

Aus dem  
Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie  
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

dem Zentrum für Innere Medizin  
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Ralph Schermuly

**Modulation des cGMP-Signalweges  
zur Therapie der experimentellen  
pulmonalen Hypertonie**

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

Eingereicht von  
**Michaela Claudia Lang geb. Zöllmann**  
Tierärztin aus Gießen

Gießen  
2012

---

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer  
Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener  
Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 16.01.2013

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre:

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

Michaela Claudia Lang, Gießen 2012

---

Ergebnisse dieser Arbeit wurden an folgender Stelle veröffentlicht:

**Lang M, Kojonazarov B, Tian X, Kalymbetov A, Weissmann N, Grimminger F, Kretschmer A, Stasch JP, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT.**

The Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Riociguat Ameliorates Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia and SU5416 in Rats.

PLoS One. 2012;7(8):e43433. Epub 2012 Aug 17.

---

*MEINEN ELTERN*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>14</b>
1.1 Einführung in die Thematik.....	14
1.2 Pulmonale Hypertonie.....	16
1.2.1 Definition.....	16
1.2.2 Einteilung .....	16
1.2.3 Klinik.....	19
1.2.4 Diagnose .....	20
1.3 Euler-Liljestrand-Mechanismus.....	22
1.4 Chronische Hypoxie .....	23
1.5 Gefäßumbauprozesse.....	24
1.6 Tiermodelle.....	27
1.6.1 Monocrotalin.....	27
1.6.2 Hypoxie.....	28
1.6.3 Hypoxie + Su5416.....	29
1.6.4 Pneumektomie.....	31
1.7 Therapie.....	33
1.7.1 Konservative Therapieformen.....	34
1.7.1.a ) Basistherapie.....	34
1.7.1.b ) Kalziumkanalblocker.....	34
1.7.1.c ) Prostacycline.....	35
1.7.1.d ) Endothelin-A/B-Rezeptorantagonisten.....	36
1.7.1.e ) Selektive Endothelin-A-Rezeptorantagonisten.....	36
1.7.1.f ) Phosphodiesterase-5-Inhibitoren.....	37
1.7.2 Chirurgische Therapie.....	38
1.7.3 Neue Therapieansätze.....	38

1.8 Der NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweg.....	39
1.8.1 Der PDE-5-Hemmer Sildenafil.....	42
1.8.2 Der sGC-Stimulator Riociguat.....	44
1.9 Ziel der Arbeit.....	46
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.1 Material.....	47
2.1.1 Versuchstiere.....	47
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung.....	47
2.1.3 Substanzen und Injektionslösungen.....	48
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.4.a ) Tierexperimente.....	49
2.1.4.b ) Histologie.....	52
2.1.5 Lösungen, Kits und Antikörper für Färbungen.....	53
2.1.6 Systeme und Geräte.....	56
2.1.6.a ) Tierexperimente.....	56
2.1.6.b ) Histologie.....	57
2.1.6.c ) Hypoxiemodell.....	58
2.1.6.d ) Echokardiographie.....	58
2.2 Methoden.....	59
2.2.1 Tiermodell der Su5416/Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.....	59
2.2.2 Aufteilung der Tiergruppen.....	60
2.2.3 Therapeutische Intervention.....	61
2.2.3.a ) Behandlung mit Sildenafil.....	61
2.2.3.b ) Behandlung mit Riociguat.....	61
2.2.3.c ) Behandlung der Placebo-Tiere.....	61
2.2.4 Echokardiographie.....	62
2.2.5 Hämodynamische Messungen am Ganztier.....	65
2.2.6 Histologie .....	68

2.2.7 Morphometrische Auswertung.....	73
2.2.7.a ) Analyse des Muskularisierungsgrades.....	73
2.2.7.b ) Analyse der Wandstärke, Neointima und des Okklusionsindex	74
2.2.7.c ) Analyse des Proliferationsindex.....	75
2.2.7.d ) Analyse des Kollagengehalts des rechten Ventrikels.....	75
2.2.8 Statistische Auswertung.....	76
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>77</b>
3.1 Allgemeinbefinden und Nebenwirkungen unter Therapie.....	77
3.2 Invasive Untersuchung.....	78
3.2.1 Systemisch arterieller Druck.....	78
3.2.2 Rechtsventrikulärer systolischer Druck.....	79
3.2.3 Herzratio (RV/LV+S).....	80
3.3 Echokardiographie.....	81
3.3.1 Herzminutenvolumen (HMV).....	81
3.3.2 Lungengefäßwiderstand (TPR).....	82
3.3.3 Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (RVID).....	83
3.3.4 Wandstärke des rechte Ventrikels (RVWT).....	84
3.3.5 Pulmonal-arterielle Akzelerationszeit (PAAT).....	85
3.3.6 Myokardialer Leistungsindex (Tei-Index).....	86
3.3.7 Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (TAPSE).....	87
3.3.8 Überblick der ermittelten echokardiographischen Parameter.....	88
3.4 Histologie.....	89
3.4.1 Mediale Wandstärke.....	89
3.4.2 Muskularisierungsgrad.....	90
3.4.3 Okklusionsindex.....	92
3.4.4 Neointimaproliferation.....	94
3.4.5 Proliferationsindex (PCNA).....	96
3.4.6 Kollagengehalt des rechten Ventrikels.....	97

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>99</b>
4.1 Wahl des Tiermodells.....	99
4.2 Effekte von Sildenafil bzw. Riociguat auf die Hämodynamik.....	103
4.3 Effekte von Sildenafil bzw. Riociguat auf kardiale Struktur u.Funktion....	107
4.4 Effekte von Sildenafil bzw. Riociguat auf die Gefäßmorphometrie.....	110
4.5 Klinische Relevanz und Ausblick.....	115
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>117</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>143</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
5`GMP	5`Guanosinmonophosphat
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AkdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
ANOVA	Analysis of variance: Varianzanalyse
APAH	Assoziierte pulmonal-arterielle Hypertonie
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMPR2	Bone-morphogenetic-protein-Rezeptor-2
BNP	Brain natiuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Bodyweight: Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation: immunphänotypische Oberflächenmerkmale
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomografie
CTEPH	Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien
d	Day: Tag

EGF	Epidermal Growth Factor
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ESC:	European Society of Cardiology
FPAH	Familiär pulmonal-arterielle Hypertonie
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
Hox	Hypoxie
HMV	Herzminutenvolumen
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IPAH	Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
l	Liter
LV	linker Ventrikel
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPI	Myocardial performance index: Myokardialer Leistungsindex
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	Neuronale NO-Synthase

NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAAT	Pulmonary artery acceleration time: pulmonal-arterielle Akzelerationszeit
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PBS	Phosphate buffered saline: phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Personal Computer
PCH	Pulmonal kapilläre Hämangiomatose
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
pGC	Particulate guanylate cyclase: partikuläre Guanylatzyklase
pH	<i>potentia hydrogenii</i> : negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PH	Pulmonale Hypertonie
PCWP	Pulmonary capillary wedge pressure: Verschlussdruck
RV	Rechter Ventrikel
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung
RVID	Right ventricular inner diameter: Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels
RVSP	Right ventricular systolic pressure: Rechtsventrikulärer systolischer Druck
RVWT	Right ventricular wallthickness: Wandstärke des rechten Ventrikels
s.	siehe
S	Septum
SAP	Systemic arterial pressure: Systemisch-arterieller Druck
SEM	Standard error mean: Standardfehler
sGC	Soluble guanylate cyclase: lösliche Guanylatzyklase

Su5416	Sugen 5416
Tab.	Tabelle
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion: systolische Bewegung des Trikuspidalanulus
tägl.	täglich
TPR	Total pulmonary resistance: Lungengefäßwiderstand
u.	und
U	Units
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vs.	versus: gegen, im Vergleich zu
WHO	World Health Organisation: Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Bei dem am häufigst vorkommenden Element auf der Erde handelt es sich um Sauerstoff (ALLÈGRE et al. 2001). Nach der Entdeckung 1771 durch Karl Wilhelm Scheele (PILGRIM 1950) wurde schnell seine existenziellen Bedeutung für das Leben auf der Erde klar. Der für alle aeroben Organismen lebensnotwendige Prozess der Atmung bezeichnet die gesamten Vorgänge der Sauerstoffaufnahme und damit verbundenen Kohlendioxidabgabe.

Die Lunge ist das Hauptorgan der Atmung. Hier gelangt der Sauerstoff der Luft in das Blut, welches ihn zum Gewebe transportiert. Die eingeatmete Luft enthält neben rund 78Vol% Stickstoff, 20,9Vol% Sauerstoff. Weitere Bestandteile sind Argon, Kohlenstoffdioxid und Spuren anderer Gase. Mit jedem Atemzug strömt die Luft durch Nase oder Mund in die Luftröhre, von dort in die beiden Hauptbronchien, die sich zunehmend weiter verzweigen und schließlich in das letzte Kompartiment, die Lungenbläschen (Alveolen), münden. Diese besitzen eine sehr geringe Grenzschicht von etwa 0,3-0,7 $\mu$ m zwischen ventilertem und durchblutetem Gebiet. Dadurch kann alleine per Diffusion ein Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidaustausch zwischen Luft und Blut stattfinden.

Für diesen Gasaustausch sind die Partialdrücke der Gase die treibenden Kräfte. Sie betragen in der Alveole für Sauerstoff 100mmHg und für CO<sub>2</sub> 40mmHg, im Blut der Lungenarterie (*A. pulmonalis*) 40mmHg für O<sub>2</sub> und 46mmHg für Kohlendioxid. Aus diesen Differenzen lässt sich die Sauerstoffaufnahme von den Alveolen ins Blut und Kohlendioxidabgabe vom Blut in die Alveolen erklären. In Ruhe werden pro Minute 0,3l Sauerstoff von der Lunge zum Gewebe befördert, indem das Herz etwa 5l Blut in den Lungen- und anschließend den Körperkreislauf pumpt (SILBERNAGL & DESPOPOULOS 1990).

Pathologische Veränderungen im Gasaustauschs können auf verminderte

Durchblutung der Alveolarkapillaren, ein Diffusionshindernis oder schlechte Belüftung der Lungenbläschen zurückzuführen sein.

In Deutschland starben im Jahr 2010 laut Angaben des Statistischen Bundesamtes rund 60.000 Menschen an einer Lungenerkrankung, damit liegen die Krankheiten des Atmungssystems nach Neoplasien und Krankheiten des Kreislaufsystems auf Platz 3 der Statistik der Todesursachen. Neben der hohen Mortalität sind Lungenerkrankungen mit einer erheblichen Krankheitslast verbunden, die zu weitreichenden Einschränkungen des Wohlbefindens und der Lebensqualität der Patienten führt.

Der Blutkreislauf kann in ein Hoch- und ein Niederdrucksystem eingeteilt werden, wobei die Arterien des Körperkreislaufs dem Hochdrucksystem, die Venen, Kapillaren und der gesamte Lungenkreislauf dem Niederdrucksystem zugeordnet werden. Erkrankungen, die durch eine Störung des Blutdrucks im Lungenkreislauf gekennzeichnet sind, werden als pulmonale Hypertonie zusammengefasst. Ernst von Romberg beschrieb bereits 1891 das Krankheitsbild des pulmonalen Hochdrucks. Schätzungsweise über 25 Millionen Menschen sind weltweit von dieser schweren Krankheit betroffen (ELLIOTT et al. 2010).

Durch unentwegte Forschung an neuen Behandlungsmöglichkeiten konnte in den letzten Jahren eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik sowie eine verlängerte Überlebenszeit erzielt werden (HUBER et al. 2007). Dennoch existiert noch keine zufriedenstellende Therapie und die pulmonale Hypertonie bleibt bis heute eine unheilbare Erkrankung.

## **1.2 Pulmonale Hypertonie**

### **1.2.1 Definition**

Bei gesunden Personen liegt der physiologische pulmonale Druck bei  $14\pm 3\text{mmHg}$ , mit einer oberen Grenze von  $20\text{mmHg}$  (BADESCH et al. 2009, KOVACS et al. 2009). Die Erkrankung der pulmonalen Hypertonie wurde durch die European Society of Cardiology (ESC) definiert. Als von pulmonaler Hypertonie betroffen gelten Personen, deren mittlerer pulmonaler Blutdruck  $25\text{mmHg}$  in Ruhe überschreitet. Werte zwischen  $21\text{-}25\text{mmHg}$  gelten als grenzwertig (GALI et al. 2010, NEF et al. 2010).

Eine früher verwendete Definition, welche eine Blutdruckangabe während körperlicher Anstrengung beinhaltete, wurde verworfen, da auch gesunde Menschen während körperlicher Ertüchtigung pulmonal-arterielle Drücke von über  $30\text{mmHg}$  erreichen können (NAEIJJE et al. 1993, KOVACS et al. 2009).

### **1.2.2 Einteilung**

Während der WHO-Konferenz 1973 fand eine Einteilung in eine primäre und auf Grund anderen Grunderkrankungen auftretende, sekundäre pulmonale Hypertonie statt. Diese Klassifizierung wird inzwischen als veraltet angesehen und wurde auf dem vierten Weltkongress 2008 zur pulmonalen Hypertonie in Dana Point von einer neuen Klassifikation abgelöst.

Hierbei unterscheidet man 5 große Gruppen der pulmonalen Hypertonie: die der „pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH)“, der „pulmonalen Hypertonie bei Linksherzerkrankungen“, der „Erkrankungen der Lunge bzw. Hypoxie“, der „chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie“ und eine letzte Gruppe, in der alle seltenen Erkrankungen mit unklarer multifaktorieller Genese

zusammengefasst werden.

- 1.) Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)
  - 1.1 Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH)
  - 1.2 Familiär pulmonal-arterielle Hypertonie (FPAH)
    - 1.2.1 BMPR2 Genmutation
    - 1.2.2 ALK1, Endoglin Genmutation
    - 1.2.3 unbekannte Ursache
  - 1.3 Arzneimittel- und Toxin-induzierte pulmonal-arterielle Hypertonie
  - 1.4 Assoziierte pulmonal-arterielle Hypertonie (APAH)
    - 1.4.1 Kollagenosen
    - 1.4.2 HIV-Infektionen
    - 1.4.3 Portale Hypertonie
    - 1.4.4 angeborene Herzfehlern
    - 1.4.5 Schistosomiasis
    - 1.4.6 Chronisch hämolytische Anämie
  - 1.5. Persistierende pulmonal-arterielle Hypertonie bei Neugeborenen
- 1'.) Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)
- 2.) Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens
  - 2.1 Systolische Dysfunktion
  - 2.2 Diastolische Dysfunktion
  - 2.3 Herzklappenerkrankungen
- 3.) Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
  - 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
  - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung
  - 3.3 andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
  - 3.4 Schlafapnoe-Syndrom
  - 3.5 Alveoläre Hyperventilation
  - 3.6 Chronische Höhenkrankheit
  - 3.7 Fehlbildungen in der Entwicklung
- 4.) Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)
- 5.) Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
  - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
  - 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonare Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
  - 5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
  - 5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse

Tab. 1: Gruppenübersicht der pulmonalen Hypertonie, modifiziert nach GALIE et al. 2010.

Eine weitere Einteilung kann anhand der funktionellen Schweregrade festgelegt werden, die während der Evian Konferenz 1998 determiniert und durch die Venedig Konferenz 2003 bestätigt wurde (BARST et al. 2004). Sie wird vor allem für die Einschätzung einer Prognose und Therapieentscheidung verwendet. Die vier Klassen unterteilen die diagnostizierten Schweregrade von Klasse 1 der Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkungen der körperlichen Belastbarkeit, über Klasse 2 und 3 der Patienten mit leichten Einschränkungen bzw. deutlicher Einschränkung bei körperlicher Anstrengung bis hin zur Klasse 4. In dieser letzten Klasse werden alle Patienten zusammengefasst, die zu keinerlei Belastungen ohne Beschwerden fähig sind, sowie Patienten, die bereits in Ruhe Symptome einer manifesten Rechtsherzsinsuffizienz, wie Müdigkeit und Dyspnoe, aufweisen.

Über die Verteilung der verschiedenen Krankheitsgruppen existieren unterschiedliche Daten. In Europa wird von einer Prävalenz von etwa 15-50 PAH-Patienten pro Million Einwohner ausgegangen (PAECCOCK et al. 2007). Bei einer klinischen Studie eines echokardiologischen Labors lag die Prävalenz einer pulmonalen Hypertonie von 4579 untersuchten Herzpatienten bei 10,5%. Davon ließen sich 78,7% auf eine Linksherzerkrankung zurückführen (Gruppe 2), 9,7% auf Lungenerkrankungen und Hypoxie (Gruppe 3), 4,2% der Patienten fielen in Gruppe 1 der pulmonal-arteriellen Hypertonie, 0,6% in Gruppe 4 der PH aufgrund chronischer Thromboembolien und in 6,8% der Fälle war es nicht möglich eine klare Ursache zu diagnostizieren (Gruppe 5) (GABBAY & PLAYFORD 2007).

### 1.2.3 Klinik

Die klinischen Erscheinungen von an pulmonaler Hypertonie erkrankten Personen sind lange Zeit sehr unspezifisch und variieren individuell. Auf Grund dieser oft unklaren ersten Symptome dauert es im Schnitt 2 Jahre bis zu einer endgültigen Diagnosestellung (TAICHMANN & MANDEL 2007).

Im frühen Stadium der Erkrankung zeigen Patienten oft eine asymptomatische Phase. Die sich daran anschließenden Symptome, die etwa bei einem Lungendruck zwischen 30 bis 40mmHg auftreten, sind meist uneindeutig. Es kommt zu Dyspnoe bei Belastung, Synkopen und vorzeitiger Erschöpfung durch das Unvermögen das Herzminutenvolumen während körperlicher Ertüchtigung zu erhöhen (RICH et al. 1987). Der stets weiter steigende Blutdruck der Pulmonalarterie führt im Endstadium zu dominierenden Symptomen eines beginnenden Rechtsherzversagens, wie stark eingeschränkte körperliche Belastbarkeit, Kreislaufstörungen und Müdigkeit.

Pulmonaler Hochdruck tritt im Verhältnis von 1,7 : 1 vermehrt bei Frauen als Männern auf (NAUSER & STITES 2001). Die höchste Prävalenz findet sich in der Altersgruppe der 20-40Jährigen (RUBIN 1997). Im Patientenkreis der über 50Jährigen stellt das *Cor pulmonale*, die Folge eines pulmonalen Hochdrucks, das dritthäufigste Herzleiden nach coronaren und hypertensiven Krankheiten dar (NAUSER & STITES 2001).

Vor Einführung spezifischer Therapien betrug die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung einer pulmonal-arteriellen Hypertonie 2,8 Jahre (D'ALONZO et al. 1991, HUMBERT et al. 2004). Durch die Entwicklung neuer, gezielter wirkender Medikamente konnte die Überlebensrate nach 3 Jahren auf 60% erhöht werden (HUBER et al. 2007).

#### **1.2.4 Diagnose**

Als Goldstandard der Diagnosestellung einer pulmonalen Hypertonie gilt die invasive Methode der Rechtsherzkatheterisierung (BUDEV et al. 2003). Sie ist das einzige diagnostische Mittel, mit welchem direkt eine Druckerhöhung des Lungenkreislaufs festzustellen ist. Es können Aussagen über den pulmonalen und systemischen Gefäßwiderstand gegeben sowie der Herzaustoß und das Herzminutenvolumen errechnet werden. Mit diesen Angaben ist eine Prognose über die Funktionalität des Herzens, das letztlich limitierende Organ, möglich. Es werden vor allem die Drücke im rechten Atrium und Ventrikel, in der Pulmonalarterie sowie der pulmonal-arterielle Verschlussdruck gemessen. Dieser pulmonal-arterielle Verschlussdruck (PCWP: pulmonary capillary wedge pressure) ist ein wichtiger Parameter für die Einteilung in prekapilläre und postkapilläre pulmonale Hypertonie. Ein PCWP über 15mmHg spricht für eine pulmonale Hypertonie auf Grund einer Linksherzerkrankung, Drücke darunter für eine andere Form der PH (OUDIZ 2007, GALI et al. 2009).

Transthorakale Echokardiographie stellt eine weitere wichtige Form der Diagnosestellung dar. Sie ist eine günstige, einfache und reproduzierbare Möglichkeit nichtinvasiv eine Angabe über den pulmonal-arteriellen Druck erheben zu können (SCHANNWELL et al. 2007). Ein weiterer Parameter, der auf Diagnosestellung, Einordnung zur jeweiligen klinischen Klasse und genauen Typs der vorliegenden pulmonalen Hypertonie Einfluss nimmt, ist neben dem Herzultraschall auch die Elektrokardiographie. So konnte in einer Studie von RICH et al. mittels EKG eine Rechtsherzvergrößerung in 87% der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (RICH et al. 1987).

Weitere Untersuchungen zur Diagnosestellung sind Thoraxröntgen, CT und die Serologie. Hier wird vor allem der Biomarker BNP (brain natriuretic peptide) als einfacher, nichtinvasiver Marker des Schweregrades der Erkrankung ermittelt (LEUCHTE et al. 2004). Speziellere Diagnostika sind beispielsweise die

Ventilations-Perfusionsszintigraphie, welche der Unterscheidung zwischen chronisch thromboembolischer und anderer Formen der pulmonalen Hypertonie dient (NAUSER & STITES 2001).

Ein einfacher direkter Test besteht in der Überprüfung der Lungenfunktion durch körperliche Ertüchtigung. Beim 6-Minuten-Gehtest kann eine Einschätzung der physischen Beeinträchtigung und Einordnung in die entsprechende Klasse der NYHA erfolgen. In einer Untersuchung von MIYAMOTO et al. 2000 legten gesunde Personen im Durchschnitt  $655 \pm 91$ m zurück. An pulmonaler Hypertonie erkrankte Patienten schafften im Mittel nur  $297 \pm 188$ m. Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen gelaufener Wegstrecke und Einordnung in die funktionellen Klassen. Auch wurde deutlich, dass der 6-Minuten-Gehtest eine prognostische Aussage besitzen kann, da ein Zusammenhang zwischen gelaufener Strecke und dem Mortalitätsrisiko der jeweiligen Patienten bestand (MIYAMOTO et al. 2000). Ein weiterer Vorteil dieses Gehtests ist die einfache Kontrolle des Therapieerfolgs bei unter Behandlung stehenden Patienten (BUDEV et al. 2003).

### 1.3 Euler-Liljestrand-Mechanismus

Der 1946 von Ulf von Euler und Göran Liljestrand beschriebene Zusammenhang zwischen Lungenperfusion und -ventilation wird als hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion bezeichnet (VON EULER & LILJESTRAND 1946). Kommt es in einem Teil der Lunge zu einer verminderten Belüftung, führt der dadurch auftretende lokale Sauerstoffmangel zu einer reflexartigen Vasokonstriktion. Dies verhindert den Blutfluss durch diesen Lungenbereich zu Gunsten besser belüfteter Areale. Durch diesen Regelmechanismus wird in der Lunge eine optimale Oxygenierung des Blutes gewährleistet.

Bis heute ist noch nicht abschließend geklärt, welche grundlegenden Mechanismen an der als Antwort auf Hypoxie stattfindenden Vasokonstriktion beteiligt sind. Es wird vermutet, dass durch den sinkenden Sauerstoffpartialdruck in den glatten Gefäßmuskelzellen der Lunge der Kalium-Strom durch spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle verringert wird und so das Membranpotential abfällt. Die dadurch ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt zu einer Phosphorylierung von Myosin durch die Myosin-Leichtketten-Kinase und löst dadurch die Gefäßkonstriktion aus (WEISSMANN et al. 2001). Dabei ist bislang unklar, ob Kalzium aus intrazellulären Speichern stammt oder extrazellulären Ursprungs ist (YUAN et al. 1993, SATO et al. 2000).

Aus dem sinnvollen physiologischen Mechanismus bei akuter Hypoxie begrenzt auf einen Lungenabschnitt, formt jedoch das Einwirken chronischer Hypoxie einen pathologischen Regelkreis: Der generalisierte Sauerstoffmangel führt in der gesamten Lunge zu einer Vasokonstriktion und damit zu einem verstärkten Gefäßwiderstand. Dies wiederum führt zu einem strukturellen Gefäßumbauprozess, dem pulmonal vaskulären Remodeling. Die physiologisch dünnwandigen kleinen Lungengefäße weisen proliferative Veränderungen in allen drei Gefäßschichten (Endothel, Muskularis und Adventita) auf. Sie verdicken sich,

werden starr und besitzen ein kleineres Lumen. Dies führt zu einer fortschreitenden verminderten pulmonalen Durchblutung und verstärkt somit die Hypoxie (MEYRICK 2001, PIETRA et al. 2004, MOOI & GRÜNBERG 2006, TUDER 2009).

## **1.4 Chronische Hypoxie**

Die Ursachen der pulmonalen Hypertonie sind mannigfaltig. Chronischer Sauerstoffmangel in der Atemluft ist einer der wesentlichen Ursachen, die zu einem Gefäßumbau in den Pulmonalarterien und somit zum Lungenhochdruck führen (HISOLP & REID 1976; RABINOWITCH et al. 1979). Die meisten Säugetiere zeigen eine Druckerhöhung im Lungenkreislauf, nachdem man sie in eine hypoxische Umgebung bringt (TUCKER et al. 1975). Eine Ausnahme stellen beispielsweise Pfeifhasen, Yaks und Lamas dar, bei denen trotz chronischer Hypoxie keine Gefäßumbauprozesse festzustellen sind (DURMOWICZ et al. 1993, JONES & REID 1995, RHODES 2005).

Eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks zeigte sich auch bei Menschen, die sich in großen Höhen aufhalten. So wiesen Versuchspersonen schon nach einem 40tägigen Aufenthalt auf dem Mount Everest einen gesteigerten Lungendruck auf. Verminderte Reaktionen auf applizierte Vasodilatoren ließen außerdem auf bereits stattgefundene Gefäßumbauprozesse schließen (GROVES et al. 1987, HOUSTON et al. 1987).

Charakterisiert ist dieser Gefäßumbau im Wesentlichen durch eine Kombination aus Verdickung der Adventitia und Media der kleinen Pulmonalarterien sowie Okklusion durch Neointimaproliferation und Ausbildung plexiformer Endothelläsionen.

## **1.5 Gefäßumbauprozesse**

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine Krankheit der kleinen Lungenarterien, charakterisiert durch exzessives Remodeling der Gefäße, was zu einem progressiven Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes und folglich einem zunehmenden pulmonal-arteriellen Druck führt (HUBER et al. 2004, 2007).

Die beim vaskulären Remodeling stattfindenden strukturellen und funktionellen Gefäßumbauprozesse bestehen aus einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher verschiedener Zelltypen. Sie umfassen mannigfaltige Interaktionen zwischen Endothel, Muskularis und Adventitia (OLSCHEWSKI & SEEGER 1994, VAN-SUYLEN et al. 1998). Es kommt zu intimaler Fibrose, Mediaverdickung und Neointimaproliferation sowie plexiformen Läsionen (RUBIN 1997). Durch diese Veränderungen in allen drei Gefäßschichten wird die Elastizität der Gefäße verringert, der Querschnitt eingeengt und die pulmonale Hypertonie manifestiert sich (HEATH 1993, BOTNEY 1994).

In der Adventitia zeigt sich als erste Reaktion auf verminderte Sauerstoffverfügbarkeit eine Proliferation von Fibroblasten. Es bilden sich vermehrt kontraktile und extrazelluläre Matrixproteine. Diese spielen wiederum eine Rolle beim Wachstum der Muskularis, da sie vermutlich für eine parakrine Aktivierung glatter Muskelzellen, deren Hypertrophie und Proliferation verantwortlich sind (REID & DAVIES 1989, BELKNAP et al. 1997, STENMARK & MECHAM 1997). Die Zellen des Endothels scheinen ein direktes Ziel der Hypoxie zu sein. Hier findet man Hypertrophie und Hyperplasie, Neointimaproliferation sowie einer Vergrößerung des subendothelialen Raumes. Es kommt zu einer Erhöhung der Permeabilität. Vermutlich ist dieser Influx von Plasmaproteinen eine wichtige Voraussetzung für das ablaufende vaskuläre Remodeling. Zum anderen kommt es zu einem Abfall des anti-thrombotischen Potential sowie zu einem Anstieg der Proteinsynthese und vermehrten Sezernierung von Entzündungsmediatoren. Diese Zunahme von pro-thrombotischen und pro-

inflammatorischen Faktoren dient wahrscheinlich dem Anlocken von für das vaskuläre Remodeling notwendigen Progenitorzellen an die Gefäßwände. (MEYRICK & REID 1979, 1980, REID & DAVIES 1989, BELKNAP et al. 1997, STENMARK & MECHAM 1997). Die sich bildenden plexiformen Läsionen sind ein Kennzeichen schwerer humaner PAH. Es handelt sich um schnell proliferierende Endothelzellen, welche durch Konvolutbildung kleinster Gefäßkanäle das Lumen der Pulmonalarterien vollständig einengen (TUDER 1994, RUBIN 1997, ABE et al. 2010).

Je nach Gefäßgröße unterscheiden sich die anzutreffenden Gefäßveränderungen. Große Pulmonalarterien zeigen vor allem in der Media und Adventitia eine Zunahme der Wandstärke. Es werden vermehrt Kollagen, Elastin und glattmuskuläre Zellen angetroffen. Distale muskularisierte Arterien weisen mehr glatte Muskelzellen auf, die Fibroblasten der Adventitia werden zu Myofibroblasten (SHORT et al. 2004). Die vorher nicht muskularisierten kleinen Alveolargefäße zeigen eine *de novo* Muskularisierung als erstes Anzeichen einer Hypoxie. Diese Reaktion auf eine verminderte Sauerstoffversorgung ist gleichzeitig auch das erste, das sich nach Normalisierung der Sauerstoffverhältnisse wieder zurückbildet (VOELKEL & TUDER 2000, STENMARK et al. 2006).

Durch die zunehmende Gefäßfestigkeit wird der vorher gleichmäßige Blutfluss pulsatil und fördert durch steigende Scherkräfte weiter das Gefäßremodeling (STENMARK et al. 2009). Hinzu kommt eine sinkende Produktion und Aktivität der Vasodilatoren Stickstoffmonoxid sowie Prostacyclin (AARONSON et al. 2002). Als freigesetzte vasokonstriktorische Substanzen gelten unter anderem Serotonin und Endothelin (VOELKEL & TUDER 2000). Die Nachlast des rechten Herzens erhöht sich durch die Gefäßfestigkeit und den steigenden Gefäßwiderstand um einen Faktor von 30-40 und führt letztlich zum *Cor pulmonale* (BADESCH et al. 1989, FALLER 1999, HERGET et al. 2000, LE CRAS & MCMURTRY 2001).

Die den genannten Gefäßveränderungen zu Grunde liegenden biochemischen

Mechanismen sind weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise auf eine erhöhte Expression von Endothelin-1, Angiopoietin-1 sowie eine verminderte Expression von endothelialer NO-Synthase und Prostacyclin-Synthase (TUDER et al. 2007). Auch Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF, IGF-1 und EGF scheinen eine wichtige Rolle beim Gefäßremodeling zu spielen (HUMBERT et al. 2004b, AUSTIN & LOYD 2007). Vor allem die genauen Ursachen der Entstehung der plexiformen Läsionen sind unklar. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass es einige Zeit in Anspruch nimmt, bis es zu einer Ausbildung dieser Arteriopathien kommt (HEATH et al. 1987) und auch Studien am Rattenmodell weisen darauf hin, dass sich vergleichbare Gefäßveränderungen erst nach mehreren Wochen manifestieren (ABE et al. 2010). Es ist bisher ungeklärt, ob die plexiformen Läsionen ein Grund für oder nur ein Effekt von pulmonalem Hochdruck sind.

## 1.6 Tiermodelle

### 1.6.1 Monocrotalin

Das 1961 erstmalig beschriebene Monocrotalin-Modell (LALICH & MERKOW 1961) dient inzwischen neben dem Hypoxie-Modell als meist verwendete Methode zur experimentellen Erzeugung von PAH in der Ratte. Trotz dieser jahrelangen Verwendung in der Forschung ist der genaue Mechanismus dennoch nicht komplett entschlüsselt (CAMPIAN et al. 2006). Nicht alle Tierarten sind empfänglich, so zeigen Mäuse nach Monocrotalin-Injektion keine pulmonale Hypertonie (DUMITRASCU et al. 2008).

Das primär untoxische Monocrotalin, welches aus den Samen der Pflanze *Crotalaria spectabilis* extrahiert werden kann, wird nach *subcutaner* Injektion durch das Cytochrom P450 3A Monooxygenase-System der Leber zu reaktiven alkylierenden Verbindungen (REID et al. 1997, 1998). Diese wiederum besitzen einen selektiven toxischen Effekt auf die Lungengefäße, die das nächst distale Gefäßbett nach der Toxifizierung in der Leber darstellen (MARSBOOM & JANSSENS 2004).

Dazu ist eine einmalige Injektion von 60mg/kg ausreichend. Die hervorgerufenen Endothelschäden führen zu einer Erhöhung der kapillären Permeabilität und so zu einem interstitiellen Ödem mit einer Anhäufung von Makrophagen. Gefolgt wird dieser initiale Prozess von fortschreitenden Veränderungen der Gefäßmorphologie, es kommt zu einer Hyperplasie der Gefäßmuskulatur und Adventitia. Dieses pulmonale Gefäßremodeling führt letztlich zu einer Erhöhung des Widerstands der Lungenstrombahn und so zum pulmonalen Hochdruck (MONNET & CHACHQUES 2005).

### **1.6.2 Hypoxie**

Ein Abfall des alveolaren Sauerstoffpartialdruckes führt zu einer Vasokonstriktion der pulmonalen Arterien (CAMPIAN et al. 2006). Dieser bereits vorangehend beschriebene Euler-Liljestrand-Mechanismus erklärt das Zusammenspiel von Ventilation und Perfusion der Lunge.

Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion nutzt man für ein Tiermodell der pulmonalen Hypertonie. Dafür kann die Hypoxie entweder durch einen reduzierten Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft in normobarer Haltung oder durch eine Tierhaltung in hypobarer Umgebung mit normoxischer Luftzusammensetzung erzeugt werden. Üblicherweise wird für Ratten und Mäuse eine normobare Sauerstoffkonzentration von 10% O<sub>2</sub> verwendet. Diese Sauerstoffkonzentration ist ausreichend, um die erwünschte pulmonale Hypertonie zu erzeugen (KERR et al. 1987, FUNG & LIU 1991, KLINGER et al. 1999).

Die durch die Hypoxie ausgelöste Vasokonstriktion führt zu einer erhöhten mechanischen Belastung und Scherspannung in den Lungengefäßen und mündet über den vorangehend beschriebenen Mechanismus in einem pulmonalen Hochdruck. Sowohl die glatten Gefäßmuskelzellen als auch die Fibroblasten der Adventitia proliferieren unter den hypoxischen Bedingungen. Eine signifikante Endothelzellproliferation tritt jedoch nicht auf (VOELKEL & TUDER 2000).

Die in diesem Modell durch Hypoxie ausgelösten Veränderungen der Lungenstrombahn sind nach einer Reexposition der Versuchstiere in eine normoxische Umgebung reversibel (STENMARK et al. 2009).

### 1.6.3 Hypoxie + Su5416

Das Su5416/Hypoxie Tiermodell ist eine Weiterentwicklung des reinen Hypoxie-Modells. Hypoxie alleine führt zwar zu Hypertrophie und Hyperplasie der Muskelschicht, das Endothel bleibt allerdings als Monolayer erhalten. Bei der schweren Form der humanen pulmonalen Hypertonie kommt es hingegen zur Ausbildung eines Clusters intraluminaler Zellen, welche die Lungengefäße verschließen (LEE et al. 1998, TARASEVICIENE-STEWART et al. 2000). Somit fehlt im Hypoxie-Modell die Nachahmung der Endothelveränderungen, die im Menschen gefunden werden. Auch das Monocrotalin-Modell kann diese Okklusion durch proliferierende Endothelzellen nicht nachahmen (MEYRICK & REID 1980, JONES 1997).

Durch die einmalige Injektion des VEGF-Rezeptor-Antagonisten Su5416 in Kombination mit Hypoxie kann die Auswirkung des reduzierten Sauerstoffgehaltes verstärkt werden und zu den oben genannten Endothelveränderungen führen (TARASEVICIENE-STEWART et al. 2006, OKA et al. 2007, ABE et al. 2010). Der Wachstumsfaktor VEGF ist ein wichtiger Überlebens- und Differenzierungsmediator für Endothelzellen. Seine Abwesenheit in Zellkultur ruft Apoptose hervor. Die Signaltransduktion findet über zwei hoch-affine transmembranöse Rezeptortyrosinkinasen (VEGF-R1 und VEGF-R2) statt, die autophosphoryliert zu einer Zunahme der Kinaseaktivität und damit einer erhöhten intrazellulären Signaltransduktion führen. Ein Knockout der VEGF-R1, VEGF-R2 oder VEGF Gene ist letal (CARMELIET et al. 1996). Hingegen führt eine Überexpression des Wachstumsfaktors zu Endothelzellproliferation und Hypervaskularisierung. Auch wurde publiziert, dass eine Überexpression von VEGF die Lunge vor hypoxisch induziertem pulmonalen Hochdruck schützt (PARTOVIAN et al. 2000).

Eine VEGF-Blockierung durch Su5416-Injektion ruft bei in Normoxie gehaltenen Ratten eine geringe Mediahypertrophie und somit leichte pulmonale Hypertonie

hervor (STENMARK et al. 2009). In Kombination mit Hypoxie, das heißt erhöhten vaskulären Scherkräften durch Vasokonstriktion, kommt es allerdings zu schwerer pulmonaler Hypertonie. Dafür ist eine einmalige *subcutane* Injektion, in der Regel von 20mg/kg ausreichend. Es wird vermutet, dass sich der Wirkstoff trotz einer kurzen Plasmahalbwertszeit durch seinen hydrophoben Charakter in den Lipidmembranen von Zellen ansammelt und so eine langfristige Wirkung hervorruft (MENDEL et al. 2000). Durch die Blockierung der VEGF-Rezeptors kommt es ausschließlich zu Veränderungen in der Lunge, andere Organe bleiben davon unangetastet (TARASEVICIENE-STEWART et al. 2000).

Zu Beginn tritt eine Apoptose von Endothelzellen ein. Dieses initiale Zellsterben ist gefolgt von einer Hyperproliferation der überlebenden Zellen. Das auf den ersten Blick paradox erscheinende überschießende Zellwachstum nach einer Wachstumsfaktor-Blockade wird erklärt, indem die Hyperproliferation einiger überlebender Zellen von Signalen der sterbenden Zellen getriggert wird (GOLPON et al. 2004).

Es findet eine Selektion auf tumorähnliche, apoptose-resistente Gefäßzellen statt. Diese vermehren sich durch eine scheinbar dysregulierte Angiogenese und verschließen so präkapilläre Arterien. Die okklusiven Wucherungen sind vor allem an Gefäßaufzweigungen zu finden, wahrscheinlich weil dort die mechanischen Kräfte am höchsten sind, welche die Proliferation weiter unterstützen. Ein ähnliches hyperproliferatives Potential wurde in isolierten Endothelzellen von humanen Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie gefunden (MASRI et al. 2007).

Dieses überschießende Zellwachstum kann durch die Gabe von Caspase-Inhibitoren verhindert werden, somit ist die primäre Selektion auf apoptose-resistente Zellen Voraussetzung für die sich anschließende Proliferation. Hierbei handelt es sich um multipotente Zellen, die Vorläuferzellen des Knochenmarks ähneln. Welcher Zelltyp genau für die Ausbildung der Neointima zuständig ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die Endothelzellen weisen phänotypische Veränderungen auf und ähneln glatten Muskelzellen. Es konnte

gezeigt werden, dass es sich bei den multipotenten Vorläuferzellen vor allem um c-Kit+ und CD34+ Zellen handelt (SAKAO et al. 2007).

Auch nach Reexposition der Versuchstiere in Normoxie bleiben die Veränderungen stabil (TARASEVICIENE-STEWARD 2001, OKA et al. 2007). In einer Studie konnte bei Ratten durch einmalige Su5416-Injektion und 3-wöchigen Aufenthalt in Hypoxie mit anschließender 11-wöchiger Haltung in Normoxie sogar ein Fortschreiten der Endothelveränderungen bis hin zur Entstehung plexiformer Läsionen beobachtet werden (ABE et al. 2010). Somit lässt sich in dem chronischen Su5416/Hypoxie Modell eine irreversible prekapilläre Proliferation der Endothelzellen finden ähnlich der Situation humaner PAH.

#### **1.6.4 Pneumektomie**

Wie bereits erwähnt, lässt sich mit der Gabe des Pflanzenalkaloids Monocrotalin das Krankheitsbild der humanen PAH in der Ratte imitieren. Im Gefäßremodeling kommt zu Muskularisierung und Zunahme der Wandstärke, doch die bei der menschlichen pulmonalen Hypertonie anzutreffenden okklusiven Endothelzellproliferationen sind nicht nachweisbar.

Kombiniert man jedoch die Monocrotalin-Applikation mit einer vorangegangenen einseitigen Pneumektomie, kann in den Pulmonalgefäßen der Versuchstiere eine Neointimaformation mit plexiformen Läsionen beobachtet werden (WHITE et al. 2007). Dabei ist die Entnahme eines Lungenlappens alleine ist nicht ausreichend. Entscheidend scheint die Verbindung aus Reizung durch Monocrotalin einerseits und Änderung der Hämodynamik durch Pneumektomie andererseits zu sein (STENMARK et al. 2009).

Pathologische Veränderungen zeigen sich bereits nach wenigen Tagen und verstärken sich innerhalb der folgenden Wochen. Eine Kombination aus einseitiger Pneumektomie und Monocrotalin-Gabe führt so vor allem in den

kleinen Pulmonalgefäßen zur Neointimabildung und Gefäßokklusion. Somit lassen sich in diesem Tiermodell zwei wichtige morphologische Parameter der humanen pulmonalen Hypertonie nachahmen (STENMARK et al. 2009, YI et al. 2000).

## **1.7 Therapie**

Die pulmonale Hypertonie des Menschen ist eine Krankheit, die eine hohe Mortalität aufweist und bisher nur ansatzweise zu therapieren ist (OLSCHEWSKI 2000). Bis heute ist eine komplette Heilung nicht möglich (TAICHMANN & MANDEL 2007).

Die aktuellen Therapieansätze zielen auf eine Beseitigung der primären Ursache der pulmonalen Druckerhöhung sowie auf eine langfristige Blutdrucksenkung im Lungenkreislauf durch möglichst pulmonal wirkende vasodilatatorische Medikamente. Der ebenfalls am Krankheitsbild beteiligte Faktor der fortschreitenden vaskulären Zellproliferation wird derzeit noch von keiner der behördlich zugelassenen Substanzen bekämpft (GHOFRANI et al. 2006).

Die jeweiligen Therapien richten sich nach dem Schweregrad sowie der Beseitigung eventuell zu Grunde liegender weiterer Erkrankungen. Es wird versucht eine Verbesserung der Überlebenszeit, Besserung der hämodynamischen Parameter in Ruhe und unter Belastung sowie eine Besserung der klinischen Symptomatik und Lebensqualität zu erzielen.

Es ist jedoch festzuhalten, dass durch eine konservative Therapie der Lungenhochdruck nicht ausheilen kann. Belastungstoleranz, Lebensqualität und Überlebensdauer der Betroffenen können jedoch deutlich verbessert werden (HUBER et al. 2007).

### **1.7.1 Konservative Therapieformen**

#### **1.7.1.a ) Basistherapie**

Die Basistherapie stellt eine Sauerstofftherapie sowie die Gabe von Diuretika dar, die dann individuell mit weiteren Medikamenten ergänzt wird. Die Rolle herzwirksamer Glykoside als Standardtherapie ist umstritten. Digoxin zeigte in manchen Patienten mit idiopathischer PAH und beginnendem Rechtsherzversagen eine kurze Verbesserung der Herzleistung, Langzeiteffekte einer chronischen Gabe konnten allerdings noch nicht bestätigt werden (HUBER et al. 2007).

Da eine intravaskuläre Thrombosebildung in vielen Patienten mit pulmonaler Hypertonie zu finden ist, stellt eine Behandlung mit Antikoagulantien einen weiteren wichtigen Therapieansatz für eine verlängerte Überlebenszeit dar. Auch ein angemessenes körperliches Training begünstigt die Prognose einer pulmonalen Hypertonie. Eine Überanstrengung, die zu Synkopen und thorakalen Schmerzen führt, sollte dabei jedoch stets vermieden werden (MERELES et al. 2006).

#### **1.7.1.b ) Kalziumkanalblocker**

Kalziumkanalblocker hemmen spannungsabhängige Kalziumkanäle und verhindern so das Einströmen von Kalziumionen vor allem in glatte Muskelzellen sowie Herzmuskelzellen. Dieser Einstrom führt normalerweise zu einer Änderung des Membranpotentials und daraus resultierend zu einer Muskelkontraktion, welche wiederum eine Gefäßverengung bewirkt.

Die Substanzklasse der Kalziumkanalblocker wird nur bei Patienten eingesetzt,

die eine nachgewiesene Verbesserung des pulmonalen Druckes unter einem kurz wirksamen Vasodilatator aufweisen. Bei diesem Patientenkreis scheint vor allem noch eine starke Vasokonstriktion als Ursache der pulmonalen Hypertonie in Frage zu kommen. Dies spricht für ein frühes Krankheitsstadium, in dem der stattfindende Gefäßumbau noch eine untergeordnete Rolle spielt (SITBON et al. 2004). Kommt es durch den Wirkstoff hingegen eher zu einer generellen Gefäßerweiterung mit sinkendem systemischen Druck, steigt das Risiko eines Rechtsherzversagens.

Die Dosis wird individuell nach Wirksamkeit und Verträglichkeit titriert. Zum Einsatz kommen vor allem Nifedipin (120-140mg/d), Diltiazem (360-900mg/d) oder Amlodipin (15-30mg/d).

#### 1.7.1.c ) Prostacycline

Prostacycline bewirken eine Vasodilatation, indem sie an den G-Protein-gekoppelten Prostacyclin-Rezeptor der glatten Muskelzellen der Gefäße binden und zu einer Erhöhung der intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentration führen. Ein weiterer Aspekt ist die Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Hemmung der Thrombozytenaggregation (GERBER et al. 1980, CLAPP et al. 2002).

Der Nachteil dieser Medikamentengruppe ist die extrem kurze Halbwertszeit, so dass Prostacycline entweder intravenös (1-5ng/kg/min) per Dauertropf oder inhalativ (6-9 x 2,5-5µg) verabreicht werden müssen. In Japan und Korea ist neben diesen beiden Applikationsformen ein orales Prostazyklin-Analogon (Beraprost) auf dem Markt, welches in Deutschland und den USA allerdings keine Zulassung besitzt und in einer placebokontrollierten Studien keine Verbesserungen zeigte (BARST et al. 2003).

1.7.1.d ) Endothelin-A/B-Rezeptorantagonisten

Von den vasokonstriktorisch wirksamen Proteinen der Endotheline sind drei humane Isoformen bekannt (ET-1, ET-2, ET-3), von denen hauptsächlich Endothelin 1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PAH zukommt. Über die beiden Endothelinrezeptoren A und B, die hauptsächlich auf glatten Muskelzellen sowie Endothelien lokalisiert sind, bewirkt es eine intrazelluläre Zunahme von Kalziumionen und somit eine Gefäßverengung (IWAMURO et al. 1999, LEE & RUBIN 2005).

Der sowohl in den USA als auch seit 2002 in Europa zugelassene Endothelin-A/B-Rezeptorantagonist Bosentan besticht vor allem durch seine gute orale Verfügbarkeit und eine ausreichend lange Halbwertszeit, die eine zweimalige Anwendung pro Tag zulässt.

1.7.1.e ) Selektive Endothelin-A-Rezeptorantagonisten

In der Hoffnung Nebenwirkungen zu verringern, erfolgte 2006 die Zulassung des selektiven Endothelin-A-Rezeptorantagonisten Ambrisentan. Es liegen positive Behandlungsergebnisse vor (BARST et al. 2004; GALI et al. 2005). Ebenfalls scheint es im Gegensatz zur Behandlung mit dem dualen Rezeptorantagonist Bosentan Unterschiede im Auftreten von Leberenzym-Veränderungen zu geben (LEE & RUBIN 2005).

1.7.1.f) Phosphodiesterase-5-Inhibitoren

Die Phosphodiesterase-5 spielt eine wichtige Rolle im NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg (s. Kap. 1.8). Das Signalmolekül NO führt zu einer intrazellulären Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Levels (cGMP). cGMP wiederum ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der über eine Signalkaskade eine Gefäßerweiterung zur Folge hat (LINCOLN et al. 1976). Die Phosphodiesterase-5 ist am Abbau dieses second messengers beteiligt und wirkt dadurch der Gefäßdilatation entgegen. Eine medikamentelle Hemmung der PDE-5 stellt so einen interessanten Ansatz zur Unterstützung der Gefäßrelaxation dar. In den USA und Europa liegt eine Zulassung für die Phosphodiesterase-5-Inhibitoren Sildenafil und Tadalafil als Viagra® bzw. Cialis® zur Behandlung erektiler Dysfunktionen und als Revatio® bzw. Adcirca® für die Behandlung pulmonal-arterieller Hypertonie vor. Studien zeigten einen hochsignifikanten Effekt auf die Lebensqualität von Patienten mit PAH (SASTRY et al. 2004). Dosisempfehlungen liegen bei 3 x tägl 20mg für Sildenafil bzw. 1 x tägl 40mg für Tadalafil (Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ)). Es gibt Hinweise auf eine positive Beeinflussung der Therapie mit einem PDE-5-Inhibitor in Kombination mit Prostanoiden (GHOFRANI et al. 2004) und dem selektiven Endothelin-A-Rezeptorantagonisten Bostentan (HOEPER et al. 2004).

### **1.7.2 Chirurgische Therapie**

Die 1981 erstmals praktizierte Lungentransplantation ist eine Möglichkeit, das Leben von an pulmonaler Hypertonie erkrankten Personen zu retten. Vor allem bei Patienten mit drohendem Rechtsherzversagen spielt die Herz-Lungen-Transplantation eine entscheidende Rolle. Eine weitere Maßnahme die Hämodynamik akut erkrankter Patienten zu verbessern, ist die atriale Septostomie. Allerdings bringt dieser Schritt gleichzeitig eine Verschlechterung der arteriellen Sauerstoffversorgung mit sich und kann die Krankheitsursache nicht beheben. Dennoch stellt die Septostomie eine mögliche Variante zur Überbrückung der Zeit bis zur einer Transplantation dar (HUBER et al. 2009).

### **1.7.3 Neue Therapieansätze**

Moderne Therapien zielen nicht mehr ausschließlich auf eine Vasodilatation ab. Ein neuer Ansatz sind Medikamente mit antiproliferativen Wirkungen gegen das pulmonale Remodeling. Hierbei werden vor allem Krebsmedikamente eingesetzt, die die Zellwucherung der Gefäßwände und den daraus resultierenden Lumenverlust verhindern sollen. Besonders Hemmstoffe von Tyrosinkinase haben in präklinischen Versuchen und ersten klinischen Studien deutlich positive Ergebnisse gebracht. Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) - Rezeptorantagonist Imatinib zeigte eine eindeutige Wirksamkeit bei schwerer pulmonaler Hypertonie (GHOFRANI et al. 2005, 2010b). PDGF besitzt ein stark mitogenes Potential und ist unter anderem für die Proliferation und Migration von vaskulären Muskelzellen in der Lunge verantwortlich. Ebenso konnte mit dem Multi-Kinasehemmstoff Sorafenib neben der Erzielung einer Umkehrung des vaskulären Remodelings auch die Rechtsherzhypertrophie signifikant gesenkt werden (KLEIN et al. 2008).

## 1.8 Der NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweg

Robert F. Furchgott, Ferid Murad und Louis Ignarro wurden 1998 für die Entdeckung des Stickstoffmonoxid-Moleküls mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet. Murad benannte bereits in den 70er Jahren eine Substanz als "endothelial derived relaxing factor", die Furchgott und Ignarro als NO identifizierten.

NO ist ein hochpotenter körpereigener Vasodilator und spielt so eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus. Mit der seit langem etablierten Verwendung von Nitroglyzerin zur Behandlung von Herzerkrankungen wurde es indirekt schon seit vielen Jahrzehnten als Therapeutikum eingesetzt.

Stickstoffmonoxid entsteht durch die Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin, welche so zu Citrullin reduziert wird (MARLETTA 1988; MONCADA 1989). Für diese Reaktion sind NO-Syntasen essentiell. Ihre Hauptbildungsorte stellen das Epithel der Atemwege sowie Gefäßendothelzellen dar (GHOFRANI et al. 2004). Es gibt drei verschiedene Isoformen der NO-Synthasen: die endotheliale NO-Synthase eNOS bzw. NOS 3, die induzierbare NO-Synthase iNOS bzw. NOS 2 sowie die neuronale NO-Synthase nNOS bzw. NOS 1. Da inzwischen bekannt ist, dass die verschiedenen Isoformen in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommen, wird heute hauptsächlich die neutrale, zelltypunabhängige Nomenklatur NOS 1-3 verwendet. Für Abläufe im kardiovaskulären System spielt die NOS 3 die wichtigste Rolle (FÖRSTERMANN & KLEINERT 1995).

Auslösende Reize für die Aktivierung der NO-Syntasen ist zum einen die Rezeptoraktivierung durch körpereigene Substanzen, wie z.B. Acetylcholin und Noradrenalin. Des Weiteren können auch Druckkräfte des Blutes, vor allem steigende Scherkräfte, die NO-Synthaseaktivität erhöhen. In den Endothelzellen befindliche Scherkraft-sensitive Mechanorezeptoren können so eine schnelle Anpassung der Gefäßweite an sich ändernde Druckverhältnisse gewähren (CORSON et al.1996). Wird die NO-Synthase durch den Antagonisten NG-

Monomethyl-L-Arginin geblockt, kommt es zu einer Verstärkung der hypoxischen Vasokonstriktion (ARCHER et al. 1989.).

Hinsichtlich der NOS 3-Verfügbarkeit bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie zeigen sich verschiedene Studienergebnisse. Einige Arbeiten weisen eine verringerte Aktivität auf (GIAID & SALEH 1995, XU et al. 2004), andere hingegen beschrieben bei PH-Patienten eine erhöhte NOS 3-Expression (XUE & JOHNS 1995; TUDER et al. 1999).

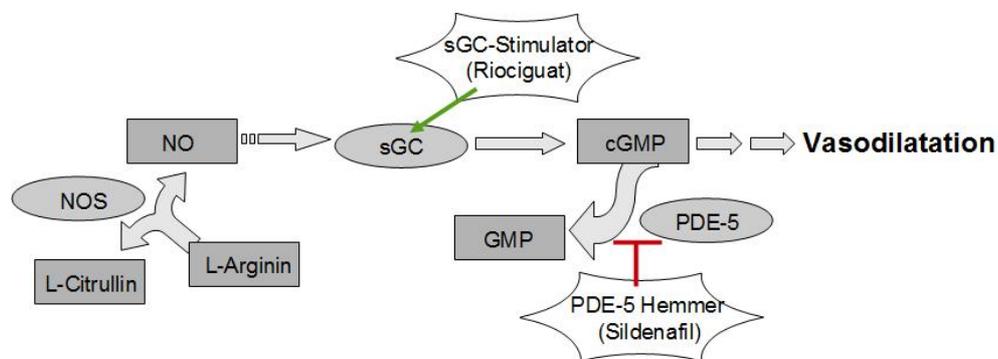


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweges mit möglichen therapeutischen Ansatzpunkten, modifiziert nach GHOFrani & GRIMMINGER 2009.

Die Wirkungsdauer von NO beträgt nur wenige Sekunden bis es mit Sauerstoffmolekülen reagiert und zu Nitrit bzw. Nitrat wird. Durch seine geringe Molekülgröße kann es ungehindert durch die Gefäßwand diffundieren. Zielort ist die lösliche Guanylatzyklase, hier bindet es an die Häm-Gruppe und aktiviert das Enzym (IGNARRO et al. 1987). In eukaryontischen Zellen existieren zwei Formen der Guanylatzyklase, eine lösliche (sGC) und eine partikuläre membrangebundene Form (pGC) (KIMURA & MURAD 1974). Das Enzym führt zu einer vermehrten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP).

Das so entstandene cGMP fungiert als second messenger, indem es durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen einen  $Ca^{2+}$ -Ausstrom und eine

Veränderung der Aktin-Myosin-Kontraktion bewirkt. Diese führt so zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzellen und folglich zu einer Vaso- bzw. Bronchodilatation (ARNOLD et al. 1977).

Beendet wird der Vorgang durch Phosphodiesterasen, welche das zyklische Guanosinmonophosphat zu 5`Guanosinmonophosphat (5`GMP) hydrolisieren (BEAVO & BRUNTON 2002). Bei den Phosphodiesterasen handelt es sich um eine Enzymfamilie, die aus insgesamt elf verschiedenen Isoenzymen (PDE-1 bis PDE-11) besteht. Sie alle besitzen eine homologe katalytische Domäne am C-terminalen Ende. Am N-Terminus befinden sich die Proteindomänen, welche für die Regulation der enzymatischen Aktivität zuständig sind (CONTI & BEAVO 2007). In der Lunge spielt vor allem die Phosphodiesterase-5 eine wichtige Rolle (MATSUMOTO et al. 2003).

### 1.8.1 Der PDE-5-Hemmer Sildenafil

Sildenafil oder 1-[[3-(1-Methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazin ist ein selektiver Hemmstoff der Phosphodiesterase-5, welche hauptsächlich in Lungengewebe, Thrombocyten sowie der glatten Gefäßmuskulatur der Corpora cavernosa vorkommt. Die Substanz greift somit in den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweg ein, in dem es den Abbau von cGMP verhindert und somit einer Vasokonstriktion entgegenwirkt (MATSUMOTO et al. 2003).

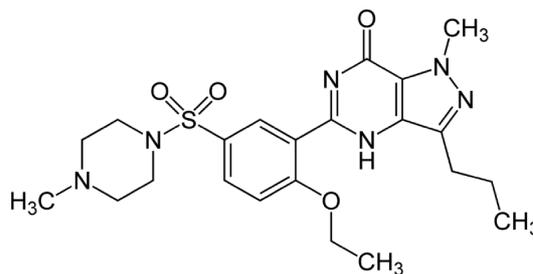


Abbildung 1.2: Strukturformel von Sildenafil

Verschiedene Studien zeigten eine erhöhte Expression von PDE-5 in peripheren pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen bei pulmonaler Hypertonie (MACLEAN et al. 1997, WHARTON et al. 2005). Sildenafil bindet an die katalytische Domäne der PDE-5 und hemmt sie so.

Durch die Gabe von Sildenafil lässt sich eine Verbesserung der Krankheitssituation sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien erzielen (GHOFRANI et al. 2002, GHOFRANI et al. 2003, SEBKHI et al. 2003, GHOFRANI et al. 2004a,b, SCHERMULY et al. 2004). Da der Wirkstoff ebenfalls eine

schwache Hemmwirkung auf die in der Retina vorkommende PDE-6 besitzt, können als Nebenwirkung unter anderem leichte Farbsehstörungen auftreten (SAENZ DE TEJADA et al. 2001, WEEKS et al. 2005).

Die erste Zulassung erhielt Sildenafil unter dem Namen Viagra® zur Behandlung der erektilen Dysfunktion. Das unter dem Handelsnamen Revatio® auf dem Markt befindliche Sildenafil hat eine Zulassung für die Behandlung von Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie der WHO-Funktionsklassen II und III. Indikation ist die Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ)).

Die empfohlene Dosierung für eine orale Gabe liegt bei 3 x täglich 20mg (GALI et al. 2005). Sildenafil wird schnell resorbiert und fördert für etwa 4 Stunden einen Abfall des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks und pulmonalen Gefäßwiderstandes (LEPORE et al. 2002) ohne dabei Einfluss auf den systemisch-arteriellen Druck zu haben (COHEN et al. 1996).

### 1.8.2 Der sGC-Stimulator Riociguat

Riociguat (BAY 63-2521) oder Methyl-N-[4,6-Diamino-2-[1-[(2-fluorphenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-pyrimidinyl]-N-methyl-carbaminat ist ein direkter NO-unabhängiger Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (EVGENOV et al. 2006).

Wie in Kap. 1.8 beschrieben führt eine Aktivierung der sGC zur Erhöhung des cGMP-Levels in der Zelle, wodurch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom und so eine Vasodilatation bewirken (ARNOLD et al. 1977).

Als NO-Stimulator kann Riociguat sowohl synergistisch als auch unabhängig von NO den cGMP Level erhöhen und so über die beschriebene Signalkaskade zu einer Gefäßdilatation führen.

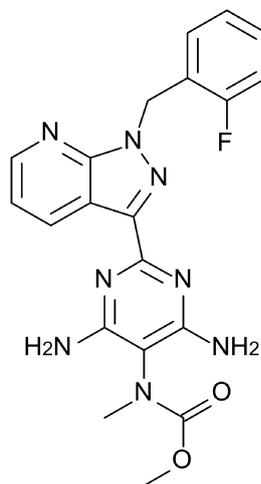


Abbildung 1.3: Strukturformel von Riociguat

In verschiedenen Studien führte eine Behandlung mit Riociguat zur Senkung des pulmonalen Drucks, einer Verringerung der Rechtsherzhypertrophie sowie einer Reduktion des vaskulären Remodelings der Lungengefäße (DUMITRASCU et al. 2006, EVGENOV et al. 2008, SCHERMULY et al. 2008). Der Wirkstoff befindet sich momentan in der klinischen Entwicklung der Firma Bayer Schering Pharma in

Phase III Studien.

Die kristalline Reinsubstanz ist oral verfügbar. Riociguat wird schnell resorbiert und zeigt eine maximale Plasmakonzentration nach 0,5-1,5 Stunden. Die durchschnittliche Halbwertszeit beträgt 5-10 Stunden. Es existiert keine allgemein gültige Dosierungsempfehlung. Die Plasmakonzentrationen von Riociguat variieren zwischen verschiedenen Patienten stark, so dass eine individuelle Titration empfohlen wird (FREY et al. 2008).

In einer klinischen Studie mit Patienten der funktionellen Klassen II und III zeigte sich eine gute Verträglichkeit bis zu einer 3 x täglichen Applikation von 2,5mg. Es kam zu einer signifikanten Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit sowie verschiedener hämodynamischer Parameter (GRIMMINGER et al. 2009).

## **1.9 Ziel der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit soll die therapeutische Wirkung des sGC-Stimulators Riociguat im Modell der Su5416/Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte untersucht werden. Im Vergleich dazu dient als positive Kontrolle der sich bereits im Handel befindliche PDE-5-Hemmer Sildenafil (Revatio®, Viagra®).

Neben den pathophysiologischen Aspekten, die sowohl durch echokardiographische als auch invasive hämodynamische Messungen analysiert werden, soll dabei besonderes Augenmerk auf pathohistologische Veränderungen gelegt werden. Durch das gewählte Tiermodell der Hypoxie in Kombination mit dem VEGF-Rezeptor-Antagonist Su5416 wird in der Ratte ein Gefäßremodeling ähnlich dem der humanen Erkrankung der PAH ausgelöst.

In der Fragestellung soll untersucht werden, ob durch eine therapeutische Intervention mit Sildenafil bzw. Riociguat diesen typischen Gefäßveränderungen in der Lunge entgegengewirkt und das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie gelindert werden kann.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Die für diese Arbeit nötigen Tierversuche wurden mit männlichen Ratten (*Rattus norvegicus*) des Aufzuchtstammes Sprague-Dawley (Farbe albino) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Auszuchtstamm. Lieferant sowie Zuchtbetrieb der Tiere ist die Firma Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland), wo die Sprague-Dawley Ratte als eingetragenes Warenzeichen unter der Handelsbezeichnung CD®-Ratte geführt wird.

Das Gewicht der Ratten lag zwischen 250–300g und entsprach damit etwa einem Alter von 8 Wochen. Vor Applikation von Substanzen wurde das genaue Körpergewicht der einzelnen Tiere bestimmt und exakt nach dem jeweiligen Gewicht dosiert. Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu jeweils fünf Ratten im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Dauer der Experimente gehalten. Die Umgebungstemperatur belief sich im Mittel auf 22°C, die Beleuchtungsdauer betrug dreizehn Stunden pro Tag. Die Fütterung erfolgte mit Altromin® Standarddiätfutter *ad libitum*. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser.

#### **2.1.2 Tierversuchsgenehmigung**

Die durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und können unter den Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 03/2009 und GI 20/10 Nr. 80/2009 eingesehen werden.

### 2.1.3 Substanzen und Injektionslösungen

50% 2-Propanol/ 1% Providonjod-Lösung (Braunoderm®)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Beatmungsgas (100% O <sub>2</sub> )	Air Liquid Siegen, Deutschland
Beatmungsgas (50%O <sub>2</sub> , 50% N <sub>2</sub> )	Air Liquid Siegen, Deutschland
Destilliertes Wasser	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,9% A.C.S. Spectrophotometric grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Formalin (Formaldehyd-Lösung 3.5-3.7%)	Otto Fischar GmbH&Co.KG Saarbrücken, Deutschland
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®)	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Isofluran (Isofluran Baxter®)	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid (Ketamin ®)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH Burgdorf, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid (Domitor®)	Pfizer GmbH Berlin, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung (0.9% NaCl)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Riociguat (Reinsubstanz)	
Sildenafil (Reinsubstanz)	
SU5416 Sigma-RBI S8442 - 25mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Substanzen und Injektionslösungen

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

### 2.1.4.a ) Tierexperimente

Atemkalk (Sodabsorb®)	Dräger Medical GmbH Lübeck, Deutschland
Augensalbe (Bepanthen® Augen- u.Nasensalbe)	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Combi-Stopper	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Dreiwegehahn (Discofix®)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe (Vasco® Nitril white)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe (Peha soft® nitrile)	Paul Hartmann AG Heidenberg, Deutschland
Einmalspritze (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml) (Inject®- Luer®)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml (Original Perfusor® Spritze)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme (Elca® Med Creme)	ASID BONZ Herrenberg, Deutschland
Eppendorf tubes (Microtubes 1.5ml)	Sarstedt AG & Ko Nürnbrecht, Deutschland
Falkonröhrchen 15 ml, 50 ml (Cellstar® Tubes)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Haushaltsbindfaden	

Kanülen (BD Microlance 3®) 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 GmbH Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband (Durapore®)	3M St. Paul, MN, USA
Mulltupfer, Größe 6, unsteril	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH München, Deutschland
Müllbeutel, schwarz Nr. 12	Coats GmbH Kenzingen, Deutschland
Operationsbesteck	Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland; Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Parafilm	American National Can Menasha, USA
Polyethylenkanüle (Vasofix® Safety®, 22G)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Rattenimmobilisator (Modell 81)	IITC Life Science Inc. Woodland Hills, USA
Silikonkatheter für Rechtsherzkatheterisation	Eigene Anfertigung
Skalpel (Feather® Disposable Scalpel) 10er, 11er, 20er	Pfm medical AG Köln, Deutschland
Ultraschallgel (Aquagel®)	Parker Laboratories Inc. Fairfield, USA

Venenkatheter (Intradyn <sup>™</sup> Venous Hemostasis Introducer)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Venenverweilkanüle 22 G und 20 G (Vasocan Braunüle®)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Wärmematte (ThermoLux®)	Witte + Sutor GmbH Murrhardt, Deutschland
Zellstofftupfer 5 x 4 cm (Pur-Zellin®)	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Unterlage	Tork Mannheim, Deutschland

*Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente*

2.1.4.b )      Histologie

Automatische Pipetten 100-1000µl, 10-100µl, 1-10µl (Eppendorf PhysioCare concept®)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Deckgläser 24x36mm	Menzel GmbH&Co.KG Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten (Rotilabo® Einbettkassette)	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium (Pertex®)	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Microtomklingen (S 35)	Produkte für Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger 25x75x1mm (SuperFrost Plus®)	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus®)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Pipettenspitzen 1000µl, 200µl, 100µl, 10µl	Sarstedt Nürnbrecht, Deutschland
Selecta Faltenfilter	Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland
Universal Einbettkassetten mit Deckel	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

*Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Histologie*

### 2.1.5 Lösungen, Kits und Antikörper für Färbungen

Albumin bovine Fraction V (BSA: Bovines Serum Albumin)	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin Antikörper (Monoclonal, mouse anti-human)	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Antikörper FL-261	Santa Cruz Biotchnology Inc Heidelberg, Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor Antikörper (Polyclonal, rabbit anti-human)	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Citrat Puffer	Invitrogen Corporation Camarillo, USA
DAB (Substrat Kit für Peroxidase SK-4100)	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Dinatriumphosphatdihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck Darmstadt, Deutschland
Eisen-Haematoxylin A nach Weigert	Division Chroma Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin B nach Weigert	Division Chroma Münster, Deutschland
Essigsäure	Merck Darmstadt, Deutschland
Ethanol (70%, 96%, 99.6%)	Otto Fischar GmbH&Co.KG Saarbrücken Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 - 3,7%	Otto Fischar GmbH&Co.KG Saarbrücken, Deutschland

Hämalaun nach Mayer, sauer	Division Chroma Münster, Deutschland
Hematoxylin (Hematoxylin QS H-3404)	Vector Laboratories Burlingame, USA
Horseradish peroxidase streptavidin	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Imm Press Anti-Rabbit Ig Peroxidase	Vector Laboratories Inc Burlingame, Canada
Isopropylalkohol (99.8%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot (Kernechtrot Aluminiumsulfat)	Waldeck GmbH&Co.KG Münster, Deutschland
Methanol, reinst	Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methylgrün	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland
Normal Horse Serum	Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
PAP Pen	G.Kisker GbR Steinfurt, Deutschland
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt	Fluka Chemie Buchs, Schweiz

Proteinkinase K	Dako Real™ Glostrup, Dänemark
R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit	Vector Laboratories Inc Burlingame, USA
Salzsäure 25%	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Sirius Rot F3B Lösung	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-Biotin-Blocking Kit	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Trypsin (Digest All2®)	Zytomed Berlin, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector NovaRED	Vector Laboratories Inc Burlingame, USA
Vector VIP (Vector®VIP substrate Kit for peroxidase SK-4600)	Vector/Linaris GmbH Wertheim-Bettingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (50%)	Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol, reinst	Carl Roth GmbH&Co Karlsruhe, Deutschland

*Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Lösungen, Kits und Antikörper für Färbungen*

## 2.1.6 Systeme und Geräte

### 2.1.6.a ) Tierexperimente

Beatmungssystem für Ratten (SAR- 830/P Ventilator)	IITH Life Science Inc. Woodland Hills, CA, USA
Blutanalysegerät (Rapidlab™ 348)	Bayer Healthcare Fernwald, Deutschland
Computer mit Monitor	
Druckaufnehmer APT300	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckwandler (Combitrans Monitoring Set Mod.II for Arterial Blood Pressure Management)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Eismaschine (Icematic F100 Compact)	CastelmacSPA Castelfranco, Italien
Feinwaage (Mettler Toledo PB303 Delta Range®)	Mettler Toledo Greifensee, Schweiz
Narkosekammer	Kreutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
O <sub>2</sub> Kontroller (Modell 4010)	Labotec Göttingen, Deutschland
Software von HSE Hämodyn W	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Tierwaage (Sauter RP 3000)	August Sauter GmbH Bayer Leverkusen, Deutschland
Zentrifuge (Hettich Mikro 200R)	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co.KG Tuttlingen, Deutschland

*Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Tierexperimente*

2.1.6.b ) Histologie

Computer (Q 550 IW)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
Digitale Kamera (DC300 F)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
Paraffinausgießstation (Leica EG 1140 H)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
geschlossener Vakuum Gewebe- infiltrationsautomat (Leica TP 1050)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
Kühlplatte (Leica EG 1150 C)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
Makro für -Muskularisierungsgrad -Wandstärke -Neointima -Kollagengehalt	Speziell entwickelt von Herrn Christoph Frank (Informatiker) Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch (Leica HI 1220)	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad (Leica HI 1210)	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom, vollautomatisch (Leica RM 2165)	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software (Q Win V3)	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht (DMLA)	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH&Co.KG Schwabach, Deutschland

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Histologie

2.1.6.c ) Hypoxiemodell

Blutanalysegerät ABL 330	Radiometer Kopenhagen, Dänemark
Filter (Iso-Gard®)	Teflex Medical GmbH Kernen, Deutschland
Membran Vakuumpumpe	KnF-Neuberger Freiburg, Deutschland
Sauerstoff-Controller (Modell 4010)	Labotec Göttingen, Deutschland
Sauerstoff-Sensor	Teledyne Analytical Instruments Kalifornien, USA
Kondensationswasserbecken	Kreutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland

*Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte des Hypoxiemodells*

2.1.6.d ) Echokardiographie

Ultraschallgerät Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Canada
Isofluranverdampfer mit -kammer	VetEquip Inc. Pleasanton, USA
Rektalthermometer	Indus Instruments Houston, USA

*Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte der Ultraschall-untersuchungen*

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tiermodell der Su5416/Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie**

Zur Erzeugung der pulmonalen Hypertonie wurden die Ratten in einem üblichen Tierkäfig gehalten, welcher sich in einer gasdicht verschlossenen, normobaren Kammer befand. Über eine entsprechende technische Anlage wurde den Tieren ein Atemgas zugeleitet, welches in seiner Zusammensetzung der Raumluft, jedoch mit reduzierter Sauerstoffkonzentration, entsprach (WEISSMANN et al. 2004). Mit Hilfe eines Steuergerätes wurde der Sauerstoffgehalt kontinuierlich erfasst und bei Bedarf durch Zuströmen von Sauerstoff bzw. Stickstoff konstant bei 10%O<sub>2</sub> gehalten. Dies entspricht dem üblichen Wert, der auch in anderen Experimenten verwendet wurde (FUNG & LIU 1991, KERR et al. 1987, TUCKER et al. 1975, KLINGER et al.1999).

Die Kontrolltiere wurden ebenfalls in einem handelsüblichen Tierkäfig in einem baugleichen System gehalten. Dieses bestand aus einer normobaren Kammer, der keine hypoxische Luft, sondern ein Atemgas mit einer 21%igen Sauerstoffkonzentration zugeführt wurde.

Durch die Atmung der Tiere entstehende Feuchtigkeit wurde mit Hilfe einer Kondensationskühlfalle aus dem geschlossenen System entfernt. Die Luftfeuchtigkeit lag im Mittel bei 60-65%. Der Kohlendioxid-Gehalt konnte durch Leitung der Luft über Atemkalk abgebunden werden. Zusätzlich zur Messung durch die Sauerstoffcontroller fand eine tägliche Kontrolle des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts durch eine Gasprobenuntersuchung mit dem Radiometer ABL 300 statt.

Zur Induktion einer stärkeren pulmonalen Hypertonie mit Neointimaprolieration erfolgte eine einmalige Injektion des VEGF-Rezeptor Antagonisten SU5416 in einer Dosis von 20mg/kg (TARASEVICIENE-STEWART et al. 2006; OKA et al. 2007). Dafür wurde der VEGFR Antagonist SU5416 gemäß der in der Produktinformation angegebenen Löslichkeit von 100mM mit DMSO aufgelöst

und den Tieren entsprechend dem jeweiligen Körpergewicht in einer Dosis von 20mg/kg *subcutan* injiziert.

Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde täglich überprüft. Das System wurde alle 2-3 Tage zum Reinigen der Käfige sowie zum Wechseln des Futters und Wassers kurz geöffnet und das Körpergewicht der Ratten notiert.

### **2.2.2 Aufteilung der Tiergruppen**

Die Versuchsanordnung bestand aus 5 verschiedenen Tiergruppen:

1. Normoxie nach 35 Tagen (n = 10)
2. Su5416 Injektion + Hypoxie nach 21 Tagen (n = 10)
3. Su5416 Injektion + Hypoxie nach 35 Tagen,  
Therapie mit 2%iger Methylcellulose, der Trägersubstanz für Sildenafil  
bzw. Riociguat, von Tag 21 bis Tag 35 (n = 10)
4. Su5416 Injektion + Hypoxie nach 35 Tagen,  
Therapie mit Sildenafil 50 mg/kg/d von Tag 21 bis Tag 35 (n = 10)
5. Su5416 Injektion + Hypoxie nach 35 Tagen,  
Therapie mit Riociguat 10 mg/kg/d von Tag 21 bis Tag 35 (n = 10)

### 2.2.3 Therapeutische Intervention

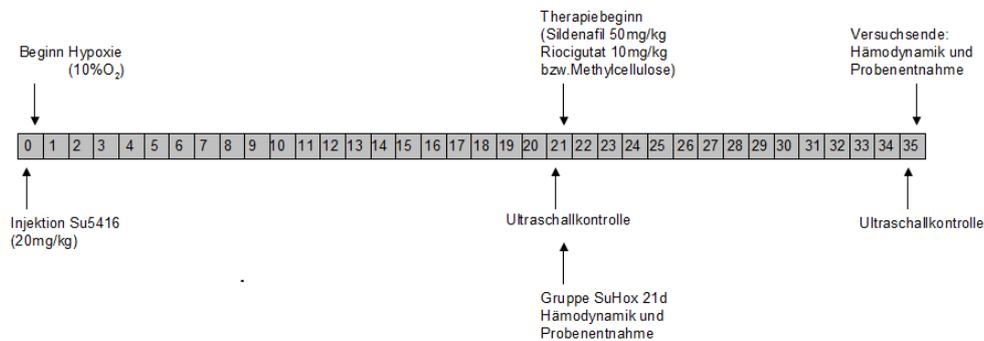


Abbildung 2.1: Zeitplan über den Versuchsablauf

#### 2.2.3.a ) Behandlung mit Sildenafil

Sildenafil wurde als Reinsubstanz verwendet. Zur Herstellung einer Lösung für die orale Behandlung wurde es mit einer 2%igen Methylcellulose-Suspension in einer Konzentration von 50mg/ml angemischt. Von Tag 21-35 erhielten die durch Isofluran leicht sedierten Ratten mittels Schlundsonde 1 x täglich 50mg/kg.

#### 2.2.3.b ) Behandlung mit Riociguat

Riociguat wurde ebenfalls als Reinsubstanz verwendet, die für die Herstellung der oralen Lösung mit einer 2%igen Methylcellulose-Suspension in einer Konzentration von 10mg/ml angemischt wurde. Die Eingabe erfolgte auf gleiche Weise wie die von Sildenafil in einer Dosierung von 10mg/kg/d. Die Tiere wurden ebenfalls 1 x täglich von Tag 21-35 behandelt.

#### 2.2.3.c ) Behandlung der Placebo-Tiere

Kontrolltiere erhielten 1 x täglich von Tag 21-35 eine 2%igen Methylcellulose-Suspension durch orale Verabreichung unter leichter Isofluran Sedation in der Konzentration von 1ml/kg/d.

#### **2.2.4 Echokardiographie**

Die echokardiografische Verlaufskontrolle wurde freundlicherweise von dem Kardiologen Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

Für eine nicht-invasive Untersuchung des kardiovaskulären Systems stellt die transthorakale Doppler/Echokardiographie die führende bildgebende Methode dar. In dieser Studie wurden die echokardiographischen M-Mode und Doppler-Untersuchungen mit dem handelsüblichen Gerät Vevo 770 Doppler-Echokardiographiesystem von VisualSonics durchgeführt. Ausgestattet ist das Gerät mit einem 25MHz Doppler- und 2D-Linearschallkopf. Es verfügt über eine Software, die eine Bildspeicherung mit hoher Bildfrequenz ermöglicht.

An Tag 21 sowie Tag 35 wurden die Herzfunktionen und Rechtsherzhypertrophie der Tiere aller Versuchsgruppen durch Doppler-/Echokardiographie beurteilt. Dafür wurden die Ratten mittels sanfter Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach einer kurzen Anflutungsphase eines 3% Isofluran/Sauerstoff-Gemisches in einer Narkosekammer wurde die weitere Gaszufuhr von 1,5% Isofluran/Sauerstoff für die Zeit der Untersuchung über einen Nasenkonus konstant gehalten. Die narkotisierte Ratte wurde mit Hilfe von Klebestreifen in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen fixiert. Dies ermöglichte eine simultane Ein-Kanal-EKG Aufzeichnung während der gesamten echokardiographischen Untersuchung. Die in Narkose geöffneten Augen der Versuchstiere wurden durch Bepanthen-Salbe® vor dem Austrocknen geschützt. Mittels eines rektal eingeführten Temperaturmessfühlers konnte die Temperatur der Wärmeplatte in Abhängigkeit zur Körpertemperatur der Ratte reguliert werden. Zur Verbesserung der Bildqualität fand eine Rasur des Thorax und anschließende Haarentfernung mit Enthaarungscreme statt. Der Brustkorb wurde daraufhin möglichst luftblasenfrei mit angewärmtem Ultraschallgel bedeckt und die Ultraschalluntersuchung begonnen. Nach der Untersuchung wurden die Ratten von der Narkosezufuhr und Fixation befreit, sorgfältig vom Ultraschallgel

gesäubert und bis zum kompletten Erwachen beobachtet. Anschließend wurden sie zurück in ihre Käfige verbracht.

Die Echokardiographie ist eine etablierte Methode eine Aussage bezüglich der Krankheitssituation im Tiermodell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte zu treffen (URBONIENE et al. 2010, KOSANOVIC et al. 2011). Als Parameter wurden das Herzminutenvolumen (HMV), der pulmonale Gefäßwiderstand (TPR: total pulmonary resistance), der Rechtsherzdiameter (RVID: right ventricular inner diameter), die Dicke der rechten Herzwand (RVWT: right ventricular wall thickness), der Tei-Index oder MPI (myocardial performance index: myokardialer Leistungsindex), die pulmonal-arterielle Akzelerationszeit (PAAT: pulmonary artery acceleration time) sowie die TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion) berechnet.

Das Herzminutenvolumen ist das Blutvolumen, welches in einer Minute vom Herz über die Aorta in den Blutkreislauf gepumpt wird. Berechnet werden kann es aus Schlagvolumen x Herzfrequenz, wobei das Schlagvolumen mit Hilfe der Echokardiographie aus dem Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes und dem Integral der systolischen Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta (sog. Velocity Time Integral) berechnet wurde. Das Herzminutenvolumen wird in Milliliter pro Minute angegeben. Der pulmonale Gefäßwiderstand bezeichnet das Verhältnis von mittlerem pulmonal-arteriellem Druck zu Herzminutenvolumen. Er wird relativ zum Körpergewicht (100g BW) dargestellt.

Zur Bestimmung der Dilatation der rechten Herzkammer wurde der Innendurchmesser des rechten Ventrikels als maximale Entfernung der freien Wand der rechten Kammer zum Septum gemessen. Hierfür wurde die 4 Kammeransicht verwendet. Als Parameter für die Hypertrophie des Herzens wurde in der modifizierten parasternalen Längsachsenansicht die Wandstärke des rechten Ventrikels ermittelt. Diese beiden rechtsventrikulären Dimensionen werden in der Einheit Millimeter angegeben.

Der Tei-Index oder auch MPI wurde mittels Tissue Doppler Imaging gemessen. Es ist ein globaler Parameter für sowohl die systolische als auch diastolische

Funktion des rechten Ventrikels. Der myokardiale Leistungsindex wird aus der Summe von isovolumetrischer Kontraktionszeit und isovolumetrischen Relaxationszeit dividiert durch die Auswurfzeit ermittelt.

TAPSE ist die zurückgelegte Strecke des Trikuspidalrings zwischen Enddiastole und Endsystole. Gemessen wurde im M-Mode in der apikalen 4-Kammeransicht. Er dient als Parameter für die longitudinale Funktion des rechten Ventrikels. Die Einheit ist Millimeter.

Die pulmonal-arterielle Akzelerationszeit wurde durch Analyse des parasternalen Doppler-Spektrums im Bereich des rechtsventrikulären Ausflusstraktes bestimmt und ist definiert als das Intervall von Beginn bis zum Maximum des systolischen pulmonal-arteriellen Flusses. Die PAAT korreliert mit dem pulmonal-arteriellen Blutdruck.

### 2.2.5 Hämodynamische Messungen am Ganztier

Am Ende der Studie wurden die Tiere in einem etablierten *in vivo* Modell (SCHERMULY et al. 2005, DAHAL et al. 2010a,b) untersucht. Für die Aufzeichnung der Blutdruck- und Beatmungsparameter wurde das Programm HSE-Harvard Software Haemodyn verwendet. Die luftblasenfrei gespülten Druckaufnehmer und Schläuche wurden für die zu ermittelnden Werte SAP und RVSP durch Öffnung zur Raumluft auf 0mmHg eingestellt.

Die jeweilige Ratte wurde kurz vor Messbeginn aus dem Tierstall geholt, mit Hilfe eines Kleintier-Restrainer fixiert und ihr *intrapitoneal* 50mg/kg Ketamin und 100µg/kg Medetomidin injiziert. Durch Ausfall des Lid-, Corneal- sowie Zwischenzehenreflexes wurde eine ausreichende Narkosetiefe sichergestellt.

Die Ratten wurden in Rückenlage auf eine vorgewärmten Wärmematte verbracht, mit Klebestreifen an den Gliedmaßen fixiert, und die ventrale Körperoberfläche mit Braunoderm®-Lösung befeuchtet. Nach Entfernung eines etwa 2 x 2cm großen Hautstücks im Cervicalbereich konnte durch stumpfes Präparieren die Trachea vorgelagert, inzisiert, der Beatmungstubus eingeführt und durch eine Ligatur mit einem Bindfaden fixiert werden. Die Beatmung erfolgte mit einem Atemzugvolumen von 3ml und einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute. Der positiv-endexpiratorische Druck lag bei 1cm Wassersäule, um ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration zu vermeiden.

Nach Sicherstellen der korrekten Beatmung wurde die *Arteria carotis sinister* durch stumpfe Präparation der darüber liegenden Muskelschichten aufgesucht, vorsichtig von benachbarten Anteilen des *Nervus vagus* getrennt und durch craniale Ligatur mit einem Bindfaden auf Spannung gebracht. Nachdem vor dem Brusteingang ein Arterienclip platziert wurde, konnte die Arterie inzisiert und der mit einem Dreiwegehahn verbundene Kunststoffkatheter einer 22G Braunüle mit Hilfe eines flexiblen Führungsdrahts vorgeschoben werden. Der Katheter wurde ebenfalls mit Hilfe eines Bindfadens fixiert und nach Entfernung des

Führungsdrahtes und der Arterienklemme vollständig in das Gefäß eingebracht. Um eine Thrombenbildung zu vermeiden, wurden der Zugang mit 500µl einer 1:10 verdünnten Heparin-NaCl-Mischung gespült. Danach konnte der sich auf Herzhöhe befindliche arterielle Druckaufnehmer luftblasenfrei an den Dreivegehahn angeschlossen werden.

Im Anschluss fand die Präparation der *Vena jugularis dexter* statt. Sie wurde ebenfalls durch stumpfe Präparation freigelegt und mittels eines cranial angebrachtem Bindfadens gestreckt. Nach Inzision konnte die Schleuse für den Rechtsherzkatheter mit Hilfe eines Mandrins eingebracht und gleichfalls durch einen Faden fixiert werden. Auch der venöse Zugang wurde mit 500 µl einer 1:10 verdünnten Heparin-NaCl-Mischung gespült. Zur Ermittlung des rechtsventrikulären Druckes konnte nun durch diese Schleuse ein mit dem auf Herzhöhe befindlichem venösen Druckaufnehmer verbundener Katheter eingeführt und bis zum Erreichen des rechten Ventrikels vorgeschoben werden. Die gemessenen Drücke wurden durch flüssigkeitsgefüllte Druckaufnehmer registriert, verstärkt, im PC in digitale Signale umgewandelt und durch das Programm HSE-Harvard Software Haemodyn aufgezeichnet und abgespeichert.

Im Anschluss an die hämodynamische Messung wurde je eine arterielle Blutprobe aus der *A. carotis* sowie eine gemischtvenöse Probe aus dem rechten Ventrikel entnommen und im Blutgasanalysegerät Rapidlab™ 348 die Blutparameter pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, Hämoglobin, Hämatokrit und O<sub>2</sub>-Sättigung ermittelt. Das restlich zu gewinnende Blut wurde in Heparin-Röhrchen gesammelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 10.000U/min und 4°C konnte das Plasma abpipettiert und für weitere Untersuchungen bei -20°C eingefroren werden.

Die sich anschließende Präparation der Lunge und des Herzens erfolgte durch einen medianen Hautschnitt von der Cervicalregion bis zum Xyphoid. Das Abdomen wurde eröffnet und durch Fixation des *Processus xiphoideus* mittels Klemme das gespannte Diaphragma inzisiert und das Sternum bis zur *Apertura thoracis cranialis* durchtrennt. Anschließend wurden beide Rippenbögen gespreizt und mit Hilfe von zwei Klemmen lateral fixiert.

In dem so eröffnete Brustraum konnte eine Inzision der *Arteria pulmonalis* vorgenommen und ein Spülkatheter eingebracht werden. Ebenfalls wurde der linke Ventrikel durch einen kleinen Schnitt eröffnet, um ein Abfließen der Spülflüssigkeit zu gewähren. Mit isotoner Kochsalzlösung wurde nun die Lunge bei einem Druck von 20cm Wassersäule bis zur kompletten Blutfreiheit gespült. Anschließend erfolgte bei maximaler Inspiration die Abschaltung des Beatmungsgerätes. Daraufhin wurde der rechte Lungenflügel nach Ligatur am Hilus entnommen und für weitergehende molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  schockgefrostet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die linke Lunge wurde ebenfalls bei einem Druck von 20cm Wassersäule mit Formaldehyd gespült, entnommen und für 24 Stunden in Formaldehyd aufbewahrt. Die so fixierten Lungenhälften fanden weitere Verwendung in der Histologie.

Das Herz wurde ebenfalls aus dem Thorax entnommen. Es wurden alle nicht-muskulären Anteile wie umgebendes Bindegewebe, Gefäßstämme sowie die Atrien entfernt und der rechte Ventrikel von linkem Ventrikel und Septum abgetrennt. Durch sofortiges Wiegen wurde das Feuchtgewicht beider Anteile ermittelt und das Verhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum als Parameter der Rechtsherzhypertrophie bestimmt. Anschließend wurde sowohl linker als auch rechter Ventrikel durchteilt und je eine Hälfte für molekularbiologische Untersuchungen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  schockgefrostet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die andere Hälfte wurde für weitere histologische Untersuchungen in Formalin gelagert.

### **2.2.6 Histologie**

Die in Formalin gelagerte linke Lunge sowie die Ventrikel wurden nach 24 Stunden in 0.1M PBS (phosphate buffered saline) überführt. Dafür wurde eine 10-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung hergestellt, die als Einmalpuffer verdünnt werden konnte und auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde:

- 80g NaCl
- 2,0 g KCl
- 11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 2,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

gelöst in 900 ml auqa dest.

Am darauffolgenden Tag fand eine Erneuerung des PBS statt, nach zwei Tagen wurden die Organe in 70% Ethanol verbracht.

Daraufhin wurden die Lungenflügel und Herzteile in Einbettkassetten überführt und im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP 1050, Leica) entwässert. Danach fand ein Einbetten in Paraffin statt.

Von diesen Paraffinblöcken wurden jeweils 3µm dicke Schnitte angefertigt und bei 58°C entparaffiniert. Die Lungenschnitte wurden nach den folgenden Protokollen für Elastica-van Gieson, Immunhistochemie (Doppelfärbung Anti-alpha actin/von Willebrand-Faktor) und PCNA gefärbt. Mit den Schnitten der rechten Ventrikel wurde eine Sirius-Red Färbung durchgeführt. Abschließend wurden alle Schnitte mit Pertex eingedeckt.

### **Elastica van Gieson-Färbung**

<b>Nr</b>	<b>Dauer/min</b>	<b>Reagenz</b>
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol absolut 99,6%
5	5	Ethanol absolut 99,6%
6	5	Ethanol 96%
7	5	Ethanol 70%
8	10-24 Stunden	Resorcin-Fuchsin
9	15	Leitungswasser
10	1	aqua dest
11	5	Fe-Hämatoxylin nach Weigert A:B 1:1
12	1	aqua dest
13	15	Leitungswasser
14	1	aqua dest
15	10	van-Gieson Lösung
16	1	aqua dest
17	2	Ethanol 96%
18	2	Ethanol 96%
19	5	Ethanol 99,6%
20	5	Isopropylalkohol 99,8%
21	5	Xylol
22	5	Xylol
23	5	Xylol

*Tabelle 2.9: Färbeprotokoll Elastica van Gieson-Färbung*

Zubereitung der Resorcin-Fuchsin-Lösung:

- 10ml Weigerts Resorcin-Fuchsin
- + 200ml 1%iger HCl-Alkohol (7,2ml HCL + 193,0ml 70% Ethanol)

Rezeptur der van Gieson-Lösung:

- 240 ml gesättigte Pikrinsäure (nach Filtration)
- + 8 ml 2%iges Säurefuchsin
- + 4 ml 1%ige Essigsäure

**Doppelfärbung Anti-alpha actin/von Willebrand Faktor**

Nr	Dauer (min)	Reagenz
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol absolut 99,6%
5	5	Ethanol absolut 99,6%
6	5	Ethanol 96%
7	5	Ethanol 70%
8	15	Wasserstoffperoxid - Methanol 1:1
9	2x5	Aqua dest
10	2x5	PBS
11	15	Trypsin (37°C)
12	4x5	PBS
13	15	BSA 10%
14	2x5	PBS
15	20	Serumblock I Normal Horse Serum
16	30	Primärantikörperl alpha actin 1:900 mit 10%BSA
17	4x5	PBS
18	10	biotinyl. Sekundärantikörper
19	3x5	PBS
20	5	Streptavidin Peroxidase Complex
21	3x5	PBS
26	15sec	VIP-Substrat
27	5	H2O
28	5	PBS
29	15	BSA 10%
30	2x5	PBS
31	20	Serumblock I 2,5%Normal Horse Serum
32	30	Primärantikörper vWF1:900 mit 10%BSA
33	4x5	PBS
34	30	Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit Peroxidase
35	2x5	PBS
36	15sec	Vektor DAB
37	5	H2O
38	3	Methylgrün
39	1	Aqua dest
40	2	Ethanol 96%
41	2	Ethanol 96%
42	5	Isopropylalkohol
43	5	Isopropylalkohol
44	5	Xylol
45	5	Xylol
46	5	Xylol

*Tabelle 2.10: Färbeprotokoll Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor*

**PCNA (proliferating cell nuclear antigen) Färbung**

Nr	Dauer (min)	Reagenz
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol absolut 99,6%
5	5	Ethanol absolut 99,6%
6	5	Ethanol 96%
7	5	Ethanol 70%
8	2x5	Aqua dest
9	20	Citrat Puffer (pH 6,0) kochen
10	10	Citrat Puffer warmhalten
11	30	Citrat Puffer kühlen
12	1	Aqua dest
13	20	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol
14	2x5	Aqua dest.
15	2x5	PBS
16	15	Proteinkinase K
17	1	Aqua dest.
18	2x5	PBS
19	60	BSA (10%)
20	2x5	PBS
21	10	Serumblock Normal Horse Serum 2,5%
26	12Stunden	Primärantikörper 1 PCNA 1:100 mit 10%BSA
27	2Stunden	PBS
28	10	Biotinyl. Sekundär-Antikörper
29	4x5	PBS
30	5	Streptavidin-Peroxidase Complex
31	4x5	PBS
32	15sec	NovaRED-Substrat
33	5	H <sub>2</sub> O
34	1	Aqua dest
35	2	Hämatoxylin
36	1	H <sub>2</sub> O
37	1	PBS
38	1	Aqua dest
40	2	Ethanol 96%
41	2	Ethanol 96%
42	5	Isopropylalkohol
43	5	Isopropylalkohol
44	5	Xylol
45	5	Xylol
46	5	Xylol

Tabelle 2.11: Färbeprotokoll PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

**Sirius Red-Färbung**

Nr	Dauer (min)	Reagenz
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol absolut 99,6%
5	5	Ethanol absolut 99,6%
6	5	Ethanol 96%
7	5	Ethanol 70%
8	1	Aqua dest.
9	60	0,1% picro Sirius Red
10	2	1%Essigsäure
11	2	1%Essigsäure
12	2	1%Essigsäure
13	1	Aqua dest.
14	5	Ethanol 70%
15	5	Ethanol 96%
16	5	Ethanol 99,6
17	5	Xylol
18	1	Xylol

*Tabelle 2.12: Färbeprotokoll der Sirius Red-Färbung*

### **2.2.7 Morphometrische Auswertung**

Die morphometrische Auswertung der Lungenschnitte fand mit Hilfe des computergestützten Analysesystems Leica Q Win Standard Analyzing Software statt. Die Makros für die Gefäßmorphologie wurden speziell von der Firma Leica entwickelt. Zur Auszählung wurden die Schnitte anonymisiert und ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen analysiert.

#### 2.2.7.a ) Analyse des Muskularisierungsgrades

Von den nach Tab. 2.10 gefärbten Schnitten wurden pro Tier je 100 intrapulmonale Gefäße bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Bei der durchgeführten Doppelfärbung wurden muskularisierte Teile der Gefäßwand durch Anti- alpha smooth muscle actin violett und die endothelialen Bereiche durch Anti- von Willebrand Faktor braun angefärbt. Die ausgewerteten Gefäße hatten einen externen Durchmesser zwischen 20 und 50µm.

Mit Hilfe der Leica Q Win Standard Analyzing Software wurde der Muskularisierungsgrad bestimmt. Dazu wurde der prozentuale Anteil der Anti-alpha smooth muscle actin positiven Gefäßwandbereiche in der Media colorimetrisch-spektrometrisch berechnet. Es fand eine Unterteilung der Gefäße in voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert statt:

- nicht muskularisiert:  $\leq 5\%$  Smooth muscle alpha actin positiv
- partiell muskularisiert:  $>5\% - \leq 75\%$  Smooth muscle alpha actin positiv
- voll muskularisiert:  $> 75\%$  Smooth muscle alpha actin positiv

2.2.7.b ) Analyse der Wandstärke, Neointima und des Okklusionsindex

Die Elastica-van-Gieson Färbung wurde zur Bestimmung der Wandstärke, Neointimaproliferation und des Okklusionsindex verwendet. Dazu wurden 100 intrapulmonale Gefäße mit einem externen Durchmesser unter 50 µm bei 630facher Vergrößerung analysiert. Mit der Elastica-van Gieson Färbung wurden elastische Fasern auf Grund der enthaltenen Resorcin-Fuchsin-Lösung schwarzviolett angefärbt. Durch die Verwendung von Eisenhämatoxin stellten sich die Zellkerne schwarzbraun dar, die van-Gieson Lösung sorgte für die Rotfärbung von kollagenen Fasern sowie für eine gelbbraune Färbung der Muskulatur und des Zytoplasmas.

Die Wandstärke wurde definiert als mittlerer Abstand zwischen Lamina elastica externa und Gefäßlumen. Zur Berechnung der medialen Wandstärke wurde dieser Wert in ein Verhältnis zum externen Gefäßdurchmesser gesetzt:

Mediale Wandstärke =  $(2 \times \text{Wandstärke} / \text{externen Gefäßdurchmesser}) \times 100$

Damit war es möglich, eine von der Gefäßgröße unabhängige Aussage über die Dicke der Gefäßwand treffen zu können.

Als Neointima galt der sich darstellende Bereich zwischen Lamina elastica interna und Gefäßlumen. Für die Bestimmung der Ratio` von Neointima zu Media wurde dieser Wert in ein Verhältnis zur Media gesetzt.

Für den Okklusionsindex wurden die Gefäße in die drei Kategorien "offen", "partiell geschlossen" und "geschlossen" eingeteilt. Als offen galten Gefäße mit einem Bereich über 75% des ursprünglichen Lumens, partiell geschlossene Gefäße besaßen ein offenes Lumen zwischen 25 und 75% und geschlossene Gefäße zeigten einen offenen inneren Gefäßbereich unter 25%.

- offen: > 75% freies Lumen
- partiell geschlossen: 75% - 25% freies Lumen
- geschlossen: > 25% freies Lumen

#### 2.2.7.c ) Analyse des Proliferationsindex

In den nach Protokoll Tab. 2.11 gefärbten Schnitten stellten sich die PCNA positiven Kerne rotbraun, die PCNA-negativen Kerne blau dar. Mit 400facher Vergrößerung wurden je 80-100 Gefäße mit einem externen Gefäßdurchmesser zwischen 20 und 50µm betrachtet. Je Gefäß wurden die gefäßnahen Kerne in PCNA positiv und negativ unterteilt. Zur Ermittlung des Proliferationsindex wurde die Anzahl der PCNA positiven Kerne durch die Anzahl der Gefäße geteilt.

#### 2.2.7.d ) Analyse des Kollagengehalts des rechten Ventrikels

In den mit Sirius Red Färbung angefärbten rechten Ventrikeln zeigten sich Kollagenfasern rot. Das umgebende nicht kollagenhaltige Gewebe wurde gelb dargestellt. Bei einer 400fachen Vergrößerung wurde der prozentuale Kollagengehalt der rechten Ventrikel bestimmt. Dazu wurde der gesamte Schnitt meanderförmig abgefahren und jedes zweite Bild einer Analyse mit Leica Q Win Standard Analyzing Software mit dem Makro für Kollagengehalt unterzogen. In die Auswertung wurden nur die Ventrikel mit einbezogenen, von denen pro Schnitt mindestens 50 Bilder entstanden. Es wurden alle Kollagen-positiven Bereiche (rot) prozentual zu den negativen (gelb) ermittelt. Der Gesamtkollagengehalt des rechten Ventrikels wurde als Mittelwert aller Einzelbilder berechnet.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Tierzahl der jeweiligen Gruppen wurde als n-Zahl mit angegeben. Die Normalverteilung wurde getestet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurde durch Varianzanalyse (ANOVA: analysis of variance) mit dem Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeinbefinden und Nebenwirkungen unter Therapie

Klinisch kam es innerhalb einiger Tage nach Su5416-Injektion und Hypoxie-Exposition zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Die Tiere wirkten müder und inaktiver. Der Spieltrieb war verringert, bei körperlichen Belastungen kam es zu Dyspnoe. Fortschreitend zeigte sich eine leichte zyanotische Färbung der Schleimhäute. Bei einigen Ratten aus der Placebo-Gruppe traten periphere Ödeme auf.

Während der 1x täglichen Behandlung mit 50mg/kg Sildenafil bzw. 10mg/kg Riociguat zeigten sich bei den Versuchstieren keine Nebenwirkungen. Auch bei der sich an die hämodynamische Messung anschließende Sektion der Tiere konnten keine auf die Behandlung zurückzuführenden pathologischen Befunde festgestellt werden.

Die Gewichtsverläufe der behandelten Tiere, sowohl mit Sildenafil, Riociguat oder Methylcellulose zeigten ähnliche Verläufe. Tiere der Placebo-Gruppe nahmen während des 35 tägigen Experiments  $49,7 \pm 7,4$ g zu. Die Gewichtszunahme der mit Sildenafil behandelten Ratten lag im Mittel bei  $48,2 \pm 10,0$ g, bei den mit Riociguat behandelten Tieren betrug dieser Wert  $48,3 \pm 6,1$ g. Dies entspricht einer Gewichtszunahme von  $18,5 \pm 3,9\%$  des ursprünglichen Körpergewichts in der Sildenafil-Gruppe,  $17,6 \pm 2,2\%$  bei einer Behandlung mit Riociguat und  $17,0 \pm 2,5\%$  bei einer Methylcellulose-Behandlung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

Während der Behandlung mit Riociguat verstarb ein Tier während der oralen Eingabe des Medikaments. Dies kann auf eine Aspiration der Flüssigkeit während der für die Medikamenteneingabe durchgeführten Sedation zurückzuführen sein.

## 3.2 Invasive Untersuchung

### 3.2.1 Systemisch arterieller Druck

Der mittlere systemische Druck zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Bei den Tiere aus Normoxie lag er bei  $133 \pm 6$  mmHg. 21 Tage nach Su5416 Injektion und Hypoxie betrug der Wert  $134 \pm 7$  mmHg. Die mit Methylcellulose behandelte Placebogruppe zeigte einen mittleren Druck von  $135 \pm 5$  mmHg. Er betrug bei der Therapiegruppe Riociguat im Mittel  $113 \pm 10$  mmHg und bei den mit Sildenafil behandelten Tieren  $116 \pm 5$  mmHg.

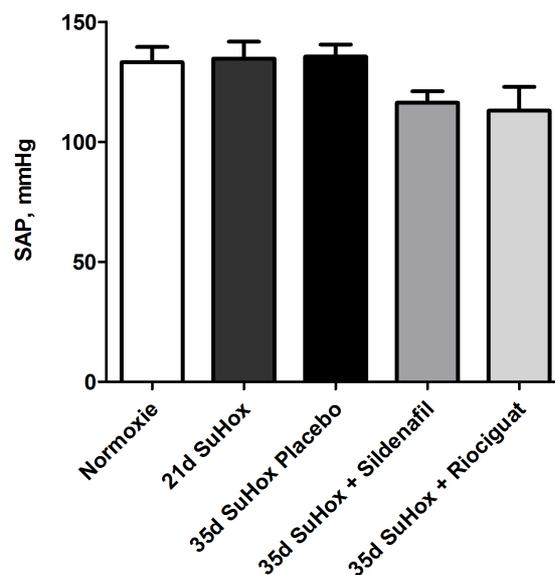


Abbildung 3.1: Mittlerer systemisch arterieller Druck (SAP) in den verschiedenen Versuchsgruppen.

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=9  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=9  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.2.2 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Der durchschnittliche rechtsventrikuläre systolische Druck lag bei den gesunden Ratten aus normoxischen Haltungsbedingungen bei  $31,2 \pm 2,3$  mmHg. 21 Tage nach Su5416 Injektion und Hypoxie zeigten die Tiere einen mittleren rechtsventrikulären Druck von  $78,9 \pm 2,9$  mmHg, in der mit Methylcellulose behandelte Gruppe lag dieser Wert nach 35 Tagen bei  $88,9 \pm 2,1$  mmHg.

Die Drücke der behandelten Gruppen lagen 35 Tage nach Su5416-Injektion und Hypoxie in der Riociguat-Gruppe bei  $73,7 \pm 3,8$  mmHg und in der Sildenafil-Gruppe bei  $79,4 \pm 2,7$  mmHg. Sowohl durch eine Behandlung mit Riociguat als auch Sildenafil zeigte sich somit eine signifikante Verbesserung zur Placebo-Gruppe.

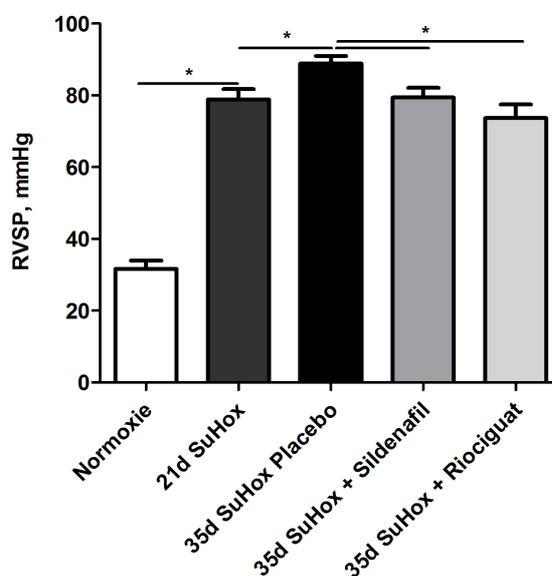


Abbildung 3.2: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=9  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.2.3 Herzratio (RV/LV+S)

Als Maß der Rechtsherzhypertrophie zeigte das bestimmte Verhältnis aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (Normoxie  $0,25 \pm 0,01$ ) eine Zunahme während Hypoxie Exposition und Su5416-Injektion (nach 21 Tagen  $0,62 \pm 0,02$ ; nach 35 Tagen  $0,76 \pm 0,02$ ). In der mit Sildenafil behandelten Tiergruppe lag die deutlich geringere Herzratio bei  $0,66 \pm 0,03$ . Eine signifikante Verringerung der Rechtsherzhypertrophie zeigte sich auch durch eine Behandlung mit Riociguat ( $0,56 \pm 0,03$ ) sowohl im Vergleich zur Placebo- als auch der Sildenafil-Gruppe.

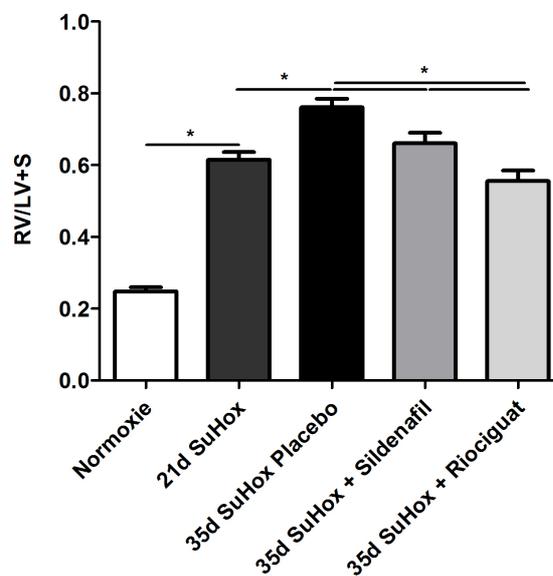


Abbildung 3.3: Herzratio (RV/LV+S) als Maß der Rechtsherzhypertrophie in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=10  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=10  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3 Echokardiographie

#### 3.3.1 Herzminutenvolumen (HMV)

Das Herzminutenvolumen bei gesunden Ratten lag bei durchschnittlich  $77,6 \pm 5,6$  ml/min. Er fiel durch Su5416 Injektion und 21 Tage Hypoxie auf  $42,6 \pm 2,6$  ml/min und nach 35 Tagen auf  $31,4 \pm 2,1$  ml/min.

Mit Sildenafil behandelte Tiere besaßen nach 35 Tagen im Mittel ein Herzminutenvolumen von  $43,4 \pm 3,0$  ml/min und verbesserten sich damit signifikant zur Placebogruppe. Eine signifikante Erhöhung wurde ebenfalls durch eine Therapie mit Riociguat ( $60,8 \pm 5,2$  ml/min) erzielt. Hier verbesserte sich das ermittelte Herzminutenvolumen zusätzlich im Vergleich zu einer Behandlung mit Sildenafil.

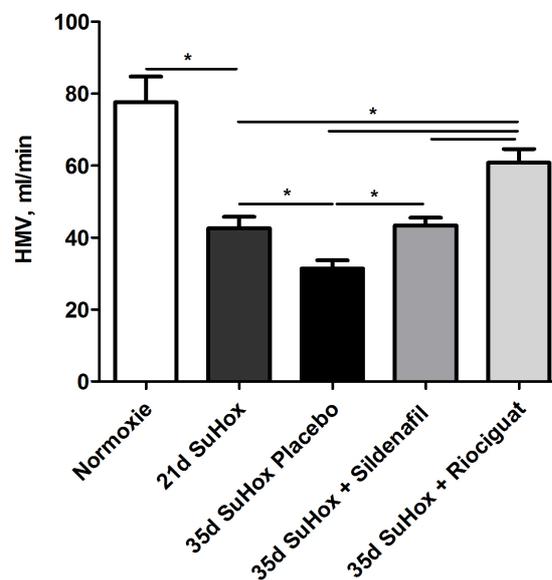


Abbildung 3.4: Das ermittelte Herzminutenvolumen in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumlufte, n=5  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=6  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=10  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.2 Lungengefäßwiderstand (TPR)

Der Widerstand der Lungenstrombahn wurde anhand des TPR (total pulmonary resistance) errechnet. Normoxische Kontrolltiere zeigten hier einen mittleren Wert von  $0,97 \pm 0,10 \text{ mmHg} \times \text{min/ml} \times 100 \text{g BW}$ . Dieser stieg durch Hypoxie und Su5416 an (nach 21 Tagen  $6,3 \pm 0,44$ ; nach 35 Tagen  $9,21 \pm 1,00 \text{ mmHg} \times \text{min/ml} \times 100 \text{g BW}$ ). Eine Therapie mit Sildenafil und Riociguat bewirkte eine signifikante Reduzierung des Gefäßwiderstandes auf  $5,89 \pm 0,34$  bzw.  $4,04 \pm 0,34 \text{ mmHg} \times \text{min/ml} \times 100 \text{g BW}$ .

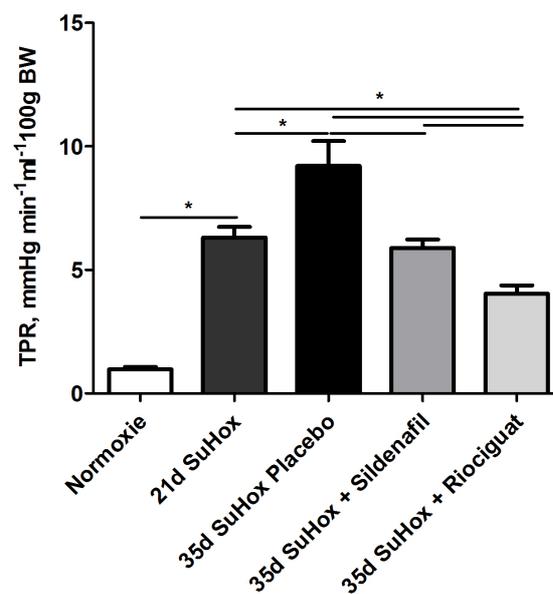


Abbildung 3.5: Graphische Darstellung des pulmonalen Gefäßwiderstandes (TPR) in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=8  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.3 Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (RVID)

Das Maß der Rechtsherzdilatation durch den ermittelten rechtsventrikulären inneren Durchmesser (RVID- right ventricular inner diameter) zeigt eine Vergrößerung dieses Parameters während Hypoxie und Su5416-Injektion ( $3,97 \pm 0,06\text{mm}$  nach 21 Tagen und  $4,30 \pm 0,4\text{mm}$  nach 35 Tagen) im Vergleich zu den gesunden Tieren aus Normoxie ( $2,76 \pm 0,01\text{mm}$ ). Durch eine medikamentelle Intervention konnte die Rechtsherzdilatation verglichen zu Placebotieren signifikant gesenkt werden (Sildenafil  $3,77 \pm 0,23\text{mm}$ , Riociguat  $3,56 \pm 0,07\text{mm}$ ).

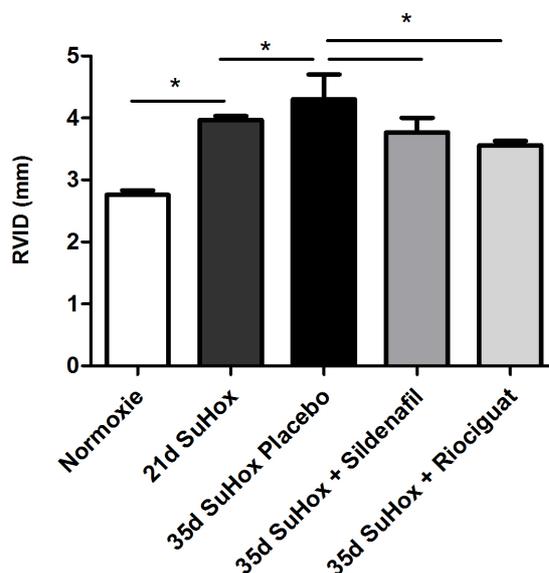


Abbildung 3.6: Der innere Durchmesser des rechten Ventrikels (RVID) als Maß der Rechtsherzdilatation in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.4 Wandstärke des rechten Ventrikels (RVWT)

Die Wandstärke des rechten Ventrikels zeigte im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ( $0,51 \pm 0,01\text{mm}$ ) einen Anstieg durch Su5416/Hypoxie (nach 21Tagen  $1,3 \pm 0,02\text{mm}$ , nach 35Tagen  $1,64 \pm 0,07\text{mm}$ ). Die Gabe von Sildenafil und Riociguat konnte diese Werte signifikant senken (Sildenafil:  $1,37 \pm 0,03\text{mm}$  Riociguat:  $1,23 \pm 0,04\text{mm}$ ). Die Wandstärken der beiden Therapiegruppen unterschieden sich dabei deutlich.

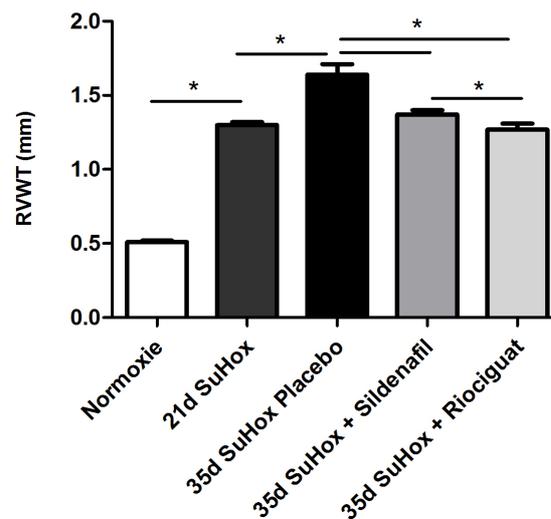


Abbildung 3.7: Wandstärke des rechten Ventrikels RVWT in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.5 Pulmonal-arterielle Akzelerationszeit (PAAT)

Die pulmonal-arterielle Akzelerationszeit (PAAT) betrug in der normoxischen Kontrollgruppe im Mittel  $36,56 \pm 0,65$  msec. Durch Su5416-Injektion und Hypoxie-Exposition sank sie signifikant (nach 21 Tagen auf  $18,21 \pm 0,89$  und nach 35 Tagen auf  $12,19 \pm 0,7$  msec). Sowohl eine Behandlung mit Sildenafil ( $16,94 \pm 0,69$  msec) als auch mit Riociguat ( $19,38 \pm 1,39$  msec) erzielte verglichen dazu eine signifikante Erhöhung.

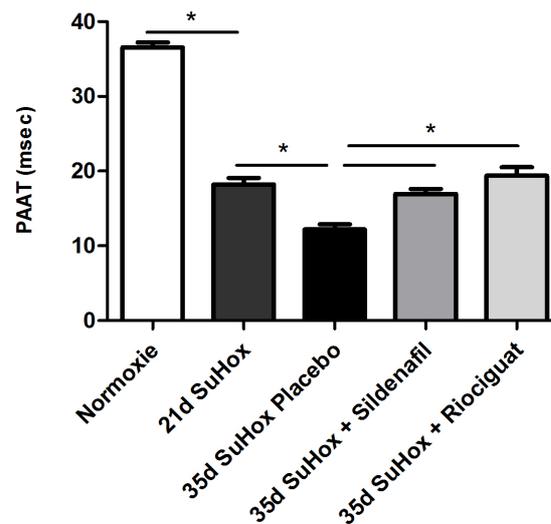


Abbildung 3.8: PAAT (pulmonary artery acceleration time) in den verschiedenen Versuchsgruppen als Parameter des mittleren Drucks in der Pulmonalarterie, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.6 Myokardialer Leistungsindex (Tei-Index)

Zur Einschätzung der globalen Funktion des Ventrikels wurde der MPI (myocardial performance index) bzw. Tei-Index herangezogen. Im Vergleich zu gesunden Tieren ( $0,63 \pm 0,06$ ) stieg dieser Parameter nach 21 Tagen Hypoxie auf  $1,85 \pm 0,08$  und nach weiteren 14 Tagen und einer Behandlung mit Methylcellulose auf  $2,44 \pm 0,16$ . Eine Behandlung mit Sildenafil zwischen Tag 21 und 35 konnte eine signifikante Verringerung auf  $1,51 \pm 0,04$  bewirken. Mit Riociguat fiel der Wert auf  $1,25 \pm 0,05$ . Innerhalb der beiden Wirkstoffe zeigten sich dabei signifikante Unterschiede.

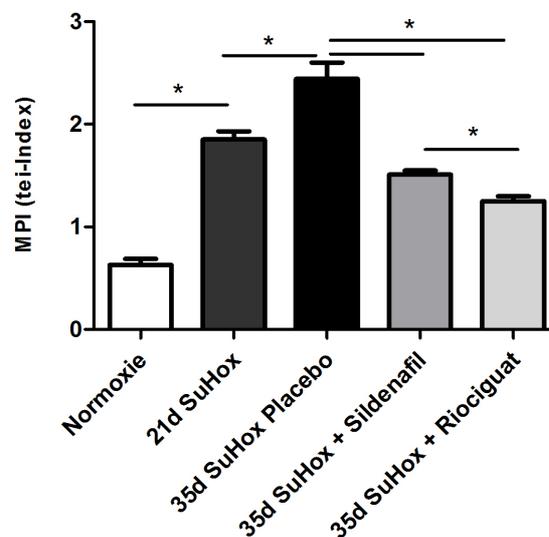


Abbildung 3.9: Graphische Darstellung des myokardialen Leistungsindex (Tei.Index) in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.3.7 Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (TAPSE)

Als echokardiologischer Parameter für die Funktion des rechten Herzens wurde die TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion) in den verschiedenen Versuchsgruppen bestimmt. Die normoxischen Kontrolltiere zeigten hier eine durchschnittliche Auslenkung von  $2,62 \pm 0,02$ mm. Diese verringerte sich nach 21 Tagen nach Su5416/Hypoxie auf  $1,52 \pm 0,06$ mm und nach 35 Tagen auf  $1,32 \pm 0,09$ mm. Durch beide Therapien stieg die Bewegung des Trikuspidalanulus im Vergleich zu Placebotieren signifikant an, mit Sildenafil auf  $1,78 \pm 0,06$ mm, mit Riociguat auf  $2,18 \pm 0,04$ mm. Beide unterschieden sich damit deutlich voneinander.

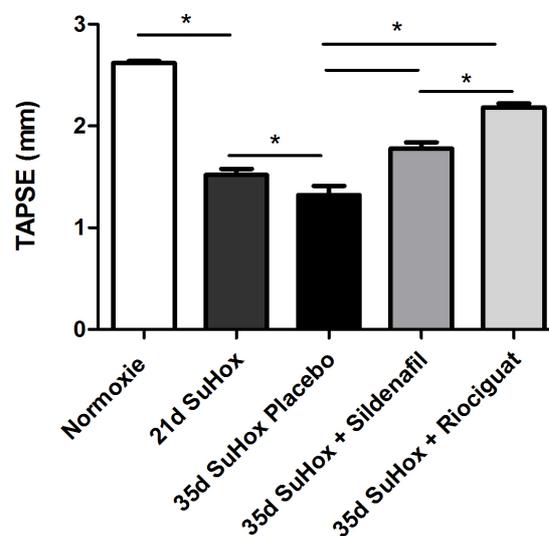


Abbildung 3.10: Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (TAPSE) in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

## 3.3.8 Überblick der ermittelten echokardiographischen Parameter

	Normoxie	21d SuHox	35d SuHox Placebo		35d SuHox + Sildenafil		35d SuHox + Riociguat	
			prä	post	prä	post	prä	post
<b>PAAT, (msec)</b>	36.56 ±0.65	18.21 ±0.89	18.52 ±0.86	12.19 ±0.73 *	18.61 ±0.97	16.94 ±0.69 †	18.33 ±0.89	19.38 ±1.39 †
<b>RVID, (mm)</b>	2.76 ±0.07	3.97 ±0.06	3.9 ±0.09	4.3 ±0.4 *	3.86 ±0.09	3.77 ±0.23 †	3.95 ±0.02†	3.56 ±0.07 *†
<b>RVWT (mm)</b>	0.51 ±0.01	1.30 ±0.02	1.3 ±0.05	1.64 ±0.07 *	1.31 ±0.03	1.37 ±0.03 †	1.33 ±0.03	1.27 ±0.04 ‡
<b>TAPSE (mm)</b>	2.62 ±0.02	1.52 ±0.06	1.56 ±0.03	1.32 ±0.09 *	1.50 ±0.06	1.78 ±0.06 *†	1.53 ±0.03	2.18 ±0.04 *†‡
<b>MPI</b>	0.63 ±0.06	1.85 ±0.08	1.82 ±0.05	2.44 ±0.16 *	1.83 ±0.06	1.51 ±0.04 *†	1.83 ±0.11	1.25 ±0.05 *†‡

Tabelle 3.1: Die ermittelten Ultraschallparameter in den verschiedenen Versuchsgruppen:

prä: vor Behandlung, post: nach Behandlung,

\* $p \leq 0.05$ : prä vs. post

†  $p \leq 0.05$ : post 35d SuHox+Sildenafil bzw. post 35dSuHox+Riociguat vs. post SuHox Placebo

‡  $p \leq 0.05$ : post 35d SuHox+Riociguat vs. post 35d SuHox+Sildenafil.

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Mediale Wandstärke

Die mediale Wandstärke lag in der gesunden Kontrollgruppe bei  $18,6 \pm 2,9\%$ . Nach Su5416-Injektion und 21 Tagen Hypoxie betrug sie  $45,6 \pm 2,5\%$  und stieg nach weiteren 14 Tagen in der Placebo-Gruppe auf  $58,0 \pm 4,0\%$  an. Bei der Therapiegruppe mit Sildenafil 50mg/kg zeigte sich nach 35 Tagen eine signifikant geringere mediale Wandstärke von  $48,5 \pm 2,7\%$ . Die Riociguat-Gruppe unterschied sich ebenfalls signifikant von den nur mit Methylcellulose behandelten Tiere ( $44,4 \pm 2,2\%$ ).

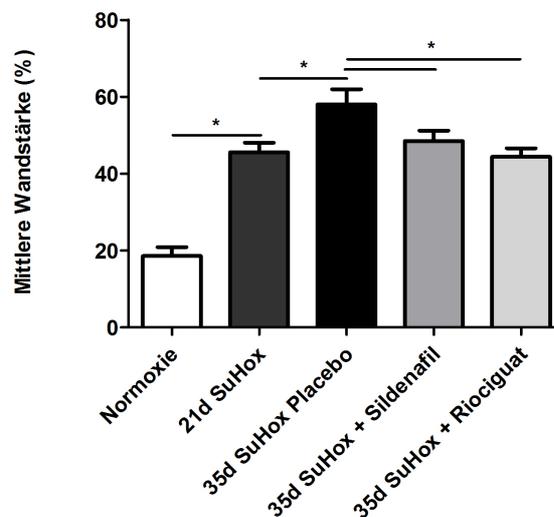


Abbildung 3.11: Mittlere Wandstärke von Pulmonalgefäßen mit einem externen Gefäßdurchmesser  $<50\mu\text{m}$  in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=9  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.4.2 Muskularisierungsgrad

In den Schnitten der gesunden Tiere aus normoxischer Haltung zeigten sich zum Großteil nicht muskularisierte ( $67,4 \pm 5,0\%$ ) und partiell muskularisierte Gefäße ( $25,2 \pm 3,3\%$ ). Voll muskularisierte Gefäße traten nur zu  $7,6 \pm 2,4\%$  auf. Dieses Verhältnis verschob sich im Verlauf der Erkrankung. Nach 21 Tagen Hypoxie und Su5416-Injektion waren  $41,4 \pm 2,6\%$  vollmuskularisierte,  $44 \pm 3,0\%$  partiell muskularisierte und nur noch  $14,6 \pm 2,6\%$  unmuskularisierte Gefäße zu finden. Nach 35 Tagen Hypoxie und Su5416 Injektion sowie einer Methylcellulose-Behandlung  $59 \pm 1,8\%$  vollmuskularisierte,  $32,9 \pm 1,7\%$  teil und  $8,2 \pm 1,3\%$  nicht muskularisierte Gefäße.

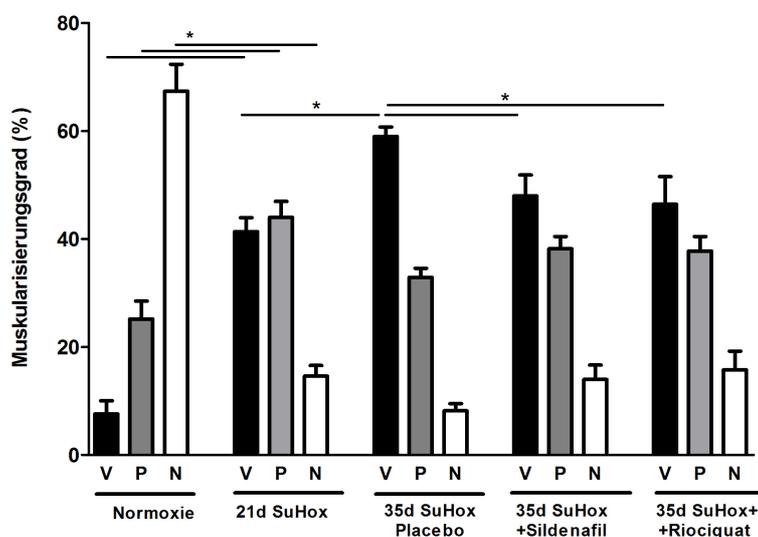
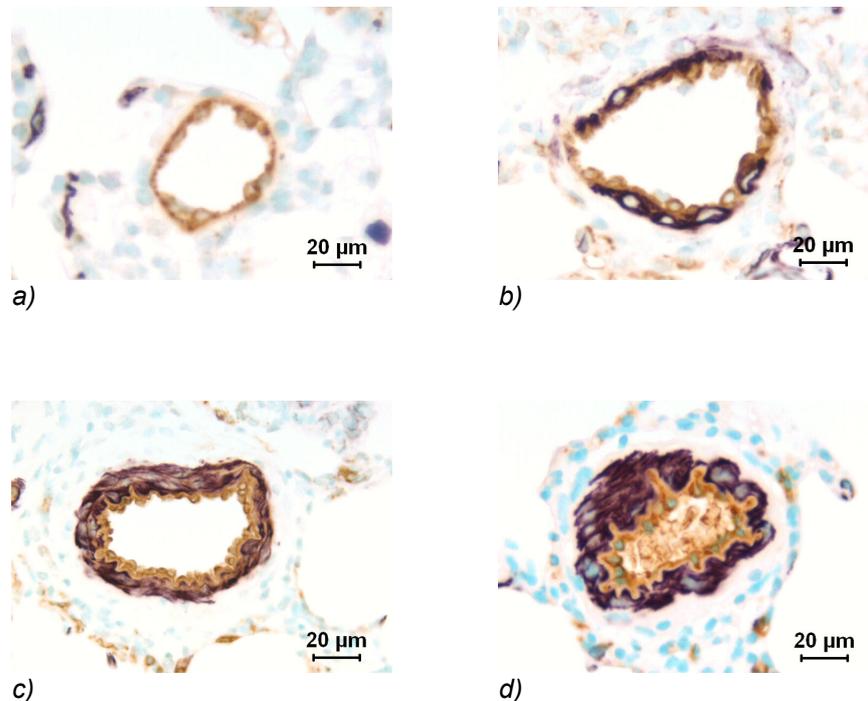


Abbildung 3.12: Muskularisierungsgrad von Pulmonalgefäßen mit einem externer Gefäßdurchmesser  $<50\mu\text{m}$  in den verschiedenen Versuchsgruppen. V = Vollmuskularisation, P = Partielle Muskularisation, N = Nicht muskularisiert,  $*p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=10  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=10  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=10  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

Bei den behandelten Tieren betrug das Verhältnis voll-, zu teil-, zu nicht muskularisierten Gefäßen in der Sildenafil-Gruppe  $48 \pm 3,9\%$ ,  $38 \pm 2,9\%$ ,  $14 \pm 2,7\%$ , bei Riociguat  $46,4 \pm 5,1\%$ ,  $37,8 \pm 2,7\%$ ,  $15,8 \pm 3,5\%$ . Somit zeigten sich in beiden Gruppen signifikante Unterschiede in einer Abnahme der vollmuskularisierten Gefäße im Vergleich zu den mit Methylcellulose behandelten Versuchstieren.



**Abbildung 3.13:** Darstellung unterschiedlicher Muskularisierungsgrade in der Immunhistochemischen Doppelfärbung gegen endothelialen Faktor VIII (braun) und glattmuskuläres Smooth muscle alpha actin (violett) in 400 facher Vergrößerung. a) unmuskularisiertes Gefäß; b) teil muskularisiertes Gefäß, c) vollmuskularisiertes Gefäß; d) voll muskularisiertes Gefäß mit verschlossenem Lumen

### 3.4.3 Okklusionsindex

Während der Zeit nach Su5416 Injektion in Hypoxie verschob sich das Verhältnis von offenen zu geschlossenen Gefäßen immer mehr in Richtung geschlossener Gefäße.

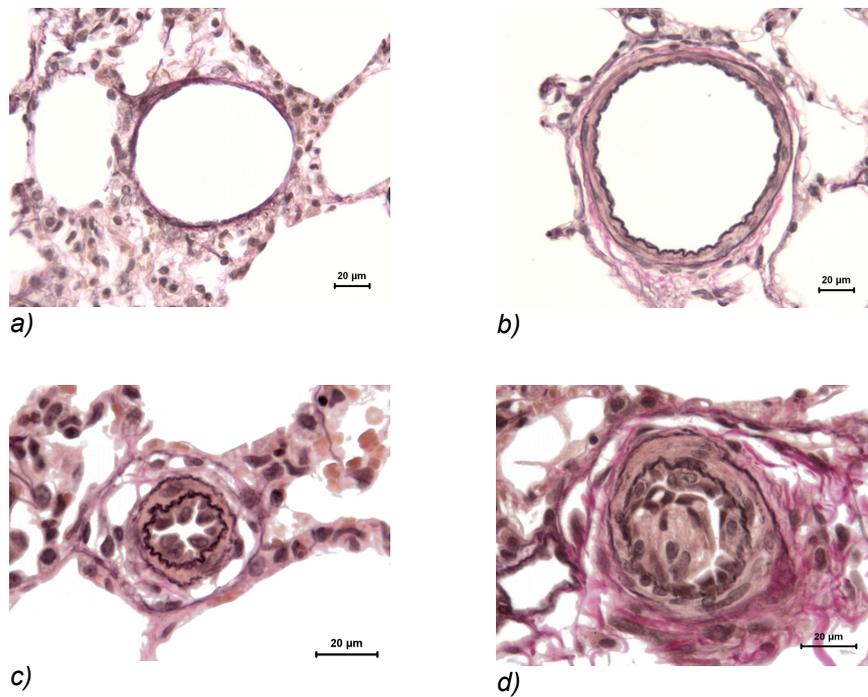


Abbildung 3.14 Darstellung unterschiedlicher Okklusionsgrade peripherer Lungengefäße in der Van-Gieson Färbung bei 630facher Vergrößerung.  
a) offen (Normoxie) b) offen, trotz deutlicher Zunahme der Media (Hypoxie+Su5416)  
c) partiell geschlossen, d) geschlossen

In den gesunden Kontrollen dominierten mit  $81,6 \pm 7,7\%$  die offenen Gefäße (partiell geschlossen  $18,2 \pm 7,5\%$ , geschlossen  $0,2 \pm 0,2\%$ ). Nach 21 Tagen Su5416 und Hypoxie waren nur noch  $2,8 \pm 0,8\%$  aller Gefäße offen, der Hauptteil lag bei partiell geschlossenen ( $83,8 \pm 2,8\%$ ) und geschlossenen ( $13,4 \pm 3,0\%$ ). Nach 35 Tagen Su5416/Hypoxie ging der Trend weiter in Richtung geschlossener Gefäße ( $37,8 \pm 6,5\%$ , partiell geschlossen  $60,3 \pm 5,8$  und offen  $2,0 \pm 1,1\%$ ). In den behandelten Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in den geschlossener Gefäße, sie nahmen bei beiden Therapiegruppen im Vergleich zu den Placebotieren ab und es bestand kein Unterschied mehr zu den Kontrolltieren an Tag 21 (Sildenafil  $26,9 \pm 4,7\%$ ; Riociguat  $13,8 \pm 2,8\%$ ). Die partiell geschlossenen Gefäße zeigte eine leichte Zunahme (Sildenafil  $70,0 \pm 4,0\%$ , Riociguat  $76,1 \pm 5,9\%$ ), gleiches gilt für die offenen (Sildenafil  $3,2 \pm 1,1\%$ , Riociguat  $10,1 \pm \%$ ).

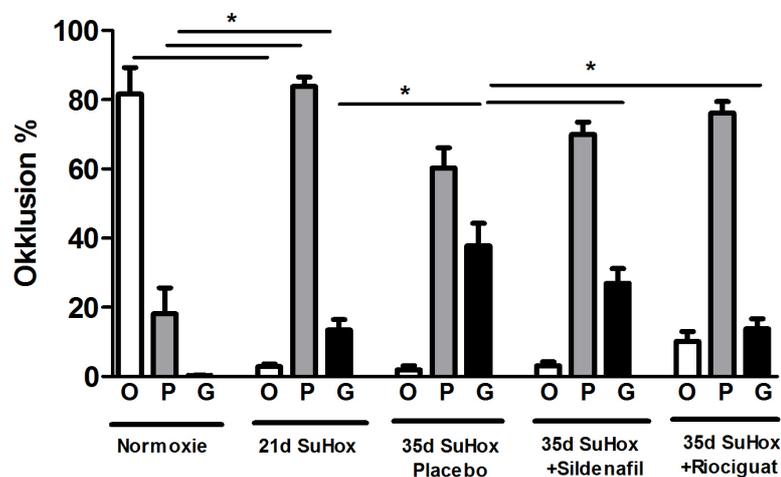


Abbildung 3.15: Der Okklusionsindex von Pulmonalgefäßen mit einem externen Gefäßdurchmesser unter  $50\mu\text{m}$ , O=offene Gefäße; P=partiell geschlossene Gefäße, G=geschlossene Gefäße, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=9  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=10  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.4.4 Neointimaproliferation

Das durchschnittliche Verhältnis von Neointima zu Media war mit  $1,64 \pm 0,11$  am höchsten in der Placebo-Gruppe. Wie in Abb.3.16 zu erkennen, zeigte sich durch Su5416-Injektion und anschließenden 35-tägigen Aufenthalt bei 10% Sauerstoff eine deutliche Neointimaproliferation (Abstand zwischen Lamina elastica interna und Lumen).

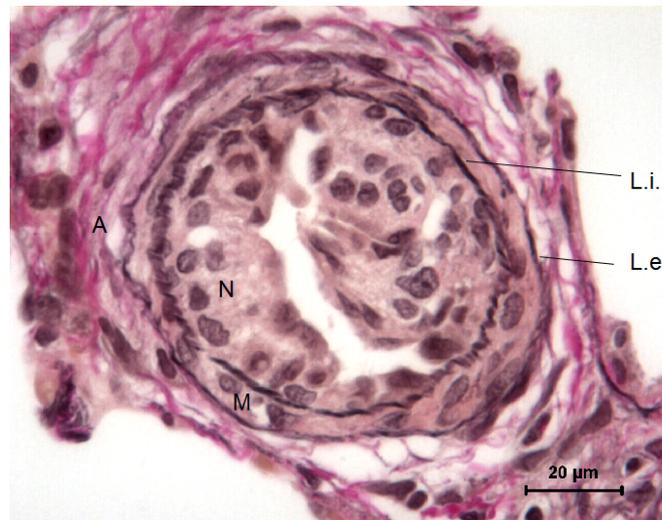


Abbildung 3.16: Elastica van-Gieson Färbung eines Gefäßes (35d SuHox Placebo) mit deutlicher Neointimaproliferation bei 630facher Vergrößerung. L.i.: Lamina elastica interna, L.e.: Lamina elastica externa, A: Adventitia, M: Muskularis, N: Neointima

In den gesunden Kontrollen zeigte sich keine Neointimaproliferation, hier wurde das Verhältnis von Media zu Endothel und Intima ausgewertet und betrug im Durchschnitt  $0,48 \pm 0,04$ . Nach Su5416-Injektion und 21 Tagen Hypoxie lag die Ratio durchschnittlich bei  $1,01 \pm 0,05$ . Bei der mit Sildenafil 50mg/kg behandelten Therapiegruppe war das Verhältnis im Mittel bei  $1,46 \pm 0,04$  und signifikant niedriger als bei den Placebotieren. Riociguat unterschied sich mit  $1,14 \pm 0,05$  ebenfalls signifikant von den nur mit Methylcellulose behandelten Tieren sowie auch von der Sildenafil-Gruppe.

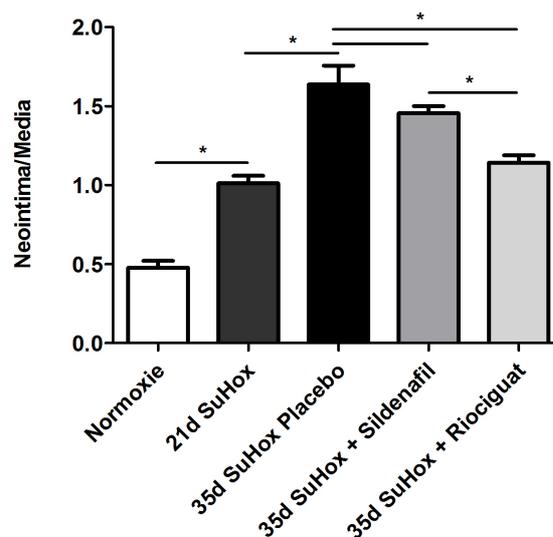


Abbildung 3.17: Das Verhältnis von Neointima zu Media kleiner Pulmonalgefäßen mit einem externen Gefäßdurchmesser  $<50\mu\text{m}$  in den verschiedenen Versuchsgruppen. In der Gruppe "Normoxie" wurde statt Neointima Endothel+Intima verwendet. \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=9  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=8  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=8  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=9  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=9

### 3.4.5 Proliferationsindex (PCNA)

Im Verlauf der Su5416/Hypoxieexposition zeigte sich eine Zunahme der PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) positiven Zellen (nach 21 Tage Su5415/Hypoxie betrug der Proliferationsindex  $1,14 \pm 0,06$ , nach 35 Tagen  $2,27 \pm 0,18$ ) im Vergleich zu der gesunden Kontrolltiere (Proliferationsindex  $0,44 \pm 0,04$ ). In allen beiden Therapiegruppen konnte dieser Wert im Vergleich zu mit Methylcellulose behandelten Ratten um mehr als die Hälfte gesenkt werden (Sildenafil  $0,83 \pm 0,02$ , Riociguat  $0,94 \pm 0,12$ ).

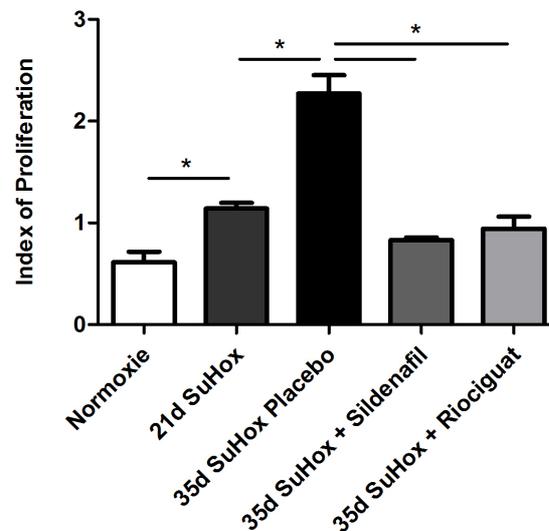


Abbildung 3.18: Graphische Darstellung des Proliferationsindex in den verschiedenen Versuchsgruppen. \* $p < 0,05$ .

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=5  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=5  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=5  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=5  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=5

### 3.4.6 Kollagengehalt des rechten Ventrikels

Die Ermittlung des Kollagengehaltes im rechten Ventrikel zeigte eine Zunahme durch Su5416/Hypoxie. In den unter Normoxie gehaltenen Tieren lag der durchschnittliche Gehalt an Kollagen bei  $0,76 \pm 0,18\%$ . Dieser Wert erhöhte sich nach 21 Tagen Su5416/Hypoxie bereits auf  $4,45 \pm 0,86\%$  und nach 35 Tagen auf  $11,55 \pm 1,48\%$ . In der mit Sildenafil behandelten Versuchsgruppe zeigte sich verglichen dazu ein deutlich geringerer Kollagenanteil von  $5,12 \pm 0,69\%$ , bei mit Riociguat behandelten Tieren war der Wert ebenfalls verglichen mit Placebotieren signifikant erniedrigt ( $3,54 \pm 0,2$ ).

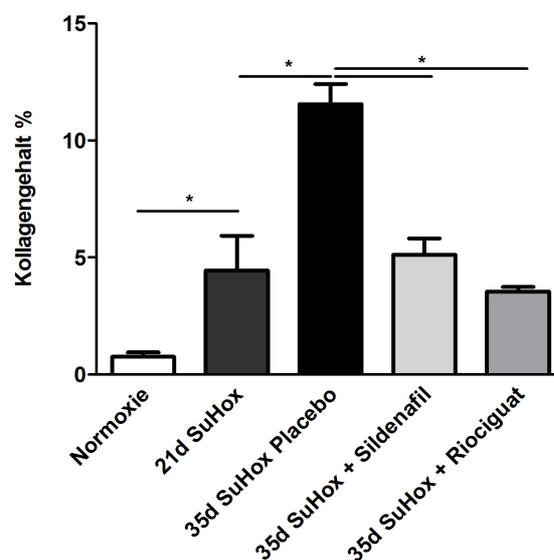


Abbildung 3.19: Der prozentualen Kollagengehalt des rechten Ventrikels in den verschiedenen Versuchsgruppen, \* $p < 0,05$ .

Normoxie: gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft, n=6  
 21d SuHox: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>), n=6  
 35d SuHox Placebo: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35, n=6  
 35d SuHox + Sildenafil: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35, n=6  
 35d SuHox + Riociguat: Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35, n=6

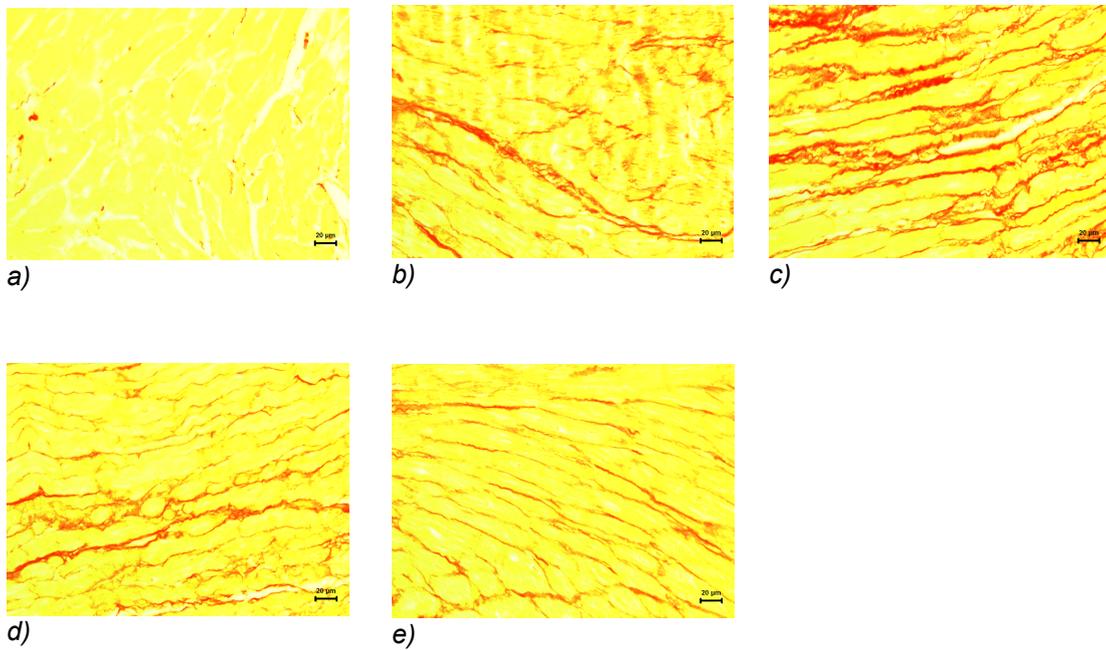


Abbildung 3.20 Sirius Red Färbung des rechten Ventrikels zur Analyse des Kollagengehaltes bei 400facher Vergrößerung.

a) Normoxie; b) 21d SuHox; c) 35d SuHox Placebo d) 35d SuHox + Sildenafil  
e) 35d SuHox + Riociguat

**Normoxie:** gesunde Kontrolltiere, gehalten bei Raumluft  
**21d SuHox:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 21Tage Hypoxie (10%O<sub>2</sub>)  
**35d SuHox Placebo:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Methylcellulose von Tag 21-35  
**35d SuHox + Sildenafil:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Sildenafil (50mg/kg) von Tag 21-35  
**35d SuHox + Riociguat:** Su5416-Injektion (20mg/kg) + 35 Tage Hypoxie, Riociguat (10mg/kg) von Tag 21-35

## **4 Diskussion**

### **4.1 Wahl des Tiermodells**

Viele unterschiedliche Faktoren führen zu dem Krankheitsbild der humanen PAH, so dass es eine Herausforderung darstellt, diese für die Forschung identisch nachzuahmen. Das Ganztiermodell bietet die Möglichkeit physiologische Organreaktionen darzustellen und so auch metabolische und humorale Einflüsse beobachten zu können. Eine Untersuchung an Säugetieren ist aus Gründen der Übertragbarkeit des komplexen Krankheitsgeschehens auf den Menschen notwendig und schließt Untersuchungen an entwicklungsgeschichtlich entfernteren Spezies wie z.B. Wirbellosen aus.

In dieser Arbeit wurde das Modell der Hypoxie und Su5416-induzierten pulmonal-arteriellen Hypertonie der Ratte gewählt. Die Erzeugung einer pulmonalen Hypertonie durch Hypoxie und Su5416 ist ein weltweit gebräuchliches tierexperimentelles Verfahren. Es ist eine Weiterentwicklung des reinen Hypoxiemodells, welches neben dem Monocrotalin-Modell ein viel verwendetes experimentelles Tiermodell für PAH darstellt. Im Monocrotalin-Modell wird durch das Zufügen eines selektiv auf das Lungengefäßbett wirkende Toxin eine Veränderung in der Gefäßmorphologie ausgelöst, welche zum pulmonalen Hochdruck führt (MARSBOOM & JANSSENS 2004). Beim Hypoxiemodell kommt es durch eine physiologische Reaktion des Körpers auf niedrigen Sauerstoffpartialdruck zum Euler-Liljestrand-Reflex. Der verwendete 10%ige Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft entspricht einem Aufenthalt in etwa 5000m über Meereshöhe. Bekannt ist diese Reaktion auch von der so genannten Höhenkrankheit (PENALOZA & ARIAS-STELLA 2007). Es wird vermutet, dass die hypoxisch induzierte Vasokonstriktion in einer Zunahme der Scherspannung in den Lungengefäßen resultiert, welche dann wiederum Hypertrophie und Proliferation der pulmonalen Gefäßmuskelzellen auslöst (VOELKEL & TUDER 2000). Sowohl dem Monocrotalin- als auch dem Hypoxie-Modell fehlen jedoch die

für eine humane Erkrankung typischen okklusiven Endothelzellproliferationen (TARASEVICIENE-STEWART et al. 2006, ABE et al. 2010).

Durch die Verbindung des VEGFR-Antagonisten Su5416 mit Hypoxie kommt es nicht nur zu einem erhöhten pulmonalen Blutdruck, sondern ebenfalls zu einer Imitation des vaskulären Remodelings in der Ratte (TARASEVICIENE-STEWART et al. 2006, OKA et al. 2007, ABE et al. 2010). Somit ist es möglich, einen wichtigen Ansatzpunkt über Entstehung und mögliche Therapiestrategien der pulmonalen Gefäßveränderungen zu erforschen. Im Gegensatz zur Höhenkrankheit des Menschen (PENALOZA & ARIAS-STELLA 2007) und zum reinen Hypoxie Modell (STENMARK et al. 2009) sind diese Erscheinungen auch nach Beendigung der Hypoxie und Verbringen in Normoxie nicht reversibel (TARASEVICIENE-STEWART 2001, OKA et al. 2007).

Für die Untersuchung der Wirkung der beiden Medikamente Sildenafil und Riociguat wurde der kurative Versuchsansatz gewählt. Im Gegensatz zu einem präventiven Ansatz, bei welchem bereits zu Beginn der einwirkenden Noxe mit der Therapie begonnen wird, startete diese therapeutische Intervention 21 Tage nach Su5416-Injektion und Beginn der Hypoxie. Die zu diesem Zeitpunkt untersuchte Kontrollgruppe (21d SuHox) zeigte, dass bereits nach 21 Tagen eine ausgeprägte pulmonale Hypertonie mit einem deutlichen vaskulären Remodeling festzustellen war. So kann die Situation humaner Patienten sinnvoll nachgestellt werden, in der ebenfalls eine Therapie erst nach Auftreten erster Symptome und Diagnosestellung begonnen wird.

Die in dieser Studie verwendeten Dosierungen von 50mg/kg/d für Sildenafil und 10mg/kg/d für Riociguat orientierten sich an aus anderen Arbeiten bekannten Dosen (SEBKHI et al. 2003, SCHERMULY et al. 2004, DUMITRASCU et al. 2006, SCHERMULY et al. 2008). Die Applikation fand über eine Fütterungssonde *per os* statt. Somit bestand die Möglichkeit jedem Tier nach Körpergewicht individuell Medikamente zu verabreichen. Im Gegensatz zu einer Verabreichung über das Trinkwasser war gesichert, dass jede Ratte mit der ausreichenden Menge versorgt wurde.

Sildenafil besitzt bereits eine Zulassung zur Therapie der pulmonalen Hypertonie. Bereits in mehreren vorangegangenen tierexperimentellen Untersuchungen konnte, sowohl bei der Monocrotalin- als auch Hypoxie-bedingten PAH, eine Verminderung des vaskulären Remodelings und Senkung des pulmonal-arteriellen Drucks erzielt werden (SEBKHI et al. 2003, SCHERMULY et al. 2004). Auch in klinischen Studien war Sildenafil in der Lage einen positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen zu nehmen (GHOFRANI et al. 2002, 2003, 2004a,b, REICHENBERGER et al. 2007a,b).

Riociguat hingegen befindet sich noch nicht auf dem Markt, es ist momentan in der klinischen Entwicklung der Firma Bayer Schering Pharma in Phase III Studien. In unterschiedlichen Untersuchungen im Hypoxie-Modell der Maus und Monocrotalin-Modell der Ratte führte eine Behandlung mit Riociguat zur Senkung des pulmonalen Drucks, der Rechtsherzhypertrophie sowie einer Reduktion der Gefäßveränderungen (DUMITRASCU et al. 2006, EVGENOV et al. 2008, SCHERMULY et al. 2008).

Im Laufe der Hypoxie-Exposition nach Su5416-Injektion kam es zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit leichter Dyspnoe. Bei einigen der nur mit Methylcellulose behandelten Tieren traten gegen Versuchsende periphere Ödeme auf. Fortschreitend war auch eine leichte Zyanose der Schleimhäute feststellbar. All diese Symptome weisen auf eine beginnende Rechtsherzinsuffizienz hin. Der Grad der Erkrankung lässt sich in Klasse III der Klassifizierung der funktionellen Schweregrade einordnen. Trotz des reduzierten Allgemeinbefindens ähnelte das Körpergewicht der Placebotiere dem der mit Riociguat oder Sildenafil therapierten Ratten. Die durch Ödeme verursachte vermehrte Flüssigkeitsansammlung dürfte zu dieser ähnlichen Gewichtsentwicklung beigetragen haben.

Es lässt sich abschließend feststellen, dass durch das gewählte Modell sowohl die klinischen als auch die histologischen Veränderungen ähnlich der humanen pulmonalen Hypertonie nachgeahmt werden konnten. Die prinzipiellen Mechanismen, die zur Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen

Hypertonie führen, sollten bei allen Säugetieren weitestgehend identisch und vergleichbar und so eine gewisse Übertragbarkeit der getesteten Substanzwirkungen auf den Menschen vorhanden sein.

## **4.2 Effekte der Behandlung mit Sildenafil bzw. Riociguat auf die Hämodynamik**

Zur Beurteilung der Hämodynamik können der invasiv ermittelte rechtsventrikuläre Druck, der systemisch arterielle Druck sowie der Lungengefäßwiderstand und das Herzminutenvolumen herangezogen werden. Die invasive Methode der Rechtsherzkatheterisierung gilt als Goldstandard der Diagnosestellung, da hier direkt die Druckerhöhung im Lungenkreislauf gemessen werden kann (BUDEV et al. 2003). Der in dieser Studie gemessene Druck im rechten Ventrikel zeigte eine Verdreifachung 35 Tage nach Su5416 Injektion und Hypoxie im Vergleich zu Kontrolltieren aus Normoxie-Bedingungen. Auch der pulmonale Gefäßwiderstand wies eine drastische Erhöhung auf. Der TPR spiegelt den Funktionsstatus des pulmonalvaskulären Systems aus Endothelium und glatten Muskelzellen wieder und besitzt eine gute prognostische Aussagekraft. Außerdem dient er der Einschätzung der Wirksamkeit von Therapiemaßnahmen (D'ALONZO et al. 1991).

Es ist weitläufig bekannt, dass chronische Hypoxie zu einer Vasokonstriktion und dadurch erhöhtem rechtsventrikulären Druck und Widerstand der Lungenstrombahn führt (HEATH et al. 1973, MEYRICK & REID 1983). Durch ein Einsetzen des vaskulären Remodelings, d.h. proliferativen Veränderungen der Lungengefäße, verringert sich das Lumen der Pulmonalarterien weiter. Der ständig erhöhte Perfusionswiderstand der Lunge resultiert in Veränderungen am Herzen (s. Kap.4.3) und in einer Verschlechterung der Herzfunktionen. Die eingeschränkte Herzleistung wird auch in dieser Arbeit an dem sich mehr als halbierten Herzminutenvolumen der Placebo-Gruppe im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren deutlich. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Ratten bereits ein reduzierter Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft eine Verdopplung der rechtsventrikulären Drucks (RABINOVITCH et al. 1979) und einsetzende Rechtsherzinsuffizienz hervorruft (RESSL et al. 1974). Durch eine vorangehende Injektion des VEGFR-Antagonisten Su5416 können diese Auswirkungen weiter

verstärkt werden (TARASEVIENE-STEWARD et al. 2006, OKA et al. 2007, ABE et al. 2010). Auch zeigte sich, dass das durch Su5416 und Hypoxie ausgelöste Krankheitsbild durch eine Reexposition in eine normoxische Umgebung nicht heilbar ist und sich somit von den reversiblen Veränderungen bei alleiniger Hypoxie unterscheidet. Die in anderen Studien veröffentlichten Parameter wie RVSP und Herzratio ähneln denen in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen (TARASEVICIENE-STEWARD 2001, 2005, 2006, OKA et al. 2007).

Die pathophysiologischen Mechanismen der PAH sind komplex und multifaktoriell. Der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßwiderstandes. Die untersuchten Medikamente Sildenafil und Riociguat greifen beide in dieses Regelsystem ein. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der hämodynamischen Kenngrößen unter Therapie. Sowohl Sildenafil als auch Riociguat waren in der Lage eine signifikante Regression des rechtsventrikulären Druckes und des Lungengefäßwiderstandes zu erzielen. Die ermittelten Parameter unterschieden sich nicht mehr von denen der Kontrollgruppe (21d SuHox) zu Therapiebeginn. Dies lässt darauf schließen, dass beide Wirkstoffe das Fortschreiten des Krankheitsprozesses verhindern konnten. Das Herzminutenvolumen stieg im Vergleich zu den Tieren, welche nur eine Therapie mit Methylcellulose erhielten, deutlich an. Riociguat war in der Lage, sowohl beim Herzminutenvolumen als auch dem Lungengefäßwiderstand, eine signifikant bessere Wirkung zu erzielen als Sildenafil. Auch waren die ermittelten Werte höher als bei Vergleichstieren zu Beginn der Behandlung an Tag 21. Daraus kann vermutet werden, dass es durch die Behandlung mit Riociguat nicht nur zu einer Verhinderung des Fortschreitens, sondern einer Regression des Krankheitsbildes kam.

In gesunden Lungen resultiert die Bindung von NO an die lösliche Guanylatzyklase in einer Aktivierung und Synthese des sekundären Botenstoffs cGMP, welcher die cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert und zu einer Reduktion der zytosolischen  $Ca^{2+}$  Konzentration führt. Dies löst in der Muskelzelle eine Desensibilisierung des kontraktiven Aktion-Myosin Systems und so eine

Vasodilatation aus (ARNOLD et al. 1977). Phosphodiesterase-5-Inhibitoren schützen vor dem Abbau von cGMP. Dadurch ist es möglich, den Abfall der cGMP-Konzentration in der Zelle zu verlangsamen, jedoch sind sie abhängig von einer intakten NO-sGC-cGMP-Achse (MICHELAKIS et al. 2003).

Die positive Wirkung von Sildenafil bei PAH deckt sich mit vorangegangenen Studien, in denen die Gabe von Sildenafil ebenfalls zu einer Verbesserung der Krankheitssituation im Tiermodell und klinischen Studien führte (GHOFRANI et al. 2002, 2003, 2004a,b; SEBKHI et al. 2003, SCHERMULY et al. 2004). Eine Erschöpfung an NO durch eine reduzierte Synthese oder Verluste kann den cGMP Level allerdings beeinträchtigen und so die Wirkung der PDE-5 Inhibitoren limitieren (STASCH et al. 2009). In PAH-Patienten zeigte sich eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO und lässt eine begrenzte Wirksamkeit von Sildenafil vermuten (ULRICH SOMAINI 2009), da Sildenafil lediglich als eine Art „Restlichtverstärker“ dienen kann.

Im Gegensatz dazu wirkt Riociguat NO unabhängig. Es hat seinen Angriffspunkt an der löslichen Guanylatzyklase und kann als sGC-Stimulator die Sensitivität von sGC für endogenes bioverfügbares NO erhöhen. Daneben ist Riociguat auch in der Lage ohne Anwesenheit von Stickstoffmonoxid auf die löslichen Guanylatzyklase zu wirken und eine Produktion von cGMP auszulösen (STASCH et al. 2009). Die in dieser Arbeit erstmals im Su5416/Hypoxie Model erzielten Ergebnisse decken sich mit anderen Veröffentlichungen, in denen Riociguat bei Hypoxie-induzierter PAH der Maus und Monocrotalin-induzierter PAH der Ratte Hämodynamik, Rechtsherzhypertrophie und Gefäßveränderungen der Lunge verbessern konnte (DUMITRASCU et al. 2006). Riociguat befindet sich momentan in klinischen Studien und zeigte dort eine gute Verträglichkeit, verbesserte die Leistungsfähigkeit und hämodynamischen Parameter in Patienten mit thrombo-embolischer und pulmonal-arterieller Hypertonie der Funktionsklassen II und III (GHOFRANI et al. 2010a).

Der ermittelte systemisch-arterielle Druck zeigte sowohl durch Su5416/Hypoxie-Exposition, als auch eine Behandlung mit Sildenafil oder Riociguat keine

signifikanten Änderungen. Unter Therapie bestand ein leichter Trend hin zu einem niedrigeren systolischen Druck. Dies kann ein Hinweis auf eine nicht ausschließlich auf das pulmonale Gefäßbett beschränkte vasodilatatorische Wirkung beider Medikamente sein. Laut Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) führt Sildenafil neben einer selektiven Vasodilatation im pulmonalen Gefäßsystem und auch in geringerem Ausmaß zu einer Vasodilatation im systemischen Kreislauf. Riociguat zeigte bei vorangegangenen Studien mit Monocrotalin-induzierter PAH keinen signifikanten Unterschied des systemisch-arteriellen Blutdrucks (SCHERMULY et al. 2008).

### **4.3 Effekte der Behandlung mit Sildenafil bzw. Riociguat auf die kardiale Struktur und Funktion**

Aussagen über Veränderungen am Herzen wurden sowohl invasiv durch Messung der Gewichtsration von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum als auch durch die durchgeführte Herzultraschalluntersuchung ermittelt. Des Weiteren fand eine histologische Auswertung des Kollagengehalts des rechten Ventrikels statt. Dadurch stehen vielfältige Parameter zur Beurteilung der Effekte am Herzen zur Verfügung.

Die transthorakale Doppler-/Echokardiographie ist das führende nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Untersuchung des kardiovaskulären Systems bei Ratten und Mäusen (URBONIENE et al. 2010, KOSANOVIC et al. 2011). Die Echokardiographie dient dazu Herzgröße und -funktion zu beurteilen. Sie bietet eine valide, nicht-invasive Möglichkeit reproduzierbare Werte zu erlangen und die zeitlichen morphologischen und funktionellen Veränderungen des Herzen zu untersuchen. Die Methode ist standardisiert, ohne großen Aufwand verfügbar und relativ schnell durchführbar. Durch Optimierung der Technik mittels moderner hochauflösender Doppler-Echokardiographiegeräte ist eine verlässliche Datenerhebung möglich.

Durch Su5416-Injektion und Hypoxie zeigten die Tiere im Verlauf des Experiments einen steten Anstieg des pulmonalen Drucks und korrelierend dazu eine steigende Rechtsherzhypertrophie. Dieses fortschreitende myokardiale Remodeling ist ein wichtiges Kennzeichen der PAH, welches auch bei humanen Patienten vorzufinden ist. Es schließt eine erhöhte Wanddicke, Fibrose und myokardiale Hypertrophie, welche ebenfalls in Dilatation übergehen kann, ein. Der gesamte Prozess wird als *Cor pulmonale* bezeichnet und ruft letztlich ein tödlich endendes Rechtsherzversagen hervor. Dabei ist die Hypertrophie des rechten Ventrikels ein wichtiger prognostischer Faktor für Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BRISTOW et al. 1998).

Innerhalb der 35 Tage nach Su5416 Injektion und Hypoxie zeigte sich bei den

Ratten eine deutliche Rechtsherzhypertrophie, die Wandstärke der rechten Kammer stieg, die Herzratio verdreifachte sich, gleichzeitig wurde eine Herzdilatation und Verschlechterung der Herzfunktionen TAPSE, MPI und der PAAT registriert. Die signifikante Zunahme an kollagenen Fasern in der histologischen Untersuchung des rechten Ventrikels bestätigte ebenfalls die stattfindenden Umbauprozesse.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, sind diese Veränderungen auf den von Vasokonstriktion und vaskulärem Remodeling hervorgerufenen, erhöhten Perfusionswiderstand der Lunge zurückzuführen. Durch die zunehmende Versteifung des Ventrikels wird die Füllung und das Schlagvolumen negativ beeinflusst. All dies spiegelt sich in einem verschlechterten Herzzeitvolumen wider. Mit fortschreitendem Krankheitsprozess kommt es zu einer nicht ausreichenden Versorgung der Organe und im Endstadium zum Rechtsherzversagen.

Nach 14 Tagen Medikamentengabe senkte Riociguat signifikant Rechtsherzhypertrophie und kardiale Fibrose. Die RV/LV+S Ratio und der RVWT waren signifikant niedriger als in der Placebogruppe und vergleichbar mit den Kontrolltieren nach 21 Tagen Su5416/Hypoxie. Auch die durch RVID ermittelte Herzdilatation zeigte eine signifikante Verringerung zur Placebogruppe. Zudem wurden die im Ultraschall gemessenen Rechtsherzfunktionen positiv beeinflusst. So zeigte der globale Leistungsparameter MPI, welcher sowohl für die systolische als auch diastolische Funktion des rechten Ventrikels steht, eine deutliche Verbesserung unter Behandlung. Beim Menschen dient der ebenfalls ermittelte Parameter TAPSE als wichtiges prognostisches Hilfsmittel für die Abschätzung der Überlebensdauer. Dieser gibt eine Aussage über die longitudinale Funktion des rechten Ventrikels. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der TAPSE unter Therapie sowie eine bessere Wirkung von Riociguat im Vergleich zu Sildenafil und spricht so für eine deutlich verbesserte Leistungsfähigkeit des rechten Ventrikels. Auch die pulmonal-arterielle Akzelerationszeit, welche die Beschleunigung des Blutes in der Pulmonalarterie widerspiegelt, zeigte eine

signifikante Erhöhung durch die Medikamentengabe. Dies weist auf eine verminderte Steifheit und erhöhte Kapazität der Lungenstrombahn hin. PAAT korreliert sowohl bei Tieren als auch dem Menschen stark mit dem mittleren pulmonal-arteriellen sowie dem rechtsventrikulären Druck (ZEYDABADINEJAD 2006, URBONIENE et al. 2010, KOSANOVIC et al. 2011).

Insgesamt lässt sich auch hier analog zu den Erkenntnissen der hämodynamischen Parameter feststellen, dass der PDE-5 Hemmer Sildenafil ebenfalls Verbesserungen hervorrief. Diese waren aber nicht so groß wie bei der Behandlung mit dem sGC Stimulator. Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Daten über die Wirkung von Riociguat im Su5416/Hypoxie Modell sind vergleichbar mit veröffentlichten Phase II Studien (GRIMMINGER 2009, GHOFRANI 2010a).

Im Su5416/Hypoxie-induzierten Modell der pulmonalen Hypertonie lässt sich eine Aussage über den rechten Ventrikel nur im Zusammenhang mit den Druckveränderungen der Pulmonalgefäße treffen. Eine gesonderte Analyse der Veränderungen ist nicht möglich, da nicht differenziert werden kann, ob die Veränderungen nur eine Folge der Druckzunahme bzw. Druckabnahme unter Therapie oder auf eine gezielte antiproliferative Substanzwirkung am rechten Herzen zurückzuführen sind. Hierzu wäre die Verwendung eines weiteres Modell, beispielsweise durch Stenose der *Arteria pulmonalis*, nötig. Der kardioprotektive und antifibrotische Effekt von Sildenafil und Riociguat wurde in anderen Studien demonstriert (NAGENDRAN et al. 2007, SHARKOVSKA et al. 2010, GESCHKA et al. 2011). Daneben zeigte sich, dass der Riociguat ähnelnde sGC Stimulator Bay41-8543 im *Arteria pulmonalis* Banding-Modell für Rechtsherzhypertrophie die Kontraktilität des rechten Ventrikels positiv beeinflussen und die Herzfibrose verringern konnte (SCHYMURA et al. 2011).

#### **4.4 Effekte der Behandlung mit Sildenafil bzw. Riociguat auf die Gefäßmorphometrie**

In den durchgeführten Versuchen konnten die Veränderungen von rechtsventrikulärer Hypertrophie, Hämodynamik und strukturellem Gefäßwandumbau im Modell der Hypoxie-Su5416 induzierten pulmonalen Hypertonie untersucht werden. Durch die Injektion des VEGFR-Antagonisten Su5416 vor Verbringung in Hypoxie war es möglich, histopathologische Veränderungen vergleichbar zur humanen Erkrankung hervorzurufen. Dies ist ein Vorteil gegenüber den häufig verwendeten Forschungsmodellen der reinen Hypoxie oder Monocrotalin-induzierten PAH, die nicht in der Lage sind, diese Veränderungen in der Ratte nachzuahmen.

Der Kenntnisstand bezüglich der stattfindenden Gefäßveränderungen, vor allem der Neointimaformation und Entstehung plexiformer Läsionen, ist noch sehr gering. Die zu Grunde liegenden Ursachen dieser Arteriopathien sind weitgehend ungeklärt. Vor allem endotheliale Dysfunktionen scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Diese resultieren letztlich in einer Imbalance aus endothelialen Vasodilatoren wie NO und Prostacyclin sowie vasokonstriktorisches und proliferativ wirkenden Substanzen, wie Endothelin-1 und Thromboxan (TUDER et al. 2007, RABINOVITCH 2008). Bei den humanen plexiformen Läsionen handelt es sich um schnell proliferierende Endothelzellen, in denen es zu einer Ausbildung von kleinen endoluminalen Kanälen kommt. Es wird vermutet, dass es sich hier um das Ergebnis eines überschießenden Neovaskulisierungsversuchs handelt. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass es eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, bis es zu einer Ausbildung dieser Arteriopathien kommt (HEATH et al. 1987). Gleiches zeigte sich bei einer Untersuchung im Rattenmodell, bei der sich vergleichbare Gefäßveränderungen ebenfalls erst nach 14 Wochen manifestierten (ABE et al. 2010). Nach 5 Wochen Su5416-Injektion und Hypoxie ließen sich dementsprechend noch keine plexiformen Läsionen feststellen, es kam jedoch zu einer deutlichen Ausbildung einer Neointima, welche im Durchschnitt

die 1,6 fache Dicke der Media besaß. Neointima wird die Gefäßschicht aus Zellen und extrazellulärer Matrix bezeichnet, welche zwischen Endothel und Lamina elastica interna anzutreffen ist. Ebenfalls bei der humanen Erkrankung stellt sie ein charakteristisches Phänomen dar (HUMBERT et al. 2004, NICOD et al. 2007). Anhand der Analyse der PCNA-positiven Kerne konnte eine Aussage bezüglich der Tendenz zur Proliferation gemacht werden. Der PCNA Index ist ein interessanter histologischer Marker für stattfindende Zellvermehrung. Es handelt sich hierbei um ein hauptsächlich im Zellkern anzutreffendes Protein, welches für die DNA-Replikation nötig ist. Je nach Zellzyklus wird mehr oder weniger exprimiert, das Maximum findet sich in der S-Phase. Dementsprechend korreliert der Gehalt an PCNA-positiven Zellen mit dem Maß der Zellproliferation (BRAVO et al. 1981). In der Analyse der Lungenschnitte der Placebo-Gruppe zeigte sich ein deutlicher Anstieg von PCNA-positiven Kernen, was als ein Nachweis der Endothelproliferation zu werten ist. Dies bestätigt die Annahme, dass durch die Gabe des Wachstumsfaktor-Antagonisten Su5416 auf die initiale Apoptose eine Hyperproliferation der überlebenden Zellen folgt. Diese überschießende Zellvermehrung führt dann wiederum zur Okklusion der Gefäßlumina (VOELKEL & TUDER 2000).

Auch in dieser Studie verschob sich der Okklusionsindex von hauptsächlich offenen Gefäßen unter Normoxie hin zu geschlossenen Gefäßen mit Su5416/Hypoxie und ähnelt damit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (OKA et al. 2007). Hier wurde eine lineare Korrelation zwischen Okklusionsindex und rechtsventrikulärem Druck beschrieben, welcher auch in dieser Untersuchung zu erkennen ist. Des Weiteren wird deutlich, dass es sich bei der pulmonalen Hypertonie nicht um eine rein vasokonstriktive, sondern eher um eine vasoproliferative Erkrankung handelt. Bezüglich des progressiven pulmonalen Remodelings sollte daher neben einer auf Gefäßdilatation abzielenden Behandlung auch ein Fokus auf anti-proliferative Ansätze gerichtet werden. Die ins Verhältnis zur Gefäßbreite gesetzte mediale Wandstärke zeigte eine deutliche Zunahme unter Hypoxie in Kombination mit SU5416. Diese Zunahme ist

zum einen durch Veränderung der Intima durch Neointimaformation sowie eine Mediaverdickung zurückzuführen. Diese strukturellen Veränderungen in allen Gefäßschichten sind typisch für eine pulmonal-arterielle Hypertonie. Die Vergrößerung der Media beruht hauptsächlich auf Proliferation glattmuskulärer Zellen sowie einer Zunahme extrazellulärer Matrixproteine (STENMARK et al. 2006).

Mit der etablierten Methode der immunhistochemischen Doppelfärbung zur Differenzierung zwischen alpha-Aktin- und von Willebrand (Faktor VIII)- positiven Gefäßbereichen (WEISSMANN et al. 2007) konnte weiter zwischen unbemuskelten, partiell und voll muskularisierten Gefäßen unterschieden werden. Die unter Su5416 und Hypoxie ausgebildete fortschreitende Muskularisierung ist an der deutlichen Zunahme muskularisierter Gefäße im Vergleich zu normoxischen Kontrolltieren zu erkennen. Bei der *de novo* Muskularisierung kommt es zu einer distalen Ausbreitung glatter Muskelzellen in physiologisch unmuskularisierte kleine Lungengefäße (HUMBERT et al. 2004b).

Betrachtet man all diese histologischen Parameter im Hinblick auf die Wirkung von Sildenafil und Riociguat, lässt sich feststellen, dass die NO-sGC-cGMP-Achse eine wichtige Rolle in der Pathogenese der angioproliferativen pulmonalen Hypertonie zu spielen scheint. Beide Wirkstoffe waren in der Lage die durch Su5416 und Hypoxie hervorgerufenen Gefäßveränderungen zu reduzieren. Die mediale Wandstärke konnte durch beide Substanzen deutlich gesenkt werden. Auch konnte die Zunahme der voll muskularisierten Gefäße durch eine therapeutische Intervention mit Sildenafil bzw. Riociguat signifikant verlangsamt werden. Zudem kam es zu einem leichten Anstieg der nicht muskularisierten Gefäße im Vergleich zur Methylcellulose-behandelten Vergleichsgruppe. Die in dieser Arbeit erstmalig gezeigten positiven Wirkungen von Sildenafil und Riociguat auf das Gefäßremodeling im Su5416/Hypoxie Modell zeigten sich auch bei der Monocrotalin- und reinen Hypoxie-induzierten experimentellen PAH (ZHAO et al. 2001, SEBKHI et al. 2003, DUMITRASCU et al. 2006).

Des Weiteren kam es zu einer signifikant geringeren Neointimaproliferation.

Dadurch zeigten sich weniger okklusive Gefäßläsionen als in der Placebo-behandelten Vergleichsgruppe. Auffällig ist hier, dass Riociguat im Vergleich zu Sildenafil eine eindeutig bessere Reduktion der Neointimaformation aufwies. Es konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass eine Stimulation der sGC im Vergleich zu einer PDE-5-Hemmung einen deutlich stärkeren therapeutischen Effekt bei der Su5416/Hypoxie-induzierten experimentellen PAH aufweist. Diese im Vergleich zur Placebo-Gruppe geringere Tendenz zur Zellproliferation konnte auch durch eine Reduktion von PCNA-positiven Zellen nachgewiesen werden. Diese Verringerung der Proliferation von vaskulären Zellen der Lunge durch Modulation des NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweges zeigte sich auch in anderen Studien am Monocrotalin-Modell bzw. bei humanen Zellen (SCHERMULY et al. 2004, WHARTON et al. 2005).

Die bei pulmonaler Hypertonie anzutreffende verringerte Verfügbarkeit von NO führt zu einer geringeren cGMP Produktion und damit verbundenen Vasokonstriktion (RABINOVITCH 2008). Beide untersuchten Wirkstoffe setzen an unterschiedlichen Punkten des NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweges an. PDE-5-Hemmer verringern den Abbau von cGMP, hingegen führen sGC-Stimulatoren zu einer vermehrten Bildung des Botenstoffes. Dadurch kann auch die bessere Wirkung von Riociguat im Vergleich zu Sildenafil erklärt werden, welches als PDE-5-Hemmer nur die gegebenen Menge an cGMP erhalten kann.

Die PDE-5-Expression und Aktivität spielt vor allem in der Lunge eine wichtige Rolle und scheint bei pulmonaler Hypertonie erhöht (BLACK et al. 2001, WHARTON et al. 2005, MACLEAN et al. 2009) und stellt somit einen attraktiven pharmakologischen Angriffspunkt dar. Mit Hilfe der Aufrechterhaltung des cGMP-Spiegels kann versucht werden die vasodilatativen Eigenschaften von NO zu verstärken (RAJA et al. 2006). Dies bestätigt sich sowohl in dieser Arbeit als auch in verschiedenen Veröffentlichungen, in denen durch Therapie mit Sildenafil ebenfalls der Lungengefäßumbau gehemmt wurde (SEBKHI et al. 2003, SCHERMULY et al. 2004). Allerdings ist der therapeutische Effekt von PDE-5-Inhibitoren abhängig vom typischerweise in PAH-Patienten reduzierten Basalwert

der NO-Expression und somit nicht in allen Patienten effektiv (BHATIA et al. 2003, CHOCKALINGAM et al. 2005).

Riociguat hingegen ist in der Lage die cGMP Biosynthese direkt durch NO-unabhängige Stimulation zu erhöhen sowie die lösliche Guanylatzyklase für niedrige NO-Level zu sensitivieren (MITTENDORF et al. 2009). Es wurde bereits gezeigt, dass Riociguat den rechtsventrikulären Druck, die Rechtsherzhypertrophie sowie das Gefäßremodeling im Monocrotalin-Modell der Ratte sowie bei Hypoxie in Mäusen verbessern kann (SCHERMULY et al. 2008). Mit der vorliegenden Arbeit konnte nun auch erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass die in der Ratte durch Su5416 und Hypoxie hervorgerufenen Gefäßveränderungen durch eine Behandlung mit Riociguat signifikant reduziert werden können.

#### **4.5 Klinische Relevanz und Ausblick**

Die pulmonale Hypertonie gilt noch immer als unheilbare Krankheit. Auch wenn in den letzten Jahren neue Therapiemöglichkeiten die Lebensqualität und Überlebenszeit der Patienten deutlich verbessern, ist es eine tödlich endende Erkrankung (HUBER et al. 2007).

In dieser Arbeit konnten erfolgreich der humanen PAH ähnelnde Gefäßveränderungen im Su5416/Hypoxie-Modell nachgestellt werden. Es wurde deutlich, dass es sich statt um ein vasokonstriktives eher um ein vasoproliferatives Krankheitsbild handelt. Gegenwärtig eingesetzte Medikamente zielen neben einer Verbesserung der klinischen Erscheinungen auf die Verringerung des pulmonal-arteriellen Drucks. Eine spezielle Therapie sowohl dem pulmonalen als auch myokardialen Remodeling entgegenzuwirken, existiert momentan noch nicht. Ein neuer Ansatzpunkt sind bisher in der Krebstherapie eingesetzte Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche auch im Hinblick auf das progressive vaskuläre Remodeling einen hemmenden Einfluss nehmen können (GHOFRANI et al. 2005, SCHERMULY et al. 2005).

Die beiden untersuchten Medikamente Sildenafil und Riociguat zeigten eine Verbesserung der Hämodynamik sowie der Rechtsherzhypertrophie und des vaskulären Remodelings. Vor allem der bis heute noch nicht zugelassene sGC Stimulator Riociguat zeigte erstmalig im Vergleich zu Sildenafil eine deutlich bessere Wirkung im Su5416/Hypoxie Modell und könnte bei künftigen Therapien Berücksichtigung finden. Die gewonnenen histologischen Ergebnisse eröffnen weitere Fragen bezüglich der verantwortlichen Mechanismen auf Zellebene. Zu deren Aufklärung sind weitergehende molekularbiologische Arbeiten nötig, damit die pathologischen Umbauprozesse detaillierter aufgeschlüsselt werden können. Um therapeutische Ansätze der Gefäßveränderungen zu optimieren, ist es essentiell ihre Entstehung im Laufe der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie zu untersuchen.

## **5 Zusammenfassung**

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine schwerwiegende Erkrankung, deren Krankheitsverlauf noch immer nicht aufzuhalten oder gar zu kurieren ist. Es handelt sich um eine Erkrankung der kleinen arteriellen Lungengefäße, die wiederum für die Erhöhung des Gefäßwiderstandes und in Folge dessen für den pulmonalen Hochdruck verantwortlich sind. Typisch sind intimale Fibrose, Mediaverdickung, Neointimaproliferation sowie plexiforme Läsionen.

Der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen, so auch der PAH. Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, die Effekte des PDE-5-Hemmers Sildenafil und die des sGC-Stimulators Riociguat (BAY 63-2521) verglichen zu einer Placebothherapie in einem tierexperimentellen Versuchsaufbau zu untersuchen. Dazu wurde das Modell der Hypoxie-induzierten PAH in Verbindung mit dem VEGFR-Antagonisten Su5416 in der Ratte gewählt. Dies ermöglichte neben der pulmonalen Druckerhöhung auch die bei humanen Patienten vorzufindenden Gefäßveränderungen nachzustellen.

An Hand unterschiedlicher aussagekräftiger Parameter, gemessen durch invasive Hämodynamik, echokardiographische Untersuchungen sowie die analysierte Gefäßmorphometrie konnten die therapeutischen Effekte beider Substanzen nachgewiesen werden. Riociguat und Sildenafil nahmen positiven Einfluss auf die Hämodynamik, das vaskuläre Remodeling sowie die rechtsventrikuläre Hypertrophie und Herzfunktion verglichen mit einer Placebobehandlung. Dabei wurden bessere Resultate durch Riociguat erzielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum Verständnis der Erkrankung und deren Verlauf bei und ebnen den Weg für eine verbesserte Medikamentierung. Neben dem bereits für die Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie zugelassenen Medikament Sildenafil (Revatio®) bietet so auch das noch in der klinischen Studie befindliche Riociguat eine denkbare Möglichkeit der Behandlung des Krankheitsbildes der pulmonalen Hypertonie.

## **6 Summary**

Pulmonary arterial hypertension is a severe life-threatening disease. Up to now there is no medical treatment to permanently stop or even reverse the course of disease. Mainly the small arterial vessels of the lung are affected, while they increase pulmonary resistance and thereby lead to pulmonary hypertension. Intimal fibrosis, thickening of the media, neointima proliferation as well as plexiform lesions are typical pathohistological findings.

The nitric oxide (NO)- soluble guanylate cyclase (sGC)- cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signal transduction pathway is impaired in many cardiovascular diseases, including PAH. Riociguat (BAY 63-2521) is a stimulator of sGC that works both in synergy with and independently from NO to increase levels of cGMP. The aim of the study was to investigate the role of NO-sGC-cGMP signaling in a model of severe PAH and to evaluate the effects of sGC stimulation by riociguat and PDE5 inhibition by sildenafil in comparison to a placebo treatment on hemodynamics and vascular remodeling in severe experimental PAH. Severe angioproliferative PAH was induced in rats by combined exposure to the vascular endothelial growth factor receptor antagonist SU5416 and hypoxia at 10% O<sub>2</sub>. The employed model enabled not only to increase pulmonary pressure, but also to mimic the vascular alteration observed in human patients.

Therapeutic effects have been demonstrated with help of different parameters: invasive hemodynamics, echocardiographic investigations and histological studies. Both compounds show positive influence on hemodynamics, vascular remodeling, right heart hypertrophy, and heart function in comparison with vehicle treatment. Riociguat had greater effects on these parameters than sildenafil.

The outcome of this study contributes to the understanding of the process and the disease itself and paves the way for an optimized medication. Besides sildenafil, which is already approved for PAH therapy (Revatio®), riociguat is a promising possibility for a treatment.

## **7 Literaturverzeichnis**

Aaronson PI, Robertson TP, Ward JP (2002)

Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction.  
Respir Physiol Neurobiol.132:107–120.

Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M (2010)

Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension.  
Circulation.121:2747-2754.

Allègre C, Manhès G, Lewin E(2001)

Chemical composition of the Earth and the volatility control on planetary genetics.  
Earth and Planetary Science Letters 185(1–2):49–69.

Archer SL, Tolins JP, Raj L, Weir EK (1989)

Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor.  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 164 (3):1198-1205.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977)

Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 74(8):3203-3207.

Austin ED & Loyd JE (2007)

Genetics and mediators In pulmonary arterial hypertension  
Clin Chest Med 28, 43-57.

Badesch DB, Orton EC, Zapp LM, Westcott JY, Hester J, Voelkel NF, Stenmark KR (1989)

Decreased arterial wall prostaglandin production in neonatal calves with severe chronic pulmonary hypertension.  
Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol. 1:489–498.

Badesch BD, Champion HC, Gomez-Sanchez MA (2009)

Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension.

J.Am.Coll.Cardiol.34:888-894.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH (1996)

A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group.

N.Engl.J.Med.334:296-302.

Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V (2003)

Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension.

J Am Coll Cardiol; 41(12):2119-2125.

Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski A, Gaine S (2004)a

Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension.

J.Am.Coll.Cardiol. 43:40–47.

Barst RJ, Langleben D, Badesch D (2004)b

Treatment of pulmonary arterial hypertension with selective endothelin-A receptor antagonist sitaxentan.

J.Am.Coll.Cardiol.43(7):1149-1153.

Beavo JA & Brunton LL (2002)

Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century.

Nat.Rev.Mol.Cell Biol.3(9):710-718.

Belknap JK, Orton EC, Ensley B, Tucker A, Stenmark KR (1997)

Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries.

Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.16:366–371.

Bhatia S, Frantz RP, Severson CJ, Durst LA, McGoon MD (2003)

Immediate and long-term hemodynamic and clinical effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension receiving vasodilator therapy.

Mayo.Clin.Proc.78:1207-1213.

Black SM, Sanchez LS, Mata-Greenwood E, Bekker JM, Steinhorn RH, et. al (2001)  
sGC and PDE5 are elevated in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension.  
Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.281:L1051-1057.

Botney MD, Bahadori L, Gold LI (1994)  
Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta.  
Am.J.Pathol.144:286-95.

Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE (1981)  
Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation.  
Exp.Cell Res. 136 (2):311-319.

Budev MM, Arroliga AC, Jennings CA (2003)  
Diagnosis and evaluation of pulmonary hypertension.  
Cleve.Clin.J.Med.70:9-17.

Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL (2006):  
How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension?  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 373:391–400.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens, L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C (1996)  
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.  
Nature 380:435–439.

Chockalingam A, Gnanavelu G, Venkatesan S, Elangovan S, Jagannathan V, et al. (2005)  
Efficacy and optimal dose of sildenafil in primary pulmonary hypertension.  
Int.J.Cardiol.99:91-95.

Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A (2002)  
Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery.  
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 26(2):194-201.

- Cohen A, Hanson HK, Morris K, Fouty B, McMurty IF, Clarke W, Rodman DM (1996)  
Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively  
vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats.  
J.Clin.Invest 97(1):172-179.
- Conti M & Beavo J (2007)  
Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in  
cyclic nucleotide signaling.  
Annu.Rev.Biochem.76:481-511.
- Corson MA, James NJ, Latta SE, Nerem RM, Berk, BC, Harrison DG (1996)  
Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress.  
Circ.Res. 79(5):984-991.
- Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M (2000)  
Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor.  
Nat.Med.6:698-702.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring  
RM, Groves BM, Kernis JT (1991)  
Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective  
registry.  
Ann.Intern.Med.115:343-349.
- Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, Ghofrani HA,  
Weissmann N, Voswinckel R, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2010)a  
Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension.  
Am.J.Respir.Crit.CareMed.181:158-67.
- Dahal BK, Kosanovic D, Pamarthi PK, Sydykov A, Lai YJ, Kast R, Schirok H, Stasch JP, Ghofrani  
HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT (2010)b  
Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension.  
Eur.Respir.J.36:808-18.

- Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H (2006)  
Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling.  
*Circulation*.113:286–95.
- Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti S, Ghofrani HA, Samidurai A, Traupe H, Seeger W (2008)  
Characterization of a murine model of monocrotalin pyrrole-induced acute lung injury.  
*BMC.Pulm.Med* 8:25.
- Durmowicz AG, Hofmeister S, Kadyraliev TK, Aldashev AA, Stenmark KR (1993)  
Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude.  
*J Appl Physiol*.74:2276–2285.
- Elliott CG, Barst RJ, Seeger W, Porres-Aguilar M, Brown LM, Zamanian RT, Rubin LJ (2010)  
Worldwide physician education and training in pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective.  
*Chest*.137:85-94.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP (2006)  
NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential.  
*Nature Reviews.Drug Discovery*.5,9:755–768.
- Faller DV (1999)  
Endothelial cell responses to hypoxic stress.  
*Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*.26:74–84.
- Förstermann U & Kleinert H (1995)  
Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms.  
*Naunyn Schmiedeberg`s Arch.Pharmacol*. 352(4):351-364.
- Frey R, Mück W, Unger S, Artmeier-Brandt U, Weimann G, Wensing G (2008)  
Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat (BAY 58-2667) in healthy male volunteers.  
*Journal of Clinical Pharmacology*.48(12)1400–1410.

Fung YC & Liu SQ (1991)

Changes of zero-stress state of rat pulmonary arteries in hypoxic hypertension.  
J.Appl.Physiol.70:2455-2470.

Gabbay E, Yeow W, Playford D (2007)

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an uncommon cause of pulmonary hypertension (PH) in an unselected population: The Armadale echocardiography study.  
Am.J.Resp.Crit.Care.Med.175:A713.

Galie N, Torbicki, A, Barst R (2004)

Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension: the task force on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension of the European Society of Cardiology.  
Eur.Heart.J.25:2243-2278.

Galie N, Badesch D, Oudiz R (2005)a

Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension.  
J.Am.Coll.Cardiol.46 (3):529-535.

Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G (2005)b

Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension.  
N.Engl.J.Med. 353(20):2148-2157.

Gali N, Palazzini M, Manes A (2010)

Pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a clarification is needed.  
Eur.Respir.J.36:986-990.

Gerber JG, Voelkel N, Nies AS, McMurtry IF, Reeves JT (1980)

Moderation of hypoxic vasoconstriction by infused arachidonic acid: role of PGI<sub>2</sub>.  
J.Appl.Physiol.49(1):107-12.

Geschka S, Kretschmer A, Sharkovska Y, Evgenov OV, Lawrenz B (2011)

Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive Dahl rats.  
PLoS One 6:e21853.

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, et al. (2002)  
Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial.  
Lancet 360 (9337):895-900.

Ghofrani HA, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, et al. (2003)a  
Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension.  
Am.J.Respir.Crit Care Med.167(8):1139-1141.

Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT (2003)b  
Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary hypertension.  
J.Am.Coll.Cardiol.42(1):158-164.

Ghofrani HA., Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, et al (2004)a  
Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base  
camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial.  
Ann.Intern.Med. 141(3):169-177.

Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Schermuly  
RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2004)b  
Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5  
inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study.  
J.Am.Coll.Cardiol.44 (7):1488-1496.

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

Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F (2005)  
Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension.  
N.Engl.J.Med.353:1412-1413.

Ghofrani HA, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2006)  
„Reverse Remodeling“ - Paradigmenwechsel in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie  
Dtsch. Med. Wochenschr. 131:871-874.

Ghofrani HA & Grimminger F (2009)

Modulating cGMP to treat lung diseases.

Handb Exp Pharmacol:191:469–483.

Ghofrani HA, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Staehler G, et al. (2010)a

Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study.

Eur Respir J 36: 792-799.

Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ et al (2010)b

Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy.

Am J Respir Crit Care Med:182(9):1171-7.

Giaid A & Saleh D (1995)

Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension.

N.Engl.J.Med.333(4):214-221.

Golpon HA, Fadok VA, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Sauer C et al. (2004)

Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth.

FASEB J.18(14):1716-1718.

Grimminger F, Weimann G, Frey R (2009)

First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension.

Eur.Respir.J.33(4):785–792.

Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman A, Malconian MK, et al. (1987)

Operation Everest II: elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen.

J.Appl.Physiol.63:521–530.

Heath D, Smith P, Gosney J, Mulcahy D, Fox K, Yacoub M, Harris P (1987)

The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension.

Br.Heart.J.58:204.

Heath D (1993)

The pathology of pulmonary hypertension.

Eur.Respir.Rev.3:555-558.

Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L, Ostadal M (2000)

A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension.

Physiol.Res.49:493–501.

Hislop A & Reid L (1979)

New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension.

Br.J Exp.Pathol.57:542-554.

Hoeper MM, Faulenbach C, Golpon H (2004)

Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary hypertension.

Eur.Respir.J.24(6):1007-1010.

Houston CS, Sutton JR, Cymerman A, Reeves JT (1987)

Operation Everest II: man at extreme altitude.

J.Appl. Physiol.63:877–882.

Huber LC, Fischler M, Distler O, Gay S, Speich R, Ulrich S (2007)

Pulmonal-arterielle Hypertonie - Aktuelle Therapieansätze.

Arzneimitteltherapie 25:364-373.

Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004)a

Treatment of pulmonary arterial hypertension.

N.Engl.J.Med351:1425-36.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, et al. (2004)b

Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension.

J.Am.Coll.Cardiol. 43(12):13S-24S.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KD (1987)

Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical.

Circ.Res.61(6):866-879.

Iwamuro Y, Miwa S, Zhang XF, Minowa T, Enoki T, Okamoto Y, Hasegawa H, Furutani H, Okazawa M, Ishikawa M, Hashimoto N, Masaki T (1999)

Activation of three types of voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca<sup>2+</sup> channel blocker LOE 908.

Br.J.Pharmacol.126(5):1107-1114.

Jones R & Reid L (1995)

Vascular Remodeling in Clinical and Experimental Pulmonary Hypertension.

London: Portland Press.

Jones, PL, Cowan KN, Rabinovitch M (1997)

Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease.

Am.J.Pathol.150:1349-1360.

Kerr JS, Ruppert CL, Tozzi CA, Neubauer JA, Frankel HM, Yu SY, Riley DJ (1987)

Reduction of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the rat by an inhibitor of collagen production.

Am Rev Resp.Dis, 135: 300-306.

Kimura H & Murad F (1974)

Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart.

J.Biol.Chem.249(21):6910-6.

Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti S, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schäfer S (2008)

Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling.

Circulation 118(20):2081-2090.

Klinger JR, Warburton RR, Pietras LA, Smithies O, Swift R, Hill NS (1999)

Genetic disruption of atrial natriuretic peptide causes pulmonary hypertension in normoxic and hypoxic mice.

Am J Physiol 20:L868-874.

- Kosanovic D, Kojonazarov B, Luitel H, Dahal BK, Sydykov A et al (2011)  
Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.  
Respir.Res.12:87.
- Kovacs G, Berghold A, Scheidl S (2009)  
Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects. A systematic review.  
Eur.Resp.J.34:888-894.
- Lalich JJ & Merkow L (1961)  
Pulmonary arteries produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*.  
Lab Invest 10:744-750.
- Le Cras TD & McMurtry IF (2001)  
Nitric oxide production in the hypoxic lung.  
Am.J.Physiol.Lung.Cell Mol.Physiol.280:L575–L582.
- Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM (1998)  
Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension.  
J.Clin.Invest.101:927–934.
- Lee SH & Rubin LJ (2005)  
Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension.  
J.Intern.Med.258:199-215.
- Lepore J Maroo JA, Pereira NL, Ginns LC, Dec GW, Zapol WM, Bloch KD, Semigran MJ (2002)  
Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension.  
Am.J.Cardiol.90(6):677-680.
- Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA (2004)  
Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension.  
J.Am.Coll.Cardiol.43:764-770.

Lincoln TM, Hall CL, Park CR, Corbin JD (1976)

Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate binding proteins in rat tissues.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.73(8):2559-63.

Loscalzo, J. (1992)

Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension.

N.Engl.J.Med 327:117-119.

MacLean MR, Johnston ED, McCulloch, KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G (1997)

Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension.

J.Pharmacol.Exp.Ther.283(2):619-624.

Marletta MA (1988)

Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents.

Chem.Res.Toxicol.1(5):249-257.

Marsboom GR & Janssens SP (2004):

Models for pulmonary hypertension.

Drug Discovery Today: Disease Models 1(3):289-296.

Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, VasANJI A, Drazba J, et al. (2007)

Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension.

Am.J.Physiol.Lung.Cell Mol.Physiol.293:L548-L554.

Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2003)

Phosphodiesterases in the vascular system.

J.Smooth Muscle Res. 39(4):67-86.

Mendel DB, Schreck RE, West DC et al (2000)

The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function.

Clin.Cancer Res. 2000;6(12):4848-4858.

Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S (2006)

Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension.

Circulation.114(14):1482-1489.

Meyrick B & Reid L (1979)

Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall.

Am.J.Pathol.96:51–70.

Meyrick B & Reid L (1980)a

Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study.

Lab Invest.42:603–615.

Meyrick B & Reid L (1980)b

Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression.

Am.J.Pathol.100:151-178.

Meyrick B (2001)

The pathology of pulmonary artery hypertension.

Clin.Chest Med.22:393–404.

Michelakis ED et al (2003)

The role of the NO axis and its therapeutic implications in pulmonary arterial hypertension.

Heart Fail Rev. 8(1):5-21.

Michelakis ED, McMurtry MS, Sonnenberg B, Archer SL. (2003)

The NO - K<sup>+</sup> channel axis in pulmonary arterial hypertension. Activation by experimental oral therapies.

Adv Exp Med Biol. 543:293-322

Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, et al. (2009)

Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension.

Chem.Med.Chem.4:853-865.

Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T (2000)

Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension; comparison with cardiopulmonary exercise testing.  
Am.J Respir.Crit.Care Med.161:487–492.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA(1989)

Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication.  
Biochem Pharmacol38(11):1709-1715.

Monnet E & Chachques JC (2005)

Animal Models of Heart Failure: What Is New?  
Ann.Thorac.Surg.79:1445-1453.

Mooi WJ & Grünberg K (2006)

Histopathology of pulmonary hypertensive diseases.  
Curr.Diagn.Pathol.12:429–440.

Naeije R, Melot C, Niset G (1993)

Mechanism of improved arterial oxygenation after peripheral chemoreceptor stimulation during hypoxic exercise.  
J.Appl.Physiol.74:1666-1671.

Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R (2007)

Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility.  
Circulation 116: 238-248.

Nauser TD & Stites ST (2001)

Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension.  
Am.Fam.Physician 63:1789-1798.

Nef HM, Möllmann H, Hamm C, Grimminger F, Ghofrani HA (2010)

Pulmonary hypertension: updated classification and management of pulmonary hypertension.  
Heart.96(7):552-559.

Nicod LP (2007)

The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension.

Swiss.Med.Wkly.37(31-32):437-442.

Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF, McMurtry IF (2007)

Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats.

Circ.Res.100:923-929.

Olschewski H & Seeger W (1994)

Pathophysiology of pulmonary hypertension

Z Kardiol 83:181-191.

Olschewski H (1999)

Physiology and physiopathology of the pulmonary circulation

Internist 40:696-709.

Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Höper MM, Behr J, Kleber FX, Seeger W (2000)

Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group.

Ann.Intern.Med.132:435-443.

Oudiz RJ (2007)

Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease.

Clin.ChestMed.28:233-241.

Paciocco G, Martinez FJ, Bossone E (2001)

Oxygen desaturation on the six-minute walking test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension.

Eur.Resp.J.17:647-652.

Palevsky HI & Fishman AP (1990)

Chronic cor pulmonale. Etiology and management.

JAMA 263:2347-2353.

Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavier IM, Lemarchand P, et al. (2000)  
Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against  
hypoxic pulmonary hypertension in rats.  
*Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*;23:762–771.

Peacock WF, Allegra J, Ander D, Collins S, Diercks D, Emerman C, Kirk JD, Starling RC, Silver M,  
Summers R (2003)  
Management of acute decompensated heart failure in the emergency department.  
*Congest Heart Fail.*1:3-18.

Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJV (2007)  
An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension.  
*Eur.Respir.J.*30:104-109.

Penaloza D. & Arias-Stella J (2007):  
The Heart and Pulmonary Circulation at High Altitudes: Healthy Highlanders and Chronic Mountain  
Sickness.  
*Circulation* 115:1132-1146.

Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM (2004)  
Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension.  
*J.Am.Coll.Cardiol.*43:25–32.

Pilgrim, E: (1950)  
Entdeckung der Elemente.  
Mundus Verlag, Stuttgart.

Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L (1979)  
Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features.  
*Am.J.Physiol.*236: H818-827.

Rabinovitch M (2008)  
Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.  
*J.Clin.Invest* 118(7):2372-2379.

Raja SG, Danton MD, Macarthur KJ, Pollock JC (2006)

Treatment of pulmonary arterial hypertension with sildenafil: from pathophysiology to clinical evidence.

J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.20(5):722-735.

Reid L & Davies P (1989)

Control of Cell Proliferation in Pulmonary Hypertension.

New York: Marcel Dekker Inc. Vol 38.

Reid MJ, Lame MW, Morin D, Wilson DW., Segall HJ (1997)

Monocrotaline metabolism and distribution in Fisher 344- and Sprague-Dawley rats.

Comp.Biochem.Physiol.B.Biochem.Mol.Biol.117:115-123.

Reid MJ, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. (1998)

Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of <sup>14</sup>C-monocrotalin in rat liver microsomes.

J.Biochem.Mol.Toxicol.12:157-166.

Rhodes J (2005)

Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease.

J.Appl .Physiol.98:1092–1100.

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM (1987)

Primary pulmonary hypertension. A national prospective study.

Ann.Intern.Med.107:216-223.

Reichenberger F, Kohstall MG Seeger T, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA (2007)a

Effect of sildenafil on hypoxia-induced changes in pulmonary circulation and right ventricular function.

Respir.Physiol.Neurobiol.159(2):196-201.

Reichenberger F, Voswinckel R, Enke B, Rutsch M, Fechtali E, Schmehl T, Olschewski H, Schermuly R, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Mayer E, Seeger W (2007)b

Long-term treatment with sildenafil in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

Eur.Respir.J.30(5):922-927.

- Ressler J, Urbanova D, Widimsky, Ostadal JB, V Pelouch V, Prochazka J (1974)  
Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats.  
Respiration 31(1):38-46.
- Rothman A, Wolner B, Button D, Taylor P (1994)  
Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells.  
J.Biol.Chem. 269:6399-6404.
- Rubin LJ (1997)  
Primary pulmonary hypertension.  
N.Engl.J.Med. 336:111-117.
- Saenz de Tejada I, Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Moncada I, Allona A, Lledo E, Korschen HG, Niewohner U, Haning H, Pages E, Bischoff E (2001)  
The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil.  
Int.J.Impot.Res. 13(5):282-290.
- Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Cool CD, Tada Y, Kasahara Y, Kurosu K, Tanabe N, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Voelkel NF (2007)  
VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34+ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells.  
FASEB J. (13):3640-3652. Epub 2007.
- Sakao S & Tatsumi K (2011)  
The Effects of Antiangiogenic Compound SU5416 in a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension.  
Respiration 81(3):253-61.
- Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS (2004)  
Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study.  
J.Am.Coll.Cardiol 43:1149-1153.

- Sato K, Morio Y, Morris KG, Rodman DM, McMurtry IM (2000)  
Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction involves ETA receptor-mediated inhibition of KATP channel.  
Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.278:L434–L442.
- Schannwell CM, Steiner S, Strauer BE (2007)  
Diagnostics in pulmonary hypertension.  
J.Physiol.Pharmacol.58:591-602.
- Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F (2004)  
Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.  
Am.J.Respir.Crit Care Med. 69(1):39-45.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2005)  
Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition.  
Journal of Clinical Investigation 115:2811-2821.
- Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Muller D, Schluter KD, (2008)  
Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension.  
Eur.Respir.J.32:881–91.
- Schymura Y, Janssen W, Wietelmann A, Stasch JP, Weissmann N, et al. (2011)  
Effects Of BAY 41-8543 And Sildenafil On Right Heart Structure And Function In Pulmonary Artery Banded Mice.  
Am J Respir Crit Care Med 183: A5007.
- Sebkhi A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR (2003)  
Phosphodiesterase type5 as target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension.  
Circulation 107(25):3230-3235.
- Sharkovska Y, Kalk P, Lawrenz B, Godes M, Hoffmann LS (2010)  
Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase reduces organ damage in experimental low-renin and high-renin models.  
J.Hypertens.281666-1675.

Short M, Nemenoff RA, Zawada WM, Stenmark KR (2004)  
Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts.  
*Am.J.Physiol.Cell.Physiol.*286:C416–C425.

Silbernagl S & Despopoulos A (1990)  
Taschenatlas der Physiologie.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Sitbon O, Gressin V, Speich R, Macdonald PS, Opravil M, Cooper DA, Fourme T, Humbert M, Delfraissy JF, Simonneau G (2004)  
Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension.  
*Am .J.Respir.Crit.Care.Med.* 170(11):1212-7.

Stasch JP et al (2009)  
NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators.  
*Handb Exp Pharmacol.* 191:277-308.

Stenmark KR & Mecham RP (1997)  
Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling.  
*Annu.Rev.Physiol.*59:89–144.

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

Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurty IF (2009)  
Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure.  
*Am.J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol.*297:1013-1032.

Taichmann DB & Mandel J (2007)  
Epidemiology of pulmonary arterial hypertension.  
*Clinics in Chest Medicine* 28:1-22.

Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tudor RM (2001)

Inhibition of the VEGF receptor-2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension.  
FASEB J.15(2):427-38.

Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Cool C, Wood K, Tudor RM, Burns N, Kasper M, Voelkel NF (2006)

Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension.  
Am.J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol. 291(4):L668-76.

Tucker A, McMurtry IF, Reeves JT, Alexander AF, Will DH, Grover RF (1975)

Lung vascular smooth muscle as a determinant of pulmonary hypertension at high altitude.  
Am J Physiol.228(3):762-767.

Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994)

Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension.  
Am.J.Pathol.144:275-285

Tuder RM, Cool DC, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF (1999)

Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension.  
Am.J.Respir.Crit Care Med.159(6):1925-1932.

Tuder RM, Mareki JC , Richter A, Fijalkowska I, Flores S (2007)

Pathology of pulmonary hypertension.  
Clin Chest Med 28:23-42.

Tuder RM (2009)

Pathology of pulmonary arterial hypertension.  
Semin.Respir.Crit.CareMed.30:376-385.

Ulrich Somaini S (2009)

Management der pulmonalen Hypertonie - was ist neu seit Dana Point?  
Kardiovaskuläre Medizin12(9):245-250.

- Urboniene D, Haber I, Fang YH, Thenappan T, Archer SL (2010)  
Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension.  
Am.J.Physiol.Lung Cell Mo. Physiol 299: L401-412.
- Van-Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ (1998)  
Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension.  
Am.J.Respir.Crit.Care.Med.1423-1428.
- Voelkel, NF &Tuder RM (2000)  
Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?  
J. Clin. Invest. 106(6): 733-738.
- Von Euler US, Liljestrand G (1946)  
Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat.  
Acta Physiol. Scand.12:301-320.
- Weeks JL,Zoraghi R, Beasley A, Sekhar KR, Francis SH, Corbin JD (2005)  
High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients.  
Int.J.Impot.Res.17 (1):5-9.
- Weissmann, N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W (2001)  
Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?  
Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281:L314-L317.
- Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F (2004)  
Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice.  
Respir.Physiol. Neurobiol. 139 (2):191-202.
- Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR (2005)  
Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells.  
Am.J.Respir.Crit.Care Med.172(1):105-113.

White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubmann MB (2007)

Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension.

Am.J.Physiol.Lung Cell Mol. Physiol. 293: L583-L590.

Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC (2004)

Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension.

FASEB J. 18(14):1746-1748.

Xue C & Johns RA (1995)

Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension.

N.Engl.J.Med. 333(24):1642-1644.

Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, Hansen LA, Park K, Friedman PJ (2000)

Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study.

Am.J.Respir.Crit Care Med. 162:1577-1586.

Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP (1993)

Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes.

Am.J.Physiol.Lung Cell. Mol. Physiol.264:L116–L123.

Zeydabadinejad M (2006)

Echokardiographie des rechten Herzens: Eine praxisorientierte Einführung.

Thieme Verlag, Stuttgart.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der NO-sGC-cGMP- Signaltransduktionsweg.....	40
Abbildung 1.2: Strukturformel von Sildenafil.....	42
Abbildung 1.3: Strukturformel von Riociguat.....	44
Abbildung 2.1: Zeitplan über den Versuchsablauf.....	61
Abbildung 3.1: Mittlerer systemisch arterieller Druck (SAP) .....	78
Abbildung 3.2: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) .....	79
Abbildung 3.3: Herzratio (RV/LV+S) .....	80
Abbildung 3.4: Herzminutenvolumen (HMV).....	81
Abbildung 3.5: Pulmonaler Gefäßwiderstand (TPR) .....	82
Abbildung 3.6: Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (RVID) .....	83
Abbildung 3.7: Wandstärke des rechten Ventrikels (RVWT).....	84
Abbildung 3.8: Pulmonal-arterielle Akzelerationszeit (PAAT) .....	85
Abbildung 3.9: Myokardialer Leistungsindex (Tei.Index) .....	86
Abbildung 3.10: Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (TAPSE) .....	87
Abbildung 3.11: Mittlere Wandstärke .....	89
Abbildung 3.12: Muskularisierungsgrad.....	90
Abbildung 3.13: Darstellung unterschiedlicher Muskularisierungsgrade .....	91
Abbildung 3.14 Darstellung unterschiedlicher Okklusionsgrade .....	92
Abbildung 3.15: Okklusionsindex .....	93
Abbildung 3.16: Elastica van-Gieson Färbung eines Gefäßes mit deutlicher Neointimaproliferation .....	94
Abbildung 3.17: Verhältnis von Neointima zu Media .....	95
Abbildung 3.18: Proliferationsindex.....	96
Abbildung 3.19: Prozentualer Kollagengehalt des rechten Ventrikels .....	97
Abbildung 3.20 Darstellung eines rechten Ventrikels in der Sirius Red Färbung ..	98

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Substanzen und Injektionslösungen.....	48
Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente.....	51
Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Histologie.....	52
Tabelle 2.4: Verwendete Lösungen, Kits und Antikörper für Färbungen.....	55
Tabelle 2.5: Verwendete Systeme und Geräte für Tierexperimente.....	56
Tabelle 2.6: Verwendete Systeme und Geräte für Histologie.....	57
Tabelle 2.7: Verwendete Systeme und Geräte des Hypoxiemodells.....	58
Tabelle 2.8: Verwendete Systeme und Geräte der Ultraschalluntersuchungen....	58
Tabelle 2.9: Färbeprotokoll Elastica van Gieson-Färbung.....	69
Tabelle 2.10: Färbeprotokoll Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor.....	70
Tabelle 2.11: Färbeprotokoll PCNA (proliferating cell nuclear antigen).....	71
Tabelle 2.12: Färbeprotokoll der Sirius Red-Färbung.....	72
Tabelle 3.1: Ermittelte Ultraschallparameter in den verschiedenen Versuchsgruppen.....	88

## **10 Danksagung**

Für die mir bei der Erstellung dieser Arbeit entgegenkommende vielfältige Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken:

Für die Möglichkeit in einem Spitzenforschungszentrum arbeiten zu dürfen, möchte ich hiermit Herrn Prof. Dr. Seeger danken.

Herrn Prof. Dr. Diener danke ich besonders für die sehr freundliche und unkomplizierte Betreuung im Fachbereich Veterinärmedizin.

Ein herzlicher Dank an Herrn Prof. Dr. Schermuly, der fachlich als auch menschlich ein toller Chef und stets eine verständnisvolle Unterstützung während allen Phasen dieser Arbeit war.

Herrn Prof. Dr. Weissmann danke ich für die Bereitstellung der Hypoxie-Anlage. Daneben Daniela Haag für die unermüdliche Hilfe und das Durchhaltevermögen in unserem Projekt "Höllmaschine".

Vielen Dank an Dr. Katja Helmus für die Vorarbeit im Thema Su5416 sowie an Michael Behrendts, der mich einst auf die gute Idee einer Doktorarbeit am Lungenzentrum Gießen brachte.

Ein ganz besonderes Dankeschön "meinem" Post-Doc Dr. Baktybek Kojonazarov für die vielen Stunden im Echoraum und die stetigen Bemühungen, um das Voranschreiten dieser Arbeit. Außerdem danke ich Dr. Djuro Kosanovic, dessen Wissen und Erfahrung mir sehr viel geholfen haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ECCPS danke ich für die freundliche und humorvolle Atmosphäre. Besonders möchte ich Christina Vroom, Christin Ritter, Stephanie Viehmann, Lisa Fröhlich und Samantha Storn für alle Hilfe, Gespräche und Gummibärchen danken. Vor allem aber dafür, dass ich nicht nur tolle Arbeitskolleginnen, sondern auch Freunde gefunden habe.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern danken, nur durch euch bin ich soweit gekommen! Danke für den steten Rückhalt und das Gefühl, egal was kommt, euer Stolz zu sein. Meinem Bruder Alex vielen vielen Dank, dass du genau so bist, wie du bist! Liebe Sandra, herzlichen Dank für die geduldige Hilfe.

Meinem Mann Johannes danke ich für das Engagement und Interesse an meiner Arbeit, die vielen Ratschläge und tatkräftige Unterstützung, die auch die Labor-Wochenenden schön gemacht und zum Bändigen der Technik beigetragen haben.

Danke Lennard für die Gewissheit, dass es neben Forschung, Wissenschaft und Arbeit etwas so unbeschreiblich wichtigeres im Leben gibt!