

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rechtsventrikuläre Hämodynamik und pulmonaler Phänotyp
transgener Mäuse mit Überexpression von human-Endothelin-1
und Knockout der endothelialen NO-Synthase

Right ventricular hemodynamics and pulmonary phenotype
in transgenic mice with overexpression of human endothelin-1
and endothelial NO synthase knockout

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Arne Blancke

aus Oldenburg

Datum der Promotion: 21.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Abstrakt	10
Abstrakt Deutsch	10
Abstrakt Englisch	11
1 Einleitung	12
1.1 Pulmonale Hypertonie.....	12
1.1.1 Pathophysiologie der pulmonalen arteriellen Hypertonie	14
1.2 Idiopathische pulmonale Fibrose	15
1.2.1 Pathophysiologie der idiopathischen pulmonalen Fibrose	16
1.3 Pulmonale Hypertonie infolge einer idiopathischen pulmonalen Fibrose	17
1.4 Endothelin-System.....	18
1.5 Stickstoffmonoxid-System.....	19
1.6 Bedeutung von Endothelin und NO für die pulmonale Hypertonie.....	20
1.6.1 Rolle von Endothelin	20
1.6.2 Rolle von NO.....	21
1.7 Bedeutung von Endothelin und NO für die idiopathische pulmonale Fibrose	22
1.7.1 Rolle von Endothelin	22
1.7.2 Rolle von NO	22
1.8 Endothelin- und NO-Interaktion in den verwendeten Mausmodellen	23
1.8.1 Human-ET-1-transgene Mäuse (ET+/+)	23
1.8.2 eNOS-Knockout-Mäuse (eNOS-/-)	24
1.8.3 eNOS-Knockout-Mäuse mit Überexpression von human-Endothelin-1 (eNOS-/- ET+/+).....	25
1.8.4 Fragestellung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte.....	27
2.1.2 Chemikalien.....	28

2.2	Methoden	28
2.2.1	Versuchstiere	28
2.2.2	Tierhaltung.....	29
2.2.3	Organentnahme.....	29
2.2.4	Histologische Methoden	29
2.2.4.1	Fixierung.....	29
2.2.4.2	Paraffineinbettung	29
2.2.4.3	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	30
2.2.5	Färbungen	30
2.2.5.1	Sirius-Rot-Färbung	30
2.2.5.2	Histologische Analyse	31
2.2.5.2.1	Bestimmung der interstitiellen Fibrose	31
2.2.5.2.2	Bestimmung der perivaskulären Fibrose	31
2.2.5.3	Elastika-Van Gieson-Färbung	32
2.2.5.4	Histologische Analyse	33
2.2.5.4.1	Bestimmung der Media-Lumen-Ratio	33
2.2.6	Messung der Hämodynamik	33
2.2.6.1	Durchführung der rechtsventrikulären Herzkatheteruntersuchung	33
2.2.6.1.1	Messung der Hämodynamik mit dem Konduktanz-Katheter	33
2.2.6.1.2	Hämodynamische Parameter	34
2.2.6.1.3	Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.)	34
2.2.6.1.4	Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.).....	35
2.2.6.1.5	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Blutdruck (RVEDP)	35
2.2.6.1.6	Maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max.)	35
2.2.6.1.7	Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.)	35
2.2.6.1.8	Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau)	35
2.2.6.2	Herzfrequenz (bpm).....	35
2.2.7	Statistik	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Körpergewicht, Herzgewicht und Lungenfeuchtgewicht	37
3.1.1	Körpergewicht	37
3.1.1.1	Aufteilung nach Genotyp	37
3.1.1.2	Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	38
3.1.2	Absolutes und relatives Herzgewicht	39
3.1.2.1	Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp	39
3.1.2.2	Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	40

3.1.2.3	Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp	41
3.1.2.4	Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	42
3.1.3	Absolutes und relatives Lungenfeuchtgewicht	43
3.1.3.1	Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp	43
3.1.3.2	Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	44
3.1.3.3	Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp	45
3.1.3.4	Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	46
3.2	Histologische Analyse	47
3.2.1	Interstitielle Fibrose	47
3.2.1.1	Aufteilung nach Genotyp	47
3.2.1.2	Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	48
3.2.2	Perivaskuläre Fibrose	49
3.2.2.1	Aufteilung nach Genotyp	49
3.2.2.2	Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	49
3.2.3	Media-Lumen-Ratio	50
3.2.3.1	Aufteilung nach Genotyp	50
3.2.3.2	Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht	51
3.3	Hämodynamische Messungen	52
3.3.1	Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.)	52
3.3.2	Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.)	53
3.3.3	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)	54
3.3.4	Maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max.)	55
3.3.5	Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.)	56
3.3.6	Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau)	57
3.3.7	Herzfrequenz	58
4	Diskussion	59
4.1	Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit	59
4.2	Diskussion der Methoden	59
4.2.1	Untersuchung des vaskulären Remodelings und der Fibrosebildung	59
4.2.2	Messung des rechtsventrikulären Blutdrucks und der Herzfunktion	60
4.2.3	Tiermodelle für menschliche Krankheiten	61
4.3	Diskussion der Ergebnisse	62
4.3.1	Körpergewicht, Herzgewicht und Lungengewicht	62
4.3.2	Vaskuläres Remodeling	63

4.3.3 Bestimmung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose	64
4.3.4 Rechtsventrikulärer Blutdruck und Herzfunktion	64
4.4 Schlussfolgerungen	65
5 Literaturverzeichnis	67
6 Eidesstattliche Versicherung	84
7 Lebenslauf	85
8 Danksagung.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1.	Nizza-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie 2013 (nach Sommer et al. (9)).....	14
Tabelle 3-1.	Perivaskuläre Fibrose – 1. und 2. Score – Aufteilung nach Genotyp	49
Tabelle 3-2.	Perivaskuläre Fibrose – 1. und 2. Score – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1. Vereinfachte schematische Darstellung einer rechtsventrikulären Druckkurve mit Messparametern der Hämodynamik.....	36
Abbildung 3-1. Körpergewicht – Aufteilung nach Genotyp.....	37
Abbildung 3-2. Körpergewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	38
Abbildung 3-3. Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp.....	39
Abbildung 3-4. Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	40
Abbildung 3-5. Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp.....	41
Abbildung 3-6. Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	42
Abbildung 3-7. Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp.....	43
Abbildung 3-8. Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	44
Abbildung 3-9. Relatives Lungenfeuchtgewicht Aufteilung nach Genotyp.....	45
Abbildung 3-10. Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	46
Abbildung 3-11. Interstitielle Fibrose – Aufteilung nach Genotyp.....	47
Abbildung 3-12. Interstitielle Fibrose – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	48
Abbildung 3-13. Media-Lumen-Ratio – Aufteilung nach Genotyp.....	50
Abbildung 3-14. Media-Lumen-Ratio – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht.....	51
Abbildung 3-15. Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.) – Aufteilung nach Genotyp.....	52
Abbildung 3-16. Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.) – Aufteilung nach Genotyp.....	53
Abbildung 3-17. Rechtsventrikulärer enddiastolische Druck (RVEDP) – Aufteilung nach Genotyp.....	54
Abbildung 3-18. Maximale rechtsventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max.) – Aufteilung nach Genotyp.....	55
Abbildung 3-19. Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.) – Aufteilung nach Genotyp.....	56
Abbildung 3-20. Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau) – Aufteilung nach Genotyp.....	57
Abbildung 3-21. Herzfrequenz – Aufteilung nach Genotyp.....	58

Abkürzungsverzeichnis

ADAMA	asymmetrisches Dimethyl-Arginin
BH4	Tetrahydrobiopterin
BPA	pulmonale Ballonangioplastie
CTGF	connective tissue growth factor
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
dP/dt max.	maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt min.	minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
ECE	Endothelin-converting enzyme
ECM	extracellular matrix
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FGF	fibroblast growth factor
HCl	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
L-NAME	N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester
NMRI	Naval Medical Research Institute
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PAWP	pulmonary artery wedge pressure
PCR	polymerase chain reaction
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PDGF	platelet derived growth factor
PGI2	Prostazyklin
PH	pulmonale Hypertonie
PVR	pulmonary vascular resistance
RCT	randomized controlled trial
RVEDP	rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
RVP max.	maximaler rechtsventrikulärer Druck
RVP min.	minimaler rechtsventrikulärer Druck

Tau	rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit
TGF- β	transforming growth factor beta
UIP	usual interstitial pneumonia
WT	Wildtyp

Abstrakt

Abstrakt Deutsch

Hintergrund: Endothelin-1 (ET-1) spielt als potenter Vasokonstriktor eine zentrale Rolle für die Kreislaufregulation. Weiter zeigt ET-1 in einer Vielzahl von Geweben mitogene, pro-fibrotische und inflammatorische Effekte. Als starker Vasodilatator der glatten Gefäßmuskulatur fungiert Stickstoffmonoxid (NO) als regulatorischer Gegenspieler von ET-1. Vermutlich spielen sowohl ET-1 als auch NO bei der Entstehung und dem Verlauf der pulmonalen Hypertonie (PH) und der Lungenfibrose eine Rolle. Die vorliegende Arbeit soll evaluieren, ob eine Überexpression von ET-1 in Kombination mit einer Ausschaltung seines Antagonisten NO zu einer PH bzw. zu einer Veränderung der rechtsventrikulären Herzfunktion führt. Außerdem soll untersucht werden, ob es unter diesen Bedingungen zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes oder arteriellen Remodeling kommt.

Methoden: Dazu wurden **1.** human-ET-1-transgene Mäuse mit einer ET-1-Überexpression (ET+/+), **2.** human-ET-1-transgene Mäuse mit simultanem Knockout der endothelialen NO-Synthase (eNOS^{-/-} ET+/+), **3.** Mäuse mit isoliertem eNOS-Knockout (eNOS^{-/-}) und **4.** Wildtyp Mäuse (WT) untersucht. Im Alter von 9 Monaten wurden das Körper-, Herz- und Lungenfeuchtgewicht der Tiere bestimmt. Die histologische Analyse umfasste die Bestimmung der interstitiellen Fibrose, perivaskulären Fibrose sowie der Media-Lumen-Ratio. Über eine Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden hämodynamische Parameter der Rechtsherzfunktion ermittelt.

Ergebnisse: ET+/+ Tiere zeigten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als WT und eNOS^{-/-} Tiere. Zusätzlich war das Gewicht der eNOS^{-/-} ET+/+ Tiere signifikant geringer als das der eNOS^{-/-} Tiere. Das relative Herzgewicht unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. ET+/+ Tiere hatten ein signifikant höheres relatives Lungenfeuchtgewicht als WT und eNOS^{-/-} Tiere. Bezüglich der interstitiellen Fibrose, der perivaskulären Fibrose und der Media-Lumen-Ratio ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Bei den hämodynamischen Parametern traten ebenfalls kaum Gruppenunterschiede auf, lediglich der minimale rechtsventrikuläre Druck lag bei ET+/+ Tieren signifikant höher als bei WT-Tieren.

Schlussfolgerung: In dem untersuchten human-ET-1-transgenen Mausmodell mit simultanem Knockout der endothelialen NO-Synthase führt die Überexpression von ET-1 in pulmonalen Endothelzellen bei gleichzeitigem NO-Mangel weder zur Entstehung einer PH noch zu einer interstitiellen Fibrose. Daher scheint dieses eNOS^{-/-} ET-1+/+ Mausmodell nicht zur Untersuchung der PH oder fibrosierender Lungenerkrankungen geeignet zu sein.

Abstrakt Englisch

Background: Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor and plays a pivotal role in regulating vascular tone. Moreover, ET-1 has mitogenic, profibrotic and proinflammatory effects in a variety of tissues. Nitric oxide (NO) has been identified as a potent vasodilator and relaxant in vascular smooth muscle cells. Hence, NO serves as the counterpart of ET-1 in regulating vascular function. ET-1 and NO have both been implicated in the pathogenesis of numerous diseases as for example pulmonary hypertension (PH) and lung fibrosis. The aim of this study was to investigate whether the combination of ET-1 overexpression and NO deficiency would lead to PH and changes in right ventricular function. Additionally, lung tissue was tested for fibrosis and arterial remodeling.

Methods: Four different mice groups were analysed: **1.** human-ET-1 transgenic mice with chronic overexpression of ET-1 (ET^{+/+}), **2.** human-ET-1 transgenic mice with additional knockout of endothelial NO synthase (eNOS^{-/-} ET^{+/+}), **3.** mice with sole knockout of eNOS (eNOS^{-/-}) and **4.** wild-type mice. In 9-month-old mice right ventricular function was assessed by right heart catheterization. Body weight, heart weight and wet lung weight were measured. Lung tissue was analysed for interstitial fibrosis, perivascular fibrosis and changes in media-lumen-ratio.

Results: The body weight was significantly lower in ET^{+/+} mice compared to WT and eNOS^{-/-} mice. Furthermore eNOS^{-/-} ET^{+/+} mice showed a significantly lower body weight than eNOS^{-/-} mice. No significant difference in relative heart weight was detected between the groups. The relative lung weight was significantly higher in ET^{+/+} mice compared to WT and eNOS^{-/-} mice. For interstitial fibrosis, perivascular fibrosis and media-lumen-ratio no significant differences were observed among all four groups. Hemodynamic measurements of right ventricular function only revealed a significantly higher minimal right ventricular pressure in ET^{+/+} mice compared to WT mice.

Conclusion: In the present study we investigated human-ET-1 transgenic mice with additional endothelial NO synthase knockout and found that the combination of ET-1 overexpression and NO deficiency does neither lead to PH nor lung fibrosis. In conclusion, this eNOS^{-/-} ET-1^{+/+} mouse model appears to be unsuitable for the analysis of PH or fibrotic lung diseases.

1 Einleitung

Im vaskulären Endothel der Lunge werden mit Endothelin-1 (ET-1) und Stickstoffmonoxid (NO) zwei Substanzen gebildet, die als physiologische Gegenspieler in einem komplexen Signalsystem den Gefäßtonus, die Zellproliferation und die Immunmodulation regulieren.

Obwohl ET-1 als einer der potentesten Vasokonstriktoren gilt, entwickelten ET-1 überexprimierende Mäuse in einem transgenen Mausmodell der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hocher überraschenderweise keine arterielle Hypertension (1). Quaschnig et al. belegten, dass in den human-ET-1 überexprimierenden Mäusen eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO besteht, die den vaso-konstriktorischen Einfluss der erhöhten ET-1-Expression antagonisiert (2). Laut Hocher et al. bilden die transgenen Mäuse das human-ET-1 auch im Lungengewebe mit der Folge einer altersabhängig vermehrten interstitiellen Fibrose und Inflammation (3).

Um die Effekte eines aktivierten ET-1-Systems ohne die antagonistische Kompensation durch NO zu untersuchen, eliminierte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hocher in dem transgenen Mausmodell den NO-Einfluss mit Hilfe des nicht-selektiven NO-Synthase-(NOS)-Inhibitors N(omega)-nitro-L-arginine methylester (L-NAME). Dabei trat bei den Tieren eine Aggravation der schon bekannten Lungenfibrose und Inflammation auf (4). Weiter entwickelte die Arbeitsgruppe durch die Kreuzung von Knockout-Mäusen für die endotheliale NOS (eNOS) mit ET-1-transgenen Mäusen ein Modell mit einer fixierten Imbalance zwischen dem ET-1- und NO-System. Diese eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tiere wiesen einen signifikant höheren Blutdruck auf als die Kontrollgruppen (5).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ET-1-transgene Mäuse einen pathologischen pulmonalen Phänotyp ausbilden und dass bei eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tieren das Gleichgewicht zwischen dem ET-1 und NO-System gestört ist. In der vorliegenden Arbeit soll an den eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäusen untersucht werden, ob das chronische Ungleichgewicht aus ET-1-Überexpression und NO-Defizienz zu Veränderungen im Lungenkreislauf und im Lungengewebe führt.

1.1 Pulmonale Hypertonie

Zur pulmonalen Hypertonie (PH) zählt eine Gruppe von Erkrankungen, die alle eine Druckerhöhung in der pulmonalen Strombahn aufweisen. Die PH betrifft circa 1 % der Weltbevölkerung (6). Nach der Nizza-Klassifikation von 2013 wird die PH in fünf Unterklassen eingeteilt, deren Ätiologie und Symptomatik zum Teil deutlich voneinander abweichen (Tab.1) (7). Unterschieden werden präkapilläre Formen der PH (Gruppe 1, 3, 4), postkapilläre Formen, die in erster Linie durch eine Linksherzstauung verursacht werden (Gruppe 2), und gemischte Formen (Gruppe 5 bzw.

andere Gruppen mit einer zusätzlichen prä- oder postkapillären Komponente). Ausschließlich Gruppe 1 wird als pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) bezeichnet (8).

Aufgrund der unterschiedlichen Pathophysiologie der PH-Formen ist für die Therapie und Prognose eine exakte Diagnosestellung und Zuordnung zu einer PH-Gruppe zwingend notwendig. Nur so kann eine unwirksame oder für den Patienten schädliche Behandlungsmethode vermieden werden.

Der Begriff PH bezeichnet eher ein Symptom als eine Erkrankung, da er lediglich eine Zustandsbeschreibung der Druckverhältnisse im kleinen Kreislauf darstellt.

Definitionsgemäß spricht man ab einem pulmonal-arteriellen Mitteldruck (mPAP) ≥ 25 mmHg in Ruhe von einer PH (7). Betroffene Patienten klagen zunächst über unspezifische Symptome wie Belastungsdyspnoe, Schwindel und Synkopen. Mit fortschreitender Krankheitsdauer kommt es aufgrund der chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels zu einem Cor pulmonale und einer Rechtsherzinsuffizienz bis hin zur Rechtsherzdekompensation.

Das wichtigste nicht-invasive Diagnoseverfahren der PH ist die Echokardiografie. Zur Diagnose einer PAH ist zusätzlich eine Rechtsherzkatheteruntersuchung unerlässlich, um die geforderten Diagnosekriterien pulmonal-arterieller Wedge-Druck (PAWP) und pulmonal-vaskulärer Widerstand (PVR) zu messen und eine Vasoreagibilitätstestung vorzunehmen (8).

Die medikamentöse Therapie der PH richtet sich nach der PH-Klassifikation. Aktuell ist nur für Gruppe 1 und Gruppe 4 eine medikamentöse PH-spezifische Therapie zugelassen. Bei Patienten, die den anderen PH-Gruppen zuzuordnen sind, ist die Behandlung der Grunderkrankung vorrangig (9). Für die Therapie der PAH stehen Medikamente aus vier Substanzklassen zur Verfügung: Phosphodiesterase-5-(PDE-5)-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Bosentan, Ambrisentan, Macitentan), Prostazykline bzw. Prostazyklin-Analoga (Iloprost, Epoprostenol, Treprostinil) und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (Riociguat). Die PH-Therapie mit einer zugrundeliegenden Linksherz- und/oder Lungenerkrankung beschränkt sich auf die Behandlung der Grunderkrankung(en) (10). Die chronisch thrombembolische PH kann bei rechtzeitiger Diagnosestellung operativ mittels pulmonaler Endarteriektomie kurativ behandelt werden (11). Für inoperable Patienten steht seit wenigen Jahren die pulmonale Ballonangioplastie (BPA) als interventionelle Behandlungsoption zur Verfügung (12). Medikamentös können diese Patienten auch mit Riociguat therapiert werden (13, 14).

Tabelle 1-1. Nizza-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie 2013 (nach Sommer et al. (9))

Nizza-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	
Einteilung	
Gruppe 1 Pulmonalarterielle Hypertonie	
1.1 Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie	
1.2 Hereditäre pulmonalarterielle Hypertonie	
1.3 Arzneimittel- und toxininduzierte pulmonalarterielle Hypertonie	
1.4 Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie, bei:	
1.4.1 Kollagenosen	
1.4.2 HIV-Infektion	
1.4.3 Portaler Hypertonie	
1.4.4 Kongenitaler Herzerkrankung	
1.4.5 Schistosomiasis	
1' Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose: idiopathisch, hereditär, medikamenten-/toxininduziert, assoziiert mit Kollagenosen/HIV	
1'' Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen	
Gruppe 2 Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen	
2.1 Systolische Dysfunktion	
2.2 Diastolische Dysfunktion	
2.3 Herzklappenerkrankungen	
2.4 Kongenitale oder erworbene Einfluss- oder Ausflusstraktverengungen des linken Herzens und kongenitale Kardiomyopathien	
2.5 Kongenitale oder Pulmonalvenenstenosen	
Gruppe 3 Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie	
3.1 Chronische obstruktive Lungenerkrankung	
3.2 Interstitielle Lungenerkrankung	
3.3 Andere restriktive und obstruktive gemischte pulmonale Erkrankungen	
3.4 Schlafapnoesyndrom	
3.5 Alveoläre Hypoventilation	
3.6 Chronische Höhenkrankheit	
3.7 Anlagebedingte Fehlbildungen	
Gruppe 4 Chronische thrombembolische pulmonale Hypertonie	
Gruppe 5 Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen	
5.1 Hämatologische Erkrankungen: chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Zustand nach einer Splenektomie	
5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose	
5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen	
5.4 Andere: pulmonale tumoröse thrombotische Mikroangiopathie, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit/ohne Dialyse, segmentale Pulmonale Hypertonie	

1.1.1 Pathophysiologie der pulmonalen arteriellen Hypertonie

Die PAH kann idiopathisch oder hereditär bzw. auf dem Boden einer der o.g. zusätzlichen Grunderkrankungen oder arzneimittelinduziert entstehen. Unabhängig von der Ätiologie weisen alle Formen typische pathophysiologische Veränderungen auf (15-17):

- erhöhte Kontraktilität der pulmonal-arteriellen Gefäße
- endotheliale Dysfunktion
- vaskuläres Remodeling mit Gefäßmuskelproliferation und Endothelhyperplasie
- In-situ-Thrombosen

- Störungen der Produktion und Deposition von Substanzen der extrazellulären Matrix
- vaskuläre Inflammation

Die für die PAH charakteristischen histopathologischen Veränderungen betreffen alle drei Schichten der Gefäßwand und beinhalten u.a. eine vollständige Okklusion des Gefäßlumens, plexiforme Läsionen und eine Mediahypertrophie. Die Adventitia ist durch Anreicherung von Kollagen unregelmäßig verdickt (18). Perivaskulär und interstitiell finden sich entzündliche Infiltrate mit Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen (19).

Zu Grunde liegen diesen Defekten des pulmonalen Gefäßsystems Störungen des NO-Signalwegs, des Endothelin-Signalwegs sowie des Prostazyklin- und Thromboxan- Signalwegs (20).

Zusammengefasst führt eine Imbalance aus einem Vasodilatator-Mangel (Prostaglandin, NO) bei gleichzeitig vermehrter Vasokonstriktion durch ein aktiviertes Endothelin-System zu einer progredienten Okklusion der Lungenstrombahn mit konsekutiver Gefäßwiderstandserhöhung (21). Der schleichend verlaufende Krankheitsprozess führt zunächst zu einer Störung der rechtsventrikulären Herzfunktion und am Ende zum Rechtsherzversagen bzw. zum Tod.

1.2 Idiopathische pulmonale Fibrose

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine progressiv verlaufende und stets zum Tode führende fibrosierende Lungengerüsterkrankung. Laut Klassifizierung internationaler Fachgesellschaften (American Thoracic Society, European Respiratory Society) zählt sie zu den idiopathischen interstitiellen Pneumonien (22). Die IPF gehört mit einer geschätzten Prävalenz von ca. 2–29 pro 100.000 Personen zu den häufigsten idiopathischen Pneumonien (23). Die Prognose ist mit einer mittleren Überlebensdauer von drei bis vier Jahren ungünstiger als die zahlreicher maligner Erkrankungen (24).

Führende Symptome der IPF sind eine schleichend einsetzende Belastungsdyspnoe in Begleitung eines trockenen Hustens. Die Diagnosesicherung erfolgt mittels hochauflösender Dünnschicht-Computertomografie und ggf. einer zusätzlichen Lungenbiopsie.

Die IPF ist nicht heilbar; der einzige kurative Therapieansatz besteht in einer Lungentransplantation (25). 2013 enthielt die deutsche SK2-Leitlinie zur Therapie der IPF mit dem anti-fibrotisch wirksamen Pirfenidon lediglich ein Medikament mit einer „schwach positiven“ Empfehlung (26). Zu einem Durchbruch in der pharmakologischen Therapie der IPF kam es in Deutschland 2015 mit der Zulassung des multi-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib. Aktuell gilt die IPF mit Nintedanib und Pirfenidon als medikamentös behandelbar. Seit 2017 werden beide Medikamente zur

Behandlung der IPF auch von der deutschen Leitliniengruppe empfohlen. Beide Medikamente können die IPF jedoch lediglich modulieren, indem sie eine Verschlechterung der Lungenfunktion verzögern ohne den Krankheitsprozess aufzuhalten oder gar umzukehren (27).

In zwei Phase-2 Studien mit rekombinantem humanen Pentraxin-2 vs. Placebo und dem monoklonalen Antikörper Pamrevlumab vs. Placebo kam es in den Interventionsgruppen zu positiven Effekten auf die Lungenfunktion, so dass weiterführende Studien empfohlen wurden (28, 29).

1.2.1 Pathophysiologie der idiopathischen pulmonalen Fibrose

Die Ätiologie der IPF ist bislang unbekannt. Das aktuelle Konzept zur Erklärung der Pathogenese beschreibt eine inadäquate Wundheilungsreaktion mit vorzeitiger Typ-II-Pneumozyten-Apoptose, in deren Folge es zu einer Fibroblasten-Proliferation, einer gesteigerten Kollagen-Synthese und schlussendlich zu einer irreversiblen Lungenfibrose kommt. Wiederholte, subklinische Mikroverletzungen des Alveolarepithels führen laut dieser Hypothese zu einem überschießenden, unkoordinierten Reparaturmechanismus (30). Hierbei produzieren überaktivierte Bronchial- und Alveolarepithelzellen Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Migration von Fibroblasten, die Transition von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (EMT) und die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten stimulieren. Diese Zellen sind für eine exzessive Produktion von extrazellulärer Matrix und dessen Ablagerung in Form von Kollagen im Lungeninterstitium verantwortlich (31-33). Der vernarbende Umbau führt zur progredienten Zerstörung der Lungenarchitektur. Wachstumsfaktoren, die bei der Entstehung der IPF identifiziert wurden, sind u.a. der Transforming growth factor beta (TGF- β), der Connective tissue growth factor (CTGF), der Platelet derived growth factor (PDGF) und der Fibroblast growth factor (FGF) (34). Eine inflammatorische Reaktion, die bis vor wenigen Jahren noch als Auslöser der IPF galt, spielt eventuell sekundär eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung.

In Fällen von familiärer und sporadischer Lungenfibrose wurde eine genetische Prädisposition festgestellt. Mutationen der Telomerase-Gene für TERT, TERC, PARN und RTEL1 erhöhten das Risiko für eine IPF (35, 36). Das gleiche gilt für Mutationen im Gen für das Surfactant-Protein C (37). Ein Single-Nucleotid-Polymorphismus in der MUC5B-Promoter-Region erhöht ebenfalls das Risiko. Das von diesem Gen kodierte Protein, Mucin 5B, ist für die mukoziliäre Clearance erforderlich (38, 39). Diese Genvariante kommt bei der familiären sowie der sporadischen IPF vor. Zigarettenrauch ist der exogene Risikofaktor, für den die stärkste Assoziation mit der familiären sowie der sporadischen IPF gezeigt werden konnte (40). Die für die IPF charakteristischen histopathologischen Veränderungen werden unter dem Begriff Usual interstitial pneumonia (UIP)

zusammengefasst. Ein für die Histologie typisches Bild der IPF ist das heterogene Nebeneinander von fibrotischen Arealen mit narbigen und honigwabeförmigen Veränderungen, die sich abwechseln mit Arealen, die gesundes Parenchym aufweisen. Die pathologischen Veränderungen sind v.a. basal, subpleural und paraseptal lokalisiert. Sie enthalten dichtes Kollagen, in dem die sogenannten Fibroblastenherde (fibroblast foci) regelmäßig angeordnet anzutreffen sind. Die Honigwaben-Veränderungen sind zystisch fibrotische Räume, die häufig von Bronchialepithel ausgekleidet sind und Mucus und Entzündungszellen enthalten. Geringgradiger ausgeprägt sind die Inflammationszeichen mit Lymphozyteninfiltration und einer Hyperplasie von Typ-II-Pneumozyten und Bronchialepithelzellen (41, 42).

1.3 Pulmonale Hypertonie infolge einer idiopathischen pulmonalen Fibrose

Die PH, die infolge einer IPF auftritt (PH-IPF), wird in der aktuellen Nizza Klassifikation der Gruppe 3 – PH infolge einer Lungenerkrankung – zugeordnet (7). Zwischen dem Progress einer IPF und der Entwicklung einer PH wird ein kausaler Zusammenhang vermutet. Nicht alle IPF-Patienten entwickeln eine PH. Die Prävalenz der PH im Anfangsstadium der IPF wird mit 8,1–14,9 % angegeben (43, 44). In weit fortgeschrittenen Stadien steigt sie auf über 60 % an. Aus Fallserien mit Patienten, die sich einer Evaluation zur Lungentransplantation wegen fortgeschrittener IPF unterzogen, weiß man, dass dort die Prävalenz der PH zwischen 30–85 % liegen kann (45). Die PH-IPF ist in der Regel milder ausgeprägt als die PAH und zeigt andere hämodynamische Charakteristika (46). Das klinische Krankheitsbild der IPF wird oft nicht von der PH dominiert. Die Prognose bei der IPF-Erstdiagnosestellung wird jedoch vom PH-Ausprägungsgrad negativ beeinflusst (47).

Die Pathophysiologie der PH-IPF ist nicht geklärt. Ein wahrscheinlicher Pathomechanismus ist die hypoxische Vasokonstriktion. Allerdings gibt es Hinweise, dass die PH bei IPF unabhängig von einer Hypoxämie entstehen kann. Lange Zeit bestand der Konsens, dass es sich bei der PH-IPF um eine Komplikation der progressiven fibrotischen Umbauprozesse in der Lunge handelt. Tiermodelle belegen, dass eine Verbesserung der Lungenfibrose mit Verbesserung der PH einhergeht (48). Derzeit stehen keine Medikamente zur Verfügung, die in der Lage sind die Fibrosebildung rückgängig zu machen. Daher ist das Verständnis des PH-Entstehungsprozesses und die Identifikation von Therapieansatzpunkten von großer Bedeutung. Für viele Mediatoren, unter ihnen ET-1 und NO, wurde eine Rolle bei der Entstehung der Lungenfibrose nachgewiesen (48, 49). Ob und wie sie unabhängig davon bei der Genese einer PH-IPF mitwirken, muss geklärt werden. Die Grundlagenforschung zu dieser Fragestellung wird durch die beschränkte Anzahl an

geeigneten Tiermodellen mit einer Kombination aus Lungenfibrose und PH erschwert (48, 50). Zurzeit gibt es für die PH-IPF keine spezifische Behandlung. Die Therapie der Grunderkrankung steht im Vordergrund (8). Typische PAH-Medikamente können kontraindiziert sein, da sie über die Hemmung der hypoxischen Vasokonstriktion den gestörten Gasaustausch weiter verschlechtern (51). In einem Single center randomized controlled trial, bei dem die Wirksamkeit von Bosentan bei Patienten mit IPF und moderater PH getestet wurde, wurde eine verbesserte Hämodynamik und Lebensqualität ohne Verschlechterung der Lungenfunktion in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Placebogruppe nachgewiesen (52).

1.4 Endothelin-System

Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon mit einem hydrophoben Carboxy-Terminus und zwei Disulfidbrücken, wodurch die für das Molekül charakteristische Haarnadelform entsteht. Die drei Isoformen der Endothelin-Familie, ET-1, Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3), unterscheiden sich in nur wenigen Aminosäuren voneinander (53). Endotheline sind parakrin und autokrin wirkende Gewebeshormone. Der überwiegende Anteil des produzierten ET-1 wirkt in unmittelbarer Nähe des Produktionsortes auf Endothelin-Rezeptor-tragende Zielzellen. Die Plasmakonzentration ist mit 1–2 pg/ml gering (54). ET-1 spielt als häufigste Isoform und als potenter Vasokonstriktor eine zentrale Rolle bei der Kreislaufregulation (53). ET-1 wird überwiegend in Endothelzellen gebildet. Weitere ET-1-produzierende Zellen sind epitheliale Zellen der Lunge, Makrophagen, kardiale Fibroblasten und Kardiomyozyten, Neuronen und Astrozyten im Zentralnervensystem (ZNS), Endometriumzellen und Hepatozyten (53). Neben ihrer zentralen Rolle bei der lokalen Kreislaufsteuerung sind Endotheline auch an Prozessen der Embryogenese beteiligt. ET-1 beeinflusst die Entwicklung von kraniofazialen und kardialen Strukturen (55).

ET-2 wird hauptsächlich in intestinalen Endothelzellen und in den Nieren sowie in geringerer Menge im Myokard, in der Plazenta und in den Ovarien exprimiert. Die Funktion von ET-2 ist bislang unklar (56, 57). Im Groß- und Kleinhirn sowie in der Hypophyse konnten hohe Konzentrationen an ET-3 nachgewiesen werden, wo es vermutlich die Entwicklung von Neuronen und Astrozyten beeinflusst. Ferner spielt ET-3 eine Rolle bei der Ausbildung des myenterischen Nervenplexus (53, 58).

Endotheline zeigen in vielen Geweben eine mitogene, pro-fibrotische und inflammatorische Wirkung (53, 59, 60). Die Endothelin-Vorstufe Pro-Endothelin-1 (Big-Endothelin-1) wird durch das Endothelin-konvertierende-Enzym-1 (ECE-1) zum biologisch aktiven ET-1 gespalten. Der Abbau

erfolgt zu 70 % in der Lunge. Die Plasmahalbwertszeit ist mit ca. 3–4 min gering (53). Die Freisetzung von Endothelin wird durch Katecholamine, Angiotensin, Zytokine sowie freie Radikale gesteigert. Auch physikalische Faktoren wie Scherkräfte am Gefäßendothel beeinflussen die ET-1-Synthese. Weiter wird die Endothelin-Produktion durch NO und Prostazyklin gehemmt (61).

ET-1 entfaltet seine Wirkung über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (ETA- und ETB-Rezeptor). Der ETA-Rezeptor hat eine vergleichbare Affinität für ET-1 und ET-2; ET-3 wird ca. 100-fach schwächer gebunden. Der ETB-Rezeptor bindet alle Endothelin-Isoformen mit gleicher Affinität (62, 63).

ETA-Rezeptoren finden sich u. a. auf Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, auf Myozyten und in den Bronchien. Die Aktivierung von ETA-Rezeptoren führt zu einer Vaso- und Bronchokonstriktion (62, 64). ETB-Rezeptoren werden primär von den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert und lösen bei Aktivierung eine Vasokonstriktion aus (65, 66).

Auf Gefäßendothelzellen lokalisierte ETB-Rezeptoren leiten dagegen nach Aktivierung eine Vasodilatation ein, indem sie die Freisetzung von NO und Prostazyklin stimulieren (67).

1.5 Stickstoffmonoxid-System

Die Biosynthese des gasförmigen Botenstoffs NO aus L-Arginin findet in Gefäßendothelzellen statt. Die Reaktion wird durch die Kalzium-Calmodulin aktivierte eNOS katalysiert. NO hat eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden. In dieser Zeit diffundiert es aus den Endothelzellen in die benachbarte glatte Gefäßmuskulatur. Dort wirkt es als potenter Vasodilatator, indem es durch die Aktivierung der zytoplasmatischen Guanylatzyklase eine cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen auslöst (68). Endothelial gebildetes NO hat darüber hinaus vielfältige protektive Funktionen im kardiovaskulären System. NO hemmt die Thrombozyten-Aggregation, die Proliferation von Gefäßmuskelzellen und die Leukozyten-Adhäsion (69-71). Die eNOS-Aktivität und NO-Freisetzung wird durch physikalische, biochemische und pharmakologische Faktoren beeinflusst. Die durch den Blutfluss über der Endothelzelle ausgelöste Schubspannung zählt zu den wichtigsten Aktivatoren der eNOS. Östrogene, Statine und radikale Sauerstoffspezies steigern die eNOS-Expression (68, 72). Neben der eNOS wurden die neuronale NOS (nNOS) sowie der induzierbare NOS (iNOS) als die drei Haupt-Isoformen der NOS identifiziert. Alle NOS werden durch die endogenen Inhibitoren asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA) und NG-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) gehemmt (68). Die wie eNOS Kalzium-abhängige nNOS wird in Neuronen des ZNS und des peripheren Nervensystems exprimiert, wo sie als Modulator der Freisetzung von neuronaler Transmitter fungiert (73). Die iNOS arbeitet Kalzium-unabhängig und kann in allen

kernhaltigen Zellen (u. a. Makrophagen, Fibroblasten, Hepatozyten, Endothelzellen) exprimiert werden. Nach Induktion der iNOS-Expression durch pro-inflammatorische Zytokine kommt es in Makrophagen als Teil der Immunantwort langfristig (mehrere Tage) zu einer gesteigerten NO-Produktion (74, 75). Bei einer NO-Überproduktion kann die initial beabsichtigte zytotoxische Wirkung des NO zu einer Inflammation, endothelialen Dysfunktion, Gewebeschädigung und einem Schock führen (76).

1.6 Bedeutung von Endothelin und NO für die pulmonale Hypertonie

1.6.1 Rolle von Endothelin

PH-Patienten weisen eine mit der Krankheitsschwere korrelierende Erhöhung der Konzentration von Pro-ET-1 und ET-1 im Plasma und Lungengewebe auf (77-80).

ET-1 hat eine mitogene Wirkung und ist mitverantwortlich für die Proliferation glatter Muskelzellen der Lungenstrombahn (77, 81, 82). Der für die PH charakteristische Gefäßumbau mit hypertrophen Gefäßmuskelzellen und erhöhter Ablagerung von extrazellulärer Matrix in der Tunica media (83, 84) wird in-vitro durch ET-1 über eine Transforming growth factor beta-(TGF- β)-Stimulation und Aktivierung des ERK 1/2 MAP-Kinase-Weges mitbestimmt (85). Die chronische Druckbelastung der rechten Herzkammer bei der PH führt zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie mit zunehmender Dysfunktion, die mit einem Remodeling des Myokards einhergeht, das ebenfalls durch eine interstitielle Fibrose und Deposition von Komponenten der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagen) gekennzeichnet ist (86-88). In den Kardiomyozyten ist unter diesen Bedingungen das ET-1-System aktiviert; es kommt zu einer Überexpression von ET-1- und ETA-Rezeptoren (88). ET-1 könnte über eine Förderung der Fibroblasten-Proliferation und der Stimulation der Synthese der extrazellulären Matrix auch am Remodeling des rechten Ventrikels beteiligt sein (89). In Tiermodellen verbesserten ET-Rezeptor-Inhibitoren die rechtsventrikuläre Fibrose und Dysfunktion (90-92). Bei PH-Patienten kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion mit Störung des Endothelin-Signalwegs. Die vorrangig von glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten ETA-Rezeptoren vermitteln Signale für die Vasokonstriktion, Proliferation, Hypertrophie, Zellmigration und Fibrose (93). Die primär auf Gefäßendothelzellen lokalisierten ETB-Rezeptoren lösen eine Vasodilatation aus und hemmen zudem die Proliferation und Apoptose (93, 94). Außerdem sind sie für die Endothelin-Clearance aus der systemischen Zirkulation zuständig. ETB-Rezeptoren, die wie ETA-Rezeptoren auf Gefäßmuskelzellen angesiedelt sind, vermitteln wie ETA-Rezeptoren Signale für eine Vasokonstriktion (95, 96).

Bei einer PH verändert sich die Expression der Endothelin-Rezeptoren. Die Expression von endothelialen ETB-Rezeptoren mit vasodilatatorischen Eigenschaften sowie Clearance-Funktion sinkt. Die steigende Anzahl der ETA- und ETB-Rezeptoren auf Zellen der Gefäßmuskulatur führt zu einem Ungleichgewicht zugunsten der vasokonstriktiv und mitogen wirkenden Rezeptorsubtypen.

Die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan (ETA/ETB-Antagonist), Ambrisentan (selektiver ETA-Antagonist) und Macitentan (ETA/ETB-Antagonist) stellen medikamentöse Therapieoption der PH dar, die am Endothelin-Signalweg ansetzen.

1.6.2 Rolle von NO

Die pulmonal-endotheliale Dysfunktion führt zu Störungen im NO-Signalweg und hat eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO im Lungengewebe erkrankter Menschen und in Tiermodellen zur Folge (97-99). Aufgrund des resultierenden erniedrigten cGMP-Spiegels überwiegen vasokonstriktorische Mechanismen. Die fehlende Hemmung durch NO führt zudem durch eine gesteigerte Proliferation von glatten Muskelzellen und eine vermehrte vaskulären Inflammation und Thrombosen zu Gefäßobliterationen in der Lungenstrombahn (21). Studien zum Hintergrund des vermuteten NO-Mangels kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einerseits kam es zu einer Reduktion der eNOS-Expression bei Patienten mit PAH (97), andererseits wurde in einem Ratten-Modell mit PH und in Lungenbiopsien von Patienten mit PH eine erhöhte Expression von eNOS nachgewiesen (100). Dieser Widerspruch lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass eine gesteigerte eNOS-Genexpression nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Produktion von bioaktivem NO verbunden ist.

Im Rahmen der eNOS-Entkoppelung produziert die eNOS statt NO Superoxid-Radikale, die zu den reaktiven Sauerstoff-Spezies zählen (101, 102). Als Verursacher des potentiell gefäßschädigenden oxidativen Stresses verliert die eNOS ihre vasoprotektive Funktion und trägt möglicherweise zur Progression der PH bei.

Inhibitoren der PDE-5 hemmen den Abbau des Second Messengers cGMP und greifen so in die NO/cGMP-Signalkaskade ein. Die vasodilatatorisch und anti-proliferativ auf die pulmonale, glatte Gefäßmuskulatur wirkenden PDE-5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil sind für die PAH-Behandlung zugelassen und stellen Medikamente dar, die auf den NO-Signalweg abzielen. Mit Tetrahydrobiopterin (BH4) steht aktuell jedoch ein neuer Wirkstoff im Fokus der PH-Forschung. Dieser Kofaktor der eNOS fördert die Dimerisierung des Enzyms und wirkt so der eNOS-Entkopplung entgegen. Im Tiermodell wurde eine Verbesserung der PAH nachgewiesen. Eine

Verträglichkeitsprüfung des Wirkstoffes bei Menschen war positiv, so dass die Autoren nun die Durchführung einer randomisierten Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie empfehlen (103-105).

1.7 Bedeutung von Endothelin und NO für die idiopathische pulmonale Fibrose

1.7.1 Rolle von Endothelin

Das Plasma und die bronchoalveoläre Lavage von Patienten mit IPF zeigen erhöhte ET-1-Konzentrationen (106-108). Immunhistologisch wurde im Lungengewebe von IPF-Patienten eine erhöhte Expression von ET-1 und Endothelin-konvertierendem-Enzym-1 (ECE-1) nachgewiesen, die mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert (109). ET-1, dessen Expression durch Transforming growth factor beta (TGF- β) gesteigert wird, stimuliert als potenter profibrotischer Mediator die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die Kollagen-Synthese im menschlichen Lungengewebe (110-112). Obwohl eine Rolle von Endothelin in der Pathogenese der Lungenfibrose als gesichert gilt (113-117), konnten Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Bosentan, Ambrisentan, Macitentan) in mehreren klinischen Studien die Mortalität und Morbidität nicht signifikant senken (118-120). Daher stellt sich die Frage, warum sich die tierexperimentellen Erkenntnisse zum Einfluss von ET-1 auf die Lungenfibrose und der positive Effekt von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (3, 4, 121) in humanen Studien nicht reproduzieren lassen (122). Trotz neuer Erkenntnisse über die komplexen Signalwege, Mediatoren und Einflussfaktoren ist die Pathogenese der IPF nicht vollständig verstanden. Die Identifikation von Schlüsselsubstanzen in dem Regelungsnetzwerk aus fibrotisch und anti-fibrotisch wirkenden Mediatoren steht noch aus, ebenso wie die Überführung der bekannten IPF-Konzepte in eine potente Therapie. Die aktuell verfügbaren Medikamente (Pirfenidon, Nintedanib) können den Krankheitsprozess lediglich verzögern, aber nicht aufhalten oder umkehren. Die Forschung wird durch die Tatsache erschwert, dass ein Tiermodell fehlt, das die IPF im Menschen adäquat abbildet (123). Dieser Umstand erschwert zusätzlich die Translation von präklinisch erworbenen Erkenntnissen in für Patienten nützliche Therapieformen (124).

1.7.2 Rolle von NO

Unter den pathophysiologischen Bedingungen der IPF treten unnatürlich hohe NO-Konzentrationen auf, die vermutlich aufgrund einer vermehrten iNOS-Expression und -Aktivität freigesetzt werden. Wie verschiedene Studien belegen, spielt endogenes NO in der Pathogenese der Lungenfibrose eine Rolle. Dabei haben die Produkte der eNOS und der iNOS eine gegensätzliche Wirkung

auf die pulmonale Fibrose-Entstehung in Ratten und Mäusen. Während die iNOS die Fibrosebildung fördert, wirkt die eNOS hemmend (125-130).

Die bronchoalveoläre Lavage und Lungenbiopsien von IPF-Patienten zeigten erhöhte NO- und iNOS-Konzentrationen (126, 131-133). Auch in der Ausatemluft von IPF-Patienten fanden sich höhere NO-Konzentrationen. Da die intrapulmonale NO-Konzentration mit der Lungenfunktion und der körperlichen Belastbarkeit (6-Minuten-Gehtest) korreliert, eignet sich dieser Parameter möglicherweise als IPF-Biomarker (134, 135). Ein möglicher Störmechanismus im NO-Signalweg, der die physiologische NO-Synthese hemmt, könnte die NO-ADMA-(Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase)-DDAH Kaskade betreffen. Die DDAH baut in Typ-2-Pneumozyten den endogenen iNOS-Inhibitor ADMA ab. In Untersuchungen an Mäusen mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose sowie an menschlichem IPF-Lungengewebe korrelierte die DDAH-Expression und die Aktivität in Typ-II-Pneumozyten mit einer erhöhten iNOS-Expression. Die Kolo-kalisation beider Enzyme in der Nähe von fibrotischem Gewebe führte zu der Annahme, dass die DDAH eine wichtige Rolle in der Regulation der Pneumozyten spielen könnte. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die gezielte Inhibition von DDAH mittels L-291 im Mausmodell zu einer Abnahme der Kollagen-Ablagerung und einer Verbesserung der Lungenfunktion führte. Damit stellt die DDAH möglicherweise einen pharmakologischen Angriffspunkt für IPF-Therapien dar (136).

Eine Behandlung mit dem selektiven iNOS-Inhibitor GW274150 oder ein iNOS-Knockout in Mäusen mit Bleomycin-induzierter-Lungenverletzung reduzierte die Fibrosebildung, die Leukozyten-Infiltration und den nitrosativen Stress (125). ET-1-transgene Mäuse mit aktiviertem ET-System entwickeln eine altersabhängige Lungenfibrose. In diesen Tieren führt der nicht-selektive NOS-Inhibitor L-NAME zu einem beschleunigten fibrotischen Umbau der Lunge und einer vermehrten Makrophagen-Infiltration (4). Trotz der zunehmenden Erkenntnisse über den Einfluss von NO auf die Entstehung und den Progress der IPF gibt es derzeit keine NO-spezifischen Medikamente auf dem Markt. In einer klinischen Studie zur fortgeschrittenen IPF erwies sich der PDE-5-Inhibitor Sildenafil gegenüber einem Placebo bezüglich des primären Endpunktes (Verbesserung des 6-Minuten-Gehtests um 20 %) nicht als überlegen (137).

1.8 Endothelin- und NO-Interaktion in den verwendeten Mausmodellen

1.8.1 Human-ET-1-transgene Mäuse (ET+/+)

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ET-1-transgenen Mäuse wurden von Prof. Theuring (Charité Berlin, Center for Cardiovascular Research) generiert. Dabei dienten hormonell

superovulierte NMRI-(Naval Medical Research Institute)-Weibchen als Spendertiere der befruchteten Eizellen. Ein 16 kD Klon mit dem gesamten humanen-ET-1-Gen unter Kontrolle seines eigenen Promoters wurde in einen der zwei Vorkerne der befruchteten Eizelle injiziert. Die injizierten Zygoten wurden in die Eileiter von pseudoschwangeren NMRI-Ammenmäusen transferiert. Nach Isolierung der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Schwanzbiopsien der Nachkommen wurden die transgenen Tiere durch Polymerase chain reaction (PCR) und Southern Blot identifiziert. Dabei wurden drei Linien (260, 238, 856) etabliert. Für die vorliegende Arbeit wurden Tiere der Linie 856 verwendet. Die chronische ET-1-Überexpression in heterozygoten ET-1-transgenen Mäusen führt zu einer pulmonalen interstitiellen Fibrose im Bereich von perivaskulären und peribronchialen Strukturen. Darüber hinaus zeigen die Tiere eine Infiltration des Lungengewebes mit CD4-positiven Zellen, was für eine chronische Entzündungsreaktion spricht. Eine Auswirkung auf den pulmonal-arteriellen Blutdruck fehlt (3). Die ET-1-transgenen Mäuse zeigen auch im Herzen eine interstitielle Fibrose mit einer gesteigerten Matrixexpression von Kollagen III und Laminin (138). Überraschenderweise entwickeln die Mäuse keinen systemischen arteriellen Hypertonus. Das zusätzlich beobachtete chronische blutdruckunabhängige Nierenversagen wird durch eine renale Zystenbildung, renale interstitielle Fibrose und eine Glomerulosklerose begleitet (1).

Um die Rolle des NO in einem aktivierten ET-1-System zu analysieren, wurden ET-1-transgene Mäuse mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME behandelt. Die Blockierung der NO-Synthasen erhöhte die interstitielle Fibrose und die Entzündungsreaktion im Lungengewebe (4). ET-1-transgene Mäuse mit konsekutiver ET-1-Überexpression zeigen eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit (2). Die ebenfalls erhöhten Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen im Urin deuten auf eine vermehrte NO-Produktion hin. Immunhistologisch konnte in den intrarenalen Arterien eine erhöhte iNOS-Expression verglichen mit den Wildtyp-(WT)-Mäusen nachgewiesen werden (139). Diese Befunde belegen, dass es in ET-1-transgenen Mäusen als Reaktion auf eine ET-1-Überexpression zu einer Aktivierung des NO-Systems mit vermehrter NO-Produktion kommt, die die ET-1-vermittelten Effekte antagonisiert.

1.8.2 eNOS-Knockout-Mäuse (eNOS^{-/-})

Die eNOS-Knockout-Mäuse mit einem C57BL/6-Stammhintergrund wurden von Prof. Gödecke (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) entwickelt. Bei der Generierung wurde zunächst ein Inaktivierungsvektor hergestellt, der ein Neomycin-Resistenzgen als positiv selektierbares Gen enthält. Durch die Insertion dieses Resistenzgens wurde die für die Bindestelle des reduzierten Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NADPH) kodierende Region des eNOS-Gens

inaktiviert. Der Austauschvektor wurde in embryonale Stammzellen transfiziert. Die durch Neomycin-Selektion angereicherten Zellen mit dem Defekt-Gen wurden durch Mikroinjektion in die Blastocoel-Höhle von 3,5 Tage alten Maus-Blastozysten eingebracht. Nach Transfer in schein-schwangere Empfängermäuse entwickelten sich die Embryonen zu sogenannten Chimären, d.h. es entstanden gemischtzellige Mosaik-Mäuse, in deren Gewebe das eNOS-Gen in einigen Zellen ausgeschaltet war. Durch Rück- bzw. Inzucht-Kreuzungen dieser Tiere wurden homozygote eNOS-Knockout-Mäuse generiert, in denen die eNOS-Defizienz in Lunge, Herz, Leber und Nieren durch Western-Blot Analyse nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu ET-1-transgenen Mäusen entwickeln eNOS-Knockout-Mäuse einen ausgeprägten systemischen arteriellen Hypertonus und eine altersabhängige Kardiomyopathie (140-142). Darüber hinaus zeigen sie eine milde PAH (143), die sich unter chronisch hypoxischen Verhältnissen verstärkt. Unter diesen Bedingungen liegt der pulmonal-arterielle Blutdruck der eNOS-/- Tiere verglichen mit den WT-Tieren signifikant höher (144, 145). Die Befunde deuten an, dass die Pulmonalgefäße hauptsächlich durch von eNOS produziertem NO reguliert werden und dass der erhöhte Ruhetonus der Gefäße bei NO-Mangel eine überschießende hypoxische Vasokonstriktion begünstigt (146).

1.8.3 eNOS-Knockout-Mäuse mit Überexpression von human-Endothelin-1 (eNOS-/- ET+/+)

Für die in der Arbeit verwendeten Tiere wurden human-ET-1-transgene Mäuse der Linie 856 mit C57BL/6 eNOS-Knockout-Mäusen gekreuzt. Über Rückzucht wurden homozygote eNOS-/- ET+/+ Mäuse generiert. Zusätzlich wurden durch Rückkreuzung drei Kontrollgruppen mit einem homogenen genetischen Hintergrund gezüchtet (WT-Tiere, ET+/+ Tiere, eNOS-/- Tiere). Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Alter von frühestens 6 Wochen mittels Standard-PCR und Agarose-Gelelektrophorese.

Die eNOS-/- ET+/+ Tieren zeigten eine chronische ET-1-Überexpression und gleichzeitig einen relevanten NO-Mangel. Die Tiere wiesen einen signifikant höheren Blutdruck als die ebenfalls hypertensiven eNOS-Knockout-Mäuse auf (5). Weiter scheint die ET-1-Überexpression in diesen Tieren einen Adaptionsmechanismus zu induzieren, der sie vor der in eNOS-Knockout-Mäusen beobachteten diastolischen Herzfunktionsstörung schützt (147).

1.8.4 Fragestellung der Arbeit

Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein aktiviertes ET-1-System in Kombination mit der Ausschaltung seines physiologischen Gegenspielers NO zur Entstehung einer PH und einer Veränderung der rechtsventrikulären Herzfunktion führt. Zusätzlich

sollte beobachtet werden, ob es unter diesen Bedingungen Hinweise für einen fibrotischen Umbau des Lungengewebes oder für ein arterielles Remodeling gibt.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Fragen:

1. Führt die Überexpression von human-ET-1 in NO-defizitären Mäusen zu einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Blutdrucks?
2. Verändert sich die rechtsventrikuläre Herzfunktion?
3. Kommt es zu pulmonal-arteriellen Gefäßveränderungen im Sinne eines vaskulären Remodelings?
4. Kommt es zu einem fibrotischen Umbau des Lungeninterstitiums?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Waage, BCL 600, Sartorius, Deutschland

Feinwaage, SBC 22, Scaltec, Göttingen, Deutschland

Millar Micro-Tip-Transducer, 1,4 French, HSE, March, Deutschland

Powerlab System 4/25, AD Instruments, FMI, Seeheim-Ober-Beerbach, Deutschland

Pressure Control Unit, PCU-200, AD Instruments, NSW, Australien

Animal Bio Amp, ML136 EKG, AD Instruments, NSW, Australien

Stereolupe, LEICA M651, Jung Histoservice, Wetzlar, Deutschland

Narkosebox, Eigenherstellung

Narkosemaske, Eigenherstellung

Isofluran Verdampfer, Drägerwerk, Lübeck, Deutschland

Knüpfpinzetten, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland

Präparierschere, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland

Skalpelle, Typ 10, Feather, Osaka, Japan

Mosquito Klemme, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland

Wärmeplatte, Präzitherm 28-1, Störk-Tronic, Deutschland

Einbettstation, Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland

Wärmeschrank ST6030, Heraeus, Berlin, Deutschland

Mikroskop, BH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland

Farbkamera, Model CFW-1310 C

Scion Visicapture Application Version 1.0, Scion Corporation, Frederick, USA

ImageJ Computerprogram, Version 1.61, Shareware des National Institute of Health, USA

2.1.2 Chemikalien

Eisenhämatoxylin nach Weigert, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland

Salzsäure (HCl) rauchend 37 %

Isofluran, FORENE, Abbott, Ludwigshafen, Deutschland

Paraffin 6, Microm International, Walldorf, Deutschland

Paraffin 9, Microm International, Walldorf, Deutschland

Resorcin-Fuchsin nach Weigert, Waldeck, Münster, Deutschland

Sirius Red, Chroma-Gesellschaft, Köngen, Deutschland

Van Gieson-Gemisch, Waldeck, Münster, Deutschland

Wässrige Pikrinsäure, Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland

Xylol, JT Baker, Phillipsburg, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Generierung von eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäusen wurden human-ET-1-transgene NMRI-Mäuse (Linie 856) mit C57BL/6 eNOS-Knockout-Mäusen gekreuzt. Die beiden Mausstämme wurden in der Literatur beschrieben (1, 141). Durch Rückkreuzung wurden folgende Tiere gezüchtet:

Gruppe 1:	eNOS-Wildtyp + human-ET-1-Wildtyp	WT
Gruppe 2:	eNOS-Wildtyp + human-ET-1-homozygot	ET ^{+/+}
Gruppe 3:	eNOS-Knockout + human-ET-1-Wildtyp	eNOS ^{-/-}
Gruppe 4:	eNOS-Knockout + human-ET-1-homozygot	eNOS ^{-/-} ET ^{+/+}

Die Untersuchungen wurden im Alter von 9 Monaten durchgeführt.

2.2.2 Tierhaltung

Die Umgebungsbedingungen waren bei einer Temperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 46 % konstant. Ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine entsprechende Beleuchtung erzeugt. Alle Versuchstiere erhielten Wasser und ein Standardlaborfutter (Altromin) ad libitum. Die Tierhaltung und alle Tierversuche entsprachen den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden am 05.08.2004 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Genehmigungsnummer G0146/04 zugelassen.

2.2.3 Organentnahme

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse zunächst gewogen. Im Anschluss erfolgte eine Betäubung der Tiere mit hochdosiertem Isofluran bis zum Sistieren der Spontanatmung. Danach wurde durch Verschieben des Schädels gegen die Halswirbelsäule eine zervikale Dislokation durchgeführt. Nach Eröffnung des Brustkorbs wurden das Herz und die Lunge entnommen und für die histologische Untersuchung in 4 %igem Formalin fixiert.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Fixierung

Um das Lungengewebe nach der Entnahme vor Veränderungen durch postmortale Prozesse wie Autolyse und Fäulnis zu schützen, wurde eine Fixierungsmethode mittels 4 %igem Formalin angewendet. Während der 24-stündigen Immersionsfixierung bilden sich Methylenbrücken zwischen den Proteinen und führen so zur Stabilisierung des Gewebes.

2.2.4.2 Paraffineinbettung

Zur Herstellung von Gewebedünnschnitten ist eine Härtung der Organe notwendig. Hierzu dient die Paraffineinbettung, welche automatisiert in der Einbettstation Shandon Citadel 1000 durchgeführt wurde. Zunächst wurden die formalinfixierten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 3 x 100 % Ethanol) für jeweils eine Stunde entwässert. Anschließend diente Aceton für 30 min als Intermediärmedium und sorgte für die Verdrängung des Alkohols aus den Gewebeproben. Die Präparate wurden nun in 56 °C warmes Paraffin überführt. Hierbei handelte es sich für die ersten zwei Stunden um Paraffin 6 und für die verbleibende Zeit bis zur Weiterverarbeitung um Paraffin 9. Ein am Mikrotom schneidbarer Paraffinblock entstand, indem die paraffingetränkten Proben in einer Einbettkassette abschließend abermals mit Paraffin 9 übergossen wurden, um dann auf einer Kühlplatte auszuhärten.

2.2.4.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Der Paraffinblock wurde in ein Rotationsmikrotom eingespannt. Es wurden Gewebeschnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Diese wurden im Anschluss in einem 50 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Abschließend wurden die Schnitte für 30 min zur Trocknung im Wärmeschrank gelagert.

2.2.5 Färbungen

2.2.5.1 Sirius-Rot-Färbung

Prinzip:

Sirius-Rot färbt Kollagenfasern an. Durch die starke Bindung der Sulfonsäure-Gruppen des Farbstoffes an basische Gruppen der Kollagen-Moleküle erscheinen diese in der Lichtmikroskopie als rote Strukturen.

Färbelösungen:

- gesättigte wässrige Pikrinsäure
- Sirius Rot – 0,1 %ige Lösung
- HCl 0,01M

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung:

- Xylol 10 min
- Xylol 10 min
- Ethanol 100 % 5 min
- Ethanol 96% 5 min
- Ethanol 80% 5 min
- Ethanol 70% 5 min
- Aqua dest. 5 min

2. Färbung:

- Sirius Rot 0,1 % 60 min

3. Spülen und Entwässern:

- HCl 0,1 M zweimal kurz eintauchen
- Ethanol 70 % 5 min
- Ethanol 80 % 5 min
- Ethanol 96 % 5 min

- Ethanol 100 % 5 min
- Xylol 10 min
- Xylol 10 min

4. Eindecken mit Histokitt und Deckglas

2.2.5.2 Histologische Analyse

2.2.5.2.1 Bestimmung der interstitiellen Fibrose

Zur morphometrischen Quantifizierung der interstitiellen Fibrose wurden von jedem histologischen Präparat 30 Bilder angefertigt. Hierzu diente ein Mikroskop vom Typ Olympus BH-2, welches mit der Digitalkamera CFW-1310 C der Firma Scion Corporation ausgestattet war. Es wurde darauf geachtet, keine Ausschnitte mit Gefäßen oder Artefakten zu fotografieren.

Die digitale Bildverarbeitung wurde an einem PowerMac G4 (Macintosh) mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt. Die ursprünglich farbigen Bilder wurden in ein Graustufenbild (8-bit) konvertiert. Anschließend wurde ein Hell-/Dunkel-Schwellenwert definiert. Ab diesem Wert wurde auf den Schnitten ein dunkler Kontrast als Sirius-Rot-positive Fläche und somit als Kollagen-haltige Matrix gewertet. Der Anteil der interstitiellen Fibrose an der Gesamtfläche der Lungenschnitte wurde in Prozent angegeben, indem für jedes Organ der Mittelwert aus der Analyse aller Ausschnitte gebildet wurde.

2.2.5.2.2 Bestimmung der perivaskulären Fibrose

Zur Quantifizierung der perivaskulären Fibrose diente ein Index aus dem Verhältnis des Durchmessers des die Arterie umgebenden Bindegewebes und des Durchmessers der Gefäßmedia der gleichen Arterie. Es wurden fünf Stadien unterschieden:

Stadium 1	0–24 %
Stadium 2	25–49 %
Stadium 3	50–74 %
Stadium 4	75–100 %
Stadium 5	> 100 %

Im Stadium 1 beträgt die die Arterie umhüllende Skleroseschicht weniger als ein Viertel des Mediadurchmessers. Für die Auswertung kamen alle Arterien in Betracht, die quer angeschnitten waren. Für jedes Organ wurde ein mittlerer Fibroseindex errechnet, indem man die Anzahl der Gefäße

(n), die dem jeweiligen Stadium angehörten mit dem jeweiligen Schweregrad (1–5) multiplizierte und durch die Gesamtzahl der untersuchten Arterien (N) teilte.

Perivaskulärer Fibroseindex: $(1 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 3 \cdot n_3 + 4 \cdot n_4 + 5 \cdot n_5) / N$

Der perivaskuläre Fibroseindex wurde von zwei Personen, die für die zu untersuchenden Tiergruppen verblindet waren, unabhängig voneinander erhoben. Nur bei Übereinstimmung beider Untersucher wurden Abweichungen des Index zwischen den Tiergruppen akzeptiert.

2.2.5.3 Elastika-Van Gieson-Färbung

Prinzip:

Bei der Elastika-Van Gieson-Färbung handelt es sich um eine Kombination aus der Elastika-Färbung nach Weigert und der van Gieson-Trichromfärbung. Diese Färbung dient der Darstellung von elastischen Fasern in histologischen Schnitten und setzt sich im Einzelnen zusammen aus Weigerts Eisenhämatoxylin, Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert und Pikrofuchsin nach van Gieson. Im Ergebnis stellen sich elastische Fasern schwarz-violett dar, kollagene Fasern erscheinen rot, Zellkerne färben sich schwarz-braun und Muskulatur sowie Zytoplasma imponieren gelb.

Färbelösungen:

- Resorcin-Fuchsin nach Weigert
- Eisenhämatoxylin nach Weigert
- Pikrofuchsin nach van Gieson

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinierung und Rehydrierung wie unter 2.2.5.1 beschrieben (absteigende Alkoholreihe, abschließend Ethanol 80 %)
2. Färbung
 - Resorcin-Fuchsin nach Weigert 10 min
 - Spülen in fließendem Leitungswasser
 - Spülen in HCl-Ethanol 1 %
 - Spülen in fließendem Leitungswasser
 - Spülen mit Aqua dest.
 - Ethanol 70 % 1 min
 - Ethanol 80 % 2 min
 - Eisenhämatoxylin nach Weigert 3 min
 - Spülen in fließendem Leitungswasser

- Spülen in HCl-Ethanol 1 %
 - Spülen in fließendem Leitungswasser
 - Van Gieson-Lösung 2 min
 - Spülen in Ethanol 95 %
3. Spülen und Entwässern, wie unter 2.2.5.1 beschrieben
 4. Eindecken mit Histokitt und Deckglas

2.2.5.4 Histologische Analyse

2.2.5.4.1 Bestimmung der Media-Lumen-Ratio

Die Media-Lumen-Ratio der Arterien wurde mittels eines digitalen Bildverarbeitungssystems untersucht. Auf den jeweiligen Lungendünnschnitten wurden 30 quer angeschnittene Arterien identifiziert und fotografiert. Hierfür wurde ein Olympus BH-2 Mikroskop verwendet, welches mit der Digitalkamera CFW-1310 C der Firma Scion Corporation ausgestattet war. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ analysiert. Mit der Zeichenfunktion wurden die äußere und innere Zirkumferenz der Tunica media markiert. Anhand dieser Daten konnten die Mediafläche, die Lumenfläche sowie die Media zu Lumen Ratio errechnet werden.

2.2.6 Messung der Hämodynamik

2.2.6.1 Durchführung der rechtsventrikulären Herzkatheteruntersuchung

Für die Platzierung des Tip-Katheters im rechten Ventrikel wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Zunächst wurden sie hierzu für 5 min in einen Narkosekäfig platziert und dieser mit Isofluran 5 % angeflutet. Im Anschluss wurden sie in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert. Die Narkose wurde nun über eine Maske bedarfsadaptiert mit durchschnittlich Isofluran 2,5 % aufrechterhalten. Es erfolgte die Rasur der Halspartie und die Präparation der Vena jugularis externa dextra. Diese wurde dann mit einer Kanüle punktiert und über diesen Zugang der Tip-Katheter in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Nach einer Pause von 3 min zur Stabilisierung der Hämodynamik wurde mit der Messung begonnen.

2.2.6.1.1 Messung der Hämodynamik mit dem Konduktanz-Katheter

Die Analyse von Druck-Volumen-Kurven gilt als Goldstandard der Hämodynamik-Messung und ist seit der Entwicklung von Mikro-Kathetern auch bei Mäusen durchführbar (148-151).

Mit Hilfe eines Konduktanz-Katheters, der über die rechte Vena jugularis im rechten Ventrikel platziert wird, können neben dem Blutdruck zusätzlich auch hämodynamische

Funktionsparameter gemessen werden, die detaillierte Aussagen über das Ausmaß einer etwaigen systolischen oder diastolischen Dysfunktion ermöglichen (152).

Eine Druck-Volumen-Schleife entsteht durch die synchrone Ableitung der Druck- und Volumenkurven durch den Katheter, der an seinem Ende vier Elektroden und einen Drucksensor trägt. Die Funktionsweise des Katheters beruht auf dem Umstand, dass das Blut im rechten Ventrikel leitfähig ist (160 Ohm), die Wände der Herzkammer jedoch einen Nichtleiter darstellen (400 Ohm). Die zwei außen gelegenen Elektroden des Katheters induzieren konstant ein elektrisches Wechselfeld. Dieses Feld breitet sich in Abhängigkeit des sich im Ventrikel befindlichen Blutvolumens aus. Die Potentialunterschiede werden nun kontinuierlich von den zwei innen gelegenen Elektroden registriert und so die Konduktanz anhand des Ohm'schen Gesetzes bestimmt. Die Veränderungen der Konduktanz im Verlauf des Herzzyklus reflektieren die intraventrikulären Volumenänderungen. Die Konduktanz-Katheter Methode erlaubt es somit in Echtzeit und in vivo synchron Druck- und Volumenkurven zu berechnen, um so ein Druck-Volumen-Diagramm abzuleiten.

2.2.6.1.2 Hämodynamische Parameter

Zu den mit dem Rechtsherzkatheter erfassten hämodynamischen Parametern zählen:

1. maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.)
2. minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.)
3. rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)
4. maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max.)
5. minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.)
6. rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau)
7. Herzfrequenz (HF)

2.2.6.1.3 Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.)

Der RVP max. ist der höchste Druck im rechten Ventrikel während der Austreibungsphase und erlaubt eine Aussage über die systolische Herzfunktion. Gemessen wird der RVP max. in mmHg. In Abwesenheit einer Pulmonalklappenstenose entspricht der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck dem systolischen Pulmonalarteriendruck. Eine Erhöhung von RVP max. kann ausgelöst werden durch eine Pulmonalklappenstenose, Pulmonale Hypertonie oder Lungenarterienembolie. Der RVP max. ist erniedrigt bei Hypovolämie, kardiogenem Schock oder Herzbeutel tamponade.

2.2.6.1.4 Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.)

Beim RVP min. handelt es sich um den diastolischen rechtsventrikulären Druck. Der RVP min. wird ebenfalls in mmHg angegeben.

2.2.6.1.5 Rechtsventrikulärer enddiastolischer Blutdruck (RVEDP)

Auf der rechtsventrikulären Druckkurve wird am Ende der a-Welle der RVEDP abgelesen. Die Einheit beträgt mmHg. Dieser Wert erlaubt zum einen Rückschlüsse auf die Dehnbarkeit der rechten Herzkammer und ihre Fähigkeit sich zu relaxieren. Er ist somit ein Parameter der diastolischen Funktion. Zum anderen ist der RVEDP ein Maß für die Vorlast. Er kann erhöht sein bei Herzmuskelhypertrophie, Kardiomyopathie, Pericarditis constrictiva oder nach Ischämie und Infarkt. Eine Erniedrigung des RVEDP zeigt sich u.a. bei Hypovolämie und Trikuspidalklappenstenose.

2.2.6.1.6 Maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max.)

Die dP/dt max. ist ein Parameter für die Kontraktilitätsfähigkeit der rechten Herzkammer während der Systole. Sie wird gemessen während der isovolumetrischen Anspannungsphase. Die Einheit beträgt mmHg/s. Ein Anstieg der Ventrikelkontraktilität bedeutet ein Anstieg von dP/dt max.

2.2.6.1.7 Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.)

Hierbei handelt es um ein Maß für die diastolische Funktion des Ventrikels. Sie beschreibt die Fähigkeit des Myokards zur schnellen und vollständigen Erschlaffung. Ein Anstieg der Lusitropie geht somit einher mit einem Anstieg von dP/dt min. Die Einheit wird in mmHg/s angegeben.

2.2.6.1.8 Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau)

Tau beschreibt die frühe diastolische Funktion. Die Einheit beträgt Sekunden. Sie wird gemessen vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis zu dem Zeitpunkt der isovolumetrischen Entspannungsphase, an dem der Druck noch 10 % von RVP max. beträgt.

2.2.6.2 Herzfrequenz (bpm)

Die Herzfrequenz gibt die Herzschläge pro Minute (bpm) an.

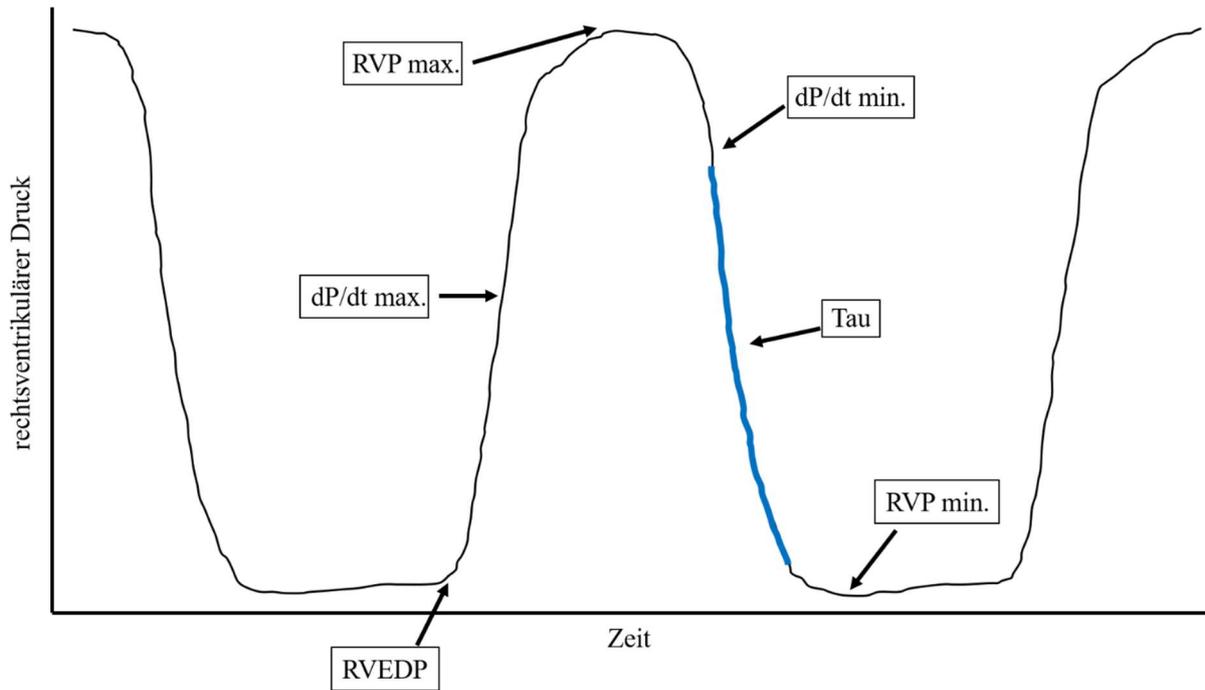


Abbildung 2-1. Vereinfachte schematische Darstellung einer rechtsventrikulären Druckkurve mit Messparametern der Hämodynamik

2.2.7 Statistik

Zur Aufbereitung der Daten wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Die Datenanalysen wurden anschließend mit der Software IBM SPSS Statistics 24 durchgeführt.

Nominal skalierte Daten wurden mittels Häufigkeitsverteilungen, metrisch skalierte Daten durch Mittelwerte und Standardabweichungen beschrieben.

Bei den inferenzstatistischen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen. Bei normalverteilten Daten wurden einfaktorische Varianzanalysen bzw. Welch-Tests und Post-Hoc-Untersuchungen nach Tukey durchgeführt. Bei einer fehlenden Normalverteilung wurde das nicht-parametrische Äquivalent zur einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA), der Kruskal-Wallis-Test, durchgeführt. In diesen Fällen wurden Mann-Whitney-U-Tests mit Bonferroni-Korrektur als Post-Hoc-Verfahren eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht, Herzgewicht und Lungenfeuchtgewicht

3.1.1 Körpergewicht

3.1.1.1 Aufteilung nach Genotyp

Das Körpergewicht der ET^{+/+} Tiere war signifikant niedriger als das der WT- und eNOS^{-/-} Tiere. Darüber hinaus zeigen auch eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tiere ein signifikant niedrigeres Gewicht als eNOS^{-/-} Tiere.

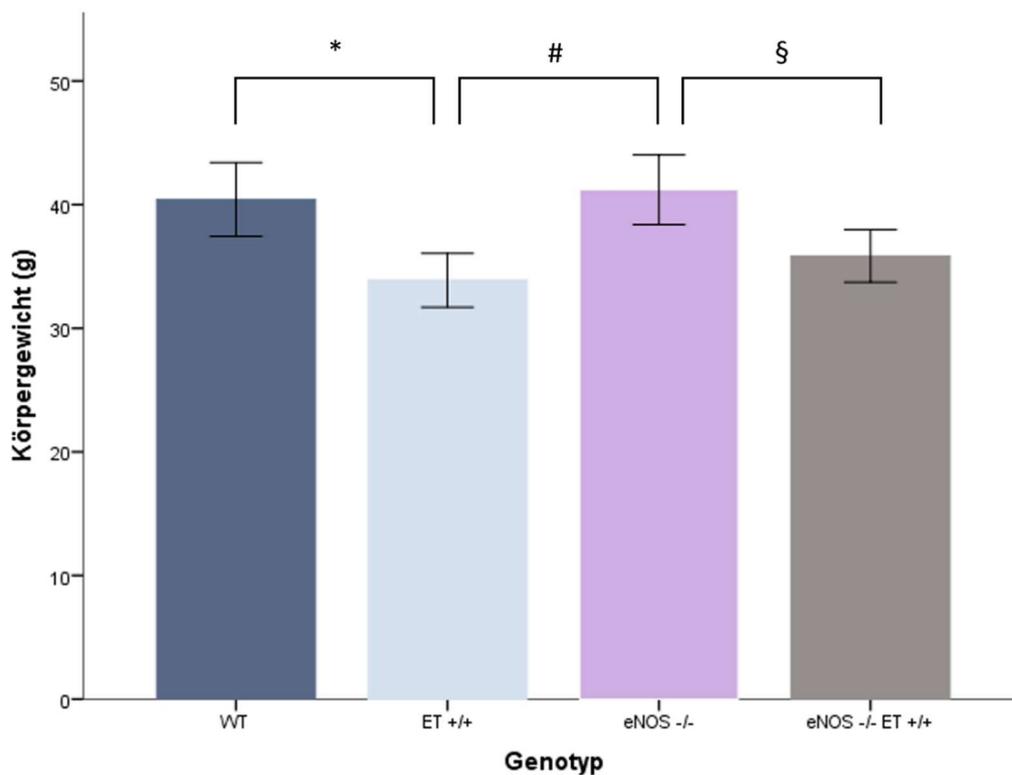


Abbildung 3-1. Körpergewicht – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung
WT n=25, ET^{+/+} n=26, eNOS^{-/-} n=28, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=21
ANOVA (Welch-Test): $p < 0,001$

Post-Hoc-Untersuchungen:

* $p < 0,05$ ET^{+/+} vs. WT

$p < 0,05$ ET^{+/+} vs. eNOS^{-/-}

§ $p < 0,05$ eNOS^{-/-} vs. eNOS^{-/-} ET^{+/+}

3.1.1.2 Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Bei den männlichen Tieren zeigten ET^{+/+} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tiere ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als WT- und eNOS^{-/-} Tiere. Darüber hinaus war in den WT- und eNOS^{-/-} Gruppen das Gewicht der männlichen Tiere jeweils größer als das der weiblichen Tiere.

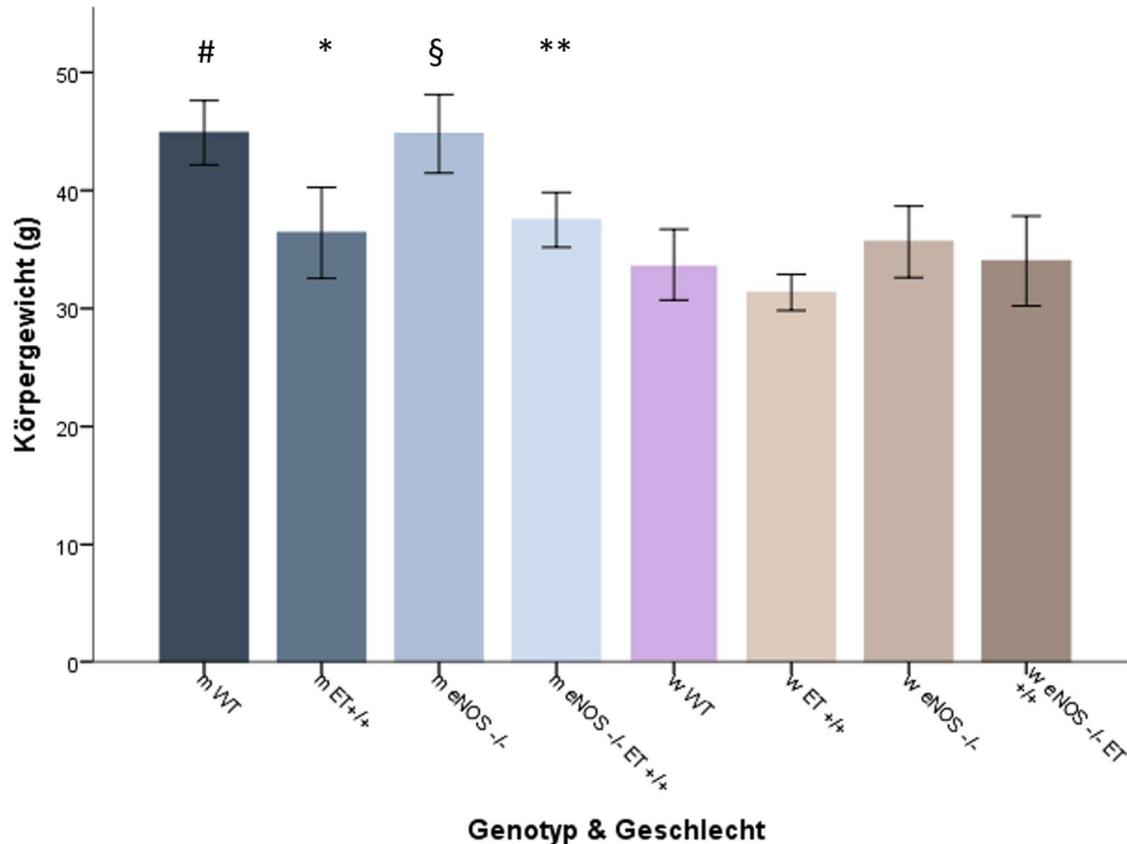


Abbildung 3-2. Körpergewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht
angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, ET^{+/+} n=13, eNOS^{-/-} n=17, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=11

weibliche Tiere: WT n=10, ET^{+/+} n=13, eNOS^{-/-} n=11, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=10

ANOVA: $p < 0,001$

Post-Hoc-Untersuchungen:

* $p < 0,05$ m ET^{+/+} vs. m WT, m eNOS^{-/-}

** $p < 0,05$ m eNOS^{-/-} ET^{+/+} vs. m WT, m eNOS^{-/-},

$p < 0,05$ m WT vs. w WT

§ $p < 0,05$ m eNOS^{-/-} vs. w eNOS^{-/-}

3.1.2 Absolutes und relatives Herzgewicht

3.1.2.1 Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp

Die Tiere der ET^{+/+} Gruppe zeigten ein signifikant niedrigeres absolutes Herzgewicht als die Tiere der eNOS^{-/-} Gruppe.

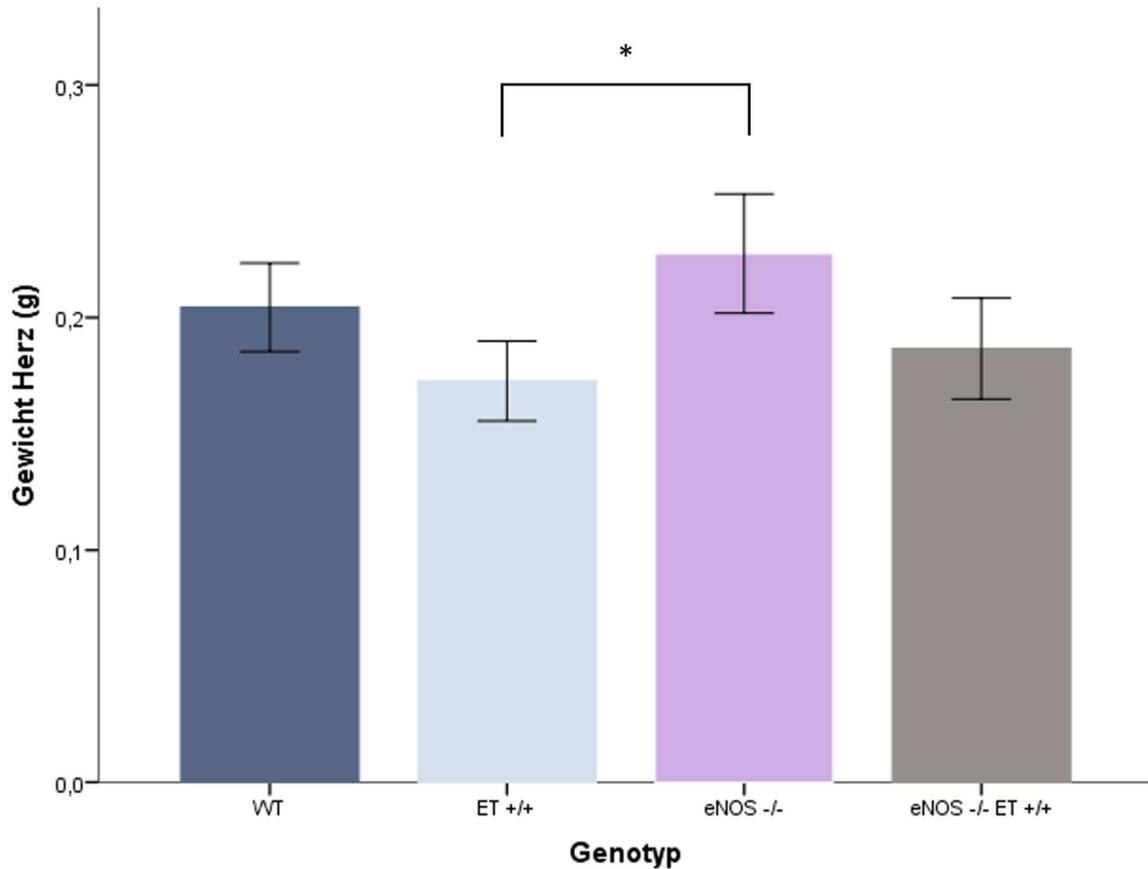


Abbildung 3-3. Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=25, ET^{+/+} n=26, eNOS^{-/-} n=28, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=21

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,003$

Post-Hoc-Untersuchungen (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur):

* $p < 0,008$ ET^{+/+} vs. eNOS^{-/-}

3.1.2.2 Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Das absolute Herzgewicht war bei den männlichen WT-, ET^{+/+}, eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tieren signifikant größer als bei den weiblichen Tieren mit dem gleichen Genotyp. Männliche ET^{+/+} Tiere zeigten ein signifikant niedrigeres absolutes Herzgewicht als männliche eNOS^{-/-} Tiere.

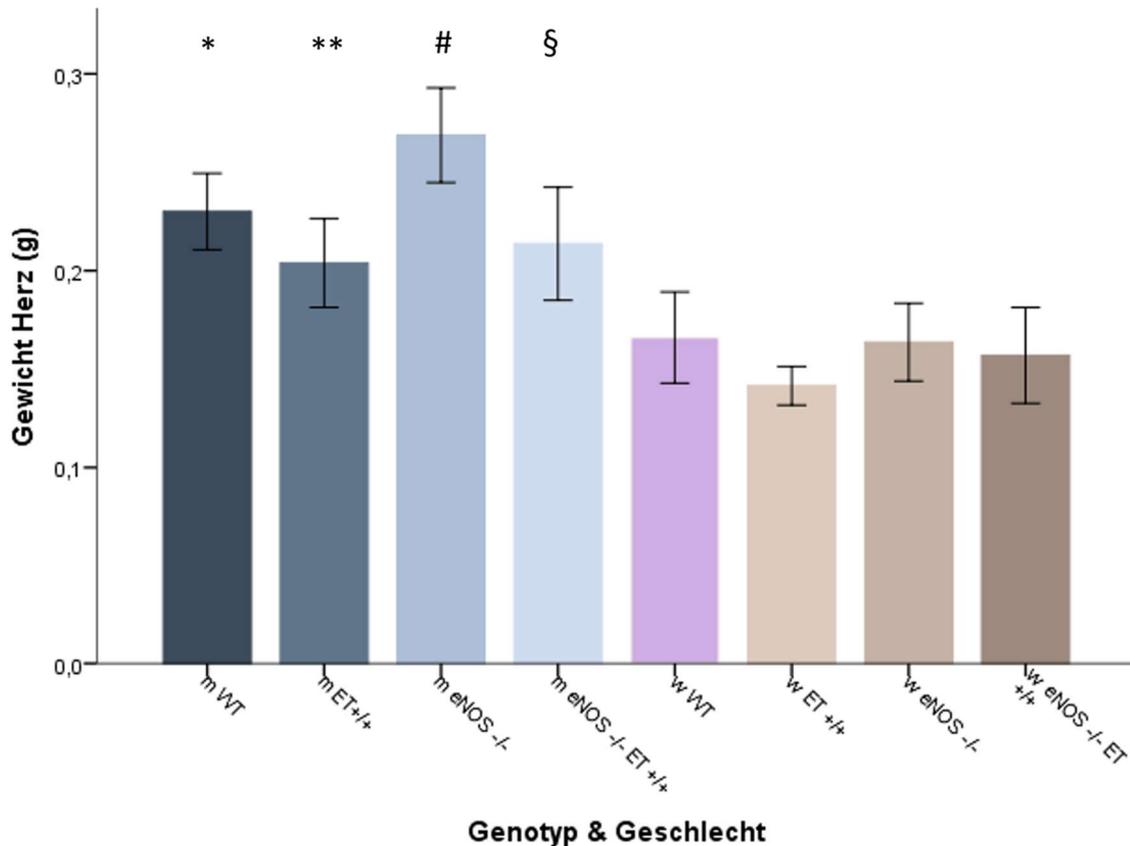


Abbildung 3-4. Absolutes Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, ET^{+/+} n=13, eNOS^{-/-} n=17, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=11

weibliche Tiere: WT n=10, ET^{+/+} n=13, eNOS^{-/-} n=11, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=10

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$

Post-Hoc-Untersuchungen (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur):

* $p < 0,002$ m WT vs. w WT

** $p < 0,002$ m ET^{+/+} vs. m eNOS^{-/-}

$p < 0,002$ m eNOS^{-/-} vs. w eNOS^{-/-}

§ $p < 0,002$ m eNOS^{-/-} ET^{+/+} vs. w eNOS^{-/-} ET^{+/+}

3.1.2.3 Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp

Beim Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht traten zwischen den vier Genotypen keine signifikanten Unterschiede auf.

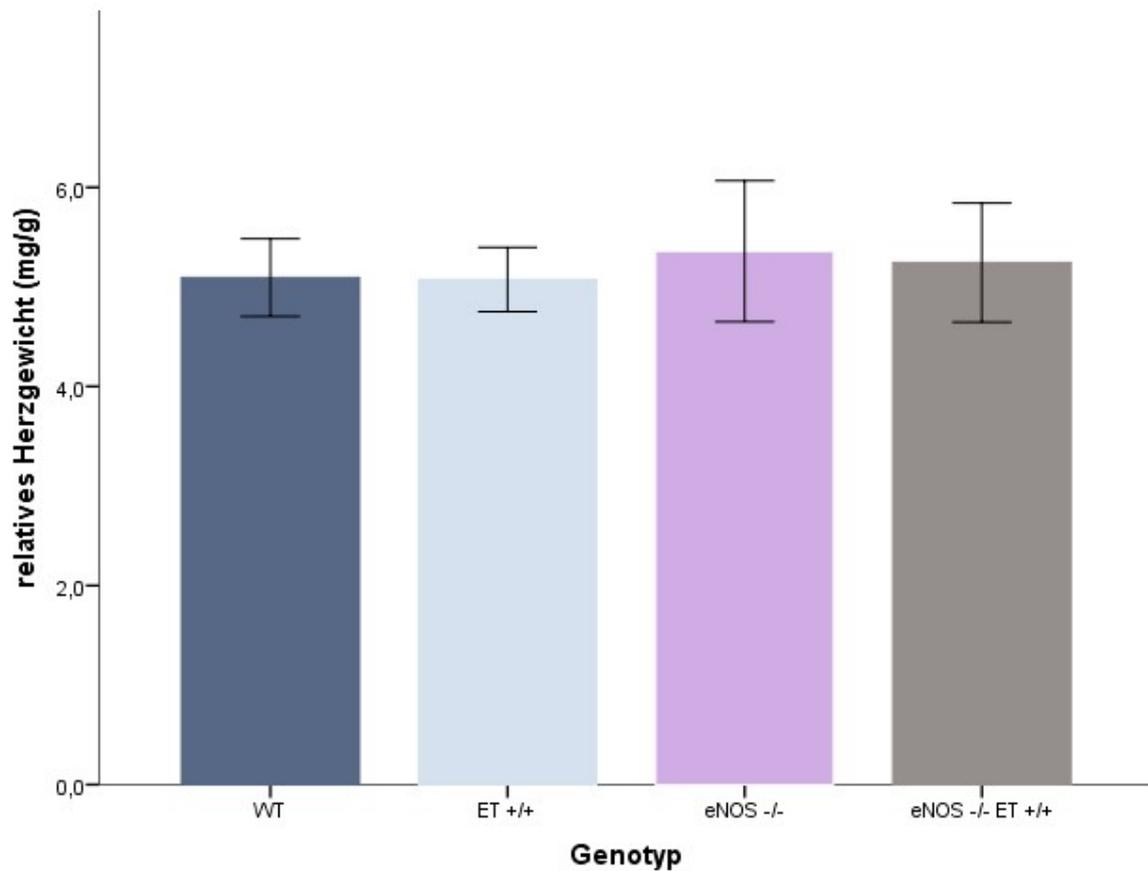


Abbildung 3-5. Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung
WT n=25, ET+/+ n=26, eNOS-/- n=28, eNOS-/- ET+/+ n=21
ANOVA (Welch-Test): $p > 0,05$
keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.1.2.4 Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Das relative Herzgewicht (Herzgewicht / Körpergewicht) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen.

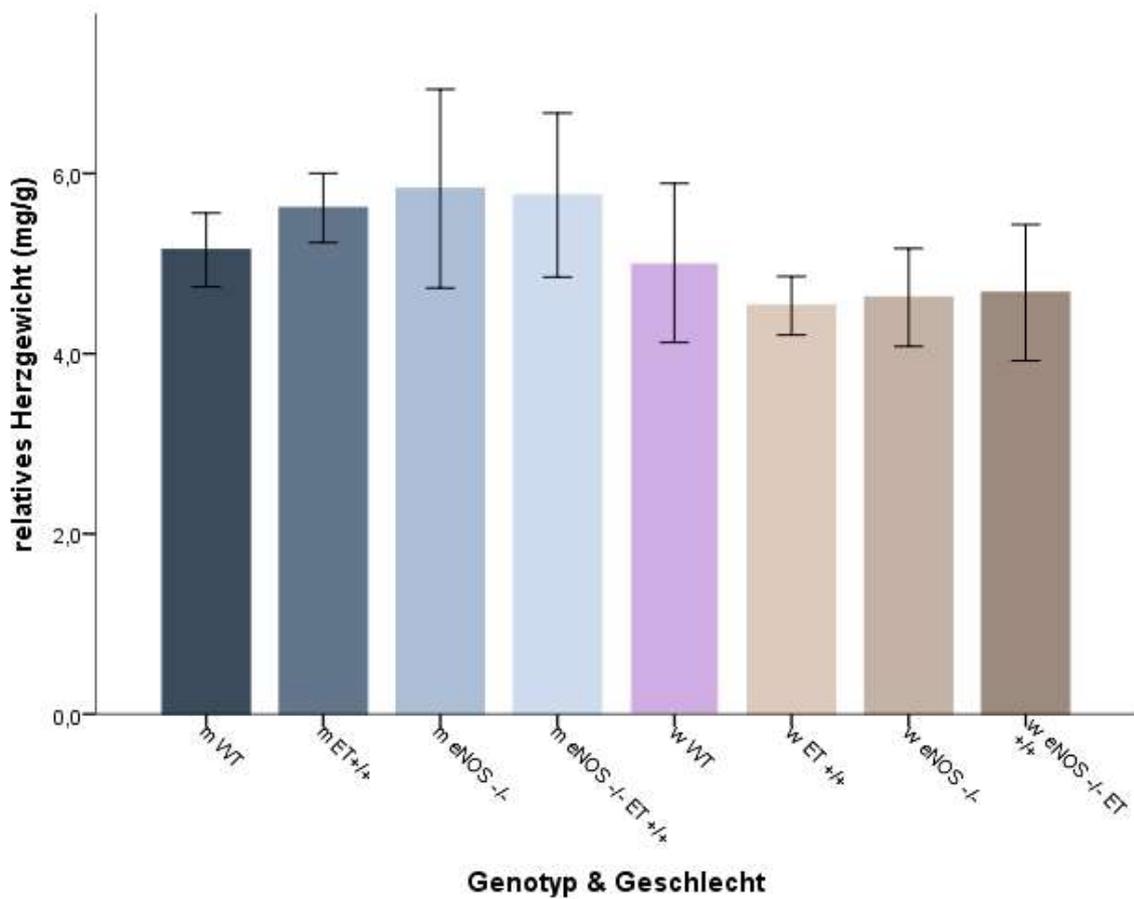


Abbildung 3-6. Relatives Herzgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, m ET+/+ n=13, eNOS-/- n=17, eNOS-/- ET+/+ n=11

weibliche Tiere: WT n=10, ET+/+ n=13, eNOS-/- n=11, eNOS-/- ET+/+ n=10

ANOVA (Welch-Test): $p = 0,002$

Post-Hoc-Untersuchungen:

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.1.3 Absolutes und relatives Lungenfeuchtgewicht

3.1.3.1 Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp

Das absolute Lungenfeuchtgewicht unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tiergruppen.

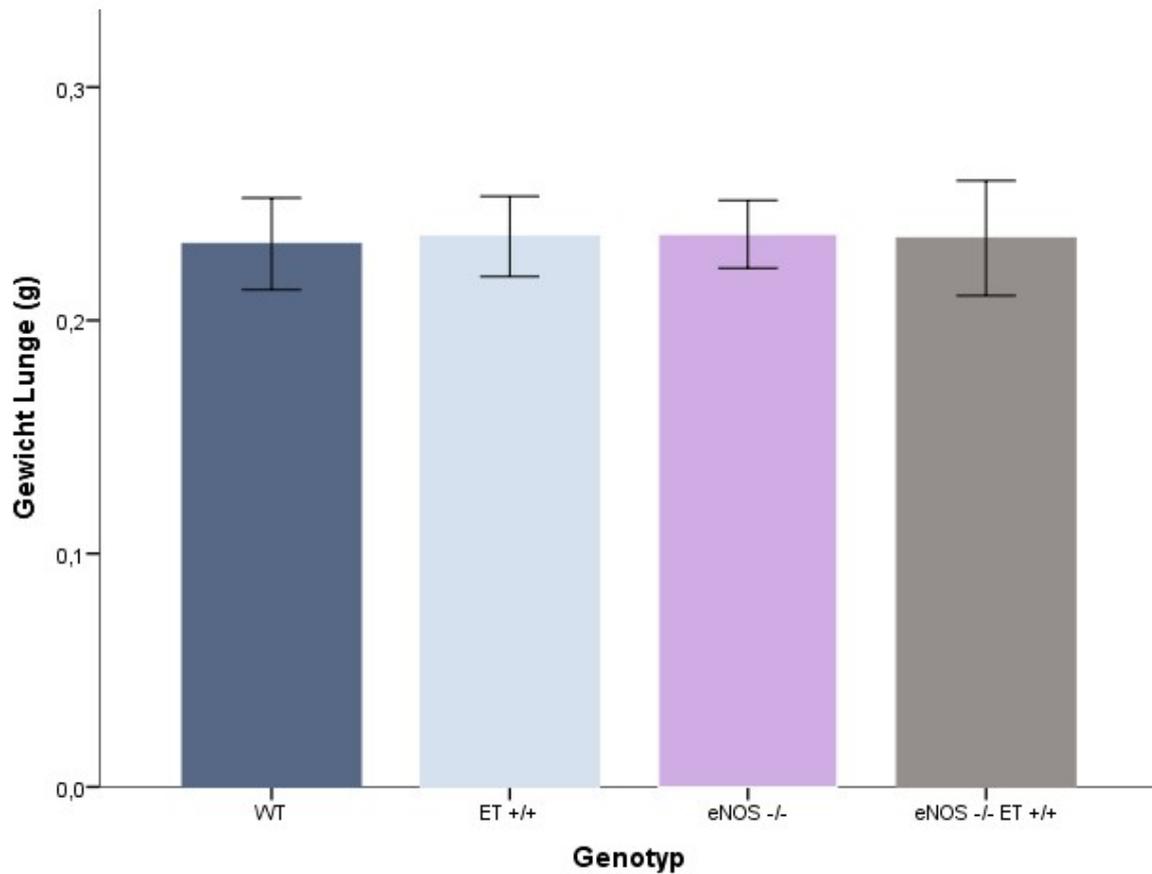


Abbildung 3-7. Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=25, ET+/+ n=25, eNOS-/- n=26, eNOS-/- ET+/+ n=21

Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.1.3.2 Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Das absolute Lungenfeuchtgewicht lag bei den weiblichen WT-Tieren signifikant niedriger als bei den männlichen WT-Tieren, den männlichen eNOS^{-/-} Tieren und den männlichen eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tieren.

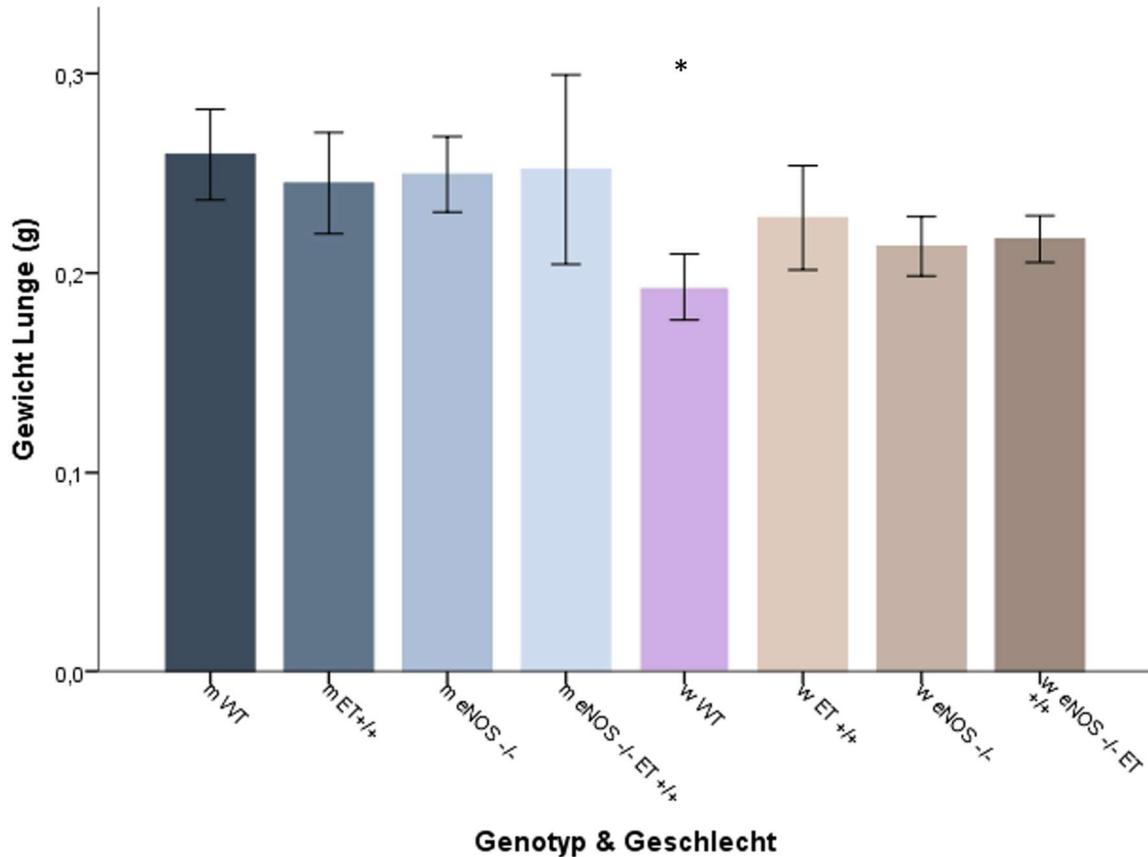


Abbildung 3-8. Absolutes Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, ET^{+/+} n=12, eNOS^{-/-} n=17, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=11

weibliche Tiere: WT n=10, ET^{+/+} n=13, eNOS^{-/-} n=9, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=10

ANOVA: p = 0,001

Post-Hoc-Untersuchungen:

* p < 0,05 w WT vs. m WT und m eNOS^{-/-} und m eNOS^{-/-} ET^{+/+}

3.1.3.3 Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp

Für diesen Parameter wurde das Lungenfeuchtgewicht durch das Körpergewicht geteilt. Das relative Lungenfeuchtgewicht der ET^{+/+} Tiere war signifikant höher als das der WT- und eNOS^{-/-} Tiere.

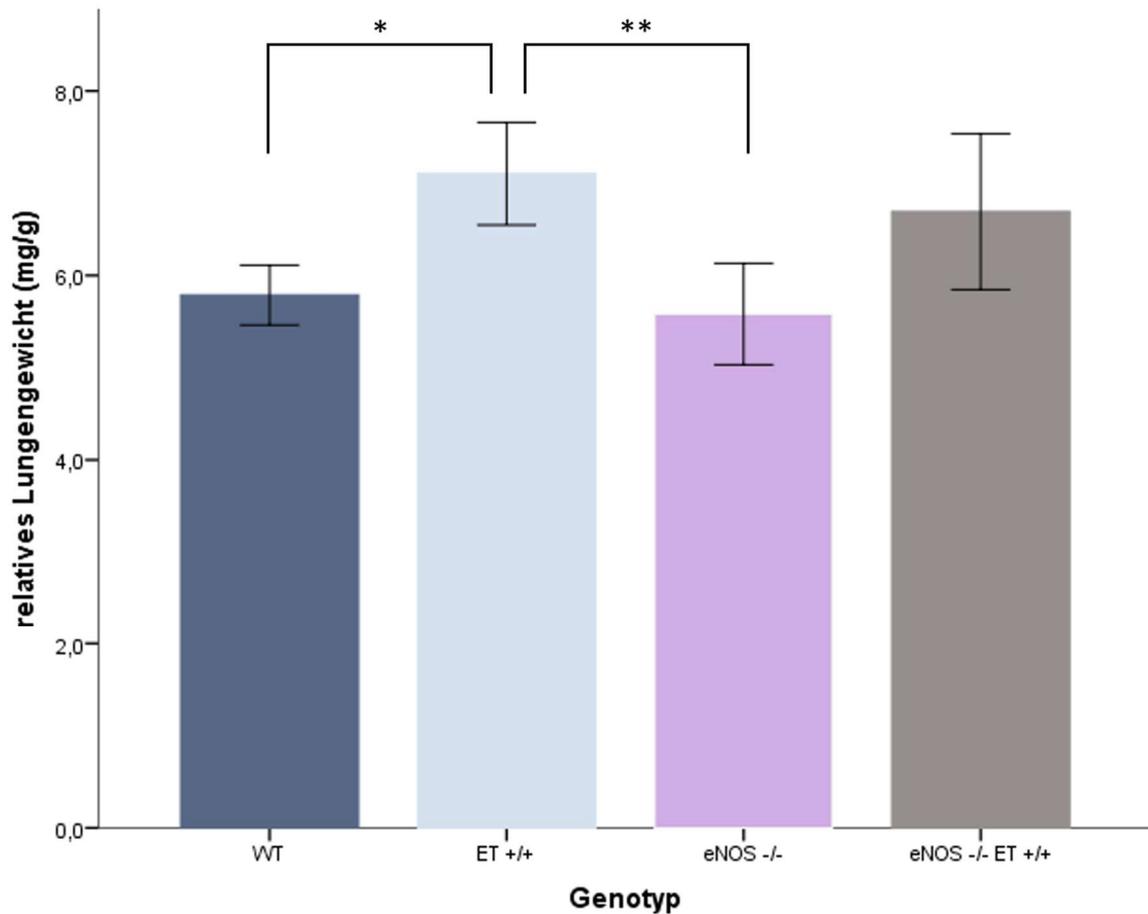


Abbildung 3-9. Relatives Lungenfeuchtgewicht Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=25, ET^{+/+} n=25, eNOS^{-/-} n=26, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=21

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$

Post-Hoc-Untersuchungen (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur):

* $p < 0,008$ ET^{+/+} vs. WT

** $p < 0,008$ ET^{+/+} vs. eNOS^{-/-}

3.1.3.4 Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Das relative Lungenfeuchtgewicht der weiblichen ET+/+ Tiere war signifikant höher als das der männlichen WT sowie der männlichen eNOS-/- Tiere.

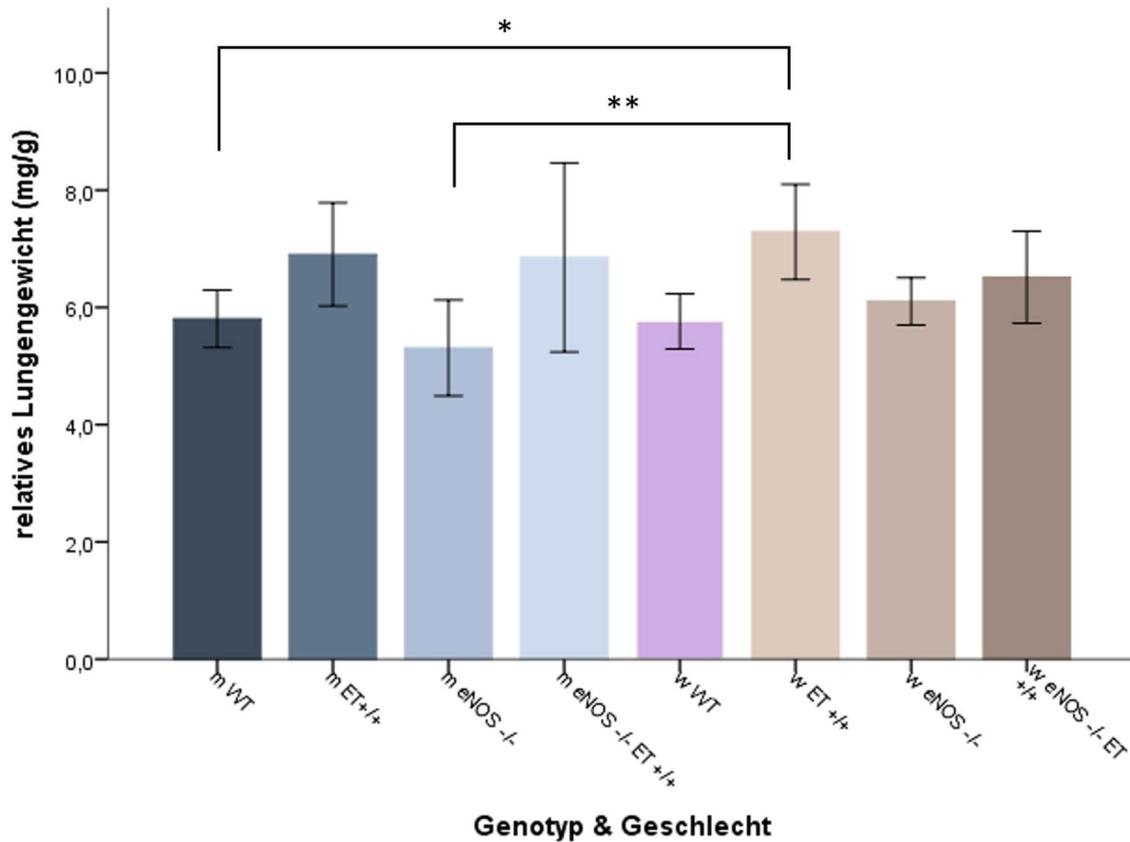


Abbildung 3-10. Relatives Lungenfeuchtgewicht – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, ET +/+ n=12, eNOS-/- n=17, eNOS-/- ET+/+ n=11

weibliche Tiere: WT n=10, ET+/+ n=13, eNOS-/- n=9, eNOS-/- ET+/+ n=10

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,002$

Post Hoc Untersuchungen (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur):

* $p < 0,002$ w ET+/+ vs. m WT

** $p < 0,002$ w ET+/+ vs. m eNOS-/-

3.2 Histologische Analyse

3.2.1 Interstitielle Fibrose

3.2.1.1 Aufteilung nach Genotyp

Bezüglich der interstitiellen Fibrose gab es keine signifikanten Gruppenunterschiede.

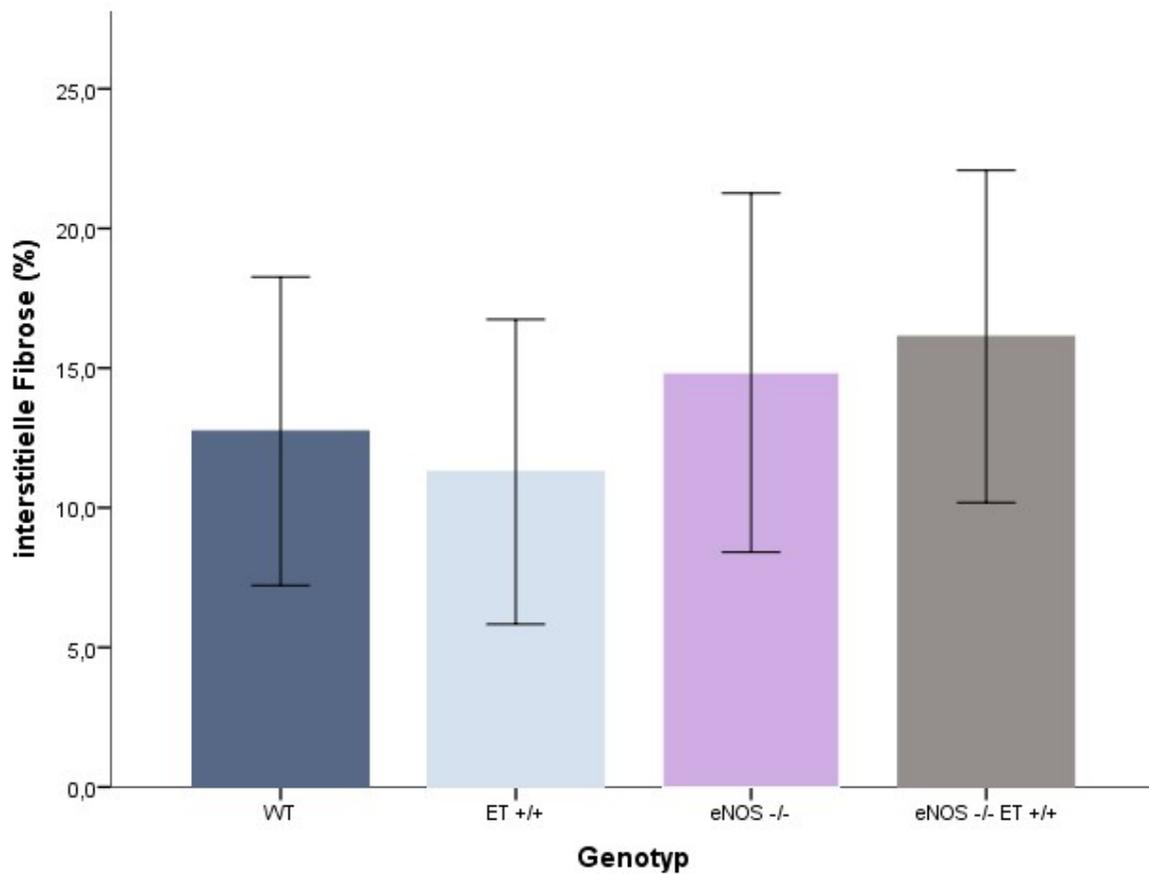


Abbildung 3-11. Interstitielle Fibrose – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=29, ET+/+ n=34, eNOS-/- n=33, eNOS-/- ET+/+ n=21

Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.2.1.2 Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Männchen und Weibchen des gleichen Genotyps zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der interstitiellen Fibrose. Beim Vergleich der männlichen bzw. weiblichen Tiere untereinander waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

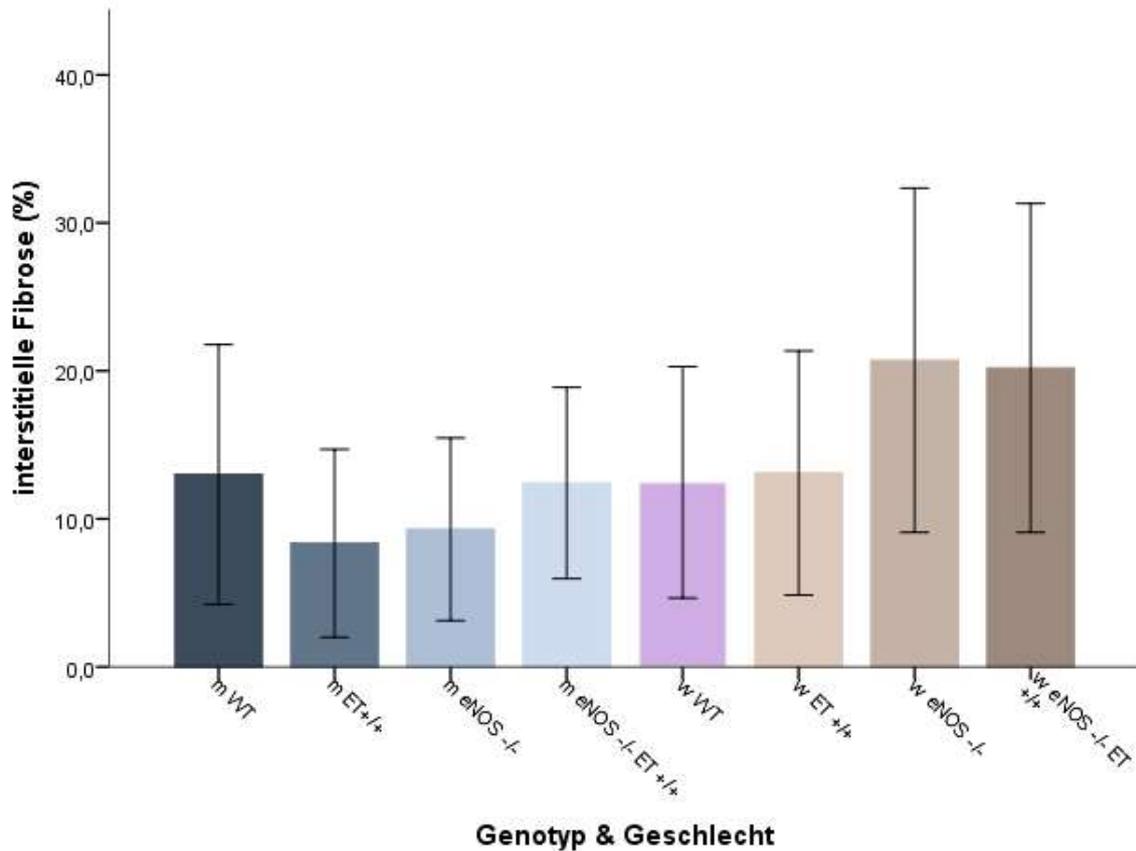


Abbildung 3-12. Interstitielle Fibrose – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, m ET+/+ n=13, eNOS-/- n=17, eNOS-/- ET+/+ n=11

weibliche Tiere: WT n=14, ET+/+ n=21, eNOS-/- n=16, eNOS-/- ET+/+ n=10

Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.2.2 Perivaskuläre Fibrose

3.2.2.1 Aufteilung nach Genotyp

Im 1. Score zeigten Tiere der eNOS^{-/-} Gruppe eine signifikant stärker ausgeprägte perivaskuläre Fibrose als WT-Tiere. Im 2. Score waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen erkennbar.

Tabelle 3-1. Perivaskuläre Fibrose – 1. und 2. Score – Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	n	1. Score	2. Score
WT	28	3,06 ± 0,92	4,21 ± 0,42
ET ^{+/+}	32	3,60 ± 0,80	4,36 ± 0,28
eNOS ^{-/-}	33	* 3,63 ± 0,67	4,43 ± 0,26
eNOS ^{-/-} ET ^{+/+}	20	3,41 ± 0,90	4,29 ± 0,41

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

1. Score ANOVA: p = 0,03; Post-Hoc-Untersuchungen: * p < 0,05 eNOS^{-/-} vs. WT

2. Score ANOVA: p > 0,05; keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.2.2.2 Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Im 1. Score zeigten weibliche WT-Tiere eine signifikant weniger stark ausgeprägte perivaskuläre Fibrose als männliche Tiere der Gruppen WT, ET^{+/+}, eNOS^{-/-} sowie weibliche Tiere der Gruppen eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+}. Im 2. Score wurde eine signifikant geringer ausgeprägte perivaskuläre Fibrose bei weiblichen WT-Tieren nur im Vergleich zu männlichen ET^{+/+} bzw. eNOS^{-/-} Tieren und weiblichen eNOS^{-/-} Tieren identifiziert.

Tabelle 3-2. Perivaskuläre Fibrose – 1. und 2. Score – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp & Geschlecht	n	1. Score	2. Score
m WT	14	3,51 ± 0,82	4,40 ± 0,38
m ET ^{+/+}	13	3,84 ± 0,69	4,46 ± 0,24
m eNOS ^{-/-}	17	3,51 ± 0,62	4,43 ± 0,29
m eNOS ^{-/-} ET ^{+/+}	11	3,12 ± 0,96	4,24 ± 0,47
w WT	14	* 2,60 ± 0,79	** 4,04 ± 0,38
w ET ^{+/+}	19	3,44 ± 0,85	4,29 ± 0,28
w eNOS ^{-/-}	16	3,76 ± 0,72	4,43 ± 0,23
w eNOS ^{-/-} ET ^{+/+}	9	3,76 ± 0,70	4,35 ± 0,35

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

1. Score ANOVA: $p = 0,001$; Post-Hoc-Untersuchungen:

* $p < 0,05$ w WT vs. m WT und vs. m ET $^{+/+}$ und vs. m eNOS $^{-/-}$ und vs. w eNOS $^{-/-}$ und vs. w eNOS $^{-/-}$ ET $^{+/+}$

2. Score ANOVA: $p = 0,013$; Post-Hoc-Untersuchungen:

** $p < 0,05$ w WT vs. m ET $^{+/+}$ und vs. m eNOS $^{-/-}$ und vs. w eNOS $^{-/-}$

3.2.3 Media-Lumen-Ratio

3.2.3.1 Aufteilung nach Genotyp

Die Media-Lumen-Ratio unterschied sich zwischen den Untersuchungsgruppen nicht signifikant.

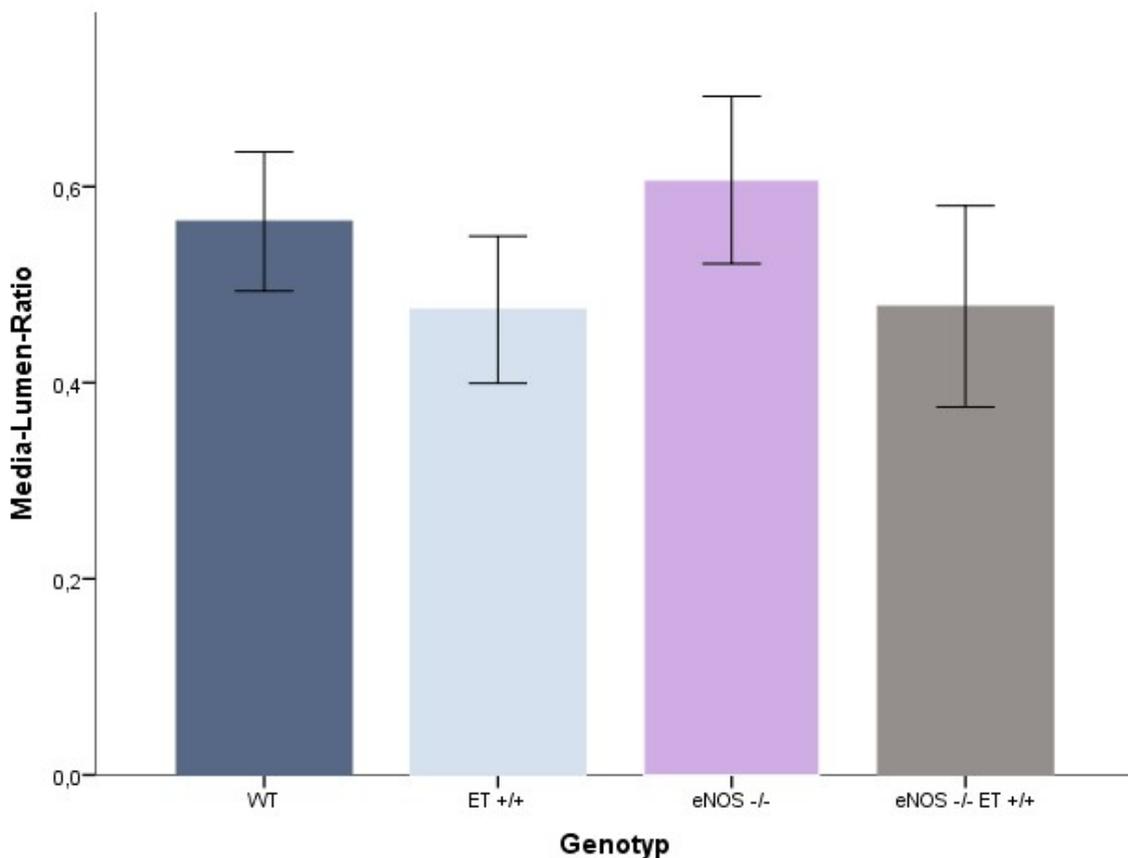


Abbildung 3-13. Media-Lumen-Ratio – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT $n=32$, ET $^{+/+}$ $n=33$, eNOS $^{-/-}$ $n=33$, eNOS $^{-/-}$ ET $^{+/+}$ $n=21$

ANOVA: $p = 0,49$

Post-Hoc-Untersuchungen:

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.2.3.2 Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Auch bei einer Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht ergaben sich bezüglich der Media-Lumen-Ratio keine signifikanten Unterschiede.

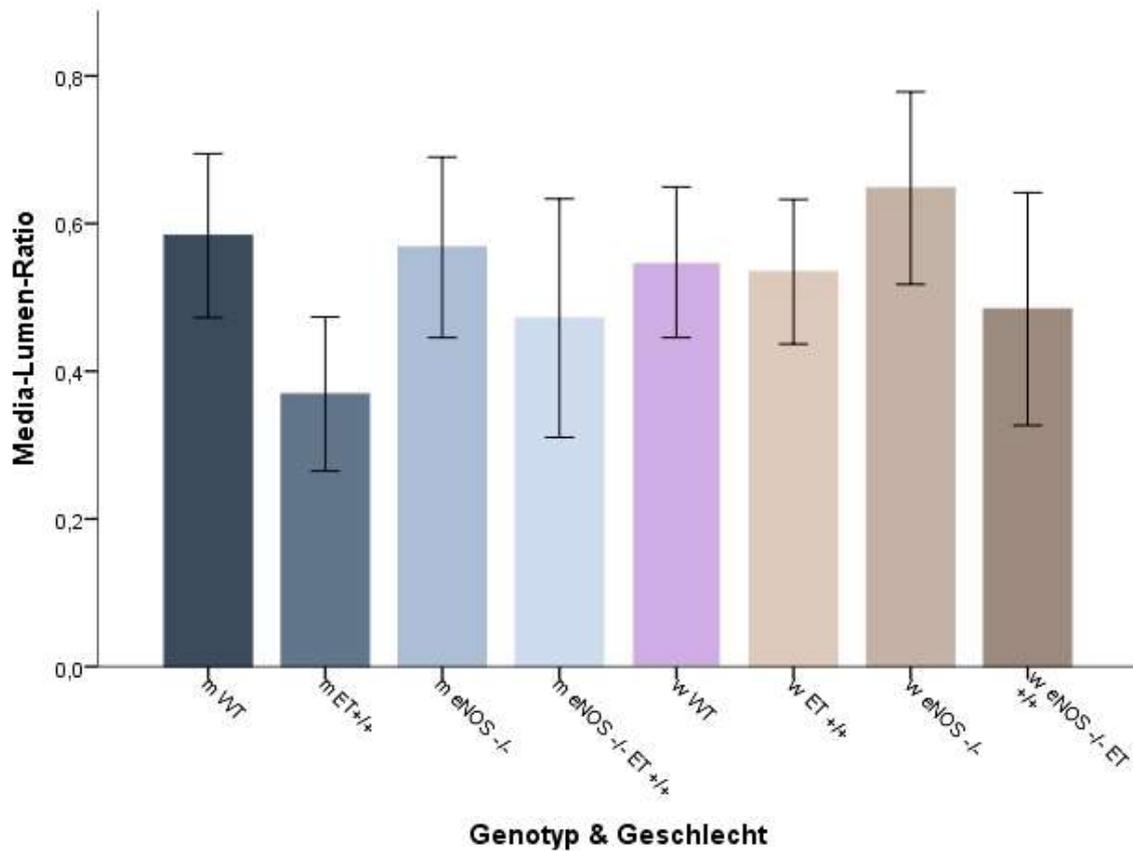


Abbildung 3-14. Media-Lumen-Ratio – Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

männliche Tiere: WT n=15, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=17, eNOS-/- ET+/+ n=11

weibliche Tiere: WT n=17, ET+/+ n=21, eNOS-/- n=16, eNOS-/- ET+/+ n=10

ANOVA: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede

3.3 Hämodynamische Messungen

3.3.1 Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.)

Der RVP max. in den untersuchten Tiergruppen war nicht signifikant verschieden.

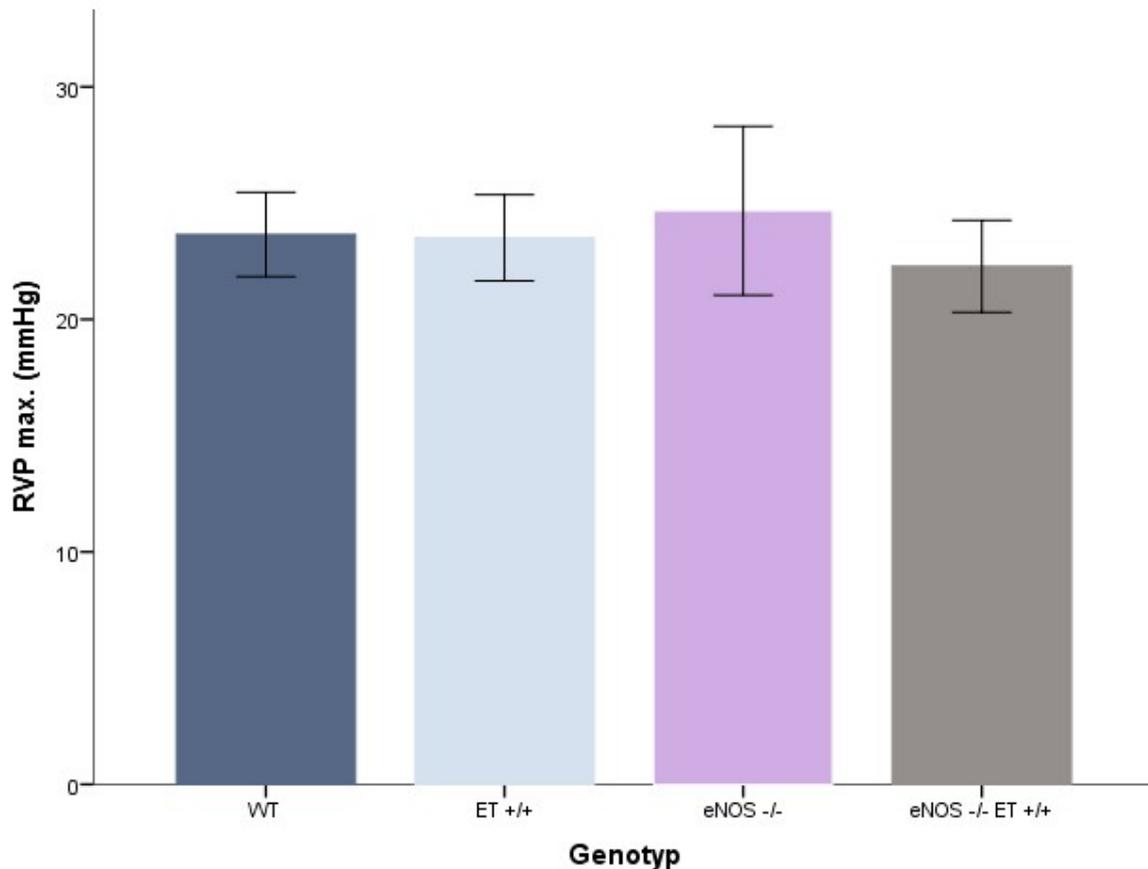


Abbildung 3-15. Maximaler rechtsventrikulärer Druck (RVP max.) – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung
WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12
ANOVA: $p > 0,05$
keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.3.2 Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.)

Der RVP min. war bei den ET^{+/+} Tieren signifikant höher als bei den WT-Tieren.

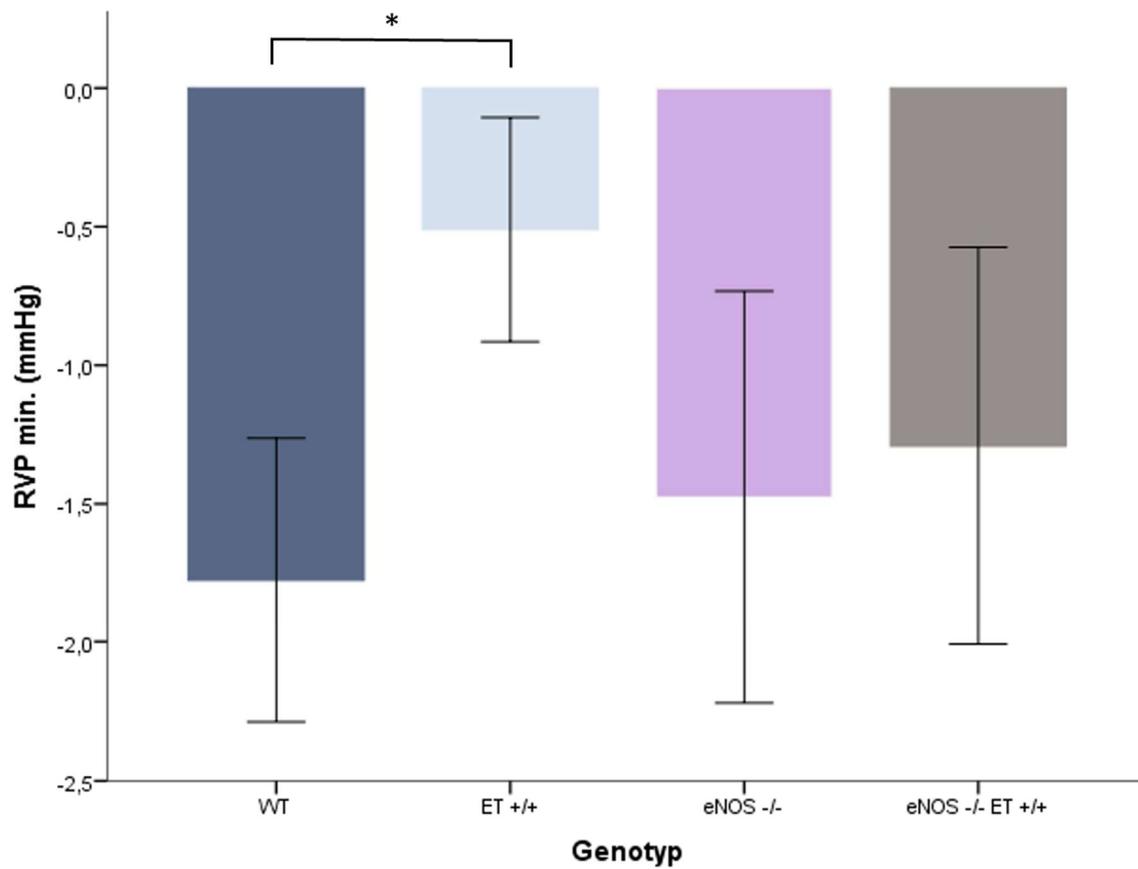


Abbildung 3-16. Minimaler rechtsventrikulärer Druck (RVP min.) – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

WT n=11, ET^{+/+} n=12, eNOS^{-/-} n=12, eNOS^{-/-} ET^{+/+} n=12

ANOVA: p = 0,018

Post-Hoc-Untersuchungen:

* p < 0,05 WT vs. ET^{+/+}

3.3.3 Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)

Der RVEDP unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

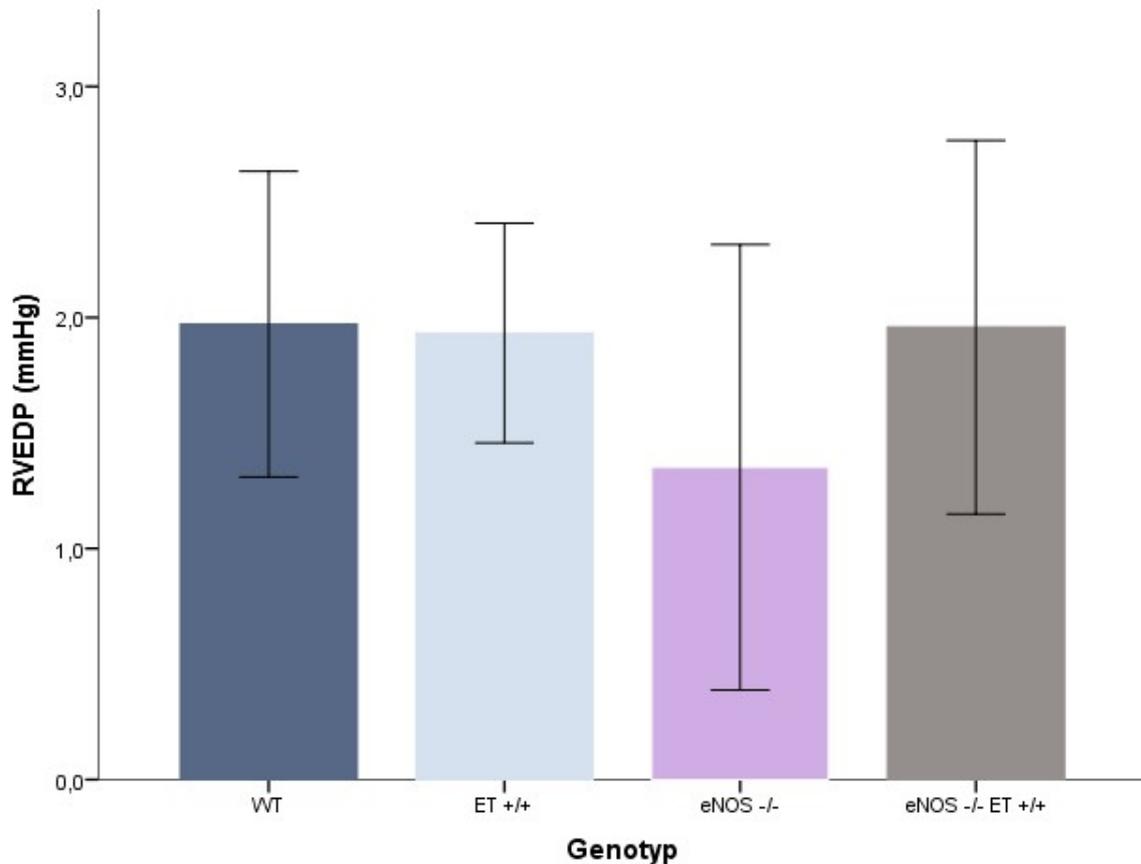


Abbildung 3-17. Rechtsventrikulärer enddiastolische Druck (RVEDP) – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12

ANOVA: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.3.4 Maximale rechtsventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max.)

Hinsichtlich der dP/dt max. konnte zwischen den untersuchten Gruppen kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

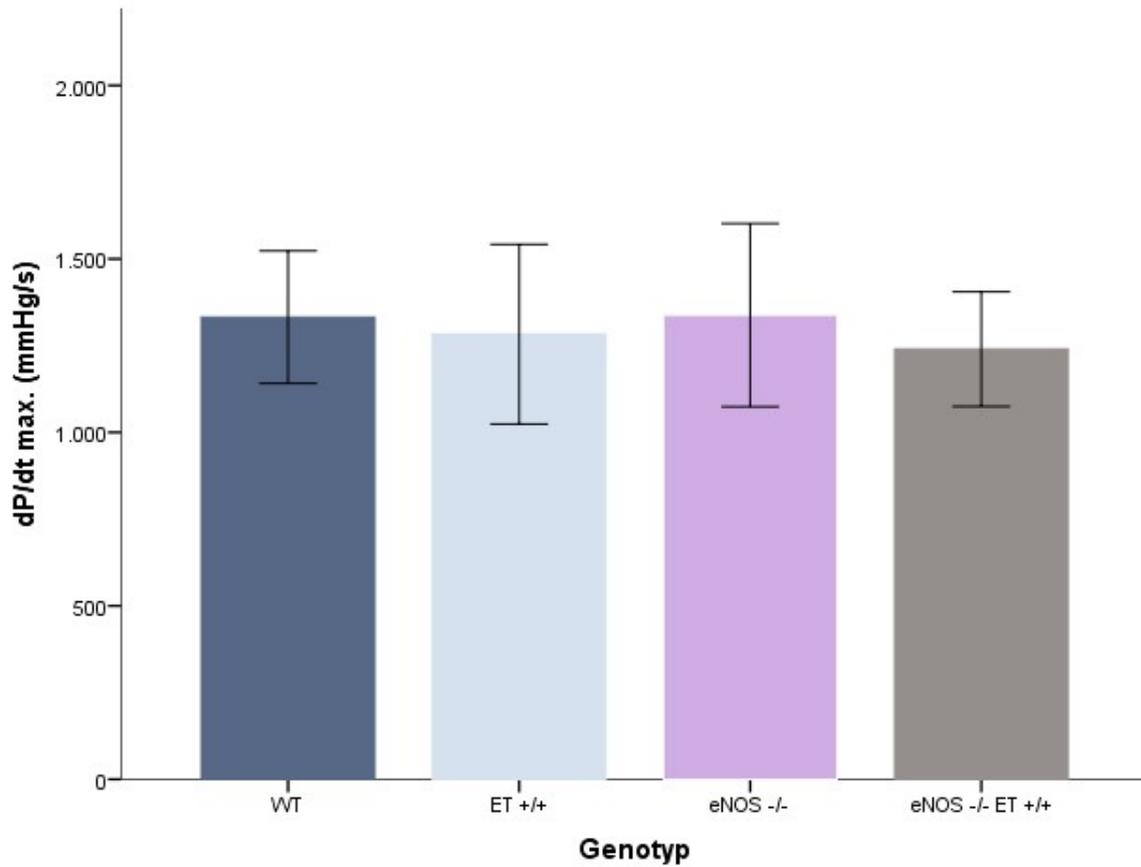


Abbildung 3-18. Maximale rechtsventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max.) – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12

ANOVA: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.3.5 Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.)

Die dP/dt min. unterschied sich zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant.

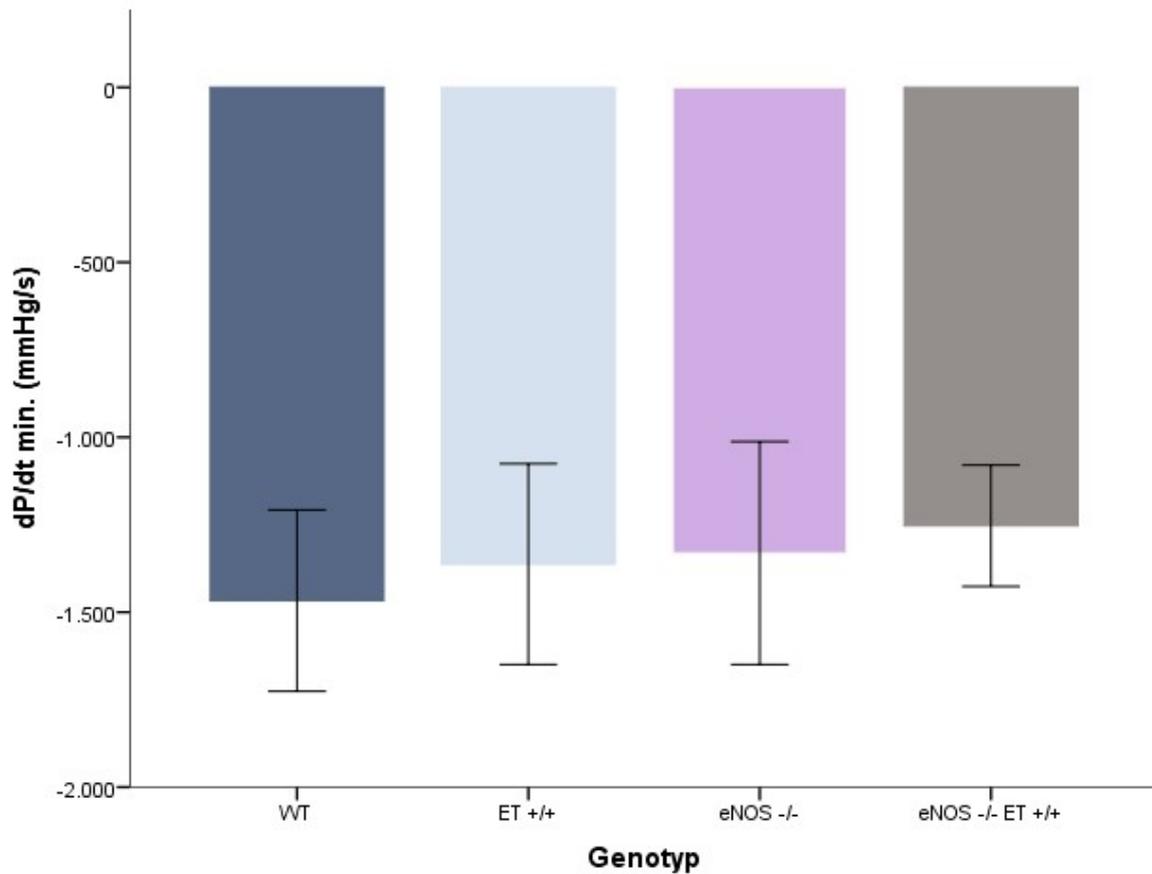


Abbildung 3-19. Minimale rechtsventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min.) – Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12

ANOVA: $p > 0,05$

keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.3.6 Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau)

Zwischen den untersuchten Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Tau-Wertes gefunden.

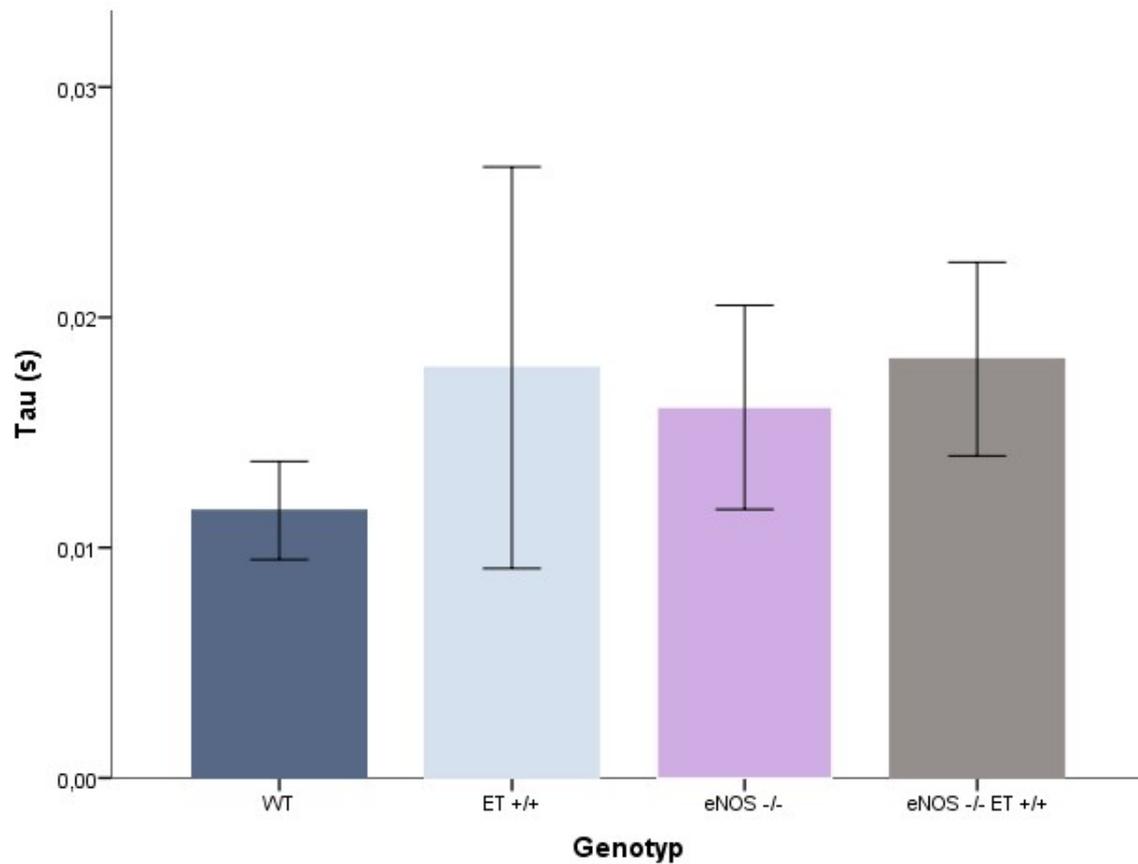


Abbildung 3-20. Rechtsventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (Tau) – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung
WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12.
ANOVA: $p > 0,05$
keine statistisch signifikanten Unterschiede

3.3.7 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tiergruppen.

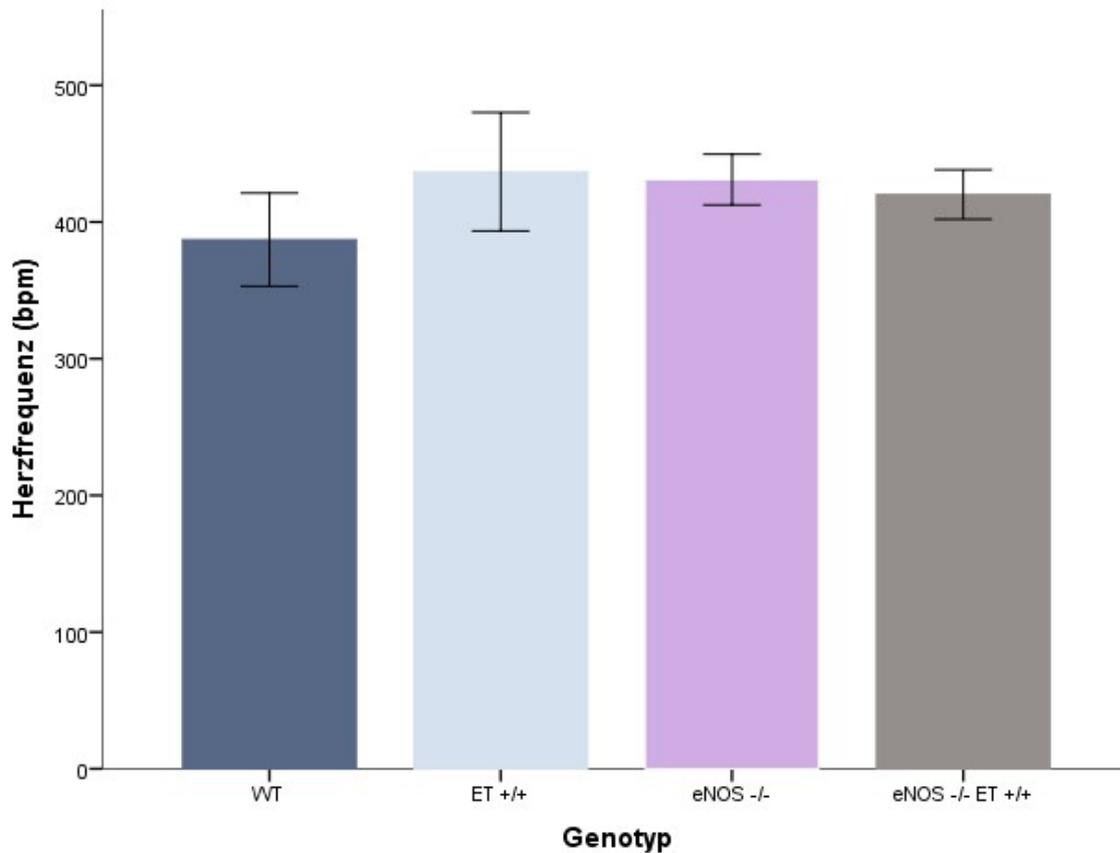


Abbildung 3-21. Herzfrequenz – Aufteilung nach Genotyp
angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung
WT n=11, ET+/+ n=12, eNOS-/- n=12, eNOS-/- ET+/+ n=12
ANOVA: $p > 0,05$
keine statistisch signifikanten Unterschiede

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des Endothelin- und des NO-Systems im Lungenkreislauf und Lungengewebe untersucht. Anhand eines neuen transgenen Mausmodells sollte evaluiert werden, ob die chronische Überexpression von human-ET-1 bei einem gleichzeitigen durch einen eNOS-Knockout bedingten NO-Mangel zu einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Blutdrucks und zu Veränderung der rechtsventrikulären Herzfunktion führt. Die hämodynamischen Verhältnisse wurden mittels Rechtsherzkatheter und Konduktanzmessung untersucht. Darüber hinaus wurden die morphologischen Veränderungen des Lungengewebes und der arteriellen Lungengefäße analysiert. Dazu wurde das Ausmaß der interstitiellen und perivaskulären Fibrose mittels digitaler Morphometrie sowie das vaskuläre Remodeling über die Media-Lumen-Ratio pulmonal-arterieller Gefäße bestimmt.

Durch den Vergleich von eNOS^{-/-} ET-1^{+/+} Mäusen, ET-1^{+/+} Mäusen, eNOS^{-/-} Mäusen und WT-Mäusen sollte evaluiert werden, ob die potenziellen Veränderungen durch eine isolierte ET-1-Überexpression bzw. ein isoliertes eNOS-Knockout oder durch eine Kombination beider Modifikationen verursacht wurden.

4.1 Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit

- Die Überexpression von human ET-1 in NO-defizitären Mäusen führte nicht zu einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Blutdrucks.
- In den pulmonal-arteriellen Gefäßen konnten keine Veränderungen im Sinne eines vaskulären Remodelings nachgewiesen werden.
- Im Lungeninterstitium kam es nicht zu einem fibrotischen Umbau.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Untersuchung des vaskulären Remodelings und der Fibrosebildung

Die mit einem vaskulären Remodeling einhergehende Mediahypertrophie wurde in der vorliegenden Arbeit morphometrisch anhand der Media-Lumen-Ratio quantifiziert. Diese Methode ist zur Quantifizierung des Gefäßumbaus in der Literatur etabliert (153). In Ratten führt die Monocrotalin-induzierte-PH zu einem arteriellen Remodeling, das sich in einer signifikant erhöhten Media-Lumen-Ratio widerspiegelt (154). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde ebenfalls in Ratten durch die Anlage eines aorto-kavalen Shunts und durch die zusätzliche Applikation von Monocrotalin ein Modell für eine flussabhängige PH etabliert. Zur Bestimmung des

Gefäßremodelings wurde zusätzlich zur Media-Lumen-Ratio ein Okklusions-, ein Muskularisierungs- sowie ein Neointima-Score bestimmt. Alle Parameter nahmen im Verlauf der PH zu (155). Eine derartig differenzierte Charakterisierung des Gefäßumbaus wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen.

In der vorliegenden Studie wurde der interstitielle Kollagengehalt in Sirius-Red gefärbten Lungenschnitten bestimmt und der Ausprägungsgrad der perivaskulären Fibrose anhand eines Scores ermittelt. Die Sirius-Red-Färbung zur Identifizierung von Kollagen ist ein etabliertes Verfahren und beruht auf der von Junqueira et al. beschriebenen Methode (156). Die praktische Anwendbarkeit des Verfahrens zur Beurteilung fibrosierender Prozesse in Lungen von Ratten wurde von Malusch et al. bestätigt (157). Mit der Sirius-Red-Färbung stellen sich Kollagenfasern vom Typ I und III im Lichtmikroskop rot dar. Der Farbstoff reagiert in geringem Umfang auch mit nicht-kollagenen Strukturen. In der Literatur wurde die zusätzliche Verwendung eines Polarisationsmikroskops beschrieben, um die Kollagenfasern selektiver erfassen und zwischen Kollagenfasern vom Typ I und III unterscheiden zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kollagenfärbung lediglich lichtmikroskopisch ausgewertet. Das in dieser Arbeit verwendete Scoring-System zur Bestimmung der perivaskulären Fibrose beruht auf dem von Raji et al. zur Bestimmung der Ausprägung einer Glomerulosklerose entwickelten semiquantitativen Score (158). In der Literatur werden semiquantitative Scores zur Bestimmung der perivaskulären Fibrose u.a. in Nieren-, Herz- und Lungengewebe häufig verwendet (4, 159, 160).

4.2.2 Messung des rechtsventrikulären Blutdrucks und der Herzfunktion

Die kardiale Phänotypisierung der eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäuse erfolgte in der vorliegenden Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter und Konduktanzmessung. Die Methodik ist im murinen Tiermodell gut etabliert (161-166). Dabei entspricht die Messung des RVP max. bei funktional intakter Pulmonalklappe dem systolischen pulmonal-arteriellen Druck (164). Die Konduktanzmethode gilt als Goldstandard für die Analyse der systolischen und diastolischen Herzfunktion (148). Ihre Validität wurde über einen Vergleich mit echokardiografischen und magnetresonanztomografischen Daten bestätigt (167, 168).

Ein Nachteil des Rechtsherzkatheters ist seine Invasivität. Es handelt sich um eine terminale Untersuchung, an deren Anschluss die Tiere getötet werden müssen. Daher sind keine Verlaufskontrollen möglich. Aufgrund der Invasivität ist zudem eine Anästhesie notwendig. Narkotika und die Körpertemperatur beeinflussen die Herzfrequenz und Kontraktilität des Myokards. Diese Effekte müssen bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. In der Literatur wird empfohlen,

die Herzfrequenz von Mäusen unter Isofluran-Narkose über einen Wert von 470 bpm zu halten, um einen negativen Effekt auf die Hämodynamik zu vermeiden (165, 166). In der vorliegenden Arbeit betrug die durchschnittliche Herzfrequenz aller Tiere der vier Untersuchungsgruppen 419 bpm. Dabei traten keine signifikanten Gruppenunterschiede auf. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Herzfrequenz ist die Narkosetiefe. Darüber hinaus beeinflusst auch das Temperaturmanagement die Herzfrequenz. Da alle Tiere dem gleichen Anästhesieverfahren unterzogen wurden, sollten eventuell resultierende Effekte auf die Hämodynamik bei allen Tieren gleichermaßen auftreten. Ein solcher systematischer Fehler sollte daher mögliche Unterschiede bei den gemessenen Parametern der einzelnen Tiergruppen nicht verfälschen.

4.2.3 Tiermodelle für menschliche Krankheiten

Der Einsatz von Tiermodellen in der biomedizinischen Grundlagenforschung dient dem Verständnis von Krankheitsprozessen und der Aufklärung der ihnen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen. Alternativmethoden wie in-vitro Zellsysteme, in-silico Verfahren oder „body on a chip“ Methoden stehen nicht für alle präklinische Forschungsfragen zur Verfügung. Daher war der Einsatz eines Tiermodells auch in der vorliegenden Arbeit unerlässlich. Mausmodelle spielen in der tierexperimentellen Forschung aufgrund der leichten und kostengünstigen Haltung der Tiere, der hohen Reproduktionsrate und der physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit mit dem Menschen eine bedeutende Rolle. Zudem wird die tierexperimentelle Forschung an Mäusen gesellschaftlich eher akzeptiert als an anderen Tieren (169). Die Entwicklung von transgenen Mausmodellen erlaubt es, durch Überexpression oder Deletion von Genen, deren Funktionen in-vivo zu analysieren. Die Generierung von murinen Krankheitsmodellen ermöglicht es, Rückschlüsse auf zellbiologische Grundlagen humaner Erkrankungen zu ziehen sowie neue Diagnostikmethoden und therapeutische Strategien zu entwickeln.

Das Krankheitsbild der PH umfasst fünf Untergruppen von pulmonal-vaskulären Erkrankungen mit unterschiedliche Pathomechanismen. Für jede dieser Untergruppen existieren Maus- und Rattenmodelle, die aber den Krankheitsprozess nicht in allen Aspekten adäquat abbilden (169). Ähnliches gilt für die IPF, ebenfalls eine chronische Erkrankung, deren Ursache und Pathomechanismus noch nicht gänzlich verstanden sind. Daher bildet die Entwicklung von validierten Mausmodellen, die den pathologischen Verlauf dieser Erkrankungen im Menschen nicht nur in Teilaspekten imitieren, sondern umfassend abbilden, einen Schwerpunkt der biomedizinischen Grundlagenforschung im Bereich der PH und IPF. Das eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mausmodell weist Veränderungen in zellulären Signalwegen auf, die auch im Krankheitsprozess der PH und IPF eine Rolle spielen. Daher wurde initial die Hypothese aufgestellt, dass die Charakterisierung des pulmonalen

Phänotyps dieses Tiermodells wertvolle Hinweise auf den Verlauf der PH oder IPF im Menschen liefern könnte.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Körpergewicht, Herzgewicht und Lungengewicht

Die ET^{+/+} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tiere zeigten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als eNOS^{-/-} Tiere. Darüber hinaus lag das Körpergewicht der ET^{+/+} Tiere signifikant niedriger als das der WT-Tiere. Ein erniedrigtes Körpergewicht von ET-1-transgenen Tieren wurde in der Literatur bereits beschrieben (170, 171). Eine vermehrte Expression von ET-1 hat somit in Mäusen ein geringeres Körpergewicht zur Folge.

ET-1 führt über die Hemmung der Insulinaktivität zu einer Lipolyse in humanen Adipozyten (107), was das geringere Körpergewicht bei den ET-1-überexprimierenden Tieren erklären könnte. Bei einer zusätzlichen Aufteilung der Genotyp-Gruppen nach Geschlecht zeigte sich, dass das Körpergewicht der männlichen eNOS^{-/-} ET^{+/+} und ET^{+/+} Tiere signifikant niedriger lag als das der männlichen WT- und eNOS^{-/-} Tiere. Zwischen den weiblichen Genotyp-Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede auf.

Die in der Literatur beschriebene Entwicklung von Übergewicht bei eNOS^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Schild et al. fanden bei 10 Monate alten eNOS^{-/-} Mäusen ein um 48 % höheres Körpergewicht als bei WT-Mäusen und führten diesen Befund auf eine fehlende NO-Inhibition der Citrat- und Lipidsynthese in der Leber und eine daraus folgende gesteigerte Bildung von viszeralem Fettgewebe zurück (172). Im Widerspruch zu diesen Beobachtungen detektierten Shesely et al. niedrigere Körpergewichte bei eNOS^{-/-} Mäusen (173).

Der Vergleich der relativen Herzgewichte ergab in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen. Somit fehlten Hinweise auf die Ausbildung einer Myokardhypertrophie in den Gruppen. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen zweier Studien mit eNOS^{-/-} Mäusen, die ebenfalls keine veränderten Herzgewichte und keine kardiale Hypertrophie detektierten (141, 173).

In einem anderen transgenen Mausmodell zeigten dagegen männliche eNOS^{-/-} Mäuse Anzeichen für eine Linksherzhypertrophie in Form eines erhöhten Herzgewichts, eines erhöhten Kardiomyozyten-Durchmessers sowie einer Verdickung der Herzwände (147).

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigten in zwei Studien mit human-ET-1-transgenen Mäusen das Gesamterzgewicht sowie das rechtsventrikuläre Herzgewicht keine Auffälligkeiten (3, 138).

Zudem wurde in der vorliegenden Studie bei den ET^{+/+} Tieren eine Gewichtszunahme der Lungen als möglicher Hinweis auf eine erhöhte pulmonale Kollagensynthese mit Ausbildung einer Lungenfibrose, eine Inflammation oder ein Lungenödem beobachtet. Die Tiere zeigten im Vergleich zu den WT- und eNOS^{-/-} Tieren ein signifikant höheres relatives Lungengewicht. Die Zunahme des Lungengewichts als Marker für das Ausmaß der Lungenfibrose wird in der Literatur häufig beschrieben (174-178). Allerdings geht eine vermehrte interstitielle Fibrose nicht zwingend mit einer Zunahme des Lungengewichts einher, wie zwei Studien mit human-ET-1-transgenen Mäusen belegten, die trotz einer vermehrten interstitiellen Fibrose keine veränderten Lungengewichte fanden (3, 4).

4.3.2 Vaskuläres Remodeling

Bei den untersuchten eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tieren, ET^{+/+} Tieren, eNOS^{-/-} Tieren und WT-Tieren war die Media-Lumen-Ratio der arteriellen Lungengefäße nicht signifikant verschieden. Auch in anderen Studien zeigten eNOS^{-/-} Mäuse unter Normalbedingungen keine Mediahypertrophie der Aorta, Karotiden und Lungengefäße im Sinne eines vaskulären Remodelings (5, 179-181). Widersprüchliche Ergebnisse zeigen sich, wenn die Tiere einem Hypoxiereiz ausgesetzt werden. In einer Studie reagierten die Tiere mit zunehmendem vaskulären Remodeling der Lungengefäße (144, 145), in einer anderen Studie führte dagegen eine NO-Defizienz zu einem reduzierten Gefäßumbau im Vergleich zur WT-Kontrolle (181). Erwähnenswert ist, dass sich das bei hypoxischen eNOS^{-/-} Mäusen beobachtete vaskuläre Remodeling nicht in einer Mediahypertrophie, sondern in einer dezenten Neo-Muskularisierung kleiner Lungenarterien äußert (144, 145).

Die arteriellen Lungengefäße bei human-ET-1-transgenen Mäusen zeigten keine Veränderungen der Media-Lumen-Ratio verglichen mit der WT-Kontrolle (3, 4).

Auch in der Aorta von human-ET-1-transgenen Mäusen konnte keine Mediahypertrophie nachgewiesen werden (5, 182). ET-1-transgene Mäuse, die das Transgen gezielt in Endothelzellen exprimieren, zeigten dagegen eine Zunahme der Media-Lumen-Ratio in den Mesenterialarterien (171).

In eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäusen wurde das vaskuläre Remodeling bislang an der Aorta und an intramyokardialen Arteriolen untersucht. Trotz des erhöhten systemischen Blutdrucks in diesen Tieren ergab die Analyse der Aortenschnitte überraschenderweise ein reduziertes Media-Lumen-

Verhältnis gegenüber dem WT (5). Bei den Koronararterien wurden keine Veränderung der Media-Lumen-Ratio nachgewiesen (147).

4.3.3 Bestimmung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose

In keiner der untersuchten Tiergruppen fand sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikant erhöhter Anteil von fibrotischen Arealen im Vergleich zu den WT-Tieren. Damit stellen die eNOS-/- ET-1^{+/+} Mäuse ein Tiermodell dar, in dem die gestörte ET-1-/NO-Balance im Lungenparenchym nicht zu einer interstitiellen Fibrose führt. Dieses Ergebnis widerspricht der Erwartung, dass die Kombination aus eNOS-Knockout und ET-1-Überexpression die Ablagerung von extrazellulärer Matrix in Form von Kollagen erhöht. In einer Studie zeigten 12 Monate alte human-ET-1-transgene Mäuse einen erhöhten Kollagengehalt in perivaskulären und peribronchialen Lungenarealen. In einer anderen Studie führte die Hemmung des NO-Systems durch den nicht-selektiven NOS-Inhibitor L-NAME bereits bei 2 Monate alten ET-1-transgenen Mäusen zu einer verstärkten interstitiellen Fibrose. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 9 Monate alten ET^{+/+} Tiere wiesen im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen 12 Monate alten ET-1-transgenen Mäusen keine vermehrte interstitielle Fibrose auf.

Laut Literatur entwickeln eNOS-/- Mäuse keine interstitielle Fibrose. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (173, 183).

Mögliche Ursachen für eine pulmonale perivaskuläre Fibrose sind fibrosierende Lungenerkrankungen, chronisch vaskuläre Entzündungen sowie ein vaskulärer Gefäßumbau im Rahmen einer PH (42, 184-187). Der perivaskuläre Kollagengehalt wurde in der vorliegenden Arbeit semiquantitativ über einen Score bestimmt. Zwischen den untersuchten Tiergruppen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Nur bei den weiblichen eNOS-/- Tieren war das Ausmaß der perivaskulären Fibrose größer als bei den weiblichen WT-Tieren. In einer anderen Studie zeigten weibliche eNOS-/- Tiere bei der Untersuchung von myokardialen Arterien ebenfalls eine gesteigerte perivaskuläre Fibrose. In der gleichen Studie war das Ausmaß der perivaskulären Fibrose bei weiblichen ET^{+/+} Tieren größer als bei ihren männlichen Pendanten (159). Ein Grund für die erhöhte Vulnerabilität der Weibchen ist möglicherweise die Steuerung inflammatorischer Signalwege durch weibliche Sexualhormone (188). Der fehlende Anstieg der perivaskulären Fibrose in den ET^{+/+} Tieren deckt sich mit den Ergebnissen einer weiteren Studie (4).

4.3.4 Rechtsventrikulärer Blutdruck und Herzfunktion

In der vorliegenden Arbeit führte die Überexpression von ET-1 bei simultaner NO-Defizienz nicht zu einer Erhöhung des Blutdrucks in der pulmonalen Strombahn (RVP max.) und hatte keine

Auswirkungen auf die systolische (dP/dt max.) und diastolische Herzfunktion (RVP min., dP/dt min., Tau). Auch die Analyse der hämodynamischen Parameter der eNOS^{-/-} Mäuse ergab keine wesentlichen hämodynamischen Einschränkungen. Bei den ET^{+/+} Tieren konnte als einzige signifikante Veränderung ein erhöhter RVP min. nachgewiesen werden.

Das vorliegende Ergebnis für die ET^{+/+} Mäuse bezüglich des pulmonal-arteriellen Blutdrucks deckt sich mit den Befunden einer anderen Studie, die ebenfalls keinen erhöhten RVP max. in human-ET-1-transgenen Mäusen fand (3).

Der in der Literatur als lediglich mild ausgeprägt beschriebene pulmonale Blutdruckanstieg bei eNOS^{-/-} Mäusen (143, 145) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Auch die linksventrikuläre Herzfunktion in eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäuse zeigte keine Auffälligkeiten bei den durch Linksherzkatheteruntersuchung gemessenen Parametern (147). Insgesamt deuten alle Befunde darauf hin, dass eNOS^{-/-}ET^{+/+} Mäuse trotz Überexpression von ET-1 und NO-Defizienz eine intakte globale Herzfunktion besitzen.

4.4 Schlussfolgerungen

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten human-ET-1-transgenen Mausmodell mit simultanem Knockout der eNOS führte die Überexpression von ET-1 in pulmonalen Endothelzellen bei gleichzeitigem NO-Mangel überraschenderweise weder zu einer Entstehung einer interstitiellen Fibrose noch zur Entwicklung einer PH. Die von Hocher et al. beschriebene interstitielle Fibrose bei ET^{+/+} Mäusen konnte in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Zwischen den von Hocher et al. und den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tieren liegen mehrere Generationen. Da eNOS^{-/-} ET^{+/+} Tiere eine eingeschränkte Fruchtbarkeit besitzen, könnten Tiere selektiert worden sein, bei denen die ET-NO-Imbalance einen geringeren Einfluss hat. Eine solche Aktivierung von protektiven Signalwegen in Sublinien könnte erklären, warum die eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäuse in der vorliegenden Studie keinen pathologischen pulmonalen Phänotyp aufwiesen. Es gibt Hinweise, dass ein iNOS-Mangel einen protektiven Effekt auf die Entstehung der kardialen und pulmonalen Fibrose haben könnte (125, 189). Auf diese Arbeit übertragen, könnten diese Befunde bedeuten, dass eine eNOS-Mangel-bedingte Reduktion des nitrosativen Stresses den pulmonalen Phänotyp der eNOS^{-/-} ET^{+/+} Mäuse geschützt hat.

Die Entstehung der interstitiellen Fibrose bei ET^{+/+} Mäusen ist altersabhängig und wurde bei 12 Monate alten Tieren beobachtet. 13 Monate alte Tiere zeigen zusätzlich eine kardiale Fibrose, die sich im Alter von 9 Monaten (Untersuchungszeitpunkt der vorliegenden Arbeit) noch nicht

manifestiert hat (189). Möglicherweise treten die Folgen der ET-NO-Imbalance erst zu einem späteren Zeitpunkt auf.

Die vorliegenden Befunde zusammenfassend betrachtet, scheint das in dieser Arbeit beschriebene eNOS^{-/-} ET-1^{+/+} Mausmodell nicht als Modellorganismus für die PH oder fibrosierende Lungenerkrankungen geeignet zu sein.

5 Literaturverzeichnis

1. Hocher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(6):1380-9.
2. Quaschnig T, Kocak S, Bauer C, Neumayer HH, Galle J, Hocher B. Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(3):479-83.
3. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(1):19-26.
4. Kalk P, Mach A, Thone-Reineke C, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, von Websky K, Relle K, Hocher B. Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2008;86(8):541-5.
5. Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(3):730-40.
6. Hoepfer MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JS. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):306-22.
7. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
8. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoepfer M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69(2):177.
9. Sommer N, Hecker M, Tello K, Richter M, Liebetrau C, Weigand MA, Seeger W, Ghofrani A, Gall H. [Pulmonary hypertension : What is new in therapy?]. *Der Anaesthesist*. 2016;65(8):635-52.
10. Hoepfer MM, Ghofrani HA, Grunig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(5):73-84.

11. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, Mayer E, Jansa P, Ambroz D, Treacy C, D'Armini AM, Morsolini M, Snijder R, Bresser P, Torbicki A, Kristensen B, Lewczuk J, Simkova I, Barbera JA, de Perrot M, Hoeper MM, Gaine S, Speich R, Gomez-Sanchez MA, Kovacs G, Hamid AM, Jais X, Simonneau G. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry. *Circulation*. 2011;124(18):1973-81.
12. Hoeper MM, Madani MM, Nakanishi N, Meyer B, Cebotari S, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):573-82.
13. Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369(4):319-29.
14. Simonneau G, D'Armini AM, Ghofrani HA, Grimminger F, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Pulido T, Wang C, Colorado P, Fritsch A, Meier C, Nikkho S, Hoeper MM. Predictors of long-term outcomes in patients treated with riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: data from the CHEST-2 open-label, randomised, long-term extension trial. *Lancet Respir Med*. 2016;4(5):372-80.
15. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D4-12.
16. Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clinics in chest medicine*. 2001;22(3):433-49, viii.
17. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tuder RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(3):261-72.
18. Hoffmann J, Marsh LM, Pieper M, Stacher E, Ghanim B, Kovacs G, Konig P, Wilkens H, Haitchi HM, Hoefler G, Klepetko W, Olschewski H, Olschewski A, Kwapiszewska G. Compartment-specific expression of collagens and their processing enzymes in intrapulmonary arteries of IPAH patients. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;308(10):L1002-13.
19. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(12):4306-13.
20. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004;109(2):159-65.
21. Lan NSH, Massam BD, Kulkarni SS, Lang CC. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*. 2018;6(2).

22. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(2 Pt 1):646-64.
23. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev*. 2012;21(126):355-61.
24. Vancheri C, Failla M, Crimi N, Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology. *The European respiratory journal*. 35. England 2010. p. 496-504.
25. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(6):788-824.
26. Behr J, Günther A, Ammenwerth W, Bittmann I, Bonnet R, Buhl R, Eickelberg O, Ewert R, Gläser S, Gottlieb J, Grohé C, Kreuter M, Kroegel C, Markart P, Neurohr C, Pfeifer M, Prasse A, Schönfeld N, Schreiber J, Sitter H, Theegarten D, Theile A, Wilke A, Wirtz H, Witt C, Worth H, Zabel P, Müller-Quernheim J, Costabel U. S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2013;67(02):81-111.
27. Behr J, Günther A, Bonella F, Geißler K, Koschel D, Kreuter M, Prasse A, Schönfeld N, Sitter H, Müller-Quernheim J, Costabel U. S2k-Leitlinie Idiopathische Lungenfibrose – Update zur medikamentösen Therapie 2017. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2017;71(07):460-74.
28. Raghu G, van den Blink B, Hamblin MJ, Brown AW, Golden JA, Ho LA, Wijsenbeek MS, Vasakova M, Pesci A, Antin-Ozerkis DE, Meyer KC, Kreuter M, Santin-Janin H, Mulder GJ, Bartholmai B, Gupta R, Richeldi L. Effect of Recombinant Human Pentraxin 2 vs Placebo on Change in Forced Vital Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2018;319(22):2299-307.
29. Gorina E, Richeldi L, Raghu G, Fernandez Perez E, Costabel U, Albera C, Lederer D, Flaherty K, Ettinger N, Bercz P, Singh B, Perez R, Goldin J, Kouchakji E, Porter S. PRAISE, a randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 clinical trial of pamrevlumab (FG-3019) in IPF patients. *European Respiratory Journal*. 2017;50(suppl 61).
30. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*. 2002;3:3.
31. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):666-71.

32. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;24(1):1-11.
33. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:157-79.
34. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England journal of medicine*. 379. United States 2018. p. 797-8.
35. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA, 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2007;356(13):1317-26.
36. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7552-7.
37. van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJ, van Es HW, van den Bosch JM, Grutters JC. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(11):1419-25.
38. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, Fingerlin TE, Zhang W, Gudmundsson G, Groshong SD, Evans CM, Garantziotis S, Adler KB, Dickey BF, du Bois RM, Yang IV, Herron A, Kervitsky D, Talbert JL, Markin C, Park J, Crews AL, Slifer SH, Auerbach S, Roy MG, Lin J, Hennessy CE, Schwarz MI, Schwartz DA. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364(16):1503-12.
39. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. Muc5b is required for airway defence. *Nature*. 2014;505(7483):412-6.
40. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(1):242-8.
41. Junker K, Brasch F. [Interstitial lung diseases]. *Pathologe*. 2008;29 Suppl 2:273-9.
42. Fink L. [Interstitial lung diseases. The pattern is important]. *Der Pathologe*. 2014;35(6):597-605.

43. Hamada K, Nagai S, Tanaka S, Handa T, Shigematsu M, Nagao T, Mishima M, Kitaichi M, Izumi T. Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131(3):650-6.
44. Kimura M, Taniguchi H, Kondoh Y, Kimura T, Kataoka K, Nishiyama O, Aso H, Sakamoto K, Hasegawa Y. Pulmonary hypertension as a prognostic indicator at the initial evaluation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2013;85(6):456-63.
45. Nathan SD, Shlobin OA, Ahmad S, Koch J, Barnett SD, Ad N, Burton N, Leslie K. Serial development of pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2008;76(3):288-94.
46. Shorr AF, Wainright JL, Cors CS, Lettieri CJ, Nathan SD. Pulmonary hypertension in patients with pulmonary fibrosis awaiting lung transplant. *The European respiratory journal*. 2007;30(4):715-21.
47. Cuttica MJ. Pulmonary hypertension associated with lung diseases and hypoxemia. *Heart Fail Rev*. 2016;21(3):299-308.
48. Collum SD, Amione-Guerra J, Cruz-Solbes AS, DiFrancesco A, Hernandez AM, Hanmandlu A, Youker K, Guha A, Karmouty-Quintana H. Pulmonary Hypertension Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Current and Future Perspectives. *Can Respir J*. 2017;2017:1430350.
49. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*. 1993;341(8860):1550-4.
50. Jarman ER, Khambata VS, Yun Ye L, Cheung K, Thomas M, Duggan N, Jarai G. A translational preclinical model of interstitial pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: mechanistic pathways driving disease pathophysiology. *Physiol Rep*. 2014;2(9).
51. Nathan S, Behr J, Collard HR, Cottin V, Hoepfer MM, Martinez F, Corte T, Keogh A, Leuchte H, Mogulkoc N, Ulrich S, Wuyts W, Malcolm S, Shah S, Yao M, Wells A. RISE-IIP: Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension associated with idiopathic interstitial pneumonia. *European Respiratory Journal*. 2017;50(suppl 61).
52. Tanaka Y, Hino M, Gemma A. Potential benefit of bosentan therapy in borderline or less severe pulmonary hypertension secondary to idiopathic pulmonary fibrosis-an interim analysis of results from a prospective, single-center, randomized, parallel-group study. *BMC pulmonary medicine*. 2017;17(1):200.
53. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:851-76.
54. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):227-37.

55. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998;125(5):813-24.
56. O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Morrison JJ, Cameron IT, Davenport AP, Smith SK. Alternatively spliced mRNAs for human endothelin-2 and their tissue distribution. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;193(3):834-40.
57. Uchide T, Fujimori Y, Temma K, Sasaki T, Kizaki K, Hara Y, Takizawa S, Saida K. cDNA cloning, sequence analysis and organ distribution of horse preproendothelin-2. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44 Suppl 1:S430-4.
58. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;164(1):74-80.
59. Forbes JM, Leaker B, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL. Macrophage and myofibroblast involvement in ischemic acute renal failure is attenuated by endothelin receptor antagonists. *Kidney international*. 1999;55(1):198-208.
60. Fujitani Y, Ninomiya H, Okada T, Urade Y, Masaki T. Suppression of endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(6):2474-82.
61. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(2):195-203.
62. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990;348(6303):730-2.
63. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;348(6303):732-5.
64. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev*. 2011;91(1):1-77.
65. Davenport AP, O'Reilly G, Molenaar P, Maguire JJ, Kuc RE, Sharkey A, Bacon CR, Ferro A. Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 8:S22-5.
66. Dahse AJ, Nieber K. [Effects, side effects and interactions. Endothelin and endothelin receptor antagonists]. *Pharm Unserer Zeit*. 2010;39(6):436-41.
67. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Ohashi M, Nawata H. Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett*. 1991;282(1):103-6.

68. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
69. Alheid U, Frolich JC, Forstermann U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res*. 1987;47(5):561-71.
70. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(11):4651-5.
71. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(5):1774-7.
72. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(1):R1-12.
73. Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:153-83.
74. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry*. 2003;384(10-11):1343-64.
75. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997;48:489-509.
76. Lange M, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1979-89.
77. Wilkens H, Bauer M, Forestier N, Konig J, Eichler A, Schneider S, Schafers HJ, Sybrecht GW. Influence of inhaled iloprost on transpulmonary gradient of big endothelin in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2003;107(11):1509-13.
78. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1993;328(24):1732-9.
79. Staniloae C, Dupuis J, White M, Gosselin G, Dyrda I, Bois M, Crepeau J, Bonan R, Caron A, Lavoie J. Reduced pulmonary clearance of endothelin in congestive heart failure: a marker of secondary pulmonary hypertension. *Journal of cardiac failure*. 2004;10(5):427-32.
80. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine*. 1991;114(6):464-9.
81. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation*. 2002;105(9):1034-6.

82. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46(3):325-415.
83. Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmuller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascular pharmacology.* 2008;49(4-6):113-8.
84. Dorfmuller P, Humbert M, Capron F, Muller KM. Pathology and aspects of pathogenesis in pulmonary arterial hypertension. Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG. 2003;20(1):9-19.
85. Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block LH. The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling. *PloS one.* 2013;8(8):e73399.
86. Ozawa K, Funabashi N, Takaoka H, Tanabe N, Tatsumi K, Kobayashi Y. Detection of right ventricular myocardial fibrosis using quantitative CT attenuation of the right ventricular myocardium in the late phase on 320 slice CT in subjects with pulmonary hypertension. *International journal of cardiology.* 2017;228:165-8.
87. Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheijm CA, Marcus JT, Dorfmuller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS. Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2013;128(18):2016-25, 1-10.
88. Egemnazarov B, Schmidt A, Crnkovic S, Sydykov A, Nagy BM, Kovacs G, Weissmann N, Olschewski H, Olschewski A, Kwapiszewska G, Marsh LM. Pressure Overload Creates Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model: Assessment by Echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography.* 2015;28(7):828-43.
89. Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2000;32(4):565-76.
90. Mouchaers KT, Schaliij I, Versteilen AM, Hadi AM, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW, Postmus PE, van der Laarse WJ, Vonk-Noordegraaf A. Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2009;297(1):H200-7.
91. Choudhary G, Troncales F, Martin D, Harrington EO, Klinger JR. Bosentan attenuates right ventricular hypertrophy and fibrosis in normobaric hypoxia model of pulmonary hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 2011;30(7):827-33.
92. Nielsen EA, Sun M, Honjo O, Hjortdal VE, Redington AN, Friedberg MK. Dual Endothelin Receptor Blockade Abrogates Right Ventricular Remodeling and Biventricular Fibrosis in Isolated Elevated Right Ventricular Afterload. *PloS one.* 2016;11(1):e0146767.

93. Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, Stelzner TJ. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1993;9(4):429-33.
94. Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Kira S. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *The American journal of physiology*. 1995;269(5 Pt 1):L668-72.
95. Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(4):620-30.
96. Li H, Elton TS, Chen YF, Oparil S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *The American journal of physiology*. 1994;266(5 Pt 1):L553-60.
97. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1995;333(4):214-21.
98. Kharitonov SA, Cailes JB, Black CM, du Bois RM, Barnes PJ. Decreased nitric oxide in the exhaled air of patients with systemic sclerosis with pulmonary hypertension. *Thorax*. 1997;52(12):1051-5.
99. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(14):1746-8.
100. Xue C, Johns RA. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333(24):1642-4.
101. Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological chemistry*. 2006;387(12):1521-33.
102. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(3):413-20.
103. Francis BN, Salameh M, Khamisy-Farah R, Farah R. Tetrahydrobiopterin (BH4): Targeting endothelial nitric oxide synthase as a potential therapy for pulmonary hypertension. *Cardiovascular therapeutics*. 2018;36(1).
104. Dikalova A, Aschner JL, Kaplowitz MR, Summar M, Fike CD. Tetrahydrobiopterin oral therapy recouples eNOS and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn pigs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2016;311(4):L743-153.

105. Robbins IM, Hemnes AR, Gibbs JS, Christman BW, Howard L, Meehan S, Cabrera I, Gonzalez R, Oyler T, Zhao L, Du RH, Mendes LA, Wilkins MR. Safety of sapropterin dihydrochloride (6r-bh4) in patients with pulmonary hypertension. *Experimental lung research*. 2011;37(1):26-34.
106. Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C, Fabbri M, Gasbarrini G, Meliconi R. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of clinical pathology*. 1995;48(4):330-4.
107. Trakada G, Nikolaou E, Pouli A, Tsiamita M, Spiropoulos K. Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2003;7(3):111-8.
108. Reichenberger F, Schauer J, Kellner K, Sack U, Stiehl P, Winkler J. Different expression of endothelin in the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary diseases. *Lung*. 2001;179(3):163-74.
109. Saleh D, Furukawa K, Tsao MS, Maghazachi A, Corrin B, Yanagisawa M, Barnes PJ, Giaid A. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;16(2):187-93.
110. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, Bou-Gharios G, du Bois RM, Black CM, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(12):4189-94.
111. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(6):2707-19.
112. Ahmedat AS, Warnken M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Juergens UR, Racke K. Pro-fibrotic processes in human lung fibroblasts are driven by an autocrine/paracrine endothelinergic system. *British journal of pharmacology*. 2013;168(2):471-87.
113. Ross B, D'Orleans-Juste P, Giaid A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(1):16-20.
114. Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Gonzalez-Santamaria J. The profibrotic role of endothelin-1: is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life sciences*. 2014;118(2):156-64.
115. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2010;24(1):49-54.

116. Polikepahad S, Moore RM, Venugopal CS. Endothelins and airways--a short review. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 2006;119(1-6):3-51.
117. Fonseca C, Abraham D, Renzoni EA. Endothelin in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(1):1-10.
118. King TE, Jr., Brown KK, Raghu G, du Bois RM, Lynch DA, Martinez F, Valeyre D, Leconte I, Morganti A, Roux S, Behr J. BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(1):92-9.
119. Raghu G, Million-Rousseau R, Morganti A, Perchenet L, Behr J. Macitentan for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the randomised controlled MUSIC trial. *The European respiratory journal*. 2013;42(6):1622-32.
120. Raghu G, Behr J, Brown KK, Egan JJ, Kawut SM, Flaherty KR, Martinez FJ, Nathan SD, Wells AU, Collard HR, Costabel U, Richeldi L, de Andrade J, Khalil N, Morrison LD, Lederer DJ, Shao L, Li X, Pedersen PS, Montgomery AB, Chien JW, O'Riordan TG. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2013;158(9):641-9.
121. Liu X, Khadtare N, Patel H, Stephani R, Cantor J. Time-dependent effects of HJP272, an endothelin receptor antagonist, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2017;45:164-9.
122. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(2 Pt 1):600-8.
123. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2018;378(19):1811-23.
124. Mora AL, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nature reviews Drug discovery*. 2017;16(11):810.
125. Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Failla M, Mazzon E, Sortino MA, Frasca G, Gili E, Crimi N, Caputi AP, Vancheri C. Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. *Respiratory research*. 2005;6:58.
126. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1763-9.
127. Yildirim Z, Turkoz Y, Kotuk M, Armutcu F, Gurel A, Iraz M, Ozen S, Aydogdu I, Akyol O. Effects of aminoguanidine and antioxidant erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2004;11(2):156-65.
128. Yoshimura S, Nishimura Y, Nishiura T, Yamashita T, Kobayashi K, Yokoyama M. Overexpression of nitric oxide synthase by the endothelium attenuates bleomycin-induced

- lung fibrosis and impairs MMP-9/TIMP-1 balance. *Respirology* (Carlton, Vic). 2006;11(5):546-56.
129. Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, Castranova V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2004;67(13):1001-26.
 130. Chen XL, Huang SS, Li WB, Wang DH, Wang XL. Inhibitory effect of aminoguanidine on bleomycin-induced pulmonary toxicity in rat. *Acta pharmacologica Sinica*. 2001;22(8):711-5.
 131. Montaldo C, Cannas E, Ledda M, Rosetti L, Congiu L, Atzori L. Bronchoalveolar glutathione and nitrite/nitrate in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*. 2002;19(1):54-8.
 132. Behera D, Kaur S, Sathyanarayana G, Bhatnagar A, Majumdar S. Nitric oxide derivative in bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Indian journal of chest diseases & allied sciences*. 2002;44(1):21-4.
 133. Lakari E, Soini Y, Saily M, Koistinen P, Paakko P, Kinnula VL. Inducible nitric oxide synthase, but not xanthine oxidase, is highly expressed in interstitial pneumonias and granulomatous diseases of human lung. *American journal of clinical pathology*. 2002;117(1):132-42.
 134. Cameli P, Bargagli E, Refini RM, Pieroni MG, Bennett D, Rottoli P. Exhaled nitric oxide in interstitial lung diseases. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2014;197:46-52.
 135. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *Journal of breath research*. 2012;6(1):016004.
 136. Pullamsetti SS, Savai R, Dumitrascu R, Dahal BK, Wilhelm J, Konigshoff M, Zakrzewicz D, Ghofrani HA, Weissmann N, Eickelberg O, Guenther A, Leiper J, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science translational medicine*. 2011;3(87):87ra53.
 137. Zisman DA, Schwarz M, Anstrom KJ, Collard HR, Flaherty KR, Hunninghake GW. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2010;363(7):620-8.
 138. Schwarz A, Godes M, Thone-Reineke C, Theuring F, Bauer C, Neumayer HH, Hoher B. Tissue-dependent expression of matrix proteins in human endothelin-1 transgenic mice. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2002;103 Suppl 48:39s-43s.
 139. Hoher B, Schwarz A, Slowinski T, Bachmann S, Pfeilschifter J, Neumayer HH, Bauer C. In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *Journal of hypertension*. 2004;22(1):111-9.
 140. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377(6546):239-42.

141. Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation research*. 1998;82(2):186-94.
142. Li W, Mital S, Ojaimi C, Csiszar A, Kaley G, Hintze TH. Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(3):671-80.
143. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC, Zapol WM. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circulation research*. 1997;81(1):34-41.
144. Steudel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(11):2468-77.
145. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG, Jr., Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(2):291-9.
146. Fagan KA, McMurtry I, Rodman DM. Nitric oxide synthase in pulmonary hypertension: lessons from knockout mice. *Physiological research*. 2000;49(5):539-48.
147. Vignon-Zellweger N, Relle K, Kienlen E, Alter M, Seider P, Sharkovska J, Heiden S, Kalk P, Schwab K, Albrecht-Kupper B, Theuring F, Stasch JP, Hocher B. Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice. *J Hypertens*. 2011;29(5):961-70.
148. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*. 1984;70(5):812-23.
149. Feldman MD, Mao Y, Valvano JW, Pearce JA, Freeman GL. Development of a multifrequency conductance catheter-based system to determine LV function in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;279(3):H1411-20.
150. Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, Byrne BJ, Millar HD, Hare JM, Kass DA. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *The American journal of physiology*. 1998;274(4 Pt 2):H1416-22.
151. Clark JE, Marber MS. Advancements in pressure-volume catheter technology - stress remodelling after infarction. *Experimental physiology*. 2013;98(3):614-21.
152. Segers P, Georgakopoulos D, Afanasyeva M, Champion HC, Judge DP, Millar HD, Verdonck P, Kass DA, Stergiopoulos N, Westerhof N. Conductance catheter-based assessment of arterial input impedance, arterial function, and ventricular-vascular interaction in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;288(3):H1157-64.

153. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *International journal of hypertension*. 2013;2013:808353.
154. van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(5 Pt 1):1423-8.
155. van der Feen DE, Weij M, Smit-van Oosten A, Jorna LM, Hagdorn QA, Bartelds B, Berger RM. Shunt Surgery, Right Heart Catheterization, and Vascular Morphometry in a Rat Model for Flow-induced Pulmonary Arterial Hypertension. *J Vis Exp*. 2017(120).
156. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*. 1979;11(4):447-55.
157. Malkusch W, Rehn B, Bruch J. Advantages of Sirius Red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. *Experimental lung research*. 1995;21(1):67-77.
158. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney international*. 1984;26(2):137-43.
159. Vignon-Zellweger N, Relle K, Rahnenfuhrer J, Schwab K, Hocher B, Theuring F. Endothelin-1 overexpression and endothelial nitric oxide synthase knock-out induce different pathological responses in the heart of male and female mice. *Life sciences*. 2014;118(2):219-25.
160. Dschietzig TB, Krause-Relle K, Hennequin M, von Websky K, Rahnenfuhrer J, Ruppert J, Gron HJ, Armbruster FP, Bathgate RA, Aschenbach JR, Forssmann WG, Hocher B. Relaxin-2 does not ameliorate nephropathy in an experimental model of type-1 diabetes. *Kidney & blood pressure research*. 2015;40(1):77-88.
161. Song Y, Coleman L, Shi J, Beppu H, Sato K, Walsh K, Loscalzo J, Zhang YY. Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295(2):H677-90.
162. Medoff BD, Okamoto Y, Leyton P, Weng M, Sandall BP, Raheer MJ, Kihara S, Bloch KD, Libby P, Luster AD. Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(4):397-406.
163. West J, Fagan K, Steudel W, Fouty B, Lane K, Harral J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Ozimek J, Tuder R, Rodman DM. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circulation research*. 2004;94(8):1109-14.
164. Thibault HB, Kurtz B, Raheer MJ, Shaik RS, Waxman A, Derumeaux G, Halpern EF, Bloch KD, Scherrer-Crosbie M. Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure:

- validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circulation Cardiovascular imaging*. 2010;3(2):157-63.
165. Cingolani OH, Kass DA. Pressure-volume relation analysis of mouse ventricular function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(6):H2198-206.
 166. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature protocols*. 2008;3(9):1422-34.
 167. Feldman MD, Erikson JM, Mao Y, Korcarz CE, Lang RM, Freeman GL. Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;279(4):H1698-707.
 168. Winter EM, Grauss RW, Atsma DE, Hogers B, Poelmann RE, van der Geest RJ, Tschope C, Schalij MJ, Gittenberger-de Groot AC, Steendijk P. Left ventricular function in the post-infarct failing mouse heart by magnetic resonance imaging and conductance catheter: a comparative analysis. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2008;194(2):111-22.
 169. Xiong PY, Potus F, Chan W, Archer SL. Models and Molecular Mechanisms of World Health Organization Group 2 to 4 Pulmonary Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2018;71(1):34-55.
 170. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2002;80(2):105-16.
 171. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110(15):2233-40.
 172. Schild L, Dombrowski F, Lendeckel U, Schulz C, Gardemann A, Keilhoff G. Impairment of endothelial nitric oxide synthase causes abnormal fat and glycogen deposition in liver. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1782(3):180-7.
 173. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):13176-81.
 174. Hoyt DG, Lazo JS. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1988;246(2):765-71.

175. Gilhodes JC, Jule Y, Kreuz S, Stierstorfer B, Stiller D, Wollin L. Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis. *PloS one*. 2017;12(1):e0170561.
176. Samuel CS, Zhao C, Bathgate RA, Bond CP, Burton MD, Parry LJ, Summers RJ, Tang ML, Amento EP, Tregear GW. Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(1):121-3.
177. Thrall RS, Vogel SN, Evans R, Shultz LD. Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice. *The American journal of pathology*. 1997;151(5):1303-10.
178. Simler NR, Howell DC, Marshall RP, Goldsack NR, Hasleton PS, Laurent GJ, Chambers RC, Egan JJ. The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *The European respiratory journal*. 2002;19(6):1124-7.
179. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):731-6.
180. Yu J, Zhang Y, Zhang X, Rudic RD, Bauer PM, Altieri DC, Sessa WC. Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-survivin pathway during flow-dependent vascular remodeling. *PloS one*. 2012;7(2):e31495.
181. Quinlan TR, Li D, Laubach VE, Shesely EG, Zhou N, Johns RA. eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279(4):L641-50.
182. Quaschnig T, Voss F, Herzfeld S, Relle K, Kalk P, Godes M, Pfab T, Kraemer-Guth A, Bonz AW, Theuring F, Galle J, Hocher B. Lack of iNOS impairs endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Kidney & blood pressure research*. 2008;31(2):127-34.
183. Noguchi S, Yatera K, Wang KY, Oda K, Akata K, Yamasaki K, Kawanami T, Ishimoto H, Toyohira Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Mukae H. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respiratory research*. 2014;15:92.
184. Erdmann, Erland, editors. *Klinische Kardiologie*. 8 ed. Heidelberg: Springer; 2011.
185. Swain SD, Han S, Harmsen A, Champeny K, Harmsen AG. Pulmonary hypertension can be a sequela of prior *Pneumocystis pneumonia*. *The American journal of pathology*. 2007;171(3):790-9.
186. Jonigk D, Hoeper MM, Kreipe H, Langer F. [Histopathological aspects of pulmonary hypertension]. *Der Pathologe*. 2012;33(3):183-91.

187. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2005;28(6):483-90.
188. Georgiadou P, Sbarouni E. Effect of hormone replacement therapy on inflammatory biomarkers. *Advances in clinical chemistry*. 2009;47:59-93.
189. Kalk P, Westermann D, Herzfeld S, Relle K, Pfab T, Bauer C, Tschöpe C, Stasch JP, Hofer B. Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2008;86(6):353-7.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Arne Blancke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rechtsventrikuläre Hämodynamik und pulmonaler Phänotyp transgener Mäuse mit Überexpression von human-Endothelin-1 und Knockout der endothelialen NO-Synthase – Right ventricular hemodynamics and pulmonary phenotype in transgenic mice with overexpression of human endothelin-1 and endothelial NO synthase knockout“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Berthold Hoher für die Bereitstellung meines Promotionsthemas und die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Für die großartige Zusammenarbeit und die vielen nützlichen Ratschläge im Labor danke ich Frau Dr. Katharina Krause-Relle, Herrn PD Dr. Phillip Kalk und Frau Dr. Karoline von Websky.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Willehad Boemke und Frau Prof. Dr. Claudia Spies für den tatkräftigen Beistand bei der Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

Meinen Eltern Christiane und Diedrich Blancke bin ich zutiefst für die Ermöglichung meines Studiums und dieser Promotion dankbar. Mit ihrem uneingeschränkten Vertrauen standen sie mir immer motivierend und unterstützend zur Seite.