

Biomarker in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Apothekerin Julia Grupe
geboren am 17.08.1982 in Dormagen

Gutachter/Innen:

1. Prof. Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch
2. Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly
3. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Langner

Halle (Saale), 27.05.2011

...And I ask, as the lungs are so close at hand, and in continual motion, and the vessel that supplies them is of such dimensions, what is the use or meaning of this pulse of the right ventricle? And why was nature reduced to the necessity of adding another ventricle for the sole purpose of nourishing the lungs?

William Harvey, *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*, 1628

Für meine Eltern

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Pulmonale Hypertonie (PH)	1
1.1.1	Prävalenz und Inzidenz der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)	2
1.1.2	Prognose der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)	2
1.1.3	Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)	3
1.1.4	Therapieoptionen der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)	5
1.2	Tiermodelle	6
1.2.1	Monocrotalin (MCT)-Modell	6
1.2.2	Pulmonalarterielles (PA) Banding-Modell	7
1.3	Biomarker	8
1.3.1	Diagnostische/prognostische Biomarker der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)	8
1.3.2	Weitere potentielle Biomarker	10
1.3.3	Überprüfung eines Therapie-Effektes (<i>Response-to-treatment</i>)	11
1.4	Aufgabenstellung / Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Geräte	15
2.2	Operationsbesteck	17
2.3	Verbrauchsmaterial	18
2.4	Substanzen	20
2.5	Versuchstiere	20
2.6	Studiendesign	21
2.6.1	Monocrotalin (MCT)-Studie mit Sildenafil-Therapie	21
2.6.2	Zeitverlauf-Studie des pulmonalarteriellen (PA) Banding-Modells	21
2.6.3	Pulmonalarterielle (PA) Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie	22
2.7	Tiermodelle	22
2.7.1	Monocrotalin (MCT)-Modell	22
2.7.2	Pulmonalarterielles (PA) Banding-Modell	23
2.8	Therapeutische Intervention	24
2.9	Echokardiographische Messungen	24
2.9.1	Pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit (PAF)	24

2.9.2	Pulmonalarterielle Akzelerationszeit korrigiert auf die Zykluslänge (PAAT/CL) ..	26
2.10	Invasive hämodynamische Messungen	26
2.11	Probenentnahme.....	28
2.12	Messung löslicher Marker im Plasma mittels ELISA und RIA	28
2.13	RNA Extraktion und RT-PCR.....	29
2.14	Generierung genspezifischer Primer-Sequenzen.....	30
2.15	Berechnungen und Statistik.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Charakterisierung des Monocrotalin (MCT)-Modells und Analyse von potentiellen Biomarkern	33
3.1.1	Hämodynamik.....	33
3.1.2	Endorgangewichte	34
3.1.3	Genexpressionsanalysen.....	36
3.1.3.1	Linker und rechter Ventrikel.....	36
3.1.3.2	Lunge	40
3.1.3.3	Niere	41
3.1.4	Echokardiographisch ermittelte Marker	42
3.1.5	Plasmamarker.....	43
3.2	Charakterisierung des pulmonalarteriellen (PA) Banding-Modells und Analyse von potentiellen Biomarkern	45
3.2.1	Hämodynamik.....	46
3.2.2	Endorgangewichte	48
3.2.3	Genexpressionsanalysen.....	50
3.2.3.1	Linker und rechter Ventrikel.....	50
3.2.3.2	Lunge	57
3.2.3.3	Niere	58
3.2.4	Echokardiographisch ermittelte Marker	59
3.2.5	Plasmamarker.....	61
4	Diskussion.....	65
4.1	Pathophysiologische Grundlagen und Unterscheidungsmerkmale des MCT- und PA Banding-Modells.....	65
4.1.1	Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVP).....	65
4.1.2	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)	66

4.1.3	Rechtsventrikuläre Hypertrophie	66
4.1.4	Kontraktilität und Relaxation.....	67
4.1.5	Fetaler Shift kontraktiler Elemente	68
4.1.6	Veränderungen der intrazellulären Calcium-Homöostase.....	69
4.1.7	Pathophysiologische Veränderungen der Lunge	71
4.1.8	Pathophysiologische Veränderungen der Niere	72
4.2	Therapeutische Intervention	72
4.3	Etablierte und potentielle Biomarker	73
4.3.1	Echokardiographie	73
4.3.2	Druck-/dehnungssensitive Marker	75
4.3.3	Remodeling-Marker.....	77
5	Zusammenfassung	82
6	Literatur	85
	Eigene Publikationen	96
	Danksagung	97
	Erklärung.....	98
	Lebenslauf.....	99

Abkürzungen

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
BMPR2	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor 2</i>
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BPdia	Diastolischer Blutdruck
BPM	Schläge pro Minute (<i>Beats per minute</i>)
BPsys	Systolischer Blutdruck
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
COL1A2	Kollagen Typ 1 alpha 2
COL3A1	Kollagen Typ 3 alpha 1
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus (<i>Cycle Threshold</i>)
DAG	Diacylglycerol
DBPS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
dP/dt max	Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dt min	Maximale Druckabfallgeschwindigkeit
EKG	Echokardiogramm
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HGNC	<i>Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee</i>
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIM-1	Nierenschädigungsmarker vom Typ 1 (<i>Kidney Injury Molecule-1</i>)
LCN-2 (NGAL)	Lipocalin-2 (Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin-2)
LDH	Lactatdehydrogenase

Abkürzungen

LVP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MCT	Monocrotalin
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
MW	Mittelwert
MYHCA	Schwere Myosinkette vom Typ alpha (<i>Myosin Heavy Chain alpha</i>)
MYHCB	Schwere Myosinkette vom Typ beta (<i>Myosin Heavy Chain beta</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFAT	Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NPR	Rezeptor natriuretischer Peptide
NT-proBNP	N-terminales Fragment der Pro-Form des B-Typ natriuretischen Peptides
OPN	Osteopontin
PA Banding	Pulmonalarteriellles Banding
PAAT	Pulmonalarterielle Akzelerationszeit
PAAT/CL	Pulmonalarterielle Akzelerationszeit korrigiert durch die Zykluslänge
PAF	Pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarterieller Druck (<i>Pulmonary artery pressure</i>)
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PH	Pulmonale Hypertonie
PW Doppler	Gepulster Doppler (<i>Pulsed Wave Doppler</i>)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RCN-1	Regulator von Calcineurin-1

Abkürzungen

RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (ca. 22°C)
RT-PCR	Qualitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>)
RVEDP	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
RV/(LV + S)	Quotient des rechtsventrikulären Gewichts und des linksventrikulären Gewichts plus Septumgewicht
RVP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck (<i>Right ventricular systolic pressure</i>)
RYR	Ryanodin Rezeptoren
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SERCA-2	Sarko-/endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase-2
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAPSE	<i>Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion</i>
TIMP-1	Inhibitor von Metalloproteinasen vom Typ 1 (<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1</i>)
TRPC-3, -4, -6	Transienter rezeptoraktivierter Kationenkanal vom Typ-3, -4, -6 (<i>Transient Receptor Potential Channel-3, -4, -6</i>)
VEGFR-2	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (<i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i>)
WHO-FC	<i>World Health Organization-Functional Class</i>

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie (PH)

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die mit unspezifischen Symptomen wie beispielsweise Müdigkeit, eingeschränkter körperlicher Belastbarkeit und Atemlosigkeit einhergeht. Pathophysiologisch ist die PH charakterisiert durch einen erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand und einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP). Dies resultiert in einem erhöhten rechtsventrikulären Druck (RVP) und kann im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen. Als diagnostisches Kriterium der PH wurde ein PAP von ≥ 25 mmHg in Ruhe definiert, invasiv gemessen mit einem Rechtsherzkatheter (Galiè *et al.*, 2009). Bei gesunden Menschen liegt der mittlere PAP in Ruhe durchschnittlich bei 14 ± 3 mmHg mit einer oberen Normgrenze von ~ 20 mmHg (Kovacs *et al.*, 2009). Auf Grund der unspezifischen Symptome ist die Diagnose der PH jedoch schwierig und erfolgt häufig erst zu einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Die PH tritt häufig in Folge einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) auf, kann jedoch auch bedingt sein durch andere Erkrankungen, wie beispielsweise linksventrikuläre Erkrankungen, Lungenembolie, Lungenfibrose oder Sarkoidose. Zur Differenzierung der einzelnen Formen der PH wurde eine Unterteilung vorgenommen, basierend auf pathologischen, pathophysiologischen und therapeutischen Charakteristika. Aktuell gilt die Klassifizierung nach dem vierten Welt Symposium für PH 2008 in Dana Point, Kalifornien, die die PH in fünf Untergruppen unterteilt (Galiè *et al.*, 2009) (Tabelle 1). Eine dieser Untergruppen bildet die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), die im Fokus dieser Arbeit stand.

Die PAH ist beschränkt auf pathophysiologische Veränderungen des arteriellen Systems pulmonaler Gefäße, was im weiteren Verlauf wiederum zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen kann. Für die PAH sind mittlerweile einige Substanzen wie beispielsweise Sildenafil und Bosentan für die medikamentöse Therapie zugelassen worden, wohingegen für andere Formen der PH bislang keine Zulassung vorliegt (Galiè *et al.*, 2009). Die verfügbaren Therapieoptionen verbessern die Belastungstoleranz und Lebensqualität der Patienten, bewirken jedoch keine Heilung. Zusammengenommen mit einer oft erst sehr spät gestellten Diagnose resultiert dies in einer schlechten Prognose, die vergleichbar ist mit einigen Tumorerkrankungen. Forschungsbedarf liegt demnach nicht nur in der Entwicklung neuer Therapie-Strategien, sondern auch in der Etablierung neuer Biomarker und Methoden zur frühen Diagnostik und Evaluation des Schweregrades der PAH.

Tabelle 1: Klassifizierung der PH nach dem vierten Welt Symposium für PH 2008 in Dana Point, California (Galiè *et al.*, 2009).

1. Pulmonalerterielle Hypertonie (PAH)

1.1. Idiopathische PAH (Ursache unbekannt)

1.2. Familiär bedingte PAH (genetischer Hintergrund)

1.3. Assoziierte PAH (beispielsweise Kollagenose, angeborener Herzfehler, portale Hypertonie, HIV-Infektion, Drogen, Toxine)

1.4. PAH assoziiert mit einer venösen oder kapillären Beeinträchtigung

1.5. Persistierende PAH bei Neugeborenen

2. Pulmonale Hypertonie (PH) auf Grund einer Linksherzerkrankung

(beispielsweise systolische oder diastolische Dysfunktion, Klappenerkrankungen)

3. Pulmonale Hypertonie (PH) basierend auf einer Lungenerkrankung und/oder Hypoxie

(beispielsweise COPD, interstitielle Lungenerkrankung)

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (PH)

5. Pulmonale Hypertonie (PH) mit unklaren oder multifaktoriellen Mechanismen

(beispielsweise Sarkoidose, Obstruktion durch einen Tumor)

1.1.1 Prävalenz und Inzidenz der pulmonalerteriellen Hypertonie (PAH)

Die niedrigste geschätzte Prävalenz der PAH liegt bei 15 Fällen pro einer Millionen Einwohner (Galiè *et al.*, 2009). Die Inzidenz der PAH wird auf 2,4 Fälle pro einer Millionen Einwohner pro Jahr in Industriestaaten geschätzt (Taichmann *et al.*, 2007). Die Erkrankung tritt sowohl bei Frauen als auch bei Männern auf, wobei Frauen mit einem Faktor von 1,6 häufiger betroffen sind. Die größte Häufigkeit der Erkrankung liegt bei Frauen in einem Alter zwischen 21 und 40 Jahren und bei Männern in einem Alter zwischen 31 und 40 Jahren (Taichmann *et al.*, 2007).

1.1.2 Prognose der pulmonalerteriellen Hypertonie (PAH)

Die durchschnittliche Zeit zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung der PAH liegt bei zwei Jahren (Taichmann *et al.*, 2007). Die Ausprägung der Symptome ist zu diesem Zeitpunkt schon relativ weit fortgeschritten und die Prognose der PAH Patienten dementsprechend schlecht. Eine Vorhersage des Überlebens erfolgt gemäß der *World Health Organization–Functional Class* (WHO-FC) durch die Einteilung der Patienten nach Schweregrad der physischen Beeinträchtigung (Dyspnoe, Fatigue (Erschöpfung), Brustschmerz, Synkopen) in Ruhe und während körperlicher Belastung in vier funktionelle Klassen. Unbehandelte Patienten mit idiopathischer PAH zeigten in Studien ein mittleres Überleben von sechs Monaten in der WHO-FC IV, von 2,5 Jahren in der WHO-

FC III und von sechs Jahren in den WHO-FC I und II. Grundsätzlich gilt, dass der größte Teil der Patienten auf Grund von Rechtsherzversagen verstirbt (Taichmann *et al.*, 2007).

1.1.3 Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)

Die Pathophysiologie der PAH ist geprägt durch einen Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind dabei Vasokonstriktion, Proliferation und obstruktives Remodeling pulmonalarterieller Gefäße sowie Inflammation und Thrombosen.

Endotheliale Dysfunktion kann Ursache hypoxisch bedingter Vasokonstriktion sein, charakterisiert durch ein Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren sowie proliferativ wirksame Substanzen (z.B. Thromboxan A₂ und Endothelin-1) und Vasodilatoren (z.B. NO oder Prostacyclin) (Humbert *et al.*, 2004). Auf diese Weise erfolgt ein pathophysiologischer Druckanstieg in pulmonalarteriellen Gefäßen (Archer *et al.*, 2000).

Der chronische Druckanstieg in pulmonalarteriellen Gefäßen sowie die endotheliale Schädigung induzieren einen strukturellen Umbau der Gefäßwand, bezeichnet als pulmonalarterielles Remodeling. In der Regel sind bei der PAH die größeren zentralen arteriellen Gefäße durch den hohen Druck dilatiert, wohingegen das Lumen der kleineren arteriellen Gefäße durch Remodeling der Gefäßwand verringert ist (Olschewski *et al.*, 1999). Dabei findet eine Fibrosierung der *Intima* und Hypertrophie der *Media* mit Neo-Muskularisierung physiologisch nicht-muskularisierter peripherer Pulmonalarterien durch distale Muskelextension statt. Der Anstieg der Produktion von Extrazellulärmatrix (Kollagene, Elastin, Fibronectin, Tenascin) führt zu einer Verdickung der *Adventitia* (Archer *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass pathophysiologische Veränderungen des Endothels zu einer Stimulation der Serin-Elastase in glatten Muskelzellen führen, was wiederum die Freisetzung von Mitogenen und einen Anstieg der Matrixdegradation durch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bewirkt (Archer *et al.*, 2000).

Histologisch charakteristisch für die PAH sind plexiforme Läsionen (aneurysmale Dilatation eines muskularisierten pulmonalarteriellen Gefäßstammes) und inflammatorische Mechanismen sowie thrombotische Läsionen und Plättchen-Dysfunktion (Humbert *et al.*, 2004).

Zusammengenommen führen diese pathophysiologischen Mechanismen zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes und somit zu einem Anstieg der Nachlast des rechten Ventrikels. Die Nachlast-Erhöhung resultiert in einer Druckbelastung des rechten Ventrikels und somit in einen messbar erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck (RVP). Eine Adaption des rechten Ventrikel ist essentiell für das Überleben bei der PAH (Chin *et al.*, 2005). Ein Anstieg des intraluminalen Druckes im rechten Ventrikel führt nach dem Gesetz von Laplace zu einem Anstieg der Wandspannung. Als wichtigster Adaptionmechanismus

erfolgt eine Verdickung der rechtsventrikulären Wand durch Akkumulation von Muskelmasse. Diese ist hauptsächlich durch Hypertrophie von Myozyten geprägt. Druckinduziertes Wachstum von Kardiomyozyten wird dabei durch die Synthese von Extrazellulärmatrix (Kollagene, Elastin, Fibronectin, Tenascin) aus Stabilisierungsgründen begleitet (Bogaard *et al.*, 2009a). Diesen Adaptationsmechanismen zum Trotz ist der rechte Ventrikel auf Dauer nicht fähig chronische Druckbelastung zu kompensieren, was zu einer verminderten kontraktile Reserve führt. Kontraktile Dysfunktion ist assoziiert mit Veränderungen der Expression kontraktile und regulatorische Proteine in Kardiomyozyten. Eines der bedeutendsten Kennzeichen ist hierbei der sogenannte fetale Shift der dicken Filamentproteine *Myosin Heavy Chain* vom Typ α zum Typ β (MYHCA und MYHCB). Darüber hinaus liegen pathophysiologische Veränderungen der intrazellulären Calcium-Homöostase in Kardiomyozyten vor (Bogaard *et al.*, 2009a), wie beispielsweise eine Herunterregulation der Genexpression der sarko-/endoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase-2 (SERCA-2) und eine Hochregulation transienter rezeptoraktivierter Kationenkanäle (TRPC). Im Endstadium der Erkrankung liegt eine Herzinsuffizienz bis hin zur Dekompensation vor (Abbildung 1). In diesem Stadium ist der rechte Ventrikel dilatiert und es findet ein Abfall des RVP statt.

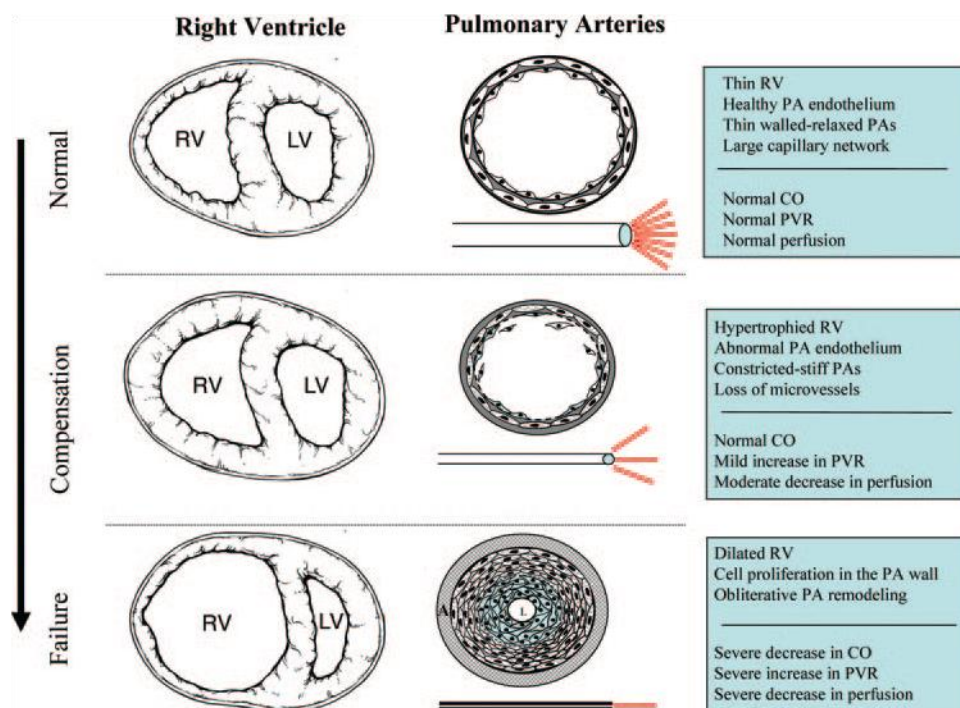


Abbildung 1: Pathophysiologische Veränderungen des rechten Ventrikels von einem physiologischen Stadium, über ein Stadium der Kompensation bis zur Rechtsherzinsuffizienz bei einer PAH Erkrankung (aus Champion *et al.*, 2009). CO – Cardiac Output; PVR – Pulmonalarterieller Widerstand (*Pulmonary vascular resistance*); PA – Pulmonalarterie; RV – Rechter Ventrikel; LV – Linker Ventrikel

1.1.4 Therapieoptionen der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)

Die aktuell verfügbaren Therapieoptionen bewirken keine Heilung der PAH, verbessern jedoch die Belastungstoleranz und Lebensqualität, sowie die Prognose von PAH Patienten (Huber *et al.*, 2007). Die derzeit verfügbaren Substanzklassen der PAH umfassen Calciumkanalblocker, Prostanoiden, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und PDE-5 Inhibitoren (Rosenkranz, 2007; Galiè *et al.*, 2009).

Seit den 1980er Jahren werden Calciumkanalblocker wie Nifedipin und Diltiazem als vasodilatorisches Therapieprinzip zur Behandlung der PAH eingesetzt (Galiè *et al.*, 2009). Von der Langzeit-Therapie mit Calciumkanalblockern profitieren jedoch nur Patienten mit einem positiven Ansprechen auf einen Vasoreaktivitätstest (Anteil weniger als 10 %) (Sitbon *et al.*, 2005). Prostacyclin ist ein potenter endogener Vasodilator. Auf Grund der geringen Halbwertszeit von Prostacyclin sind stabilere Analoga wie Epoprostenol, Treprostinil und Iloprost entwickelt worden. Eine weitere Therapieoption, welche hauptsächlich auf Vasodilatation beruht, der jedoch zusätzlich anti-mitogene Eigenschaft zugeschrieben werden, ist der unselektive Endothelin A- und B-Rezeptor-Antagonist Bosentan (Galiè *et al.*, 2009). Bosentan zählt neben den PDE-5-Inhibitoren zu der am häufigsten eingesetzten Therapie in der PAH. Die Wirkung der PDE-5-Inhibitoren basiert auf einer Erhöhung des Botenstoffes cGMP durch verminderten Abbau, die in einer Vasodilatation glatter Muskelzellen resultiert (Olschewski *et al.*, 2005; Ghofrani *et al.*, 2009). Neben der Relaxation reguliert cGMP auch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie Entzündungsprozesse, Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Hofmann *et al.*, 2009). Für die PAH sind die PDE-5-Inhibitoren Sildenafil und Tadalafil zugelassen, für die in klinischen Studien eine Verbesserung der Symptomatik, der Belastungsfähigkeit und der hämodynamischen Parameter in PAH Patienten nachgewiesen werden konnte (Ghofrani *et al.*, 2002; Galiè *et al.*, 2005).

Ein vielversprechender, neuer therapeutischer Ansatz in der PAH und auch in sekundären Formen der PH ist die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Riociguat. Die Wirkung von Riociguat basiert auf einem dualen Mechanismus. Auf der einen Seite sensibilisiert Riociguat die sGC für körpereigenes NO, auf der anderen Seite steigert Riociguat die Aktivität der sGC in Abwesenheit von NO (Stasch *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2002). Auf diese Weise erfolgt ein massiver Anstieg der cGMP Konzentration im Plasma, der zu einer Vasorelaxation führt und gleichzeitig anti-proliferative und anti-fibrotische Effekte aufweist (Stasch *et al.*, 2009). Eine Inhibition der PDEs erfolgt dabei nicht. Nach erfolgreichen Phase II Studien (Ghofrani *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008), läuft derzeit eine Phase III Studie für Riociguat in der Indikation PAH. Darüber hinaus laufen derzeit Phase II Studien für Riociguat für chronisch thromboembolische PH, PH verbunden mit Linksherzerkrankungen, PH assoziiert mit interstitieller Lungenerkrankung und COPD assoziiert mit PH, was von großer Bedeutung ist, da für diese Formen der PH bisher noch keine Substanz zugelassen ist.

Des Weiteren liegen erste klinische Daten zum Einsatz von nicht-Prostanoiden Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten, Tyrosinkinase-Inhibitoren und Serotonin-Antagonisten vor (Galiè *et al.*, 2009).

1.2 Tiermodelle

Im Rahmen der translationalen Medizin sind prädiktive Tiermodelle von besonderer Bedeutung, da versucht wird Marker, Mechanismen und Therapieansätze im Tiermodell zu evaluieren, um sie dann in klinischen Studien und gegebenenfalls in humanem Patientematerial zu verifizieren. Prädiktive Tiermodelle der PAH, die sich zur Evaluation potentieller Biomarker und zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen eignen, liegen jedoch nur in begrenzter Zahl vor. Ein häufig verwendetes Modell der PAH ist das Monocrotalin (MCT)-Modell, bei dem über einen toxischen Stimulus pathophysiologische Charakteristika der PAH imitiert werden (Marsboom *et al.*, 2004). Das Hypoxie-Modell ist eine weitere Option, bei der die Tiere einer sauerstoffarmen Atmosphäre (10 % O₂) ausgesetzt sind (Bee *et al.*, 1984). Dieses Modell ist kombinierbar mit der einmaligen Applikation eines VEGFR-2-Inhibitors (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es das Embolie-Modell basierend auf der Gabe von Mikrosphären und Modelle mit genetischer Manipulation wie z.B. die BMPR2 Knockout-Maus (Marsboom *et al.*, 2004). In den genannten Modellen stehen die primären strukturellen und funktionellen Lungengefäßschäden mit konsekutiv auftretender Rechtsherzbelastung im Vordergrund. Im Gegensatz dazu bietet das pulmonalarterielle (PA) Banding-Modell die Möglichkeit einer isolierten Betrachtung rechtsherzspezifischer Pathomechanismen in Folge einer mechanischen Nachlasterhöhung.

1.2.1 Monocrotalin (MCT)-Modell

Die Applikation des Pyrrolizidin-Alkaloids Monocrotalin (MCT), gewonnen aus den Samen von *Crotalaria spectabilis*, führt bei Ratten (Schoental & Head, 1955; Allen, 1970; Meyrick *et al.*, 1980; Ghodsi & Will, 1981) zu einer progressiven PAH. Nach der Injektion wird das Alkaloid in der Leber über Cytochrom P-450 zur aktiven, alkylierenden Verbindung Dehydro-monocrotalin metabolisiert (Kasahara *et al.*, 1997). Der aktive Metabolit bewirkt eine Schädigung des Lungenendothels, was im Folgenden in einem Remodeling der Lungengefäße mit einer Hypertrophie von medialen glatten Muskelzellen und einer Neomuskularisierung von nicht-muskulären distalen Pulmonalarterien resultiert (Rosenberg *et al.*, 1988; Schultze *et al.*, 1998). Darüber hinaus können diffuse mononukleäre Infiltrationen des Lungeninterstitiums, sowie Hämorrhagien, Thromben und Ödeme in der Lunge beobachtet werden (Allen *et al.*, 1970; Reindel *et al.*, 1990; Schultze *et al.*, 1998). Konsequentermaßen entwickeln sich ein erhöhter pulmonalarterieller Widerstand und ein Anstieg des PAP, was konsekutiv zu einer kompensatorischen rechtsventrikulären Hypertrophie führt (Meyrick *et al.*, 1980; Rosenberg *et al.*, 1988; Reindel *et al.*, 1990). Diese Veränderungen werden begleitet

durch einen Anstieg des RVP und je nach Schweregrad auch des rechtsventrikulären enddiastolischen Druckes (RVEDP), der als Maß für die Steifigkeit des rechten Ventrikels gilt. Diese tragen zur Progredienz bis hin zur rechtsventrikulären Dekompensation bei (Brown *et al.*, 1998; Seyfarth *et al.*, 2000; Hessel *et al.*, 2006). Das MCT-Modell spiegelt demzufolge das klinische Bild der PAH sehr gut wider, da die charakteristischen pathophysiologischen Veränderungen, wie das Remodeling der pulmonalarteriellen Gefäße sowie Inflammation und Thrombosen in der Lunge, die insgesamt zu einer erhöhten Nachlast und somit zu einem Anstieg des PAP und des RVP mit konsekventer kompensatorischer rechtsventrikulärer Hypertrophie führen, dargestellt werden. Von Nachteil beim MCT-Modell ist die Toxizität, da auf diese Weise nicht klar differenziert werden kann, welche pathophysiologischen Mechanismen der PAH-Erkrankung und welche der Toxizität zuzuschreiben sind. Beschrieben wurde bereits durch MCT ausgelöste Hepatotoxizität (Allen *et al.*, 1970; Hanumegowda *et al.*, 2003) sowie eine toxische Schädigung weiterer Organe, wie beispielsweise der Niere (Carstens *et al.*, 1970; Kurozumi *et al.*, 1983).

Das MCT-Modell wurde in dieser Arbeit gewählt, da es als eines der Standardmodelle der PAH gilt und auf Grund der pathophysiologischen Veränderungen der Pulmonalarterien und der konsekventen rechtsventrikulären Beeinträchtigungen das klinische Bild der PAH sehr gut widerspiegelt.

1.2.2 Pulmonalarterielles (PA) Banding-Modell

Das PA Banding-Modell wurde erstmals 1924 von Reid in Hunden durchgeführt (Reid, 1924). Seitdem wurde das Modell der Stenose der Pulmonalarterie in verschiedenen Spezies, wie beispielsweise auch der Ratte, verwendet, um pathophysiologische Mechanismen im rechten Ventrikel als Reaktion auf eine isoliert erhöhte Nachlast zu untersuchen. Die Stenose wird chirurgisch mittels Faden oder Klipp gesetzt und somit der Durchfluss der Pulmonalarterie vermindert, was zu einem Anstieg des PAP und des RVP führt.

Im Gegensatz zu den klassischen PAH Modellen können im PA Banding-Modell pathophysiologische Veränderungen des rechten Ventrikels isoliert untersucht werden. Darüber hinaus ermöglicht der mechanische Stimulus, anders als im MCT-Modell, die Untersuchung pathophysiologischer Regulationsmechanismen, potentieller Biomarker und Substanzen ohne toxischen Einfluss. Das PA Banding-Modell bietet des Weiteren die Möglichkeit Regulationsmechanismen und potentielle Marker und Methoden nicht allein in der chronischen, sondern bereits in der akuten Phase der Erkrankung zu untersuchen, was für die Evaluation früher Marker geeignet ist.

1.3 Biomarker

Ein Biomarker ist nach dem *National Institute of Health* (NIH) definiert als charakteristischer Parameter, der objektiv gemessen und evaluiert wird, als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder ein pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Intervention (*Response-to-treatment*) (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Beispiele sind biochemische Marker im Serum, Plasma oder Urin oder bildgebende Verfahren. Im Rahmen der translationalen Medizin können neue Biomarker im Tiermodell identifiziert und evaluiert werden, um dann im Patienten verifiziert zu werden. Umgekehrt werden auch Biomarker aus klinischen Studien in den entsprechenden Tiermodellen der Indikation überprüft. Im Tiermodell kann ein *Screening* potentieller Biomarker mittels Genexpressionsanalysen in pathophysiologisch relevanten Organen erfolgen. Eine Hoch- oder Herunterregulation bestimmter Marker in Organen kranker gegenüber gesunden Tieren kann dabei erste Hinweise auf z.B. erhöhte bzw. erniedrigte Plasmaspiegel geben und, falls technisch möglich, mit robusten biochemischen Assays überprüft werden (Abbildung 2). Von besonderer Bedeutung sind im Rahmen der personalisierten Medizin prädiktive Marker, die die Zuordnung des Patienten zu einer bestimmten Therapie ermöglichen.

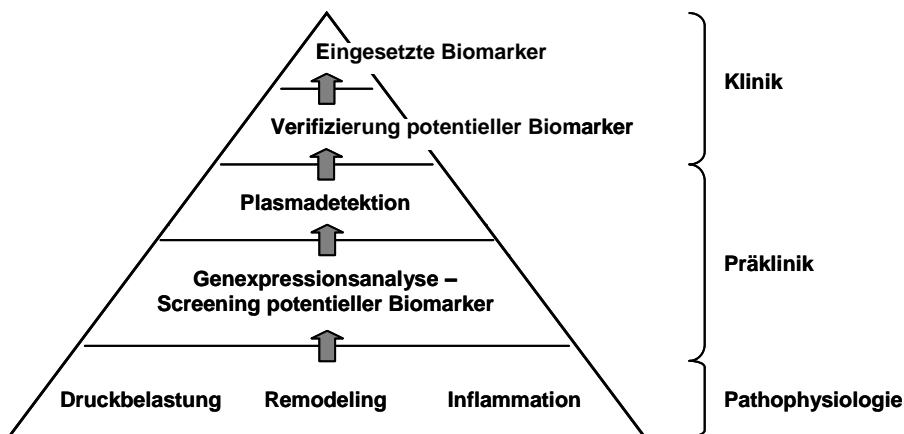


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Evaluation von Biomarkern in der PAH

1.3.1 Diagnostische/prognostische Biomarker der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH)

Der Bedarf an Biomarkern zur Diagnose und Evaluation des Schweregrades der PAH ist darin begründet, dass sich PAH Patienten klinisch mit unspezifischen Symptomen wie Atemlosigkeit, Fatigue, Angina, geringerer körperlicher Belastbarkeit, Synkopen (kurz andauernde Bewusstlosigkeit) und abdominaler Distension (Bauchaufreibung) präsentieren. In den aktuellen europäischen Leitlinien (Galiè *et al.*, 2009) werden für die Diagnose und Evaluation des Schweregrades der PAH die Rechtsherzkatheterisierung, echokardiographische Parameter, die 6-Minuten-Gehstrecke und der kardiopulmonale Belastungstest sowie BNP oder NT-proBNP im Plasma aufgeführt.

Invasive Rechtsherzkatheterisierung

Die Rechtsherzkatheterisierung ist bis Heute der Goldstandard für die Diagnose der PAH (Champion *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung werden gemäß der aktuellen europäischen Leitlinien (Galiè *et al.*, 2009) der mittlere PAP, der rechtsatriale Druck, der pulmonale Wedge-Druck, der RVP, das Cardiac Output (Herzminutenvolumen) und der pulmonalarterielle Widerstand ermittelt. Der mittlere PAP gilt dabei als Definitionskriterium der Erkrankung. Die weiteren Parameter dienen der Evaluation des Schweregrades und der Differentialdiagnose. Der mittlere PAP und der RVP werden in der Regel nicht zur Bestimmung des Schweregrades herangezogen, da sie in einem fortgeschrittenen Stadium der PAH mit einer Dekompensation des rechten Ventrikels wieder absinken (siehe 1.1.3) und somit einen falsch-positiven Trend aufzeigen würden (Taichmann *et al.*, 2007).

In vielen Studien mit Nagern wird statt des mittleren PAP der RVP als primärer Studienendpunkt bestimmt, da die Messung des PAP mit den häufig verwendeten flüssigkeitsgefüllten oder Micro-Tip Kathetern in dieser Spezies ohne Öffnung des *Thorax* nicht standardisiert ist.

Nicht-invasive echokardiographische Parameter

Der PAP kann neben der Rechtsherzkatheterisierung auch mittels transthorakaler Echokardiographie kalkuliert werden. Dabei wird mit Hilfe der Doppler-Echokardiographie der Trikuspidalregurgitationsjet ermittelt. Anhand der Jet-/Flussgeschwindigkeit kann über die Bernoulli-Gleichung ($\Delta P = 4 \times v^2$ mit ΔP = Druckgradient und v = Geschwindigkeit) ein Druckgradient und somit der PAP ermittelt werden. Von Vorteil gegenüber der Rechtsherzkatheterisierung ist die nicht-invasive Durchführung. Nachteilig ist die Potenzierung kleinerer Abweichungen bei der Messung durch die Berechnung, wodurch es sowohl zu Unter- als auch zu Überschätzungen des PAP kommen kann (Fisher *et al.*, 2009). Die Bestimmung des Schweregrades der PAH kann ebenfalls mit Hilfe echokardiographischer Parameter erfolgen, wobei TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*), die Dimension des rechten Atriums, perikardiale Effusion, der rechtsventrikuläre Dopplerindex und die linksventrikuläre Exzentrizität die besten prognostischen Werte liefern (Galiè *et al.*, 2009).

Die transthorakale Echokardiographie ist auch in Tiermodellen der PAH von Bedeutung, jedoch ist die technische Durchführung durch die kleine Herzgröße und die hohe Herzfrequenz bei Nagern oft erschwert. Als vorteilhaft gegenüber Parametern wie beispielsweise TAPSE erwies sich im MCT-Modell die pulmonalarterielle Akzelerationszeit (PAAT), da signifikante Veränderungen bereits 22 Tage nach MCT-Applikation nachgewiesen werden konnten (Jones *et al.*, 2002; Hardziyenka *et al.*, 2006).

6-Minuten-Gehstrecke

Die 6-Minuten-Gehstrecke zur Überprüfung der Belastungsfähigkeit ist definiert als die Distanz, die nach 6-Minuten durch schnelles Gehen zurückgelegt werden kann. Sie ist

bislang der einzige Belastungsendpunkt, der von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zur Überprüfung eines Substanzeffektes in klinischen Studien der PAH akzeptiert wird (Galiè *et al.*, 2009). Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Durchführung und dem geringen Kostenaufwand. Von Nachteil ist jedoch, dass die Methode durch Faktoren wie Körpergewicht, Alter und Motivation der Patienten beeinflusst wird (ATS Statement, 2002).

Ratten sind anders als beispielsweise Mäuse nur sehr schwer trainierbar, was die Nutzung von Laufrädern betrifft. Aus diesem Grund ist die Bestimmung eines Gehstrecken-Testes in den unter 1.2 beschriebenen Rattenmodellen in der praktischen Durchführung schwierig.

BNP und NT-proBNP im Plasma

Das *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) ist ein druck- und dehnungssensitiver Marker, der nachweislich sowohl bei rechtsventrikulärer Druck- als auch Volumenbelastung in Patienten mit PAH in erhöhter Konzentration im Plasma vorliegt (Nagaya *et al.*, 1998). Nagaya *et al.* (2000) konnten darüber hinaus zeigen, dass BNP im Plasma mit der rechtsventrikulären Dysfunktion korreliert. Ein Anstieg der BNP Plasmakonzentration über Basalniveau hinaus (≥ 150 pg/ml) geht einher mit einer schlechten Prognose der PAH Patienten. Analog ist auch ein Anstieg des inaktiven Fragmentes NT-proBNP im Plasma (≥ 1400 pg/ml) ein Hinweis auf eine schlechte Prognose der PAH. Aus diesem Grund werden beide Peptide als Biomarker für die Risikostratifizierung sowie das Monitoring von Therapie-Effekten in den aktuellen Leitlinien der PAH empfohlen (Galiè *et al.*, 2009).

Im MCT-Modell und im PA Banding-Modell konnte ein Anstieg auf Grund der rechtsventrikulären Druckbelastung von BNP und NT-proBNP im Plasma und auf Genexpressions-ebene im rechten Ventrikel gezeigt werden (Kodama *et al.*, 1999; Adachi *et al.*, 1995).

1.3.2 Weitere potentielle Biomarker

Nach wie vor liegt ein Bedarf an weiteren Biomarkern vor, die eine frühe Diagnose der PAH ermöglichen, zur strukturellen und funktionellen Aufklärung der Grunderkrankung beitragen und damit die Auswahl der Therapie unterstützen. Von Vorteil ist eine Auswahl verschiedener Biomarker, die mit pathophysiologischen Aspekten der Erkrankung wie Remodeling und Druckbelastung des rechten Ventrikels sowie inflammatorischen und/oder thrombotischen Prozessen korrelieren. Der Bedarf an weiteren Biomarkern ist begründet durch die Tatsache, dass, wie bereits oben erwähnt, die Zeit zwischen dem ersten Auftreten von Symptomen und der Diagnosestellung der PAH bei durchschnittlich zwei Jahren liegt und sich die Patienten zu diesem Zeitpunkt in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden (Taichmann *et al.*, 2007).

Neben der Darstellung der rechtsventrikulären Druckbelastung, die mit BNP und der Rechtsherzkatheterisierung, sowie echokardiographischen Parametern gezeigt werden kann, ist die

Analyse der Kontraktilität des rechten Ventrikels beispielsweise anhand von Markern für die intrazelluläre Calcium-Homöostase wie SERCA-2 und TRPCs von Interesse. Für diese zellulären Marker ist jedoch eine Gewebeprobenentnahme notwendig, weswegen sie in der Regel nur zur Messung in präklinischen Studien in Frage kommen. Als sezernierte potentielle Remodeling-Marker sind MMPs und deren Inhibitoren *Tissue Inhibitors of Metalloproteinase* (TIMPs) sowie Kollagene vom Typ 1 und 3 zu nennen, da sie an pathophysiologischen Remodeling-Prozessen der PAH beteiligt sind, die sowohl in der Lunge als auch im Ventrikel auftreten. Ein weiterer potentieller Marker ist das als Fibrose-Marker beschriebene Osteopontin (OPN). Erste Studienergebnisse zeigten einen Zusammenhang der OPN Plasmaspiegel und dem Überleben von Patienten mit idiopathischer PAH (Lorenzen *et al.*, 2010).

1.3.3 Überprüfung eines Therapie-Effektes (*Response-to-treatment*)

Von Interesse sind ebenfalls Biomarker, die einen therapeutischen Substanzeffekt darstellen können (*Response-to-treatment*). Für präklinische Untersuchungen eines *Response-to-treatment* wird idealerweise eine Substanz mit nachgewiesener Wirksamkeit im Tiermodell und in der Klinik herangezogen.

Der Endothelin-Rezeptor-Antagonist Bosentan gehört, ebenso wie der PDE-5 Inhibitor Sildenafil, zu den am häufigsten eingesetzten Therapieoptionen der PAH. Sildenafil wurde Bosentan jedoch zur Überprüfung eines *Response-to-treatment* potentieller Biomarker in dieser Arbeit vorgezogen, da eine signifikante Senkung des RVP unter Bosentan-Therapie im MCT-Modell bislang nur bei präventiver Gabe der Substanz, beginnend am Tag der MCT-Applikation, gezeigt worden ist (Hill *et al.*, 1997; Clozel *et al.*, 2006; Lourenço *et al.*, 2006).

Für Sildenafil dagegen konnte im MCT-Modell die Wirksamkeit der Substanz anhand einer Senkung des RVP und der rechtsventrikulären Hypertrophie gezeigt werden (Schermyly *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2008). Im PA Banding-Modell konnte bisher keine Senkung des RVP oder der rechtsventrikulären Hypertrophie unter Sildenafil-Therapie nachgewiesen werden (Schäfer *et al.*, 2009). Vor dem Hintergrund einer anhaltenden pulmonalarteriellen Stenosierung, wie sie im PA Banding-Modell vorliegt, ist dies nur durch einen direkten Effekt auf das Myokard vorstellbar. Auf Grund des verminderten cGMP Abbaus unter Sildenafil-Therapie sind jedoch verschiedene Regulationsmechanismen denkbar, die möglicherweise nicht ausreichen, um den RVP zu senken, jedoch Veränderungen auf Genexpressionsebene im Ventrikel bewirken und somit einen Einfluss auf die untersuchten Marker haben.

1.4 Aufgabenstellung / Zielsetzung

Ziel der Untersuchung war es Biomarker in zwei tierexperimentellen Modellen zu identifizieren und vergleichend zu bewerten, die mit den pathophysiologischen Charakteristika der PAH korrelieren.

Die Evaluation neuer Biomarker parallel zu etablierten Biomarkern in einem Standardmodell der PAH (MCT-Modell).

Für die Evaluation von verschiedenen Markern für PAH im MCT-Modell wurden echokardiographische Messungen, Hämodynamikmessungen, die Bestimmung der Endorgangewichte, Genexpressionsanalysen im rechten und linken Ventrikel, in der Lunge und der Niere sowie die Detektion von Plasmamarkern mittels ELISA und RIA herangezogen. Diese Methoden sollten gleichzeitig einer umfangreichen Charakterisierung pathophysiologischer Merkmale des MCT-Modells hinsichtlich druckbedingter Veränderungen, Remodeling und Kontraktilität, als Grundlage für die Evaluation der Marker, dienen.

Im Fokus der Untersuchung sollten druck-/dehnungssensitive Marker wie ANP und BNP sowie Remodeling-Marker (MMP-2, TIMP-1 und OPN) stehen, weil im MCT-Modell ein Remodeling der Pulmonalarterien, ebenso wie myokardiales Remodeling bedingt durch eine chronische Druckbelastung des rechten Ventrikels stattfindet. Für die Darstellung der Druckverhältnisse im rechten Ventrikel und in der Pulmonalarterie sollte neben der Rechtsherzkatheterisierung und Plasmamarkern (ANP, BNP) ein nicht-invasiver echokardiographischer Parameter herangezogen werden.

Die Aufgabe umfasste weiterhin die Überprüfung eines möglichen *Response-to-treatment* der untersuchten Marker mit Sildenafil. Sildenafil war als Referenzsubstanz besonders geeignet, da ein positiver Effekt auf den RVP und die rechtsventrikuläre Hypertrophie im MCT-Modell bereits beschrieben war.

Die Evaluation neuer Biomarker parallel zu etablierten Biomarkern in einem Modell mit isolierter rechtsventrikulärer Druckbelastung (PA Banding-Modell).

Die Evaluation potentieller Biomarker und die Charakterisierung des PA Banding-Modells hinsichtlich Druckbelastung, Remodeling und Kontraktilität erfolgten anhand der gleichen Marker und Methoden wie beim MCT-Modell. Neben Messung in einem chronischen Stadium, sollte beim PA Banding-Modell die Analyse der Parameter auch in der akuten Versuchsphase nach einer Woche erfolgen. Dies ist von Interesse, weil die bisher verwendeten Tiermodelle, insbesondere das MCT-Modell, ein Stadium mit sehr fortgeschrittenen Symptomen der PAH darstellen. Die Aufgabenstellung implizierte weiterhin die Untersuchung einer

möglichen Abhängigkeit der Marker vom Stenosegrad (induziert durch zwei Stenosedurchmesser: 1,7 mm und 1,3 mm), um den Einfluss der Druckbelastung zu evaluieren.

Im Fokus der Untersuchungen zum PA Banding-Modell standen die gleichen Marker für Druckbelastung und Remodeling wie beim MCT-Modell. Darüber hinaus war es ebenso wie im MCT-Modell Aufgabe, einen echokardiographischen Parameter als nicht-invasiven Marker zur Darstellung der rechtsventrikulären Druckverhältnisse zu etablieren.

Es sollte weiterhin ein möglicher *Response-to-treatment* der Marker mittels Sildenafil-Therapie untersucht werden. Auf Grund der permanent vorliegenden Stenose der Pulmonalarterie war ein signifikant positiver Therapie-Effekt durch Sildenafil auf den RVP und die rechtsventrikuläre Hypertrophie im PA Banding-Modell nicht zu erwarten. Durch cGMP erhöhende Substanzen wie Sildenafil und Riociguat konnten jedoch bereits direkte antiproliferative Eigenschaften von cGMP nachgewiesen werden. cGMP weist somit das Potential auf, einen Einfluss auf die Regulation der zu untersuchenden Marker auf Genexpressionsebene und im Plasma zu nehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung / Seriennummer	Hersteller, Ort
Agilent Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Analysenwaage	AE100	Mettler Toledo, Schweiz
Beatmungsmaske für Ratten		Gefertigt in der Werkstatt der Bayer Schering Pharma AG
Beatmungspumpe	RUS-1312-MA-RA	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
<i>Basic local alignment search tool</i>	BLAST Software	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
Software zur Hämodynamik- Auswertungen	Chart 6.0 Software	ADInstruments GmbH, Spechbach
FastPrep [®]	FastPrep [®] FP 120	Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA
Feinwaage	New Classic MF, MS3035/01	Mettler Toledo, Schweiz
Gasmischeinheit	ZUA-82-GME Gasmischeinheit	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
Gelwärmer	Thermasonic [®] Gel Warmer	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, NJ, USA
Hämodynamikmess- einrichtung	Power Lab	ADInstruments GmbH, Spechbach
Heizplatte mit Elektroden		Visual Sonics, Toronto Kanada
Isofluranverdampfer	Isoflurane, Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck
Kalibriergerät für Katheter	Perfect Aneroid	ERKA, Bad Tölz

Gerät	Bezeichnung / Seriennummer	Hersteller, Ort
Millar [®] Tip-Katheter, gebogen (2F)	SPR-513	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
Millar [®] Tip-Katheter, gerade (2F)	SPR-320	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
Narkosekasten		Gefertigt in der Werkstatt der Bayer Schering Pharma AG
PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer	SAFIRE [®]	Tecan, Crailsheim
Software zum Designen von Primern	Primer3Plus Software	http://www.primer3plus.com
Software für statistische Auswertungen	Prism [®] 5.03 Software	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Rasierer	Contura [®]	Wella AG, Darmstadt
RT-PCR System	7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Schieblehre	Digitalmessschieber	PROMAT
Schwanenhalslampe	KL5125	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Spektrophotometer	NanoDrop [®] ND 100 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Speedvac	Bachofer Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Stereolupe	MZ6	Leica GmbH, Wetzlar
Tierwaage	XS4002S	Mettler Toledo, Schweiz
Ultraschallgerät	Vevo [®] 770	VisualSonics, Toronto, Kanada
Vortexer	IKA [®] Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Wärmeplatte		Gefertigt in der Werkstatt der Bayer Schering Pharma AG
Zentrifuge (fürEppendorf- Tubes)	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Bezeichnung / Seriennummer	Hersteller, Ort
Zentrifuge (für Monovetten)	Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Scientific GmbH, Osterode

2.2 Operationsbesteck

Gerät	Bezeichnung / Seriennummer	Hersteller, Ort
Abgerundete Schere	tk 8523-12, stainless	Tekno, Tuttlingen
Anatomisch gerade Pinzette	tk 10100-14, stainless	Tekno, Tuttlingen
Anatomisch stark gebogene Pinzette	OC022R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Große anatomisch gebogene Pinzette	BD314R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Kleine anatomisch gebogene Pinzette	BD312R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Kleine, spitze Schere	FD016R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Knüpfpinzette	FD 281R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Mikro-Nadelhalter	20-305-01	KLS martin, Tuttlingen
Nadelhalter	BM149R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Rektalthermometer	Electronic Thermometer, ama-digit ad 15 th	Amarell GmbH & Co. KG, Kreuzwertheim
Spitze Schere	tk 8652-09, stainless	Tekno, Tuttlingen
Stumpf-spitze Schere	BC224R, stainless	Aesculap, Center Valley, PA, USA
Tracheotubus	RUS-1312-RA-MA Zubehörbox	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
Wundspreizer	15-749-10	KLS martin, Tuttlingen

2.3 Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung	Hersteller, Ort
0,9%ige NaCl Lösung	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun	B. Braun Melsungen AG
384 Taqman Platten	384-Well Clear Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
96-Well PCR Platte	twin.tec PCR plate 96	Eppendorf, Hamburg
Adhäsiv Folie	Micro Amp [®] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Agilent Chips	RNA Nano Chips	Agilent Technologies, Waldbronn
Agilent Reagenzien	Agilent RNA 6000 Nano Reagent	Agilent Technologies, Waldbronn
Antibakterielle Salbe	Nebacetin [®]	Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg
Augen- und Nasensalbe	Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Buprenorphin Hydrochlorid	Temgesic [®]	Essex pharma GmbH, München
C18-Säule	Bond Elut	Varian, Horbor City, CA, USA
DNase I	DNase I Amplification Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA Monovette	S-Monovette [®] EDTA 4,9 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Einmalspritze, verschiedene Volumina	BD Luer Lok [®] Tip	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrodengel	Signa creme [®] Electrode cream	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, NJ, USA
Enthaarungscreme	Pilca [®]	GlaxoSmithKline, Bühl
Fixierpflaster	Leukosilk [®] (1,25 cm x 5 m; 2,5 cm x 5 m)	Fleischhacker GmbH & Co. KG, Schwerte
Hautdesinfektionsmittel	Cutasept [®]	Bode Chemie, Hamburg
Isofluran	Isofluran CP [®]	Cp-pharma, Burgdorf
Kanülen	Sterican [®]	B. Braun Melsungen AG
Lithium Heparin Monovette	S-Monovette [®] Lithium-	Sarstedt AG, Nümbrecht

Material	Bezeichnung	Hersteller, Ort
	Heparin 4,9 ml	
Monocrotalin (MCT)	Crotaline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MMP-2 ELISA	Quantikine® Human/Mouse/Rat MMP-2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Monovetten-Kanüle	Monovette®-Kanüle Nr. 1, 20G	Sarstedt AG, Nümbrecht
OPN ELISA	Quantikine® Mouse Osteopontin Immunassay	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Pentobarbital	Narcoren®	Merial GmbH, Hallbergmoos
pH Teststreifen	Spezialindikator pH 2,0-9,0	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	Dualfilter	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Matrix Liquid handling Products, Pipet Tips	Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA
Polyester beschichteter Faden	Ethibond® Excel 3-0 V-5	Johnson-Johnson Intl., St Stevens-Woluwe, Belgien
Polypropylen Faden	Prolene® 5-0 TF	Johnson-Johnson Intl., St Stevens-Woluwe, Belgien
qPCR Master Mix	qPCR Master Mix Plus	Eurogentech, Seraing, Belgien
Reverse Transkriptions-System	ImProm-II Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RIA Kit (ANP und BNP)	ANP, BNP RIA Kit	Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA
RNAse und DNAse freies Wasser	Ultra PURE® Distilled Water DNAse, RNAse Free	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Schredderröhrchen	Einweg Mahlbechereinsatz violett 2 ml	Dr. Wieland GmbH & Co. KG, Pforzheim
Seidenfaden	Seraflex® USP 2/0	SERAG Wiessner, Naila
Sterile Wattestäbchen	Walu Aluminiumstäbchen	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg

Material	Bezeichnung	Hersteller, Ort
TIMP-1 ELISA	Quantikine [®] Rat TIMP-1 Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TRizol [®]	TRizol [®] Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ultraschallgel	Ultraschallgel CV Sonic	C+V PHARMA DEPOT GMBH, Versmold
Venenverweilkatheter	Vasofix [®] Braunüle [®]	B. Braun Melsungen AG
Zellstofftupfer	Pur zellin [®]	Hartmann, Heidenheim

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen.

2.4 Substanzen

Sildenafil HCl wurde im chemischen Labor der Bayer Schering Pharma AG synthetisiert. Das verwendete MCT (Produktname: Crotaline; C2401) wurde von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH in einer Reinheit von $\geq 98\%$ erworben.

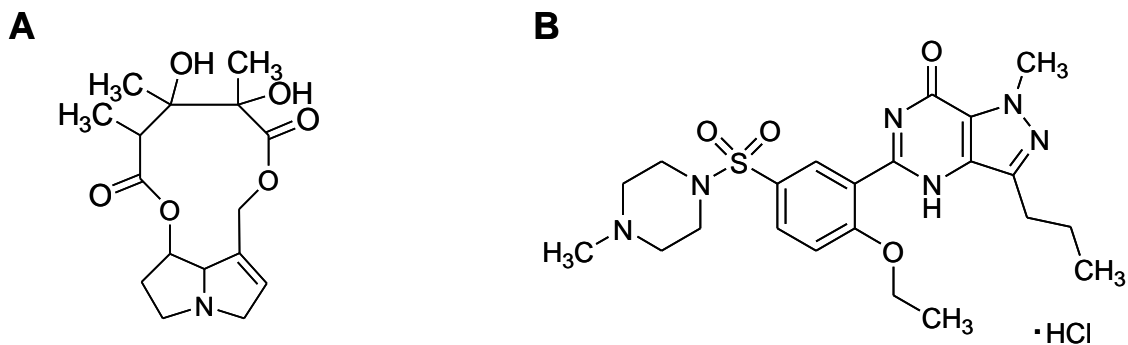


Abbildung 3: Strukturformel von A) MCT und B) Sildenafil HCl

2.5 Versuchstiere

In allen durchgeführten Versuchen wurden männliche Sprague Dawley Ratten eingesetzt. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, wo sie unter der Bezeichnung Crl:CD(SD) erhältlich sind.

Über die gesamte Studiendauer befanden sich die Tiere in Haltungsräumen mit wechselnder Tag-Nacht-Beleuchtung im 12 Stunden-Rhythmus, bei RT und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 45 %. Die Haltung der Ratten erfolgte in Gruppen von jeweils vier Tieren in durchsichtigen Makrolon Polycarbonat-Käfigen des Typs 4 (1815 cm² × 20 cm). Die Tiere erhielten Trinkwasser (Leitungswasser) und Standardfutter (ssniff[®] R/M-H Alleinfuttermittel) *ad libitum*.

2.6 Studiendesign

Für die Analyse ausgewählter Marker im MCT- und PA Banding-Modell wurden zwei separate Studien nach dem gleichen Studiendesign durchgeführt (Abbildung 4).

2.6.1 Monocrotalin (MCT)-Studie mit Sildenafil-Therapie

In der MCT-Studie wurden jeweils 12 Tiere in der Kontroll- und Therapiegruppe und 16 Tiere in der Placebogruppe eingesetzt (Ausgangsgewicht: 200-250 g). Insgesamt sind vier Tiere aus der MCT Placebogruppe vor oder während der finalen Hämodynamikmessung verstorben. Studienbeginn war die MCT Injektion (siehe 2.7.1). Nach 14 Tagen wurde die erste echokardiographische Messung (siehe 2.9.2) durchgeführt. Direkt nach der Messung wurde die Therapie, wie bei Clozel *et al.*, 2006 beschrieben, mit 100 mg/kg KG Sildenafil über das Trinkwasser begonnen (siehe 2.8). An Tag 28 wurde zunächst die zweite echokardiographische Messung und im Anschluss daran die finale Hämodynamikmessung durchgeführt (siehe 2.10). Nach der Messung wurde arterielles Blut in Lithium Heparin- und EDTA-Monovetten gesammelt und das durch Zentrifugation erhaltene Plasma aliquotiert und eingefroren. Gewebeproben von Herz, Lunge und linker Niere wurden nach der Entnahme und Bestimmung der Endorgangewichte und der Tibiallänge, eingefroren (siehe 2.11). Lösliche Marker wurden im Plasma mittels ELISA und RIA quantifiziert (siehe 2.12). Aus den Gewebeproben wurde RNA isoliert und die relative Genexpression durch RT-PCR mit Taqman-Sonden ermittelt (siehe 2.12).

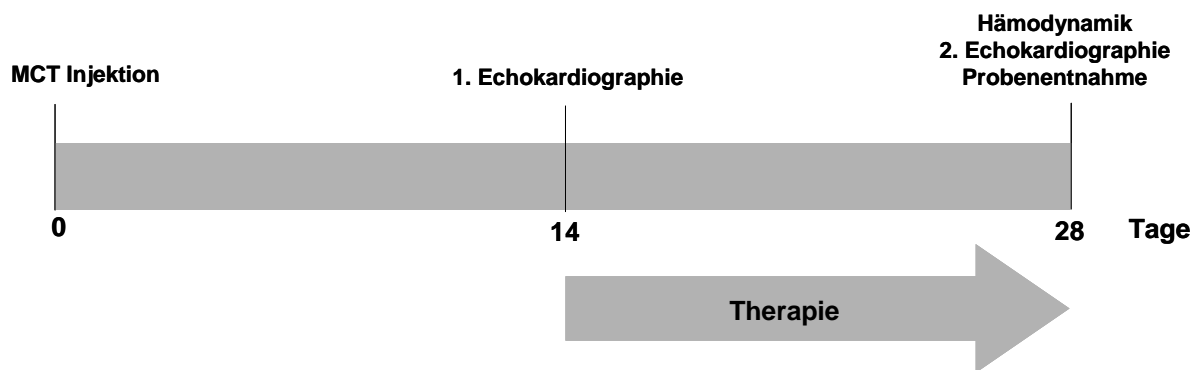


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der MCT-Studie unter Therapie mit 100 mg/kg KG Sildenafil

2.6.2 Zeitverlauf-Studie des pulmonalarteriellen (PA) Banding-Modells

Für die Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells (Abbildung 5) wurden insgesamt vier Gruppen operiert (siehe 2.7.2). Jede Gruppe setzte sich zusammen aus drei Sham-operierten Tieren, 6 Tieren mit einer Stenose der Pulmonalarterie mit einem Durchmesser von 1,7 mm (1,7 mm-Banding) und 6 Tieren mit einem Stenosedurchmesser von 1,3 mm (1,3 mm-Banding) (Ausgangsgewicht: 240-280 g).

Pro Woche wurde in einer Gruppe eine echokardiographische Messung (siehe 2.9.1) und anschließend die finale Hämodynamikmessung (siehe 2.10) durchgeführt. Nach der Messung wurde arterielles Blut in Lithium Heparin- und EDTA-Monovetten gesammelt und das durch Zentrifugation erhaltene Plasma aliquotiert und eingefroren. Herz, Lunge, linke Niere und linke *Tibia* wurden entnommen. Nach Bestimmung der Endorgangewichte und der Tibialänge wurden Teile des Gewebes eingefroren (siehe 2.11). Lösliche Marker wurden im Plasma mittels ELISA und RIA quantifiziert (siehe 2.12). Aus den Gewebeproben wurde RNA isoliert und die relative Genexpression durch RT-PCR mit Taqman-Sonden ermittelt (siehe 2.13).

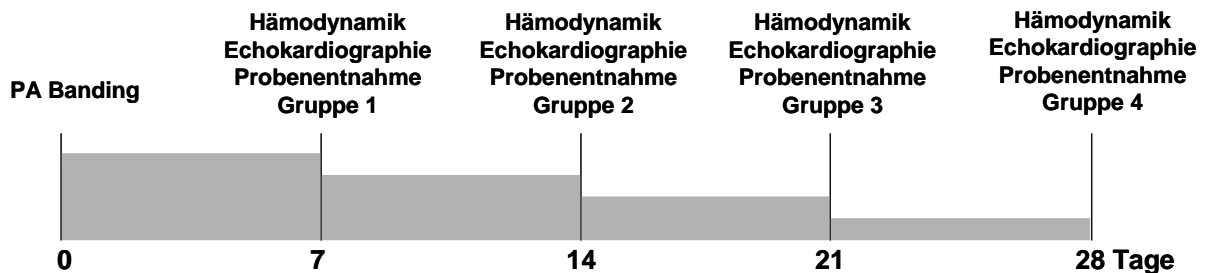


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der PA Banding Zeitverlauf-Studie: Im Abstand von 7 Tagen wurden in jeweils einer Gruppe die finalen Messungen durchgeführt.

2.6.3 Pulmonalarterielle (PA) Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie

Basierend auf den Ergebnissen der Zeitverlauf-Studie wurden bei der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie nur Sham-Tiere und Tiere mit 1,3 mm-Banding operiert (siehe 2.7.2). Es wurden jeweils 12 Tiere pro Gruppe eingesetzt (Ausgangsgewicht: 240-280 g).

Studienbeginn war die PA Banding Operation. Der weitere Versuchsablauf erfolgte nach dem gleichen Zeitschema und mit den gleichen Methoden wie bei der MCT-Studie (siehe 2.6.1). Ebenso wie in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells wurde bei der echokardiographischen Messung die pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit (PAF) ermittelt (siehe 2.9.1).

2.7 Tiermodelle

2.7.1 Monocrotalin (MCT)-Modell

Das MCT wurde in 1N HCl gelöst (175,44 mg/ml) und danach mit 1N NaOH auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt. Mit *Aqua destillata* wurde auf das finale Volumen, berechnet anhand der Dosierung und des mittleren Körpergewichtes der Tiere, aufgefüllt.

Vor der MCT Applikation wurden die Tiere mit einem Druckluft-Sauerstoff-Isfluran-Gemisch (500 ml/min Druckluft, 300 ml/min Sauerstoff) mit 5% Isfluran narkotisiert. In einer Dosierung von 60 mg/kg wurde den Tieren das gelöste MCT einmalig s.c. injiziert.

Als Kontrollen wurden unbehandelte Tiere eingesetzt.

2.7.2 Pulmonalarteriell (PA) Banding-Modell

Zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten für 5 Minuten einem Druckluft-Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (siehe 2.7.1) in Kombination mit 5 % Isofluran ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die Tiere intubiert. Als Tubus wurde die Plastikhülle einer Vasofix[®] Braunüle[®] verwendet, die mit einem Schrumpfschlauch verdickt worden war. Die Beatmung erfolgte mit 60 Atemzügen pro Minute und einem Volumen von ca. 10 l/min/kg. Um ein mögliches Kollabieren der Alveolen zu verhindern, wurde ein positiver endinspiratorischer Druck von 15 cm Wassersäule eingestellt. Die Erhaltungsdosis Isofluran zur weiteren Narkotisierung betrug ca. 2 %. Zur Analgesie wurde den Tieren 0,03 mg/kg Temgesic[®] s.c. verabreicht (1,8 ml 0,9 %ige NaCl und 0,2 ml Temgesic[®] in einem Volumen von 0,1 ml/100 g KG). Während der OP lagen die Tiere auf einer Wärmeplatte, um die physiologische Körpertemperatur von ca. 37 °C zu erhalten, die mittels Rektalthermometer überprüft wurde. Zur Vorbereitung der OP wurden die Tiere im OP Bereich rasiert, die Haut anschließend desinfiziert und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Augen- und Nasensalbe bedeckt. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehreflextest durchgeführt.

Der Operationsbereich lag ca. 0,5 cm kaudal des linken Schulterblattes. Mit einem Skalpell wurde die Haut auf Höhe des linken Ellenbogens etwa 1,5 cm vertikal geöffnet. Die verschiedenen Muskelschichten wurden mit einer anatomisch gebogenen Pinzette im Faserverlauf getrennt. Die Interkostalmuskulatur des dritten Interkostalraumes wurde zunächst mit einer anatomisch gebogenen Pinzette durchstoßen und dann mit einer stumpfen, geraden anatomischen Pinzette vertikal gespreizt. Nach Einführung eines Wundspreizers wurde der Interkostalraum auf eine 2 cm breite Spalte erweitert. Mit sterilen Tupfern wurde der Thymus in kraniale Richtung geschoben und das Perikard geöffnet. In das Fettgewebe zwischen Aorta und Pulmonalarterie wurde mit einer Knüpppinzette eine Öffnung präpariert. Anschließend wurde die Pulmonalarterie mittels einer anatomisch gebogenen Pinzette leicht angehoben. Unter der Pulmonalarterie wurde ein Polypropylen-Faden durchgezogen und die Fadenenden locker verknotet, so dass unter den Knoten ein gebogener Metallstab mit einem Durchmesser von 1,3 mm bzw. 1,7 mm platziert werden konnte. Der Faden wurde darüber mit einem chirurgischen Knoten verknotet und der Metallstab schnell herausgezogen. Die Fadenenden wurden auf ca. 3 mm gekürzt (Abbildung 6). Anschließend konnte der Wundspreizer entnommen werden. Der Interkostalraum wurde mit zwei U-Heften (Polyesterbeschichteter Faden) geschlossen. Die einzelnen Muskelschichten wurden in fortlaufenden Nähten verschlossen. Die Haut wurde in Einzelheften genäht. Während dieses Vorgangs wurde die Isofluranzufuhr bis auf Null gesenkt.

Die Wunde wurde mit 0,9 %iger NaCl Lösung und Hautdesinfektionsmittel gereinigt und zur Infektionsprophylaxe mit einer antibakteriellen Salbe behandelt. Die künstliche Beatmung erfolgte, bis die Tiere aus der Narkose erwachten. Anschließend wurden die Tiere in einen gewärmten, mit Zellstoff ausgelegten Käfig verbracht und bis zur vollständigen Regeneration intensiv beobachtet.

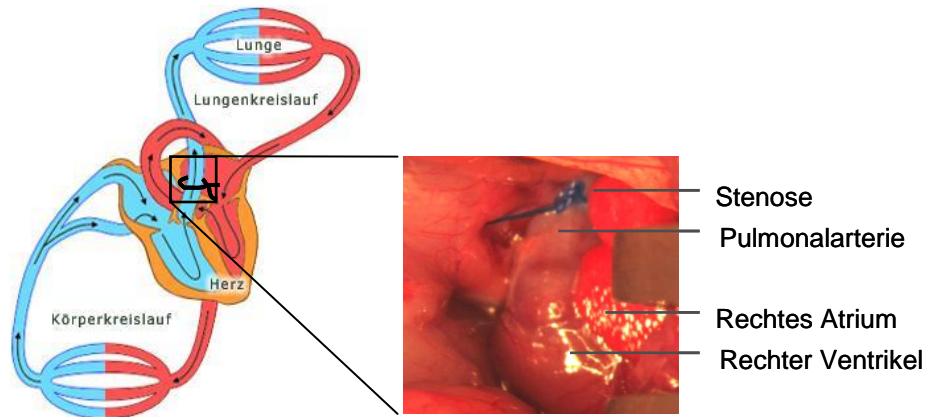


Abbildung 6: OP Ausschnitt des PA Bandings mit freigelegter und stenosierter Pulmonalarterie.

Als Kontrollen wurden Sham-operierte Tiere eingesetzt. Die Operation wurde wie oben beschrieben durchgeführt, ohne eine Stenosierung mittels Faden vorzunehmen.

2.8 Therapeutische Intervention

Basierend auf dem mittleren KG der Tiere wurde die Menge an Sildenafil errechnet, die einer Tagesdosierung von 100 mg/kg KG entspricht. Als Berechnungsgrundlage für das Volumen diente eine durchschnittliche Trinkwasseraufnahme der Tiere von 30 ml pro Tag/Ratte. Die Substanzmenge wurde für die entsprechende Tierzahl für fünf Tage in 0,5 %iger Zitronensäure gelöst. Die Lösung wurde jeweils nach vier Tagen erneuert. Die durchschnittliche Trinkmenge von 29,5 ml der Ratten/Tag variierte im Mittel nicht über den Untersuchungszeitraum.

2.9 Echokardiographische Messungen

2.9.1 Pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit (PAF)

Die Messung der PAF wird herangezogen, um mit Hilfe der vereinfachten Gleichung nach Bernoulli einen Druckgradienten zu berechnen. Hier wurde das Prinzip für die Bestimmung der Druckverhältnisse in der Stenose angewendet.

Die narkotisierten Tiere wurden auf eine Wärmeplatte gelegt, ausgestattet mit Elektroden zur Ableitung der Herz-/Atemfrequenz. Über eine speziell angefertigte Beatmungsmaske für Ratten wurde ein Druckluft-Sauerstoff-Isfluran-Gemisch (siehe 2.7.1) mit einer Erhaltungs-

dosis von 2 % Isofluran eingeleitet. Die Pfoten der Tiere wurden mit Pflaster auf die Elektroden fixiert, auf die zuvor Kontaktgel aufgetragen wurde. Die Tiere wurden zunächst im Thoraxbereich rasiert und anschließend mit einer Enthaarungscreme enthaart. Auf diese Stelle wurde eine ca. 2 cm dicke Schicht vorgewärmtes Ultraschallgel aufgetragen.

Die Einstellung der optimalen Schnittebene und somit des Messbereiches erfolgt im B-Mode. Im B-Mode wird die Echogenität, die die Amplitude der Reflektion des Schallwellenimpulses ausdrückt, in Helligkeit umgesetzt. Es gilt, je heller der Bildpunkt ist, desto höher ist die Echogenität. Durch Bewegung der Sonde wird der angeschallte Körperbereich gescannt, wodurch ein zweidimensionales Bild erhalten wird.

Der Schallkopf (Sondenfrequenz von 17,5 MHz) wurde im linken Thoraxbereich parallel zum Sternum angesetzt und dann leicht gegen den Uhrzeigersinn gedreht bis die Pulmonalarterie im Längsschnitt zu sehen war. Die Aorta war als kreisrunder Querschnitt auf der rechten Seite des Bildes zu sehen und diente als Orientierungspunkt. Die auf diese Weise dargestellte Schnittebene entspricht der modifizierten parasternalen langen Achse (Abbildung 7). Der Schallkopf wurde in ein Stativ eingespannt, um einen versehentlichen Wechsel der Schnittebene zu unterbinden. Im B-Mode wurde das *Gate* (Messfenster) auf 0,5 mm festgelegt. Bei der Flussmessung lag die Pulmonalarterie in einer Linie mit der Schallwelle und die Stenose bzw. die entsprechende Stelle bei Kontrolltieren in einer Tiefe von ca. 17 mm, was dem optimalen Messbereich der Sonde entsprach. Zur Messung der PAF wurde in den PW Doppler Mode gewechselt. In diesem Modus wird die Änderung der Entfernung der im Messvolumen vorhandenen Streupartikel pro Zeiteinheit gemessen. Für die weitere Auswertung wurden einzelne Sonogramme des Flusssignals aufgenommen.

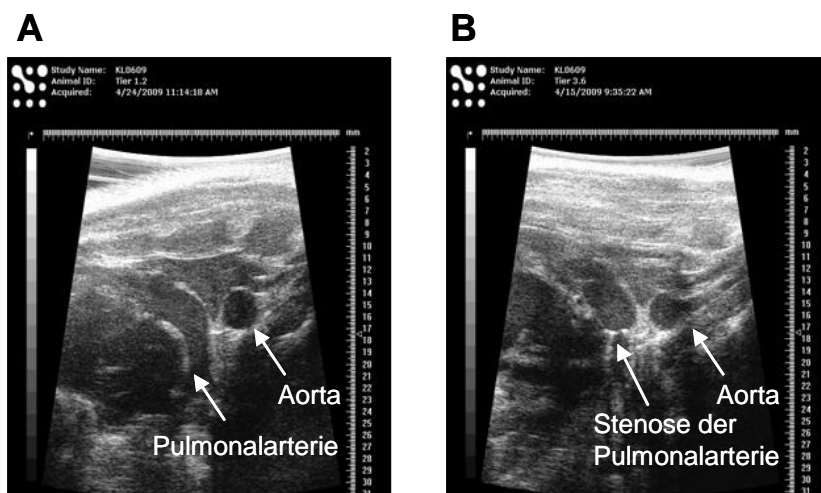


Abbildung 7: Darstellung der Pulmonalarterie in der modifizierten parasternalen langen Achse zur Messung der PAF in A) Kontrolltieren und B) Tieren mit 1,3 mm-Bandierung. Die Bildaufnahme erfolgte im B-Mode.

Die Auswertung wurde mit der Vevo 770[®] V2.3.0 Software durchgeführt. Bestimmt wurde die maximale Flussgeschwindigkeit im Peak Maximum, die in der Systole vorliegt. Pro Tier

wurden drei Peaks ausgewertet und deren Mittelwert gebildet. Ausgehend von der PAF konnte auch der Druckgradient für diese Stelle berechnet werden.

Bei einem Tier aus der Zeitverlauf–Studie des PA Banding-Modells und zwei Tieren aus der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie konnte an jeweils einem Messtag kein auswertbares Sonogramm aufgenommen werden. Diese Tiere sind von der statistischen Auswertung der PAF ausgeschlossen worden.

2.9.2 Pulmonalarterielle Akzelerationszeit korrigiert auf die Zykluslänge (PAAT/CL)

Die echokardiographische Bestimmung der PAAT/CL erfolgte in einer zusätzlichen MCT-Studie. Das Studiendesign entsprach dem der MCT-Studie (siehe 2.6.1; Abbildung 4). Die PAAT/CL wurde in jeweils 10 Tieren pro Gruppe gemessen.

Zur Messung der PAAT/CL in MCT behandelten Ratten wurden die Tiere ebenso narkotisiert und präpariert, wie unter 2.9.1 beschrieben. Die Pulmonalarterie wurde in der gleichen Schnittebene dargestellt wie bei der Messung der PAF (Abbildung 7) mit dem Unterschied, dass hier die Pulmonalklappe in der optimalen Messtiefe von ca. 17 mm lag. Mittels PW Doppler Mode wurde das Flusssignal unmittelbar unterhalb der Klappenebene aufgenommen und einzelne Sonogramme gespeichert.

Die Auswertung erfolgte mit der Vevo 770[®] V2.3.0 Software. Bestimmt wurde die Akzelerationszeit (PAAT) vom Beginn bis zum Maximum des Signals. Um eine Interferenz der Herzfrequenz zu minimieren, wurde die Akzelerationszeit um die Zykluslänge (CL) von einem Peak bis zum nächsten durch Division korrigiert (PAAT/CL). Pro Tier wurden drei Peaks ausgewertet und deren Mittelwert gebildet.

2.10 Invasive hämodynamische Messungen

Die Hämodynamikmessung wurde mit einem Power Lab System unter Verwendung der Chart 6.0 Software durchgeführt.

Die Einleitung der Narkose erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Zusätzlich wurde den Tieren 60 mg/kg KG Narcoren[®] i.p. verabreicht (Mischungsverhältnis: 1,5 ml Narcoren[®] und 2,5 ml 0,9 %ige NaCl). Narcoren[®] unterdrückt die Spontanatmung, die möglicherweise das Drucksignal beeinflusst hätte. Dies machte es jedoch notwendig, dass die Tiere künstlich beatmet wurden. Während der gesamten Präparation und Hämodynamikmessung befanden sich die Tiere auf einer Wärmeplatte, um die physiologische Körpertemperatur aufrecht zu erhalten.

Für die Beatmung wurde an den Tieren eine Tracheotomie durchgeführt. Die Tiere wurden dafür im Halsbereich rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde der Zwischenzehreflextest zur Überprüfung der Narkosetiefe durchgeführt. Mit einer stumpfen Schere wurde ein ca.

3 cm langer Schnitt, ausgehend ca. 1,5 cm unterhalb der Maulöffnung, nach kaudal in die Haut geschnitten. Darüber hinaus sind zwei kleinere davon abgehende horizontale Schnitte gemacht worden, um ein optimales Präparationsfeld zu erlangen. Die *Trachea* wurde mit zwei anatomisch gebogenen Pinzetten von Muskelfasern und den Speicheldrüsen freipräpariert. Für die Fixierung wurde eine anatomisch gebogene Pinzette unter die freigelegte *Trachea* positioniert. Darüber hinaus wurde unter der *Trachea* ein ca. 15 cm langer Seidenfaden vorgelegt. Mit einer kleinen spitzen Schere wurde die *Trachea* zwischen den Trachealspannen eingeschnitten. In die Öffnung wurde nun eine Tracheotubus eingeführt und mit dem Seidenfaden fixiert. Die Tiere wurden an die Beatmungspumpe angeschlossen und wie unter 2.7.1 beschrieben beatmet. Die Isofluran-Erhaltungsdosis betrug 1-2 %.

Es wurden Elektroden an das Tier angeschlossen, um während der Hämodynamikmessung das EKG abzuleiten und die Herzfrequenz zu messen.

Mit anatomisch gebogenen Pinzetten wurden 1,5 cm der *Arteria carotis sinister* freipräpariert. Unter das Gefäß wurden drei Seidenfäden von ca. 15 cm Länge mittels Knüpfpinzetten vorgelegt. Mit einem Seidenfaden wurde die Arterie kranial durch Verknoten gestaut. Kaudal wurde das Gefäß gestaut, indem ein zweiter Faden mit einem Nadelhalter gespannt wurde. Eine am Ende leicht gebogene Kanüle diente der Eröffnung der Arterie. In die Öffnung wurde mit einer Knüpfpinzette ein Millar Mikrotip Katheter (2F) eingeführt, der mit dem dritten Seidenfaden fixiert wurde. Durch Lösen der Stauung kaudal, konnte der Katheter vorgeschoben werden, bis ein Signal des systemischen Blutdrucks erzielt wurde. Danach wurde in gleicher Weise die *Vena jugularis dexter* freipräpariert, gestaut und eröffnet. Zur Messung des RVP wurde ein gebogener Millar Mikrotip Katheter (2F) in die Vene eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die Messung wurde über 3 Minuten durchgeführt und gespeichert. Die Messwerte der über diesen Zeitraum aufgenommenen Druckkurve wurden für die Auswertung anschließend gemittelt.

Die Auswertung der Hämodynamikmessung erfolgte unter Nutzung der Chart 6.0 Software. Über die Messung in der *Arteria carotis sinister* wurde der systolische und diastolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz ermittelt. Die Messung mittels des Katheters in der *Vena jugularis dexter* diente der Bestimmung des RVP, des RVEDP sowie des dP/dt max und dP/dt min. Der RVP ist der größte, zum Zeitpunkt der Systole gemessene Druck im rechten Ventrikel und somit ein Parameter der systolischen Funktion. Der RVEDP ist der Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion gemessen wird. Ein erhöhter RVEDP ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion, die mit einer abnormen Relaxation, einer gestörten Füllung und/oder einer verminderten Dehnungsfähigkeit einhergeht. Der dP/dt max ist der Differentialquotient aus Druck und Zeit und ist somit das Maß für die Druckanstiegsgeschwindigkeit und ein guter Parameter zur Bewertung

der Kontraktilität. Der dP/dt min beschreibt die Druckabfallgeschwindigkeit und dient als Maß für die Relaxationsfähigkeit des Ventrikels.

2.11 Probenentnahme

Nach Beendigung der Hämodynamikmessung durch Entfernen der Katheter wurde die Isofluran Zufuhr auf 5 % erhöht. Mit einer spitz-stumpfen Schere wurde ein Hautschnitt median im Bereich der *Regio xiphoidea* gesetzt und der *Processus xiphoideus* mit einem Nadelhalter erfasst und angehoben. Anschließend wurde die Thoraxhöhle durch Abtrennen des *Diaphragmas* und Durchtrennung der Rippen eröffnet. Die Blutentnahme erfolgte über Punktion des linken Ventrikels. Es wurde zunächst arterielles Blut in Lithium-Heparin- und danach in EDTA-Monovetten gesammelt. Im Anschluss wurden die Monovetten bei 3.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Das Herz wurde zusammen mit den beiden Lungenflügeln entnommen. Dazu wurden der *Oesophagus* und die *Trachea* mit den anhängenden Gefäßen und Nerven durchtrennt. Anschließend wurden Herz und Lunge vom dorsalen *Thorax* mit einer kleinen spitzen Schere unter Durchtrennung des *Mediastinums* bis hin zum *Diaphragma* freipräpariert. Danach wurde ein Hautschnitt in der *Regio abdominalis media* gesetzt. Die Niere wurde unter Durchtrennung des *Hilum renale*, der *Vena renalis* und der *Arteria renalis* entnommen. Die entnommenen Organe wurden bis zur weiteren Präparation in 4 °C kaltem DBPS gelagert. Die *Tibia* wurde entnommen, indem das Gelenk zwischen *Femor* und *Tibia* überstreckt und beide mit einer spitz-stumpfen Schere am *Ligamentum collaterale tibiale* und *Meniscus medialis* voneinander getrennt wurden. Anschließend wurden die Bänder zwischen *Tibia* und *Calcaneus* sowie *Talus* getrennt. Die Tibialänge wurde mit einer Schieblehre gemessen.

Das Herz wurde von der Lunge getrennt und von Gefäßen und Herzbeutel freipräpariert. Die *Atria* wurden abgetrennt und separat gewogen. Das Herzgewicht wurde bestimmt, bevor rechter Ventrikel, Septum und linker Ventrikel getrennt und gewogen wurden. Die Lungenflügel wurden von Nerven, Blutgefäßen und *Oesophagus* freipräpariert und das Gesamtgewicht bestimmt. Die Nierenkapsel sowie die Nebenniere wurden entfernt, bevor die Niere gewogen wurde. Die Endorgangewichte wurden auf die Tibialänge als Körpergewichts-unabhängigen Faktor bezogen. Auf diese Weise wurden mögliche krankheitsbedingte, akut auftretende Körpergewichtsverluste nicht unverhältnismäßig gewichtet. Teile jeden Gewebes wurden auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.12 Messung löslicher Marker im Plasma mittels ELISA und RIA

Für die Bestimmung von ANP und BNP wurden 600 µl EDTA-Plasma 1:1 mit 1 %iger Trifluoressigsäure versetzt und anschließend über C18-Säulen gegeben. Das Eluat wurde in

einer Speedvac lyophilisiert und in 250 µl Probenpuffer (Zusammensetzung: 50 % Methanol, 40 % 5M Essigsäure, 10 % Wasser) aufgenommen. Die ANP- und BNP-Konzentration wurde mit Hilfe eines RIA-Kits nach Protokoll des Herstellers bestimmt.

Die Bestimmung von MMP-2 im Plasma wurde mit dem kommerziell erwerblichen Quantikine[®] Human/Mouse/Rat MMP-2 (total) Immunoassay durchgeführt. Die Plasmakonzentration von TIMP-1 wurde mit dem Quantikine[®] Rat TIMP-1 Immunoassay ermittelt. Die OPN Plasmakonzentration wurde mit dem Quantikine[®] Mouse Osteopontin Immunoassay erhoben, der nach Herstellerangaben auch die OPN-Quantifizierung im Ratten-Plasma zulässt. Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach den jeweiligen Protokollen des Herstellers.

In Einzelfällen lag kein ausreichendes Volumen an Plasma vor oder das Blut entsprach z.B. bedingt durch Hämolyse nicht der Qualität, die zur Quantifizierung eines Parameters notwendig war.

2.13 RNA Extraktion und RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde aus dem rechten und linken Ventrikel sowie der linken Lunge und der linken Niere isoliert. Dazu wurden die einzelnen Gewebe zunächst mechanisch unter Kühlung mit Flüssigstickstoff in einem Porzellanmörser zerrieben. Ein kleiner Teil des pulverisierten Gewebes wurde in Schredderröhrchen gegeben, die mit 900 µl TRIzol[®] gefüllt waren, und in einer Fast Prep[®] weiter zerkleinert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und Homogenisierung mittels Vortexer wurden die Proben zentrifugiert. Auf diese Weise entstand eine Phasentrennung mit der Gesamt-RNA in der oberen Phase. Diese wurde abgenommen und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und erneutes Zentrifugieren gefällt. Eine Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 800 µl 80 %igem Ethanol. Die RNA-Pellets wurden für 10 min abgedampft und anschließend durch Zugabe von RNase-freiem Wasser gelöst. Mittels Spektrophotometer wurde die gelöste Gesamt-RNA quantifiziert. Eine Überprüfung der RNA Qualität erfolgte elektrophoretisch mit dem Agilent Bioanalyzer.

Zur Entfernung möglicher Reste genomischer DNA, wurde zunächst 1 µg Gesamt-RNA mit RNase freier DNase I für 15 min bei RT verdaut. Diese Reaktion wurde anschließend durch Inkubation mit EDTA für 15 min bei 65 °C gestoppt. Die Gesamt-RNA wurde nun in einem Reaktionsvolumen von 53 µl mit dem ImProm-II Reverse Transcription System gemäß dem Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben und diese mit RNase-freiem Wasser auf ein finales Volumen von 200 µl verdünnt.

Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. 4 µl der cDNA Proben wurde mit qPCR Master Mix Plus und dem genspezifischen Primer-Paar und einer TaqMan-Sonde versetzt (Tabelle 2). Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid,

dessen 5'-Ende mit einem 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter-Farbstoff markiert ist, während das 3'-Ende ein 6-Carboxytetramethylrodamin (TAMRA) als Quencher-Farbstoff trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Durch Hydrolyse der TaqMan[®]-Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter-Farbstoff im Verlauf der PCR freigesetzt. In Abhängigkeit der Zahl freigesetzter Reporter-Moleküle wächst das Reporter-Signal. Eine Hydrolyse der TaqMan[®]-Sonde ist nur dann möglich, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template kommt. Das Reporter-Signal wird somit nur generiert, wenn eine Amplifikation der Zielsequenz erfolgt. Der Fluoreszenzanstieg ist folglich direkt proportional zu der Anreicherung an Amplifikat. Je höher die Expression eines Genes ist, desto mehr PCR Produkte werden amplifiziert (Livak *et al.*, 1995). Dies macht eine Quantifizierung der Genexpression möglich.

Die PCR wurde in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einem Temperatur-Programm von 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 15 s 95 °C und 1 min 60 °C, in 384-Wellplatten im Applied Biosystem 7900 HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Die Expressionen wurden mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Zu Beginn der PCR ist die Templatemenge reaktionslimitierend. In der nachfolgenden Phase nehmen die PCR Amplifikate bis zum Erreichen einer Plateauphase unter idealen Reaktionsbedingungen exponentiell zu. Gemessen wird der C_t -Wert am Anfang der exponentiellen Phase. Der C_t -Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz angestiegen ist. Die relative Genexpression lässt sich nach der Formel:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ mit } \Delta\Delta C_t = \Delta C_t[C_{t_{35}} - C_{t_{\text{Referenzgen}}}] - \Delta C_t[C_{t_{\text{Probe}}} - C_{t_{\text{Referenzgen}}}]$$

berechnen. Als Referenzgene wurden das ribosomale Protein L32 und B2M herangezogen. Ein C_t -Wert von 35 wird hier als höchster anzunehmender C_t -Wert festgelegt und kann als interne Referenz dienen. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte gemäß User Bulletin #2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems.

2.14 Generierung genspezifischer Primer-Sequenzen

Die Generierung genspezifischer Primer-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Primer3Plus Software. Eine anschließende Alignment-Analyse wurde mit der BLAST Software durchgeführt.

PCR-Primer und TaqMan® Sonden

Tabelle 2: DNA Sequenzen der genspezifischen PCR-Primer und der TaqMan® Sonden

Gen	Offizielle Bezeichnung nach HGNC	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde (5'-FAM, 3'-TAMRA)
ANP	NPPA	CCTCTTCCTGGCCTT TTGG	TGTGTTGGACACCGC ACTGT	TCCCAGGCCATATTGGAG CAAATCC
B2M	B2M	GCTCGCTCGGTGAC CG	GTTTTCTGAATGGCA AGCACG	TTTCTGGTGCTTGTCTCT CTGGCCG
BNP	NPPB	GCTGCAGACTCCGG CTTCT	ATCACTTGAGAGGTG GTCCCA	ACTCTGCCTGCGGCTCTT CTTTCCC
COL1A2	COL1A2	CCCAGCCAAGAATGC ATACA	TCAAAGTGGCTGCCA CCAT	TGCCAGGCCAACAAGC ATGTCT
COL3A1	COL3A1	TGGCGGCTTTTACC ATATT	ACTCTCTATTTGTCC GTTAACAGACTTG	CCAATGGATTTCAAGATC AACACTGA
L32	RLP32	GAAAGAGCAGCACA GCTGGC	TCATTCTCTTCGCTG CGTAGC	TCAGAGTCACCAATCCCA ACGCCA
MMP-2	MMP2	GTTTATTTGGCGGAC AGTGACA	GGGAGCTCAGGCCA GAATG	CCCACAGGTCCCTTGCTG GTGG
MYHCA	MYH6	GCCAAGGCAAACCT GGAGA	TTCACCCGGTATTCA TTCGC	AGTGTCCCGGACACTGG AGGACCA
MYHCB	MYH7	TGGAGAACGACAAG CAGCAG	CCTGGCGTTGAGTG CATTTA	TGGATGAGCGACTCAAAA AGAAGGACTTTG
OPN	SPP1	AGCCATGACCACATG GACGA	GATTCGTCAGATTCA TCCGAGT	AGACCATGCAGAGAGCG AGGATTCTGTG
SERCA-2	ATP2A	TGCTTGTCCATGTCC CTTCA	GCGGTGTGATCTGG AAAATGA	TTGATCCTCTACGTGGAA CCTTTGCCA
TIMP-1	TIMP1	TGTCCACAAGTCCCA GAACC	ATGTGCAAATTTCCG TTCT	AGTTTCTCATCGCGGGCC GTTT
TRPC-3	TRPC3	CACACAGTTTTAACA GCATTCTCA	TTGTGCTTTCAAAC ATACCG	TCAGCCAACACGATATCA GCAGATAATGA
TRPC-4	TRPC4	CTCAAGCATAGATTA TGATTTAAGCC	AAGTTGTCACAATCT CGTGGT	ACGGACACAGTTGCCCAT GAAGATTATG
TRPC-6	TRPC6	GCAGCAGCTCCTCTC CATATG	CGAGGACCACGAGG AATTC	AACCTCTCTGGTTTACGG CAGCAGACC

2.15 Berechnungen und Statistik

Die statistischen Berechnungen und die Auswertung der ELISA Messungen mittels Standardkurven sowie die Darstellung der Graphen wurden mit der Graph Pad Prism 5.0 Software durchgeführt.

Die Daten der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells sind als $MW \pm SD$ dargestellt mit einer Tierzahl von $n=3/\text{Tag}$ in der Kontrollgruppe und jeweils $n=5-6/\text{Tag}$ in den beiden Bandinggruppen. Die Daten der PA Banding- ($n=10-12/\text{Gruppe}$) und der MCT-Studie ($n=11-14/\text{Gruppe}$) mit Sildenafil-Therapie sind, gerechtfertigt durch die höhere Tierzahl, als $MW \pm SEM$ dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen einer Studie wurden durch Anwendung von One-way ANOVA, gefolgt von einer Newman-Keuls *post hoc* Analyse zum multiplen Vergleich bestimmt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

Statistische Ausreißer, die, vor allem auf Grund methodenbedingter größerer Schwankungen, bei den relativen Genexpressionen auftraten, wurden mittels *Grubbs Test* ermittelt und von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. In der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells wurde auf Grund der kleinen Tierzahl kein *Grubbs Test* durchgeführt. Der *Grubbs Test* wurde mit dem *Online Calculator for Outliers*, bereitgestellt von Graph Pad Software, durchgeführt.

Zur Erfassung der Relation zweier Parameter zueinander wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt.

Als körporgewichtsunabhängiges Maß für eine Hypertrophie des rechten Ventrikels wurde der Quotient aus dem rechtsventrikulären Gewicht und der Summe des linksventrikulären Gewichtes und des Septumgewichtes bestimmt ($RV/(LV + S)$).

Auf Basis der echokardiographisch ermittelten PAF wurde ein Druckgradient mit Hilfe der Bernoulli-Gleichung $\Delta P = 4 \times v^2$ [mmHg] mit ΔP = Druckgradient und v = Flussgeschwindigkeit berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Monocrotalin (MCT)-Modells und Analyse von potentiellen Biomarkern

14 Tage nach einmaliger Applikation von 60 mg/kg MCT wurden die Ratten mit 100 mg/kg/Tag Sildenafil über 14 Tage therapiert. Echokardiographische Messungen der pulmonalarteriellen Akzelerationszeit (PAAT/CL) wurden an Tag 14 und 28 durchgeführt. Die finale Hämodynamikmessung sowie Blut- und Organentnahme erfolgten an Tag 28. Genexpressionsanalysen im rechten und linken Ventrikel, Lunge und Niere dienten dem Screening potentieller Biomarker und der pathophysiologischen Charakterisierung des Modells. Die druck-/dehnungssensitiven Marker ANP und BNP sowie die Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN wurden zusätzlich zur Bestimmung der relativen Genexpression auch als Proteine mittels RIA oder ELISA im Plasma quantifiziert.

3.1.1 Hämodynamik

Der RVP wurde als Parameter für die systolische Funktion des rechten Ventrikels bestimmt. Bei MCT behandelten Placebotieren lag der RVP signifikant höher als in den Kontrolltieren. Die Therapie mit Sildenafil führte zu einer signifikanten Reduktion des RVP (Tabelle 3; Abbildung 8 A).

Der RVEDP als Maß für die Steifigkeit des rechten Ventrikels war nicht signifikant gesenkt (Tabelle 3; Abbildung 8 B).

Der dP/dt max, als Maß für Kontraktilität, war in der Placebogruppe signifikant erhöht und gegenläufig dazu der dP/dt min, als Maß für Relaxation, erniedrigt. Beide Parameter wurden durch die Therapie mit Sildenafil gesenkt (Tabelle 3; Abbildung 8 C, D).

Der systolische und diastolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz waren in allen Gruppen stabil (Tabelle 3). Die Amplitude von systolischem und diastolischem Blutdruck war bei MCT-behandelten Tieren geringer als bei Kontrolltieren.

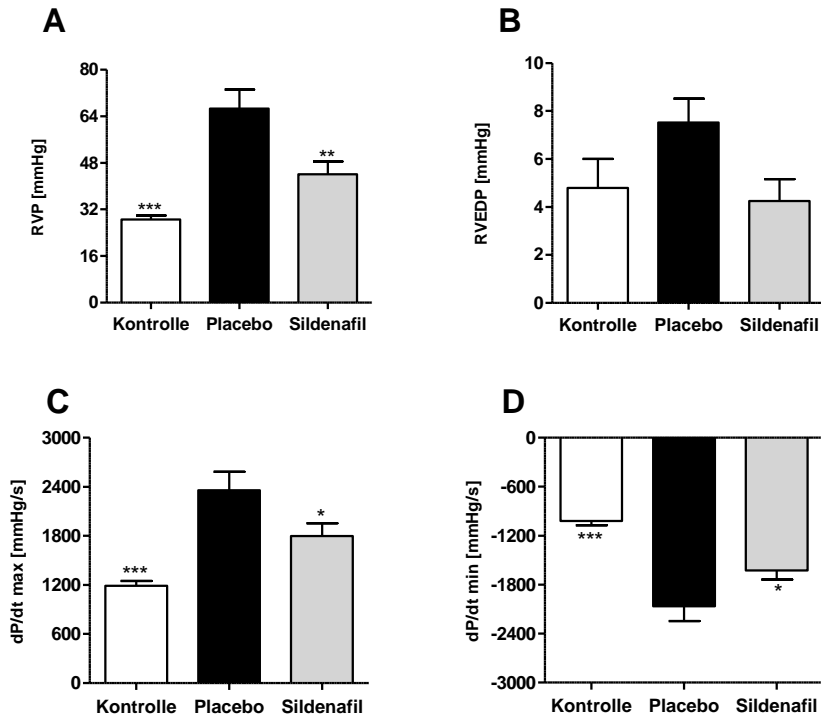


Abbildung 8: Hämodynamik Parameter im rechten Ventrikel im MCT-Modell. A) RVP, B) RVEDP, C) dP/dt max, D) dP/dt min. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 3: Hämodynamik Parameter im MCT-Modell. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
RVP [mmHg]	28,6 ± 1,3***	66,7 ± 6,4	44,1 ± 4,4**
RVEDP [mmHg]	4,8 ± 1,2	7,5 ± 1,0	4,2 ± 1,0
dP/dt max [mmHg/s]	1190 ± 59***	2359 ± 227	1798 ± 159*
dP/dt min [mmHg/s]	-1019 ± 52***	-2065 ± 180	-1624 ± 113*
BPsys [mmHg]	94,7 ± 7,2	90,8 ± 7,4	82,1 ± 3,9
BPdia [mmHg]	67,0 ± 6,9	73,2 ± 6,6	61,3 ± 4,0
Herzfrequenz [BPM]	306 ± 10	316 ± 9	325 ± 9

3.1.2 Endorgangewichte

In der Placebogruppe des MCT-Modells lag der Quotient RV/(LV + S), als Maß für rechtsventrikuläre Hypertrophie, signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Tabelle 4; Abbildung 9 A). Die Erhöhung des Quotienten basiert dabei hauptsächlich auf einer Zunahme des rechtsventrikulären Gewichtes (Tabelle 4). Durch die Therapie mit Sildenafil konnte eine signifikante Reduktion der rechtsventrikulären Hypertrophie erwirkt werden.

Das mittlere Gewicht des rechten *Atriums* war in der Placebogruppe signifikant höher als in der Kontroll- und Sildenafilgruppe (Tabelle 4). Das mittlere Gewicht des linken Atriums wies dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf (Tabelle 4).

In der Placebogruppe lag das mittlere Lungengewicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe und konnte durch die Sildenafil-Therapie reduziert werden (Tabelle 4; Abbildung 9 B).

Bei den Nierengewichten traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Tabelle 4).

Das Körpergewicht MCT-behandelter Tiere war signifikant niedriger als das Gewicht der Kontrolltiere. Bei der Tibialänge lagen keine signifikanten Unterschiede vor (Tabelle 4).

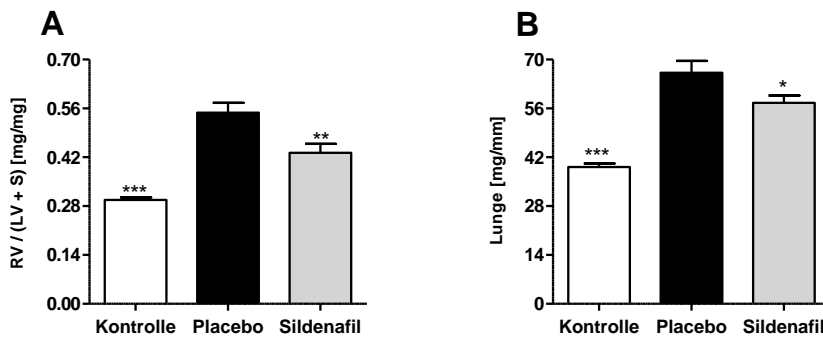


Abbildung 9: Endorgangewichte im MCT-Modell. A) RV/(LV + S), B) Lungengewicht normiert auf Tibialänge. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 4: KG, Tibialänge, Organgewichte normiert auf die Tibialänge und Quotient RV/(LV + S) im MCT-Modell. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
RV/(LV + S) [mg/mg]	0,30 \pm 0,01***	0,55 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03**
Herz [mg/mm]	28,0 \pm 0,4***	33,2 \pm 1,0	28,5 \pm 0,8***
Rechter Ventrikel [mg/mm]	6,4 \pm 0,2***	11,5 \pm 0,7	8,4 \pm 0,5***
Linker Ventrikel [mg/mm]	13,8 \pm 0,4	13,3 \pm 0,4	11,9 \pm 0,4*
Rechtes Atrium [mg/mm]	1,7 \pm 0,1***	2,7 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1***
Linkes Atrium [mg/mm]	0,94 \pm 0,04	0,80 \pm 0,05	0,92 \pm 0,04
Lunge [mg/mm]	39,2 \pm 1,0***	66,3 \pm 3,3	57,6 \pm 2,1*
Niere [mg/mm]	37,0 \pm 0,8	34,6 \pm 1,0	37,6 \pm 1,1
KG [g]	420,8 \pm 8,1***	338,3 \pm 9,2	352,3 \pm 6,2
Tibialänge [mm]	38,3 \pm 0,3	37,1 \pm 0,4	37,5 \pm 0,5

3.1.3 Genexpressionsanalysen

Zur Modellcharakterisierung und zum *Screening* potentieller Biomarker wurde die Expression verschiedener Gene mittels RT-PCR quantifiziert. Neben drucksensitiven Markern wurden auch Remodeling-Marker bestimmt. Darüber hinaus wurden grundsätzliche pathophysiologische Veränderungen in der Calcium-Homöostase und der kontraktilen Elemente auf Genexpressionsebene untersucht, da diese maßgeblich zu pathophysiologischen Prozessen wie Hypertrophie, Kontraktilitäts- bzw. Relaxationsverlust oder Remodeling beitragen können.

3.1.3.1 Linker und rechter Ventrikel

Druck-/dehnungssensitive Marker

Die relativen Genexpressionslevel der druck-/dehnungssensitiven Marker ANP und BNP entsprachen den Ergebnissen der hämodynamischen Parameter. Die relative Genexpression von ANP im rechten Ventrikel war durch die MCT Behandlung verglichen mit Kontrollniveau um den Faktor 20 erhöht (Abbildung 10 B). Im linken Ventrikel lag eine Erhöhung in der Placebogruppe gegenüber der Kontrollgruppe um den Faktor 5 vor (Abbildung 10 A). Die relative Genexpression von BNP im rechten Ventrikel war in der Placebogruppe um den Faktor 11 gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert (Abbildung 10 D). Auch im linken Ventrikel konnte eine Hochregulation von BNP beobachtet werden, die mit dem Faktor 1,9 jedoch weniger stark ausgeprägt war als im rechten Ventrikel (Abbildung 10 C). Die Therapie mit Sildenafil führte zu einer niedrigeren Expression von ANP und BNP. Im linken Ventrikel waren die Genexpressionslevel auf Kontrollniveau. Im rechten Ventrikel war die ANP Genexpression um 80 % und die BNP Genexpression um 60 % niedriger als in der Placebogruppe (Abbildung 10 B, D).

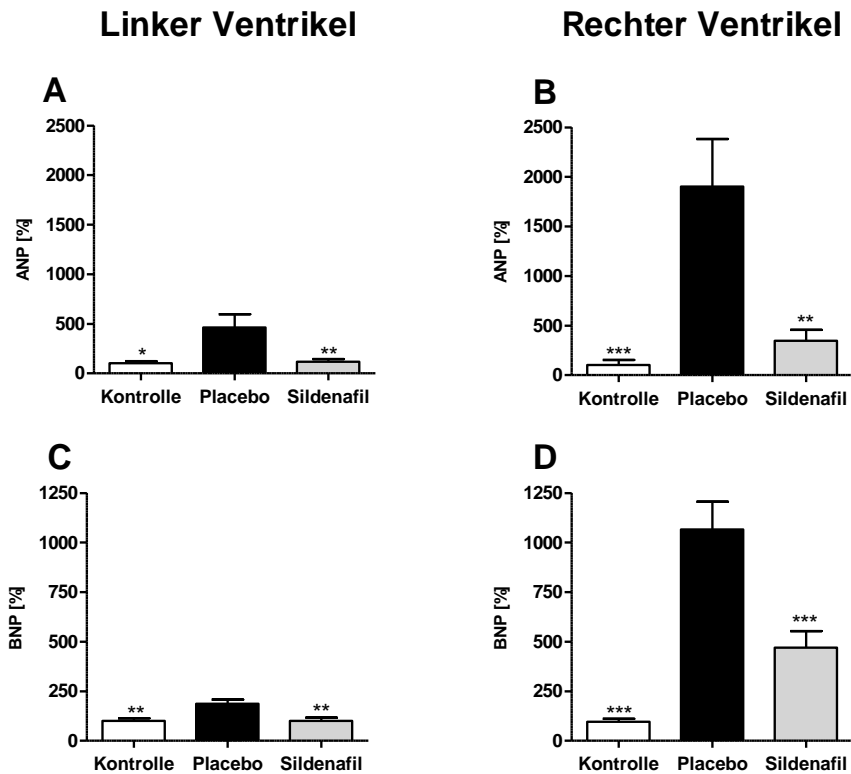


Abbildung 10: Relative Genexpressionen druck-/dehnungssensitiver Marker im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle A) ANP linker Ventrikel, B) ANP rechter Ventrikel, C) BNP linker Ventrikel, D) BNP rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Remodeling-Marker

Bei den relativen Genexpressionen der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN lagen Unterschiede zwischen linkem und rechtem Ventrikel vor. Die relative Genexpression von MMP-2 war im linken Ventrikel nicht erhöht, während im rechten Ventrikel eine geringe Erhöhung (Faktor 1,4) in der Placebogruppe gegenüber der Kontrollgruppe vorlag (Abbildung 11 B). Deutlicher waren die Unterschiede bei TIMP-1 und OPN. Die relative Genexpression von TIMP-1 war im rechten und im linken Ventrikel (Faktor 12 bzw. 4,9) in der Placebogruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 11 C, D). Unter der Therapie mit Sildenafil war die relative Genexpression von TIMP-1 in beiden Ventrikeln signifikant niedriger als in der Placebogruppe (Abbildung 11 C, D). Die relative Genexpression von OPN war in der Placebogruppe im linken und rechten Ventrikel signifikant höher als in den entsprechenden Kontrollen (Faktor 7,8 bzw. 28) (Abbildung 11 E, F). Auch die Genexpression von OPN war im MCT-Modell unter der Therapie mit Sildenafil signifikant niedriger. Im linken Ventrikel lagen die Genexpressionen unter Therapie mit Sildenafil um 82 % und im rechten Ventrikel um 78 % niedriger als in der Placebogruppe (Abbildung 11 E, F). Die relative Genexpression von COL1A2 und COL3A1 (Anhang 1) war im rechten Ventrikel in der Placebogruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant höher. Die Therapie mit Sildenafil führte im rechten Ventrikel zu einer niedrigeren Genexpression von

COL1A2 und COL3A1 im Vergleich zur Placebogruppe. Die Unterschiede der Genexpressionslevel dieser Marker im linken Ventrikel waren marginal (Anhang 1).

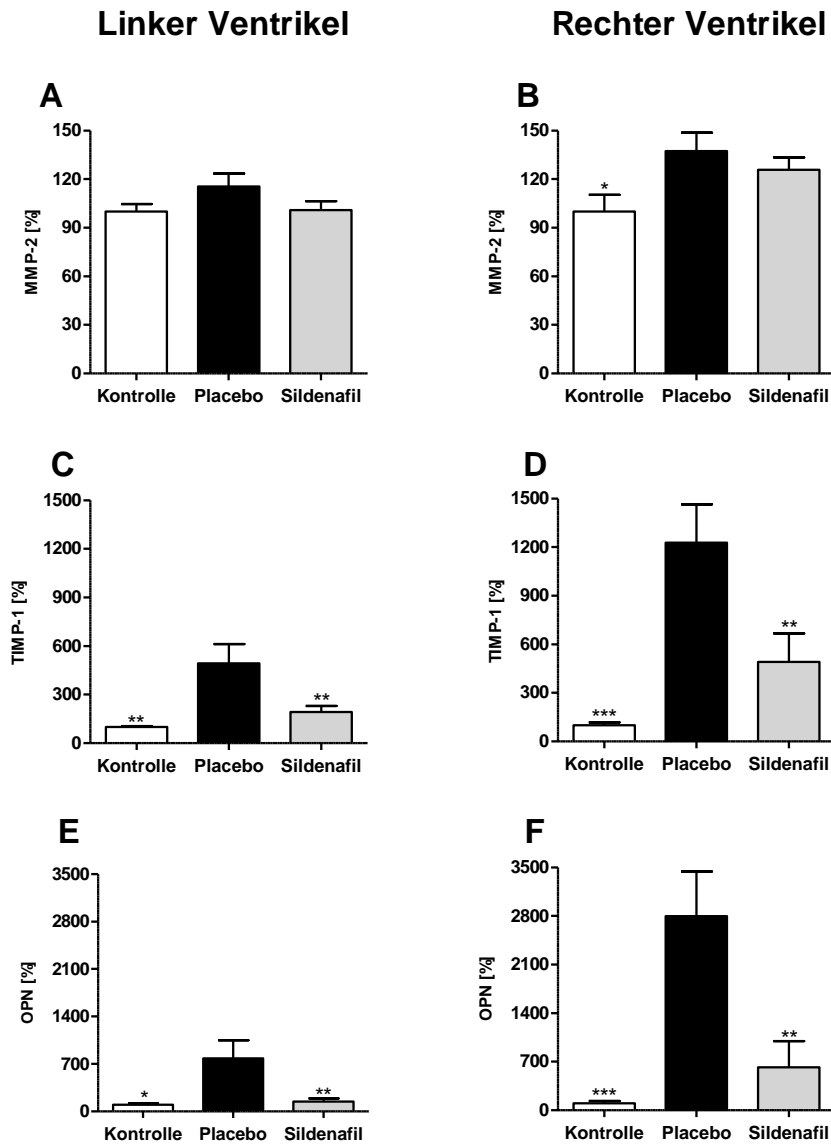


Abbildung 11: Relative Genexpressionen von Remodeling-Marker im rechten und linken Ventrikel im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2 linker Ventrikel, B) MMP-2 rechter Ventrikel, C) TIMP-1 linker Ventrikel, D) TIMP-1 rechter Ventrikel, E) OPN linker Ventrikel, F) OPN rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Kontraktile Elemente

Der Quotient aus den kontraktiven Myosin-Elementen MYHCB und MYHCA war in der Placebogruppe im linken Ventrikel um den Faktor 44 und im rechten Ventrikel um den Faktor 61 höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 12 A, B). Die Therapie mit Sildenafil führte zu einem signifikant niedrigeren Quotienten von MYHCB und MYHCA im rechten Ventrikel.

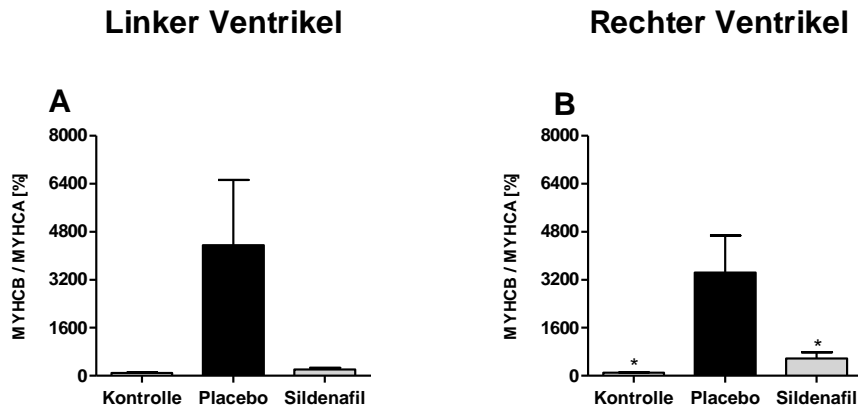


Abbildung 12: Quotient der relativen Genexpressionen von MYHCB und MYHCA im rechten und linken Ventrikel im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MYHCB/MYHCA linker Ventrikel, B) MYHCB/MYHCA rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). * $p < 0,05$ vs. Placebo.

Marker der intrazellulären Calcium-Homöostase

Die relative Genexpression des nicht-selektiven Calcium-permeablen Kationenkanals TRPC-6 war in der Placebogruppe im rechten Ventrikel um den Faktor 3,2 höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 13 B). Unter Therapie mit Sildenafil war die relative Genexpression von TRPC-6 im rechten Ventrikel signifikant niedriger als in der Placebogruppe. Im linken Ventrikel waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar (Abbildung 13 A). Die Genexpression von SERCA-2, einer intrazellulären Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, war im rechten Ventrikel im MCT-Modell in der Placebogruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abbildung 13 D). Ein ähnliches Bild zeigte sich im linken Ventrikel, wobei die Effekte schwächer ausgeprägt waren (Abbildung 13 C). Die Therapie mit Sildenafil resultierte in signifikant höheren Genexpressionen von SERCA-2 in beiden Ventrikeln. Im MCT-Modell zeigte sich, dass die Expression des Calcineurin Regulators RCN-1 in beiden Ventrikeln annähernd parallel zu TRPC-6 verlief. Die relative Genexpression von TRPC-3 und TRPC-4 war in den rechten Ventrikeln der Placebogruppe im Vergleich zu der Kontroll- und Sildenafilgruppe niedriger. Für TRPC-4 traf dies auch für den linken Ventrikel zu. Die Genexpressionsdaten von RCN-1, TRPC-3 und TRPC-4 sind in Anhang 1 zusammengefasst.

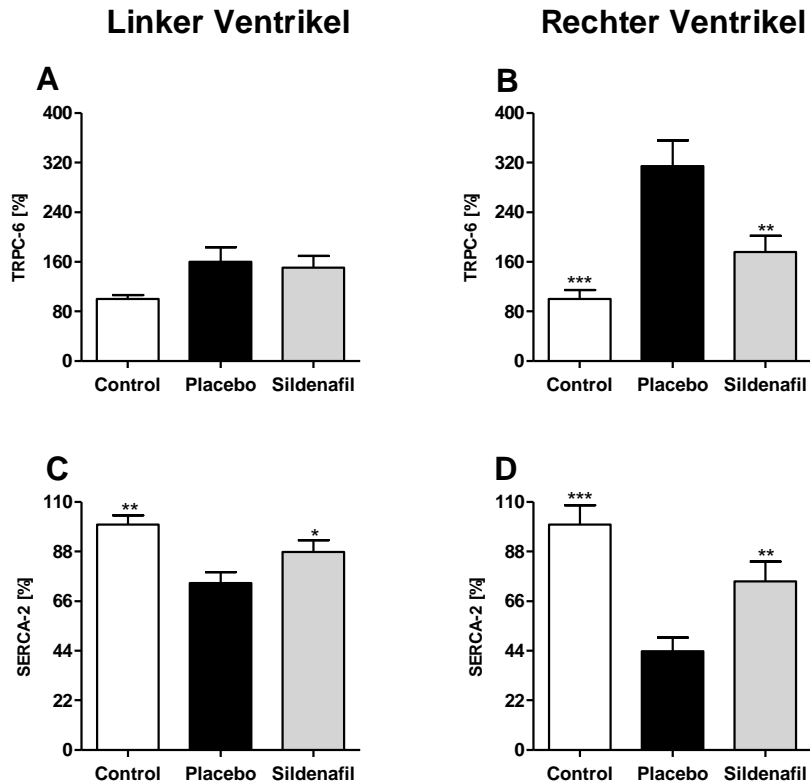


Abbildung 13: Relative Genexpression von Markern mit Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase im rechten und linken Ventrikel im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) TRPC-6 linker Ventrikel, B) TRPC-6 rechter Ventrikel, C) SERCA-2 linker Ventrikel, F) SERCA-2 rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

3.1.3.2 Lunge

Remodeling-Marker

Es lagen keine signifikanten Unterschiede der relativen Genexpression von MMP-2 zwischen den Gruppen vor (Abbildung 14 A). Die Genexpressionslevel von TIMP-1 und OPN waren in den MCT behandelten Tieren signifikant höher als in den Kontrolltieren (Faktor 2,5 bzw. 7,3). Ein Ansprechen auf die Therapie mit Sildenafil konnte hier nicht beobachtet werden (Abbildung 14 B, C). Zur weiteren Untersuchung von Remodeling Prozessen in der Lunge wurden neben den Markern MMP-2, TIMP-1 und OPN auch COL1A2 und COL3A1 bestimmt. Die relativen Genexpressionen von COL1A2 und COL3A1 waren in den mit MCT behandelten Tieren höher als in den Kontrolltieren. Ein Therapie-Effekt von Sildenafil konnte nicht nachgewiesen werden (Anhang 1).

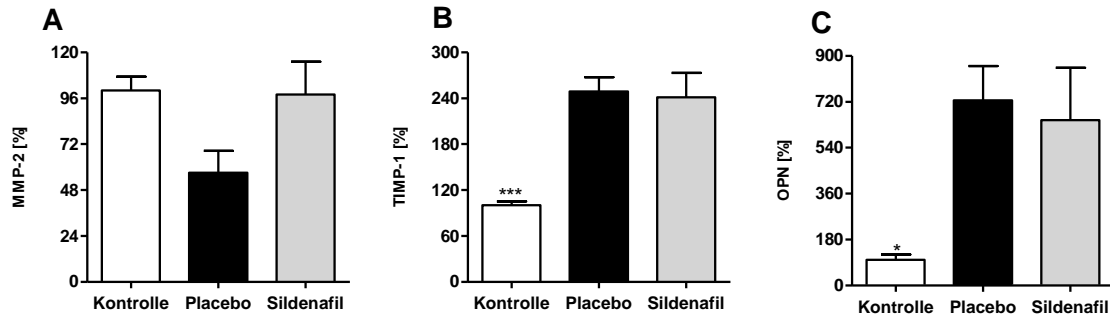


Abbildung 14: Relative Genexpressionen der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Lunge im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; ***p<0,001 vs. Placebo.

3.1.3.3 Niere

Nierenschädigungsmarker

Die Genexpressionslevel der Nierenschädigungsmarker LCN-2 und KIM-1 lagen in der Placebogruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Therapie mit Sildenafil führte zu signifikant niedrigeren Expressionen dieser Marker (Abbildung 15 A, B).

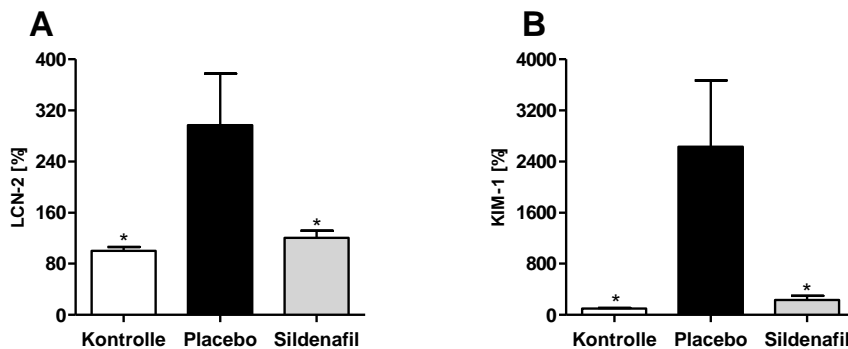


Abbildung 15: Relative Genexpressionen von Markern für Nierenschädigung im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) LCN-2, B) KIM-1. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05 vs. Placebo.

Remodeling-Marker

Die relative Genexpression von MMP-2 war in der Placebogruppe gegenüber der Kontrollgruppe leicht und unter Sildenafil-Therapie gerade signifikant erhöht (Abbildung 16 A). Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen traten bei der relativen Genexpression von TIMP-1 auf (Abbildung 16 B). OPN dagegen wies mit einem Faktor von 2,4 eine signifikant höhere relative Genexpression in der Placebogruppe als in der Kontrollgruppe auf (Abbildung 16 C). Die erniedrigte Genexpression von OPN in der Sildenafilgruppe war nicht signifikant. Die Unterschiede der Genexpressionen von COL1A2 und COL3A1 zwischen den Gruppen waren gering (Anhang 1).

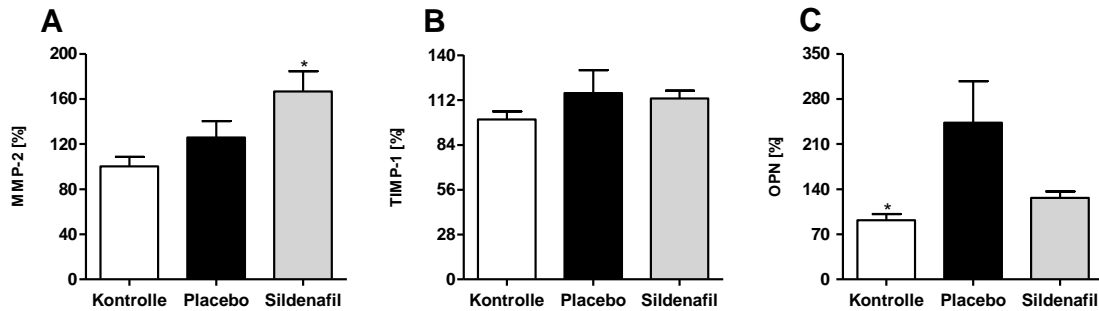


Abbildung 16: Relative Genexpressionen der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Niere im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05 vs. Placebo.

3.1.4 Echokardiographisch ermittelte Marker

Zur Darstellung pathophysiologischer Veränderungen des RVP und der rechtsventrikulären Wand wurde die PAAT/CL echokardiographisch bestimmt. An Tag 14 lagen keine signifikanten Unterschiede in der PAAT/CL zwischen den Gruppen vor (Tabelle 5; Abbildung 18 A). An Tag 28 konnte anhand der Peakform bei einigen Placebotieren eine mittelsystolische Flussverlangsamung beobachtet werden (Abbildung 17 B). In der Placebogruppe lag eine im Mittel signifikant niedrigere PAAT/CL verglichen mit der Kontrollgruppe vor. Mit dieser Methode konnte ein signifikanter Therapie-Effekt von Sildenafil dargestellt werden (Tabelle 5; Abbildung 18 B). Die Korrelationskoeffizienten der PAAT/CL und dem RVP sowie dem Quotienten RV/(LV + S) waren invers (Abbildung 18 C, D).

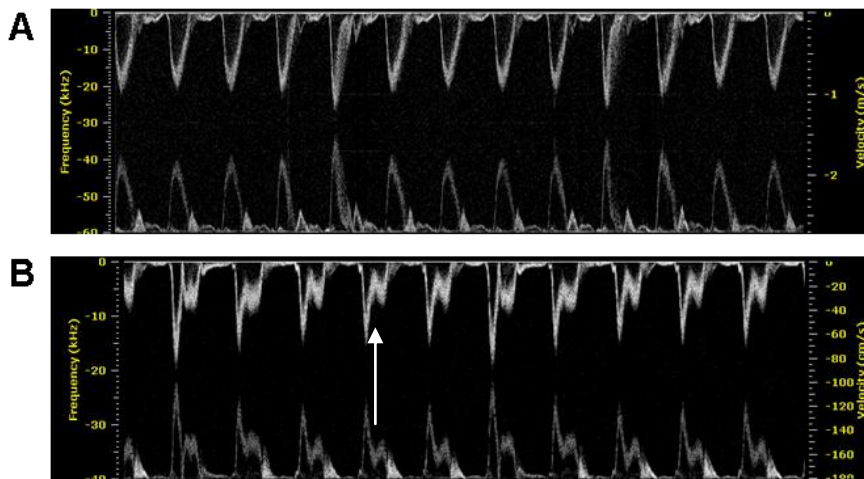


Abbildung 17: PW Doppler des pulmonalarteriellen Flusses, aufgenommen zur Bestimmung der PAAT in der modifizierten parasternalen langen Achse an Tag 28 im MCT-Modell. A) Kontrolle, B) Placebo. In einigen mit MCT behandelten Tieren konnte eine mittelsystolische Flussverlangsamung beobachtet werden (siehe Pfeil).

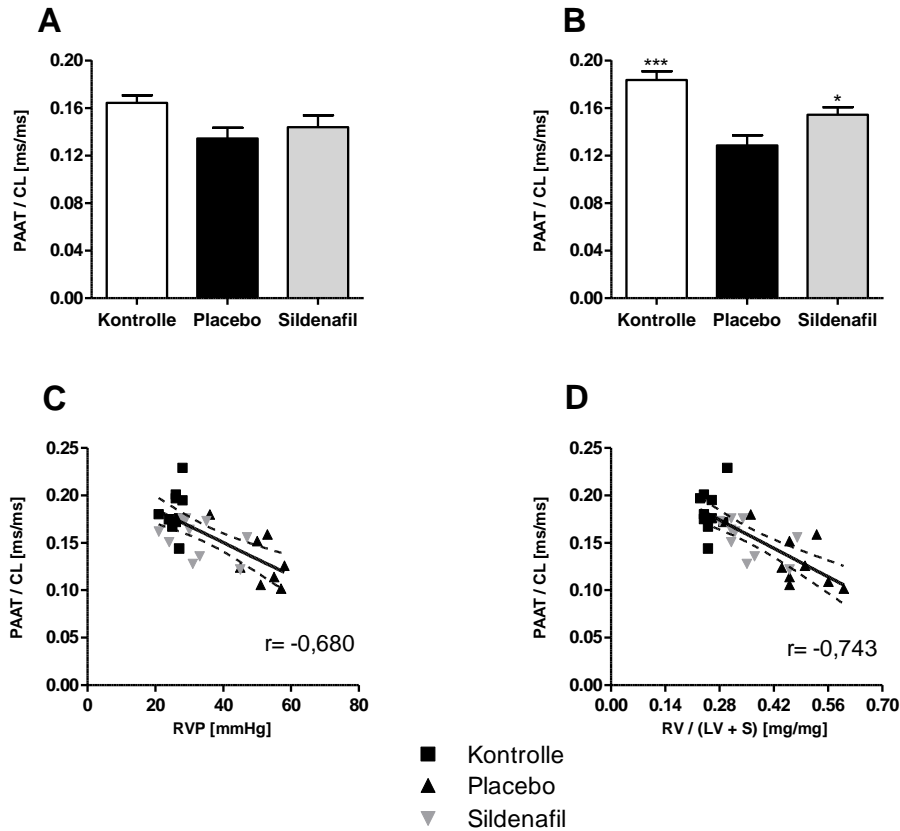


Abbildung 18: Pulmonalarterielle Akzelerationszeit korrigiert auf die Zykluslänge (PAAT/CL) von einer Systole zur Nächsten und Relation der PAAT/CL an Tag 28 mit dem RVP und RV/(LV + S) im MCT-Modell. A) PAAT/CL Tag 14 in [ms/ms], B) PAAT/CL Tag 28 in [ms/ms], C) Relation PAAT/CL und RVP an Tag 28, D) Relation PAAT/CL und RV/(LV + S) an Tag 28. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10/Gruppe). *p<0,05; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 5: Pulmonalarterielle Akzelerationszeit korrigiert auf die Zykluslänge (PAAT/CL) an Tag 14 und 28. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10/Gruppe). *p<0,05; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
PAAT/CL [ms/ms] Tag 14	0,164 \pm 0,006	0,134 \pm 0,009	0,143 \pm 0,010
PAAT/CL [ms/ms] Tag 28	0,184 \pm 0,007***	0,129 \pm 0,008	0,154 \pm 0,006*

3.1.5 Plasmamarker

Druck-/dehnungssensitive Plasmamarker

Die Messung der Plasmakonzentration von ANP und BNP ergab signifikant höhere Konzentrationen in der Placebogruppe als in der Kontrollgruppe. ANP war um den Faktor 5,1 (Tabelle 6; Abbildung 19 A), BNP um den Faktor 3,7 erhöht (Tabelle 6; Abbildung 19 C). Für beide druck-/dehnungssensitiven Marker konnte ein signifikanter Therapie-Effekt durch Sildenafil beobachtet werden. Die Plasmakonzentration von ANP war um 65 % und die Plasmakonzentration von BNP war um 55 % niedriger als in der Placebogruppe. Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation zwischen der ANP- und BNP-Plasmakonzentration und dem RVP ermittelt (Abbildung 19 B, D).

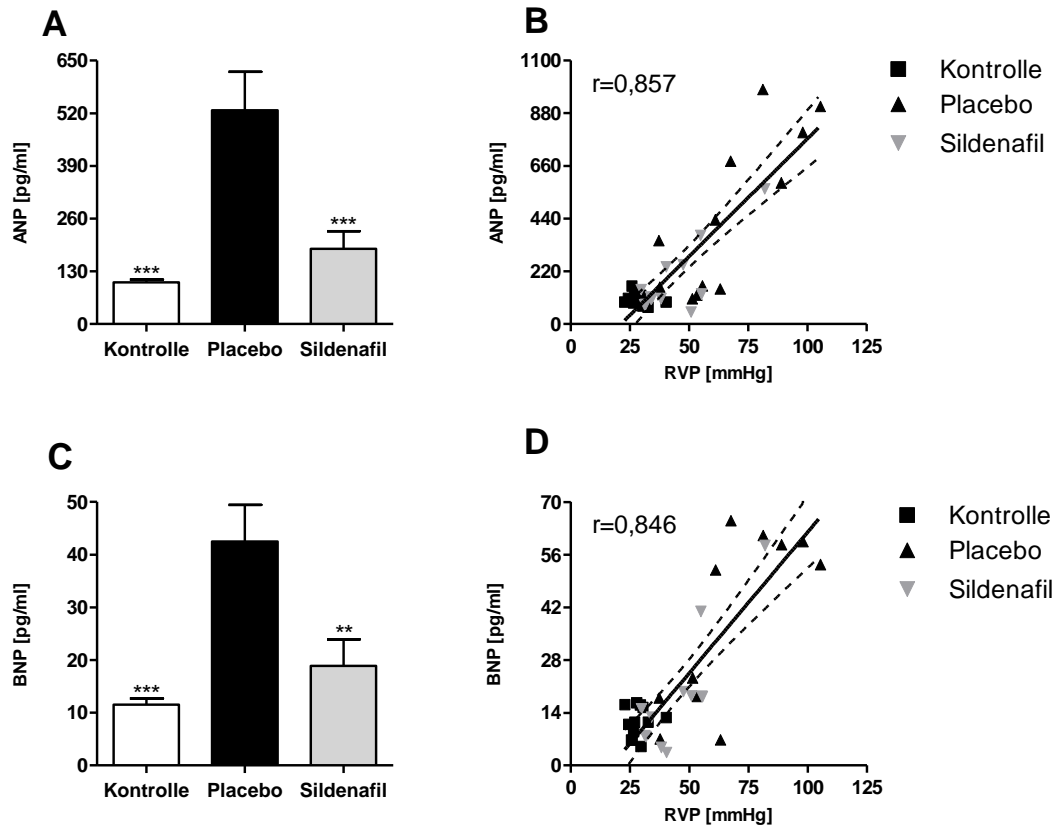


Abbildung 19: Plasmakonzentrationen von druck-/dehnungssensitiven Markern und Relationen entsprechender Marker mit dem RVP im MCT-Modell. A) ANP, B) Relation von ANP und RVP, C) BNP, D) Relation von BNP und RVP. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Remodeling-Plasmamarker

Für die Remodeling-Marker MMP-2 und OPN konnte eine Erhöhung der Plasmakonzentration um den Faktor 1,7 und für TIMP-1 um den Faktor 1,9 in der Placebogruppe gemessen werden (Tabelle 6; Abbildung 20 A-C). Unter der Therapie mit Sildenafil wurden bei diesen Markern signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen beobachtet. Bei TIMP-1 und OPN lagen die mittleren Plasmakonzentrationen in der Gruppe mit Sildenafil-Therapie auf Kontrollniveau. Die MMP-2-Plasmakonzentration war durch die Therapie mit Sildenafil signifikant niedriger.

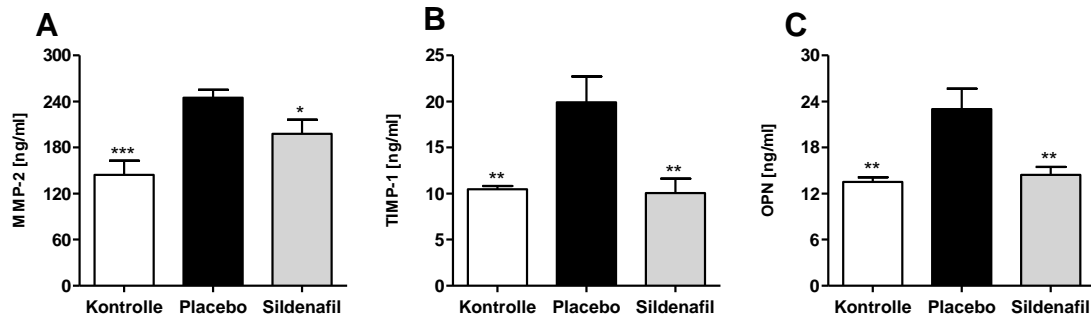


Abbildung 20: Plasmakonzentrationen von Remodeling-Markern im MCT-Modell. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 6: Plasmakonzentrationen von druck-/dehnungssensitiven Markern und von Remodeling Markern im MCT-Modell. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
ANP [pg/ml]	103,1 ± 7,2***	527,2 ± 95,4	186,0 ± 43,4***
BNP [pg/ml]	11,5 ± 1,2***	42,5 ± 6,9	18,9 ± 5,0**
MMP-2 [ng/ml]	144,7 ± 18,2***	244,9 ± 10,1	197,8 ± 18,5*
TIMP-1 [ng/ml]	10,5 ± 0,4**	19,9 ± 2,8	10,1 ± 1,5**
OPN [ng/ml]	13,5 ± 0,6**	23,0 ± 2,7	14,5 ± 1,0**

3.2 Charakterisierung des pulmonalarteriellen (PA) Banding-Modells und Analyse von potentiellen Biomarkern

Es wurde zunächst eine Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells durchgeführt sowohl zur Analyse akuter und chronischer Regulationsabläufe potentieller Biomarker als auch zur Untersuchung der Abhängigkeit zwischen Druckverhältnissen und Regulation dieser Marker (induziert durch zwei verschiedene Stenosegrade: 1,7 mm und 1,3 mm).

Die zweite PA Banding-Studie wurde mit einem Stenosedurchmesser von 1,3 mm durchgeführt. Zusätzliche Gruppen mit 1,7 mm-Banding entfielen, da in der Zeitverlauf-Studie nur geringe Veränderungen auf Expressionsebene beobachtet wurden. Es wurde mit 100 mg/kg/Tag Sildenafil über 14 Tage therapiert, beginnend an Tag 14 nach der Operation. Die Studie wies das gleiche Zeitschema auf, wie die MCT-Studie (siehe 2.6.3 und 3.1).

In beiden Studien wurde die pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit (PAF) echokardiographisch ermittelt und hämodynamische Parameter bestimmt mit anschließender Entnahme von Blut und Gewebe. Genexpressionsanalysen wurden im rechten und linken Ventrikel, Lunge und Niere durchgeführt. Die Plasmakonzentrationen der druck-/dehnungssensitiven Marker ANP und BNP sowie der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN wurden mittels RIA oder ELISA ermittelt.

3.2.1 Hämodynamik

In beiden Bandinggruppen der Zeitverlauf-Studie zeigten sich vom ersten Messzeitpunkt der Studie an Tag 7 bis zum letzten Messzeitpunkt an Tag 28 signifikante Erhöhungen des RVP verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 21 A; Anhang 3). Signifikant waren auch die Druckunterschiede zwischen der 1,3 mm-Bandinggruppe und der 1,7 mm-Bandinggruppe über den gesamten Versuchsverlauf. Eine Erhöhung des RVP erfolgte demzufolge in Abhängigkeit vom Grad der Stenose, jedoch weitgehend unabhängig von der Zeit. Einzige Ausnahme bildete die signifikante Erhöhung des RVP von $60,2 \pm 3,3$ mmHg an Tag 7 auf $77,4 \pm 5,4$ mmHg an Tag 14 in der 1,3 mm-Bandinggruppe. Übereinstimmend lag auch in der zweiten PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie ein erhöhter RVP in den Placebotieren im Vergleich zu den Kontrolltieren vor. Die Therapie mit Sildenafil zeigte keinen Effekt auf den RVP (Tabelle 7; Abbildung 22 A).

In der Zeitverlauf-Studie lag an allen Tagen ein Trend zu erhöhten RVEDP-Werten in der 1,3 mm-Bandinggruppe vor, der jedoch nur an den Tagen 14 und 21 signifikant war, verglichen mit den beiden anderen Versuchsgruppen (Abbildung 21 B; Anhang 3). In der zweiten PA Banding-Studie lag ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Placebogruppe vor. Die Therapie mit Sildenafil führte zu keiner Veränderung des RVEDPs gegenüber der Placebogruppe (Tabelle 7; Abbildung 22 B).

Es konnte eine signifikante Erhöhung des dP/dt max und gegenläufig dazu eine Erniedrigung des dP/dt min über die gesamte Dauer der Zeitverlauf-Studie in der 1,3 mm-Bandinggruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen beobachtet werden (Anhang 3; Abbildung 21 C, D). In weniger ausgeprägter Form konnte dies auch für die 1,7 mm-Bandinggruppe gezeigt werden, wenn auch nicht zu allen Messzeitpunkten eine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe erreicht wurde. In der zweiten PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie konnten signifikante Unterschiede des dP/dt max und des dP/dt min zwischen der Kontroll- und Placebogruppe gemessen werden (Tabelle 7; Abbildung 22 C, D). Für den dP/dt max und dP/dt min konnte kein Therapie-Effekt durch Sildenafil abgebildet werden.

Der systolische und diastolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz waren in allen Gruppen unverändert stabil (Tabelle 7).

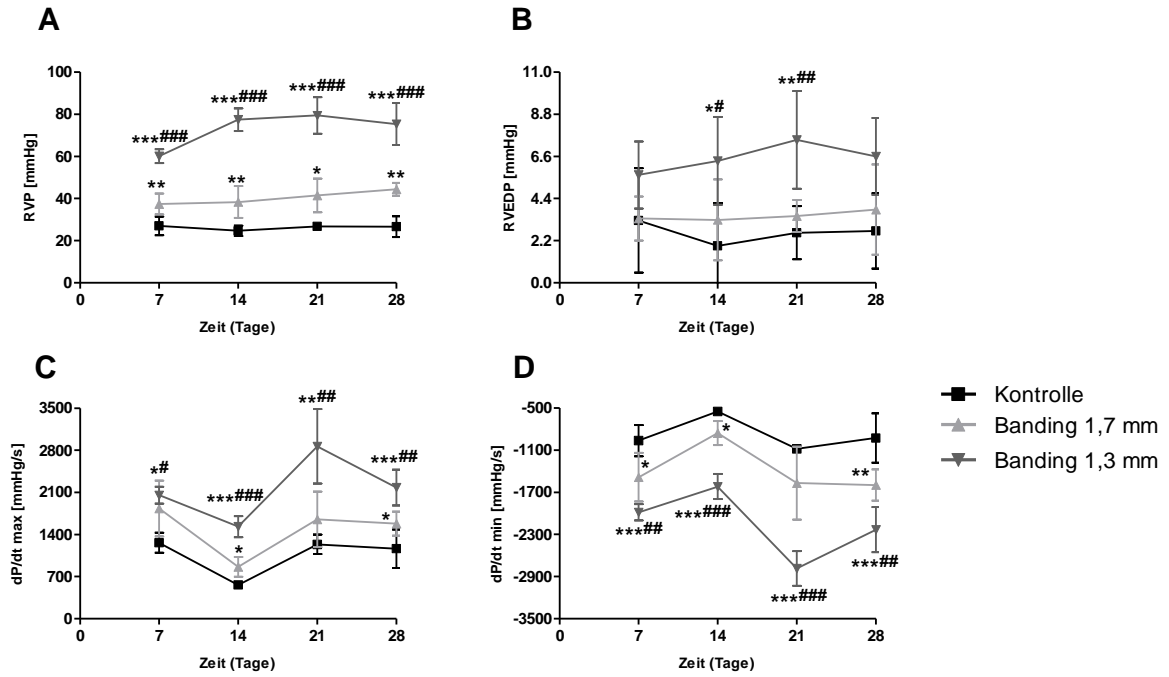


Abbildung 21: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Hämodynamik Parameter im rechten Ventrikel. A) RVP, B) RVEDP, C) dP/dt max, D) dP/dt min. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

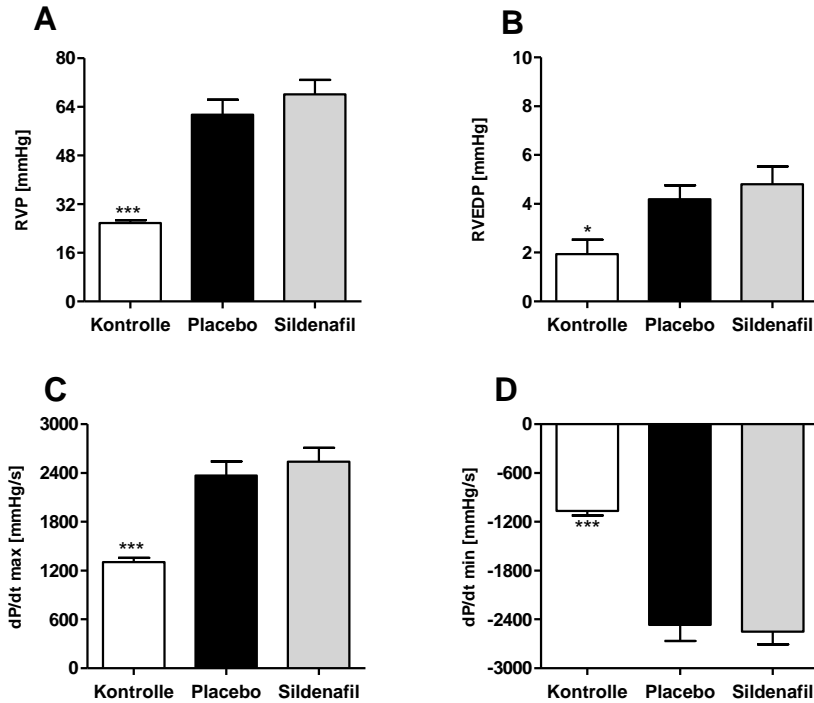


Abbildung 22: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Hämodynamik Parameter im rechten Ventrikel. A) RVP, B) RVEDP, C) dP/dt max, D) dP/dt min. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 7: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Hämodynamik Parameter. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
RVP [mmHg]	25,9 \pm 0,9***	64,2 \pm 4,5	68,1 \pm 4,8
RVEDP [mmHg]	1,9 \pm 0,6*	4,2 \pm 0,6	4,8 \pm 0,7
dP/dt max [mmHg/s]	1307 \pm 48***	2460 \pm 165	2541 \pm 169
dP/dt min [mmHg/s]	-1065 \pm 55***	-2556 \pm 192	-2548 \pm 157
BPsys [mmHg]	117,0 \pm 8,3	109,6 \pm 8,9	106,6 \pm 8,1
BPdia [mmHg]	90,1 \pm 5,9	84,9 \pm 7,1	81,0 \pm 6,4
Herzfrequenz [BPM]	340 \pm 7	338 \pm 14	333 \pm 9

3.2.2 Endorgangewichte

Für den Quotient RV/(LV + S), als Maß für rechtsventrikuläre Hypertrophie, lagen signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen an Tag 7 vor, die bis zum Tag 28 in den beiden Bandinggruppen noch anstiegen (Abbildung 23 A; Anhang 4). Dies ergab sich fast ausschließlich aus einer Gewichtszunahme der rechtsventrikulären Wand (Abbildung 23 F). Eine Progredienz der rechtsventrikulären Hypertrophie im Zeitverlauf konnte nur für die 1,3 mm-Bandinggruppe beobachtet werden. Analog zu den Daten der 1,3 mm-Bandinggruppe wurde auch in der zweiten PA Banding-Studie ein signifikanter Anstieg des Quotienten RV/(LV + S) im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen (Tabelle 8; Abbildung 24 A). Zwischen der Placebo- und Sildenafilgruppe lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

In der 1,3 mm-Bandinggruppe der Zeitverlauf-Studie wurde eine progrediente Gewichtszunahme für das rechte Atriumgewicht gemessen, das sich in dieser Gruppe darüber hinaus zu allen Messzeitpunkten als signifikant gegenüber den beiden anderen Gruppen zeigte (Abbildung 23 D; Anhang 4). Keine Gewichtszunahme konnte hingegen für das linke Atrium beobachtet werden (Abbildung 23 C; Anhang 4). Diese Ergebnisse der 1,3 mm-Bandinggruppe von Tag 28 waren übereinstimmend mit den Ergebnissen der zweiten PA Banding-Studie (Tabelle 8). Ein Therapie-Effekt von Sildenafil auf die Gewichtszunahme des rechten Atriums in Tieren mit PA Banding konnte nicht beobachtet werden.

Weder in der Zeitverlauf-Studie (Anhang 4; Abbildung 23 B) noch in der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie (Tabelle 8; Abbildung 24 B) waren Unterschiede der Lungengewichte zwischen den Gruppen messbar.

In keiner der beiden Banding-Studien wurden signifikante Unterschiede im Nierengewicht, Körpergewicht und der Tibialänge zwischen den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet (Tabelle 8; Anhang 4).

Ergebnisse

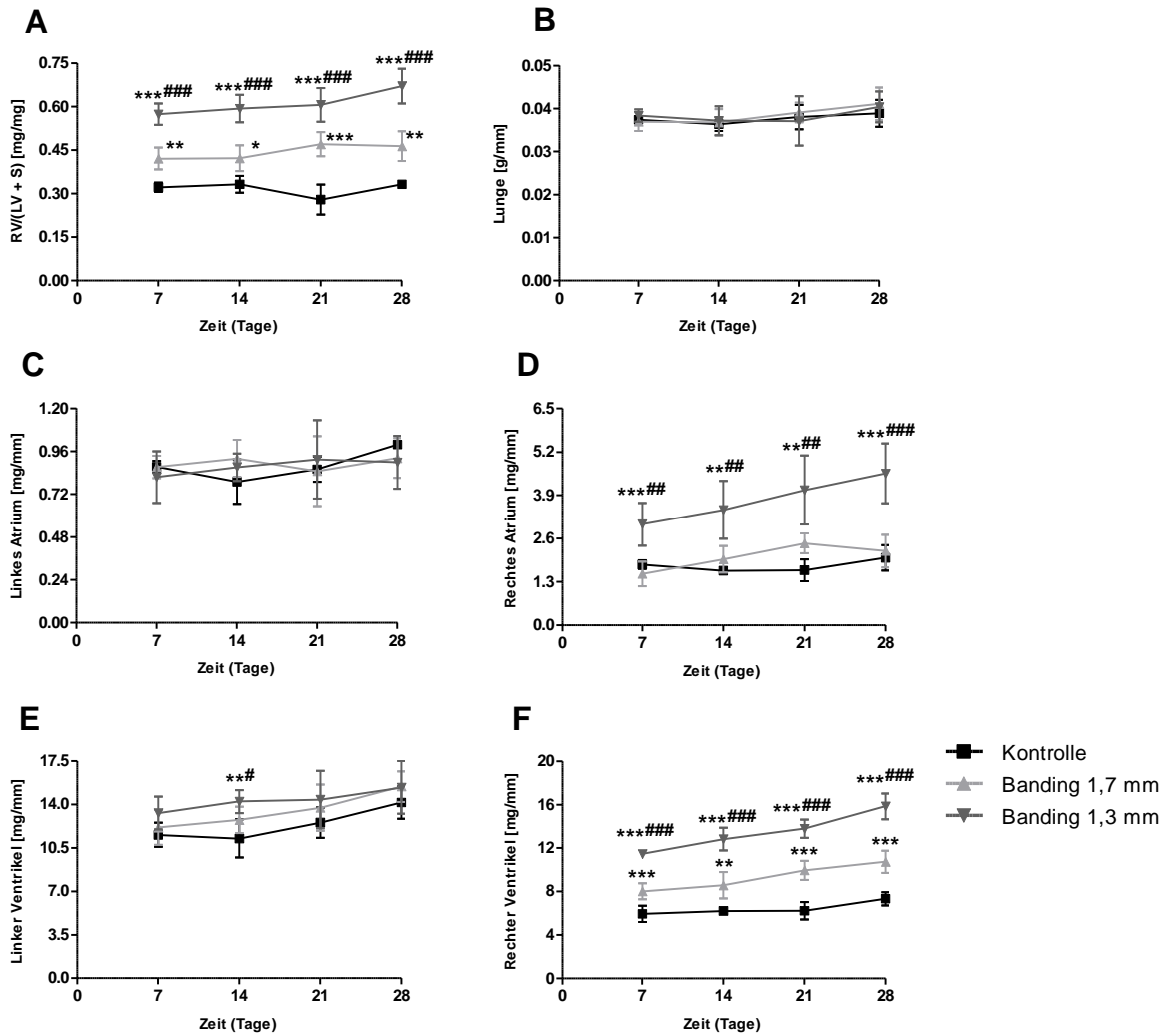


Abbildung 23: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Endorgangewichte normiert auf die Tibiallänge. A) Gewicht des gesamten Herzens ohne Atria, B) RV/(LV + S), C) Gewicht linkes Atrium, D) Gewicht rechtes Atrium, E) Gewicht linker Ventrikel, F) Gewicht rechter Ventrikel, G) Lungengewicht. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

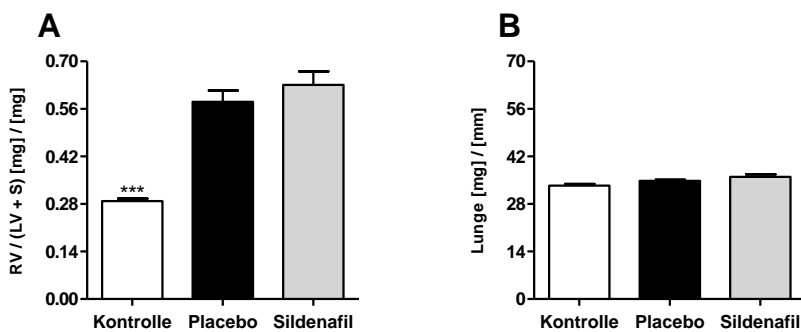


Abbildung 24: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Endorgangewichte. A) RV/(LV + S), B) Lungengewicht normiert auf die Tibiallänge. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 8: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: KG, Tibialänge und Organgewichte normiert auf die Tibialänge und Quotient RV/(LV + S). Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=10-12). ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
RV/(LV + S) [mg/mg]	0,29 ± 0,01***	0,58 ± 0,03	0,63 ± 0,04
Herz [mg/mm]	25,8 ± 0,6***	32,1 ± 0,9	33,5 ± 1,0
Rechter Ventrikel [mg/mm]	5,6 ± 0,1***	11,6 ± 0,6	12,6 ± 0,7
Linker Ventrikel [mg/mm]	12,5 ± 0,4	13,3 ± 0,4	13,0 ± 0,6
Rechtes Atrium [mg/mm]	1,3 ± 0,1***	3,0 ± 0,2	3,2 ± 0,3
Linkes Atrium [mg/mm]	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,09	0,9 ± 0,1
Lunge [mg/mm]	33,4 ± 0,5	34,8 ± 0,4	36,0 ± 0,7
Niere [mg/mm]	33,7 ± 1,6	31,6 ± 0,9	31,9 ± 0,9
KG [g]	349,8 ± 6,6	352,8 ± 5,6	350,4 ± 7,8
Tibialänge [mm]	37,0 ± 0,2	37,1 ± 0,2	37,1 ± 0,2

3.2.3 Genexpressionsanalysen

3.2.3.1 Linker und rechter Ventrikel

Druck-/dehnungssensitive Marker

Eine signifikante Hochregulation der Genexpression von ANP und BNP im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen konnte in der 1,3 mm-Bandinggruppe der Zeitverlauf-Studie zu allen Messzeitpunkten im rechten Ventrikel beobachtet werden (Abbildung 25 B, D). In abgeschwächter Weise trat auch im linken Ventrikel eine Erhöhung dieser Marker in der 1,3 mm-Bandinggruppe auf (Abbildung 25 A, C). Keine signifikanten Veränderungen der Genexpressionslevel, bezogen auf die Kontrollgruppe, konnten in der 1,7 mm-Bandinggruppe gezeigt werden. Auch in der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie waren die relativen Genexpressionen von ANP (Faktor 20) und BNP (Faktor 7) vor allem im rechten Ventrikel in der Placebogruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe höher (Abbildung 26 B, D). Im linken Ventrikel präsentierte sich die Genexpression von ANP und BNP ähnlich wie im rechten Ventrikel, jedoch mit einem Faktor von 3 für ANP und einem Faktor von 1,7 für BNP gegenüber der Kontrollgruppe weniger stark ausgeprägt (Abbildung 26 A, C). Die Therapie mit Sildenafil führte zu keiner Senkung der relativen Genexpression von ANP und BNP.

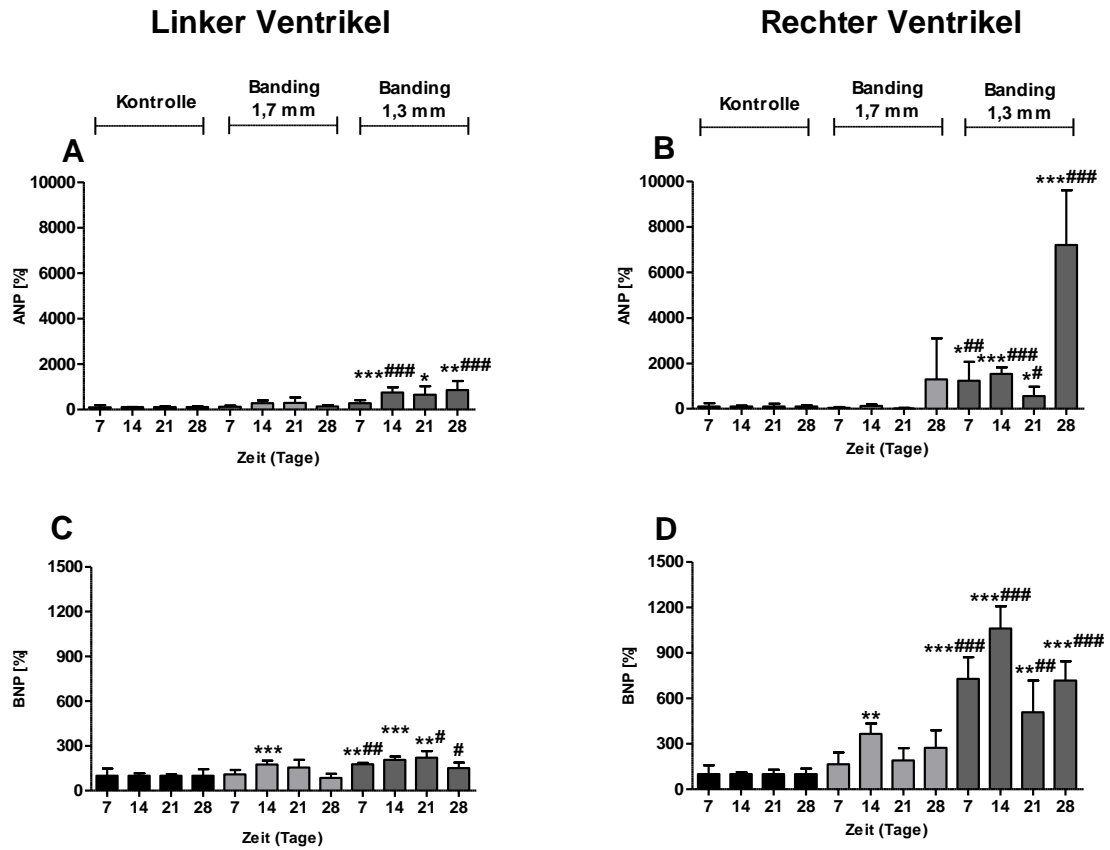


Abbildung 25: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Relative Genexpression von druck-/dehnungs-sensitiven Markern dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) ANP linker Ventrikel, B) ANP rechter Ventrikel, C) BNP linker Ventrikel, D) BNP rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Banding vs. Kontrolle, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

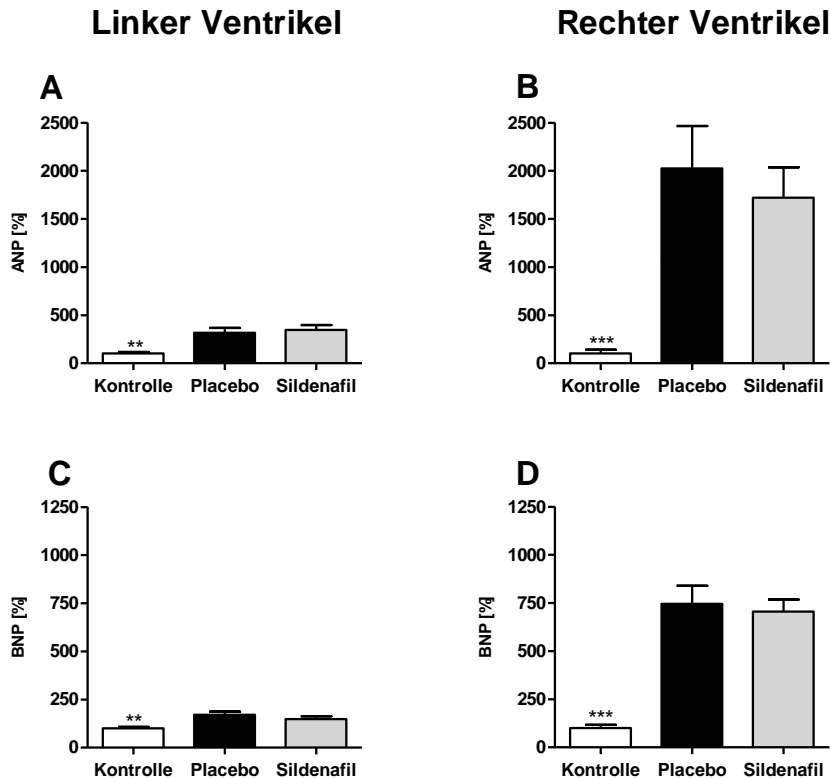


Abbildung 26: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpressionen druck-/dehnungssensitiver Marker, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle A) ANP linker Ventrikel, B) ANP rechter Ventrikel, C) BNP linker Ventrikel, D) BNP rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Remodeling-Marker

Für die Gene COL1A2, COL3A1, MMP-2, TIMP-1 und OPN ließen sich im rechten Ventrikel vergleichbare Expressionsmuster beobachten. Während zwischen der 1,7 mm-Bandinggruppe und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden, waren diese Gene in der 1,3 mm-Bandinggruppe im rechten Ventrikel, speziell in der frühen Versuchsphase, signifikant hochreguliert (Abbildung 27 B, D, F; Anhang 7). An Tag 7 war in der 1,3 mm-Bandinggruppe im rechten Ventrikel die relative Genexpression von COL1A2 um den Faktor 5,5, von COL3A1 um den Faktor 6,7, von MMP-2 um den Faktor 2,6, von TIMP-1 um den Faktor 5,7 und von OPN um den Faktor 60 verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe erhöht. Zu den späteren Messzeitpunkten konnten ebenfalls signifikant erhöhte Genexpressionslevel der ausgewählten Remodeling-Marker gemessen werden, die jedoch nicht die maximalen Expressionen von Tag 7 erreichten. Dies bestätigte sich auch in der zweiten PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie. Hier war die Genexpression in der Placebogruppe im rechten Ventrikel für TIMP-1 (Faktor 3,5), OPN (Faktor 10), COL1A2 (Faktor 1,9) und COL3A1 (Faktor 2,2) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Anhang 2; Abbildung 28 D, F). MMP-2 zeigte in dieser Studie keine signifikanten Effekte auf Genexpressionsebene (Abbildung 28 A, B). Die Therapie mit Sildenafil bewirkte bei keinem der Marker eine Veränderung gegenüber der Placebogruppe. Die Genexpressionsanalyse

des linken Ventrikels zeigte in beiden PA Banding-Studien nur wenige bzw. im Falle der zweiten PA Banding-Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 27 A, C, E; Abbildung 28 A, C, E; Anhang 2; Anhang 6).

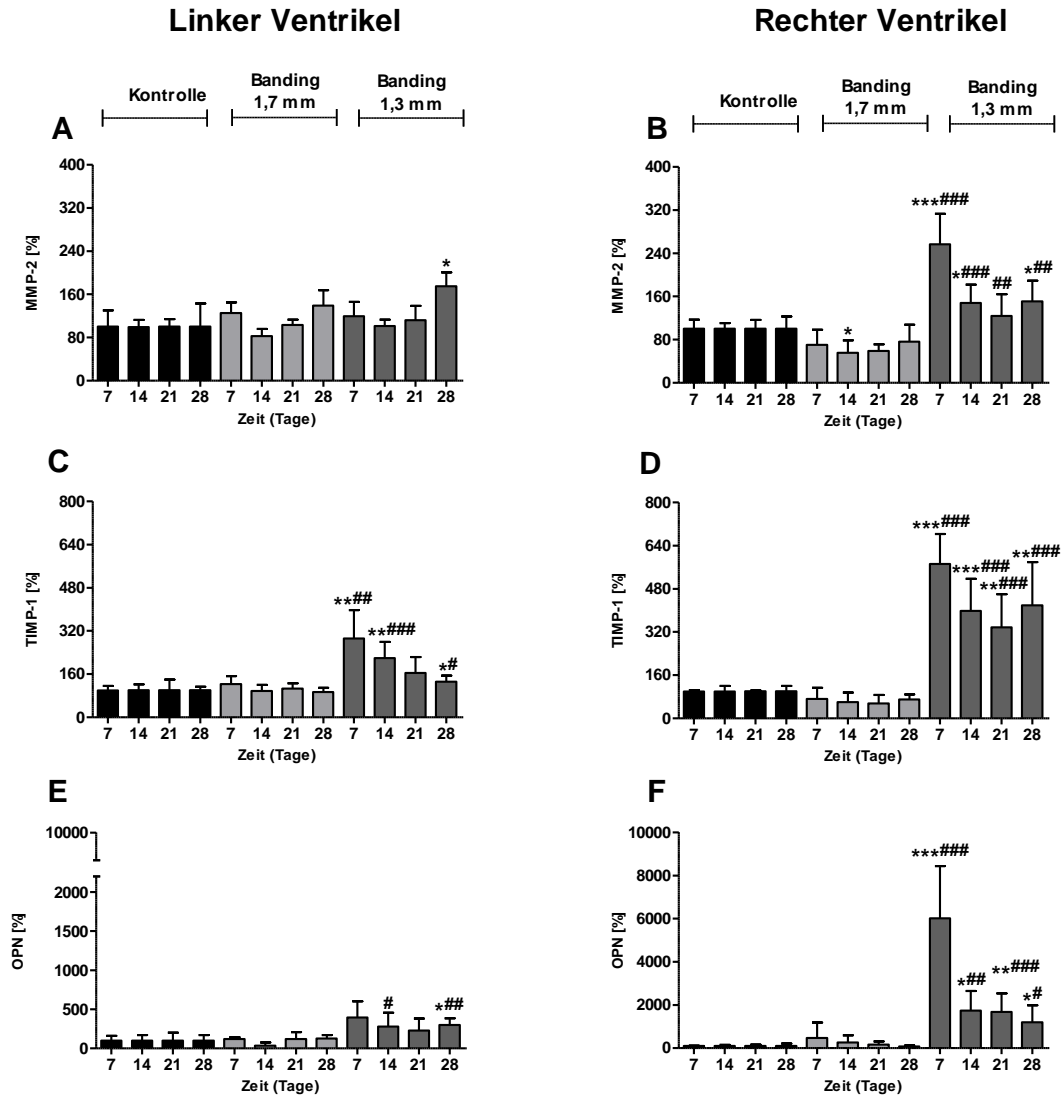


Abbildung 27: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Relative Genexpression von Remodeling-Markern dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) MMP-2 linker Ventrikel, B) MMP-2 rechter Ventrikel, C) TIMP-1 linker Ventrikel, D) TIMP-1 rechter Ventrikel, E) OPN linker Ventrikel, F) OPN rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

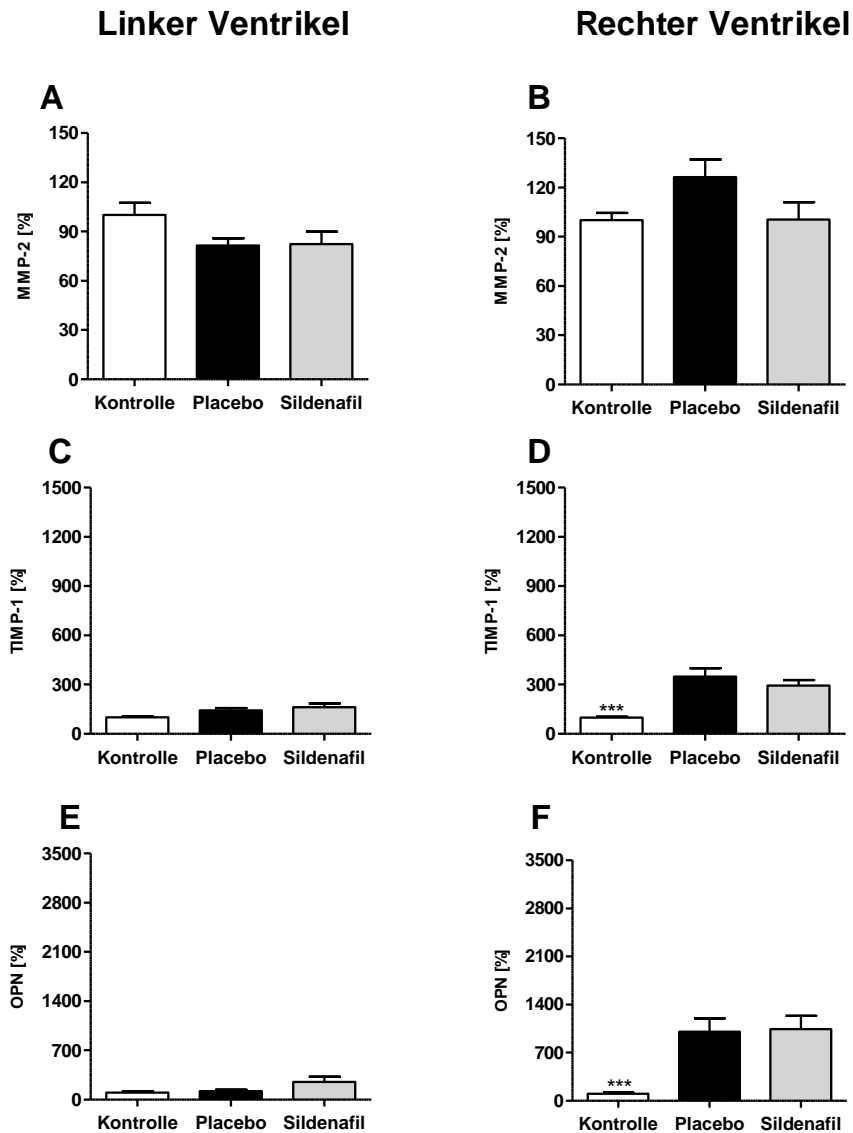


Abbildung 28: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpressionen von Remodeling-Marker im rechten und linken Ventrikel, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2 linker Ventrikel, B) MMP-2 rechter Ventrikel, C) TIMP-1 linker Ventrikel, D) TIMP-1 rechter Ventrikel, E) OPN linker Ventrikel, F) OPN rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). ***p<0,001 vs. Placebo.

Kontraktile Elemente

Für den Quotienten aus den kontraktiven Myosin-Elementen MYHCB und MYHCA wurde im rechten Ventrikel in der 1,3 mm-Bandinggruppe an Tag 7 eine Erhöhung um den Faktor 23 gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet, was sich bis zum Tag 28 auf den Faktor 10 abschwächte (Abbildung 29 B). Im linken Ventrikel lag der Quotient in der 1,3 mm-Bandinggruppe an Tag 7 um den Faktor 2,5 höher als in der Kontrollgruppe und verstärkte sich bis Tag 28 auf den Faktor 6,1 (Abbildung 29 A). In beiden Ventrikeln wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der 1,7 mm-Banding- und der Kontrollgruppe beobachtet. In der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster, wie in

der 1,3 mm-Bandinggruppe an Tag 28 (Abbildung 30 A, B). Die Therapie mit Sildenafil führte zu keiner Veränderungen des MYHCB/MYHCA Verhältnisses gegenüber der Placebogruppe.

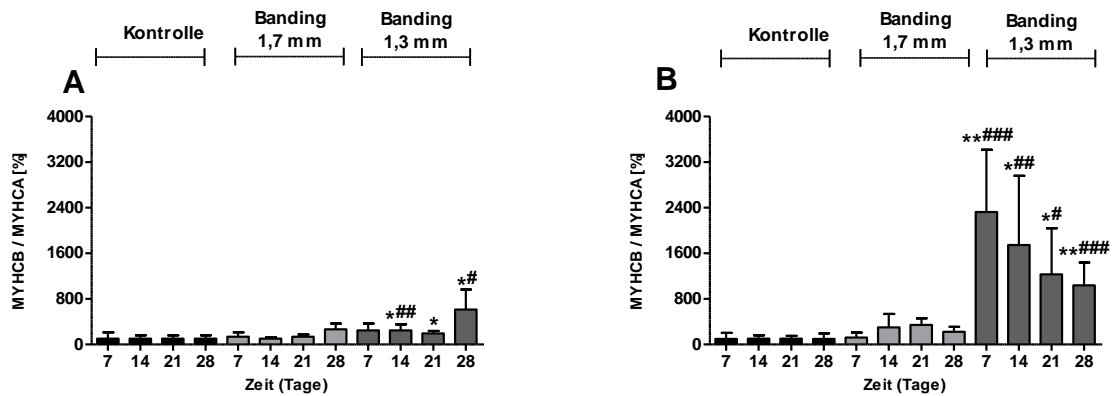


Abbildung 29: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Quotient der relativen Genexpressionen von MYHCB und MYHCA dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) MYHCB/MYHCA linker Ventrikel, B) MYHCB/MYHCA rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

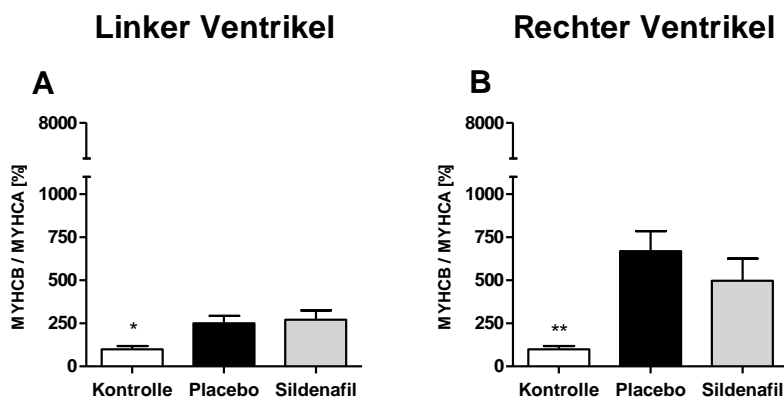


Abbildung 30: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Quotient der relativen Genexpressionen von MYHCB und MYHCA im rechten und linken Ventrikel, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MYHCB/MYHCA linker Ventrikel, B) MYHCB/MYHCA rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; **p<0,01 vs. Placebo.

Marker der intrazellulären Calcium-Homöostase

In der Zeitverlauf-Studie lag zu allen Messzeitpunkten eine signifikante Hochregulation von TRPC-6 im rechten Ventrikel in der 1,3 mm-Bandinggruppe im Vergleich zu der 1,7 mm-Bandinggruppe und der Kontrollgruppe vor (Abbildung 31 B). Dies konnte in der zweiten PA Banding-Studie bestätigt werden, wobei hier zusätzlich eine Herunterregulation der Genexpression unter Sildenafil-Therapie beobachtet werden konnte (Abbildung 32 B). Im linken Ventrikel der Zeitverlauf-Studie lagen keine Unterschiede der Genexpression von TRPC-6 zwischen den Gruppen vor (Abbildung 31 A), während in der zweiten PA Banding-Studie die Genexpression von TRPC-6 in den Tieren mit Banding signifikant niedriger war als in den Kontrolltieren (Abbildung 32 A). Die Genexpression von SERCA-2 war in der

1,3 mm-Bandinggruppe der Zeitverlauf-Studie im rechten Ventrikel zu allen Messzeitpunkten herunterreguliert, verglichen mit den anderen beiden Versuchsgruppe (Abbildung 31 D). Im Gegensatz dazu konnte eine Hochregulation des Genes in der 1,7 mm-Bandinggruppe an Tag 28 gemessen werden. Mit Ausnahme leicht erhöhter Genexpressionslevel von SERCA-2 in der 1,7 mm-Bandinggruppe an den Tagen 7 und 21, konnten im linken Ventrikel keine gruppenspezifischen Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 31 C). Die Genexpression von SERCA-2 im rechten Ventrikel war auch in der zweiten Studie in Tieren mit PA Banding signifikant niedriger, ohne dass hier ein Therapie-Effekt zu beobachten war (Abbildung 32 D). Im linken Ventrikel zeigte sich ein ähnliches Bild wie im rechten Ventrikel, wobei die Effekte schwächer ausgeprägt waren (Abbildung 32 C). In beiden PA Banding Studien verlief die Expression des Calcineurin Regulators RCN-1 annähernd parallel zu TRPC-6. Für TRPC-3 und TRPC-4 konnte keine eindeutige Regulation der relativen Genexpressionen gemessen werden. TRPC-3, TRPC-4 und RCN-1 sind in Anhang 2, 6 und 7 zusammengefasst.

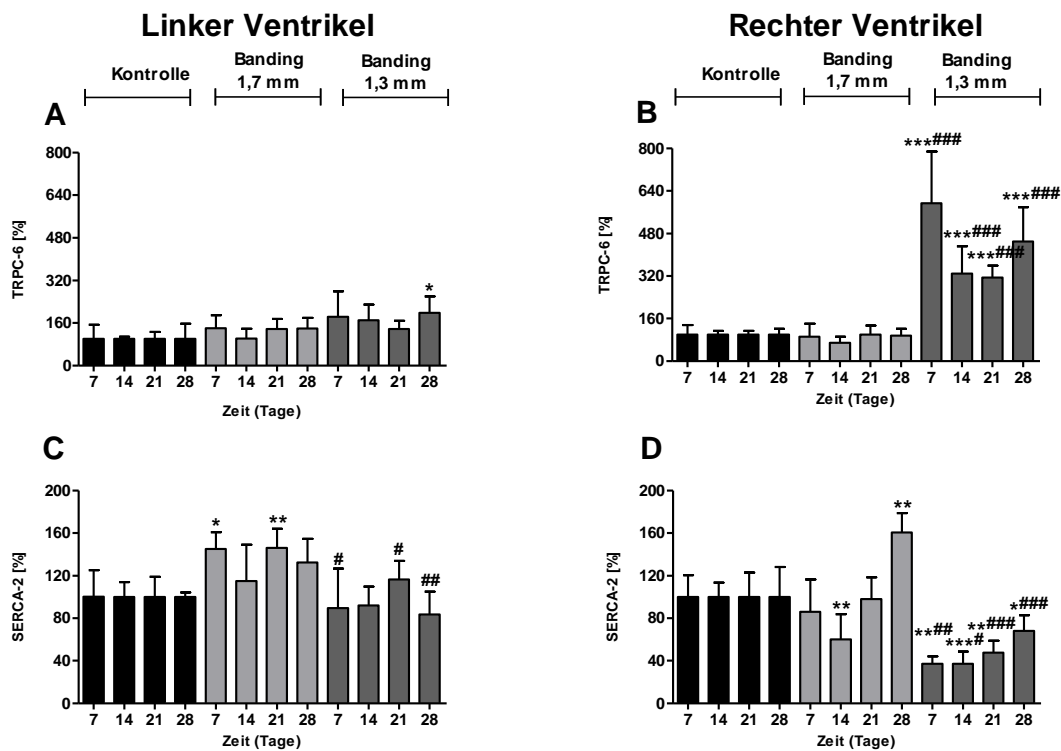


Abbildung 31: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Relative Genexpression von Markern der intrazelluläre Calcium-Homöostase dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) TRPC-6 linker Ventrikel, B) TRPC-6 rechter Ventrikel, C) SERCA-2 linker Ventrikel, D) SERCA-2 rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=5-6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

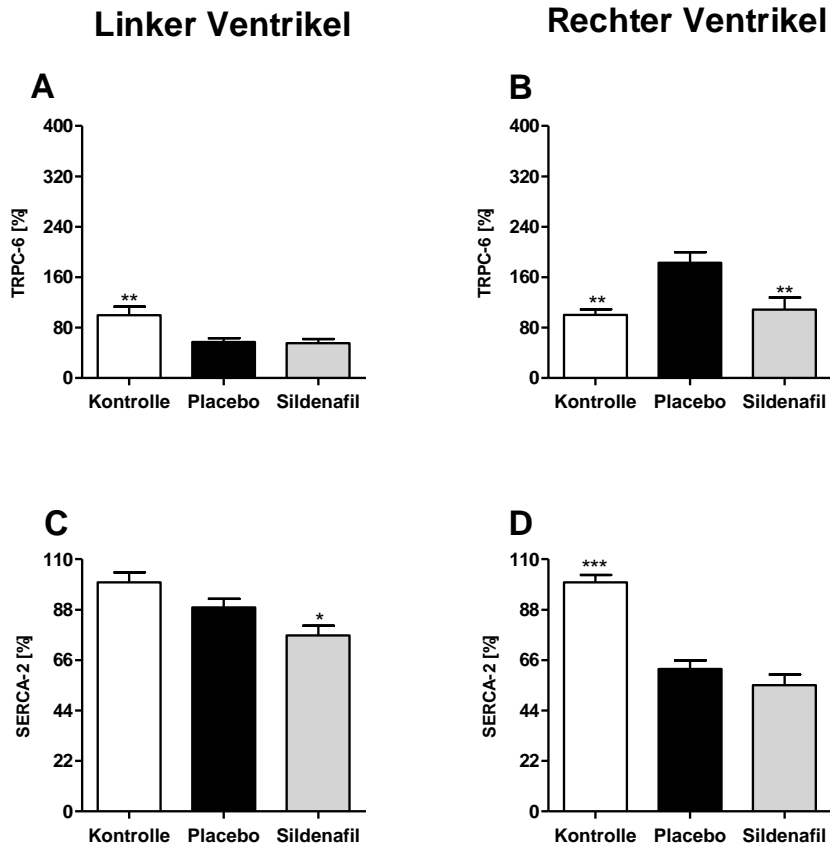


Abbildung 32: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpression von Markern mit Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase im rechten und linken Ventrikel, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. A) TRPC-6 linker Ventrikel, B) TRPC-6 rechter Ventrikel, C) SERCA-2 linker Ventrikel, D) SERCA-2 rechter Ventrikel. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

3.2.3.2 Lunge

Remodeling-Marker

Unterschiede in der relativen Genexpression zwischen den drei Versuchsgruppen der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells wurden bei den Remodeling-Marker COL1A2, COL3A1, MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Lunge nicht gemessen (Abbildung 33 A-C; Anhang 8). Auch in der zweiten PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie traten keine Unterschiede in den Genexpressionen der oben aufgeführten Remodeling-Marker zwischen der Kontroll- und Placebogruppe auf (Abbildung 34 A-C; Anhang 2). Allein die Genexpression von MMP-2 und COL3A1 war unter der Therapie mit Sildenafil signifikant niedriger als in der Placebogruppe.

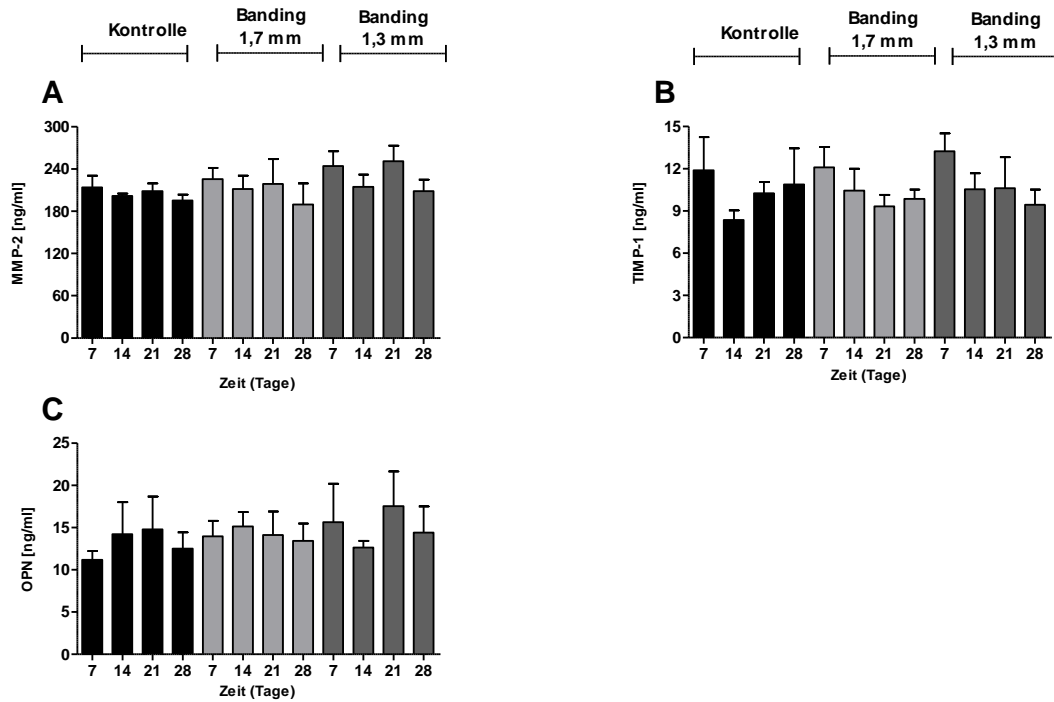


Abbildung 33: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Relative Genexpression der Remodeling-Marker A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN in der Lunge dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der Kontrollen für den jeweiligen Tag. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6).

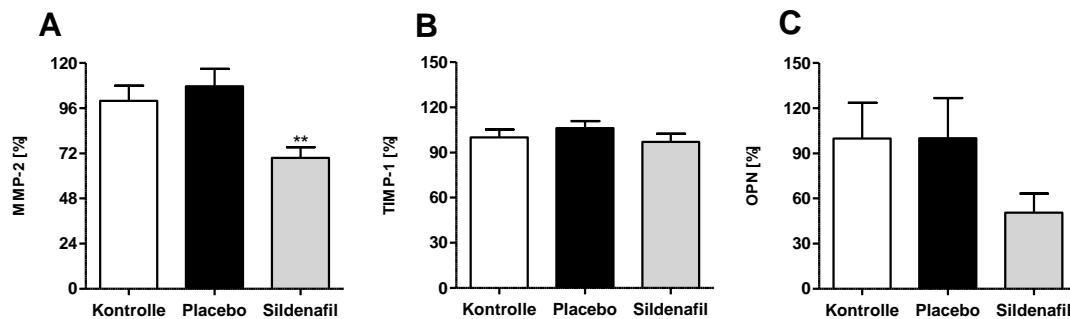


Abbildung 34: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpressionen der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Lunge, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). **p<0,01 vs. Placebo.

3.2.3.3 Niere

Nierenschädigungsmarker

Die relative Genexpression von LCN-2 war in der Placebo- und Sildenafil-Gruppe der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie signifikant niedriger als in Kontrolltieren. Die relative Genexpression von KIM-1 wies keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf (Abbildung 35 A, B).

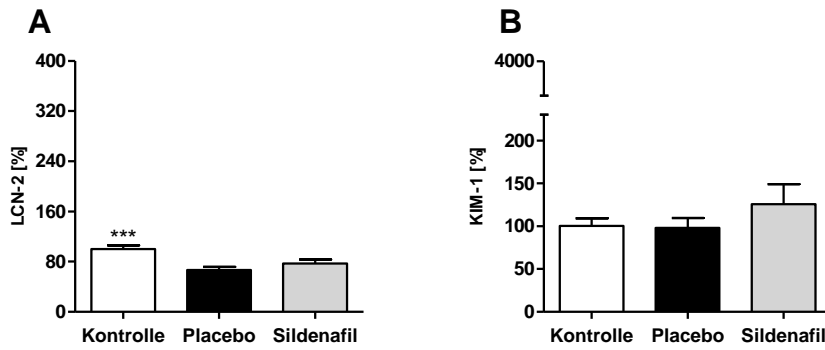


Abbildung 35: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpressionen von Markern für Nierenschädigung, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) LCN-2, B) KIM-1. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). ***p<0,001 vs. Placebo.

Remodeling-Marker

In der Niere erfolgte keine Regulation der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1, OPN, COL1A2 und COL3A1 in Folge des PA Bandings und ebenso war kein Therapie-Effekt durch Sildenafil zu beobachten (Abbildung 36 A-C; Anhang 2).

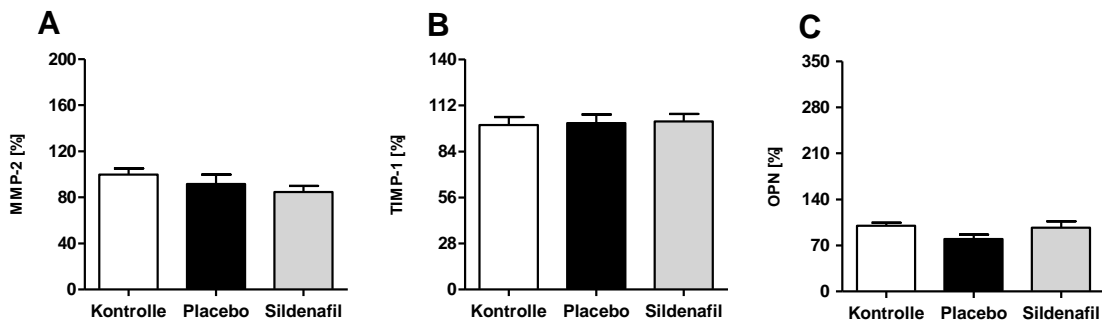


Abbildung 36: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Relative Genexpressionen der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Niere, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

3.2.4 Echokardiographisch ermittelte Marker

Die PAF wurde echokardiographisch ermittelt, um die Druckverhältnisse im Bereich der Stenose verglichen mit Kontrolltieren zu bewerten. Es ergaben sich dabei signifikante Unterschiede dieses Parameters zwischen allen Gruppen über den gesamten Studienverlauf (Abbildung 37 A-C; Abbildung 38 A; Anhang 3). Abhängig vom Stenosegrad lag eine Erhöhung der PAF in den Bandinggruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Darüber hinaus lag ein hoher Korrelationskoeffizient ($r=0,879$) zwischen dem, aus der PAF berechneten, Druckgradienten und dem invasiv gemessenen RVP vor (Abbildung 38 B). Ein ebenfalls hoher Korrelationskoeffizient ($r=0,863$) ließ sich für den berechneten Druckgradienten und den Quotienten $RV/(LV + S)$ beobachten (Abbildung 38 C).

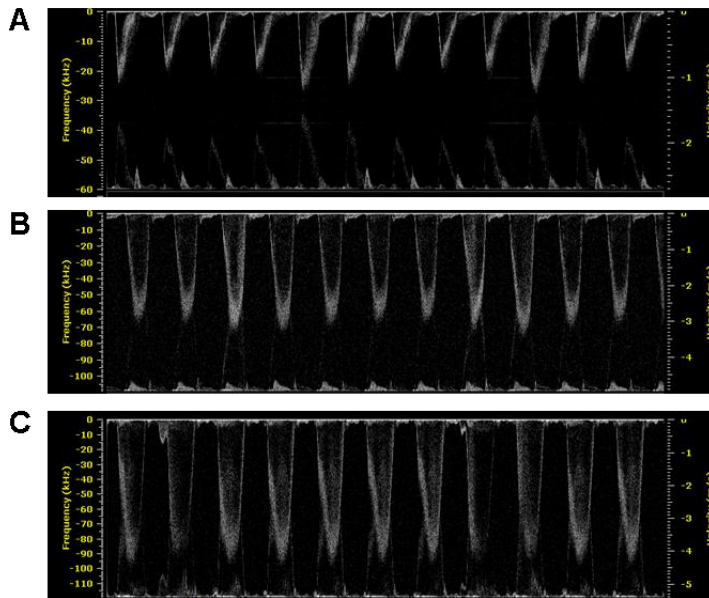


Abbildung 37: PW Doppler der pulmonalarteriellen Flussgeschwindigkeit (PAF), aufgenommen in der modifizierten parasternalen langen Achse an Tag 28. Gemessen wurde die maximale Flussgeschwindigkeit im Peak, die hier schon optisch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen lässt. A) Kontrolle, B) 1,7 mm-Banding, C) 1,3 mm-Banding

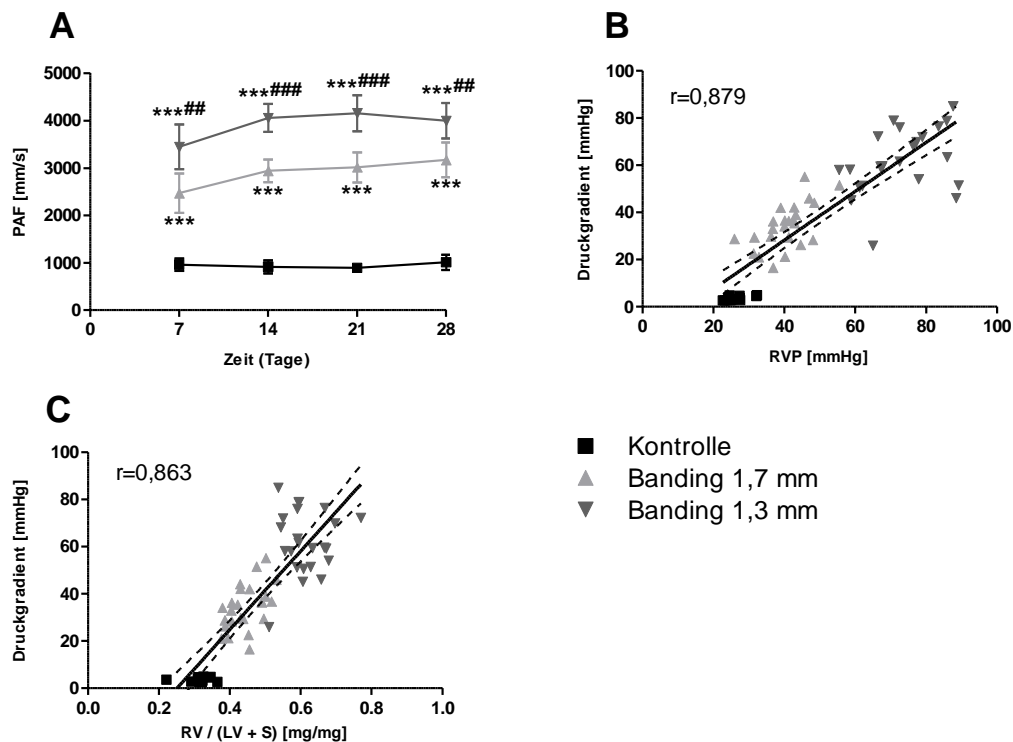


Abbildung 38: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Pulmonalarterielle Flussgeschwindigkeit (PAF) und Relation des daraus errechneten Druckgradienten mit dem RVP. A) PAF, B) Relation Druckgradient und RVP, C) Relation Druckgradient und RV/(LV + S). Die Daten unter A) sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=6, 1,3 mm-Banding n=5-6). ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

Bereits an Tag 14 lag die PAF in der Placebogruppe der zweiten PA Banding-Studie im Mittel signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Tiere, die ab Tag 14 mit Sildenafil

therapiert wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt eine vergleichbare PAF wie die Tiere in der Placebogruppe (Abbildung 39 A). Während in der Placebogruppe kaum eine Progredienz der PAF von Tag 14 bis 28 beobachtet werden konnte, zeigte sich in der Sildenafilgruppe eine weitere Steigerung der PAF (Abbildung 39 B). Basierend auf den Daten der PAF an Tag 28 wurde der Druckgradient berechnet, der in Übereinstimmung mit der Zeitverlauf-Studie sowohl mit dem RVP als auch mit dem Quotienten $RV/(LV + S)$ hohe Korrelationskoeffizienten aufwies (Abbildung 39 C, D).

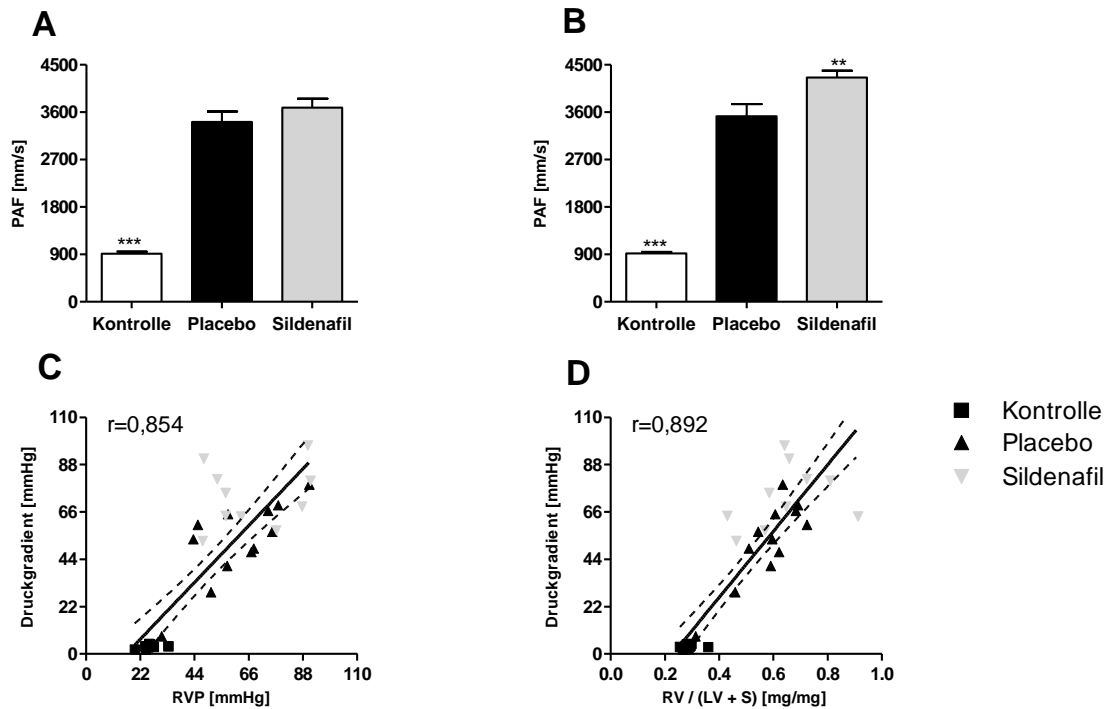


Abbildung 39: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: PAF und Relation des errechneten Druckgradienten an Tag 28 mit dem RVP und $RV/(LV + S)$. A) PAF Tag 14 in [mm/s], B) PAF Tag 28 in [mm/s], C) Relation Druckgradient und RVP, D) Relation Druckgradient und $RV/(LV + S)$. Die Daten unter A) und B) sind als MW \pm SEM dargestellt (PA Banding n=10-12). **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

Tabelle 9: PAF in der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie. Die Daten sind als MW \pm SEM **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
PAF [mm/s] Tag 14	912 \pm 43***	3414 \pm 195	3685 \pm 174
PAF [mm/s] Tag 28	917 \pm 32***	3523 \pm 233	4258 \pm 132**

3.2.5 Plasmamarker

Druck-/dehnungssensitive Plasmamarker

Die ANP und BNP Plasmaspiegel in der Zeitverlauf-Studie wiesen eine signifikante Erhöhung der Marker in der 1,3 mm-Bandinggruppe im Vergleich zur 1,7 mm-Banding- und Kontrollgruppe auf. Für die ANP Plasmakonzentrationen konnte ein „stufenförmiger“ Anstieg

über die zwei Stenosegrade und die Zeit beobachtet werden (Abbildung 40 A; Anhang 9). Darüber hinaus wurde ein hoher Korrelationskoeffizient ($r=0,804$) zwischen der ANP Plasmakonzentration und dem RVP an Tag 28 festgestellt (Abbildung 40 B; Anhang 9). In der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie lag der Korrelationskoeffizient bei $r=0,408$ (Abbildung 41 B). Die Erhöhung der ANP Plasmaspiegel in der Placebogruppe lag bei einem Faktor von 1,7 verglichen mit der Kontrollgruppe (Tabelle 10; Abbildung 41 A). Ein Substanzeffekt von Sildenafil konnte nicht beobachtet werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen der BNP Plasmakonzentration und dem RVP lag in der Zeitverlauf-Studie bei $r=0,618$ (Abbildung 40 D). Eine signifikante Erhöhung der BNP Plasmaspiegel in der 1,3 mm-Bandinggruppe im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen zeigte sich konstant über die Zeit (Anhang 9; Abbildung 40 C). In der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie konnte, neben einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration in der Placebogruppe gegenüber der Kontrollgruppe, eine signifikante Senkung der BNP Plasmakonzentration um 27 % unter der Therapie mit Sildenafil beobachtet werden (Tabelle 10; Abbildung 41 C). Der Korrelationskoeffizient zwischen der BNP Plasmakonzentration und dem RVP lag bei $r=0,168$ (Abbildung 41 D).

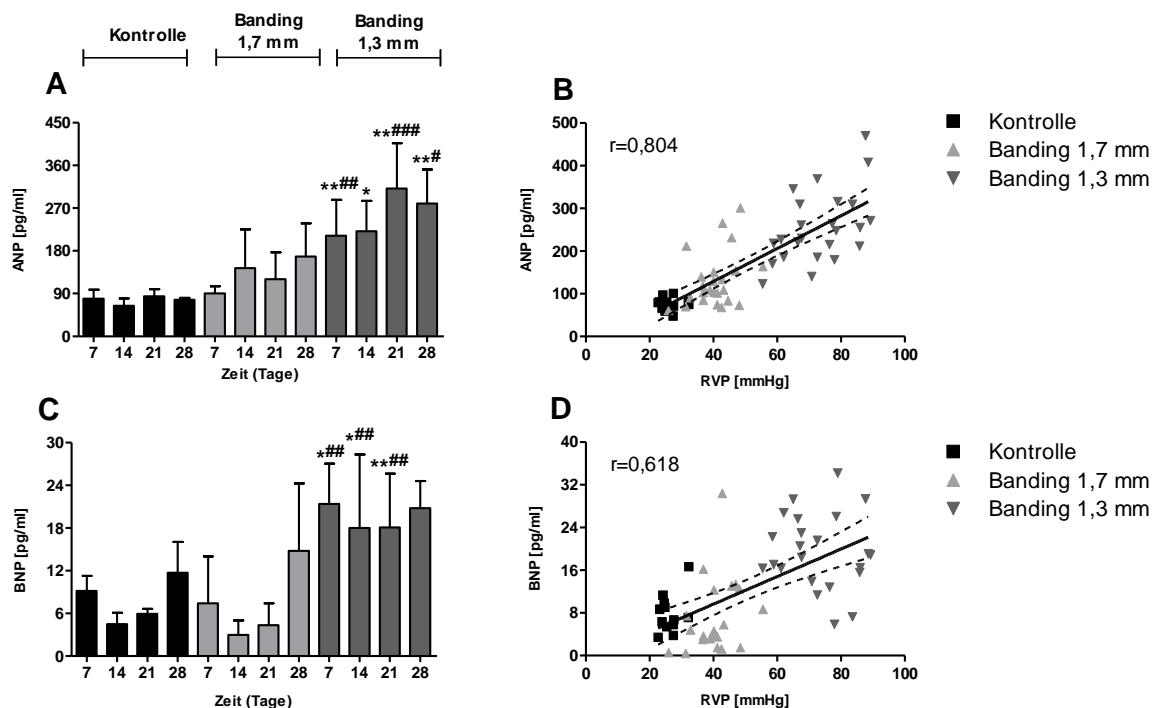


Abbildung 40: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Plasmakonzentrationen druck-/dehnungssensitiver Marker [pg/ml] und Relationen der Marker mit dem RVP. A) Plasmakonzentration ANP, B) Relation von ANP und RVP, C) Plasmakonzentration BNP, D) Relation von BNP und RVP. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=5-6). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ Banding vs. Kontrolle, # $p<0,05$; ### $p<0,01$; #### $p<0,001$ 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

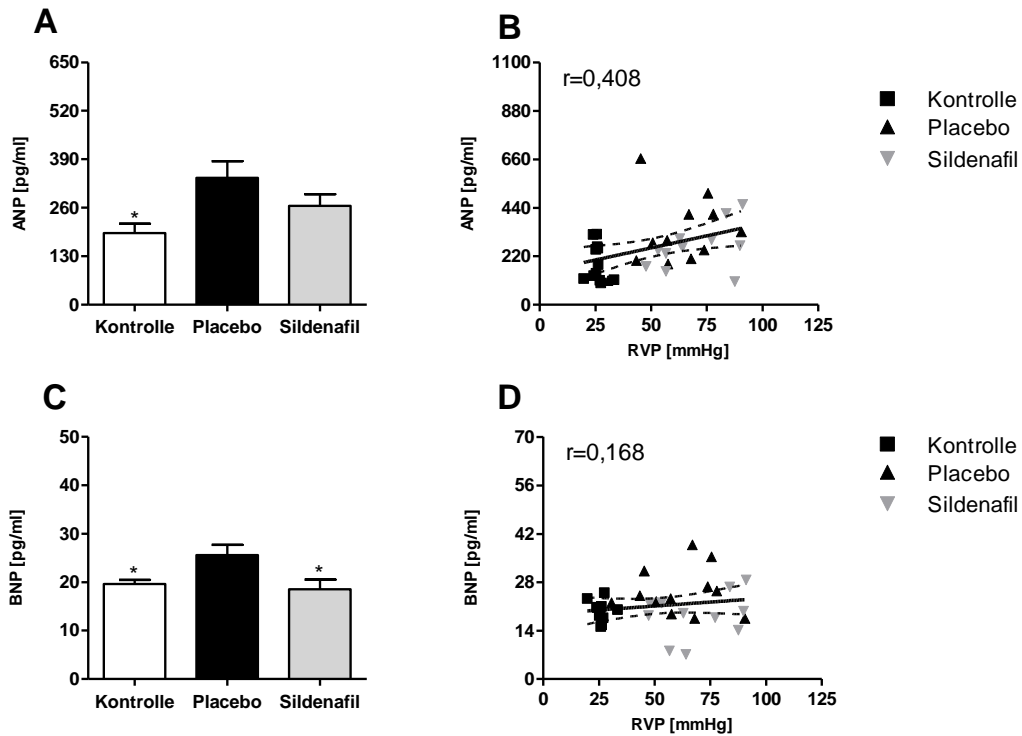


Abbildung 41: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Plasmakonzentrationen von druck-/dehnungssensitiven Markern [pg/ml] und Relationen der Marker mit dem RVP. A) ANP, B) Relation von ANP und RVP, C) BNP, D) Relation von BNP und RVP. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05 vs. Placebo.

Remodeling-Plasmamarker

Die Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN zeigten im Plasma weder in der Zeitverlauf-Studie (Abbildung 42 A-C; Anhang 9) noch in der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie (Tabelle 10; Abbildung 43 A-C) signifikante Gruppenunterschiede.

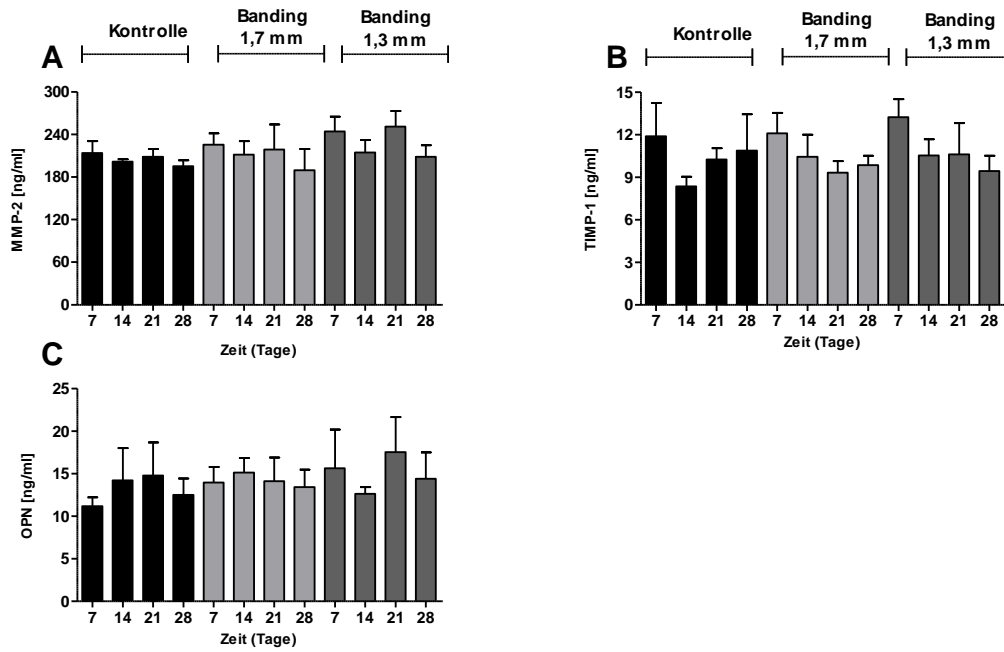


Abbildung 42: Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells: Plasmakonzentrationen von Remodeling-Markern. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=6, 1,3 mm-Banding n=6).

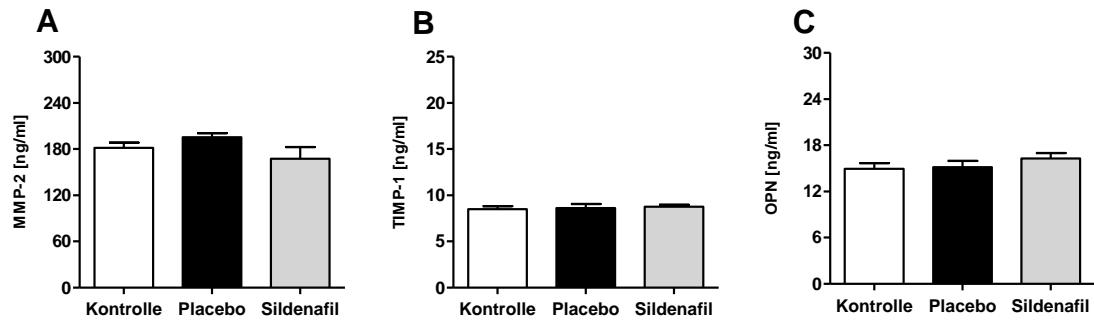


Abbildung 43: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Plasmakonzentrationen von Remodeling-Markern. A) MMP-2, B) TIMP-1, C) OPN. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12).

Tabelle 10: PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie: Plasmakonzentrationen von druck/dehnungsensitiven Markern und Remodeling-Markern. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05 vs. Placebo.

	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
ANP [pg/ml]	192,8 \pm 24,3*	321,4 \pm 44,9	264,9 \pm 31,4
BNP [pg/ml]	19,7 \pm 0,8*	25,3 \pm 2,0	18,6 \pm 2,0*
MMP-2 [ng/ml]	181,7 \pm 6,7	195,6 \pm 5,1	167,7 \pm 14,8
TIMP-1 [ng/ml]	8,5 \pm 0,3	8,6 \pm 0,4	8,8 \pm 0,2
OPN [ng/ml]	15,0 \pm 0,7	15,2 \pm 0,8	16,3 \pm 0,7

4 Diskussion

4.1 Pathophysiologische Grundlagen und Unterscheidungsmerkmale des MCT- und PA Banding-Modells

4.1.1 Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVP)

Die Rechtsherzkatheteruntersuchung zur Bestimmung des PAP und darüber hinaus des Druckes im rechten Atrium, des RVP, des pulmonalen Gefäßdruckes und des Cardiac Outputs gelten als Goldstandard bei der Bestätigung der Diagnose einer PAH (Galiè *et al.*, 2009). Statt des PAP wird in Tiermodellen mit Ratten in der Regel der RVP bestimmt, weil eine Einführung des Katheters in die Pulmonalarterie ohne Eröffnung des Thorax bisher nicht möglich ist. Obwohl die Messung des Druckes im rechten Atrium aus klinischer Sicht mittlerweile als prädiktiver eingeschätzt wird als der PAP bzw. der RVP in Bezug auf den funktionellen Status und die Überlebenswahrscheinlichkeit (Chin *et al.*, 2005; Voelkel *et al.*, 2006), gilt in Rattenmodellen, auch aus Gründen der praktischen Umsetzung, nach wie vor der RVP als primärer Studienendpunkt.

Es konnte bereits in verschiedenen Tierstudien gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Nachlast des rechten Ventrikels, sowohl durch mechanische Stenosierung der Pulmonalarterie, als auch durch toxisch bedingtes Remodeling der Pulmonalgefäße durch MCT, zu einer Erhöhung des RVP führt. Im MCT und im PA Banding-Modell war an Tag 28, wie in der Literatur beschrieben (Schäfer *et al.*, 2009), eine annähernd äquivalente Erhöhung des RVP zu beobachten. Anhand der Zeitverlauf-Studie konnte festgestellt werden, dass im PA Banding-Modell bereits kurz nach der Stenosierung der Pulmonalarterie der maximale Druck von Tag 28 erreicht wurde und dieser in Abhängigkeit vom Grad der Stenose stand. Im MCT-Modell findet dagegen ein progredienter Anstieg des RVP über einen Versuchsverlauf von 4 Wochen statt, der allerdings erst ab der dritten Woche signifikant erhöht ist (Ghodsi *et al.*, 1981). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass im MCT-Modell zunächst toxisch bedingt ein Remodeling der Lungengefäße stattfindet, welches nicht akut, jedoch progredient zu einer Erhöhung der Nachlast und somit zu einer Druckerhöhung im rechten Ventrikel führt (Rosenberg *et al.*, 1988; Reindel *et al.*, 1990).

Hämodynamikmessungen im linken Ventrikel zeigten keine signifikanten Veränderungen im PA Banding-Modell (Braun *et al.*, 2003; Faber *et al.*, 2006). Im MCT-Modell konnte eine linksventrikuläre Dysfunktion mit einem signifikant verminderten LVP nach einer Studiendauer von sechs Wochen festgestellt werden (Correia-Pinto *et al.*, 2009). Erste Veränderungen auf Genexpressionsebene konnten dagegen in beiden Modellen bereits nach vier Wochen Studiendauer im linken Ventrikel beobachtet werden (LekanneDeprez *et*

al., 1998; Correia-Pinto *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurden in allen Studien, neben dem rechten Ventrikel, auch Genexpressionsdaten im linken Ventrikel erhoben.

4.1.2 Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)

Der RVEDP wird zur Beurteilung der diastolischen Funktion herangezogen. Eine Erhöhung weist auf das Vorliegen einer abnormen Relaxation, einer gestörten Füllung und/oder einer verminderten Dehnungsfähigkeit hin. Ursache dieser pathophysiologischen Veränderungen ist eine Erhöhung der Steifigkeit des Ventrikels, die wahrscheinlich sowohl auf eine quantitative Zunahme der Kollageneinlagerung, als auch auf eine qualitative Veränderung hinsichtlich der Quervernetzung myokardialen Kollagens zurückzuführen ist (Badenhorst *et al.*, 2003). In einem Tiermodell für Hypertonie bedingte Hypertrophie wurde gezeigt, dass eine Verschiebung der Anteile myokardialer Kollagene zu einer erhöhten myokardialen Steifigkeit führt. Hier trat eine Verschiebung von Kollagenen des Typs I hin zu Kollagenen vom Typ III auf (Mukherjee *et al.*, 1990). Im MCT-Modell konnte lediglich ein nicht-signifikanter Trend zu einem höheren RVEDP gemessen werden. Im PA Banding-Modell war die Erhöhung des RVEDP in der Placebogruppe der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie signifikant, jedoch wurde diese Signifikanz in der Zeitverlauf-Studie, möglicherweise auf Grund der niedrigeren Tierzahl, nicht erreicht. Die Ventrikelsteifigkeit war demnach in beiden Modellen zum Messzeitpunkt nicht maßgeblich erhöht.

4.1.3 Rechtsventrikuläre Hypertrophie

Eine Erhöhung des Quotienten $RV/(LV + S)$, als Maß für rechtsventrikuläre Hypertrophie, konnte im MCT- und PA Banding-Modell in annähernd gleicher Ausprägung in der Placebogruppe gemessen werden. In der Zeitverlauf-Studie war der Quotient $RV/(LV + S)$, ebenso wie der RVP, bereits in der frühen Phase, in Abhängigkeit vom Stenosegrad, erhöht und zeigte kaum eine Progression über die Zeit. In beiden untersuchten Modellen ergab sich die Hypertrophie fast ausschließlich aus einer Gewichtszunahme der rechtsventrikulären Wand. Die Gewichtszunahme basiert dabei primär auf einer Hypertrophie von Kardiomyozyten und sekundär auf einer myokardialen interstitiellen Fibrose (Ahmad *et al.*, 2005), was zusammengenommen als zelluläre Antwort auf mechanische Dehnung und humorale Wachstumsfaktoren gesehen werden kann (Gonzales *et al.*, 2009). Eine histologische Untersuchung des rechten Ventrikels im PA Banding-Modell mit Trichromfärbung zur Detektion von interstitieller Fibrose, als mögliche Ursache für eine rechtsventrikuläre Gewichtszunahme, wurde hier nicht durchgeführt, da das entnommene Gewebe für die Analyse der Genexpression verwendet wurde. Es konnte bereits in Ratten mit PA Banding (Durchmesser 1,3 mm) gezeigt werden, dass nach sechs Wochen keine signifikante Fibrosierung des rechten Ventrikels im Vergleich zu den Kontrolltieren vorliegt (Bogaard *et*

al., 2009b). Die Frage, ob im MCT-Modell eine myokardiale Fibrose im rechten Ventrikel auftritt, wird dagegen kontrovers diskutiert. Keine interstitielle, myokardiale Fibrose im MCT-Modell wurde nach Sirius Red Färbung in der Gruppe um Hessel *et al.* (2006) nach vier Wochen nachgewiesen. Nach 6 Wochen konnte mit Masson's Trichrom Färbung von Daicho *et al.* (2009) Fibrose in den rechten Ventrikeln MCT behandelter Ratten gezeigt werden. Es ist demnach anzunehmen, dass erst in einer Versuchsphase, in der die Tiere klare Anzeichen einer Herzinsuffizienz wie Aszites, Pleuraerguss und portale Hypertonie aufweisen, eine myokardiale Fibrose nachweisbar ist.

4.1.4 Kontraktilität und Relaxation

Als adaptive Folge der rechtsventrikulären Druckbelastung und Hypertrophie waren auch die Kontraktilität und Relaxation, gemessen anhand der maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit dP/dt_{max} und dem Maximum des Druckabfalls dP/dt_{min} , in beiden Modellen erhöht. In tierexperimentellen Untersuchungen zeigte sich, dass in Nagern ein Anstieg des dP/dt_{max} und dP/dt_{min} als Kompensation von erhöhten Druckverhältnissen und strukturellen Veränderungen des Ventrikels auftritt (Faber *et al.*, 2006; Faber *et al.*, 2007). In der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells stellte sich die Steigerung der Kontraktilität und Relaxation abhängig vom Grad der Stenose, jedoch unabhängig von der Zeit dar. Schwankungen des dP/dt_{max} bzw. dP/dt_{min} in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells sind vermutlich auf tagesabhängige Faktoren und individuelle Ansprechbarkeit auf die Narkose zurückzuführen, da diese parallel in allen drei Gruppen aufgetreten sind. Eine generelle Steigerung der Kontraktilität im PA Banding-Modell wurde bereits von Faber *et al.* (2006) und Leeuwenburgh *et al.* (2001) beobachtet. Darüber hinaus wurde von Faber *et al.* (2006) festgestellt, dass ein Stimulus der β -Adrenorezeptoren durch Dobutamin zu einer weiteren Steigerung des dP/dt_{max} und des dP/dt_{min} führt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Tiere mit 1,3 mm-Banding zwar eine erhöhte basale Kontraktilität aufwiesen, jedoch die kontraktile Reserve erhalten blieb. Konträr dazu wird für das MCT-Modell eine signifikante Reduktion der β_1 -Adrenorezeptordichte nach 28 Tagen beschrieben, die jedoch nicht durch rechtsventrikuläre Hypertrophie alleine, sondern nur durch die Kombination mit neurohumoraler Aktivierung ausgelöst wird (Brown *et al.*, 1998; Leineweber *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde ein Anstieg der Relaxationszeit, ein negatives Kraft-Frequenz-Verhältnis und eine verminderte kontraktile Reserve aus Versuchen an isolierten Muskelstreifen von MCT behandelten Tieren mit Isoproterenol-Stimulation der β_1 -Adrenorezeptoren beschrieben (Kögler *et al.*, 2003; Versluis *et al.*, 2004).

Anhand der Studienergebnisse bezüglich kontraktile Reserve und β -Adrenorezeptordichte wird ersichtlich, dass sich der pathophysiologische Status der Tiere, grundlegend in den beiden Modellen unterscheidet, trotz einer annähernd gleichen Auslenkung hämodynamischer

Parameter. Auch bei einigen Patienten konnte beobachtet werden, dass sie in Folge einer PAH schneller eine Rechtsherzinsuffizienz entwickelten als andere Patienten mit einer äquivalenten Erhöhung des PAP. Als mögliche Erklärung werden Veränderungen auf Genexpressionsebene und neurohormonale Aktivierung in Betracht gezogen (Haddad *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden im MCT- und PA Banding-Modell zur näheren Analyse verschiedene Marker der intrazellulären Calcium-Homöostase und kontraktile Elemente auf Genexpressionsebene bestimmt.

4.1.5 Fetaler Shift kontraktiler Elemente

Die Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzens korreliert mit dem Verhältnis der schweren Myosinketten alpha (MYHCA) und beta (MYHCB). Die prädominant vorliegende Form im Nagerherz ist mit mehr als 90 % MYHCA (Miyata *et al.*, 2000). Herzen mit einer hohen Expression von MYHCA weisen eine schnellere Kontraktionsgeschwindigkeit auf, während die Expression von MYHCB eine ökonomischere Kraftgenerierung durch einen niedrigeren ATP-Verbrauch ermöglicht (Palmer, 2005). Eine Verschiebung der Expression von MYHCA zu MYHCB ermöglicht es demnach, Energie zu bewahren. Die dadurch verminderte Kontraktilität kann jedoch zur Progression der Erkrankung beitragen, da die kardiale Reserve reduziert ist (Krenz *et al.*, 2004). Dieser Effekt kennzeichnet, neben beispielsweise der transienten Expression von Wachstumsfaktoren und einem Anstieg der Expression von α -Aktin, den Umkehrprozess vom adulten zum fetalen Genexpressionsmuster im Herzen. Dieser wird ausgelöst durch druckbelastungsinduzierte kardiale Hypertrophie (Chien *et al.*, 1993). Sowohl im MCT-Modell als auch im 1,3 mm-Banding konnte ein signifikant höherer Quotient MYHCB/MYHCA und somit eine Verschiebung in beiden Ventrikeln gegenüber den Kontrollen gemessen werden. Für das MCT-Modell wurde dies bereits als Anpassung an die erhöhten Druckbedingungen beschrieben (Morioka *et al.*, 1992; Versluis *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte in diesem Modell auch im linken Ventrikel eine Erhöhung von MYHCB nachgewiesen werden (Correia-Pinto *et al.*, 2009). Eine Veränderung der hämodynamischen Parameter erfolgte jedoch erst zu einem späteren Versuchszeitpunkt (Correia-Pinto *et al.*, 2009). Die Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells zeigte, dass die höchsten Werte des Quotienten MYHCB/MYHCA im rechten Ventrikel in der 1,3 mm-Bandinggruppe am Tag 7 erreicht wurden und sich im weiteren Versuchsverlauf leicht abschwächten. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in der späteren Versuchsphase eine Adaption des Ventrikels an die vorliegenden Druckverhältnisse stattgefunden hat. Im linken Ventrikel wurde in dieser Studie ein gegenläufiger Trend beobachtet. Eventuell ist dies, ähnlich wie im MCT-Modell, ein erster Hinweis auf eine spätere Veränderung der linksventrikulären Druckverhältnisse. Ein Shift von MYHCA zu MYHCB blieb in der 1,7 mm-Bandinggruppe aus, was darauf schließen lässt, dass eine leichte rechtsventrikuläre Druckbelastung keine Veränderung kontraktiler Elemente verursacht. Generell war die

Erhöhung des Quotienten MYHCB/MYHCA im MCT-Modell prozentual stärker ausgeprägt als im PA Banding-Modell. Dies ist in Übereinstimmung mit der beschriebenen verminderten kontraktilen Reserve im MCT-Modell (Kögler *et al.*, 2003; Versluis *et al.*, 2004), die in dieser Form für das PA Banding-Modell nicht nachgewiesen worden ist (Faber *et al.*, 2006).

4.1.6 Veränderungen der intrazellulären Calcium-Homöostase

Die intrazelluläre Calcium-Homöostase spielt eine wichtige Rolle bei der pathophysiologischen Entwicklung kardialer Hypertrophie (Hébert, 2001). Insbesondere Proteine, die an der Wiederaufnahme von Calcium aus dem Zytosol in intrazelluläre Speicher beteiligt sind, weisen bei Patienten mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz Veränderungen in der Expression auf. Die Bedeutung von Calcium ist hierbei durch die essentielle Funktion bei der Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels begründet. Bei der Kontraktion erfolgt, ausgelöst durch Depolarisation, ein Einstrom von Calcium in die Myozyten über spannungsabhängige L-Typ Calcium Kanäle (Ahmad *et al.*, 2005). Auf diese Weise wird ein starker Einstrom von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin Rezeptoren (RyR) und Inositol-1, 4, 5-Triphosphat (IP₃) Rezeptoren ausgelöst, bezeichnet als Calcium induzierte Calcium-Freisetzung (Fabiato, 1983). Bei der Relaxation erfolgt der Rücktransport von Calcium über den Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) und die sarko-/endoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase (SERCA), hauptsächlich über die im Myokard primär exprimierte Isoform SERCA-2 (Hasenfuss *et al.*, 1997). Sowohl in verschiedenen Tiermodellen mit druckinduzierter Hypertrophie (Morioka *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1989) als auch bei Patienten mit schwerer kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Zarain-Herzberg, 2006) konnte eine Herunterregulation von SERCA-2 auf Genexpressions- und Proteinebene gezeigt werden. In den durchgeführten Studien konnte im rechten Ventrikel für das MCT-Modell, ebenso wie für das PA Banding-Modell mit einem Stenosedurchmesser von 1,3 mm, eine Herunterregulation der SERCA-2 Genexpression nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung steht zu Ergebnissen von Kögler *et al.* (2003) und Lekanne-Deprez *et al.* (1998). Im Gegensatz zu der Herunterregulation der Genexpression von SERCA-2 im 1,3 mm-Banding, erfolgte im 1,7 mm-Banding eine leichte Hochregulation. Eine denkbare Hypothese ist, dass das mildere Banding eine gesteigerte Calcium-Empfindlichkeit verursacht, wie es beispielsweise auch an Ratten mit leichter kardialer Hypertrophie nach Ausdauertraining beobachtet worden ist (Buttrick *et al.*, 1994; Wisløff *et al.*, 2001). Es wird beschrieben, dass die Herunterregulation von SERCA-2 zu einer Veränderung der Regulation des intrazellulären Calciums führt, was wiederum eine Aktivierung des *Calcineurin-Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen* (NFAT) Signalweges bewirkt (Crabtree, 1999; Zarain-Herzberg, 2006). Calcineurin dephosphoryliert und induziert eine nukleäre Translokation von NFAT Transkriptionsfaktoren, die, zusammen mit anderen Transkriptions-

faktoren, durch die Bindung an Regulatorregionen kardialer Gene, verantwortlich für hypertrophes Wachstum sind (Crabtree *et al.*, 2002).

Transient Receptor Potential Channels (TRPC) sind Untereinheiten nicht-selektiver Calcium permeabler Kanäle, die über die sekundäre Transmitter des Phospholipase C-Signalweges Diacylglycerol (DAG) und IP3 (TRPC-3, -6, -7), sowie über die Leerung intrazellulärer Calcium-Speicher, wie beispielsweise SERCA, und Dehnung (TRPC-1, -4, -5) aktiviert werden (Wu *et al.*, 2010). Der Calcium-Einstrom über diese Kanäle führt zu einer Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren, die, wie bereits bei SERCA-2 beschrieben, eine hypertrophe Reaktion des Myokards induzieren (Nishida *et al.*, 2008). Insbesondere für TRPC-6 wurden erhöhte Expressionen im linken Ventrikel durch druckinduzierte Hypertrophie auf Grund von Aorten-Banding im Tiermodell, sowie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie beschrieben (Kuwahara *et al.*, 2006). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Rechtsherzhypertrophie im MCT- und PA Banding-Modell mit 1,3 mm Stenosedurchmesser signifikant erhöhte Genexpressionen von TRPC-6 vorlagen, wobei diese im MCT-Modell stärker ausgeprägt waren als im PA Banding-Modell. Anhand der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells wurde ersichtlich, dass die Hochregulation in der 1,3 mm-Bandinggruppe bereits in der frühen Versuchsphase erfolgte und konstant anhielt. Die linken Ventrikel wiesen weder im MCT noch im PA Banding-Modell eine veränderte Regulation auf. Die Frage, ob eine Hochregulation der TRPC-6 Kanäle eine positive oder negative Rolle in der Ausbildung von Kardiomyopathie und interstitieller, kardialer Fibrose spielt, wird kontrovers diskutiert (Kuwahara *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2007). Sicher scheint jedoch, dass die TRPC-6 Kanäle über den Calcineurin-NFAT-Signalweg an der kardialen Hypertrophie partizipieren (Abramowitz *et al.*, 2009).

Versuche an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass TRPC-3 Kanäle an der Entwicklung einer pathophysiologischen kardialen Linksherzhypertrophie beteiligt sind (Nakayama *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). Ebenso wie bei den TRPC-6 Kanälen erfolgt hier eine Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges (Nakayama *et al.*, 2006). Die MCT- und PA Banding-Studien ergaben, anders als bei den Expressionsdaten zu TRPC-6, keine klare Hochregulation von TRPC-3. Im MCT-Modell war die Expression von TRPC-3 im rechten Ventrikel sogar signifikant runterreguliert gegenüber der Kontrollgruppe. Eine denkbare Erklärung hierfür wäre ein kompensatorischer Mechanismus, ähnlich wie er für glatte Gefäßmuskelzellen in TRPC-6 defizienten Mäusen beschrieben worden ist. Die hochregulierten TRPC-3 Kanäle leisteten in diesen Zellen jedoch keinen vollständigen funktionellen Ersatz für die TRPC-6 Kanäle (Dietrich *et al.*, 2005).

In kardialen Muskelzellen wurde eine Assoziation zwischen der Herunterregulation von SERCA-2 und einer Hochregulation von TRPC-4 und -5 nachgewiesen (Seth *et al.*, 2004).

Daher ist die Expression von TRPC-4 in den Ventrikeln des MCT- und PA Banding-Modells bestimmt worden. Konträr zu den Ergebnissen von Seth *et al.* (2004) wurde hier jedoch, vor allem im MCT-Modell, tendenziell eine Herunterregulation von TRPC-4 beobachtet.

Die Genexpression des Calcineurin Regulators (RCN-1), einem sensitiven Marker für Calcineurin Signalwege, verlief annähernd parallel zu der Genexpression von TRPC-6 in beiden untersuchten Tiermodellen. Kuwahara *et al.* (2006) konnten bereits *in vitro* und *in vivo* in transgenen Mäusen zeigen, dass eine Überexpression von TRPC-6 zu einer Aktivierung der Expression von RCN-1 führt und einen regulatorischen Kreislauf im Calcineurin-NFAT Signalweg bildet. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass der Signalweg von TRPC-6 über Calcineurin-NFAT, wie er bereits für Modelle der Linksherzhypertrophie beschrieben worden ist, auch für das MCT- und PA Banding-Modell zutrifft.

4.1.7 Pathophysiologische Veränderungen der Lunge

Im MCT-Modell basiert die pathophysiologische Hypertrophie des rechten Ventrikels auf einer Widerstandserhöhung des Lungengefäßbettes, bedingt durch strukturelle Veränderungen des arteriellen Endothels (Rosenberg *et al.*, 1988), Einwanderung glatter Muskelzellen in zuvor nicht-muskularisierte Pulmonalarterien (Meyrick *et al.*, 1980) und einer Zunahme der Mediadicke durch Hypertrophie glatter Muskelzellen in kleinen Pulmonalgefäßen (Meyrick *et al.*, 1980; Ghodsi *et al.*, 1981). Darüber hinaus wurden Läsionen der Adventitia beobachtet, charakterisiert durch Ödeme und die Infiltration inflammatorischer Zellen (Allen *et al.*, 1970; Reindel *et al.*, 1990; Schultze *et al.*, 1991). Verschiedene Gruppen konnten Fibrin- und Plättchenthromben in alveolaren Kapillaren und pulmonalen Gefäßen nachweisen (Allen *et al.*, 1970; Plestina *et al.*, 1972). Als mögliches Anzeichen für Ödeme und Inflammation sowie Remodeling Prozesse, kann ein Anstieg des Lungengewichtes gewertet werden, wie er in der MCT-Studie an Tag 28 vorlag. Weiterhin wurde in dieser Studie auf Expressionsebene ein Anstieg der Remodeling-Marker TIMP-1, OPN, COL1A2 und COL3A1 gemessen. In der Literatur wurden bisher keine pathophysiologischen Veränderungen der Lunge im PA Banding-Modell beschrieben. Denkbar wäre jedoch gewesen, dass während der Operation eine Beeinträchtigung der Lungen durch die künstliche Beatmung und das Öffnen des Thorax erfolgte. Veränderungen der Lungengewichte und Genexpressionen der ausgewählten Remodeling-Marker konnten im PA Banding-Modell jedoch nicht festgestellt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann postuliert werden, dass die Lungen, im Gegensatz zum MCT-Modell, keine gruppenspezifischen, pathophysiologischen Veränderungen aufweisen und somit in Krankheitsprozesse des PA Banding-Modells nicht maßgeblich involviert sind.

4.1.8 Pathophysiologische Veränderungen der Niere

Eine toxische Schädigung durch die Applikation von MCT, wie sie für die Lunge als Modellgrundlage beschrieben ist, tritt grundsätzlich auch in anderen Organen auf. Frühe Studien an Ratten mit *Crotalaria spectabilis* Samen und MCT Gabe über Trinkwasser zeigten neben einer Schädigung der Lunge auch pathophysiologische Veränderungen des Herzens, der Leber und der Niere (Allen *et al.*, 1970; Carstens *et al.*, 1970; Roth *et al.*, 1981). Für die Niere beschrieben Kurozumi *et al.* (1983) weiterhin, dass 28 Tage nach MCT Injektion Mesangiolyse, verbunden mit Obliteration von Kapillaren, Nekrose und Hämorrhagien im *Mesangium* (Zellen im Inneren der Nierenkörperchen und am Gefäßpol) auftraten. Das Vorliegen von Nierentoxizität konnte in der MCT-Studie anhand eines Anstiegs der Genexpression von KIM-1 und LCN-2 bestätigt werden. Im PA Banding-Modell wurde dagegen keine Hochregulation von KIM-1 und LCN-2 gemessen, was die pathophysiologische Beeinträchtigung der Niere in diesem Modell unwahrscheinlich macht. Für KIM-1 wurde gezeigt, dass die Genexpression in Folge von Ischämie und Toxizität in Ratten, hochreguliert ist (Bailly *et al.*, 2002; Vaidya *et al.*, 2009). Auch bei Patienten mit ischämischer Nierenschädigung konnte eine erhöhte Expression von KIM-1 in tubulären Zellen, sowie erhöhte KIM-1 Proteinkonzentrationen im Urin nachgewiesen werden (Han *et al.*, 2002). Neben einigen weiteren Markern gilt KIM-1 als von der FDA und EMA anerkannter Biomarker für Nierenschädigung in Nagern (Lock, 2010). LCN-2 gilt ebenfalls als früher und sensitiver Biomarker für ischämisch und toxisch bedingte Nierenschädigungen. Eine Hochregulation der Expression von LCN-2 sowie ein Anstieg im Plasma konnten bei akuter Nierenschädigung im Tiermodell und in Patienten gezeigt werden (Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2005).

4.2 Therapeutische Intervention

Die Therapie mit dem PDE-5 Inhibitor Sildenafil zählt zu den zugelassenen Standardtherapien der PAH (Galiè *et al.*, 2009). In Tiermodellen der PAH konnte eine Hochregulation der PDE-5 Aktivität in pulmonalen Gefäßen gezeigt werden, die für den Abbau von cGMP verantwortlich ist (Hanson *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 2002). Eine Blockade der PDE-5 durch Sildenafil führt zu einem Anstieg der cGMP Konzentration und somit zu einer Vasodilatation glatter Muskelzellen. Darüber hinaus konnte ein direkter anti-proliferativer Effekt von Sildenafil *in vitro* an pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen gezeigt werden (Wharton *et al.*, 2005). Die Wirksamkeit von Sildenafil wurde sowohl präklinisch im Tiermodell (Schermyly *et al.*, 2004) als auch in PAH-Patienten nachgewiesen (Ghofrani *et al.*, 2002; Galiè *et al.*, 2005). Limitierend hierbei ist, dass die Wirksamkeit von Sildenafil abhängig von einem intakten NO-sGC-cGMP System ist. Verminderte endogene NO Spiegel, wie sie bei Patienten mit PAH vorliegen, wirken sich einschränkend auf die Wirksamkeit von Sildenafil aus (Ghofrani *et al.*, 2009). Der sGC Stimulator Riociguat führt dagegen zu einer Erhöhung der

sGC Aktivität und somit zu einer massiven Erhöhung der cGMP Plasmakonzentration unabhängig von endogenem NO (Stasch *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte mit sGC Stimulatoren ein starker Synergismus mit NO nachgewiesen werden (Stasch *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2002). Im MCT- und Hypoxie-Modell konnte eine Senkung des RVP, der rechtsventrikulären Hypertrophie und eines pathophysiologischen Gefäßremodelings durch Riociguat-Therapie gezeigt werden (Dumitrascu *et al.*, 2006; Schermuly *et al.*, 2008). Ein direkter anti-proliferativer Effekt auf glatte Muskelzellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Wharton *et al.*, 2005). Nach erfolgreichen Phase II Studien (Ghofrani *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008) laufen aktuell Phase III Studien mit Riociguat in der Indikation PAH und sekundären Formen der PH. Die nachgewiesene gute Wirksamkeit von Riociguat in Tiermodellen und klinischen Studien der PAH ist eine Bestätigung des therapeutischen Benefits einer cGMP Erhöhung, die in weniger potenter Form auch bei Sildenafil vorliegt. Von wissenschaftlichem Interesse wäre daher in zukünftigen Studien die Überprüfung eines *Response-to-treatment* von potentiellen Biomarkern mit Riociguat zu untersuchen.

Die Therapie mit Sildenafil bewirkte im MCT-Modell eine Senkung der hämodynamischen Parameter sowie der Hypertrophie im rechten Ventrikel. Der Shift der kontraktiven Parameter, sowie die pathophysiologischen Veränderungen der Marker für Calcium-Homöostase waren unter Sildenafil weniger stark ausgeprägt, was ein Indiz für eine verbesserte Kontraktilität ist. Im PA Banding-Modell war dagegen kein positiver Substanzeffekt zu beobachten. Dies führt zu der Hypothese, dass Sildenafil keinen direkten anti-Remodeling Effekt auf das Myokard hat, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Schäfer *et al.* (2009). Die Effekte von Sildenafil auf die rechtsventrikuläre Struktur und Funktion scheinen somit nur die Konsequenz eines primären vasodilatorischen Effektes von Sildenafil auf die Lungengefäße zu sein. Im MCT-Modell wurden signifikant niedrigere Lungengewichte in der Therapiegruppe detektiert als in der Placebogruppe.

Darüber hinaus ist, auf Grund der Senkung der Genexpression von LCN-2 und KIM-1, ein positiver Substanzeffekt von Sildenafil in der Niere wahrscheinlich. Ein protektiver Effekt von Sildenafil wurde bereits in einem Tiermodell mit toxisch bedingter Schädigung der Niere, im Ischämie-Reperfusion-Nierenschädigungsmodell, sowie im 5/6-Nephrektomie Modell nachgewiesen (Rodríguez-Iturbe *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

4.3 Etablierte und potentielle Biomarker

4.3.1 Echokardiographie

Die wichtigste nicht-invasive Methode zur klassischen Diagnose der PAH ist die transthorakale Echokardiographie. Als Standarddiagnoseparameter gilt hier die Messung des Trikuspidalregurgitationsjets (Badesch *et al.*, 2009; Galiè *et al.*, 2009). Anhand der Gleichung

nach Bernoulli kann über die Jetgeschwindigkeit der PAP kalkuliert werden. Zur Prognose eines PAH Patienten werden dagegen echokardiographische Parameter wie TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*), die Dimension des rechten Atriums, perikardiale Effusion, der rechtsventrikuläre Dopplerindex und die linksventrikuläre Exzentrizität herangezogen (Galiè *et al.*, 2009). Auch in Tiermodellen der PH ist die trans-thorakale Echokardiographie von Bedeutung, wobei hier die Durchführung oft erschwert ist. Im MCT-Modell wurden in diesem Zusammenhang bereits die Messung der rechtsventrikulären Wanddicke, der PAAT, des rechtsventrikulären enddiastolischen Durchmessers und der TAPSE beschrieben (Jones *et al.*, 2002; Hardziyenka *et al.*, 2006).

Im PA Banding-Modell liegt, basierend auf den physikalischen Gesetzmäßigkeiten nach Bernoulli und Venturi, eine Beschleunigung des Blutflusses in der stenosierte Stelle der Pulmonalarterie vor. Die Flussmessungen in den beiden Studien des PA Banding-Modells zeigten, dass bereits an Tag 7 nach der Operation ein signifikanter Anstieg der PAF in Abhängigkeit vom Stenosegrad vorlag. Anhand der Gleichung nach Bernoulli wurde über die Flussgeschwindigkeit der Druckgradient in der Pulmonalarterie ermittelt, der in Tieren mit PA Banding ebenfalls signifikant erhöht war. Diese Methode ist bereits im Aortenbanding-Modell in Mäusen und einem adjustierbarem PA Banding in Schweinen beschrieben worden (Sekarski *et al.*, 2004; Hartley *et al.*, 2008). In den PA Banding-Studien gelang es darüber hinaus zu zeigen, dass eine Korrelation zwischen dem echokardiographisch ermittelten Druckgradienten und dem RVP, sowie der rechtsventrikulären Hypertrophie ($RV/(LV + S)$) vorlag. Eine Senkung der PAF durch die Therapie mit Sildenafil war bedingt durch das Ausbleiben einer Reduktion des RVP in diesem Modell nicht zu erwarten. Es zeigte sich, dass die Therapie mit Sildenafil sogar zu einem signifikanten Anstieg der PAF an Tag 28 führte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch Sildenafil eine starke Vasodilatation der Pulmonalgefäße ausgelöst wird, da das Endothel in diesem Modell funktionell intakt ist. Auf diese Weise wäre der dem PA Banding nachgeschaltete Widerstand geringer, was zu einer höheren Flussgeschwindigkeit in der Stenose geführt haben könnte. Eine Messung der PAAT und TAPSE in diesem Modell wurde nicht vorgenommen. Eine signifikante Reduktion der Flussgeschwindigkeit oberhalb der Stenose, ebenso wie auftretende Verwirbelungen, führen zu einer starken Beeinflussung des Signals, welches zur Bestimmung der PAAT herangezogen wird. Eine Bestimmung der TAPSE wurde dadurch erschwert, dass die Manipulation und Verlagerung des Herzens durch den operativen Eingriff, zusätzlich zu einer Formänderung des Herzens durch rechtsventrikuläre Hypertrophie, ein Anschlagen der Herzspitze, als essentiellen Orientierungspunkt, in einigen Tieren verhinderte.

Im MCT-Modell wurde die PAAT/CL, als nicht-invasiver Parameter zur Beschreibung der rechtsventrikulären Funktion, herangezogen. Für diesen Parameter spricht, im Gegensatz zur Bestimmung der TAPSE, dass er bereits 22 Tage nach MCT Injektion signifikante Unter-

schiede zwischen Placebo- und Kontrollgruppe zeigt (Hardziyenka *et al.*, 2006). Übereinstimmend konnte in der MCT-Studie an Tag 28 eine signifikante Senkung der PAAT/CL in der Placebogruppe gemessen werden. Optisch unterschied sich die Peakform der gemessenen Signale in einigen Placebotieren durch mittelsystolische Flussverlangsamung von denen der Kontrolltiere. Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen bei PH-Patienten und anderen Tierstudien (Wessely, 2003; Jones *et al.*, 2002; Laudi *et al.*, 2006). Darüber hinaus lagen inverse Korrelationen zwischen der PAAT/CL und dem RVP sowie der rechtsventrikulären Hypertrophie (RV/(LV + S)) vor. Des Weiteren konnte, analog zu den Ergebnissen des RVP und der rechtsventrikulären Hypertrophie, eine Verbesserung der PAAT/CL unter der Therapie mit Sildenafil gezeigt werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass echokardiographische Messungen der PAF und der PAAT/CL neben dem klinischen Einsatz auch eine Bedeutung bei der Bewertung von Tierstudien haben. Beide Parameter ermöglichen eine nicht-invasive Verlaufskontrolle der pathophysiologischen Entwicklung des rechten Ventrikels. Im Falle der PAAT/CL konnte darüber hinaus im MCT-Modell ein positiver Therapie-Effekt durch Sildenafil dargestellt werden, was diesen Marker zu einem potentiellen *Response-to-treatment* Marker macht. In Ermangelung eines positiven Therapie-Effekts von Sildenafil im PA Banding-Modell, konnte der Nachweis für ein Therapieansprechen bei der PAF an dieser Stelle nicht erbracht werden.

4.3.2 Druck-/dehnungssensitive Marker

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP sind an der Aufrechterhaltung der kardiopulmonalen Homöostase beteiligt. Dies erfolgt über Vasodilatation, Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) und Natriurese (Marin-Grez *et al.*, 1986; Yap *et al.*, 2004). Ihre physiologische Funktion erfüllen beide Peptide primär durch Bindung an den G-Protein gekoppelten, natriuretischen Rezeptor A (NPR-A), was zu der Bildung von cGMP führt (Nakao *et al.*, 1992). Zusätzlich zu Druckbelastung und Dehnung von Myozyten gelten auch humorale Faktoren als Stimuli der ANP und BNP Produktion und Sekretion (Yap *et al.*, 2004).

Neben ihrer Bedeutung bei linksventrikulärer Dysfunktion, spielen die natriuretischen Peptide ANP und BNP eine bedeutende Rolle bei pathophysiologischen Veränderungen des rechten Ventrikels. Erhöhte ANP und BNP Plasmakonzentrationen konnten sowohl bei rechtsventrikulärer Druck- als auch Volumenbelastung in Patienten mit PAH gemessen werden (Nagaya *et al.*, 1998; Tulevski *et al.*, 2001). In den Leitlinien für PAH wird BNP und das stabilere, inaktive Fragment NT-proBNP zur initialen Risikostratifizierung empfohlen und zum Monitoring von therapeutischen Interventionen vorgeschlagen (Galiè *et al.*, 2009).

Die klinischen Ergebnisse und Daten aus Tierstudien bestätigend (Schäfer *et al.*, 2009), lagen sowohl im MCT als auch im PA Banding-Modell erhöhte Plasmakonzentrationen von

ANP und BNP in den Placebogruppen vor. Im MCT-Modell wurden in der Placebogruppe jedoch für beide Marker grundsätzlich höhere Plasmaspiegel gemessen als im PA Banding-Modell, obwohl in beiden Modellen ein annähernd gleicher RVP und somit ein äquivalenter Stimulus für die ANP und BNP Produktion erreicht wurde und auch die Genexpressionslevel annähernd um den gleichen Faktor erhöht waren. Allein in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells lag die Genexpression von ANP in der 1,3 mm-Bandinggruppe um ein vielfaches höher als in den anderen Studien. Dies ist auf eine außergewöhnlich geringe Genexpression in der Kontrollgruppe an Tag 28 zurückzuführen, wodurch der Bezugswert geringer war als an den anderen Versuchstagen. Ein möglicher Unterschied der Modelle könnte im Abbau der natriuretischen Peptide liegen. Der Abbau von ANP und BNP erfolgt einerseits über Bindung an den natriuretischen Rezeptor C (NPR-C), gefolgt von Endozytose und lysosomale Degradation (Almeida *et al.*, 1989) und andererseits über Spaltung und Inaktivierung durch neutrale Endopeptidasen (NEP 24.11), die sich in großer Zahl in den Endothelzellen der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus in der Niere befinden (Rademaker *et al.*, 1997). In verschiedenen Hypertoniemodellen und Patienten mit essentieller Hypertonie konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition der NEP zu erhöhten ANP und BNP Plasmakonzentrationen sowie verstärkter Natriuresis führt (Seymour *et al.*, 1990; Stasch *et al.*, 1996; Wegner *et al.*, 1996). Darüber hinaus liegen in Patienten mit Herzinsuffizienz, kombiniert mit einer Nierenschädigung und somit niedrigerer glomerulärer Filtrationsrate (GFR), höhere BNP und NT-proBNP Plasmakonzentrationen vor als bei Patienten mit Herzinsuffizienz ohne eingeschränkte GFR (deFilippi *et al.*, 2007; Niizuma *et al.*, 2009). Eine mögliche Hypothese ist daher, dass die toxische Schädigung des Nierenendothels durch die Behandlung mit MCT zu einem verminderten Abbau von ANP und BNP über die NEP der Niere führt und aus diesem Grund im MCT-Modell höhere Plasmakonzentrationen vorliegen als im PA Banding-Modell.

Ein signifikanter Therapie-Effekt von Sildenafil war im MCT-Modell sowohl auf Genexpressionsebene als auch im Plasma zu beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit der Senkung der hämodynamischen Parameter und des Quotienten $RV/(LV + S)$ und vermutlich primär auf den vasodilatatorischen Effekt von Sildenafil in den Pulmonalgefäßen zurückzuführen. Darüber hinaus könnte ein positiver Substanzeffekt von Sildenafil in der Niere zu einer Verbesserung der Nierenfunktion geführt haben und somit einen Einfluss auf den Abbau von ANP und BNP genommen haben.

In der PA Banding-Studie mit Sildenafil-Therapie wurde ein niedriger Korrelationskoeffizient der BNP-Plasmakonzentration mit dem RVP beobachtet. Dies ist zumindest teilweise bedingt durch den Substanzeffekt von Sildenafil auf den BNP-Plasmaspiegel, während bei den hämodynamischen Parametern keine Veränderung unter Therapie beobachtet wurde. Im MCT-Modell wurden dagegen hohe Korrelationskoeffizienten von ANP und BNP im Plasma

mit dem RVP erreicht. Betrachtet man allein die Ergebnisse aus der Zeitverlauf-Studie, die unabhängig von möglichen Therapie-Effekten sind, gilt dies grundsätzlich auch für das PA Banding-Modell. Vor allem für ANP kann hier eine sehr gute Korrelation mit dem RVP beobachtet werden, die auch eine leichte Abhängigkeit vom Stenosegrad aufweist. Für BNP lag hier ein niedrigerer Korrelationskoeffizient vor, da die Plasmaspiegel über den gesamten Versuchsverlauf konstant hoch lagen und keine Abstufung der BNP Plasmakonzentration auf Grund des Stenosegrads beobachtet werden konnte. Möglicherweise kann die unterschiedliche Freisetzung der natriuretischen Peptide als Erklärung herangezogen werden. Die Sekretion von ANP und in geringem Ausmaß auch von BNP erfolgt hauptsächlich aus *Granula* im *atrialen* Gewebe über regulatorische Signalwege (Hasegawa *et al.*, 1991). Das rechte *Atrium* weist eine leicht progrediente Gewichtszunahme in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells auf und ist aus pathophysiologischer Sicht den Veränderungen im rechten Ventrikel nachgeschaltet. Vermutlich erklärt dies die leichte Progredienz der ANP-Plasmakonzentration. Der Großteil des sezernierten BNP wird dagegen konstitutiv in den Ventrikeln gebildet (Mukoyama *et al.*, 1991). BNP erreicht bei Vorliegen einer ventrikulären Dysfunktion höhere Konzentrationen als ANP, welches unter physiologischen Bedingungen dominiert (Boomsma *et al.*, 2001). Die kardiale Reserve ist im PA Banding-Modell erhalten und damit die rechtsventrikuläre Funktion noch nicht in dem Maße beeinträchtigt, dass eine derartige Erhöhung der BNP Plasmaspiegel beobachtet werden konnte.

Es konnte bestätigt werden, dass ANP und BNP im Plasma in Abhängigkeit der vorliegenden Druckverhältnisse im rechten Ventrikel ansteigen. Jedoch ist eine klare Differenzierung nötig zwischen reiner rechtsventrikulärer Dysfunktion und rechtsventrikulärer Dysfunktion kombiniert mit Nierenschädigung. In klinischen Studien zu ANP und BNP, in denen eine Korrelation der Plasmamarker mit dem PAP und anderen hämodynamischen Parametern gezeigt werden konnte (Nagaya *et al.*, 1998; Nagaya *et al.*, 2000), sind Patienten mit eingeschränkter GFR aus diesem Grund ausgeschlossen worden. Diese Unterscheidung ist auch in den Tiermodellen zur Bewertung von Substanzeffekten und dem Schweregrad der Erkrankung essentiell, da sonst kein direkter Rückschluss von der ANP und BNP Konzentration auf den Status des rechten Ventrikels, explizit des RVP, gezogen werden kann.

4.3.3 Remodeling-Marker

Die myokardiale Extrazellulärmatrix besteht aus fibrillären Kollagenen, Basalmembranen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und bioaktiven Signalmolekülen. Sie dient als strukturell unterstützendes Netzwerk aus verschiedenen Zelltypen zur Aufrechterhaltung der myokardialen Geometrie während des Kontraktions-Relaxations-Zyklus (Spinale, 2001). Unterbrechungen und Diskontinuität der Extrazellulärmatrix führen zu einem Verlust der normalen strukturellen Unterstützung. In den Ventrikeln resultiert dies in einer Veränderung

der myokardialen Geometrie und Funktion (Spinale, 2001). Neben dem Myokard ist die Extrazellulärmatrix auch in anderen Geweben ein essentieller Bestandteil bei Wachstumsprozessen, Wundheilung und Fibrose. Fibrose ist ein Reparatursmechanismus bei unterschiedlichen Gewebsverletzungen und kann eine überlebenswichtige Aufrechterhaltung der Integrität von funktionellen Organen bedeuten (Denhardt *et al.*, 2001). Ein Übermaß an Fibrose kann allerdings beispielsweise im Herzen zu einer Einschränkung der diastolischen Funktion und zu einer Progression der Herzinsuffizienz beitragen (Berk *et al.*, 2007).

Veränderungen der Extrazellulärmatrix konnten anhand der Genexpression von COL1A2 und COL3A1 gezeigt werden. In beiden Modellen war die Genexpression dieser Kollagene im rechten Ventrikel hochreguliert. Eine Verschiebung vom Kollagen Typ I hin zum Kollagen Typ III, wie von Mukherjee *et al.* (1990) beschrieben, wurde dabei nicht beobachtet, was als Bestätigung für das Fehlen einer Fibrose in beiden Modellen zu sehen ist. Eine Verminderung der COL1A2 und COL3A1 Expression im rechten Ventrikel unter der Therapie mit Sildenafil lag, übereinstimmend mit den Ergebnissen bezüglich rechtsventrikulärer Hypertrophie, nur im MCT-Modell vor. Neben den Ventrikeln war im MCT-Modell auch im Lungengewebe eine erhöhte Expression von COL1A2 und COL3A1 messbar. Ein Therapieeffekt durch Sildenafil konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

OPN ist ein multifunktionelles Protein, das in verschiedenen Geweben exprimiert wird und als pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Marker gilt. Durch Bindung an Integrine können Signalwege aktiviert werden, die an Adhäsion, Migration, Proliferation, zellulärer Struktur sowie Zellüberleben und Zelltod beteiligt sind (Waller *et al.*, 2010). Basal ist OPN in adultem, kardialen Gewebe nur gering exprimiert. Bei verschiedenen pathophysiologischen Veränderungen, einschließlich Druckbelastung und insbesondere bei Herzinsuffizienz, findet jedoch eine Hochregulation der Expression statt (Graf *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1999). Ein Anstieg der Genexpression von OPN im rechten Ventrikel konnte sowohl für das MCT-Modell als auch für das PA Banding-Modell gezeigt werden. Im MCT-Modell war die Differenz zwischen Kontroll- und Placebogruppe jedoch sehr viel stärker ausgeprägt und umfasste auch den linken Ventrikel, was eine reine Stimulation der OPN Expression durch Druckbelastung ausschließt. Möglicherweise ist die Hochregulation von OPN im linken und rechten Ventrikel des MCT-Modells neben der Druckbelastung auf eine Infiltration von Makrophagen zurückzuführen, wie sie auch bei chronischer Myokarditis beobachtet werden kann (Szalay *et al.*, 2008). Bei Vorliegen einer Myokarditis wird davon ausgegangen, dass ein großer Teil der erhöhten Expression von OPN im Myokard auf eingewanderte Makrophagen und Fibroblasten zurückzuführen ist (Singh *et al.*, 1999). Interstitielle inflammatorische Infiltrationen konnte sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel für das MCT-Modell bereits nachgewiesen werden (Schultze, 1998; Akhavein *et al.*, 2007). In Folge von

Inflammation kann OPN myokardiale Fibrose und Remodeling induzieren. Das Vorliegen von Fibrose ist für das MCT-Modell jedoch nicht eindeutig geklärt.

Auch in den Lungen konnte im MCT-Modell eine Hochregulation der Genexpression von OPN beobachtet werden. Basal wird OPN in der Lunge von bronchialen Epithelzellen und vereinzelt Makrophagen exprimiert. Bei pathophysiologischen Veränderungen wird OPN in verletztem Epithel, in alveolaren und interstitiellen Makrophagen, in T-Zellen sowie im Endothel von pulmonalen Gefäßen exprimiert (O'Regan, 2003). Eine Bedeutung von OPN für vaskuläres Remodeling konnte im Tiermodell nachgewiesen werden. Hier wurde gezeigt, dass OPN eine Verdickung der Media und eine Neuformierung der Intima nach Verletzung induziert (Isoda *et al.*, 2002). Im MCT-Modell wurde auch in der Niere eine erhöhte Expression von OPN detektiert. Dies ist vermutlich auf die toxische Schädigung der Niere durch MCT zurückzuführen, da bereits gezeigt wurde, dass bei Vorliegen einer Nierenschädigung ein Anstieg der Genexpression von OPN in Tieren und Patienten detektiert werden kann (Pichler *et al.*, 1995; Hudkins *et al.*, 2001).

Analog zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse wurden nur im MCT-Modell erhöhte OPN Plasmakonzentrationen nachgewiesen, die unter Sildenafil-Therapie signifikant gesenkt waren. Auf Genexpressionsebene wurde in den Ventrikeln ein signifikanter Therapie-Effekt von Sildenafil beobachtet. In der Niere lag eine Tendenz zu niedrigeren Expressionen von OPN vor. Kein Therapie-Effekt auf Expressionsebene war in der Lunge messbar. Auf Grund des Ausbleibens eines Anstiegs der OPN-Plasmakonzentration im PA Banding-Modell und basierend auf den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse in der Lunge und der Niere, scheint die OPN-Plasmakonzentration im MCT-Modell die Summe von fibrotischen bzw. inflammatorischen Prozessen in verschiedenen Organen zu sein und somit kein spezifischer Marker für kardiale Veränderungen.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) repräsentieren den Großteil des proteolytischen Systems der Extrazellulärmatrix und sind zusammen mit ihren Inhibitoren (TIMPs) maßgeblich an Remodeling Prozessen beteiligt (Polyakova *et al.*, 2004). MMP-2 ist eine Gelatinase, die zur Familie Matrix-degradierender Proteasen zählt und in den meisten Geweben exprimiert wird. Funktionell erfolgt durch MMP-2 eine Degradierung von denaturierten Kollagenen, von intaktem Kollagen Typ IV, sowie weiterer Proteine der Extrazellulärmatrix (Kandasamy *et al.*, 2010). Eine Regulation von MMP-2 findet bereits auf transkriptioneller Ebene statt (Kandasamy *et al.*, 2010). Post-translational erfolgt eine Inhibition und somit Kontrolle der MMP Aktivität über TIMPs, sowie α 2-Makroglobulin (Spinale *et al.*, 2002). Im Tiermodell konnte bereits eine Beteiligung von MMPs und im speziellen von MMP-2 an Remodeling Prozessen in pulmonalen Gefäßen und somit an der Progression der PAH nachgewiesen werden (Frisdal *et al.*, 2001; Schermuly *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde im Tiermodell

eine Hochregulation der MMP-2 Aktivität bei Druckbelastungs-induzierter Hypertrophie gezeigt (Matsusaka *et al.*, 2006; Umar *et al.*, 2007). Divergierend dagegen sind die Daten bezüglich der Expression und Aktivität von MMP-2 bei Herzinsuffizienz (Peterson *et al.*, 2001; Tozzi *et al.*, 2007). Trotz der beschriebenen ausgeprägten Regulation auf transkriptionaler Ebene und dem Nachweis der Beteiligung von MMP-2 an der Progression der PAH konnten weder im MCT-Modell noch im PA Banding-Modell größere Effekte auf Genexpressionsebene in den untersuchten Organen detektiert werden. Allein in der Placebogruppe des MCT-Modells und in der 1,3 mm-Bandinggruppe der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells war im rechten Ventrikel ein leichter Anstieg der MMP-2 Expression zu verzeichnen. In der zweiten PA Banding-Studie konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden. Ein Therapie-Effekt durch Sildenafil wurde auf Genexpressionsebene nicht beobachtet. Entgegen der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse konnte ein signifikanter Anstieg der MMP-2 Konzentration im Plasma MCT behandelter Tiere gemessen werden, der unter Therapie mit Sildenafil signifikant gesenkt war. Im PA Banding-Modell konnte dagegen kein Therapie-Effekt beobachtet werden.

Auf Grund dieser Daten scheint MMP-2 im Plasma kein geeigneter Marker zu sein, rechtsventrikuläre Hypertrophie und strukturelle Veränderungen eines spezifischen Organes in den untersuchten Tiermodellen abzubilden. Die Regulation und Aktivierungs- bzw. Inhibitionsprozesse der MMPs weisen eine hohe Komplexität auf, die neben dem ubiquitären Vorhandensein von MMP-2 in den meisten Geweben eine klare Zuordnung des MMP-2 Anstiegs im Plasma zu pathophysiologischen Veränderungen eines spezifischen Organs erschweren.

Die TIMPs liegen sowohl als lösliche Proteine, als auch in Assoziation mit Membran-gebundenen Proteinen vor (Baker *et al.*, 2002). TIMPs inhibieren durch Komplexierung die aktive Form der MMPs, wobei es keine hochspezifischen Bindungspräferenzen zu einer bestimmten MMP gibt (Kandasamy *et al.*, 2010). Darüber hinaus modulieren TIMPs Zellwachstum und -überleben, wobei diese Effekte nicht eindeutig der Inhibition der MMP Aktivität zuzuordnen sind (Baker *et al.*, 2002). Eine Hochregulation der TIMP-1 Expression konnte sowohl in Tiermodellen der PAH (Schäfer *et al.*, 2009), als auch in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen aus Lungen von PAH Patienten nachgewiesen werden (Lepetit *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte im MCT-Modell gezeigt werden, dass die Applikation von humanem TIMP-1 zu einer signifikanten Reduktion des pulmonalvaskulären Remodelings und einer Verminderung der MMP Aktivität führt (Viellard-Baron *et al.*, 2003). Eine Hochregulation der TIMP-1 Genexpression war in den rechten Ventrikeln des PA Banding-Modells und stärker ausgeprägt im MCT-Modell zu beobachten. Im MCT-Modell war die Genexpression darüber hinaus auch im linken Ventrikel und in der Lunge signifikant erhöht. Der Anstieg der TIMP-1 Genexpression im linken Ventrikel implementiert eine strukturelle Veränderung, eventuell auf Grund einer toxischen Schädigung durch MCT. Anhand der Zeitverlauf-Studie wurde er-

sichtlich, dass eine Hochregulation der TIMP-1 Expression im linken Ventrikel in der frühen Versuchsphase auch im PA Banding-Modell auftrat und sich im weiteren Versuchsverlauf wieder abschwächte. Die Analyse der Plasmakonzentrationen von TIMP-1 ergab dagegen nur im MCT-Modell einen Anstieg in der Placebogruppe, der unter Sildenafil-Therapie signifikant gesenkt war. Der Therapie-Effekt von Sildenafil konnte im MCT-Modell auf Genexpressionsebene in den Ventrikeln, nicht jedoch in der Lunge detektiert werden, was in Übereinstimmung steht mit den Ergebnissen zu COL1A2, COL3A1 und OPN.

Basierend auf dem Ausbleiben eines Anstiegs der Plasmakonzentration im PA Banding-Modell kann für TIMP-1 geschlossen werden, dass die Erhöhung der Plasmakonzentration im MCT-Modell nicht allein auf druckbedingte kardiovaskuläre Remodelingprozesse zurückzuführen ist. Die Senkung der TIMP-1 Plasmakonzentration unter der Therapie mit Sildenafil scheint jedoch zumindest teilweise auf kardialen Veränderungen zu basieren. Ein positiver Therapie-Effekt von Sildenafil in den Lungen MCT behandelte Tiere war, ebenso wie bei COL1A2, COL3A1, MMP-2 und OPN, für TIMP-1 auf Genexpressionsebene nicht zu beobachten. Dies steht in Diskrepanz zu der Hypothese eines direkten Anti-Remodeling Effektes von Sildenafil in den pulmonalen Gefäßen in diesem Modell (Schermyly *et al.*, 2004).

Anhand der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells konnte gezeigt werden, dass eine ausgeprägte Hochregulation der Remodeling-Marker in der frühen Versuchsphase in den rechten Ventrikeln der 1,3 mm-Bandinggruppe vorlag. Dies könnte auf eine Verletzung von Muskelfasern durch die akute Druckbelastung direkt nach der Operation und eine nachgeschaltete Wundheilung zurückzuführen sein. In OPN Knock-out Mäusen konnte eine Beteiligung von OPN an der Wundheilung für Läsionen der Haut nachgewiesen werden (Liaw *et al.*, 1998). Für MMP-2 wurde eine Beteiligung an der Wundheilung und Narbenbildung nach Myokardinfarkten beschrieben (Spinale *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass etablierte Marker für druckinduzierte Hypertrophie, wie ANP und BNP im Plasma sowie echokardiographische Methoden im MCT- und PA Banding-Modell die Pathophysiologie der Modelle grundlegend darstellen. Diese Marker sind somit von hoher Aussagekraft und potentielle Marker für klinische Studien. Zusätzliche Marker zur Charakterisierung struktureller Veränderungen, wie MMP-2, TIMP-1 und OPN, waren dagegen in den untersuchten Tiermodellen von geringer Aussagekraft, da weder ein Bezug zu pathophysiologischen Veränderungen eines spezifischen Organes vorlag, noch ausgeschlossen werden konnte, dass eine Regulation der Marker auf Modell-bedingten toxischen/inflammatorischen Prozessen beruht.

5 Zusammenfassung

Die PAH ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die in der Regel erst spät diagnostiziert wird. Geprägt ist die PAH durch einen Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes. Die daraus resultierende Nachlast-Erhöhung führt zu einer Druckbelastung des rechten Ventrikels, die zunächst durch Hypertrophie kompensiert wird, jedoch bei einem chronischen Krankheitsverlauf zu einer Rechtsherzinsuffizienz führt, die die Haupttodesursache der PAH ist. Trotz verschiedener Optionen der Diagnose und Evaluation des Schweregrades der PAH liegt die durchschnittliche Zeit zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung bei zwei Jahren. Die Patienten befinden sich zu diesem Zeitpunkt bereits in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Dies begründet den Bedarf an Biomarkern zur möglichst frühen Diagnose und zur Aufklärung der Struktur und Pathophysiologie der Grunderkrankung.

Die Evaluation potentieller Biomarker erfolgte im MCT- und PA Banding-Modell. Auf diese Weise konnten Marker sowohl hinsichtlich ihrer Regulation durch toxisch induzierte pathophysiologische Veränderungen der Lungengefäße und konsequenter rechtsventrikulärer Beeinträchtigungen (MCT-Modell), als auch hinsichtlich einer isolierten pathophysiologischen Druckveränderung des rechten Ventrikels (PA Banding-Modell) vergleichend untersucht werden. Anhand einer Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells mit zwei verschiedenen Stenosegraden (1,3 und 1,7 mm) konnten die akute und chronische Regulation potentieller Biomarker sowie die Abhängigkeit vom Stenosegrad (Grad der Nachlasterhöhung) analysiert werden. Die Therapie mit Sildenafil diente zur Überprüfung eines *Response-to-treatment* der Marker.

Im MCT und im PA Banding-Modell (Stenosedurchmesser: 1,3 mm) lag ein annähernd äquivalent erhöhter RVP vor, der konsequent zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie sowie zu einer für Nager typischen Hyperkontraktilität ($dP/dt \max$) und Hyperrelaxation ($dP/dt \min$) führte. Während im MCT-Modell diese Veränderungen auf ein toxisch bedingtes Remodeling und einen erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand zurückzuführen waren, lag im PA Banding-Modell eine rein mechanisch induzierte Druckbelastung in Abhängigkeit des Stenosegrades bereits in der frühen Versuchsphase vor. Veränderungen der intrazellulären Calcium-Homöostase, hier insbesondere repräsentiert durch die Genexpression von SERCA-2 und TRPC-6, sowie ein Shift kontraktile Elemente (MYHCA zu MYHCB) in Richtung einer energieökonomischeren Form konnten im PA Banding-Modell (Stenosedurchmesser 1,3 mm) bereits in der frühen Phase, ausgeprägter jedoch im MCT-Modell nachgewiesen werden. Dies stimmt überein mit den Literaturangaben bezüglich einer verminderten kontraktilen Reserve im MCT-Modell. Basierend auf den erhobenen Daten und übereinstimmend mit Literaturangaben befanden sich die Tiere beider Modelle im Stadium der kompensierten Hypertrophie. Im MCT-Modell zeigten sich jedoch auf Genexpressions-

ebene, deutlicher als im PA Banding-Modell, erste Anzeichen einer entstehenden Insuffizienz. Im MCT-Modell traten daneben modellbedingte Begleiterscheinungen, wie eine anhand der Marker KIM-1 und LCN-2 nachgewiesene Nierenschädigung, auf.

Sowohl über die echokardiographische Messung der pulmonalarteriellen Flussgeschwindigkeit (PAF) im PA Banding-Modell als auch über die Bestimmung der pulmonalarteriellen Akzelerationszeit (PAAT/CL) im MCT-Modell konnten nicht-invasiv Aussagen über druckabhängige Veränderungen im rechten Ventrikel getroffen werden. Die PAF zeigte sich abhängig vom Stenosegrad und war ebenso wie der RVP bereits in der frühen Versuchsphase erhöht. Auf diese Weise konnte im Tiermodell bestätigt werden, dass echokardiographische Untersuchungen dieser Art zur Bewertung von rechtsventrikulärer Druckbelastung bei der PAH geeignet sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl ANP als auch BNP im Plasma zur Bewertung druckbedingter rechtsventrikulärer Veränderungen über die Zeit herangezogen werden können. Kardiales Remodeling konnte in den durchgeführten Tiermodellen anhand der Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN im Plasma nicht abgebildet werden. Eine Erhöhung dieser Marker im Plasma ist bei reinem druckinduzierten Remodeling, wie es im PA Banding-Modell vorliegt, nicht nachweisbar. Erhöhte Plasmaspiegel der Remodeling-Marker bei toxisch induzierter PAH werden zum Teil durch Veränderungen auf kardialer Ebene beeinflusst, jedoch kann auf Grund der Daten aus dem PA Banding-Modell keine klare Zuordnung zu myokardspezifischen Remodeling-Prozessen getroffen werden.

Ein *Response-to-treatment* konnte nur im MCT-Modell, nicht jedoch im PA Banding-Modell beobachtet werden. Neben einer Verbesserung hämodynamischer Parameter, der Endorgangewichte und der Genexpression von Markern der intrazellulären Calcium-Homöostase konnte ein positiver Effekt durch Sildenafil in den toxisch geschädigten Nieren MCT behandelte Tiere detektiert werden. Der Therapie-Effekt von Sildenafil konnte im MCT-Modell mit der PAAT/CL sowie ANP und BNP im Plasma abgebildet werden. Ebenso lag in diesem Modell eine Reduktion der Plasmakonzentrationen von MMP-2, TIMP-1 und OPN unter Sildenafil-Therapie vor.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass etablierte Marker für Druckbelastung, wie ANP und BNP im Plasma sowie echokardiographische Methoden, die Pathophysiologie des MCT- und PA Banding-Modells hervorragend darstellen konnten. Diese Marker sind auf der Grundlage der untersuchten Modelle von hoher Aussagekraft und sollten daher in klinischen Studien der PAH bestimmt werden. Für die Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN im Plasma konnte kein direkter Bezug zu pathophysiologischem Remodeling eines spezifischen Organs hergestellt werden. Diese Marker scheinen somit in den untersuchten präklinischen Modellen von geringer Aussagekraft zu sein. Es wird ersichtlich, dass die Evaluation von Biomarkern für die PAH noch am Anfang steht und weiterhin Forschungsbedarf vorliegt, um eine frühe

Diagnose der Erkrankung zu ermöglichen. Forschungsbedarf liegt auch in der Entwicklung prädiktiverer Tiermodelle, da die bisher verfügbaren Tiermodelle der PAH nicht die gesamte Pathophysiologie der Erkrankung abdecken können bzw., wie anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sehr deutlich wird, durch Faktoren beeinflusst werden, die bei der Erkrankung nicht relevant sind.

6 Literatur

- Abramowitz J, Birnbaumer L. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J*. 2009, **23**: 297-328
- Adachi S, Ito H, Ohta Y, Tanaka M, Ishiyama S, Nagata M, Toyozaki T, Hirata Y, Marumo F, Hiroe M. Distribution of mRNAs for natriuretic peptides in RV hypertrophy after pulmonary arterial banding. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1995, **268**: H162-H169
- Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Ann Rev Genom Hum Genet*. 2005, **6**: 185–216
- Akhavain F, St.-Michel EJ, Seifert E, Rohlicek CV. Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J Appl Physiol*. 2007, **103**: 287-295
- Allen JR, Carstens LA. Clinical signs and pathologic changes in crotalaria spectabilis-intoxicated rats. *Am J Vet Res*. 1970, **31**: 1059-1070
- Almeida FA, Suzuki M, Scarborough RM, Lewicki JA, Maack T. Clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factors in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1989, **256**: R469-R475
- Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research “work in progress”. *Circulation*. 2000, **102**: 2781-2791
- ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002, **166**: 111–117
- Badenhorst D, Maseko M, Tsotetsi OJ, Naidoo A, Brooksbank R, Norton GR, Woodiwiss AJ. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodeling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res*. 2003, **57**: 632-641
- Badesch DB, Champion HC, Sanchez MAG, Hoepfer MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009, **54**: 55-66
- Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of Kidney Injury Molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*. 2002, **277**: 39739-39748
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002, **115**: 3719-3727
- Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*. 1996, **334**: 296–302.
- Bee D, Wach RA. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Respir Physiol*. 1984, **56**: 91-103
- Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007, **117**: 568-575

- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001, **69**: 89-95
- Boogaard HJ, Abe K, Noordegraaf AV, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* 2009a, **135**: 794-804
- Bogaard HJ, Natarajan H, Henderson SC, Long CC, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation.* 2009b, **120**: 1951-1960
- Boomsma F, van den Meiracker AH. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. *Cardiovasc Res.* 2001, **51**: 442-449
- Braun MU, Szalai P, Strasser RH, Borst MM. Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes. *Cardiovasc Res.* 2003, **59**: 658-667
- Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. Cardiac and vascular response after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharm.* 1998, **31**: 108-115
- Buttrick PM, Kaplan M, Leinwand LA, Scheuer J. Alterations in gene expression in the rat heart after chronic pathological and physiological load. *J Mol Cell Cardiol.* 1994, **26**: 61-67
- Carstens LA, Allen JR. Arterial degeneration and glomerular hyalinization in the kidney of monocrotaline-intoxicated rats. *Am J Pathol.* 1970, **60**: 75-92
- Champion HC, Michelakis ED, Hassoun PM. Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation.* 2009, **120**: 992-1007
- Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Ann Rev Physiol.* 1993, **55**: 77-95
- Chin KM, Kim NHS, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Art Dis.* 2005, **16**: 13-18
- Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Chung S, Chang YK, Lee SJ, Na KR, Kim SY, Shin YT, Lee KW. Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Am J Physiol - Renal Physiol.* 2009, **297**: F362-F370
- Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C, Qiu C. Bosentan, Sildenafil and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med.* 2006, **231**: 967-973
- Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque R, Lourenço AP, Melo-Rocha G, Vasques-Nóvoa F, Gillebert TC, Leite-Moreira A. Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Bas Res Cardiol.* 2009, **104**: 535-545
- Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 2002, **109**: S67-S79
- Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, Calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 1999, **96**: 611-614
- Daicho T, Yagi T, Marunouchi T, Ohara M, Takeo S, Tanonaka K. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Biol Pharmacol Bull.* 2009, **32**: 1378-1384

- deFilippi CR, Seliger SL, Maynard S, Christenson RH. Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality. *Clin Chem*. 2007, **53**: 1511-1519
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001, **107**: 1055-1061
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*. 2005, **25**: 6980-6989
- Dumitrescu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation*. 2006, **113**: 286-295
- Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Steendijk P, Hop WC, Schoemaker RG, Duncker DJ, Lamers JMJ, Helbing WA. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol*. 2006, **291**: H1580-H1586
- Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Bezstarosti K, Verhoeven AJM, Duncker DJ, Helbing WA, Lamers JMJ. Time dependent changes in cytoplasmic proteins of the right ventricle during prolonged pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2007, **43**: 197-209
- Fabiato A. Calcium-induced release from the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983, **245**: C1-C4
- Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, Corretti MC, Hassoun PM. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009, **179**: 615–621
- Frisdal E, Gest V, Viellard-Baron A, Levame M, Lepetit H, Eddahibi S, Lafuma C, Harf A, Adnot S, d'Ortho MP. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2001, **18**: 838-845
- Frey R, Mück W, Unger S, Artmeier-Brandt U, Weimann G, Wensing G. Single-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 63-2521: an ascending-dose study in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2008, **48**: 926-934
- Galiè 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. Sildenafil citrate therapy for pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2005, **353**: 2148-2157
- Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2009, **30**: 2493-2537
- Ghods F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol*. 1981, **240**: H149-H155
- Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002, **360**: 895-900

- Ghofrani HA, Weimann G, Frey R, Voswinckel R, Thamm M, Bölkow D, Weissmann N, Mück W, Unger S, Wensing G, Schermuly RT, Grimminger F. BAY 63-2521, an oral soluble guanylate cyclase stimulator, has a favourable safety profile, improves cardiopulmonary haemodynamics and has therapeutic potential in pulmonary hypertension. *BMC Pharmacology*. 2007, **7**: S8
- Ghofrani HA, Grimminger F. Soluble guanylate cyclase stimulation: an emerging option in pulmonary hypertension therapy. *Eur Respir Rev*. 2009, **18**: 35-41
- Ghofrani HA, Grimminger F. Modulating cGMP to treat lung diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009, **191**: 469-483
- González A, López B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N, Zudaire A, Díez J. Biochemical markers of myocardial remodeling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009, **81**: 509-518
- Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, Fleck E, Hsueh WA. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1997, **96**: 3063-3071
- Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008, **117**: 1717-1731
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002, **62**: 237-244
- Hanumegowda UM, Copple BL, Shibuya M, Malle E, Ganey PE, Roth RA. Basement membrane and matrix metalloproteinases in monocrotaline-induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2003, **76**: 237-246
- Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke WR. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 1998, **275**: 931-941
- Hardziyenka M, Campian ME, de Bruin-Bon R, Michel MC, Tan HL. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiography*. 2006, **19**: 1272-1279
- Hartley CJ, Redy AK, Madala S, Michael LH, Entman ML, Taffet GE. Doppler estimation of reduced coronary flow reserve in mice with pressure overload cardiac hypertrophy. *Ultrasound Med Biol*. 2008, **34**: 892-901
- Hasegawa K, Fujiwara H, Itoh H, Nakao K, Fujiwara T, Imura H, Kawai C. Light and electron microscopic localization of brain natriuretic peptide in porcine atrium. *Circulation*. 1991, **84**: 1203-1209
- Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. *Bas Res Cardiol*. 1997, **92**: 87-93
- Hébert TE. Signalling in cardiac disease: the molecular deficit at the heart of the problem. *Cardiovasc Res*. 2001, **50**: 7-9
- Hessel MHM, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol*. 2006, **291**: H2424-H2430
- Hill NS; Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*. 1997, **83**: 1209-1215

- Hofmann F, Bernhard D, Ludowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**: 137-162
- Huber LC, Fischler M, Distler O, Gay S, Speich R, Ulrich S. Pulmonal-arterielle Hypertonie - Aktuelle Therapieansätze. *Arzneimitteltherapie.* 2007, **25**: 364-373
- Hudkins KL, Le QC, Segerer S, Johnson RJ, Davis CL, Giachelli CM, Alpers CE. Osteopontin expression in human cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 2001, **60**: 635-640
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004, **43**: 13S-24S
- Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhashi M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res.* 2002, **91**: 77-82
- Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol.* 2002, **283**: H364-H371
- Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010, **85**: 413-423
- Kasahara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Sugito K, Kakusaka I. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J Cardiovasc Pharm.* 1997, **30**: 124-129
- Keogh A, Benza RL, Corris P, Dartevelle P, Frost A, Kim NH, Lang IM, Pepke-Zaba J, Sandoval J, Mayer E. Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009, **54**: S67–S77
- Kögler H, Hartmann O; Leineweber K, Nguyen van P, Schott P, Brodde OE, Hasenfuss G. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 2003, **93**: 230-237
- Kodama K, Adachi H. Improvement of mortality by long-term E4010 treatment in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999, **290**: 748-752
- Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J.* 2009, **34**: 888-894
- Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol.* 2004, **44**: 2390-2397
- Kurozumi T, Tanaka K, Kido M, Shoyama Y. Monocrotaline-induced renal lesions. *Exp Mol Pathol.* 1983, **39**: 377-386
- Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 2006, **116**: 3114-3126
- Laudi S, Trump S, Schmitz V, West J, McMurtry IF, Mutlak H, Christians U, Weimann J, Kaisers U, Steudel W. Serotonin transporter protein in pulmonary hypertensive rats treated with atorvastatin. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2007, **293**: L630-L638

- Lee KW, Jeong JY, Lim BJ, Chang YK, Lee SJ, Na KR, Shin YT, Choi DE. Sildenafil attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology*. 2009, **257**: 137-143
- Leeuwenburgh BPJ, Helbing WA, Steendijk P, Schoof PH, Baan J. Biventricular systolic function in young lambs subject to chronic systemic right ventricular pressure overload. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol*. 2001, **281**: H2697-H2740
- Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfuß A, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE. Ventricular hypertrophy plus neurohumoral activation is necessary to alter the cardiac β -adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res*. 2002, **91**: 1056-1062
- LekanneDeprez RH, van der Hoff MJB, de Boer PAJ, Ruijter JM, Maas AAW, Chamuleau RAFM, Lamers WH, Moorman AFM. Changing patterns of gene expression in the pulmonary trunk-banded rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998, **30**: 1877-1888
- Lepetit H, Eddahibi S, Frisdal E, Munaut C, Noel A, Humbert M, Adnot S, D'Ortho MP, Lafuma C. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2005, **25**: 834-842
- Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BLM. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*. 1998, **101**: 1468-1478
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995, **4**:357-362.
- Lock EA. Sensitive and early markers of renal injury: where are we and what is the way forward? *Toxicol Sci*. 2010, **116**: 1-4
- Lorenzen JM, Nickel N, Krämer R, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, Haller H, Hoepfer MM. Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Chest*. 2010, **139**: 1010-1017
- Lourenço AP, Roncon-Albuquerque R, Brás-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol*. 2006, **291**: H1587-H1594
- Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*. 1986, **324**: 473-476
- Marsboom GR, Janssens SP. Models for pulmonary hypertension. *Drug Discov Today*. 2004, **1**: 289-296
- Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. *Hypertension*. 2006, **47**: 711-717
- Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol*. 1980, **239**: H692-H702
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM; Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005, **365**: 1231-1238

- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes MM, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Am J Nephrol*. 2003, **14**: 2534-2543
- Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand A. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000, **86**: 386-390
- Morioka S, Honda M, Ishikawa S, Ishinaga Y, Yano S, Tanaka K, Moriyama K. Changes in contractile and non-contractile proteins, intracellular Ca²⁺ and ultrastructures during the development of right ventricular hypertrophy and failure in rats. *Jap Circ J*. 1992, **56**: 469-474
- Mukherjee D, Sen S. Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1990, **67**: 1474-1480
- Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, Lowry AS, Escobar GP, Lucas DG, Yarbrough WM, Zile MR, Spinale FG. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation*. 2003, **107**: 618-625
- Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest*. 1991, **87**: 1402-1412
- Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002, **137**: 1187-1194
- Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl J, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Alpert N, Periasamy M. Regulation of myocardial Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, **86**: 2966-2970
- Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Kuribayashi S, Hamada S, Kakishita M, Nakanishi N, Takamiya M, Kunieda T, Matsuo H, Kangawa K. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1998, **31**: 202-208
- Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 2000, **102**: 865-870
- Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens*. 1992, **10**: 1111-1114
- Nakayama H, Wilkin BJ, Bodi I, Molkentin JD. Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J*. 2006, **20**: 1660-1670
- Niizuma S, Iwanaga Y, Yahata T, Tamaki Y, Goto Y, Nakahama H, Miyazaki S. Impact of left ventricular end-diastolic wall stress on plasma B-type natriuretic peptide in heart failure with chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Clin Chem*. 2009, **55**: 1347-1353
- Nishida M, Kurose H. Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy. *Naun-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008, **378**: 395-406

- Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Gα12/13-mediated up-regulation of TRPC-6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem.* 2007, **282**: 23117-23128
- Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. *Internist.* 1999, **40**: 696-709
- Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Sitbon O, Speich R, Hoepfer M, Behr J, Winkler J, Seeger W, for the AIR Study Group. Inhaled iloprost in severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 2002, **347**: 322–329
- Olschewski H, Ghofrani HA, Enke B; Reichenberger F, Voswinkel R, Kreckel A, Ghofrani S, Wiedemann R, Schulz R, Grimminger F, Seer W. Medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Internist.* 2005, **46**: 341-349:
- O'Regan A. The role of osteopontin in lung disease. *Cyt Growth Fac Rev.* 2003, **14**: 479-488
- Palmer BM. Thick filament proteins and performance in human heart failure. *Heart Fail Rev.* 2005, **10**: 187-197
- Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien P, Sliskovic DR, Bocan TMA, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation.* 2001, **103**: 2303-2309
- Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennett WM, Couser WG, Johnson RJ. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 1995, **6**: 1186-1196
- Plestina R, Stoner HB. Pulmonary edema in rats given monocrotaline pyrrole. *J Pathol.* 1972, **106**: 235-249
- Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol.* 2004, **44**: 1609-1618
- Rademaker MT, Charles CJ, Kosoglou T, Protter AA, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol.* 1997, **273**: H2372-H2379
- Reid MR. Partial occlusion of the pulmonary aorta and inferior vena cava with the metallic band. Observations on changes in the vessel wall and in the heart. *J Exp Med.* 1924, **40**: 289-291
- Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990, **106**: 179-200
- Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, Vaziri ND. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int.* 2005, **68**: 2131-2142
- Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol.* 1988, **255**: H1484-H1491
- Rosenkranz S. Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clin Res Cardiol.* 2007, **96**: 527-541

- Roth RA, Dotzlaef LA, Baranyl B, Kuo CH, Hook JB. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lungs of rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981, **60**: 193-203
- Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, Kramer F, Lustig K, Milting H, Kast R, Klein M. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodeling. *Cardiovasc Res.* 2009, **82**: 30-39
- Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath, Seeger W, Grimminger F. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004, **169**: 39-45
- Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2008, **32**: 881-891
- Schoental R, Head MA. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. *Br J Cancer.* 1955, **9**: 229-237
- Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension – the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1998, Part B, **1**: 271-346
- Schultze AE, Wagner JG, White SM, Roth RA. Early indications of monocrotaline pyrrole-induced lung injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991, **109**: 41-50
- Sekarski N, Fridez P, Corno AF, Segesser von LK, Meijboom EJ. Doppler-guided regulation of a telemetrically operated adjustable pulmonary banding system. *J Am Coll Cardiol.* 2004, **44**: 1087-1094
- Seth M, Sumbilla C, Mullen SP, Lewis D, Klein MG, Hussain A, Soboloff J, Gill DL, Inesi G. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca²⁺ signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, **101**: 16683-16688
- Seyfarth T, Gerbershagen HP, Giessler C, Leineweber K, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE. The cardiac β -adrenoceptor–G–protein(s)–adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2000, **32**: 2315-2326
- Seymour AA, Norman JA, Asaad MM, Fennell SA, Abboa-Offei B, Little DK, Kratunis VJ, Delaney NG; Hunt JT, Di Donato G. Possible regulation of atrial natriuretic factor by neutral endopeptidase 24.11 and clearance receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990, **256**: 1002-1008
- Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, Bing OHL, Colucci WS. Myocardial osteopontin expression coincides with heart failure. *Hypertension.* 1999, **33**: 663-670
- Sitbon O, Humbert M, Jais X, loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005, **111**: 3105–3111.
- Spinale FG. Matrix metalloproteinase: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002, **90**: 520-530

- Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Ganten D, Wegner M. Renal and antihypertensive effects of neutral endopeptidase inhibition in transgenic rats with an extra renin gene. *Am J Hypertens.* 1996, **9**: 795-802
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001, **410**: 212-215
- Stasch JP, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br J Pharmacol.* 2002, **135**:344-355.
- Stasch JP, Hobbs AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009, **191**: 277-308
- Szalay G, Sauter M, Haberland M, Zuegel U, Steinmeyer A, Kandolf R, Klingel K. Osteopontin: a fibrosis-related marker molecule in cardiac remodeling of enterovirus myocarditis in the susceptible host. *Circ Res.* 2009, **104**: 851-859
- Taichmann DB, Mandel J. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Chest Med.* 2007, **28**: 1-22
- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001, **15**: 427-438
- Tozzi R, Palladini G, Fallarini S, Nano R, Gatti C, Presotto C, Schiavone A, Micheletti R, Ferrari P, Fogari R, Perlini S. Matrix metalloprotease activity is enhanced in the compensated but not in the decompensated phase of pressure overload hypertrophy. *Heart.* 2007, **20**: 663-669
- Tulevski II, Groenink M, van der Wall EE, van Velduisen DJ, Boomsma F, Stoker J, Hirsch A, Lemkes JS, Mulder BJM. Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction. *Heart.* 2001, **86**: 27-30
- Umar S, Hessel M, Steendijk P, Bax W, Schutte C, Schalij M, van der Wall E, Atsma D, van der Laarse A. Activation of signaling molecules and matrix metalloproteinases in right ventricular myocardium of rats with pulmonary hypertension. *Pathol Res Pract.* 2007, **203**: 863-872
- Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, Muniappa N, Thudium D, Gerhold D, Holder DJ, Bobadilla NA, Marrer E, Perentes E, Cordier A, Vonderscher J, Maurer G, Goering PL, Sistare FD, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotech.* 2009, **28**: 478-485
- Versluis JP, Heslinga JW, Sipkema P, Westerhof N. Contractile reserve but not tension is reduced in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol.* 2004, **286**: H979-H984
- Viellard-Baron A, Frisdal E, Raffestin B, Baker AH, Eddahibi S, Adnot S, D'Ortho MP. Inhibition of matrix metalloproteinase by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats. *Hum Gene Ther.* 2003, **14**: 861-869
- Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupius J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB. Right ventricular function and failure: report of a national heart, lung and blood institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation.* 2006; **114**: 1883-1891

Waller AH, Sanchez-Ross M, Kaluski E, Klapholz M. Osteopontin in cardiovascular disease: a potential therapeutic target. *Cardiol Rev.* 2010; **18**: 125-131

Wegner M, Ganten D, Stasch JP. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the effect of natriuretic peptides in renin transgenic rats. *Hypertens Res.* 1996, **19**: 229-238

Wessely E. Echokardiographie aktuell: Pulmonale Hypertonie. *J Kardiol.* 2003, **10**: 572-573

Wharton J, Strange JW, Møller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, **172**: 105-113

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases β_1 contractility, Ca sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002, **54**: 162-174

Wu X, Eder P, Chang B, Molkentin. TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, **107**: 7000-7005

Yap LB, Ashrafian H, Mukerjee D, Coghlan JG, Timms PM. The natriuretic peptides and their role in disorders of right heart dysfunction and pulmonary hypertension. *Clin Biochem.* 2004, **37**: 847-856

Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006, **84**: 509-521

Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Grupe J, Krahn T, Stasch JP, Leineweber K. Echocardiographic and soluble biomarkers for right heart hypertrophy due to pressure overload. *Cardiovasc Res.* (under Review)

Poster

Grupe J, Neumann A, Leineweber K. Time course of the pulmonary artery banding model monitored by pulmonary artery flow velocity: a possible non-invasive biomarker for disease progression in pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 2010, 31 (Abstract Supplement): 751

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt und somit wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Kirsten Leineweber für die Überlassung des spannenden Themas, die einmalige Betreuung und das beständige Streben, ihr Wissen an mich weiterzugeben. Vielen Dank für die geteilte Freude bei Erfolgserlebnissen ebenso wie die tröstenden Worte in Krisenzeiten.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Johannes-Peter Stasch für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Betreuung und Unterstützung. Ohne seinen Einsatz wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Thomas Krahn danke ich herzlich für seine Unterstützung und die Möglichkeit, meine Arbeit in der Abteilung Target Discovery - Biomarker durchzuführen.

Bei meinen lieben Kollegen aus dem Pharma-Forschungszentrum möchte ich mich für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank gilt Andrea Neumann, die mich vieles gelehrt hat und mir bei meinen Tierstudien treu zur Seite stand. Danken möchte ich auch Peter Hauenschild, Ina Flocke und Isabella Hutmacher für ihre Ratschläge, Hilfe bei den Messungen und die netten und humorvollen Gespräche. Yvonne Keim danke ich herzlich für die Übernahme der RIA-Messungen. Meinen „Zimmerkollegen“ Markus Keil und Martin Kretz danke ich für die vielen lustigen Stunden, die wir gemeinsam verbracht haben. Herrn Dr. Axel Kretschmer, Herrn Dr. Peter Ellinghaus, Herrn Dr. Frank Kramer, Frau Dr. Martina Delbeck, Frau Dr. Eva Becker und Herrn Dr. Werner Nickl danke ich für nette Gespräche und ihre fachliche Unterstützung.

Meinen Mitstreiterinnen Katrin Faye Nickel, Dr. Linda Hoffmann, Dr. Elodie Kienlen und Dr. Wiebke Janssen danke ich für tolle Gespräche, viele schöne Mittagspausen und die geduldige Einführung in tierexperimentelles Arbeiten (auch aus der Ferne). Meiner Freundin und Kollegin Dr. Sina Habbel danke ich für einen Grund mehr jeden Morgen zur Arbeit zu fahren und den Rückhalt, den sie mir gegeben hat.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Sabine. Ohne ihre Liebe, ihre Zusprache und ihr Vertrauen in mich, wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Köln, den 11. Juni 2011

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Grupe
Geburtsdatum	17.08.1982
Geburtsort	Dormagen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

08.1989-06.1993	Grundschule in Rheinfeld, Dormagen
08.1993-06.2002	Bettina-von-Arnim Gymnasium, Dormagen
	Abschluss: Abitur (Note 1,2)

Akademische Ausbildung

10.2002-10.2006	Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
11.2006-04.2007	Schiller-Apotheke in Hamburg (1. Hälfte des Praktischen Jahres)
05.2007-10.2007	Abteilung Marketing/Antiinfektiva der Bayer Vital GmbH in Leverkusen (2. Hälfte des Praktischen Jahres)
	Abschluss: Approbation als Apothekerin (Note 2,3)
01.2008-12.2010	Promotion in der Abteilung Target Discovery/Biomarker in der Pharmakologisch - Toxikologischen Forschung der Bayer Schering Pharma AG in Wuppertal
	Thema: Biomarker in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie
	Betreuung der Promotion durch Frau PD Dr. Kirsten Leineweber

Köln, den 11. Juni 2011

Anhang 1: Relative Genexpressionen im linken und rechten Ventrikel, in der Lunge und der Niere der Remodeling-Marker COL1A2 und COL3A1, sowie der Marker RCN-1, TRPC-3 und TRPC-4 im MCT-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=11-14). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	MCT (Linker Ventrikel)			MCT (Rechter Ventrikel)			MCT (Lunge)			MCT (Niere)		
	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
COL1A2	100 \pm 7,5	131 \pm 18	88 \pm 6,5*	100 \pm 8,9***	230 \pm 26	160 \pm 20*	100 \pm 10**	141 \pm 8,8	158 \pm 9,3	100 \pm 4,6***	68 \pm 5,6	87 \pm 4,2**
COL3A1	100 \pm 10	134 \pm 14	102 \pm 10	100 \pm 10***	225 \pm 26	164 \pm 18*	100 \pm 15*	152 \pm 11	184 \pm 17	100 \pm 5,7	78 \pm 9,3	114 \pm 8,3**
TRPC-3	100 \pm 5,8	82 \pm 5,8	84 \pm 5,6	100 \pm 12***	40 \pm 6,2	59 \pm 8,1**						
TRPC-4	100 \pm 7,7***	56 \pm 4,7	78 \pm 5,5*	100 \pm 8,8***	32 \pm 6,6	55 \pm 10***						
RCN-1	100 \pm 7,1**	153 \pm 11	117 \pm 10*	100 \pm 13***	469 \pm 52	326 \pm 35*						

Anhang 2: Relative Genexpressionen im linken und rechten Ventrikel, in der Lunge und der Niere der Remodeling-Marker COL1A2 und COL3A1 sowie der Marker RCN-1, TRPC-3 und TRPC-4 im PA Banding-Modell, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt (n=10-12). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Placebo.

	PA Banding (Linker Ventrikel)			PA Banding (Rechter Ventrikel)			PA Banding (Lunge)			PA Banding (Niere)		
	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil	Kontrolle	Placebo	Sildenafil
COL1A2	100 \pm 6,0	94,1 \pm 5,4	99 \pm 9,6	100 \pm 5,1**	186 \pm 21	166 \pm 20	100 \pm 6,7	106,7 \pm 5,9	72,6 \pm 7,1**	100 \pm 5,9	105,3 \pm 5,2	104,8 \pm 3,9
COL3A1	100 \pm 8,2	83 \pm 6,4	86 \pm 9,9	100 \pm 7,3***	215 \pm 26	147 \pm 21*	100 \pm 9,1	105,5 \pm 8,7	63,1 \pm 8,0**	100 \pm 4,7	103,3 \pm 7,5	90,2 \pm 5,0
TRPC-3	100 \pm 7,7**	68 \pm 5,1	68 \pm 4,4	100 \pm 5,1	87 \pm 7,0	67 \pm 5,9*						
TRPC-4	100 \pm 11	84 \pm 4,3	81 \pm 6,7	100 \pm 6,7	113 \pm 11	84 \pm 9,1						
RCN-1	100 \pm 10,*	75 \pm 5,9	65 \pm 5,3	100 \pm 7,4***	221 \pm 24	138 \pm 24**						

Anhang 3: Hämodynamik Parameter der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm Banding n=6, 1,3 mm Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
RVP [mmHg]	27,1 \pm 4,4	24,7 \pm 2,5	26,8 \pm 1,2	26,7 \pm 4,9	37,4 \pm 4,9**	38,4 \pm 7,6**	41,5 \pm 8,7*	44,4 \pm 3,0**	60,2 \pm 3,3***###	77,4 \pm 5,4***###	79,5 \pm 8,7***###	75,4 \pm 9,9***###
RVEDP [mmHg]	3,3 \pm 2,7	1,9 \pm 2,2	2,6 \pm 1,4	2,7 \pm 2,0	3,4 \pm 1,1	3,3 \pm 2,1	3,5 \pm 0,8	3,8 \pm 2,4	5,6 \pm 1,8	6,4 \pm 2,3*#	7,5 \pm 2,6**##	6,6 \pm 2,0
dP/dt max [mmHg/s]	1265 \pm 167	561 \pm 15	1237 \pm 163	1166 \pm 320	1833 \pm 463	861 \pm 163*	1651 \pm 461	1583 \pm 202*	2055 \pm 139*#	1532 \pm 174***###	2866 \pm 617**##	2182 \pm 298***##
dP/dt min [mmHg/s]	-965 \pm 224	-550 \pm 11	-1080 \pm 29	-926 \pm 352	-1486 \pm 346*	-856 \pm 172*	-1569 \pm 520	-1595 \pm 223**	-1984 \pm 115***##	-1618 \pm 178***###	-2785 \pm 246***###	-2232 \pm 322***##
PAF [mm/s]	960 \pm 131	913 \pm 139	894 \pm 61	1009 \pm 161	2469 \pm 415***	2941 \pm 242***	3013 \pm 376***	3170 \pm 365***	3445 \pm 472***###	4055 \pm 296***###	4154 \pm 376***###	3996 \pm 374***###
Bpsys [mmHg]	96,0 \pm 16,6	140,4 \pm 10,6	84,5 \pm 8,8	82,7 \pm 3,5	106,2 \pm 30,4	115,7 \pm 39,2	98,7 \pm 17,0	87,0 \pm 12,6	96,7 \pm 11,0	123,9 \pm 38,2	103,2 \pm 32,5	73,4 \pm 8,6
Bpdia [mmHg]	71,0 \pm 16,5	111,4 \pm 4,8	75,1 \pm 7,6	54,1 \pm 5,7	77,6 \pm 25,2	85,3 \pm 35,8	75,1 \pm 19,2	52,5 \pm 17,6	73,3 \pm 11,2	89,6 \pm 25,0	73,8 \pm 27,3	45,2 \pm 5,5
Herzfrequenz [BPM]	319 \pm 45	348 \pm 10	324 \pm 23	277 \pm 39	342 \pm 38	324 \pm 95	241 \pm 93	260 \pm 32	278 \pm 23	279 \pm 96	293 \pm 66	231 \pm 19

Anhang 4: KG, Tibiallänge, Endorgangewichte normiert auf die Tibiallänge und Quotient RV/(LV + S) in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm Banding n=6, 1,3 mm Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
KG [g]	290,0 \pm 5,3	353,7 \pm 22,9	374,7 \pm 6,7	401,7 \pm 14,3	284,3 \pm 8,8	329,8 \pm 17,0	377,3 \pm 26,8	405,5 \pm 20,4	278,7 \pm 12,1	336,3 \pm 12,9	371,3 \pm 18,1	400,7 \pm 27,8
Tibiallänge [mm]	32,8 \pm 0,1	35,4 \pm 0,5	35,8 \pm 0,4	37,8 \pm 0,6	33,1 \pm 0,6	35,2 \pm 0,4	36,6 \pm 0,6	37,3 \pm 0,6	33,1 \pm 0,3	34,8 \pm 0,5	36,3 \pm 0,5	37,3 \pm 0,8
Herz [mg/mm]	24,7 \pm 2,1	25,3 \pm 1,5	27,0 \pm 2,0	29,3 \pm 1,5	27,3 \pm 2,0	29,0 \pm 2,2*	31,5 \pm 2,1	33,8 \pm 1,9*	32,2 \pm 1,7***###	34,8 \pm 2,2***##	37,5 \pm 3,9***##	40,5 \pm 3,0***###
Linkes Atrium [mg/mm]	0,87 \pm 0,03	0,79 \pm 0,13	0,86 \pm 0,07	1,00 \pm 0,01	0,87 \pm 0,06	0,92 \pm 0,10	0,85 \pm 0,20	0,92 \pm 0,11	0,82 \pm 0,14	0,87 \pm 0,08	0,91 \pm 0,22	0,90 \pm 0,15
Rechtes Atrium [mg/mm]	1,8 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	2,0 \pm 0,4	2,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,5	3,0 \pm 0,6***##	3,5 \pm 0,9***##	4,1 \pm 1,0***##	4,6 \pm 0,9***###
Linker Ventrikel [mg/mm]	11,5 \pm 1,0	11,3 \pm 1,5	12,5 \pm 1,2	14,1 \pm 1,3	12,1 \pm 1,4	12,8 \pm 1,1	13,7 \pm 1,9	15,4 \pm 1,2	13,3 \pm 1,3	14,2 \pm 0,9**#	14,4 \pm 2,3	15,4 \pm 2,1
Rechter Ventrikel [mg/mm]	6,0 \pm 0,75	6,2 \pm 0,3	6,2 \pm 0,8	7,3 \pm 0,6	8,0 \pm 0,8***	8,6 \pm 1,2**	10,0 \pm 0,9***	10,7 \pm 1,0***	11,5 \pm 0,3***###	12,8 \pm 1,1***###	13,8 \pm 0,8***###	15,9 \pm 1,2***###
RV/(LV + S) [mg/mg]	0,32 \pm 0,02	0,33 \pm 0,03	0,28 \pm 0,05	0,33 \pm 0,01	0,42 \pm 0,04**	0,42 \pm 0,04*	0,47 \pm 0,04***	0,46 \pm 0,05**	0,57 \pm 0,04***###	0,59 \pm 0,05***###	0,61 \pm 0,06***###	0,67 \pm 0,06***###

Anhang 5: Endorgangewichte normiert auf die Tibialänge in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm Banding n=6, 1,3 mm Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Lunge [mg/mm]	1,23 \pm 0,03	1,29 \pm 0,05	1,36 \pm 0,09	1,47 \pm 0,1	1,23 \pm 0,08	1,29 \pm 0,1	1,43 \pm 0,1	1,53 \pm 0,14	1,27 \pm 0,05	1,29 \pm 0,12	1,35 \pm 0,22	1,51 \pm 0,14
Niere [mg/mm]	37,55 \pm 2,85	34,57 \pm 1,91	37,36 \pm 3,85	37,67 \pm 2,94	34,50 \pm 1,78	33,30 \pm 3,63	38,25 \pm 2,54	39,28 \pm 1,53	32,73 \pm 1,96	34,30 \pm 3,65	37,87 \pm 2,56	36,36 \pm 2,45

Anhang 6: Relative Genexpressionen im linken Ventrikel der Remodeling-Marker COL1A2 und COL3A1 sowie der Marker RCN-1, TRPC-3 und TRPC-4 in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
COL1A2	100 \pm 15	100 \pm 18	100 \pm 27	100 \pm 18	142 \pm 34	99 \pm 20	107 \pm 12	98 \pm 30	188 \pm 45*	144 \pm 16**##	138 \pm 18*#	129 \pm 21
COL3A1	100 \pm 37	100 \pm 21	100 \pm 40	100 \pm 34	147 \pm 36	105 \pm 21	96 \pm 12	101 \pm 46	181 \pm 25*	167 \pm 30**###	127 \pm 25	142 \pm 21
RCN-1	100 \pm 47	100 \pm 12	100 \pm 14	100 \pm 37	113 \pm 96	132 \pm 61	195 \pm 33***	396 \pm 172*	71 \pm 33	142 \pm 23	72 \pm 22###	239 \pm 82
TRPC-3	100 \pm 49	100 \pm 8,2	100 \pm 39	100 \pm 69	103 \pm 62	54 \pm 15	116 \pm 27	90 \pm 43	78 \pm 32	97 \pm 36	126 \pm 24	239 \pm 29**###
TRPC-4	100 \pm 36	100 \pm 12	100 \pm 4	100 \pm 48	63 \pm 28	45 \pm 15**	71 \pm 19	83 \pm 21	53 \pm 12	58 \pm 23**	77 \pm 14	158 \pm 42#

Anhang 7: Relative Genexpressionen im rechten Ventrikel der Remodeling-Marker COL1A2 und COL3A1 sowie der Marker RCN-1, TRPC-3 und TRPC-4 in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
COL1A2	100 \pm 10	100 \pm 20	100 \pm 15	100 \pm 19	60 \pm 44	54 \pm 28	42 \pm 13	48 \pm 12	551 \pm 105***###	277 \pm 113**##	201 \pm 61**###	248 \pm 71**###
COL3A1	100 \pm 27	100 \pm 17	100 \pm 34	100 \pm 30	83 \pm 49	84 \pm 63	52 \pm 17	68 \pm 30	674 \pm 181***###	347 \pm 124**##	224 \pm 75***##	272 \pm 87***##
RCN-1	100 \pm 28	100 \pm 17	100 \pm 43	100 \pm 8,5	88 \pm 39	94 \pm 13	158 \pm 40	182 \pm 41**	162 \pm 38*#	215 \pm 36***###	192 \pm 77	196 \pm 36**
TRPC-3	100 \pm 15	100 \pm 17	100 \pm 11	100 \pm 38	116 \pm 39	68 \pm 20	164 \pm 55	141 \pm 9*	61 \pm 17#	69 \pm 19	108 \pm 40	100 \pm 17##
TRPC4	100 \pm 32	100 \pm 28	100 \pm 51	100 \pm 13	76 \pm 20	105 \pm 21	139 \pm 24	150 \pm 23	47 \pm 22*	53 \pm 14**##	85 \pm 46	104 \pm 12

Anhang 8: Relative Genexpressionen der Remodeling-Marker COL1A2 und COL3A1 in der Lunge in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells, dargestellt in Prozent [%] bezogen auf den MW der jeweiligen Kontrolle. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
COL1A2	100 \pm 14	100 \pm 19	100 \pm 14	100 \pm 16	107 \pm 10	106 \pm 14	115 \pm 33	116 \pm 13	104 \pm 16	139 \pm 22*#	115 \pm 40	117 \pm 24
COL3A1	100 \pm 7	100 \pm 11	100 \pm 17	100 \pm 8	110 \pm 14	124 \pm 16*	125 \pm 40	105 \pm 12	102 \pm 12	153 \pm 14***##	121 \pm 39	109 \pm 21

Anhang 9: Plasmakonzentrationen der drucksensitiven Marker ANP und BNP sowie der Remodeling-Marker MMP-2, TIMP-1 und OPN in der Zeitverlauf-Studie des PA Banding-Modells. Die Daten sind als MW \pm SD dargestellt (Anzahl der Tiere pro Messtag: Kontrolle n=3, 1,7 mm-Banding n=5-6, 1,3 mm-Banding n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Banding vs. Kontrolle, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 1,3 mm-Banding vs. 1,7 mm-Banding.

	Kontrolle				1,7 mm-Banding				1,3 mm-Banding			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
ANP [pg/ml]	79,1 \pm 18,8	64,3 \pm 15,9	84,0 \pm 15,3	76,9 \pm 3,70	90,6 \pm 14,4	143,3 \pm 82,1	120,7 \pm 56,1	168,3 \pm 69,7	212,1 \pm 75,4***##	221,3 \pm 63,9*	311,3 \pm 95,7***##	279,6 \pm 72,1***#
BNP [pg/ml]	9,2 \pm 2,1	4,5 \pm 1,6	6,0 \pm 0,7	11,7 \pm 4,3	7,4 \pm 6,6	3,0 \pm 2,1	4,4 \pm 3,1	14,8 \pm 9,5	21,4 \pm 5,7***	18,0 \pm 10,4***	18,1 \pm 7,6***	20,8 \pm 3,8
MMP-2 [ng/ml]	214,2 \pm 16,6	202,0 \pm 3,1	209,0 \pm 10,8	195,4 \pm 8,5	225,6 \pm 16,4	211,8 \pm 19,1	218,8 \pm 35,3	189,8 \pm 29,9	244,3 \pm 20,9	214,8 \pm 17,7	251,2 \pm 21,9	208,9 \pm 16,2
TIMP-1 [ng/ml]	11,9 \pm 2,3	8,4 \pm 0,7	10,3 \pm 0,8	10,9 \pm 2,6	12,1 \pm 1,4	10,5 \pm 1,6	9,3 \pm 0,8	9,9 \pm 0,7	13,2 \pm 1,3	10,6 \pm 1,1	10,6 \pm 2,2	9,4 \pm 1,1
OPN [ng/ml]	11,2 \pm 1,0	14,2 \pm 3,8	14,8 \pm 3,9	12,5 \pm 1,9	14,0 \pm 1,9	15,1 \pm 1,7	14,1 \pm 2,8	13,4 \pm 2,1	15,6 \pm 4,6	12,7 \pm 0,8	17,6 \pm 4,1	14,4 \pm 3,1