


Abbildung 15: Verhältnis Gewicht rechter Ventrikel zu Gewicht linker Ventrikel + Septum der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, \*\*\* p < 0,001 vs. Placebo,

Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

- Normoxie                    Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
- Placebo                    Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
- PH-797804                Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.2.3 Echokardiographie

#### 3.2.3.1 Herzfrequenz

Keine der Gruppen im Versuchsaufbau zeigte eine signifikante Veränderung der Herzfrequenz. Im Mittel lag die Schlagzahl in der normoxischen Gruppe bei  $461 \pm 12$  /min, in der Placebogruppe bei  $458 \pm 11$  /min und in der behandelten hypoxischen Gruppe bei  $490 \pm 10$  /min (Abbildung 16).

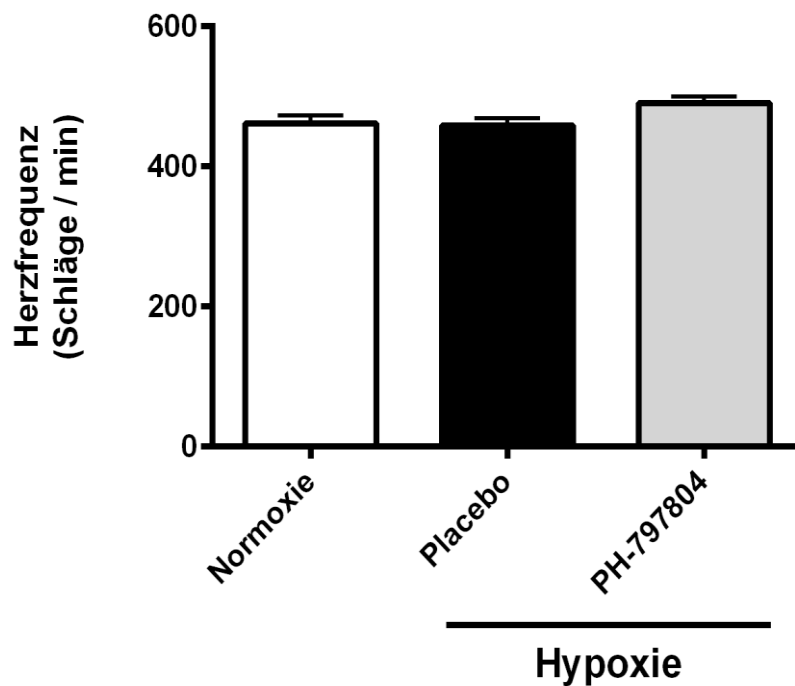


Abbildung 16: Herzfrequenz der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,  
Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10



### 3.2.3.2 Herzminutenvolumen

Unter Umgebungsbedingungen mit verringertem Sauerstoffgehalt lag der CO signifikant höher als in der hypoxischen Placebogruppe ( $19,1 \pm 0,7$  ml/min vs.  $15,1 \pm 0,4$  ml/min). In der Therapiegruppe ( $17,6 \pm 1,1$  ml/min) lag der kardiale Auswurf signifikant höher als unter Placebobehandlung (Abbildung 17).

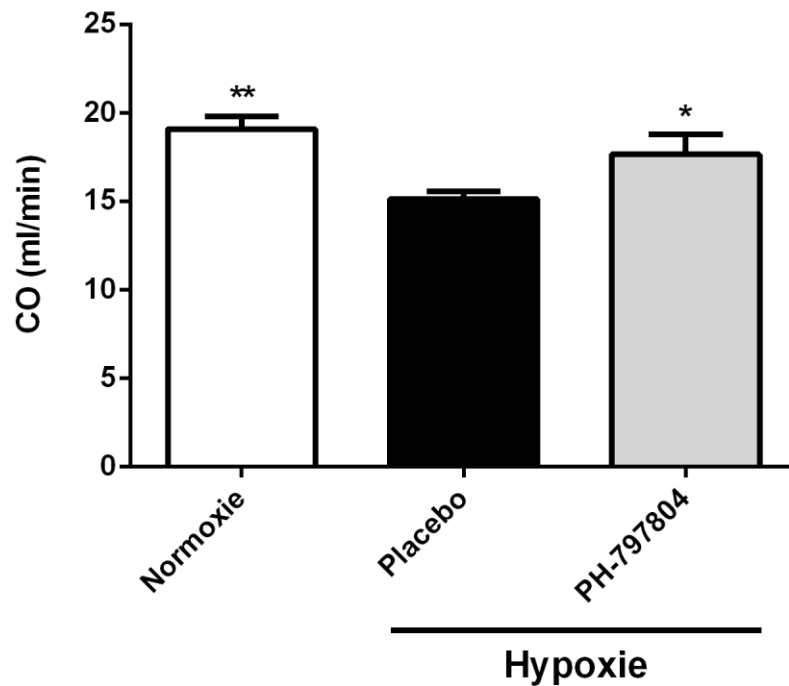


Abbildung 17: Herzminutenvolumen der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo, \*\*  $p < 0,01$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie                      Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie,  $n = 9$

Placebo                        Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose,  $n = 10$

PH-797804                    Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784,  $n = 10$

### 3.2.3.3 Herzindex

Die Ergebnisse der CI-Bestimmung sind in Abbildung 18 dargestellt. Es ergab keine signifikante Veränderung zwischen Normoxie- und Placebogruppe ( $0,78 \pm 0,03$  ml/min/kg vs.  $0,69 \pm 0,02$  ml/min/kg). Der Vergleich der Therapiegruppe ( $0,85 \pm 0,06$  ml/min/kg) mit der Placebogruppe war statistisch signifikant.

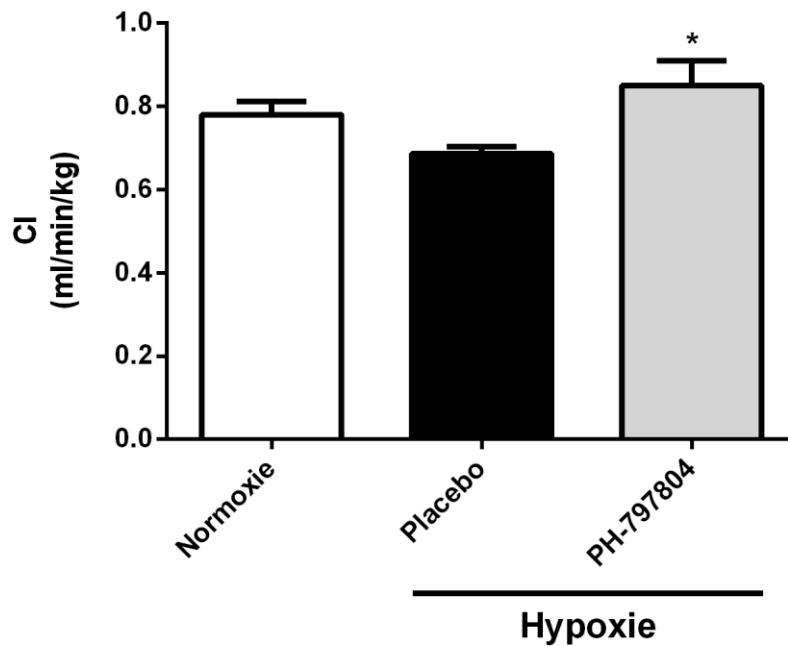


Abbildung 18: Herzindex der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-797804, n = 10

### 3.2.3.4 Myocardial performance index / Tei-Index

Unter normoxischen Umweltbedingungen war der Tei-Index signifikant geringer als in der Placebogruppe ( $0,64 \pm 0,01$  vs.  $0,87 \pm 0,02$ ). In der Therapiegruppe maß der Wert mit  $0,78 \pm 0,02$  im Vergleich zur Placebogruppe signifikant weniger (Abbildung 19).

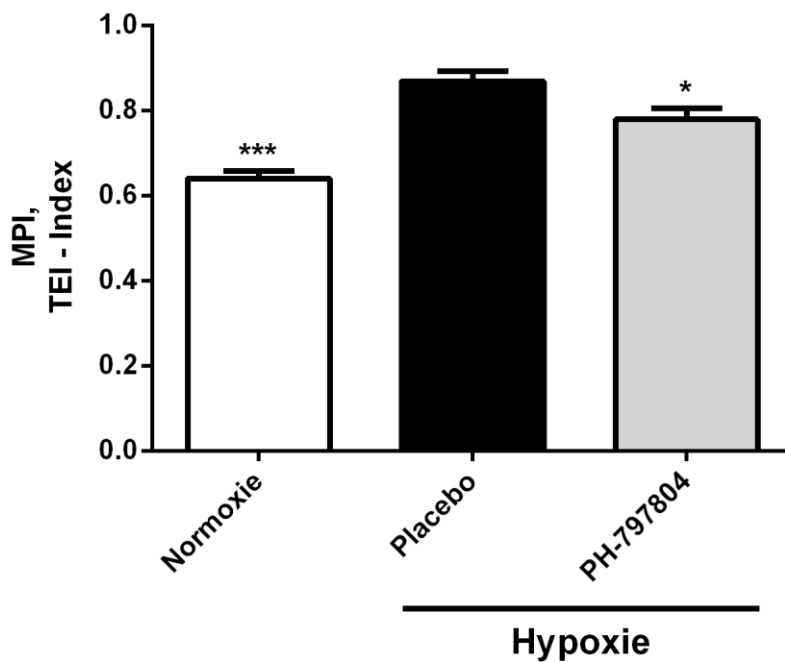


Abbildung 19: Myokardial Performance Index der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.2.3.5 Tricuspid annular plane systolic excursion

Die Auswertung der systolischen Bewegung der Trikuspidalklappe (Abbildung 20) ergab im Vergleich der Gruppen untereinander jeweils signifikant unterschiedliche Werte. Unter hypoxischen Bedingungen war die Auslenkung der Trikuspidalklappe geringer ( $1,42 \pm 0,02$  mm Normoxie vs.  $1,09 \pm 0,02$  mm Placebo). Die Therapiegruppe wies im Vergleich zur Placebogruppe einen signifikanten Unterschied auf ( $1,20 \pm 0,04$  mm vs.  $1,09 \pm 0,03$  mm).

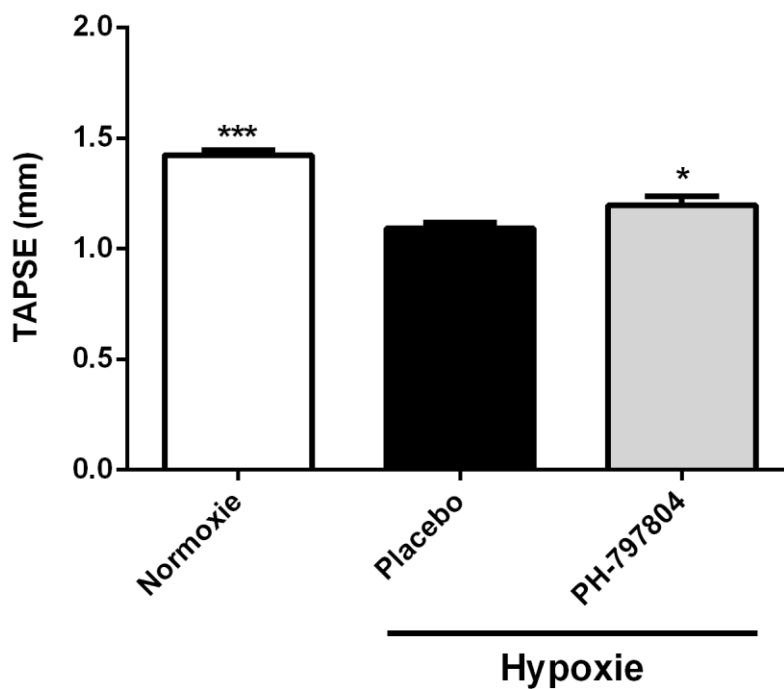


Abbildung 20: Tricuspid annular plane systolic excursion der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.2.4 Histologie

Abbildung 21 zeigt die Auswertung des Muskularisierungsgrades in voll, teilweise und nicht muskularisiert. Unter hypoxischen Bedingungen ohne Behandlung war ein signifikant größerer Anteil an voll und teilweise muskularisierten Gefäßen erkennbar. Die nicht muskularisierten Gefäße waren vermindert. Die Therapiegruppe zeigte im Vergleich zur Placebogruppe signifikant weniger voll muskularisierte Gefäße.

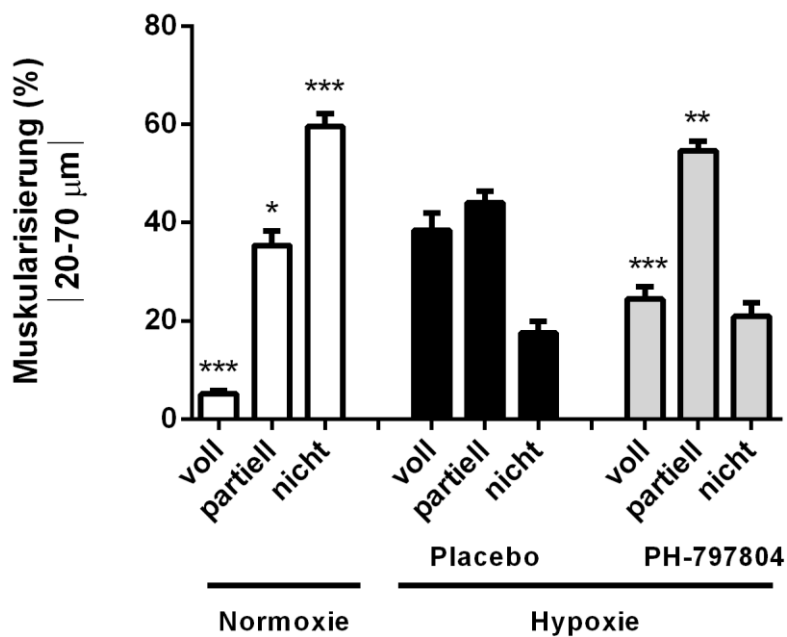


Abbildung 21: Muskularisierung der 20-70 µm großen Gefäße der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, \* p < 0,05 vs. Placebo gleicher Muskularisierungsgrad, \*\* p < 0,01 vs. Placebo gleicher Muskularisierungsgrad, \*\*\* p < 0,001 vs. Placebo gleicher Muskularisierungsgrad, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Normoxie	Gesunde Kontrolltiere unter 21% Luftsauerstoff, keine Therapie, n = 9
Placebo	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 10
PH-797804	Tiergruppe unter 10% Luftsauerstoff (Hypoxie), behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 10

### 3.3 Ergebnisse Stenosemodell

#### 3.3.1 Invasive hämodynamische Messung

##### 3.3.1.1 Systemisch arterieller Blutdruck in der Systole

Die SBPsys stellten sich in beiden PAB-Gruppen ähnlich dar ( $76,3 \pm 2,4$  mmHg Placebo und  $78,6 \pm 2,8$  mmHg PH-797804). Die Sham-Gruppe ( $90,4 \pm 1,4$  mmHg) wies einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur Placebo-Gruppe auf (Abbildung 22).

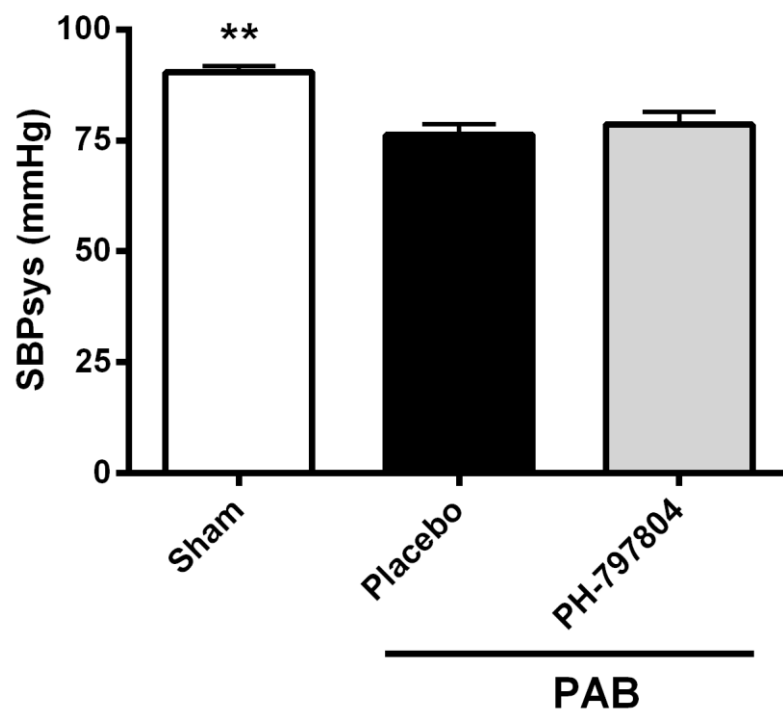


Abbildung 22: Systemischer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,

\*\*  $p < 0,01$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.1.2 Systemisch arterieller Blutdruck in der Diastole

Die SBPdia wiesen im Vergleich der Gruppen untereinander keine signifikanten Abweichungen auf ( $61,2 \pm 3,5$  mmHg Sham,  $54,8 \pm 2,2$  mmHg Placebo,  $55,1 \pm 2,2$  mmHg PH-797804) (Abbildung 23).

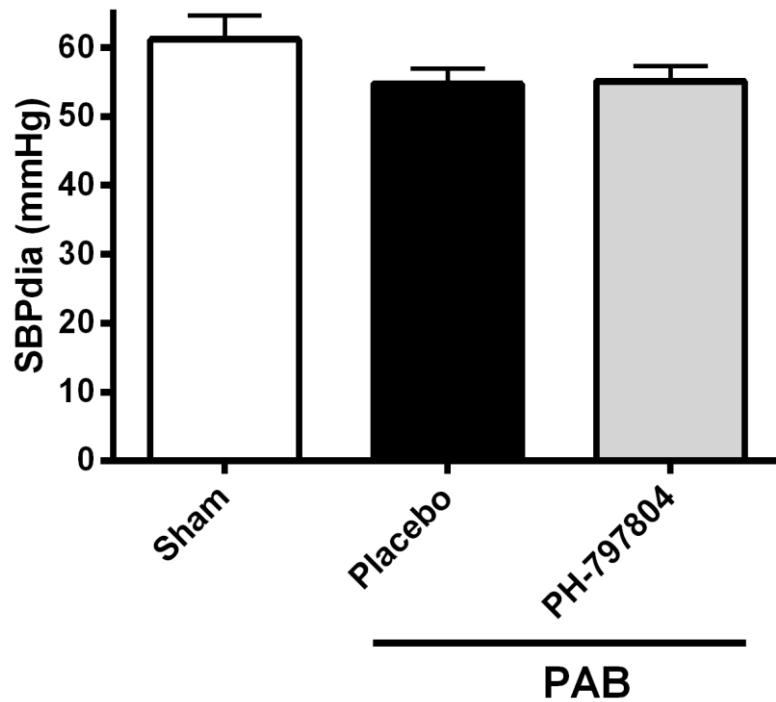


Abbildung 23: Systemischer, diastolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.1.3 Rechtsventrikulärer Blutdruck in der Systole

Die Versuchsgruppe mit geclippter Pulmonalarterie ohne Therapie nahm signifikant höhere RVSP an als die Sham-Gruppe ( $22,3 \pm 0,9$  mmHg Sham vs.  $50,0 \pm 1,8$  mmHg Placebo). Der RVSP der PH-797804-Tiere betrug  $45,0 \pm 2,9$  mmHg (Abbildung 24).

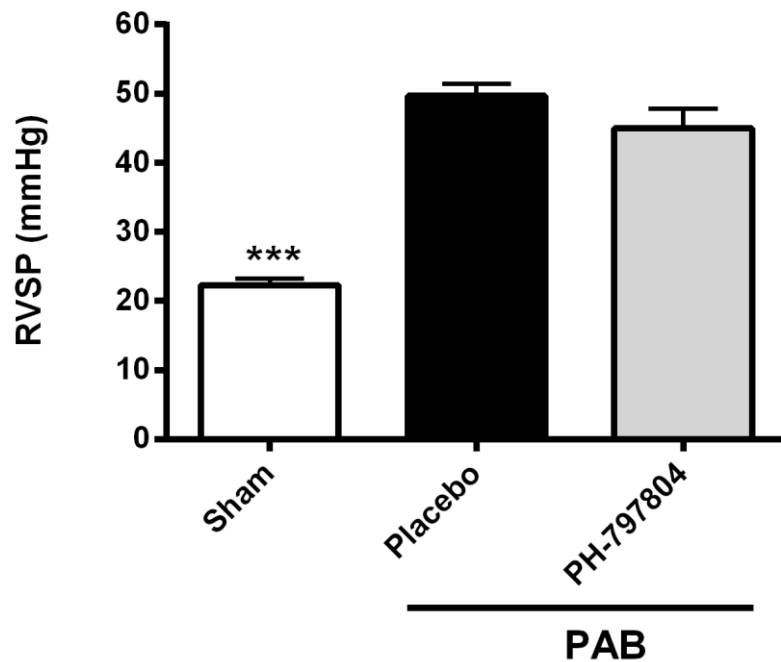


Abbildung 24: Rechtsventrikulärer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12



### 3.3.2 Strukturelle Parameter

Die Sham-Gruppe wog im Vergleich zur Placebogruppe signifikant mehr ( $26,0 \pm 0,4$  g Sham). Die Mäuse des Stenosemodells unterschieden sich im Körpergewicht nicht signifikant untereinander ( $22,5 \pm 0,3$  g Placebo vs.  $23,1 \pm 0,5$  g PH-797804) (Abbildung 25).

Der Index aus rechtsventrikulärem Gewicht und Körpergewicht lag bei den Tieren in der gesunden Vergleichsgruppe signifikant niedriger ( $0,85 \pm 0,06$  mg/g) als bei den operierten Tieren in der Placebogruppe ( $1,43 \pm 0,06$  mg/g). Der Parameter RV/KG der Therapiegruppe maß  $1,29 \pm 0,06$  mg/g (Abbildung 26).

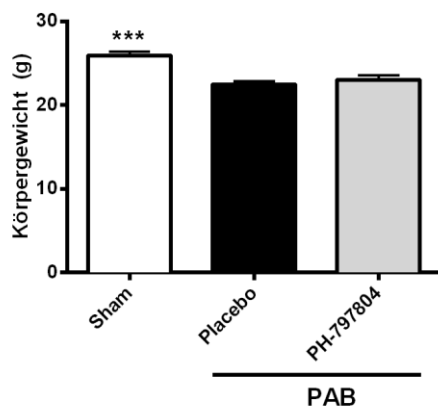


Abbildung 25: Körpergewicht der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo,

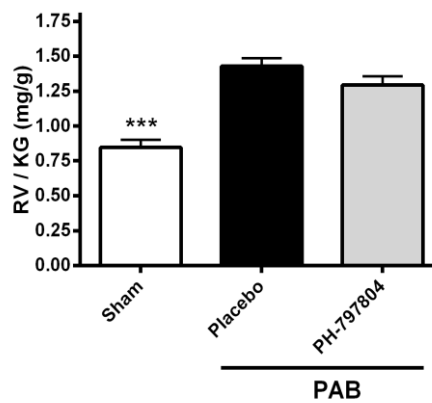


Abbildung 26: Verhältnis rechtsventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo,

Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

Die Bestimmung des Quotienten aus Gewicht des rechten und des linken Ventrikels als Parameter der kardialen Hypertrophie ergab mit  $0,25 \pm 0,02$  mg/g (Sham) signifikant geringere Werte als bei den Placebo-Tieren ( $0,46 \pm 0,02$  mg/g Placebo). Die Therapiegruppe ( $0,43 \pm 0,03$  mg/g) zeigte im Vergleich zum Placebo keine signifikante Änderung (Abbildung 27).

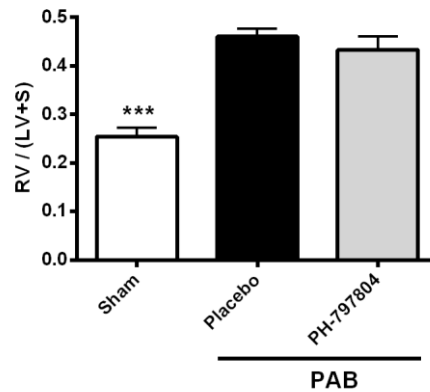


Abbildung 27: Verhältnis Gewicht rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel + Septum der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.3 Echokardiographie

#### 3.3.3.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz lag bei allen Gruppen in einem ähnlichen Bereich. In der Gruppe Sham betrug sie  $421 \pm 12$  /min, in der Gruppe Placebo  $425 \pm 13$  /min und in der Therapiegruppe  $458 \pm 13$  /min. Es zeigte sich keine Signifikanz (Abbildung 28).

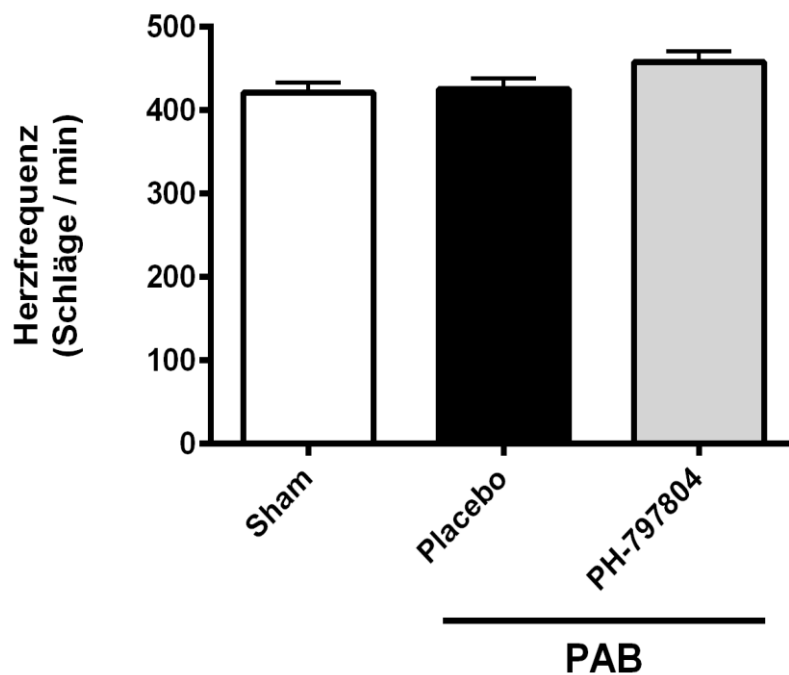


Abbildung 28: Herzfrequenz der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,  
Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.3.2 Herzminutenvolumen

Die Sham-Tiere wiesen einen höheren kardialen Auswurf auf als die Mäuse mit Pulmonalarterienclip ( $21,0 \pm 1,4$  ml/min Sham vs.  $7,8 \pm 0,7$  ml/min Placebo). Unter den geclippten Tieren wies die Gruppe mit medikamentöser Therapie ( $15,0 \pm 0,7$  ml/min PH-797804) einen signifikant höheren CO auf (Abbildung 29).

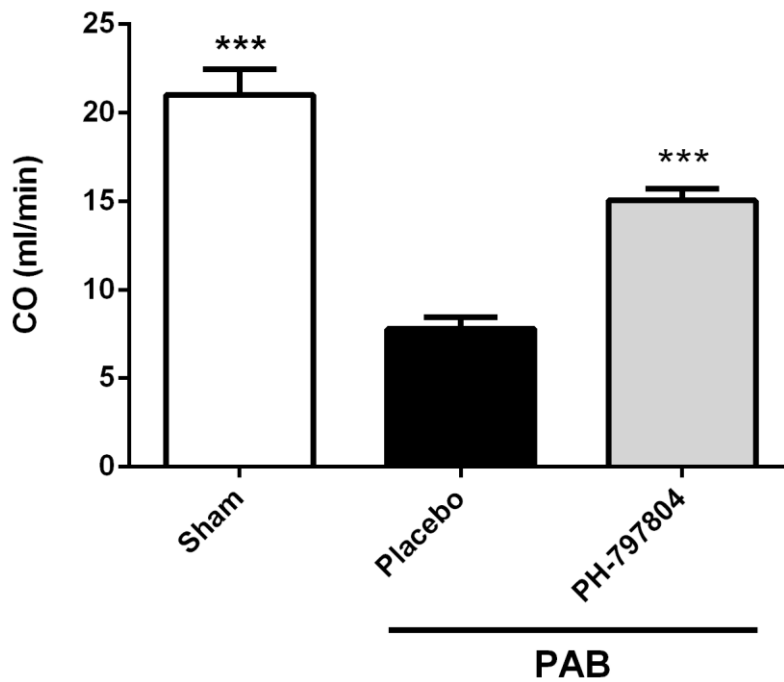


Abbildung 29: Herzminutenvolumen der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.3.3 Herzindex

Der CI der Placebogruppe ( $0,35 \pm 0,03$  ml/min/kg) zeigte im Vergleich zu den Shamtieren ( $0,81 \pm 0,51$  ml/min/kg) signifikant verringerte Werte. Im Vergleich zur Placebogruppe lag der Wert mit  $0,66 \pm 0,04$  ml/min/kg bei den therapierten Tieren signifikant höher (Abbildung 30).

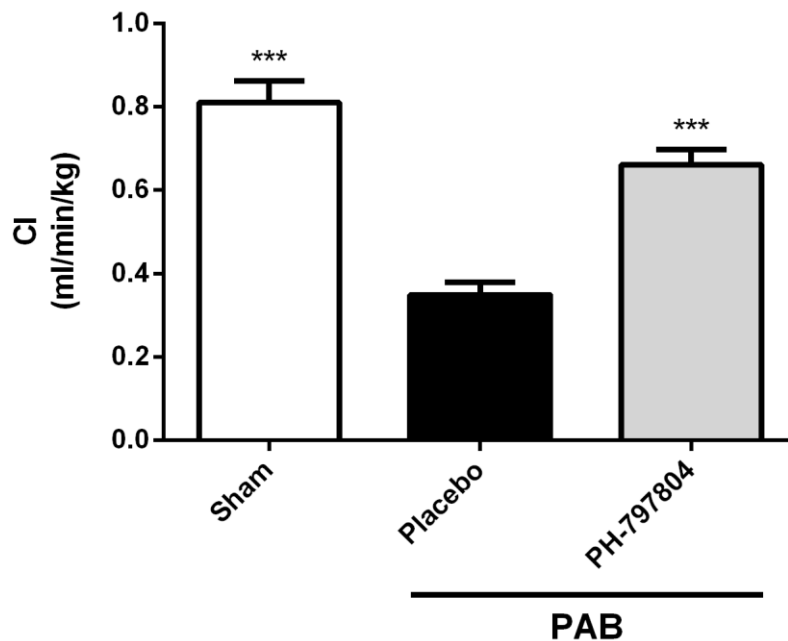


Abbildung 30: Herzindex der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21.

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.3.4 Myocardial performance index / Tei-Index

Der MPI wies im Stenosemodell statistisch signifikant höhere Werte auf ( $0,72 \pm 0,03$  Sham vs.  $1,35 \pm 0,05$  Placebo). Die behandelten Tiere mit stenosierten Pulmonalarterien ( $0,96 \pm 0,03$  PH-797804) erreichten im Vergleich zur geclippten Placebogruppe signifikant niedrigere Werte (Abbildung 31).

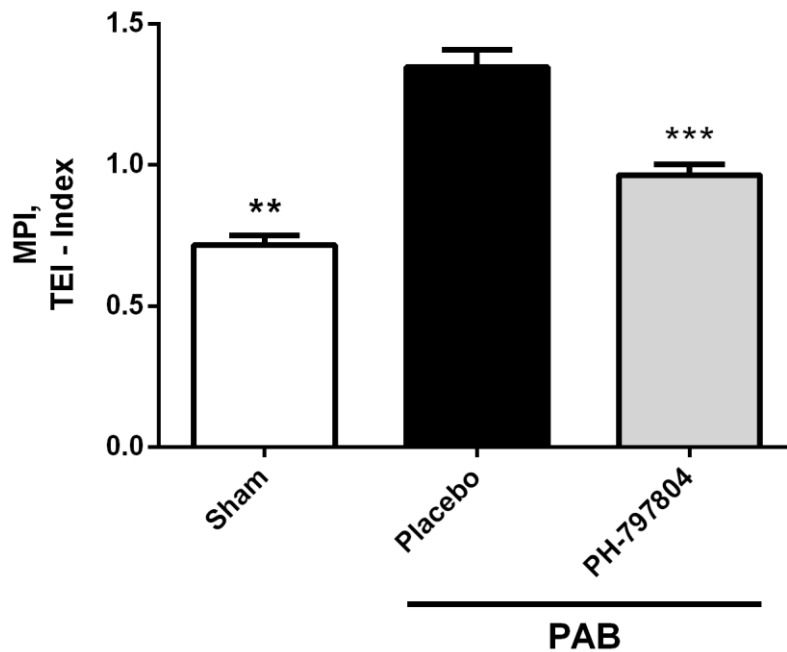


Abbildung 31: Myokardial Performance Index der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,

\*\*  $p < 0,01$  vs. Placebo, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.3.5 Tricuspid annular plane systolic excursion

Die Beweglichkeit der Trikuspidalklappe in der Systole (Abbildung 32) war bei den Sham-Tieren am größten ( $1,44 \pm 0,02$  mm Sham). Im Stenosemodell wiesen die unbehandelten Tiere die geringste Klappenauslenkung auf ( $0,82 \pm 0,03$  mm). Unter oraler Therapie lag der Wert mit  $1,16 \pm 0,03$  mm signifikant höher als in der Placebogruppe.

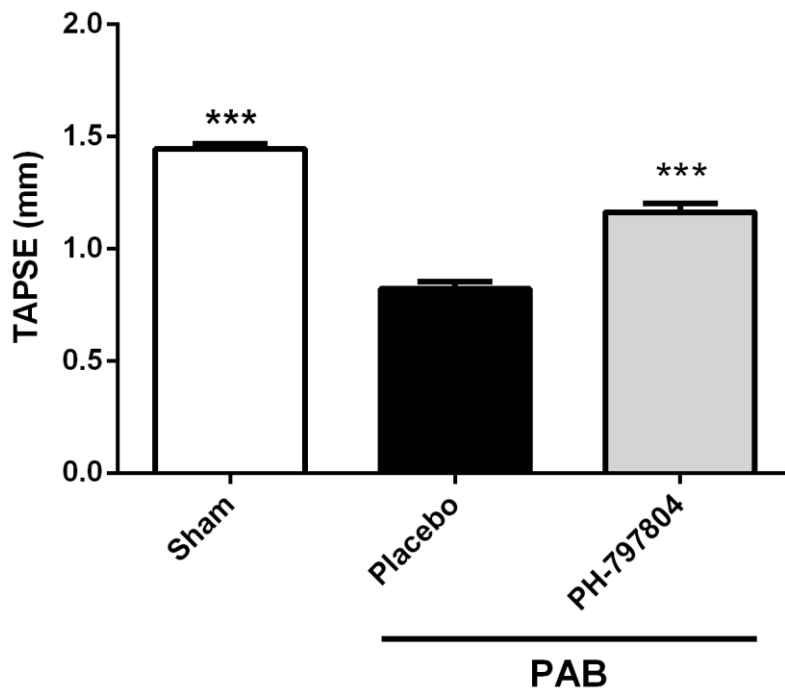


Abbildung 32: Tricuspid annular plane systolic excursion der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo, Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulmonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12

### 3.3.4 Histologie

Die Bestimmung des Fibrosegrades ergab einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe ( $0,94 \pm 0,10$  %) mit der Gruppe der PAB Placebo-Mäuse ( $6,24 \pm 0,63$  %). Die Stenosegruppen wiesen eine statistische Signifikanz zwischen behandelten ( $3,43 \pm 0,57$  %) und unbehandelten Tieren auf (Abbildung 33). Abbildung 34 zeigt den Kollagengehalt nach Picrolimus-Färbung. In der Therapiegruppe stellte sich ein geringerer Anteil an Kollagenfasern dar als in der Placebogruppe.

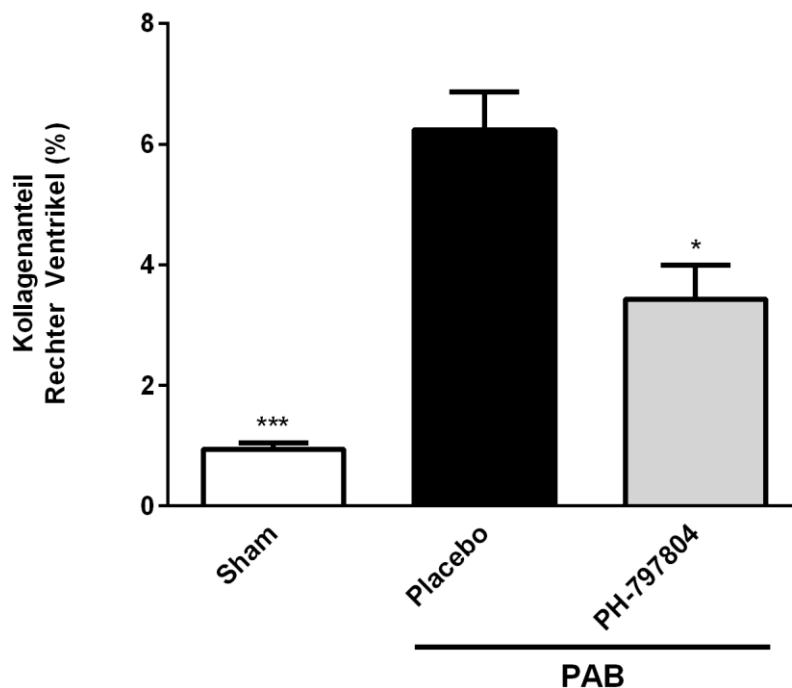


Abbildung 33: Kollagengehalt im rechten Ventrikel der Versuchstiere im Stenosemodell Tag 21,

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Placebo Statistik mittels Standard-Varianz-Analyse (ANOVA) und Student-Newman-Keuls-Test post hoc,

Sham	Kontrolltiere, operiert ohne Anlage Pulmonalarterienclip, keine Therapie, n = 8
Placebo	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG Methylcellulose, n = 14
PH-797804	Tiergruppe operiert mit Pulomonalarterienclip, behandelt mit 5 mg/kg KG PH-79784, n = 12



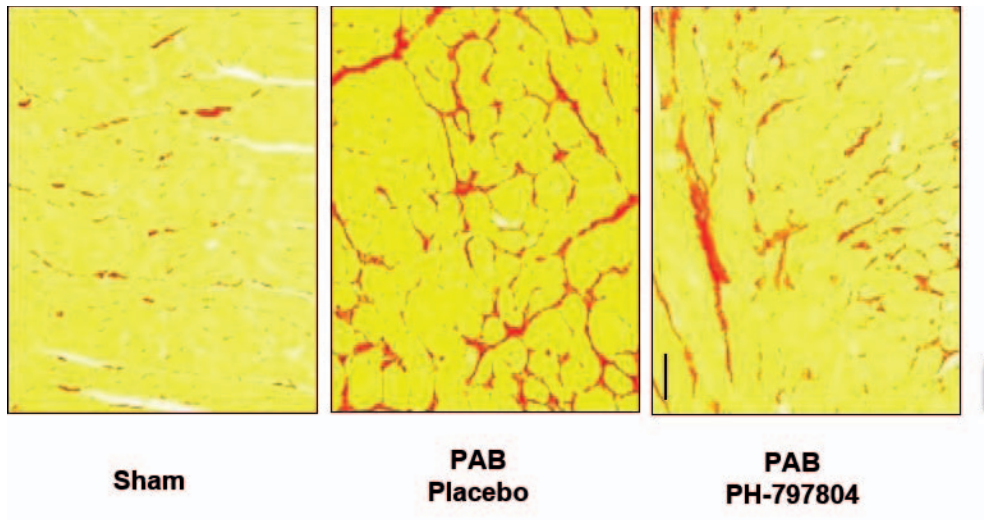


Abbildung 34: Kollagengehalt im rechten Ventrikel der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21

## **4 Diskussion**

### **4.1 Tiermodelle**

Die PAH ist ein komplexes Krankheitsbild multifaktorieller Genese. Es ist eine grundlegende Bestrebung der Wissenschaft, pathologische Prozesse aufzudecken und Krankheiten durch zielgerichtete Therapien zu kurieren. Dies erfordert im Rahmen der Grundlagenforschung und der Evaluation neuer Medikamente häufig den Einsatz eines Tiermodells. Ethisch steht außer Frage, dass Tierversuche nur in Ermangelung geeigneter Alternativen zum Einsatz kommen. Die P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibition wurde im Rahmen dieser Arbeit in zwei Modellen bezüglich ihrer Wirkungen auf das Herz- und Lungengefäßsystem untersucht, da diese unabdingbar für die Darstellung humaner Pathologien waren. Eine Zellkultur als Vorstufe des Tiermodelles spiegelt die charakteristischen Merkmale der Erkrankung nicht in ausreichendem Maße wieder.

Obwohl sich pathophysiologische Prozesse im Tiermodell darstellen lassen, sind diese dennoch nur bedingt geeignet, eine humane PAH zu simulieren. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an PAH-Modellen. Neben den klassischen Hypoxie- und MCT-Modellen werden spezifisch genmanipulierte oder chemisch getriggerte Ansätze verwendet. Die Auswahl des Versuchsaufbaus und die jeweilige Induktion der Krankheit setzen immer eine Aufwand-Nutzen-Analyse voraus. Mäuse dienen häufig aufgrund der geringen Haltungskosten, des niedrigen Platzbedarfes, des handlichen Umgangs und der verminderten Aufwendung an Therapiesubstanz als Versuchstiere. Durch häufige und große Würfe gestaltet sich die Versuchstierzucht praktikabel. Zudem zeigt das vollständig entschlüsselte Genom der Mäuse große Ähnlichkeit mit humanen Sequenzen. Eine gezielte, genetische Manipulation, beispielsweise durch Knock-In oder Knock-Out, lässt präzise Rückschlüsse auf einzelne Genabschnitte und Funktionen zu.

#### **4.1.1 Hypoxiemodell**

Grundlegend stand die Frage, welches Modell und welche Spezies Tier geeignet war, den in der Fragestellung dargelegten Sachverhalt zu erforschen. Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, stellen Mäuse eine geeignete Tierart dar.

Das Hypoxiemodell gilt, neben dem MCT-Modell, als eines der zwei Standardmodelle in der PAH-Forschung und fand in der Erarbeitung grundlegender Erkenntnisse häufig Anwendung. Wir entschieden uns bewusst gegen den Ansatz mit MCT, welches durch

einen chemischen Trigger zu direkten toxischen Schäden im Lungengefäßsystem führt. MCT löst eine sehr starke Form der PAH mit hohem mPAP aus. Dies führt konsekutiv zu einer schwerwiegenden Rechtsherzhypertrophie mit Rechtsherzversagen. Ein Nachteil dieses Modelles ist die starke Nieren- und Lebertoxizität des MCT. Da es hepatisch metabolisiert wird, fällt der Effekt im Modell in Abhängigkeit der Enzymaktivität individuell aus und variiert in der Wirkung auf den Organismus. Ebenso unterscheidet sich der Effekt zwischen verschiedenen Tierarten. Die Metabolisierung über Cytochrom P-450 erzeugt beispielsweise bei Ratten und anderen Säugetieren schwere Verlaufsformen, während Mäuse aufgrund der geringen Verstoffwechslung des MCT nicht erkranken (van Suylen, R J et al. 1998; Stenmark et al. 2009). Somit schied das MCT-Modell für einen Versuchsaufbau mit Mäusen aus.

Das Hypoxiemodell mit Mäusen ist ein weniger invasives Modell. Typische Charakteristika sind die Muskularisierung vormals nicht muskularisierter, distaler Gefäße, die SMC-Proliferation in muskularisierten Gefäßen, eine Hypertrophie der Media und Adventitia sowie ein Anstieg des inflammatorischen Geschehens (Stenmark et al. 2006; Stenmark et al. 2009). Die hypoxischen Umweltbedingungen führen zu einer Erhöhung des mPAP und steigern durch eine Afterload-Erhöhung die Belastung für das rechte Herz (van Suylen, R J et al. 1998). Bislang konnte eine Assoziation mit vielen, auch bei humaner PAH identifizierten Faktoren wie zum Beispiel ET-1, NO, Serotonin, VEGF, und PDGF nachgewiesen werden (Weissmann et al. 2006a). Das Hypoxiemodell erbrachte den Wirksamkeitsnachweis einiger bis heute eingesetzter Medikamente. Eines dieser Medikamente ist Bosentan (Choudhary et al. 2011).

Die Ausprägung der PAH hängt von der Tierart ab. Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Schafe entwickeln eine milde Form der PAH (Voelkel et al. 2013). An große Höhe gewohnte Tiere wie Lama oder Yak dagegen entwickeln keine signifikante Hypertonie (Ryan et al. 2013). Eine stärkere Ausprägung der Merkmale wird bei Kälbern und einigen Rattenstämmen beobachtet (Stenmark et al. 2009). Als ursächlich gilt unter anderem ein differierendes Expressionsmuster einiger mit Hypoxie assoziierter Gene (Bull et al. 2007). Die moderate Ausprägung der Hypertonie im Mausmodell führt am Herzen zu einer Ventrikelhypertrophie und erreicht nicht das Stadium des dilatativen Herzversagens. Die humane PAH hingegen kann über das Stadium des dilatativen Herzversagens letal verlaufen (Marsboom und Janssens 2004; Gomez-Arroyo et al. 2012).

Weitere Limitierungen des Modells sind das Fehlen plexiformer Läsionen, ein geringes Remodeling der Intima und die fehlende Persistenz der Erkrankung nach Rückkehr in normoxische Bedingungen (Meyrick und Reid 1980; Stenmark et al. 2009). Somit ist nur eine Annäherung an die Pathologie humaner PAH möglich. Eine weitere Einschränkung ist die Verwendung als PAH-Modell (WHO-Kategorie 1), da Hypoxie als Ursache der WHO-Kategorie 3 definiert wurde (siehe Kapitel 2.1.2). Dennoch wird das Modell aufgrund der Ähnlichkeit der PH-Formen als PAH-Modell verwendet (Stenmark et al. 2009; Simonneau et al. 2013).

Die Durchführung des Hypoxieexperiments gestaltete sich in unseren Räumen problemlos, da die Arbeitsgruppe häufig Hypoxiemodelle anwendet und durch langjährige Erfahrung einen Regelbetrieb gewährleisten konnte. Der Störmelder der Hypoxieanlage löste während des Versuchs nicht aus und es wurden keine besondere Vorkommnisse beobachtet.

#### **4.1.2 Stenosemodell der Arteria pulmonalis**

Das Stenosemodell stellt, neben dem aorto-kavalen Shunt, eines von zwei etablierten Modellen zur Erzeugung einer selektiven Rechtsherzhypertrophie dar (Ryan et al. 2013). Bei PAH limitiert die Kompensationsfähigkeit des rechten Ventrikels maßgeblich die Lebenserwartung (Montani et al. 2013). Die Anlage eines pulmonalarteriellen Clips vermindert signifikant die Auswurfleistung des rechten Herzens und führt über den Zeitraum von drei bis vier Wochen infolge des erhöhten rechtsventrikulären Afterloads zu einer ventrikulären Hypertrophie (Ryan et al. 2013). In Abgrenzung zum Hypoxiemodell entfällt im PAB-Modell der Einfluss eines verminderten O<sub>2</sub>-Wertes auf den Organismus. Dies lässt eine gesonderte Analyse der Effekte auf das Herz zu. Bei vielen klassischen PAH-Modellen ist keine Differenzierung zwischen pulmonalen und kardialen Auswirkungen der Therapie möglich.

Die Aussagekraft eines operativen Modells wird entscheidend durch die Erfahrung des Operateurs und des Teams bestimmt. In unserer Arbeitsgruppe wird das PAB-Modell zuverlässig reproduziert, da es seit einigen Jahren etabliert ist und die Operateure über viel Erfahrung verfügen. Die Operationsdauer betrug ungefähr 20 Minuten pro Tier, woraus eine minimale Anästhesiezeit und kurze operative Belastungen resultierten. In den früheren Beschreibungen des Modells wurde statt eines Titanclips ein Band um die Pulmonalarterie gelegt. Die Restgröße des pulmonalarteriellen Lumens wurde mittels

26G-Kanüle definiert, welche gemeinsam mit der Pulmonalarterie von einem Faden umschlungen wurde. Die Kanüle wurde nach Festigen des Knotens entfernt, sodass die Ligatur ausschließlich um die Arterie lag (Tarnavski et al. 2004). Die Verwendung eines Titanclips erlaubte uns ein schonendes Anlegen der Stenose. Durch die Befestigung des Clips mit einem dafür vorgesehenen Gerät wurde die exakte Größe der Stenose definiert. Das Anbringen eines Fadens ließ in der Vergangenheit technikbedingt mehr Spielraum für uneinheitliche Stenosegrade. Ein weiterer Vorteil zeigte sich in der reduzierten Letalität der Mäuse bei Verwendung eines Titanclips statt einer Bandligatur (Tarnavski et al. 2004).

Ein Bestandteil des Versuchsaufbaus war die Bildung der Shamgruppen. Unerwünschte Effekte auf die Aussagekraft des Studiendesigns konnten durch eine Shamgruppe verringert werden. Beispielsweise zeigten Zhao et al. bereits durch eine Shamoperation eine signifikante Veränderung der Genexpression (Zhao et al. 2004; Urashima et al. 2008).

Urashima et al. veröffentlichten 2008 eine Arbeit mit detaillierten Daten über die Effekte des PAB-Modells bei Mäusen. Sie zeigten bei geringer und mittelgradiger Stenose eine stabile Rechtsherzhypertrophie und bei schwerer Stenose ein Rechtsherzversagen. Typische pathologische Veränderungen bei Rechtsherzhypertrophie, welche mittels PAB dargestellt werden können, sind eine rechtsventrikuläre Dilatation, ein Leitungsblock des rechtskardialen Nervenleitbündels, eine gesteigerte trikuspidale Regurgitation und eine Verschiebung des interventrikulären Septums nach links. Zudem nimmt die Sterblichkeit als Folge des Rechtsherzversagens zu (Urashima et al. 2008).

Eine schwere, rechtskardiale Schädigung mit Fehlfunktion lässt sich derzeit mit drei Modellen induzieren. Dies ist einerseits mittels Pulmonalclip möglich, wie in dieser Arbeit beschrieben. Darüber hinaus kommt das MCT-Modell sowie das Modell mit dem VEGF-Inhibitor SU5416 + Hypoxie (SuHx) zum Einsatz. Die zwei letztgenannten Modelle zeigen ein geringeres Überleben und eine schlechtere kardiale Funktion. Die rechtsventrikulärer Masse und der RVSP sind bei allen Modellen ähnlich hoch, allerdings zeigt das PAB-Modell erst bei sehr hohen Stenosegraden der Pulmonalarterie ein Rechtsherzversagen. Dies lässt die Hypothese einer direkten, kardiotoxischen Schädigung von MCT und SU5416 zu und resultiert in der Frage nach weiteren, eventuell druckunabhängigen, chemischen Einflussfaktoren auf den rechten Ventrikel (Bogaard et al. 2009b; Ryan et al. 2015).

Ein Nachteil des Modells liegt im abrupten Anstieg der Nachlast nach Anlage des Metallclips. Dies entspricht nicht der typischen rechtskardialen Belastung der PAH-Patienten, bei welchen der Afterload kontinuierlich über einen großen Zeitraum zunimmt (Bogaard et al. 2009a).

## **4.2 Versuchsaufbau, Echokardiographie, hämodynamische Messung und Histologie**

Der Versuchsaufbau orientierte sich an vielen, bereits durchgeführten Versuchen mit Hypoxie- und PAB-Versuchstieren. In unserer Arbeitsgruppe erfolgte der Versuchsablauf stets wie in dieser Dissertation beschrieben und bot eine gute Vergleichbarkeit der erhobenen Daten. Tierexperimentelle Versuche stellen nur eine kleine Etappe auf dem Weg zu neuen Therapiestrategien dar. Klassischerweise widersprechen sich in-vivo und in-vitro-Untersuchungen an Menschen und Tieren oft erheblich und sollten folglich stets in der Gesamtheit bewertet werden. Eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist meist nicht möglich.

Die Echokardiographie ermöglichte unter Isoflurannarkose noninvasiv eine gute Beurteilung der kardialen Anatomie und Physiologie. Sie wurde in unserer Arbeitsgruppe nach einem standardisierten Protokoll von Herrn Dr. med. Baktybek Kojonazarov durchgeführt. Durch die regelhafte Anwendung der Methodik in unseren Tierversuchen und umfangreiche Erfahrung des Untersuchers ließen die erhobenen Parameter eine zuverlässige Aussage über den Progress der Krankheit zu. Als Limitationen gelten trotz normierter Anwendung die Abhängigkeit vom jeweiligen Untersucher sowie die kreislaufrelevanten Einflüsse der Narkosegase. Isofluran wirkt vasodilatativ, muskelrelaxierend, kardial negativ inotrop und arrhythmogen. Zudem ist eine Reduktion des Herzzeitvolumens möglich. Eine Untersuchung ohne Narkotisierung hingegen stellt einen starken Stressfaktor für die Tiere dar, weswegen die Nachteile einer Betäubung als geringere Störgrößen gesehen werden (Rottman et al. 2007; Lairez et al. 2013).

Die hämodynamische Untersuchung durch selektive Katheterisierung des linken und rechten Herzens bot einen hohen diagnostischen Standard. Es erlaubte eine valide Beurteilung stattgehabter Veränderungen in unseren Tiermodellen. Analog der Echokardiographie fand diese Methode in unserer Arbeitsgruppe regelhaft Anwendung. Durch mehrjährige Praxis im Umgang mit der Methode wurden die Messwerte von erfahrenem Personal reproduzierbar nach festem Untersuchungsschema erhoben. Eine

Limitation der hämodynamischen Messung sind die Untersucherabhängigkeit sowie die vorangehend aufgeführten Nebenwirkungen der Isoflurannarkose. Die invasive Katheterisierung stellt für den Organismus einen erheblichen Stressfaktor dar. Der Organismus reagiert auf derartige Veränderungen mit einer Erhöhung des Sympathikotonus. Dies spiegelt sich in einer Steigerung des Blutdrucks, der Herzfrequenz und einer Zunahme der Atemaktivität wieder. Zudem nehmen die Glukoseproduktion und die Aktivität der Stresshormone Cortisol, Adrenalin und Nordadrenalin unter Stress zu. Die Anästhesie mit Isofluran mildert die Auswirkungen der Untersuchung.

Die Methodik der histologischen Aufarbeitung des Lungen- und Herzgewebes geschah nach ausführlicher Einarbeitung und Übung der Arbeitsschritte. Der Arbeitsablauf war fest definiert. Die standardisierten Protokolle und die speziell für den Anwendungszweck konzipierten Geräte und Substanzen erlaubten eine reproduzierbare Gewinnung der Daten. Die Entwicklung einer speziellen Computersoftware erhöhte die Qualität der Auswertung, da die Software eine zielgerichtete Untersuchung der Präparate erlaubte.

In allen Arbeitsschritten wurde die Randomisierung der Versuchstiere eingehalten, um den Einfluss bekannter und unbekannter Störgrößen auf die Erhebung der Parameter gering zu halten.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

Dieses Kapitel erläutert die Auswirkung der Versuchsaufbauten im Hypoxie- und Stenosemodell sowie die jeweiligen Auswirkungen der medikamentösen Therapie.

#### **4.3.1 Diskussion der Ergebnisse im Hypoxiemodell**

Die hypoxischen Bedingungen wirkten sich im erwarteten Maße auf den Organismus aus. Als globale Parameter der Herzfunktion zeigten die Herzfrequenz und der systemische Blutdruck, ausgedrückt durch SBPsys und SBPdia, keine signifikanten Unterschiede unter Hypoxie. Die veränderten Umgebungsbedingungen lösen im Gefäßbett klassischerweise eine Vasodilatation aus, welche durch eine Steigerung des Sympathikus gemildert wird (Weissmann et al. 2006b; Bärtsch und Gibbs 2007). So reagiert der Organismus initial mit einem Anstieg des arteriellen Blutdruckes, gefolgt von einem Gleichgewicht mit normalen Werten nach einigen Wochen. Bei Aufenthalt über Monate bis Jahre unter hypoxischen Bedingungen ist die Einstellung einer systemischen

Hypotonie möglich (Hanna 1999; Weissmann et al. 2006b). Die primäre Erhöhung der Herzfrequenz stellt ebenfalls eine sympathoadrenerge Anpassungsreaktion an die veränderten Umgebungsbedingungen dar, die nach einiger Zeit nachlässt (Bärtsch und Gibbs 2007). In der akuten Phase der Anpassung gelingt es durch Erhöhung der Herzfrequenz das kardiale Auswurfvolumen aufrecht zu erhalten.

Die medikamentöse Therapie mit dem P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitor beeinflusste weder die Herzfrequenz, SBP<sub>sys</sub> noch SBP<sub>dia</sub>. In wieweit der Inhibitor auf diese Parameter Einfluss nehmen kann, muss in einem anderen Modell untersucht werden. Durch den fehlenden Einfluss des Hypoxiemodells auf Herzfrequenz, SBP<sub>sys</sub> und SBP<sub>dia</sub> ist eine Abschätzung der medikamentösen Therapie auf diese Stellgrößen nicht möglich.

Die Auswirkungen der Hypoxie spiegelten sich deutlich in den histologischen Untersuchungen wieder. Durch Färbung des entnommenen Lungengewebes auf Von-Willebrand-Faktor und  $\alpha$ -Actin gelang eine valide Darstellung des Muskularisierungsgrads. Die hypoxischen Umgebungsbedingungen führten zu einem Umbau der kleinen Lungengefäße im Bereich der Media. Es zeigte sich nach der Färbung eine Zunahme voll und partiell muskularisierter Gefäße sowie eine Abnahme nicht muskularisierter Gefäße. Dies entsprach den erwarteten Veränderungen bei einer milden PAH im Mausmodell. Das Auftreten plexiformer Läsionen oder totaler Obliteration des Gefäßlumens wie in anderen Modellen, zum Beispiel dem SuHx-Modell bei Ratten, wurde nicht beobachtet (Dickinson et al. 2013). Die erhobenen Parameter ließen in der Zusammenschau die Annahme eines wirkungsvollen Modellaufbaus zu. Es gelten die in Kapitel 4.1.1 erläuterten Limitationen.

Die medikamentöse Therapie zeigte in der histologischen Auswertung eine Rückbildung der pathologischen Merkmale. Der Anteil des muskularisierten Gewebes nahm statistisch nachweisbar ab. Wie in Kapitel 1.4 aufgeführt, vermindert eine Inhibition von P38 $\alpha$  die hypoxische Vasokonstriktion, die Proliferation von SMC der Media sowie die inflammatorischen Vorgänge. Diese stellen einige, bis heute mögliche Ursachen der Veränderungen dar und konnten in diesem Modell nachgestellt werden.

Die vermehrte Druckbelastung durch Remodeling im Lungengefäßsystem resultiert in einem erhöhten RVSP (Morimatsu et al. 2012). Dies führte zu hypertrophen Vorgängen der rechten Herzhälfte, welche sich in einer kardialen Gewichtszunahme äußerten (Stenmark et al. 2009). Wie in anderen Hypoxiestudien mit Mäusen stellte sich die



rechtsventrikuläre Masse im Verhältnis zum Körpergewicht und zum linken Ventrikel inklusive Septum als deutlich erhöht dar.

Auf diese morphologischen Umbauprozesse nahm die Therapie mit PH-797804 nur unzureichenden Einfluss. Eine signifikante Rückführung in Richtung physiologischer Werte konnte für den RVSP, RV/(LV+S) und RV/KG nicht erreicht werden.

Ab einem gewissen Stadium geht die Rechtsherzhypertrophie mit einer zunehmenden Dilatation einher, die zu Herzversagen führen kann. Dies führt zu einer Volumenbelastung sowie zunehmender Dilatation und wirkt sich auf die Funktion des rechten Herzens aus. Echokardiographisch konnte, anhand der TAPSE und des MPI, eine verminderte rechtsventrikuläre Funktion sowohl in der Systole als auch in der Diastole dargestellt werden. Die systolische Funktion, gemessen als TAPSE, gilt als wesentlicher prognostischer Indikator und eignet sich zur Beurteilung der therapeutischen Effektivität (Rudski et al. 2010; Howard et al. 2012). Der MPI spiegelt die Funktionsweise des Ventrikels während Systole und Diastole wieder und zeichnet sich durch leichte Reproduzierbarkeit, die Unabhängigkeit von Herzfrequenz, Volumenstatus des Ventrikels und triskupidaler Regurgitation aus (Tei et al. 1995; Howard et al. 2012). Die Therapie erzielte eine signifikante Verbesserung dieser Parameter.

Im Versuchsaufbau war das Auswurfvolumen vermindert. Der erhöhte pulmonale Widerstand und eine vermehrte rechtsventrikuläre Dilatation mit konsekutivem Shift des interventrikulären Septums führten zu einer verminderten Füllung der linken Herzkammer. Die reduzierte Auswurfleistung des Herzens ist mit einer schlechteren Prognose bei Erkrankten assoziiert (Urashima et al. 2008; Thenappan et al. 2010).

Unter Therapie verbesserte sich die Auswurfleistung des linken Ventrikels messbar. Der CO und der CI normalisierten sich unter PH-797804 deutlich.

Zusammenfassend gelang die Induktion einer milden PAH durch hypoxische Bedingungen. Die Therapie mit PH-797804 normalisierte einige Prognose- und Krankheit-assoziierte Parameter. Eine unzureichende Verbesserung aller Messwerte lässt sich möglicherweise durch die nur milde PAH oder die kurze Therapiedauer von zwei Wochen erklären.

### 4.3.2 Diskussion der Ergebnisse im Stenosemodell

Um die Folgen der Therapie mit PH-797804 zu evaluieren, fand neben dem Hypoxiemodell mit Lungen- und Herzveränderungen ein Modell mit kardialem Fokus Anwendung. Diese Kombination erlaubte eine präzisere Aussage über die beteiligten Organsysteme mit speziellem Schwerpunkt des rechten Herzens. Ein pulmonalarterieller Clip induziert, ähnlich dem häufig angewendeten Modell eines Aortenclips, einen erhöhten Afterload für das Herz (Tarnavski 2009). Dies zeigte sich im Versuchsaufbau deutlich in der Zunahme des RVSP, welcher analog dem Hypoxiemodell als Anpassung der Druck-Volumen-Relation sowie durch erhöhte Kontraktilität anstieg. Zu unterscheiden ist eine distale und proximale Form stenosierender Prozesse. Eine distale Stenose findet sich im Hypoxiemodell oder bei humaner PAH. Eine proximale Stenose entsteht in diesem Bandingmodell oder bei kongenitaler Pulmonalarterienstenose (Borgdorff et al. 2013). Die medikamentöse Therapie erzielte keine signifikante Reduktion des RVSP, allerdings lässt sich eine Tendenz im Diagramm ablesen.

Der erhöhte RVSP führte über die Dauer des Versuchs zu einer rechtskardialen Hypertrophie, welche sich wie im Hypoxiemodell durch ein erhöhtes RV/KG sowie RV/(LV+S) darstellte. Die Erhöhung der Hypertrophieparameter und des RVSP entsprachen den erwarteten Veränderungen in diesem Modell (Tarnavski et al. 2004; Urashima et al. 2008). Die Bestimmung der rechtskardialen Hypertrophie durch Picrolimusfärbung und Erhebung des Kollagenanteils zeigten ebenfalls eine deutliche Zunahme der Fibrose unter PAB-Bedingungen.

Die Therapie mit PH-797804 reduzierte die strukturellen Parameter nicht signifikant, allerdings bildete sich, analog den Ergebnissen im Hypoxiemodell, eine Tendenz in die erwartete Richtung ab.

Als Folge der erhöhten Druck- und Volumenbelastung zeigte der rechte Ventrikel auch in diesem Modell einen erhöhten Innendurchmesser, eine verminderte Funktion während Systole und Diastole (TAPSE) sowie während der Diastole (MPI). Die Konstriktion der Pulmonalarterie bewirkte einen geringeren Blutfluss durch die Lunge und linkskardial einen verminderten Auswurf, dargestellt durch einen geringeren CO und CI bei den PAB-Mäusen. Dies führte zu dilatativen Prozessen des rechten Ventrikels und verminderte den CO zusätzlich (Urashima et al. 2008). Wie im Hypoxiemodell beobachtet, gelang auch in diesem Modell eine Verbesserung der Parameter unter PH-797804. Dies zeigte eine

deutliche Wirksamkeit auf das rechte Herz, da die Einflüsse auf die Lunge in diesem Modell weniger relevant waren.

Der reduzierte Auswurf des linken Herzens führte zu einem Abfall des SBPsys. Wie im Hypoxiemodell blieben die Herzfrequenz sowie der SBPdia durch das Modell unbeeinflusst. Die Therapie mit P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitor nahm keinen Einfluss auf die Herzfrequenz und den SBPdia. SBPsys zeigte lediglich eine Tendenz, welche eventuell bei Modifikation der Versuchsbedingungen Signifikanz annehmen kann.

Die Induktion einer Rechtsherzhypertrophie durch pulmonalarterielles Clipping verlief in diesem Versuchsaufbau erfolgreich und zeigte ähnliche Werte wie in anderen Anwendungen des Modells innerhalb unserer Arbeitsgruppe (Hemnes et al. 2012; Kojonazarov et al. 2013; Novoyatleva et al. 2013a; Novoyatleva et al. 2013b; Hemnes et al. 2014; Janssen et al. 2015). Die Evaluation des MAPK-Inhibitors ergab eine Verbesserung der kardialen Funktion.

#### **4.4 Die Ergebnisse im Kontext aktueller Studien**

Gegenwärtig stellt die Betrachtung rechtskardialer Anpassungen infolge PAH eine neue Domäne der Therapie dar. Die Erforschung wurde innerhalb der letzten Jahre stark intensiviert. Ein Patient mit Rechtsherzversagen (RHV) präsentiert sich klinisch mit Ödemen, gestauten Halsvenen, einer kongestiven Hepatopathie und Atemnot. Dies kann mit Palpitation durch supraventrikuläre Tachykardien sowie Synkopen und Präsynkopen einhergehen. Bislang existiert keine allgemein gültige Definition zu den Kriterien eines RHV. Die reduzierte rechtsventrikuläre Leistung führt zur Minderdurchblutung der Lungen und des linken Herzens. Diese Veränderung wird hämodynamisch durch ein reduziertes CO und einen erhöhten rechtsatrialen Druck abgebildet (Ryan und Archer 2014).

Von großem Interesse sind die Mechanismen, die eine kardiale Hypertrophie induzieren. Der gesteigerte Stress des rechten Ventrikels führt über eine Hypertrophie und Fibrose des Ventrikels vom kompensierten Stadium des RHV zum dekompenziertem Stadium. Aktuell werden neurohormonale, inflammatorische, metabolische, rezeptorassoziierte, adrenerge und ischämische Vorgänge genannt und selektiv untersucht. Der gesteigerte Afterload führt zu einer Hypertrophie der Kardiomyozten und einer Zunahme der EZM. Dies geht mit einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch der rechten Herzhälfte einher. Die zunehmende Dilatation mit Verschiebung des interventrikulären Septums nach links und

der reduzierte Auswurf des rechten Ventrikels führen zu einem verringerten CO des linken Ventrikels mit Minderperfusion des Herzens. Der rechte Ventrikel wird physiologisch während Systole und Diastole mit Blut versorgt. Durch Hypertrophie und Dilatation verkürzt sich die Perfusionsdauer während der systolischen Herzaktion und später während der diastolischen. Die Diffusionsstrecke nimmt zu. Diese Vorgänge sowie eine typischerweise verminderte Dichte an Kapillaren werden bei Rechtsherzhypertrophie und -versagen beobachtet und führen zu Ischämie (Ryan und Archer 2014).

Die verminderte Durchblutung des Gewebes induziert eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie eine Ausschüttung neurohormonaler Faktoren wie atriales natriuretisches Peptid, BNP, ET, Prostaglandin, TGF- $\beta$ 1 (Bogaard et al. 2009a). Zudem geht das Herzversagen, was vor allem aus Daten zu linkskardialen Arbeiten bekannt ist, mit inflammatorischen Prozessen einher. Die ROS, TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 sind im Serum erhöht (Mann 2002; Bogaard et al. 2009a).

Ein RHV geht zudem mit Veränderung des Metabolismus einher. Assoziierte Gene sind HIF-1 $\alpha$ , c-Myc und FOXO1 (forkhead box protein O1) (Ryan und Archer 2014). Physiologisch wird Glukose im Zytosol durch die Pyruvat-Dehydrogenase in Pyruvat umgewandelt und in die Mitochondrien transportiert. Dieser Vorgang wird bei RHV durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase blockiert und bedeutet einen ATP-Verlust. Eine Blockade der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase mit Dichloracetat resultierte in Studien in einer signifikanten Verbesserung der rechtskardialen Parameter und einer Verbesserung des Outcomes. Darüber hinaus blockiert die  $\beta$ -Fettsäuren-Oxidation bei RHV die Glukoseverwertung, was als Randle-Zyklus bezeichnet wird. Eine Blockade durch Trimetazidine und Ranolazine konnte eine Verbesserung der Herzleistung erzielen. Der dritte derzeit bekannte Einfluss auf metabolische Vorgänge bei RHV ist die Glutaminolyse. Dieser von Tumoren bekannte Vorgang induziert ein starkes Zellwachstum. Eine Inhibition dieses Vorgangs bewirkte ebenfalls eine Verbesserung der rechtskardialen Aktivität (Ryan und Archer 2014).

Eine typische Anpassung bei RHV stellt die abnorme sympathische Hochregulation mit gestörter adrenerger Rezeptorstimulierbarkeit dar. Bei RHV konnte eine verringerte Zahl von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und Dopamin-Rezeptoren festgestellt werden. Eine Erklärung der Rezeptor-Herunterregulation bietet die permanente Überstimulation bei RHV. Die Therapie mit inotropen Substanzen zeigte bei intensivpflichtigen Patienten mit RHV nur eine minimale

Wirkung. Patienten mit Linksherzversagen zeigten nach Therapie mit  $\beta$ -Blockern eine Verbesserung des Outcomes, weswegen Carvedilol und Propranolol in tierexperimentellen Studien zu RHV untersucht wurden. Diese konnten eine Verbesserung der Funktion erreichen (Ryan und Archer 2014; Ryan et al. 2015).

Eine weitere Fragestellung ist, unter welchen Umständen aus einem adaptiven RHV ein maladaptives RHV wird. Wie vorangehend erläutert, bietet sich ein divergierendes Bild im PAB-, SuHx- oder MCT-Modell, aber auch entsprechend der humanen Ätiologie wird die gesteigerte Belastung in unterschiedlichem Maß toleriert. Das Outcome bei kongenitaler Pulmonalarterienstenose oder Eisenmengersyndrom zeigte höhere Überlebensraten als beispielsweise die IPAH (Voelkel et al. 2012).

Die Datenlage zu Veränderungen des linken Ventrikels bietet eine Basis zur Diskussion. Der rechte und linke Ventrikel zeigen sowohl ähnliche als auch differierende Eigenschaften. Das Matrixremodeling, metabolische Veränderungen und die Anpassung des Aktin-Zytoskelettes in beiden Herzkammern ähneln sich beim Banding der Pulmonalarterie beziehungsweise der Aorta (Urashima et al. 2008). Generell bietet der rechte Ventrikel, verglichen mit dem Linken, aufgrund einer geringeren Wandstärke und anderen Form eine bessere Compliance sich an den erhöhten Afterload anzupassen.

Von Interesse ist neben den pathologischen Grundlagen auch die Auswirkung bisher etablierter Therapeutika auf den rechten Ventrikel. Neben einer Reduktion des Afterloads, mit verminderter Belastung für das rechte Herz führt Sildenafil beispielsweise zu einer Steigerung der Inotropie im rechten Ventrikel (Nagendran et al. 2007). Auch Bosentan und intravenöses Prostazyklin scheinen eine positive Wirkung auf den rechten Ventrikel auszuüben (Voelkel et al. 2006).

Nach Reduktion der Hypertonie im Gefäßbett ist der rechte Ventrikel zudem in der Lage, die Hypertrophie zu reduzieren und seine normale Funktion aufzunehmen. Dies konnte bei Patienten nach Lungentransplantation gezeigt werden (Kramer et al. 1994; Pasque et al. 1995; Moulton et al. 1996). Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Typen der PAH differierende genetische Hintergründe bergen. Beispielsweise ist ein unterschiedlicher Einfluss bei IPAH oder familiärer PAH auf das rechte Herz denkbar.

Vorangehend wurde die Rechtsherzhypertrophie sowie das RHV detailliert beschrieben. Die P38-MAPK wird bei hypertrophen, fibrotischen, apoptotischen und inflammatorischen Vorgängen am Herz infolge zellulären Stresses verändert exprimiert

(Bogaard et al. 2009a). Wie bereits im Literaturteil aufgeführt, ist die P38-MAPK in viele relevante Signalkaskaden involviert und stellte aus diesem Grund in den letzten Jahren ein interessantes Forschungsziel bei unterschiedlichen Erkrankungen dar. So mildert deren Inhibition die Symptome bei rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, COPD sowie bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, Endotheldysfunktion und Myokardinfarkt (Fisk et al. 2014). Grundlegend reagiert die Stress-aktivierte P38-MAPK auf diverse Auslöser wie inflammatorische Zytokine, oxidativen Stress, radioaktive Strahlung, Wachstumsfaktoren und osmotische Einflüsse (Javadov et al. 2014). Die Kinasefamilie beeinflusst basale, zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Transkription, Wachstum, Zellteilung, Differenzierung, Apoptose und Inflammation (Martin et al. 2014). Auf zellulärer Ebene beeinflusst die P38-MAPK eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Enzymen. Dazu zählen c-Myc, IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Young 2013; Javadov et al. 2014). Vorangehend wurde deren Aktivierung auch bei Rechtsherzversagen beschrieben.

Die Experimente dieser Dissertation zeigten unter Therapie mit dem P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitor eine Verbesserung der Krankheitsparameter im Hypoxie- und Stenosemodell. Eine genaue Kausalität zu benennen ist nicht möglich, da die Datenlage zu P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibition bei PAH begrenzt und das Forschungsfeld zu komplex ist. Daher wurden hauptsächlich die Ergebnisse zu linkskardialen Pathologien verwendet. Direkte Rückschlüsse verbieten sich, da rechtes und linkes Herz möglicherweise unterschiedlich auf veränderte Bedingungen reagieren. Die SOLSTICE-Studie stellt gegenwärtig einen wichtigen Pfeiler in der kardialen Forschung mit P38-MAPK-Inhibitoren dar. In der Studie wurde bei NSTEMI-Patienten durch P38-MAPK-Inhibition mit Losmapimod eine Verminderung der Marker CRP, IL-6 und BNP erreicht. Eine Substudie zeigte im MRT eine Verkleinerung des Infarktareales unter Therapie (Newby et al. 2014). Die immunmodulatorischen Effekte bei P38-MAPK-Inhibitoren auf das kardiovaskuläre System konnten bereits in früheren klinischen Studien nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PCI) gezeigt werden. So sanken in einer Studie von de Winter et al. mit 45 Patienten unter Therapie mit VX-702 das CRP, Monozyten, neutrophile Granulozyten und Leukozyten (de Winter RJ 2005; Denise Martin et al. 2012). In einer ähnlich gestalteten Studie mit 92 Teilnehmern nahmen nach PCI und Therapie mit SB-681323 CRP, Myeloperoxidase, IL-6 und IL-8 ab (Sarav-Blat et al. 2010). Elkhawad untersuchte 2012 mittels PET-CT die Veränderungen bei

Atherosklerosepatienten. Die Studie umfasste 99 Teilnehmer und zeigte unter Therapie mit Losmapimod eine geringere Aufnahme von Glukose sowie ein erniedrigtes hochsensitives CRP (hsCRP) (Elkhawad et al. 2012). Cheriyan zeigte 2011 in einer Studie zu Hypercholosterinämie bei Menschen nach Therapie mit Losmapimod eine verbesserte endotheliale Funktion sowie eine Reduktion des hsCRP (Cheriyan et al. 2011). Die Auswahl klinischer Studien zu kardiovaskulären Erkrankungen zeigte einheitlich eine Reduktion der Entzündungsparameter unter Inhibition der P38-MAPK. Diese spielen bei PAH-bedingten Lungengefäßveränderungen sowie den assoziierten rechtskardialen Pathologien eine entscheidende Rolle (Bogaard et al. 2009a; Schermuly et al. 2011).

Die große Zahl präklinischer Studien untersuchte die Rolle von P38 in Erkrankungen mit endothelialer Dysfunktion, Atherosklerose, kardialer Kontraktilität und Hypertrophie, Myokardinfarkt und Linksherzremodeling. Die Ergebnisse der in-vitro- und in-vivo-Experimente widersprachen sich teilweise und stellen auch in Zukunft ein interessantes Forschungsgebiet dar. Im Folgenden wird kurz auf einige präklinische Daten eingegangen.

P38 spielt bei kardialen Umbauvorgängen eine entscheidende Rolle. Teilweise ist die Datenlage uneinheitlich, ob die Vorgänge verstärkt oder vermindert werden. Wang et al. zeigten 1998, dass eine Stimulation neonataler Kardiomyozyten mit P38 zu einer Hypertrophie führte, während eine Inhibition das Wachstum verminderte. Ebenso verstärkte die Überexpression der upstream gelegenen MAP3K „MKK3“ und „MKK6“ die Hypertrophie (Wang et al. 1998b; Wang et al. 1998a). Gegenteilig zu diesen in vitro Erkenntnissen entwickelten transgene Tiere in vivo nach Überaktivierung dieser Signale keine kardiale Hypertrophie. Darüber hinaus zeigten sogar transgene, P38-dominant-negative Tiere eine kardiale Hypertrophie, aber keine Fibrose infolge postkardialer Druckerhöhung (Zhang et al. 2003). Ein involvierter Signalweg führt über Calcineurin zur Hochregulation des Transkriptionsfaktors NFAT, welcher mit Hypertrophie assoziierte Genabschnitte aktiviert. P38 ist einerseits durch einer Verminderung der SERCA2 (Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2) zur Aktivierung von Calcineurin fähig, kann dieses aber auch über andere Kaskaden blockieren. Calcineurin wiederum ist über einen negativen Feedback-Mechanismus in der Lage P38 zu inhibieren. Folglich führt sowohl eine Hochregulation als auch eine Herunterregulation von P38 zu Hypertrophie über Calcineurin (Lim et al. 2001; Yang, Teddy T C et al. 2002; Braz et al. 2003; Andrews et al. 2003; Molckentin 2004). Die intensivierete Untersuchung der P38-

MAPK-Familie ergab eine unterschiedliche Funktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen. Die Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit induziert fibrotische und apoptotische Ereignisse, während die Aktivierung der  $\beta$ -Untereinheit vor allem eine Hypertrophie induziert. Die  $\beta$ -Untereinheit wirkt durch Expression von atrialem natriuretischem Peptid, BNP und fetaler Marker (Koivisto et al. 2011). Ein weiterer Signalweg zur Verstärkung der Fibrose führt, neben der direkten Aktivierung fibrotischer Gene durch P38 $\alpha$ , über eine Aktivierung von TNF- $\alpha$  zu fibrotischen Umbauvorgängen. TNF- $\alpha$  selbst ist in der Lage, die upstream von P38 gelegenen Kinasen zu aktivieren (Bellahcene et al. 2006; Yin et al. 2008). Als Auslöser apoptotischer Kaskaden aktiviert P38 das proapoptische Protein „Bad“ und deaktiviert die antiapoptischen Proteine „Bcl-xL“ und „Bcl-2“ in kardialen Myozyten (Grethe et al. 2004; Grethe und Pörn-Ares 2006; Ren et al. 2005; Kaiser et al. 2004). In einer Vielzahl weiterer Studien wurde P38 in Zusammenhang mit Myokardinfarkt und Remodelingvorgängen untersucht. P38 wird bei myokardialer Ischämie verändert exprimiert, wobei einer vermehrten Expression studienabhängig sowohl schädliche als auch protektive Auswirkungen folgten. Nach gegenwärtigem Stand kann eine kurzzeitige Aktivierung der P38-MAPK protektive Wirkungen entfalten, wohingegen bei länger andauernder Aktivierung gegenteilige Effekte der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen auftreten (Javadov et al. 2014). Eine Inhibition beziehungsweise transgene Deaktivierung der P38 $\alpha$ -Untereinheit reduzierte die Effekte der Minderversorgung des Gewebes. P38 $\alpha$  stellt während eines Infarktgeschehens vermutlich die dominante Isoform dar (Kumphune et al. 2010). Durch Inhibition von P38 verbesserte sich das Ergebnis nach Myokardinfarkt im Tiermodell (Ma et al. 1999; Sy et al. 2008; Kumphune et al. 2010). Im Myokardinfarktmodell mit medikamentenresistenter P38 $\alpha$ -Isoform und gleichzeitiger Therapie mit einem P38-Inhibitor konnte keine Verbesserung des Outcomes erreicht werden. Dies unterstreicht den pathologischen Einfluss der  $\alpha$ -Isoform (Martin et al. 2001). Weitere Studien konnten durch selektiven Knock-out der P38 $\alpha$ -Untereinheit eine Verbesserung nach Ischämie zeigen. Es konnte durch P38 $\alpha$ -Knockout eine verbesserte Funktion in Systole und Diastole, ein reduzierte Zahl apoptotischer Ereignisse, ein geringerer fibrotischer Umbau und eine verminderte Infarktgröße gezeigt werden (Saurin et al. 2000; Kaiser et al. 2004; Ren et al. 2005; Nishida et al. 2004; See et al. 2004; Tenhunen et al. 2006; Koivisto et al. 2011). Die genaue Evaluation der P38 $\alpha$ -MAPK gestaltet sich sehr komplex, da sie in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert ist. Die teilweise gegensätzlichen Wirkungen der Kinase sowie die zyklische Aktivierung dieser erschweren die Erforschung zusätzlich.



Die Assoziation von P38 mit Umbauvorgängen im Lungengefäßsystem wurde in einigen präklinischen Studien untersucht. Mit Bekanntwerden der Rolle von P38 auf pulmonale und kardiale Pathologien bei PAH-Patienten wurden bereits etablierte Medikamente bezüglich ihrer Wirkung auf P38-MAPK untersucht. Beispielsweise verminderten PDE-5-Hemmer und Prostazyklinanaloga die Aktivität der P38-MAPK im MCT-Modell signifikant (Ogo et al. 2013; Kiss et al. 2014). Lu et al erreichten 2004 bei MCT-Ratten durch P38-Inhibition eine Reduktion der inflammatorischen Parameter TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die morphologische Analyse ergab eine verminderte Wanddicke der Media und einen reduzierten pulmonalarteriellen Druck (Lu et al. 2004). Weerackody zeigte 2009, dass bei isolierten Rattenlungen durch Hypoxie ausgelöste Vasokonstriktion, eine reduzierte Freisetzung von NO sowie eine erhöhte Liberation von Superoxiden mittels P38-Inhibition umgekehrt werden konnten (Weerackody et al. 2009). Eine Studie zu COPD und Fibrose zeigte, dass unter P38-Inhibition die Spiegel von IL-6 und Matrix-Metalloprotease-9 sowie kardiale Fibrosierungen vermindert wurden (Underwood et al. 2000). Einige, bereits im Literaturteil angeführte Studien, konnten unter Therapie eine verminderte Fibroblastenaktivität zeigen, welche typischerweise mit PAH assoziiert ist (Mortimer et al. 2007; Welsh et al. 2006). Morrell et al. veröffentlichten 2006 in einer Studie eine gesteigerte Aktivität der P38-MAPK bei Hypoxie-assoziiierter Vasokonstriktion, sowie der folgenden Vasodilatation (Morrell et al. 2006). Einige Studien zeigten, dass P38 über diverse Signalkaskaden die an der Mediahypertrophie beteiligte Hypertrophie glatter Muskelzellen der Lungenarterien beeinflusst (El-Haroun et al. 2008; Dewachter et al. 2009; Li et al. 2013; Jin et al. 2014). 2013 wurde von Yu et al. nach P38-MAPK-Inhibition eine verminderte Zahl apoptotischer Ereignisse bei hypoxischen Zellen gezeigt (Yu et al. 2013). Weitere Studien wiesen auf eine Assoziation von P38 mit Veränderungen im Lungengefäßsystem hin (Chun et al. 2012; Zhu et al. 2012; Morin et al. 2014). Eine exakte Klärung der Beteiligung von P38 an pulmonalen Umbauprozessen muss in Zukunft weiter intensiv erforscht werden und ist möglicherweise essentieller Gegenstand neuer Therapiestrategien.

## 5 Zusammenfassung

Die pulmonal arterielle Hypertonie ist eine lebensbedrohliche, progredient voranschreitende Erkrankung mit eingeschränkter Überlebensprognose. Die Prävalenz liegt bei 10,6 / 1 Million Einwohner mit einer 5-Jahres-Mortalität von 65%. Pathophysiologisch unterliegen die arteriellen Lungengefäße einem Remodeling mit Proliferation der Intima, Media und Adventitia. Das Remodeling, eine In-Situ-Thrombosierung und Vasokonstriktion führen zu Obstruktion und Obliteration des Gefäßlumens. In der Folge steigt die rechtskardiale Belastung, welche anfangs durch kardiale Hypertrophie kompensiert wird. Die zunehmende Insuffizienz des Herzens, den erhöhten Afterload zu kompensieren, stellt für die Patienten den prognostisch limitierenden Faktor dar. Gegenwärtig existieren medikamentöse Ansätze mit Prostazyklinanaloge, ETR-Antagonisten, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase und PDE-5-Hemmern. Ein kurativer Ansatz existiert nicht.

In dieser Dissertation wurde eine P38 $\alpha$ -Inhibition durch PH-797804 untersucht. Als Stress-aktivierte Kinase reagiert sie auf extrazelluläre Veränderungen und reguliert vielfältige zelluläre und subzelluläre Prozesse. Durch die zentrale Rolle der P38-MAPK wurde diese bis heute in Zusammenhang mit einer großen Zahl weiterer Krankheitsbilder erforscht. Die vorliegende Arbeit nutze zwei Tiermodelle. Das erste Modell erzeugte durch einen verminderten Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft eine pulmonal arterielle Hypertonie, das zweite Modell induzierte durch eine pulmonalarterielle Partialstenose mittels Titanclip einen erhöhten, rechtskardialen Afterload. Die Auswertung der Tiermodelle und der Therapieerfolg wurden mittels Echokardiographie, hämodynamischer Links- und Rechtsherzkatheterisierung und histologischer Aufarbeitung evaluiert. Beide Tiermodelle wurden erfolgreich induziert. Die Therapiegruppe zeigte in einigen funktionellen und histologischen Parametern eine signifikante Verbesserung. Sowohl im Hypoxie- als auch im Stenosemodell wurde unter Therapie eine Verbesserung der kardialen Funktion erreicht. Im Hypoxiemodell verminderte die P38-Inhibition den Anteil muskularisierter Lungengefäße und im Stenosemodell den kardialen Kollagengehalt. Zusammenfassend stellen P38-MAPK im Rahmen der Erforschung der pulmonal arteriellen Hypertonie einen interessanten Ansatz dar. Die vorliegende Arbeit konnte Verbesserungen im pulmonalen Gefäßsystem und der kardialen Performance nachweisen.

## 6 Summary

Pulmonary arterial hypertension is a life-threatening, progressive disease with a poor prognosis. It has a prevalence of 10.6 per 1 million inhabitants and a 5-year-mortality of 65%. The pulmonary arteries are subject to remodeling processes including proliferation of the intima, media and adventitia of the vessels. Due to in-situ-thrombosis and vasoconstriction an obstruction and obliteration of the lumen results. As consequence, the right ventricular pressure increases, which in turn leads to hypertrophy to compensate the elevated afterload. In later stages, cardiac insufficiency is a prognosis relevant factor. Nowadays four basic therapeutic ways exist, including prostacyclin analogues, endothelial receptor antagonists, stimulators of soluble guanylate cyclase and phosphodiesterase-5-inhibitors. A curative approach does not exist.

In this thesis, we analyzed the effects of p38 $\alpha$ -Inhibition with PH-797804. p38-mitogen-activated protein kinase is upregulated due to extracellular changes and is involved in a number of cellular and subcellular processes. The p38-pathway was investigated in relation to several diseases. In this thesis, we employed two animal models: The first animal model induced PAH due to chronic hypoxia, the second model induced an increased right afterload by using a titanium clip to achieve a stenosis of the pulmonary artery lumen.

We used echocardiography, hemodynamic measurement of the right and left ventricle and histological analyses of the tissue to evaluate the models and the therapeutic efficiency of p38 inhibition. The treated animals showed a significant improvement in functional and histological parameters. The hypoxic model and the banding model improved the cardiac function in response to treatment with PH-797804. The histological analysis revealed a decreased muscularization of pulmonary arteries in the hypoxic model and a significant reduction of cardiac collagen in the banding model.

In summary, the family of p38-mitogen-activated protein kinases represents a promising therapeutic approach. This thesis presented improvements in the pulmonary artery remodeling and the cardiac performance due to treatment with p38 $\alpha$  -mitogen-activated protein kinase inhibitor.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ALK-1	Activin receptor-like kinase Type 1
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Standard-Varianz-Analyse
ATP	Adenosintriphosphat
BMPR2	Bone morphogenic protein receptor type 2
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovine serum albumin
CAV1	Caveolin-1
c-JNK	c-Jun N-Terminal kinases
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index; Herzindex
CO	Cardiac Output; kardiales Auswurfvolumen; Herzminutenvolumen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton, Einheit der Molekülmasse
ENG	Endoglin
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ET	Endothelin
ETR	Endothelin-1-Rezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm

H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible-Factor-1 $\alpha$
hsCRP	Hoch-sensitives C-Reaktives Protein
IL	Interleukin
INR	International normalized ratio
IPAH	Idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie
JNK	c-Jun N-Terminal kinases
KCNK3	Potassium channel subfamily K member 3
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MAPK	Mitogen-activated rotein kinase
MAP2K	MAP2K, Mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	MAP3K, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MCT	Monocrotalin
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ m	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mmHg	Maßeinheit des Drucks; Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	Mittlerer pulmonal arterieller Druck
MPI	Myocardial performance index; TEI-Index
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt, Non-ST-elevation myocardial infarction
NO	Stickstoffmonoxid
PAB	Pulmonary artery banding
PEEP	Positiven endexpiratorischen Druck; positive endexpiratory pressure

PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PBS	Natriumchlorid; siehe 2.2.4.4 Chemikalien
PCI	Perkutanen transluminalen Koronarangioplastie
PDE	Phosphodiesterasen
PDGF	Platelet derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostazyklin
PET-CT	Positron emission tomography–computed tomography
PH	Pulmonale Hypertonie
PVR	Peripheral vascular resistance; Peripherer vaskulärer Widerstand
RHV	Rechtsherzversagen
ROS	Reactive oxygen species
RV	Rechter Ventrikel
RV/(LV+S)	Rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel inklusive Septum
RVSP	Rechtsventrikulärer, systolischer Druck
SBP <sub>sys</sub>	Systemischer, arterieller Blutdruck während der Systole
SBP <sub>dia</sub>	Systemischer, arterieller Blutdruck während der Diastole
SEM	Standard error of the mean
SMAD9	Mothers against decapentaplegic homolog 9
SMC	Smooth muscle cells; Glatte Muskelzellen
SuHx	SU5416 + Hypoxie
TAB-1	Transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1 binding protein 1
TAPSE	Tricuspid annular plane systolic excursion
Tei-Index	MPI, Myocardial performance index
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	Versus
WHO	World Health Organization

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Laplace-Gesetz.....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der kardialen Anpassung an PAH-bedingte Änderungen im Lungengefäßsystem.....	14
Abbildung 3: Schaubild kardiales Remodeling,.....	15
Abbildung 4: Schaubild MAPK .....	20
Abbildung 5: Flussdiagramm Tiermodell 1 - Hypoxiemodell.....	25
Abbildung 6: Flussdiagramm Tiermodell 2 – Pulmonalarteriellles Banding.....	26
Abbildung 7: Schematische Abbildung des Aufbaus der Hypoxieanlage .....	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Herzens mit großen Gefäßen.....	38
Abbildung 9: Systemischer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	51
Abbildung 10: Systemischer, diastolischer Blutdruck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	52
Abbildung 11: Rechtsventrikulärer, systolischer Druck der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	53
Abbildung 12: Körpergewicht der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, .....	54
Abbildung 13: Verhältnis Gewicht des rechten Ventrikels zu Körpergewicht der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	54
Abbildung 14: Tibiallänge der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, .....	55
Abbildung 15: Verhältnis Gewicht rechter Ventrikel zu Gewicht linker Ventrikel + Septum der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, .....	55
Abbildung 16: Herzfrequenz der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, .....	56
Abbildung 17: Herzminutenvolumen der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35, ...	57
Abbildung 18: Herzindex der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	58
Abbildung 19: Myokardial Performance Index der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	59



Abbildung 20: Tricuspid annular plane systolic excursion der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	60
Abbildung 21: Muskularisierung der 20-70 µm großen Gefäße der Versuchstiere im Hypoxiemodell, Tag 35,.....	61
Abbildung 22: Systemischer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	62
Abbildung 23: Systemischer, diastolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	63
Abbildung 24: Rechtsventrikulärer, systolischer Blutdruck der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	64
Abbildung 25: Körpergewicht der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	65
Abbildung 26: Verhältnis rechtsventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	65
Abbildung 27: Verhältnis Gewicht rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel + Septum der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	66
Abbildung 28: Herzfrequenz der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	67
Abbildung 29: Herzminutenvolumen der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	68
Abbildung 30: Herzindex der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	69
Abbildung 31: Myokardial Performance Index der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	70
Abbildung 32: Tricuspid annular plane systolic excursion der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21,.....	71
Abbildung 33: Kollagengehalt im rechten Ventrikel der Versuchstiere im Stenosemodell Tag 21,.....	72
Abbildung 34: Kollagengehalt im rechten Ventrikel der Versuchstiere im Stenosemodell, Tag 21.....	73

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation Pulmonale Hypertonie nach der 5. Weltkonferenz, 2013 .....	3
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Injektionslösungen und Gase.....	27
Tabelle 3: Auflistung des verwendeten Operationsbestecks.....	27
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte für Operation, Therapie und Hämodynamikmessung .....	28
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte für die Hypoxieanlage.....	29
Tabelle 6: Auflistung der zur Echokardiographie verwendeten Geräte .....	29
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 8: Auflistung der zur Histologie verwendeten Geräte und Software .....	31
Tabelle 9: Auflistung allgemeine Materialien.....	32
Tabelle 10: Auflistung der zur Histologie verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 11: Auflistung der zur Histologie verwendeten Chemikalien.....	33
Tabelle 12: Histologische Färbung Lungengewebe auf alpha-Actin; .....	46
Tabelle 13: Histologische Färbung Lungengewebe auf von-Willebrand-Faktor.....	47
Tabelle 14: Histologische Färbung Herzgewebe mit Siriusred.....	48

## 10 Literaturverzeichnis

Alexander, A.; Will, D. H.; Grover, R. F.; Reeves, J. T. (1960): Pulmonary hypertention and right ventricular hypertrophy in cattle at high altitude. In: *American journal of veterinary research* 21, S. 199–204.

Alexander A.; Jenson, R. (1963): Pulmonary vascular pathology of high altitude induced pulmonary hypertension in cattle. In: *American journal of veterinary research* 24, S. 1112–1122.

Andrews, Catherine; Ho, Peter D.; Dillmann, Wolfgang H.; Glembotski, Christopher C.; McDonough, Patrick M. (2003): The MKK6-p38 MAPK pathway prolongs the cardiac contractile calcium transient, downregulates SERCA2, and activates NF-AT. In: *Cardiovascular research* 59 (1), S. 46–56.

Avruch, Joseph (2007): MAP kinase pathways: the first twenty years. In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), S. 1150–1160. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.006.

Badesch, David B.; Raskob, Gary E.; Elliott, C. Greg; Krichman, Abby M.; Farber, Harrison W.; Frost, Adaani E. et al. (2010): Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. In: *Chest* 137 (2), S. 376–387. DOI: 10.1378/chest.09-1140.

Bärtsch, Peter; Gibbs, J. Simon R. (2007): Effect of altitude on the heart and the lungs. In: *Circulation* 116 (19), S. 2191–2202. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.650796.

Bellahcene, Mohamed; Jacquet, Sebastien; Cao, Xue B.; Tanno, Masaya; Haworth, Robert S.; Layland, Joanne et al. (2006): Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor. In: *Journal of the American College of Cardiology* 48 (3), S. 545–555. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.02.072.

Benza, Raymond L.; Miller, Dave P.; Barst, Robyn J.; Badesch, David B.; Frost, Adaani E.; McGoon, Michael D. (2012): An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. In: *Chest* 142 (2), S. 448–456. DOI: 10.1378/chest.11-1460.

- Bishop, S. P.; Melsen, L. R. (1976): Myocardial necrosis, fibrosis, and DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy induced by sudden pressure overload. In: *Circulation research* 39 (2), S. 238–245.
- Bogaard, Harm J.; Abe, Kohtaro; Vonk Noordegraaf, Anton; Voelkel, Norbert F. (2009a): The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. In: *Chest* 135 (3), S. 794–804. DOI: 10.1378/chest.08-0492.
- Bogaard, Harm J.; Natarajan, Ramesh; Henderson, Scott C.; Long, Carlin S.; Kraskauskas, Donatas; Smithson, Lisa et al. (2009b): Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. In: *Circulation* 120 (20), S. 1951–1960. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883843.
- Borgdorff, Marinus A. J.; Bartelds, Beatrijs; Dickinson, Michael G.; Steendijk, Paul; Vroomen, Maartje de; Berger, Rolf M. F. (2013): Distinct loading conditions reveal various patterns of right ventricular adaptation. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305 (3), S. 64. DOI: 10.1152/ajpheart.00180.2013.
- Braz, Julian C.; Bueno, Orlando F.; Liang, Qiangrong; Wilkins, Benjamin J.; Dai, Yan-Shan; Parsons, Stephanie et al. (2003): Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. In: *The Journal of clinical investigation* 111 (10), S. 1475–1486. DOI: 10.1172/JCI17295.
- Brenner, O. (1931): Sclerosis of pulmonary artery with thrombosis. In: *Arch Intern Med* (47), S. 799–805.
- Bull, Todd M.; Coldren, Christopher D.; Geraci, Mark W.; Voelkel, Norbert F. (2007): Gene expression profiling in pulmonary hypertension. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 4 (1), S. 117–120. DOI: 10.1513/pats.200605-128JG.
- Chen, Baolin; Ma, Yuedong; Meng, Rongsen; Xiong, Zhaojun; Zhang, Chengxi; Chen, Guangqin et al. (2010): MG132, a proteasome inhibitor, attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in rats by modulation of mitogen-activated protein kinase signals. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 42 (4), S. 253–258.
- Cheriyian, Joseph; Webb, Andrew J.; Sarov-Blat, Lea; Elkhawad, Maysoon; Wallace, Sharon M L; Mäki-Petäjä, Kaisa M. et al. (2011): Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase improves nitric oxide-mediated vasodilatation and reduces inflammation

in hypercholesterolemia. In: *Circulation* 123 (5), S. 515–523. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971986.

Chichger, Havovi; Vang, Alexander; O'Connell, Kelly A.; Zhang, Peng; Mende, Ulrike; Harrington, Elizabeth O.; Choudhary, Gaurav (2015): PKC  $\delta$  and  $\beta$ II Regulate Angiotensin II Mediated Fibrosis through p38: A Mechanism of RV Fibrosis in Pulmonary Hypertension. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, S. 184. DOI: 10.1152/ajplung.00184.2014.

Choudhary, Gaurav; Troncales, Frederick; Martin, Douglas; Harrington, Elizabeth O.; Klinger, James R. (2011): Bosentan attenuates right ventricular hypertrophy and fibrosis in normobaric hypoxia model of pulmonary hypertension. In: *J. Heart Lung Transplant.* 30 (7), S. 827–833. DOI: 10.1016/j.healun.2011.03.010.

Chun, Chen; Yang, Wang; Xueding, Cai; Qi, Zhang; Xiaoying, Huang; Honglei, Xu et al. (2012): Resveratrol downregulates acute pulmonary thromboembolism-induced pulmonary artery hypertension via p38 mitogen-activated protein kinase and monocyte chemoattractant protein-1 signaling in rats. In: *Life sciences* 90 (19-20), S. 721–727. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.03.008.

Cournand, A.; Riley, R. L.; Breed, E. S.; Baldwin, E. D.; Richards, D. W.; Lester, M. S.; Jones, M. (1945): Measurement of cardiac output in man using the technique of catheterization of the right auricle or ventricle. In: *The Journal of clinical investigation* 24 (1), S. 106–116. DOI: 10.1172/JCI101570.

Cuadrado, Ana; Nebreda, Angel R. (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. In: *The Biochemical journal* 429 (3), S. 403–417. DOI: 10.1042/BJ20100323.

Cuenda, Ana; Rousseau, Simon (2007): p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), S. 1358–1375. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.03.010.

de Winter RJ (2005): A major determinant of CRP production in patients with ACS undergoing PCI. The p38-MAPK signaling pathway. Poster 606. AHA Scientific Sessions ePosters Archive 2005. American Heart Association, 2005.

Denise Martin, Eva; De Nicola, Gian Felice; Marber, Michael S. (2012): New therapeutic targets in cardiology: p38 alpha mitogen-activated protein kinase for

ischemic heart disease. In: *Circulation* 126 (3), S. 357–368. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.071886.

Dewachter, L.; Adnot, S.; Guignabert, C.; Tu, L.; Marcos, E.; Fadel, E. et al. (2009): Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. In: *The European respiratory journal* 34 (5), S. 1100–1110. DOI: 10.1183/09031936.00183008.

Dickinson, Michael G.; Bartelds, Beatrijs; Borgdorff, Marinus A J; Berger, Rolf M F (2013): The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (1), S. 14. DOI: 10.1152/ajplung.00031.2013.

Dresdale, D. T.; Michtom, R. J.; Schultz, M. (1954): Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. In: *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 30 (3), S. 195–207.

Dresdale, D. T.; Schultz, M.; Michtom, R. J. (1951): Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. In: *The American journal of medicine* 11 (6), S. 686–705.

El-Haroun, H.; Clarke, D. L.; Deacon, K.; Bradbury, D.; Clayton, A.; Sutcliffe, A.; Knox, Alan J. (2008): IL-1beta, BK, and TGF-beta1 attenuate PGI2-mediated cAMP formation in human pulmonary artery smooth muscle cells by multiple mechanisms involving p38 MAP kinase and PKA. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294 (3), S. 62. DOI: 10.1152/ajplung.00044.2006.

Elkhawad, Maysoon; Rudd, James H F; Sarov-Blat, Lea; Cai, Gengqian; Wells, Richard; Davies, L. Ceri et al. (2012): Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on vascular and systemic inflammation in patients with atherosclerosis. In: *JACC. Cardiovascular imaging* 5 (9), S. 911–922. DOI: 10.1016/j.jcmg.2012.02.016.

Ernst von Romberg (1891): Ueber Sclerose d. Lungenarterie. In: *Dtsch Arch Klin Med* 48, 1891 (48), S. 197–206.

Euler, U. S.; Liljestrand, G. (1946): Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. 12 Bände: Acta Physiol Scand.

Fisk, Marie; Gajendragadkar, Parag R.; Mäki-Petäjä, Kaisa M.; Wilkinson, Ian B.; Cheriyan, Joseph (2014): Therapeutic potential of p38 MAP kinase inhibition in the management of cardiovascular disease. In: *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 14 (3), S. 155–165. DOI: 10.1007/s40256-014-0063-6.

Galiè, Nazzareno; Corris, Paul A.; Frost, Adaani; Girgis, Reda E.; Granton, John; Jing, Zhi Cheng et al. (2013): Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. 72. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.031.

Galiè, Nazzareno; Hoeper, Marius M.; Humbert, Marc; Torbicki, Adam; Vachiery, Jean-Luc; Barbera, Joan Albert et al. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). In: *European heart journal* 30 (20), S. 2493–2537. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp297.

Ge, Baoxue; Gram, Hermann; Di Padova, Franco; Huang, Betty; New, Liguu; Ulevitch, Richard J. et al. (2002): MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5558), S. 1291–1294. DOI: 10.1126/science.1067289.

Ghofrani, H. Ardeschir; Distler, Oliver; Gerhardt, Felix; Gorenflo, Matthias; Grünig, Ekkehard; Haefeli, Walter E. et al. (2011): Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH): updated Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. In: *International journal of cardiology* 154 Suppl 1, S. 33. DOI: 10.1016/S0167-5273(11)70490-9.

Gomez-Arroyo, Jose; Saleem, Sheinei J.; Mizuno, Shiro; Syed, Aamer A.; Bogaard, Harm J.; Abbate, Antonio et al. (2012): A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 302 (10), S. 91. DOI: 10.1152/ajplung.00362.2011.

Greiser E: Hochdruck in der Lunge. In: *Die Zeit* 1968 (50).

- Grethe, Simone; Ares, Mikko P S; Andersson, Tommy; Pörn-Ares, M. Isabella (2004): p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). In: *Experimental cell research* 298 (2), S. 632–642. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.05.007.
- Grethe, Simone; Pörn-Ares, M. Isabella (2006): p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. In: *Cellular signalling* 18 (4), S. 531–540. DOI: 10.1016/j.cellsig.2005.05.023.
- Grimminger, F.; Weimann, G.; Frey, R.; Voswinckel, R.; Thamm, M.; Bölkow, D. et al. (2009): First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. In: *The European respiratory journal* 33 (4), S. 785–792. DOI: 10.1183/09031936.00039808.
- Groves, B. M.; Reeves, J. T.; Sutton, J. R.; Wagner, P. D.; Cymerman, A.; Malconian, M. K. et al. (1987): Operation Everest II: elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 63 (2), S. 521–530.
- Gurtner, H. P. (1970): Häufung der primär vaskulären pulmonalen Hypertonie in der Schweiz 1967-1970. Einleitung. In: *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 100 (50), S. 2146–2147.
- Gurtner, H. P. (1972): Pulmonale Hypertonie nach Appetizüglern. In: *Die Medizinische Welt* 23 (29), S. 1036–1041.
- Haddad, François; Doyle, Ramona; Murphy, Daniel J.; Hunt, Sharon A. (2008): Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. In: *Circulation* 117 (13), S. 1717–1731. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653584.
- Han, J.; Lee, J. D.; Bibbs, L.; Ulevitch, R. J. (1994): A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 265 (5173), S. 808–811.
- Hanna, J. M. (1999): Climate, altitude, and blood pressure. In: *Human biology* 71 (4), S. 553–582.



Harmjan; Gahl; Stender; Fabel; Deicher (1968): Zur medikamentös induzierten pulmonalen Hypertonie. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 93 (48), S. 2351.

Heath, D.; Edwards, J. E. (1958): The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. In: *Circulation* 18 (4 Part 1), S. 533–547.

Hemnes, Anna R.; Brittain, Evan L.; Trammell, Aaron W.; Fessel, Joshua P.; Austin, Eric D.; Penner, Niki et al. (2014): Evidence for right ventricular lipotoxicity in heritable pulmonary arterial hypertension. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 189 (3), S. 325–334. DOI: 10.1164/rccm.201306-1086OC.

Hemnes, Anna R.; Maynard, Karen B.; Champion, Hunter C.; Gleaves, Linda; Penner, Niki; West, James; Newman, John H. (2012): Testosterone negatively regulates right ventricular load stress responses in mice. In: *Pulmonary circulation* 2 (3), S. 352–358. DOI: 10.4103/2045-8932.101647.

Hoeper, M. M.; Ghofrani, H. A.; Gorenflo, M.; Grünig, E.; Schranz, D.; Rosenkranz, S. (2010): Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie: Europäische Leitlinien 2009. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64 (7), S. 401–414. DOI: 10.1055/s-0029-1244112.

Howard, Luke S.; Grapsa, Julia; Dawson, David; Bellamy, Michael; Chambers, John B.; Masani, Navroz D. et al. (2012): Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 21 (125), S. 239–248. DOI: 10.1183/09059180.00003912.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=p38&Search=Search> (Abfrage: 20.10.2016).

Humbert, Marc; Morrell, Nicholas W.; Archer, Stephen L.; Stenmark, Kurt R.; MacLean, Margaret R.; Lang, Irene M. et al. (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S), S. 13–24. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.02.029.

Humbert, Marc; Sitbon, Olivier; Chaouat, Ari; Bertocchi, Michèle; Habib, Gilbert; Gressin, Virginie et al. (2006): Pulmonary arterial hypertension in France: results from

a national registry. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 173 (9), S. 1023–1030. DOI: 10.1164/rccm.200510-1668OC.

Janssen, Wiebke; Schymura, Yves; Novoyatleva, Tatyana; Kojonazarov, Baktybek; Boehm, Mario; Wietelmann, Astrid et al. (2015): 5-HT<sub>2B</sub> Receptor Antagonists Inhibit Fibrosis and Protect from RV Heart Failure. In: *BioMed research international* 2015, S. 438403. DOI: 10.1155/2015/438403.

Javadov, Sabzali; Jang, Sehwan; Agostini, Bryan (2014): Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives. In: *Pharmacology & therapeutics* 144 (2), S. 202–225. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.013.

Jin, Chengtao; Guo, Jige; Qiu, Xiaoming; Ma, Ke; Xiang, Mufen; Zhu, Xiaobin (2014): IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH. In: *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 34 (4), S. 325–331. DOI: 10.3109/10799893.2014.903417.

Kaiser, Robert A.; Bueno, Orlando F.; Lips, Daniel J.; Doevendans, Pieter A.; Jones, Fred; Kimball, Thomas F.; Molkentin, Jeffery D. (2004): Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (15), S. 15524–15530. DOI: 10.1074/jbc.M313717200.

Kiss, Tamas; Kovacs, Krisztina; Komocsi, Andras; Tornyos, Adrienn; Zalan, Petra; Sumegi, Balazs; Gallyas, Ferenc (2014): Novel mechanisms of sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt. In: *PloS one* 9 (8), S. e104890. DOI: 10.1371/journal.pone.0104890.

Koivisto, Elina; Kaikkonen, Leena; Tokola, Heikki; Pikkarainen, Sampsa; Aro, Jani; Pennanen, Harri et al. (2011): Distinct regulation of B-type natriuretic peptide transcription by p38 MAPK isoforms. In: *Molecular and cellular endocrinology* 338 (1-2), S. 18–27. DOI: 10.1016/j.mce.2011.02.015.

Kojonazarov, Baktybek; Luitel, Himal; Sydykov, Akylbek; Dahal, Bhola K.; Paul-Clark, Mark J.; Bonvini, Sara et al. (2013): The peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  agonist GW0742 has direct protective effects on right heart hypertrophy. In: *Pulmonary circulation* 3 (4), S. 926–935. DOI: 10.1086/674755.

Kramer, M. R.; Valantine, H. A.; Marshall, S. E.; Starnes, V. A.; Theodore, J. (1994): Recovery of the right ventricle after single-lung transplantation in pulmonary hypertension. In: *Am. J. Cardiol.* 73 (7), S. 494–500.

Kumphune, Sarawut; Bassi, Rekha; Jacquet, Sebastien; Sicard, Pierre; Clark, James E.; Verma, Sharwari et al. (2010): A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (5), S. 2968–2975. DOI: 10.1074/jbc.M109.079228.

Lai, Yen-Chun; Potoka, Karin C.; Champion, Hunter C.; Mora, Ana L.; Gladwin, Mark T. (2014): Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. In: *Circulation research* 115 (1), S. 115–130. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301146.

Lairez, Olivier; Lonjaret, Laurent; Ruiz, Stéphanie; Marchal, Pauline; Franchitto, Nicolas; Calise, Denis et al. (2013): Anesthetic regimen for cardiac function evaluation by echocardiography in mice: comparison between ketamine, etomidate and isoflurane versus conscious state. In: *Laboratory animals* 47 (4), S. 284–290. DOI: 10.1177/0023677213496236.

Li, Xiaoyan; Lu, Wenju; Fu, Xin; Zhang, Yi; Yang, Kai; Zhong, Nanshan et al. (2013): BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49 (2), S. 212–220. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0051OC.

Lim, H. W.; New, L.; Han, J.; Molkenin, J. D. (2001): Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (19), S. 15913–15919. DOI: 10.1074/jbc.M100452200.

Lu, Jun; Shimpō, Hideto; Shimamoto, Akira; Chong, Albert J.; Hampton, Craig R.; Spring, Denise J. et al. (2004): Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 128 (6), S. 850–859. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2004.03.003.

Ma, X. L.; Kumar, S.; Gao, F.; Loudon, C. S.; Lopez, B. L.; Christopher, T. A. et al. (1999): Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte

apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. In: *Circulation* 99 (13), S. 1685–1691.

Maarman, Gerald; Lecour, Sandrine; Butrous, Ghazwan; Thienemann, Friedrich; Sliwa, Karen (2013): A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? In: *Pulmonary circulation* 3 (4), S. 739–756. DOI: 10.1086/674770.

Mandegar, Mehran; Fung, Yuan-Cheng B.; Huang, Wei; Remillard, Carmelle V.; Rubin, Lewis J.; Yuan, Jason X-J (2004): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. In: *Microvascular research* 68 (2), S. 75–103. DOI: 10.1016/j.mvr.2004.06.001.

Mann, Douglas L. (2002): Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. In: *Circulation research* 91 (11), S. 988–998.

Marber, Michael S.; Rose, Beth; Wang, Yibin (2011): The p38 mitogen-activated protein kinase pathway--a potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 51 (4), S. 485–490. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.021.

Marsboom, Glenn R.; Janssens, Stefan P. (2004): Models for pulmonary hypertension. In: *Drug Discovery Today: Disease Models* 1 (3), S. 289–296. DOI: 10.1016/j.ddmod.2004.11.026.

Martin, E. D.; Bassi, R.; Marber, M. S. (2014): p38 MAPK in cardioprotection - are we there yet? In: *British journal of pharmacology*. DOI: 10.1111/bph.12901.

Martin, J. L.; Avkiran, M.; Quinlan, R. A.; Cohen, P.; Marber, M. S. (2001): Antiischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38alpha mitogen-activated protein kinase: Evidence from ectopic expression of an inhibition-resistant kinase. In: *Circulation research* 89 (9), S. 750–752.

Meyrick, B.; Reid, L. (1980): Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. In: *The American journal of pathology* 100 (1), S. 151–178.

Molkentin, Jeffery D. (2004): Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. In: *Cardiovascular research* 63 (3), S. 467–475. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.01.021.

Montani, David; Günther, Sven; Dorfmüller, Peter; Perros, Frédéric; Girerd, Barbara; Garcia, Gilles et al. (2013): Pulmonary arterial hypertension. In: *Orphanet journal of rare diseases* 8, S. 97. DOI: 10.1186/1750-1172-8-97.

Morimatsu, Yoshitaka; Sakashita, Naomi; Komohara, Yoshihiro; Ohnishi, Koji; Masuda, Hiroshi; Dahan, Diana et al. (2012): Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. In: *Journal of vascular research* 49 (1), S. 33–42. DOI: 10.1159/000329594.

Morin, Caroline; Hiram, Roddy; Rousseau, Eric; Blier, Pierre U.; Fortin, Samuel (2014): Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307 (4), S. 86. DOI: 10.1152/ajpheart.00814.2013.

Morrell, Eric D.; Tsai, Ben M.; Wang, Meijing; Crisostomo, Paul R.; Meldrum, Daniel R. (2006): p38 mitogen-activated protein kinase mediates the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction and plays a role in phase I vasodilation. In: *The Journal of surgical research* 134 (2), S. 335–341. DOI: 10.1016/j.jss.2006.01.028.

Mortimer, Heather J.; Peacock, Andrew J.; Kirk, Alan; Welsh, David J. (2007): p38 MAP kinase: essential role in hypoxia-mediated human pulmonary artery fibroblast proliferation. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20 (6), S. 718–725. DOI: 10.1016/j.pupt.2006.08.007.

Moulton, M. J.; Creswell, L. L.; Ungacta, F. F.; Downing, S. W.; Szabó, B. A.; Pasque, M. K. (1996): Magnetic resonance imaging provides evidence for remodeling of the right ventricle after single-lung transplantation for pulmonary hypertension. In: *Circulation* 94 (9 Suppl), S. 9.

Nagendran, Jayan; Archer, Stephen L.; Soliman, Daniel; Gurtu, Vikram; Moudgil, Rohit; Haromy, Alois et al. (2007): Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. In: *Circulation* 116 (3), S. 238–248. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655266.

Newby, L. Kristin; Marber, Michael S.; Melloni, Chiara; Sarov-Blat, Lea; Aberle, Laura H.; Aylward, Philip E. et al. (2014): Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: a

randomised phase 2 trial. In: *Lancet* 384 (9949), S. 1187–1195. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60417-7.

Nishida, Kazuhiko; Yamaguchi, Osamu; Hirotsu, Shinichi; Hikoso, Shungo; Higuchi, Yoshiharu; Watanabe, Tetsuya et al. (2004): p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. In: *Molecular and cellular biology* 24 (24), S. 10611–10620. DOI: 10.1128/MCB.24.24.10611-10620.2004.

Novoyatleva, Tatyana; Janssen, Wiebke; Wietelmann, Astrid; Schermuly, Ralph T.; Engel, Felix B. (2013a): TWEAK/Fn14 axis is a positive regulator of cardiac hypertrophy. In: *Cytokine* 64 (1), S. 43–45. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.05.009.

Novoyatleva, Tatyana; Schymura, Yves; Janssen, Wiebke; Strobl, Frederic; Swiercz, Jakub M.; Patra, Chinmoy et al. (2013b): Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. In: *Basic research in cardiology* 108 (2), S. 325. DOI: 10.1007/s00395-012-0325-x.

Ogo, Takeshi; Chowdhury, H. M.; Yang, Jun; Long, Lu; Li, Xiaohui; Torres Cleuren, Yamila N et al. (2013): Inhibition of overactive transforming growth factor- $\beta$  signaling by prostacyclin analogs in pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48 (6), S. 733–741. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0049OC.

Park, John E S; Shao, Dongmin; Upton, Paul D.; Desouza, Patricia; Adcock, Ian M.; Davies, Rachel J. et al. (2012): BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. In: *PloS one* 7 (1), S. e30075. DOI: 10.1371/journal.pone.0030075.

Pasque, M. K.; Trulock, E. P.; Cooper, J. D.; Triantafillou, A. N.; Huddleston, C. B.; Rosenbloom, M. et al. (1995): Single lung transplantation for pulmonary hypertension. Single institution experience in 34 patients. In: *Circulation* 92 (8), S. 2252–2258.

Patel, Monal; Predescu, Dan; Tandon, Rajive; Bardita, Cristina; Pogoriler, Jennifer; Bhorade, Sangeeta et al. (2013): A novel p38 mitogen-activated protein kinase/Elk-1 transcription factor-dependent molecular mechanism underlying abnormal endothelial cell proliferation in plexogenic pulmonary arterial hypertension. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (36), S. 25701–25716. DOI: 10.1074/jbc.M113.502674.

- Patel, Rajendrakumar; Aronow, Wilbert S.; Patel, Laxeshkumar; Gandhi, Kaushang; Desai, Harit; Kaul, Dhiraj; Sahgal, Sumir P. (2012): Treatment of pulmonary hypertension. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 18 (4), S. 9.
- Price, Laura C.; Wort, S. John; Perros, Frédéric; Dorfmueller, Peter; Huertas, Alice; Montani, David et al. (2012): Inflammation in pulmonary arterial hypertension. In: *Chest* 141 (1), S. 210–221. DOI: 10.1378/chest.11-0793.
- Rabinovitch, Marlene (2012): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (12), S. 4306–4313. DOI: 10.1172/JCI60658.
- Ray, L. B.; Sturgill, T. W. (1988): Insulin-stimulated microtubule associated protein kinase is detectable by analytical gel chromatography as a 35-kDa protein in myocytes, adipocytes, and hepatocytes. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 262 (1), S. 307–313.
- Reid, M. R. (1924): Partial occlusion of the pulmonary aorta and inferior vena cava with the metallic band. Observations on changes in the vessel wall and in the heart. In: *J. Exp. Med.* 40 (3), S. 289–291.
- Ren, Jie; Zhang, Shaosong; Kovacs, Attila; Wang, Yibin; Muslin, Anthony J. (2005): Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 38 (4), S. 617–623. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2005.01.012.
- Rhodes, Jann (2005): Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 98 (3), S. 1092–1100. DOI: 10.1152/jappphysiol.01017.2004.
- Rockman, H. A.; Ono, S.; Ross, R. S.; Jones, L. R.; Karimi, M.; Bhargava, V. et al. (1994): Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (7), S. 2694–2698.
- Rottman, Jeffrey N.; Ni, Gemin; Brown, Michael (2007): Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. In: *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 24 (1), S. 83–89. DOI: 10.1111/j.1540-8175.2006.00356.x.

Rudski, Lawrence G.; Lai, Wyman W.; Afilalo, Jonathan; Hua, Lanqi; Handschumacher, Mark D.; Chandrasekaran, Krishnaswamy et al. (2010): Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. In: *J Am Soc Echocardiogr* 23 (7), S. 685. DOI: 10.1016/j.echo.2010.05.010.

Ryan, J.; Bloch, K.; Archer, S. L. (2011): Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. In: *International journal of clinical practice. Supplement* (172), S. 15–34. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2011.02710.x.

Ryan, John J.; Archer, Stephen L. (2014): The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. In: *Circulation research* 115 (1), S. 176–188. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301129.

Ryan, John J.; Huston, Jessica; Kutty, Shelby; Hatton, Nathan D.; Bowman, Lindsay; Tian, Lian et al. (2015): Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. In: *The Canadian journal of cardiology* 31 (4), S. 391–406. DOI: 10.1016/j.cjca.2015.01.023.

Ryan, John J.; Marsboom, Glenn; Archer, Stephen L. (2013): Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. In: *Handb Exp Pharmacol* 218, S. 105–149. DOI: 10.1007/978-3-642-38664-0\_5.

Salvador, Jesus M.; Mittelstadt, Paul R.; Guszczynski, Tad; Copeland, Terry D.; Yamaguchi, Hiroshi; Appella, Ettore et al. (2005): Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. In: *Nature immunology* 6 (4), S. 390–395. DOI: 10.1038/ni1177.

Sarov-Blat, Lea; Morgan, John M.; Fernandez, Pedro; James, Rachel; Fang, Zixing; Hurle, Mark R. et al. (2010): Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces inflammation after coronary vascular injury in humans. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (11), S. 2256–2263. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.209205.

Saurin, A. T.; Martin, J. L.; Heads, R. J.; Foley, C.; Mockridge, J. W.; Wright, M. J. et al. (2000): The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in



- preconditioned ventricular myocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (14), S. 2237–2246. DOI: 10.1096/fj.99-0671com.
- Schermuly, Ralph T.; Ghofrani, Hossein A.; Wilkins, Martin R.; Grimminger, Friedrich (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. In: *Nature reviews. Cardiology* 8 (8), S. 443–455. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.87.
- See, Fiona; Thomas, Walter; Way, Kerrie; Tzanidis, Alex; Kompa, Andrew; Lewis, Dion et al. (2004): p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. In: *Journal of the American College of Cardiology* 44 (8), S. 1679–1689. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.07.038.
- Seeger, Florian H.; Sedding, Daniel; Langheinrich, Alexander C.; Haendeler, Judith; Zeiher, Andreas M.; Dimmeler, Stefanie (2010): Inhibition of the p38 MAP kinase in vivo improves number and functional activity of vasculogenic cells and reduces atherosclerotic disease progression. In: *Basic research in cardiology* 105 (3), S. 389–397. DOI: 10.1007/s00395-009-0072-9.
- Shibley, R. A.; Shibley, L. J.; Wearn, J. T. (1937): The capillary supply in normal and hypertrophied hearts of rabbits. In: *J. Exp. Med.* 65 (1), S. 29–42.
- Simonneau, Gerald; Gatzoulis, Michael A.; Adatia, Ian; Celermajer, David; Denton, Chris; Ghofrani, Ardeschir et al. (2013): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. 41. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.029.
- Simonneau, Gérald; Robbins, Ivan M.; Beghetti, Maurice; Channick, Richard N.; Delcroix, Marion; Denton, Christopher P. et al. (2009): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1 Suppl), S. 54. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.04.012.
- Stamm, Jason A.; Risbano, Michael G.; Mathier, Michael A. (2011): Overview of current therapeutic approaches for pulmonary hypertension. In: *Pulmonary circulation* 1 (2), S. 138–159. DOI: 10.4103/2045-8932.83444.

- Steiner, S.; Strauer, B. E. (2009): Pathophysiologie des rechten Ventrikels bei Lungenerkrankungen. In: *Der Internist* 50 (9), S. 1054. DOI: 10.1007/s00108-009-2334-x.
- Stenmark, Kurt R.; Fagan, Karen A.; Frid, Maria G. (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. In: *Circulation research* 99 (7), S. 675–691. DOI: 10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f.
- Stenmark, Kurt R.; Meyrick, Barbara; Galie, Nazzareno; Mooi, Wolter J.; McMurtry, Ivan F. (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297 (6), S. 32. DOI: 10.1152/ajplung.00217.2009.
- Sturgill, T. W.; Ray, L. B. (1986): Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 134 (2), S. 565–571.
- Sy, Jay C.; Seshadri, Gokulakrishnan; Yang, Stephen C.; Brown, Milton; Oh, Teresa; Dikalov, Sergey et al. (2008): Sustained release of a p38 inhibitor from non-inflammatory microspheres inhibits cardiac dysfunction. In: *Nature materials* 7 (11), S. 863–868. DOI: 10.1038/nmat2299.
- Tarnavski, Oleg (2009): Mouse surgical models in cardiovascular research. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 573, S. 115–137. DOI: 10.1007/978-1-60761-247-6\_7.
- Tarnavski, Oleg; McMullen, Julie R.; Schinke, Martina; Nie, Qing; Kong, Sekwon; Izumo, Seigo (2004): Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. In: *Physiological genomics* 16 (3), S. 349–360. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00041.2003.
- Tei, C.; Ling, L. H.; Hodge, D. O.; Bailey, K. R.; Oh, J. K.; Rodeheffer, R. J. et al. (1995): New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy. In: *Journal of cardiology* 26 (6), S. 357–366.

Tenhunen, Olli; Soini, Ylermi; Ilves, Mika; Rysä, Jaana; Tuukkanen, Juha; Serpi, Raisa et al. (2006): p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (11), S. 1907–1909. DOI: 10.1096/fj.05-5618fje.

Thenappan, T.; Shah, S. J.; Rich, S.; Tian, L.; Archer, S. L.; Gomberg-Maitland, M. (2010): Survival in pulmonary arterial hypertension: a reappraisal of the NIH risk stratification equation. In: *The European respiratory journal* 35 (5), S. 1079–1087. DOI: 10.1183/09031936.00072709.

Tuder, Rubin M.; Archer, Stephen L.; Dorfmueller, Peter; Erzurum, Serpil C.; Guignabert, Christophe; Michelakis, Evangelos et al. (2013a): Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. 12. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.025.

Tuder, Rubin M.; Marecki, John C.; Richter, Amy; Fijalkowska, Iwona; Flores, Sonia (2007): Pathology of pulmonary hypertension. In: *Clinics in chest medicine* 28 (1), S. 23. DOI: 10.1016/j.ccm.2006.11.010.

Tuder, Rubin M.; Stacher, Elvira; Robinson, Jeffrey; Kumar, Rahul; Graham, Brian B. (2013b): Pathology of pulmonary hypertension. In: *Clinics in chest medicine* 34 (4), S. 639–650. DOI: 10.1016/j.ccm.2013.08.009.

Underwood, D. C.; Osborn, R. R.; Bochnowicz, S.; Webb, E. F.; Rieman, D. J.; Lee, J. C. et al. (2000): SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279 (5), S. 902.

Urashima, Takashi; Zhao, Mingming; Wagner, Roger; Fajardo, Giovanni; Farahani, Sara; Quertermous, Tom; Bernstein, Daniel (2008): Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295 (3), S. H1351-H1368. DOI: 10.1152/ajpheart.91526.2007.

van de Veerdonk, Mariëlle C; Marcus, J. Tim; Bogaard, Harm-Jan; Vonk Noordegraaf, Anton (2014): State of the art: advanced imaging of the right ventricle and pulmonary circulation in humans (2013 Grover Conference series). In: *Pulmonary circulation* 4 (2), S. 158–168. DOI: 10.1086/675978.

van Suylen, R J; Smits, J. F.; Daemen, M. J. (1998): Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 157 (5 Pt 1), S. 1423–1428. DOI: 10.1164/ajrccm.157.5.9709050.

Ventetuolo, Corey E.; Klinger, James R. (2012): WHO Group 1 pulmonary arterial hypertension: current and investigative therapies. In: *Progress in cardiovascular diseases* 55 (2), S. 89–103. DOI: 10.1016/j.pcad.2012.07.002.

Victor Eisenmenger (1897): Die Angeborenen Defecte der Kammerscheiderwand des Herzens. In: *Zeitschrift für Klinische Medizin* 32, 1897 (32), S. 1–28.

Voelkel, N. F.; Tuder, R. M. (2000): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? In: *The Journal of clinical investigation* 106 (6), S. 733–738. DOI: 10.1172/JCI11144.

Voelkel, Norbert F.; Gomez-Arroyo, Jose; Abbate, Antonio; Bogaard, Harm J.; Nicolls, Mark R. (2012): Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. In: *The European respiratory journal* 40 (6), S. 1555–1565. DOI: 10.1183/09031936.00046612.

Voelkel, Norbert F.; Mizuno, Shiro; Bogaard, Harm J. (2013): The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 304 (7), S. 65. DOI: 10.1152/ajplung.00335.2012.

Voelkel, Norbert F.; Quaife, Robert A.; Leinwand, Leslie A.; Barst, Robyn J.; McGoon, Michael D.; Meldrum, Daniel R. et al. (2006): Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. In: *Circulation* 114 (17), S. 1883–1891. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.632208.

Vonk-Noordegraaf, Anton; Haddad, François; Chin, Kelly M.; Forfia, Paul R.; Kawut, Steven M.; Lumens, Joost et al. (2013): Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. 33. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.027.

Wang, Y.; Huang, S.; Sah, V. P.; Ross, J.; Brown, J. H.; Han, J.; Chien, K. R. (1998a): Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38

mitogen-activated protein kinase family. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (4), S. 2161–2168.

Wang, Y.; Su, B.; Sah, V. P.; Brown, J. H.; Han, J.; Chien, K. R. (1998b): Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in ventricular muscle cells. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5423–5426.

Weerackody, Roshan P.; Welsh, David J.; Wadsworth, Roger M.; Peacock, Andrew J. (2009): Inhibition of p38 MAPK reverses hypoxia-induced pulmonary artery endothelial dysfunction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 296 (5), S. 20. DOI: 10.1152/ajpheart.00977.2008.

Weibel, E. R.; Gomez, D. M. (1962): Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. In: *Science (New York, N.Y.)* 137 (3530), S. 577–585.

Weissmann, Norbert; Grimminger, Friedrich; Seeger, Werner (2006a): Hypoxia in lung vascular biology and disease. In: *Cardiovascular research* 71 (4), S. 618–619. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.07.003.

Weissmann, Norbert; Sommer, Natascha; Schermuly, Ralph Theo; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich (2006b): Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. In: *Cardiovascular research* 71 (4), S. 620–629. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.04.009.

Welsh, D. J.; Scott, P.; Plevin, R.; Wadsworth, R.; Peacock, A. J. (1998): Hypoxia enhances cellular proliferation and inositol 1,4, 5-triphosphate generation in fibroblasts from bovine pulmonary artery but not from mesenteric artery. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 158 (6), S. 1757–1762. DOI: 10.1164/ajrcm.158.6.9706054.

Welsh, David J.; Peacock, Andrew J. (2013): Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. In: *High altitude medicine & biology* 14 (2), S. 111–116. DOI: 10.1089/ham.2013.1016.

Welsh, David J.; Scott, Pamela H.; Peacock, Andrew J. (2006): p38 MAP kinase isoform activity and cell cycle regulators in the proliferative response of pulmonary and

- systemic artery fibroblasts to acute hypoxia. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 19 (2), S. 128–138. DOI: 10.1016/j.pupt.2005.04.008.
- Will, D. H.; Alexander, A. F.; Reeves, J. T.; Grover, R. F. (1962): High altitude-induced pulmonary hypertension in normal cattle. In: *Circulation research* 10, S. 172–177.
- Wood, P. (1958a): Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. In: *British heart journal* 20 (4), S. 557–570.
- Wood, P. (1958b): The Eisenmenger syndrome or pulmonary hypertension with reversed central shunt. I. In: *British medical journal* 2 (5098), S. 701–709.
- Yamboliev, I. A.; Hedges, J. C.; Mutnick, J. L.; Adam, L. P.; Gerthoffer, W. T. (2000): Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (6), S. 907.
- Yang, Teddy T C; Xiong, Qiufang; Enslin, Hervé; Davis, Roger J.; Chow, Chi-Wing (2002): Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. In: *Molecular and cellular biology* 22 (11), S. 3892–3904.
- Yin, Huiqiu; Zhang, Jidong; Lin, Haiqing; Wang, Rong; Qiao, Yun; Wang, Bo; Liu, Fenyue (2008): p38 mitogen-activated protein kinase inhibition decreases TNF $\alpha$  secretion and protects against left ventricular remodeling in rats with myocardial ischemia. In: *Inflammation* 31 (2), S. 65–73. DOI: 10.1007/s10753-007-9050-2.
- Young, Peter R. (2013): Perspective on the discovery and scientific impact of p38 MAP kinase. In: *Journal of biomolecular screening* 18 (10), S. 1156–1163. DOI: 10.1177/1087057113497401.
- Yu, Min; Gong, Dapeng; Lim, Min; Arutyunyan, Anna; Groffen, John; Heisterkamp, Nora (2012): Lack of bcr and abr promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. In: *PloS one* 7 (11), S. e49756. DOI: 10.1371/journal.pone.0049756.
- Yu, Yanzhe; Xiao, Yonglong; Wang, Hui; Li, Junyang; Zuo, Xiangrong; Wang, Hong; Xie, Weiping (2013): Protective effect of nicorandil on hypoxia-induced apoptosis in HPAECs through inhibition of p38 MAPK phosphorylation. In: *Mol Med Rep* 7 (3), S. 816–820. DOI: 10.3892/mmr.2013.1255.
- Zhang, Bo; Luo, Ying; Liu, Man-Ling; Wang, Jing; Xu, Dun-Quan; Dong, Ming-Qing et al. (2012): Macrophage migration inhibitory factor contributes to hypoxic pulmonary

vasoconstriction in rats. In: *Microvascular research* 83 (2), S. 205–212. DOI: 10.1016/j.mvr.2011.09.014.

Zhang, Shaosong; Weinheimer, Carla; Courtois, Michael; Kovacs, Attila; Zhang, Cindy E.; Cheng, Alec M. et al. (2003): The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 111 (6), S. 833–841. DOI: 10.1172/JCI16290.

Zhao, Mingming; Chow, Amy; Powers, Jennifer; Fajardo, Giovanni; Bernstein, Daniel (2004): Microarray analysis of gene expression after transverse aortic constriction in mice. In: *Physiological genomics* 19 (1), S. 93–105. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00040.2004.

Zhu, A-Nan; Wang, Shu-Jun; Wang, Yuan-Yuan; Jin, Ke-Ke; Wang, Wan-Tie (2012): [Role of P38-MAPK signal transduction pathway and effect of panax notoginoside in rats with hypoxic hypercapnia pulmonary hypertension]. In: *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology* 28 (1), S. 79–83.

## 11 Publikationsverzeichnis

- Kojonazarov, Baktybek; Novoyatleva, Tatyana; Sabiska, Zaneta; Janssen, Wiebke; Tian, Xia; Luitel, Himal; **Kriechling, Philipp**; Newman, Julia; Evans, Steven; Grimminger, Friedrich; Weissmann, Norbert; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Seeger, Werner; Schermuly, Ralph T. Schermuly (2014):  
Inhibition of P38 Mapk Improves Heart Function in Sustained Pressure-overload Induced Right Ventricular Hypertrophy and Failure. In Circulation 130 (Suppl 2), pp. A15100.
- Baktybek Kojonazarov; Wiebke Janssen; Xia Tian; Himal Luitel; Zaneta Sibinska; Julia Newman; **Philipp Kriechling**; Tatyana Novoyatleva; Steven Evans; Friedrich Grimminger; Norbert Weissmann; Hossein A. Ghofrani; Werner Seeger; Ralph T. Schermuly (2014):  
Inhibition Of p38 MAPK Improves Heart Function In Pressure-Overload Induced Right Ventricular Remodeling. In: A106. MOLECULAR MECHANISMS OF RIGHT VENTRICULAR DYSFUNCTION: American Thoracic Society (American Thoracic Society International Conference Abstracts), pp. A2340-A2340.



## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. T. Schermuly für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und gute Zusammenarbeit. Es war eine großartige Erfahrung und wertvolle Chance in der AG Schermuly im ECCPS arbeiten zu dürfen.

Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Wiebke Janssen für die tatkräftige Unterstützung. Ohne ihre Motivation, Geduld und Unterstützung bei der Planung und Erstellung der Arbeit, wäre diese nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Baktybek Kojonazarov für die wissenschaftliche und menschliche Unterstützung bei der Erarbeitung des Themas. Vielen Dank für die Durchführung der echokardiographischen Untersuchung.

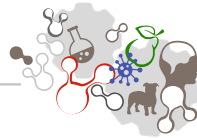
Ich danke meinen Mitstreiterinnen Frau Dr. med. vet. Julia Neumann und Frau Dr. med. vet. Janina Kolb für die lustige Zeit und die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Christina Vroom für die Einarbeitung in viele Arbeitstechniken und ihre ständige Bereitschaft, mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Danke für die Lösung vieler Unwägbarkeiten.

Vielen Dank Jan Schneider, einem guten Freund und Mitstreiter, für kurzweilige und lustige Momente innerhalb und außerhalb des Labors.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen lieben Eltern Annette und Henri danken. Es ist ein gutes Gefühl durch ihr Vertrauen und ihre Liebe jederzeit einen festen Rückhalt zu haben. Ihr wart immer für mich da. Danke, dass es euch gibt.

Ein ganz lieber Dank gilt auch meinem Bruder Florian, da er immer für mich da ist und mich durch alle Höhen und Tiefen des Lebens begleitet.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6599-7



9 783835 1965997