UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum

Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Einfluss von Nitroalkenen auf die Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Annika Janina Möller Berlin

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.12.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD. Dr. med. T. Rudolph

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. R. Böger

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Die pulmonalarterielle Hypertonie	7
1.1.1. Definition	7
1.1.2 Epidemiologie	8
1.2 Klassifikation	8
1.3 Pathophysiologie	14
1.3.1 Vaskuläres Remodeling	15
1.3.2 Molekulare Mechanismen	16
1.3.3 Einfluss von oxidativem Stress	19
1.3.4 Kardiovaskuläres System: Rechtsventrikuläre Dysfunktion	21
1.4 Therapie	22
1.4.1 Generelle Maßnahmen	22
1.4.2 Unterstützende Therapie	23
1.4.2 Spezielle medikamentöse Therapie	23
1.5 Nitroalkene	27
1.5.1 Signalmechanismus der Nitroalkene: Elektrophile	28
Reaktionen	28
1.5.2 Antiproliferative und antiinflammatorische Effekte der	28
nitrierten Fettsäuren (NO ₂ –FA, LNO ₂ und OA-NO ₂)	28
1.5.2.1 Antiinflammatorische Effekte	29
1.5.2.2 Antitthrombotische Effekte	31
1.5.2.3 Vaskuläre Effekte	31
1.5.2.4 Antidiabetogene Effekte	33
1.5.2.5 Kardioprotektive Effekte	34
2. Zielsetzung	35
3 Materialien und Methoden	36
3 1 Materialien	
3.1.1 Geräte und Software	
3.1.2 Reagenzien und Arzneistoffe	
3.1.3 Zelllinie und Kulturmedien	
3.1.4. Mauslinie	
3.1.5 Reaktionskits	

3.1.6 Puffer und Lösungen	39
.2 Methoden	40
3.2.1 Tierexperimentelles Modell	40
3.2.1.1 Tierkollektiv	40
3.2.2 Haltungsbedingungen	40
3.2.3 Implantation von osmotischen Pumpen	41
3.2.4 Invasive rechtsventrikuläre Druckmessung	42
3.2.5 Organentnahme	42
3.2.5.1 Blutentnahme	43
3.2.6 Bestimmung des Hämatokrits	44
3.2.7 Histologie	44
3.2.7.1 Fixierung und Einbettung	44
3.2.7.2 Fibrosefärbung, Siriusred	44
3.2.7.3 DHE-Färbung (Dihydroethidin Färbung)	45
3.2.7.4 Iba- 1- Färbung	45
3.2.8 Genexpression	46
3.2.8.1 Gewebehomogenisierung	46
3.2.8.2 RNA – Isolation	46
3.2.8.3 Bestimmung von Quantität und Reinheit der DNA und RNA	47
3.2.8.4 cDNA Synthese	48
3.2.8.5 Kontrolle der cDNA durch GAPDH- PCR	49
3.2.8.6 RT-PCR (Real time Polymerase Chain Reaction)	50
3.2.9 Western blot	51
3.2.9.1 Proteinbestimmung	51
3.2.9.2 Gelelektrophorese	52
3.2.9.3 Blotting	53
3.2.9.4 Chemielumineszenz	53
3.2.9.5 Stripping der Banden	54
3.2.9.6 Auswertung der Proteinbanden	54
3.2.10 Bestimmung der Muskularisierung pulmonalarterieller Lungenge	efäße
	54
3.2.11 In Vitro Proliferation von pulmonalen glatten	55
Muskelzellen	55
3.2.11.1 Determination der Proliferation	56

4.	Ergebnisse	. 56
	4.1 Systolische Blutdruckwerte im murinen rechten Ventrikel	. 57
	4.2 Durchschnittlicher pBNP- Gehalt im murinen	. 59
	rechten Ventrikel	. 59
	4.3 Gewicht RV/LV+Septum	. 59
	4.4 Hämatokrit	. 60
	4.5 Perivaskulärer und intramuskulärer Fibrosegrad im murinen rechten	
	Ventrikel	. 61
	4.6 Immunfloureszenzfärbung reaktiver	. 63
	Sauerstoffspezies im murinen Lungengewebe	. 63
	4.7 Makrophagenrekrutierung in der murinen Lunge	. 65
	4.8 Muskularisierungsgrad pulmonalarterieller Lungengefäße mit einem	
	Durchmesser zwischen 40-70 μm	. 66
	4.9 In vitro Proliferation von pulmonalarteriellen Zellen	. 68
	4.10 Western blot zu HO-1 in den murinen rechten Ventrikeln und der Lung	je
		. 69
5.	Diskussion	.72
	5.1 Rechtsventrikuläre Drücke der Mauspopulationen	. 72
	5.2 Zusammenhang zwischen dem signifikanten Anstieg des Hämatokrits u	und
	der pulmonalarteriellen Druckerhöhung	. 74
	5.3 Reduzierter pBNP- Gehalt in murinen rechten	. 75
	Herzen	. 75
	5.4 Reduktion der rechtsventrikulären Hypertrophie und Fibrosierung durch	1
	den Einfluss von OA-NO ₂	. 77
	5.5 Bedeutung der Nitroalkene als antiproliferative Mediatoren - Inhibition d	les
	vaskulären Remodelings und der Proliferation PSMC's	. 79
	5.6 Bedeutung der Nitroalkene als antiinflammatorische Mediatoren	. 81
	5.7 Vasoprotektion durch die Induktion von HO-1	. 84
	5.8 Limitation des Modells	. 85
6.	Zusammenfassung	. 87
7.	Abkürzungsverzeichnis	. 88
8.	Literaturverzeichnis	. 91
9.	Danksagung1	102

10. Lebenslauf, entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen	.Fehler!
Textmarke nicht definiert.	

1. Einleitung

1.1 Die pulmonalarterielle Hypertonie

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist auch noch heute trotz Therapiemaßnahmen eine tödlich verlaufende Erkrankung mit einer medianen Überlebensrate von 2,8 Jahren, die maßgeblich vom mittleren pulmonalarteriellen Druck, dem rechtsatrialen Druck und dem kardialen Index beeinflusst wird (D'Alonzo et al. 1991, 543–549). Die Erkrankung wird vor allem durch das Remodeling der pulmonalarteriellen Gefäßwände sowie Vasokonstriktion hervorgerufen. Beide Faktoren führen zu einem gesteigerten Druck in den Pulmonalarterien. Bedingt durch diese Veränderungen an den pulmonalarteriellen Gefäßwänden kommt es zu einer erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels und in dessen Folge zu kardialen Umbauprozessen. Diese Veränderungen am rechten Ventrikel bestimmen maßgebend das Outcome des Patienten und gehen primär mit einer kompensierenden Hypertrophie einher, die im Laufe des Fortschreitens der Erkrankung in eine Dilatation des Ventrikels und letztendlich in einem Rechtsherzversagen endet (Bogaard et al. 2009, 794).

Neuste Erkenntnisse postulieren die PAH als eine Erkrankung, die vor allem durch eine Vaskulopathie und strukturelle Veränderungen, bedingt durch exzessives Zellwachstum und Inflammation, hervorgerufen wird. Dabei werden zirkulierende Entzündungszellen rekrutiert und infiltrieren das Gewebe (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 443). Die initiale Progression der Erkrankung ist vor allem auf die strukturell bedingten Veränderungen der Gefäße und des Gewebes zurückzuführen, die maßgeblich durch die fortschreitende pulmonal endotheliale Dysfunktion bedingt ist.

1.1.1. Definition

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist definiert als eine Erkrankung, bei der es zu einem progredienten Anstieg des pulmonalen Widerstandes kommt. Ab einem pulmonalarteriellen Mitteldruck (PAP) von > 21-24 mmHg in Ruhe spricht man von einer latenten PAH. Ab einem PAP von 25 mmHg in Ruhe handelt es sich um eine manifeste PAH (De Gruyter 2011, 943). Der pulmonalvaskuläre Widerstad (PVR) entspricht der Druckdifferenz zwischen A. pulmonalis und linken Atrium zum pulmonalen Blutfluss und wird in Wood- Einheiten (mmHg/l/min) angegeben. Bei der pulmonalarteriellen Hypertonie ist der PVR > 3 Wood-Einheiten. Der pulmonalkapilläre Wedge- Druck (PCWP, Lungenkapillaren-Verschlussdruck), der dem linksventrikulären enddiastolischen Druck entspricht, ist bei der PAH < 15mmHg (Frost et al. 2012, 8) mit Ausnahme der durch Linksherzversagen verursachten PAH, bei welcher der PCWP ansteigt und über dem Normwert von 6-12 mmHg liegt (Champion 2011, 43).

1.1.2 Epidemiologie

Die pulmonalarterielle Hypertonie betrifft meist Frauen zwischen dem 20.– 40. Lebensjahr und Kinder. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 36 Jahren, jedoch kann die Erkrankung in jedem Alter auftreten (Rudarakanchana 2001, 888). Die geschätzte Inzidenz in Europa und den USA liegt bei 1-2 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner pro Jahr (Gaine and Rubin 1998, 719). Autopsiestudien ermittelten eine Prävalenz der PAH von 1300 auf 1 Millionen Menschen (Gaine and Rubin 1998, 719). Die sekundäre pulmonale Hypertonie ist wesentlich häufiger als die primäre PAH. Weltweit gibt es 100 Millionen Betroffene, die an der pulmonalen Hypertonie erkrankt sind (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 444). Die geschätzte mittlere Überlebensrate beträgt 2,8 Jahre (D'Alonzo et al. 1991, 343–349). Dabei beträgt die 1- Jahres Überlebensrate 34% (D'Alonzo et al. 1991, 343–349).

1.2 Klassifikation

1973 fand die erste internationale WHO Konferenz zur primären pulmonalen Hypertonie statt. Initial wurde die PAH in die primäre (PPH) und sekundäre PAH eingeteilt in Abhängigkeit von ihrer Ursache und den identifizierbaren Risikofaktoren. Das zweite Weltsymposium zu PAH fand im Jahr 1998 in Evian, Frankreich statt und veränderte die Einteilung der PAH grundlegend. Die PAH wurde erstmals in fünf Gruppen unterteilt, basierend auf ihren pathologischen und klinischen Eigenschaften und ihren Therapieoptionen. Das dritte Weltsymposium zur PAH 2003 in Venedig, Italien bestätigte die Gebräuchlichkeit der Einteilung von 1998 und wandelte den Begriff der primären PAH in idiopathische PAH (IPAH) um (Gérald Simonneau et al. 2009, 44). Seit 2008 wird die pulmonalarterielle Hypertonie laut der WHO mit Hilfe der Dana- Point- Klassifikation eingeteilt, die auf dem vierten weltweiten Symposium zur PAH festgelegt wurde. Diese unterscheidet weiterhin fünf übergeordnete Gruppen der PAH. Während des Symposiums wurde vor allem die Gruppe eins modifiziert, zu der die idiopathische PAH und die familiäre PAH zählen. Die Schistosomiasis und die chronische hämolytische Anämie werden seit dem vierten Weltsymposium zur PAH als separate Entitäten in der Gruppe eins gelistet. Zu den chronischen hämolytischen Anämien gehören Erkrankungen wie die Sichelzellanämie, die hereditäre Sphärozytose und die Stomatozytose, die vermutlich durch einen erhöhten Verbrauch an NO bei Hämolyse eine Resistenz gegen die Bioaktivität von Stickstoffmonoxid bilden. Dadurch wird das cGMP der pulmonalen glatten Muskelzellen nicht aktiviert und die Vasodilatation pulmonaler Gefäße wird unterbunden (Gérald Simonneau et al. 2009, 49). Für die pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und die pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH) wurde eine separate Subgruppe der Gruppe eins gebildet (Gérald Simonneau et al. 2009, 44). Diese Änderung der Klassifikation bezieht sich auf die ähnlichen Veränderungen des pulmonalen Parenchyms, die beide Erkrankungen aufweisen. Zu diesen pathologischen Prozessen gehören die Bildung eines interstitiellen Ödems, die pulmonale Hämosiderose und die Dilatation von Lymphgefäßen. Wie auch bei der PAH kommt es zu einer Intimafibrose und Mediahypertrophie kleiner pulmonaler Gefäße (Gérald Simonneau et al. 2009, 49). Die erste große Gruppe der Dana- Point Klassifikation umfasst die reine pulmonalarterielle Hypertonie. Zu ihren Untergruppen zählt die idiopathische PAH, die weder Risikofaktoren noch genetische Veränderungen aufweist. Im Gegensatz dazu steht die familiäre PAH, bei der zwei ,loss of function' Mutationen nachgewiesen werden konnten, zum einen im ,transforming growth factor ß' und im ,bone morphogenic protein' (BMP) (Newman et al. 2001, 344), zum anderen im ,Activin Rezeptor like Kinase Typ 1' (ALK-1;ACVRL1) (Ralph T.

Schermuly et al. 2011, 443). Die genetischen Mutationen, die eine PAH bedingen können, werden autosomal dominant vererbt mit einer variablen Penetranz. Der Genlocus der BMPR-2 Mutation liegt auf dem 12g33 Gen, der Genlocus der ACVRL-1 Mutation auf dem 12g11-g14 Gen (De Gruyter 2011, 943). Die Erkrankung weist eine Antizipation auf, die sich anhand eines zunehmenden Schweregrades und einer früheren Manifestation der Krankheitsmerkmale zeigt. 10- 20% der Menschen, die eine genetische Disposition aufweisen, erkranken im Laufe ihres Lebens an einer PAH (Chan and Loscalzo 2008, 15). Mutationen im BMPR2- Gen sind verantwortlich für 70% aller familiär bedingten PAH- Erkrankungen. Derweilen konnten über 140 Mutationen des BMPR-2 Gens identifiziert werden. Eine weitere Untergruppe stellt die durch Drogen und Toxine hervorgerufene PAH dar. 1960 konnte die Einnahme von Appetitzüglern wie Aminorex als Risikofaktor für die Entwicklung der PAH identifiziert werden. Ebenso ist die Einnahme von Fenfluraminderivaten und toxischem Rapsöl mit dem Auftreten der PAH assoziiert (Gérald Simonneau et al. 2009, 46). Die PAH kann zudem durch eine Infektion getriggert werden, bei welcher sich proinflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Dendritische Zellen, in sogenannten "plexiformen Läsionen" der pulmonalen Gefäße ansammeln. Die PAH ist vor allem mit viralen Infektionen- wie HIV, humanem Herpes Virus (HHV), Epstein- Barr Virus und Cytomegalievirus assoziiert (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 449). Der pathophysiologische Mechanismus der Entstehung einer PAH bei HIV- Infektion ist jedoch noch nicht geklärt. Weder der Virus noch die Virus-DNA konnten im pulmonalen Endothel nachgewiesen werden. Höchstwahrscheinlich wird die PAH indirekt über die Ausschüttung von second Messengern, Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert (Gérald Simonneau et al. 2009, 47). Eine weitere wichtige Untergruppe stellt die durch Bindegewebserkrankungen hervorgerufene PAH dar. Patienten, die an systemischer Sklerose erkrankt sind, zeigen eine deutlich erhöhte Prävalenz der PAH, ebenso bei der Lungenfibrose. Angeborene Herzfehler mit einer Shuntverbindung zwischen dem Körperkreislauf und der Lunge führen längerfristig durch den erhöhten Blutfluss und Druck im kleinen Kreislauf zu einer Obstruktion der pulmonalen Gefäße und somit zur Ausbildung einer pulmonalarteriellen Hypertonie. Letztlich resultiert eine Shuntumkehr (Eisenmenge- Reaktion), welche die progredienteste Form der PAH bei angeborenen Herzfehlern darstellt

(Gérald Simonneau et al. 2009, 47). Die PAH kann unter anderem durch eine parasitäre Schistosomiasis-Infektion hervorgerufen werden. Über 200 Millionen Menschen weltweit sind an Schistosomiasis erkrankt, von denen 20% an der PAH leiden (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 449). Diese parasitäre Erkrankung führt zu einer chronischen Infektion der Lunge. Linksherzversagen stellt die häufigste Ursache der pulmonalen Hypertonie dar. Sie wird in der zweiten Gruppe (DANA-Point II) aufgelistet und unterscheidet zwischen systolischen und diastolischen Ventrikel- und Klappendefekten (Mitral- oder Aortenklappe). Durch den linksventrikulären Druckanstieg kommt es zu einem Rückstau des Blutes in der Lunge und einem Anstieg des PAP; dieser bedingt die Entwicklung einer PAH (Gérald Simonneau et al. 2009, 50). Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich besonders mit der durch Hypoxie verursachten PAH, die unter der Gruppe drei zusammengefasst wird. Die akute Hypoxie führt zur Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße, ausgelöst durch einen Anstieg von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (Whitman et al. 2007, 309) und Serotonin (Hervé et al. 1995, 252). Ebenso wie die Aktivierung von Kalium- sensitive- Redoxkanälen, die zu einer Depolarisation der Zellmembran durch den Einstrom von Ca²⁺-Ionen führen und eine Vasokonstriktion hervorrufen (Sweeney, M. et al. 2000, 46). Die chronische Hypoxie verursacht vaskuläres Remodeling, Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen und die Deposition der extrazellulären Matrix (Jeffery and Morrell 2002, 175). Sie gleicht den Veränderungen, die bei der PAH im weit fortgeschrittenen Stadium zu finden sind (Jeffery and Morrell 2002, 175). Zu den bekannten Erkrankungen, welche zur Gruppe drei hinzugezählt werden, gehören die Zystische Fibrose, die COPD, die chronische Bronchiektasie sowie ein Symptomkomplex aus kombinierter Fibrose und Emphysembildung der Lunge mit einer Prävalenz von 50% für PAH (Gérald Simonneau et al. 2009, 49). Zu der Gruppe vier gehört die chronische thrombembolische PAH (CTEPH), die verursacht wird durch die Obliteration pulmonaler Arterien durch einen Thrombus, einen Tumor oder Fremdkörper. Bis zu 4 % der Patienten erkranken nach akuter Lungenembolie in der Folge an einer CTEPH (Tapson and Humbert 2006, 567). Eine Therapieoption stellt die chirurgische pulmonale Thrombendarteriektomie dar (Gérald Simonneau et al. 2009, 50). Die Gruppe fünf umfasst die PH- Fälle, die eine unklare oder multifaktorielle Ätiologie besitzen. Sie wird unterteilt in hämatologische, systemische, metabolische und andere Ursachen. Zu den hämatologischen Erkrankungen gehören beispielweise die Polycythämia vera, die Thrombozytämie und die chronisch myeloische Leukämie. Zu den systemischen Erkrankungen zählt die Sarkoidose, eine granulomatöse Erkrankung mit einer Prävalenz mit bis zu 28% für die Entwicklung der PAH. Zu der dritten Subkategorie gehört die Glykogenspeichererkrankung 1a, eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Der Entstehungsmechanismus der PAH ist bis jetzt nicht geklärt (Gérald Simonneau et al. 2009, 51).

1	Pulmonalarterielle Hypertonie	Idiopathische PAH (IPAH)
		Familiäre PAH (FPAH)
		Durch Drogen und Toxine ausgelöste
		РАН
		Assoziierte PAH (APAH)
		HIV-Infektion
		Portale Hypertension
		Schistosomiasisinfektion
		Chronisch hämolitische Anämie
		Kollagenosen
		Angeborene systemisch- pulmonale
		Shunts
		Persistierende pulmonale Hypertonie
		des Neugeborenen (PPHN)
Gı	uppe 1'	Pulmonal venokklusive Erkrankung
		(PVOD)
		Pulmonal kapilläre Hämangiomatose
		(PCH)
1	Pulmonalarterielle Hypertonie be-	Sysolische Dysfunktion
	dingt durch Linksherzversagen	Diastolische Dysfunktion
		Klappendefekte
		1

Dana- Point- Klassifikation der WHO von 2008

2 Pulmonalarterielle Hypertonie be-	COPD
dingt durch Lungenerkrankung	Interstitielle Lungenerkrankung
oder Hypoxie	Schlafapnoe- Syndrom
	Chronische Höhenkrankheit
	Anlagebedingte Fehlbildungen Bron-
	chopulmonale Dysplasie (BPD)
4 Pulmonalarterielle Hypertonie be-	Thrombembolische Obstruktion proxi-
dingt durch chronische Thrombembo-	maler Arterien
lien	Thrombembolische Obstruktion distaler
	Arterien
	Embolie durch Tumor, Parasit, Fremd-
	körper
5 Pulmonalarterielle Hypertonie multi-	Hämatologische Erkrankung:
faktorieller Genese	Splenektomie, Myeloproliferative Er-
	krankung
	Systemische Erkrankung: Sarkoidose,
	Neurofibromatose
	Metabolische Erkrankung: Glykogen-
	speichererkrankungen, Morbus Gau-
	cher
	Andere: Obstruktion durch Tumor,
	Chronisches Nierenversagen bei Dialy-
	se
L Taballa 4. Dana Daint Klassifikatian d	

Tabelle 4: Dana- Point- Klassifikation der WHO von 2008 (De Gruyter 2011,

943)

Die PAH wird ebenfalls durch die modifizierte NYHA- Klassifikation anhand ihres klinischen Schweregrades, laut der WHO Evian Konferenz von 1998, eingeteilt.

Klasse	Klinik
1	Nicht eingeschränkte körperliche Leis-
	tungsfähigkeit: unter normaler körperli-
	cher Aktivität keine vermehrte Dyspnoe
	oder Müdigkeit, kein Thoraxschmerz
	oder Schwächeanfall
11	Leicht eingeschränkte körperliche Leis-
	tungsfähigkeit: unter normaler körperli-
	cher Aktivität vermehrte Dyspnoe oder
	Müdigkeit, Thoraxschmerz oder
	Schwächeanfall
111	Deutlich eingeschränkte körperliche
	Leistungsfähigkeit: bereits unter leich-
	ter körperlicher Aktivität vermehrte
	Dyspnoe oder Müdigkeit, Thora-
	xschmerz oder Schwächeanfall
IV	Bereits bei geringer körperlicher Belas-
	tung vermehrte Symptome

Tabelle 5: Hypertonie, pulmonale, Klassifikation nach klinischem Schweregrad in funktionelle Klassen (WHO) (De Gruyter 2011, 944)

1.3 Pathophysiologie

Alle Untergruppen der PAH unterscheiden sich in ihren zugrundeliegenden Ursachen, jedoch ist ihnen allen gemein, dass sie charakterisiert sind durch exzessive pulmonale Vasokonsriktion und vaskuläres Remodeling (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 443). Die Konsequenz der vaskulären Proliferation und Umbauprozesse ist eine Querschnittsreduktion der pulmonalen Gefäße. Durch unterschiedliche pathogenetische Faktoren erfolgt eine Fibrose der Intima (Giaid and Saleh 1995, 218) und Hypertrophie der Media (Humbert et al. 2004, 14) sowie Adventitia (Kurt R Stenmark et al. 2002, 326–334). Die endotheliale Dysfunktion wird vor allem durch Überexpression von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 und verminderter Synthese von Vasodilatatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) (Giaid and Saleh 1995, 214) und Prostacyclin (Christman et al. 1992, 70) hervorgerufen. Durch die progredient ansteigende Druckbelastung des rechten Ventrikels in Folge der Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf kommt es im Laufe der Erkrankung zu einer Rechtsherzinsuffizienz mit Ausbildung eines Cor pulmonale. Dieser Zustand wird als fixierte PAH bezeichnet (De Gruyter 2011, 943, 944).

1.3.1 Vaskuläres Remodeling

Das vaskuläre Remodeling betrifft alle drei Gefäßschichten (Intima, Media und Adventitia) und resultiert in einer Abnahme des Gefäßguerschnitts (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 444). Zudem nimmt die Compliance großer pulmonaler Arterien stark ab und führt zu einer weiteren Drucksteigerung auf den rechten Ventrikel (Fourie, Coetzee, and Bolliger 1992, 839). Das Remodeling ist gekennzeichnet durch Verletzungen, Proliferation und Invasion der Intima durch Myofibroblasten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Die Zellen stehen dabei unter permanentem Wachstumsreiz und sind apoptoseresistent (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 444). Der Umbauprozess in der Lunge ähnelt einer chronischen Inflammation. Die Proliferation wird zum Teil durch Vasokonstriktoren mit pro- proliferativen Eigenschaften hervorgerufen, wie z.B. Endothelin oder auch Thromboxan A₂, deren Konzentration bei PAH erhöht ist (Christman et al. 1992, 70). Zudem ist die Konzentration vasodilatierender Mediatoren, wie NO oder cGMP, deutlich reduziert (Michelakis 2003, 5–21). Sie inhibieren die Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen und induzieren deren Apoptose (Chiche et al. 1998, 34263). Auch eine erhöhte Produktion von 5- Hydroxitryptamin (5-HT), ausgelöst durch die Einnahme von Dexfenfluraminen, führt zu Vasokonstriktion, Proliferation und einem erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand (Launay et al. 2002, 1129). Dexfenfluramine sind 5-HT- Agonisten und gehören zu den Amphetamin- Derivaten und Serotonin- Releasern. Zugelassen sind sie in den USA als Appetitzügler zur Gewichtsreduktion. Nach dreimonatiger Einnahme erhöht sich das Risiko, an einer PAH zu erkranken, um den Faktor 3,7- 23 (Launay et al. 2002, 1129). Ein Merkmal der fortgeschrittenen PAH ist die Bildung einer Neointima aus Extrazellulärmatrix und Myofibroblasten (Chan and Loscalzo 2008, 15).



Abbildung 1: Mechanismus der endothelialen Dysfunktion beim vaskulären Remodeling bei der pulmonalen Hypertonie. Rechtecke: Endothelzellen, Ovale: glatte Muskelzellen, schwarze Punkte: Plättchen (Budhiraja, Tuder, and Hassoun 2004, 160)

1.3.2 Molekulare Mechanismen

Der PAH liegt eine Dysbalance vasoaktiver Mediatoren zugrunde (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 444). Vasodilatierende Mediatoren wie Prostacyclin und NO (Stickstoffmonoxid) sind bei der PAH herunterreguliert. cGMP, ein ,second messenger', dem NO nachgeschaltet ist, ist ebenfalls reduziert. Vasokonstriktoren wie Thromboxan und Endothelin-1 hingegen liegen in erhöhter Konzentration bei der PAH vor. Der Anstieg von Endothelin- 1 in den vaskulären Endothelzellen der pulmonalen Arterien geht mit Mediahypertrophie und Intimafibrose einher (Galiè et al. 2002, 1500). Die Erhöhte Expression von Endothelin- 1 ist dementsprechend assoziiert mit dem vaskulären Remodeling der pulmonalen Arterien (Giaid et al. 1993, 1732). Endothelin- 1 bindet an die endothelialen A- und B - Rezeptoren und führt zu einer Vasokonstriktion vaskulärer glatter Muskelzellen (Giaid et al. 1993, 1732). Die Aktivierung des Endothelin-B-Rezeptors der Endothelzellen führt zudem zur Ausschüttung vasodilatierender, antiproliferativer Mediatoren wie NO (Seo et al. 1994, 1203) und Prostacyclin, jedoch nur in einem äußerst geringen Ausmaß (Hirata et al. 1993, 1372). Daher führen die vasodilatierenden Eigenschaften von Endothelin-1 nicht zu einer Symptomlinderung bei der PAH. NO, einer der wichtigsten Vasodilatatoren und direkter Inhibitor der Plättchenaktivierung und der Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen, wird durch NO-Synthase- Enzyme (NOS) sythetisiert. Die endotheliale Isoform NO- Synthase (eNOS) ist nachweislich im pulmonalen Endothel von PAH Patienten reduziert (Schermuly et al., 2011). Die eNOS wird durch vasoaktive Faktoren und physiologische Stimuli wie Hypoxie oder Inflammation moduliert.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung der Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid (Sim 2010, 4–14), Korean J. Anesthesiol., 2012 Januar; 58 (1): 4-14, online Veröffentlicht am 31.01.2012



Abbildung 3: Schematische Darstellung der cGMP- Signalkaskade, welche zur Vasodilatation und Inhibition der Proliferation führt (Sim 2010, 4–14), Korean J. Anesthesiol., 2012 Januar; 58 (1): 4-14, Online Veröffentlicht am 31.01.2012

In einem Mausmodell mit reduzierter eNOS- Aktivität konnte gezeigt werden, dass die betroffenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypen eine Prädisposition für die Entwicklung einer PAH zeigten. Ein weiterer Aspekt, der für die Protektivität von NO spricht, ist die symptomlindernde Wirkung von inhalativer NO-Gabe sowie der Gabe von Sildenafil, einem NO- abhängigen Phosphodiesterase- Typ- 5 Inhibitor. Das Absinken der NO- Spiegel scheint maßgeblich mit dem Einfluss von oxidativem Stress auf das pulmonale Gewebe in Zusammenhang zu stehen (Chan and Loscalzo 2008, 20). Die Prostacyclinsynthase, ein Enzym, welches Prostacyclin synthetisiert, wird bei PAH-Patienten in den kleinen pulmonalen Arterien vermindert exprimiert (L J Rubin et al. 1990, 299). Prostacyclin, ein Vasodilatator und Hemmer der Plättchenaggregation, der als Metabolit beim Abbau von Arachidonsäure entsteht, aktiviert cyclisches Adenosin Monophosphat (cAMP), welches über eine Signalkaskade zur Vasodilatation führt und die Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen inhibiert (Rich, Kaufmann, and Levy 1992, 81). Thromboxan A2, ein weiterer Metabolit des Abbaus der Arachidonsäure, das in den kleinen pulmonalen Gefäßen in erhöhter Konzentration vorliegt, wirkt vasokonstriktorisch und aktiviert die Plättchenaggregation (Chan and Loscalzo 2008, 20). Das Absinken von Kohlenstoffmonoxid (CO), einem gasförmiger Vasodilatator, führt ebenfalls zu einer geringeren Toleranz gegenüber Hypoxie. Mäuse mit einer herabregulierten Hämoxygenase-1 (HO-1), dem Schlüsselenzym, welches CO produziert, zeigten sich anfälliger gegenüber Hypoxie als Wildtypen. Eine Überexpression von HO-1 hingegen wirkte sich protektiv auf die Auswirkungen der Hypoxie aus (Chan and Loscalzo 2008, 20). 5- Hydroxytryptamin (5-HT), ein Vasokonstriktor, welcher zu Veränderungen in endothelialen glatten Muskelzellen führt, ist ebenfalls hochreguliert. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Veränderungen im Auftreten von K⁺ und Ca²⁺ Kanälen zu Fibroproliferation in glatten Muskelzellen des pulmonalen Endothels führen können. Durch die verminderte Expression von Kaliumkanälen im pulmonalen Gewebe von Patienten, die an ideopathischer PAH erkrankt sind, kommt es zur membranösen Depolarisation durch die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und dadurch zur Induktion von Muskelkontraktionen. Diese führen wiederum zur Vasokonstriktion der pulmonalarteriellen Gefäße und Proliferation der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (Yuan et al. 1998, 726). Patienten mit IPAH weisen erhöhte Plasmaspiegel von Cytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF), IL-1ß und IL-6 auf. Auch im Tiermodel spielen Cytokine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der PAH. Ratten, welche mit Monocrotalin behandelt wurden, einem Pyrrolizidinalkaloid, das eine Inflammation des Endothels hervorruft, zeigen erhöhte IL-6 Spiegel auf und Ratten, die IL-6 injiziert bekamen, entwickelten eine PAH (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 450).

1.3.3 Einfluss von oxidativem Stress

Oxidativer Stress ist ein Mediator der pulmonalen Hypertonie und der pathologischen Veränderungen an den pulmonalen Gefäßen und dem rechten Herzen (Demarco et al. 2010, 316). Reaktive Sauerstoffspezies kommen physiologischer Weise in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und der Adventitia vor. Sie können durch äußere Reize wie Scherstress, durch Inflammation und vermehrte Zytokinausschüttung oder auch durch Ischämie und Hypoxie übermäßig ex-

primiert werden und zu einer Dysbalance der Redoxreaktionen im Gewebe führen. Zelluläre Hypoxie induziert einen Anstieg von Reduktions Äquivalenten wie NADH und FADH₂ in den anaerob arbeitenden Mitochondrien. Dadurch stehen mehr Elektronen für Redoxreaktionen von zum Beispiel O₂ zu Superoxid O₂⁻ zur Verfügung und reaktive Sauerstoffspezies akkumulieren im Gewebe (Clanton 2007, 2381). Die exzessive Synthese von ROS führt langfristig zu Zellschäden durch die Oxidation von Zellbestandteilen wie Lipiden, Proteinen und DNA, außerdem zur Alteration von Transkriptionsfaktoren wie NF-kB oder HIF-1 (Hypoxie induzierter Faktor-1) (Bowers et al. 2004, 764). Oxidativer Stress verursacht die Metabolisierung von NO, indem reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxide (H₂O₂) und Stickstoff Dioxide (NO₂) mit NO reagieren und zur Bildung von Peroxynitritanionen (ONOO⁻) führen, welche die Nitration von Tyrosin induzieren (Radi 2004, 4003-4008). Die Nitration des Tyrosins schädigt die endothelialen NO- und Prostacyclin- Synthase, die durch die Produktion von NO und PGI₂ zur Vasodilatation führen (Demarco et al. 2010, 317). So kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Vasodilatatoren wie NO und Prostacyclin und Vasokonstriktoren wie Endothelin und Thromboxan A2 (Crosswhite and Sun 2010, 6). In Tiermodellen zur pulmonalen Hypertonie wurde ein Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen. Produziert werden diese hauptsächlich durch die erhöhte Aktivität der NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), der Xanthin Oxidase und der dysregulierten eNOS (endotheliale Nitrat Oxidase) (Bowers et al. 2004, 766,767). Inflammatorische Zellen wie Monozyten akkumulieren in den pulmonalen Gefäßen, generieren ROS und sezernieren mitogene und fibrogene Zytokine, welche die Zellproliferation und Fibrosierung der pulmonalen Gefäße verursachen und zu einem Progress des vaskulären Remodelings führen (Demarco et al. 2010, 316). Die reduzierte Aktivität antioxidativer Enzyme führt ebenso zur Akkumulation von ROS in den vaskulären Gefäßen (Demarco et al. 2010, 316). Ein Anstieg des Levels der reaktiven Sauerstoffspezies bewirkt einen signifikanten Abfall der Bioverfügbarkeit von Stickstoff (NO) und dadurch eine Reduktion der NO- induzierten Vasodilatation von pulmonalen Gefäßen. Diese Kaskade induziert den Progress der pulmonalen Hypertonie durch Vasokonstriktion und vermehrte Proliferation glatter arterieller Muskelzellen (Crosswhite and Sun 2010, 12).

1.3.4 Kardiovaskuläres System: Rechtsventrikuläre Dysfunktion

Durch den erhöhten pulmonalarteriellen Druck kommt es im rechten Ventrikel zu einer starken mechanischen Beanspruchung. Kompensatorisch hypertrophieren die Myozyten und es kommt zur Akkumulation von Muskelmasse (Crosswhite and Sun 2010, 12). Durch diese Wandverstärkung kann der Auswurf des rechten Ventrikels zunächst aufrecht erhalten bleiben. Dauert die Druckbelastung jedoch an, dekompensiert der rechte Ventrikel; es kommt zu einer kontraktilen Dysfunktion und der Ventrikel dilatiert (Bogaard u. a. 2009, 796). Durch die hohe Nachlast in den pulmonalen Gefäßen ist die Ventrikelwand Scherkräften ausgesetzt, die den myokardialen Sauerstoffverbrauch erhöhen. Die Druckbelastung des rechten Ventrikels verhindert eine ausreichende Perfusion während der Systole. Die verminderte Perfusion bedingt, dass der rechte Ventrikel ischämisch wird und es zur rechtsventrikulären Dysfunktion kommt (Bogaard et al. 2009, 796). Das Remodeling im rechten Ventrikel ist maßgeblich bedingt durch Veränderungen der extrazellulären Matrix. Durch Druckbelastung auf den rechten Ventrikel werden über Integrine (transmembranöse Adhäsionsmoleküle) verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und es erfolgt konsekutiv u.a. die Autophosphorylierung der FAK (fokale Adhäsionskinase), eine zytoplasmatische Tyrosinkinase. Die fokale Adhäsionskinase ist nahe der Membrananteile lokalisiert, die in Kontakt mit der extrazellulären Matrix (EZM) stehen und überträgt Signale der EZM via Integrine an das Zytoskelett sowie an zytoplasmatische Proteine. Die Aktivierung der FAK stimuliert ERK2- und JNK1 Signalwege, die durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Menge der Matrixmetalloproteine (MMPs) regulieren (Ralph T. Schermuly et al. 2011, 451). Die Aktivierung der Integrine und FAK führt so zur Hypertrophie der Kardiomyozyten (Umar et al. 2007, 868) und zur Aktivierung der NOS1 (NO-Synthase- 1). Die NOS1 ist am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der Kardiomyozyten lokalisiert und modifiziert dessen Funktion durch die Nytrosilierung des Ryanodin Rezeptors (RyR), der für den Einstrom von Ca²⁺ und die Muskelkontraktion verantwortlich ist. NO, welches durch die NO-

Synthase produziert wird, sowie anfallende ROS (reaktive Sauerstoffspezies) produzieren Peroxynitrit, das Matrix Metalloproteinasen aktiviert, die entscheidend für das Remodeling des Ventrikels verantwortlich sind (Umar et al. 2007, 864).

1.4 Therapie

Um die PAH effektiv therapieren zu können, muss primär der Schweregrad der Erkrankung mit Hilfe der WHO- Einteilung ermittelt werden. Eine spezielle, evidenzbasierte medikamentöse Therapie besteht nur für die erste Gruppe der PAH der Dana- Point- Klassifikation. Die folgenden Abschnitte richten sich nach der Therapieempfehlung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herzund Kreislaufforschung (DGK), die der Stellungnahme der European Society of Cardiology (ESC) entspricht. Eine Meta- Analyse von 23 randomisiert kontrollierten Studien von Patienten, die an PAH der Gruppe 1 (Dana- Point- Klassifikation) erkrankt sind, zeigte eine Abnahme der Mortalität um 43% und eine Reduktion der Hospitalisierungsrate um 61% (Umar et al. 2007, 864). Verglichen wurden Versuchsgruppen, die mit einer medikamentösen PAH- Therapie behandelt wurden, mit einer Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielt. Die Medikamenten- bzw. Placebogabe erstreckte sich über einen Zeitraum von 14.3 +/- 5.9 Wochen (Galie et al. 2008, 397, 398).

1.4.1 Generelle Maßnahmen

Zu den generellen Maßnahmen der PAH- Therapie gehört die Empfehlung zur Pneumokokken- und Influenzaimpfung als Infektprophylaxe. Die Entwicklung einer Pneumonie ist eine häufige Komplikation der PAH, an der 7% der betroffenen Patienten versterben (Galie et al. 2008, 396). Körperliches Training und Rehabilitationsmaßnahmen sollten im Rahmen des noch vorhandenen Leistungsspektrums erfolgen. Dyspnoe und totale körperliche Erschöpfung sind hingegen zu vermeiden (Galie et al. 2009, 2511). PAH gilt als Kontraindikation für eine Schwangerschaft, da diese zu einer 30-56 % Mortalität bei PAH er-

krankten Patientinnen führt (Newman and Robbins 2006, 1449). Bei elektiven operativen Eingriffen ist die regionale Anästhesie der Vollnarkose vorzuziehen. An PAH erkrankte Patienten sollten psychosozial angebunden werden, um der Entwicklung psychiatrischer Erkrankungen entgegenzuwirken (Bédard, Dimopoulos, and Gatzoulis 2009, 256).

1.4.2 Unterstützende Therapie

Die orale Antikoagulation sollte erwogen werden bei Patienten mit idiopathischer, familiärer und durch Appetitzügler hervorgerufene PAH. Post mortem konnten bei mehr als der Hälfte der untersuchten PAH Patienten Thromben ohne plexiforme Läsionen als Ursache der PAH nachgewiesen werden (Galie et al. 2009, 2511). Gerinnungsstörungen und Abweichungen der Fibrinolyse, sowie die Neigung zu thromboembolischen Ereignissen sprechen für eine dauerhafte Antikoagulation. Bei Patienten mit Blutungsneigung ist die Gabe von Antikoagulanzien kontraindiziert. Einen symptomatischen Benefit erfahren die Patienten ebenfalls durch die Gabe von Diuretika, vor allem bei bereits eingetretenem Rechtsherzversagen und Ödembildung (Fuster et al. 1984, 580). Patienten mit einem arteriellen pa O_2 von < 60 mmHg sollten für mindestens 15 Stunden am Tag O_2 inhalieren, um einen höheren pa O_2 zu erreichen (Galie et al. 2009, 2512). Die Langzeit- Sauerstofftherapie kann die Progression der PAH bei COPD in ihren ursprünglichen Zustand umkehren (Weitzenblum et al. 1985, 493–498). Die Gabe von Digoxin verbessert den kardialen Auswurf bei Patienten mit idiopathischer PAH und sollte vor allem Patienten mit zusätzlichen atrialen Tachyarhrythmien verabreicht werden (Weitzenblum et al. 1985, 493–498).

1.4.2 Spezielle medikamentöse Therapie

Patienten, die auf vasodilatierende Medikamente ansprechen, sollten Kalziumantagonisten erhalten. Das Ansprechen auf die Therapie ist definiert als eine Reduktion des pulmonalarteriellen Druckes und des pulmonalarteriellen Widerstandes um 20% (Rich et al. 1998, 787). Medikamente erster Wahl sind Nifedi-

pin (120-240 mg/d), Diltiazem (240-720 mg/d) und Amlodipin (20 mg); wobei Diltiazem vor allem bei Tachykardien - Nifedipin und Diltiazem vorzugsweise bei Bradykardien eingesetzt werden sollte (Rich, Kaufmann, and Levy 1992, 76). Die Reduktion der Vasokonstriktion durch die Blockade der Ca²⁺ Kanäle mindert den pulmonalarteriellen Druck und den pulmonalarteriellen Widerstand (Galie et al. 2009, 2513). Patienten, die auf die Therapie ansprechen, zeigen einen Anstieg der Lebensqualität, eine verbesserte Belastungstoleranz und generell eine Reduktion ihrer Symptome (Rich, Kaufmann, and Levy 1992, 78). Zudem konnte eine Regression der rechtsventrikulären Hypertrophie nachgewiesen werden (Rich, Kaufmann, and Levy 1992, 80). Eine weitere wirksame cytoprotektive Stoffklasse sind die Prostacycline, die ab WHO- Schweregradstufe III-IV verabreicht werden sollten. Epoprostenol ist ein Vertreter der synthetischen Prostacycline und die einzige Substanz, die den Patienten eine Lebenszeitverlängerung bringt (Nana-Sinkam et al. 2005, 612). Epoprostenol wird zentralvenös verabreicht, bedingt durch seine kurze Halbwertszeit. Die optimale Tagesdosis liegt zwischen 20-40 ng/kg/min (R J Barst et al. 1996, 296). Weitere Substanzen dieser Stoffklasse sind lloprost (inhalative Gabe) und Treprostinil (s.c., iv.). Beide Substanzen steigern die Leistungsfähigkeit und lindern die Symptome der PAH (Galie et al. 2009, 2513). Die Leistungsfähigkeit wird anhand eines 6- Minuten- Gehtests gemessen und gilt als primärer Endpunkt vieler klinischer Studien (Galie et al. 2009, 2513) und Mortalitätsprädiktor bei der PAH (Galiè et al. 2008, 3016). Die inhalative Gabe von lloprost führt zudem zu einer Besserung der NYHA- Klasse und damit auch der Lebensqualität der Patienten (Miyamoto et al. 2000, 487). Die Effektivität der kontinuierlichen, subkutanen Gabe von Treprostinil (20-80 ng/kg/min) spiegelt sich in der signifikanten Verbesserung der Hämodynamik der Patienten wider (Olschewski et al. 2002, 322). Beraprost ist das einzige chemisch stabile, oral verabreichbare Prostacyclin (Gerald Simonneau et al. 2002, 803). Es steigert die Leistungsfähigkeit jedoch nur für einen Zeitraum von 3-6 Monaten (Galiè et al. 2002, 1497). Es wird vorzugsweise bei NYHA- Klasse II und III verabreicht und lindert die Symptome der PAH, bessert jedoch nicht die kardiale Hämodynamik und NYHA- Klasse der Patienten (Galie et al. 2009, 2514, 2515). Zur Therapie der PAH im Stadium II-IV und bei Eisenmenger- Reaktion sowie kongenitalen Shunts werden Endothelinrezeptor- Antagonisten eingesetzt, um die durch Endothelin-1 induzierte

Vasokonstriktion zu reduzieren. Bosentan (125mg, 1/0/1), ein oraler dualer Endothelin A+B- Rezeptorantagonist, führt zu einer deutlich gesteigerten Leistungsfähigkeit, einer Verbesserung der Hämodynamik und der funktionellen NYHA- Klasse (D'Orléans-Juste et al. 2002, 221). Patienten nach Bosentantherapie zeigten deutlich bessere echokardiographische Resultate und Dopplerwerte. Zudem verlangsamt die Bosentantherapie die Progression der Erkrankung und die klinische Verschlechterung der Patienten setzt deutlich später ein (Channick et al. 2001, 1122). Zu den selektiven Endothelinrezeptor- A- Antagonisten gehören Sitaxsentan (100 mg/d, oral) und Ambrisentan (5-10 mg/d). Sie inhibieren lediglich die durch Endothelinrezeptor- A aktivierte Vasokonstriktion und werden bei WHO-Klasse II-III eingesetzt (Lewis J Rubin et al. 2002, 903). Sitaxsentan verbessert die Leistungsfähigkeit, die funktionale WHO- Klasse, den kardialen Index und reduziert den pulmonalen vaskulären Widerstand (Robyn J Barst et al. 2006, 2050). Auch Ambrisentan steigert die Leistungsfähigkeit und verbessert die Lebensqualität der Patienten (Robyn J Barst et al. 2006, 2055). Nach 12- wöchiger Ambrisentan- Einnahme konnte zudem die Schwere der Dyspnoe reduziert werden, gemessen an dem Borg Dyspnoe Score (Galiè et al. 2008, 3014; 3016). Ambrisentan wird vor allem bei Patienten mit idiopathischer PAH und HIV sowie CTD (connective tissue disease, Bindegewebserkrankung) assoziierter PAH eingesetzt (Galiè et al. 2008, 3014). Beide Substanzen reduzieren somit die Symptome der PAH, steigern die Leistungsfähigkeit und verzögern die klinische Verschlechterung der Patienten. Unter der Einnahme von Ambrisentan kam es zu nur geringen Abweichungen der Aminotransferasewerte (Galiè et al. 2008, 3011). Die Sitaxsentan Therapie führte vereinzelt zum Anstieg der Leberparameter und zum Ausschluss der Probanden aus der klinischen Studie (Galiè et al. 2008, 3011). Daher ist die monatliche Kontrolle der Leberwerte obligatorisch, denn beide Substanzen besitzen hepatotoxische Eigenschaften. Die Inhibition der Phosphodieseterase- Typ- 5 führt zur Vasodilatation durch Steigerung der cGMP- Konzentration (Robyn J Barst et al. 2006, 2053). Zur Therapie der PAH werden die drei bereits zur Therapie der erektilen Dysfunktion zugelassenen Medikamente Sildenafil (50 mg/d), Tadalafil (60 mg/d) und Verdenafil (20mg) eingesetzt (Ghofrani et al. 2004, 1494). Sie führen zu einem signifikanten Druckabfall in den Pulmonalarterien durch Vasodilatation (Ghofrani et al. 2004, 1495). Heutzutage wird die pulmonalarterielle Hypertonie in PAH-Zentren vor allem durch Kombinationstherapien aus ERA's, Phosphodiesterase Typ 5- Hemmern und Prostanoiden behandelt (Ghofrani et al. 2004, 1494). Doch gibt es heute noch keine Langzeitstudien zum Outcome der durch Kombinationstherapie behandelten Patienten und weitere kontrollierte klinische Studien müssen durchgeführt werden (Hoeper et al. 2005, 861). Wenn alle Therapiemaßnahmen erschöpft sind, gilt die Lungentransplantation als ultima ratio. Eine Lungentransplantation sollte bei Patienten der funktionellen NYHA- Klasse III-IV und bei Patienten, bei denen trotz Therapie keine hämodynamische Besserung erreicht werden konnte, erwogen werden (Hoeper et al. 2005, 862-863). Die Transplantation sollte bei einem kardialen Index < 2 Liter/min/m² und einem rechtsventrikulären Druck > 15 mmHg erfolgen (Sitbon et al. 2002, 780). 25% der an IPAH erkrankten Patienten sprechen nicht auf die standardisierte Therapie der PAH an (Orens et al. 2006, 752). Die Lungentransplantation ist vor allem indiziert bei der primär - und der durch kongenitale Herzfehler verursachten PAH (Galie et al. 2009, 2518). Patienten, die mit einer PVOD (pulmonale venoocclusive Erkrankung) und pulmonalen kapillären Hämangiomatosis diagnostiziert werden, haben eine sehr schlechte Prognose und sollten sofort nach Diagnosestellung für eine Lungentransplantation gelistet werden (Trulock et al. 2006, 890). Die Nachlast des rechten Ventrikels sinkt sofort nach Transplantation, die systolische Funktion des rechten Ventrikels und die diastolische linksventrikuläre Funktion verbessern sich jedoch nur langsam. Hämodynamische Instabilität ist eine häufig auftretende Komplikation der Lungentransplantation neben Infektion und Transplantatabstoßung (Orens et al. 2006, 751). Die fünf- Jahres- Überlebensrate liegt bei 49% bei verhältnismäßig guter Lebensqualität (Trulock et al. 2006, 883). Die Überlebensraten für bilaterale und singuläre Lungentransplantationen zeigt einen starken Anstieg nach dem ersten Jahr, wobei Patienten mit bilateraler Transplantation durchschnittlich länger leben (Trulock et al. 2006, 883). Bis heute existieren keine Studien zu der Effektivität der medikamentösen Therapie der durch Hypoxie und chronische Lungenerkrankungen verursachten pulmonalen Hypertonie. Die Leitlinien empfehlen eine Langzeitsauerstofftherapie bei Hypoxämie zur Optimierung der Therapie (Trulock et al. 2006, 883). Der PAP wird durch die O₂ -Therapie nicht reduziert und auch die bereits erfolgten Umbauprozesse in der Lunge sind nicht rückläufig (Galie et al. 2009, 2528). Eine

Therapie mit Vasodilatatoren wie NO ist nicht effektiv und kann sogar den Gasaustausch in der Lunge durch die Inhibition der hypoxischen Vasokonstriktion verschlechtern (Barberà u. a. 1996, 436).

1.5 Nitroalkene

Nitrierte Fettsäuren (NO₂-FA) entstehen als Nebenprodukte von Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoff (N) abhängigen Redoxreaktionen einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies (Barberà et al. 1996, 436). Zu den Fettsäuren- Nitroalken- Derivaten gehören u.a. Nitroölsäure (OA-NO₂; 9-oder 10- Nitro-9-Cis-Oktadecensäure) und Nitrolinolsäure (LNO₂; 9-, 10-, 12-, oder 13- Nitro- Oktadekadienoicsäure). Diese beiden sind am ausführlichsten untersucht worden und besitzen antiinflammatorische Signalkapazität (Baker et al. 2009, 1000).



Tabelle 1: Chemische Struktur der Nitroalkene (Baker et al. 2009, 994).

Durch posttranslationale Protein- Modifikationen wirken sie antiinflammatorisch und inhibieren die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Des Weiteren inhibieren sie die Plättchenaggregation und die Proliferation glatter Muskelzellen (Baker et al. 2009, 994).

1.5.1 Signalmechanismus der Nitroalkene:

Elektrophile Reaktionen

Elektrophile Lipide reagieren mit zellulären Nukleophilen, wie Cystein, Histidin und Lysin mittels Michael-Addition. Dabei werden meist zwei Kohlenstoffatome durch Einfachverbindung miteinander verbunden. Es können aber auch Kohlenstoffatome mit Stickstoffatomen verbunden werden. Die Addition findet an einer alpha, ß- ungesättigten Carbonylverbindung statt. Die elektrophile Nitrogruppe der Kohlenstoffdoppelbindung polarisiert die Kohlenstoff-Nitro-Bindung und verursacht eine Instabilität der Doppelbindung. Diese Instabilität begünstigt die elektrophilen Eigenschaften der nitrierten Fettsäuren und ermöglicht nukleophile Reaktivität (T. K. Rudolph et al. 2010). Alternativ können Proteinkomplexe durch eine Michael- Addition zwischen dem
ß-Kohlenstoffatom von ungesättigten Carbonylgruppen und Thiolatanionen von Proteinen entstehen (Baker et al. 2009, 998). Die Nitratgruppe ist eine der elektrophilsten funktionellen Gruppen. Die Reaktion eines Alkens mit dem Nitratmolekül der nitrierten Fettsäure überträgt diese elektrophile Eigenschaft auf das an den Stickstoff gebundene ß-Kohlenstoffatom. Diese elektrophile Eigenschaft ermöglicht es den nitrierten Fettsäuren stabile Michael-Additionen mit nukleophilen funktionellen Gruppen einzugehen (Baker et al. 2005, 42471). Es wird vermutete, dass die meisten der Proteinverbindungen, die nitrierte Fettsäuren eingehen, auf dem Mechanismus der kovalenten Bindung an nukleophile Gruppen dieser Proteine beruhen. Diese Reaktion wird als Nitroalkylation bezeichnet, dabei reagiert ein Nitroalken reversibel mit einem Thiol.

1.5.2 Antiproliferative und antiinflammatorische Effekte der nitrierten Fettsäuren (NO₂–FA, LNO₂ und OA-NO₂)

In dem folgenden Textabschnitt werden einige der antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekte der am ausführlichsten untersuchten nitrierten Fettsäuren aufgeführt. Viele der dargestellten Mechanismen stellen Signalkaskaden dar, die auch in der Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie einen Stellenwert haben könnten und einen Ausblick auf eventuell entstehende Therapieoptionen geben.

1.5.2.1 Antiinflammatorische Effekte

Eine wichtige Eigenschaft der nitrierten Fettsäuren ist ihre Fähigkeit, inflammatorische Signalkaskaden zu unterbinden. Nitroalkene (OA-NO₂) und Linolsäure (LNO₂) alkylieren die Untereinheit p65 des nuklearen Proteins NF-kB und inhibieren dadurch die Anlagerung des Komplexes an die DNA und die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren, die als Targetgene von NF-kB identifiziert werden konnten (Baker et al. 2009, 998). VCAM-1, ein Targetgen von NF-kB, welches für die Anlagerung von Monozyten an atherosklerotische Plaques im Gefäßendothel zuständig ist, wird durch OA-NO₂ und LNO₂ herunterreguliert (Cui et al. 2006, 1). Durch die Inhibition der Adhäsion von Monozyten wird deren Migration in die Gefäßintima unterbunden und die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen unterbleibt. Dadurch findet die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF α und MCP-1 (Monozyten-Chemotaxis-Protein-1) durch aktivierte Makrophagen nicht statt (Cui et al. 2006, 10).

Auch Rudolph et al. konnten die Inhibition der Adhäsion von Monozyten und Makrophagen an Endothelzellläsionen der Aortenwand von Mäusen, die mit OA-NO₂ behandelt wurden, durch reduzierte VCAM-1- Aktivierung (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) nachweisen (Cui et al. 2006, 9,10). Zudem zeigen sie, dass auch die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an der Aortenwand durch die Reduktion von ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül) inhibiert wurde (T. K. Rudolph et al. 2010, 4). Des Weiteren belegt eine Studie von Coles et al. 2002, dass auch die Aktivität der Leukozyten durch LNO₂ beeinflusst wird. Nitrolinolsäure inhibiert die Expression von CD11b, einem Oberflächenmolekül der Leukozyten, welches für die Adhäsion der Leukozyten an der Zelloberfläche von Bedeutung ist, und verhindert dadurch die Leukozytenadhäsion (T. K. Rudolph et al. 2010, 4). Zudem wird die Produktion von Sauerstoffradikalen wie O₂⁻ und die Degranulation der Leukozyten durch LNO₂ unterbunden (Coles 2002, 376;379). Diese Leukozytenaktivierung wird vor allem durch chemotaktische Mediatoren wie MLP (N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin) induziert.

Besonders Leukozyten, welche durch MLP aktiviert wurden, konnten effektiv durch Nitrolinolsäure gehemmt werden. Diese Signalkaskade wird durch die Aktivierung der Adenylatzyklase und dem damit verbundenen Anstieg der cAMP- Konzentration induziert (Coles 2002, 379). Nitrierte Fettsäuren haben außerdem einen Einfluss auf die Hämoxygenase (HO-1), ein Enzym, welches eine bedeutende Rolle spielt als protektiver Mediator in vaskulären Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel der Atherosklerose und vaskulären Restenose (Wright 2006, 4299-4304). Sie bewirken die Expression der Hämoxygenase (HO-1), welche für den Abbau von Häm zuständig ist. Die in vitro Applikation von Nitroölsäuren (OA-NO₂) im Versuch mit humanen aortalen Endothelzellen zeigt eine erhöhte Expression der HO-1 mRNA (Wright 2006, 4299–4304). Durch die Oxidation des Häm-Moleküls entstehen Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO). Die Hämdegradation ist die wichtigste endogene Quelle des menschlichen Körpers für CO. Kohlenstoffmonoxid ist wie NO ein gasförmiger Vasodilatator, der antiinflammatorisch und antiapoptotisch wirkt. Das entstehende Biliverdin wirkt als Radikalfänger ebenfalls antiinflammatorisch (Wright 2006, 4299–4304). Der gleiche Effekt zeigt sich im in vitro Experiment an kultivierten vaskulären Zellen, bei denen HO-1 und zudem die endotheliale NO- Synthase (eNOS) durch die Gabe von OA-NO₂ hochreguliert werden (N. K. H. Khoo u. a. 2010, 235). Die Aktivierung der eNOS erfolgt durch die Phosphorylierung der Ser¹¹⁷⁹ und führt zu einer erhöhten NO Produktion, welche die endotheliale Funktion deutlich verbessert und antiinflammatorische Effekte hervorruft (N. K. H. Khoo et al. 2010, 235). Ein weiterer Angriffspunkt der antiproliferativen Wirkung der nitrierten Fettsäuren ist die irreversible Inhibition der Xanthinoxidorediktase (XOR) durch die Nitroölsäure (N. K. H. Khoo et al. 2010, 236). Von Vorteil ist vor allem die potentere vollständige irreversible Inhibition der XOR im Vergleich zu bereits längerfristig eingesetzten XOR- Inhibitoren wie Allopurinol (Kelley et al. 2008, 36181). Die Xanthinoxidoreduktase oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin und letztlich zu Harnsäure. Dabei produziert sie reaktive Sauerstoffspezies, welche durch redoxabhängige Reaktionen die NO- Bioverfügbarkeit minimieren (Kelley et al. 2008, 36183). Intrazellulär existiert die XOR als Xanthindehydrogenase (XDH), die bei Inflammation zur Xanthinoxidase (XO) konvergiert wird. Die XO produziert proinflammatorische Oxidantien im inflammatorischen Umfeld, die unter anderem im ischämisch geschädigten Gewebe akkumulieren (Kelley et al. 2008, 36176). Die Xanthinoxidase reduziert O_2 zu Superoxid (O_2^{-1}) und Hydrogenperoxid (H_2O_2). Diese reaktiven Sauerstoffspezies interferieren mit der intakten Gefäßfunktion und führen zur Gefäßinflammation (Kelley et al. 2008, 36181). Die Reduktion der endothelialen zellassoziierten XOR durch Nitroölsäure kann die vaskuläre Inflammation, die kardiovaskuläre Erkrankungen bedingt, vermindern (Kelley et al. 2008, 36176).

1.5.2.2 Antitthrombotische Effekte

Weitere Studien zeigen, dass die nitrierte Fettsäuren auch als antithrombotische Mediatoren fungieren können (Kelley et al. 2008, 36183). LNO₂ hemmt via cAMP- abhängige Signalkaskaden, wie die Phosphorylierung von VASP am Serin 157, die Plätttchenaggregation (Coles 2001, 5838). LNO₂ minimiert die Thrombin induzierte Ca²⁺ Mobilisation und hemmt auch dadurch die Aggregation der Plättchen (Coles 2001, 5838).

1.5.2.3 Vaskuläre Effekte

Ein weiterer wichtiger Aspekt der protektiven Effekte der nitrierten Fettsäuren ist ihre antiproliferative Wirkung. Vor allem NO spielt eine Schlüsselrolle in der Relaxation von Gefäßen. Stickstoffmonoxid ist zuständig für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase durch Inhibition von Inflammation und Remodeling der Gefäße (T. K. Rudolph et al. 2010, 7). Entzündungen des vaskulären Systems induzieren oxidativen Stress, dieser führt zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies und zu einem Absinken der NO- Bioverfügbarkeit (N. K. H. Khoo et al. 2010, 1). Die endotheliale Dysfunktion führt zu Lipidakkumulation und Intima Hyperplasie (N. K. H. Khoo et al. 2010, 1). Derivate von Nitrierungsprozessen wie OA-NO₂ und LNO₂ werden hauptsächlich bei oxidativem Sress vermehrt produziert. Diese Signalmediatoren vermitteln über cGMP- abhängige und – unabhängige Signalkaskaden vielseitige antiinflammatorische und antiproliferative Prozesse (N. K. H. Khoo et al. 2010, 1). NO₂-FA hemmt zudem durch die Aktivierung von MKP-1 (MAPK- Phosphatase 1) die Phosphorylierung von STAT-1, einem Protein, welches als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor für lipopolysaccharid- aktivierte Makrophagen dient (Ichikawa u. a. 2008, 4093). Durch die Phosphorylierung von STAT-1 wird die Bildung von Schaumzellen inhibiert und dadurch atherosklerotische Plagues reduziert (Ichikawa et al. 2008, 4093). Die Reduktion der inflammatorischen Zellen, die sich in atherosklerotischen Zellläsionen anlagern, und die Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen mindert signifikant die Formation von atherosklerotischen Herden (T. K. Rudolph et al. 2010, 6). Rudolph et al. stellten ebenfalls fest, dass OA-NO₂ die Akkumulation von Lipiden in Makrophagen minimiert und auch die Bildung von Schaumzellen in Apolipoprotein E defizienten (apoE -/-) Mäusen reduziert. Zudem erhöhen Nitroalkene die Expression plaquestabilisierender Proteine. In den Plaques der mit Nitroalkenen behandelten Tiere konnte ein höherer Anteil an Kollagen und αSMA (glattes alpha Muskelaktin) nachgewiesen werden, was für eine verbesserte Plaquestabilität spricht (T. K. Rudolph et al. 2010, 7). Diese Ergebnisse zeigen, dass nitrierte Fettsäuren auch in der Therapie oder sogar zur Prävention der Atherosklerose eine vielversprechende Therapiestrategie darstellen können (T. K. Rudolph et al. 2010, 5). Eine Studie von Khoo et al. zeigt, dass eine verminderte Bioaktivität der endothelialen NO-Synthase zu einer verminderten Gefäßrelaxation und erhöhten Proliferationsrate der glatten Muskelzellen führte (N. K. H. Khoo et al. 2010, 237). Die reduzierte eNOS- Aktivität erhöht zudem die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und den Anstieg der Zytokinausschüttung (N. K. H. Khoo et al. 2010, 237). HO-1 und eNOS, die durch nitrierte Fettsäuren vermehrt exprimiert werden, wirken protektiv gegen den durch oxidativen Stress verursachten Endothelschaden (N. K. H. Khoo et al. 2010, 237). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass OA-NO₂ durch die Expression von HO-1 nicht nur die Proliferation glatter Muskelzellen inhibiert, sondern zusätzlich die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen von der Media in die Intima nach Verletzung der Femoralarterie verhindert (N. K. H. Khoo et al. 2010, 237). Die Migration der glatten Muskelzellen in die Intima begünstigt die Bildung einer Neointima durch Hyperplasie. Des Weiteren konnte die durch die Verletzung hervorgerufene Stenosierung der Femoralgefäße durch die Gabe von Nitro-Ölsäure deutlich minimiert werden (Cole et al. 2009, 969). Zu den cGMP- abhängigen antiproliferativen Signalkaskaden zählt unter anderem die Wirkung von LNO₂. LNO₂ führt über den Anstieg von cGMP und dessen vasomotorischen Effekte zu einer Relaxation endothelialer glatter

Muskelzellen in Ratten (Cole et al. 2009, 969). Mit der ansteigenden cGMP-Konzentration wird die cGMP- abhängige Proteinkinase I (cGK) aktiviert, welche die relaxierenden und antiproliferativen Effekte von NO vermittelt (Melichar 2004, 16671–16676). Ein weiterer Mechanismus, der die Proliferation glatter endothelialer Muskelzellen reduziert, wird von Vilacorta et al. beschrieben. Durch die Modifikation von Transkriptionsfaktoren ermöglicht NO₂ –FA die gezielte Aktivierung protektiver Gene. Nrf-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), ein Transkriptonsfaktor der Leucin- Zipper, liegt als Komplex mit Keap-1 (Kelch-like ECH- associating protein) im Zytoplasma vor (Villacorta u. a. 2007, 2). NO₂ –FA modifiziert Thiole von Keap-1 posttranslational und ermöglicht dadurch die Translokation von Nrf-2 in den Nucleus (Villacorta et al. 2007, 2). Als Transkriptionsfaktor aktiviert Nrf- 2 das ,Antioxident Response Element' (ARE), welches eine "Enhancer Sequenz' darstellt (Villacorta et al. 2007, 2). ARE reguliert die Expression antioxidativer Gene und zytoprotektive, entgiftende Phase II Enzyme, wie zum Beispiel HO-1, Superoxid Dismutase und Glutathion Peroxidase (Villacorta et al. 2007, 2). Zudem supprimiert Nrf-2 antiproliferative Gene der DNA und die Expression redoxsensitiver inflammatorischer Mediatoren (Villacorta et al. 2007, 2). So kommt es zu einem Wachstumsarrest der vaskulären glatten Muskelzellen (Villacorta et al. 2007, 1).

1.5.2.4 Antidiabetogene Effekte

Wie bereits nachgewiesen, aktivieren nitrierte Fettsäuren NO₂ –FA (9-oder 10-Nitro-9-cis-Octadecensäure) durch S-Alkylierung den Peroxisom- Proliferator-Aktivator Rezeptor gamma (PPAR γ), bedingt durch ihre elektrophile Reaktivität (Villacorta et al. 2007, 5). Dieser intrazelluläre Rezeptor wird über einen Liganden stimuliert und verändert seine Konformation, um darauf als Transkriptionsfaktor an der DNA die Expression von Genen zu regulieren, die den Lipidstoffwechsel , die Zelldifferenzierung, den Glukosemetabolismus und inflammatorische Prozesse aktivieren (Schopfer et al. 2010, 8). Antidiabetogene Medikamente wie Rosiglitazon, ein Insulin- Sensitizer, der zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt wird, führen zu einer kompletten Aktivierung des PPAR γ (Schopfer et al. 2010, 6). Die Aktivierung dieses Rezeptors durch Rosiglitazon führt zu einer gesteigerten Aufnahme freier Fettsäuren, einer verbesserten Insulinsensitivität und einem optimierten Glukosestoffwechsel, birgt jedoch auch ein breites Nebenwirkungsprofil (Schopfer et al. 2010, 6). Beispielsweise wird durch die Vollagonisierung die Adipozytendifferenzierung und Gewichtszunahme stimuliert; es kommt zur Bildung peripherer Ödeme und zu einem erhöhtem Aufkommen von kardiovaskulären Events (Schopfer et al. 2010, 6). Daher hatten viele Studien die Entdeckung eines nebenwirkungsärmeren selektiven Modulators des PPAR γ zum Ziel. Schopfer et al. konnte zeigen, dass NO₂ –FA und LNO₂ beide reversibel an die Ligandendomäne Cys285 des PPAR γ binden und zu einer Normalisierung des Blutzuckerspiegels und einer Reduktion der erhöhten Insulinspiegel führen. Diese selektive Aktivierung des Rezeptors führt zu einem verbesserten Nebenwirkungsprofil. Es treten weder Gewichtszunahme noch Ödeme auf und eine Zunahme des kardiovaskulären Risikos wird verhindert (Schopfer et al. 2010, 6).

1.5.2.5 Kardioprotektive Effekte

Nitrierte Fettsäuren spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle für den kardioprotektiven Vorgang der ischämischen Präkonditionierung (IPC). Wiederholte kurze Ischämien des Myokards wirken sich protektiv auf die Größe des Myokardinfarktes aus. Es konnte gezeigt werden, dass Nitroölsäure (LNO₂) während ischämischer Präkonditionierung des Herzmuskels in den kardialen Mitochondrien generiert wird (Schopfer et al. 2010, 7,8). Zudem führt die Zugabe von synthetisch hergestellter LNO₂ zu einer milden Entkopplung der Mitochondrien über die posttranslationale Modifikation von ANT (Adenin-Nukleotid-Translokase) und UCP-2 (Entkopplungsproteine) und zeigt einen kardioprotektiven Effekt (Nadtochiy et al. 2008, 337). Nitroalkene nitroalkylieren mitochondriale Proteine und aktivieren dadurch die Entkopplung der Mitochondrien, die zu einer Protektion der Myozyten vor Ischämie- Reperfusions- Verletzungen (IR) führt (Nadtochiy et al. 2008, 333). In einem weiteren Ischämie- Reperfusionsmodell von V. Rudolph et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass OA-NO₂ protektiv gegen den durch Ischämie und Reperfusion verursachten Schaden des Myokard wirkt und die mit Nitroalkenen behandelte Mauspopulation eine mit 46% signifikant geringere Infarktgröße zeigte als die mit Vehikel behandelte Mauspopulation (V. Rudolph et al. 2009, 155–156). Auch die linksventrikuläre

Funktion, die mittels transthorakaler Echokardiographie nach 24 Stunden Reperfusion ermittelt wurde, war bei den mit OA-NO₂ behandelten Mäusen kräftiger, da diese eine signifikant höhere prozentuale systolische Verkürzungsfraktion zeigten (V. Rudolph et al. 2009, 159). Diese protektiven Effekte sind auf die Inhibition der Untereinheit p65 des nukleären Faktors NF-kb im I/R geschädigten Gewebe zurückzuführen, wodurch die Aktivierung von proinflammatorischen Signalkaskaden unterbunden wurde (V. Rudolph et al. 2009, 156). Auch zeigte sich eine verminderte Aktivität von VCAM-1 und in der Immunfloureszenzfärbung eine reduzierte Leukozyteninfiltration der Infarktzone der mit OA-NO₂ behandelten Mauspopulation (V. Rudolph et al. 2009, 160). Die Apoptoserate der mit OA-NO₂ behandelten Mauspopulation war in der Infarktzone signifikant geringer ausgeprägt als bei den mit Vehikel behandelten Mäusen (V. Rudolph et al. 2009, 160).

2. Zielsetzung

Die vorliegende Studie soll die antiinflammatorischen und antiproliferativen Eigenschaften der Nitroölsäure (OA-NO₂) auf die Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie untersuchen. In einem in vivo Mausmodell untersucht diese Arbeit die Einflüsse der Nitroalkene auf die durch Hypoxie induzierte PAH. Die antiproliferative Bedeutung von OA-NO₂ wird in vitro anhand eines Zellmodells glatter pulmonalarterieller Muskelzellen geprüft und bewertet. Damit soll diese Dissertation einen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie der PAH leisten und eventuell neue Therapieansätze zur Behandlung der Erkrankung liefern.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Software

Gerät	Bezeichnung/ Hersteller
Computer Druckmessung	AD Instruments Power Lab 8/30
Software Druckmessung	Lab Chart 7, AD Instruments
1 French Katheter	Miller, PVR-1035
Beatmungsmaschine	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, Mini Vent Type 845
Waage (Mäuse)	Mettler, PC4000
Waage (Herzen)	Mettler, Toledo A6245
Zentrifuge (Vollblut)	Eppendorf, Mini Spin plus
Zentrifuge (Genexpression)	Eppendorf, Centrifuge 5810
Photometer	Eppendorf, Bio Photometer, 8,5mm
Spectrometer	Dynex Technologies, MRX Tc Revelation
Thermocycler	Biometra, T3
PCR	Applied Biosystems, Step one plus Real time PCR Systems
PCR Software	Applied Biosystems, Step one Software 2.0.2
Entwickler (Western blot)	GE Healthcare, Amersham Hyperfilm TM, MP
Entwickler (Gapdh)	Santec Pegl AB Vilber Labormat
Heizplatte	FMI, EHE/ 3401
Vaporizer	Penlon, Sigma Delta, Inter Med
Pumpe	Vacuubrand GmbH+ Co KG
Brutschrank	Heracell, 150 i- Co ₂ -incubator
Präparationsmikroskop	Leica, MZ6, 10447254
Mikroskop: Zellproliferation	Zeiss, West Germany, 473028 IM
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLB
--------------------------------	--
Kamera	Chroma Phor Q-Imaging, Retiga 1300
Fibrosemikroskop	Olympus CK2
Kamera	Allied Vision Technologies, Prosilica GC
Programm	Norpix, Stream Pix 5, Single Camera
I-Vision	lp-Lab
Fluoreszenzkamera, GAPDH-Bande	Santec PeqLab, Vilber Lourmat
Schüttler	Heidolph, Duomax 1030
Sauerstoffmessgeräte	Greisinger Gmh3630
Osmotische Minipumpen	Alzet
Thermoblock	Biometra, Thermoblock TB2
Zellkulturflaschen	Sarstedt
24- Well- Platten	Becton Dickinson Labware

3.1.2 Reagenzien und Arzneistoffe

Bezeichnung	Hersteller
Nitroalkene	Pitsburgh Laboratory, Bruce Freeman
Polyethylenglykol	Sigma, Bio Ultra, 91893-250 ML-F
Isofluran	Servopharma GmbH, Forene®
Buprenorphin	Reckitt Benkiser, Temgesic®
Albumin	Sigma- Aldrich
Pancuronium	Actavis 2mg/ml
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma- Aldrich
HBSS (Hank's Balanced Salt Soluti- on)	Gibco, Invitrogen
Кгуо	Sakura, Tissue Tek
Formalin	UKE-Abfüllung, Formalix 3,5%
Heparin	Rotexamedica 25.000 I.E./ 5ml
Ethidiumbromid	Biorad
Agarosepulver	Gibro BRL
Ponceau-S-Solution	Sigma

Dehydroethidin	Sigma- Aldrich P/N: 104821-25-2
PBS	Invitrogen
BSA (bovine serum albumin)	Thermo scientific, Pierce
Stained/ Unstained Marker	Thermo scientific, Pierce
DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Pierce
Image J	Wayne Rasband Java- based Bildbear- beitungsprogramm,National Institut of Health
RNase Zap	Sigma- Aldrich
98% Thiazolium Blue Tetrazolium Bromide 98%	Sigma, P/N: 298-93-1

3.1.3 Zelllinie und Kulturmedien

Bezeichnung	Lieferant
PASMC (pulmonalarterielle glatte	Lonza,Köln, Deutschland
Muskelzellen)	
Basalmedium (SmBM, Smooth muscle	Lonza, Clonestics, P/N: CC3181
cell basal medium) Wachstumsfakto-	
ren und Antibiotika (Pen/Strep)	
5% FBS (fetal bovine sera)	Clonestic, Lonza, P/N: 14-471F
PDGF (Platelet- Derived Growth Fac-	PeproTech , P/N: AF-100-14B
tor-BB)	
Antibiotika	Biochrom Ag, Pen/Strep

3.1.4. Mauslinie

Bezeichnung	Herkunft
C57bl6/J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)

3.1.5 Reaktionskits

Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit, RNA Isolation	Qiagen, P/N: 74104
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, P/N: 4368813
HotStarTaq Master Mix Kit,GAPDH-	Quiagen, P/N: 203443
PCR- Kit	
TaqMan Universal PCR Master Mix,	Applied Biosystems, P/N:4324018
	/4326614
Super Signal West Femto Maximum	Pierce Protein Biology Products, P/N:
Sensitivity Substrate 100ml Kit	34094)
BCA Protein Assay Kit, Proteinbe-	Pierce Protein, P/N: 23225
stimmung	

3.1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Glycin Puffer	Pierce
Tris Puffer	Pierce
10x TBS	Tris Base, NaCl, Ad 1000ml A.bidest -
	> auf pH 7,6 mit 36 % HCL einstellen
1x TBST	100ml 10x TBS ad 1000ml aq. Dest,
	1ml Tween-20 (=0,1%)
Blotting Puffer	Tris 3,03g, Glycin 14,4g, Methanol
	200ml, Aq dest 800ml
10x SDS-Page Laufpuffer	Tris30,2g, Glycin 14,4g, Methanol
	200ml, Aq dest 800ml
Block- Puffer	5% Milch: 5g Magermilchpulver auf
	100ml TBST
Homogenisierungspuffer	121mg Tris-HCI, 4,28g Saccharose,
	57mg EGTA, 292mg EDTA ad 50ml
	Aqua bidest., pH 7,5
Homogenisierungslösung	1 Tablette Protease-Inhibitor, 50µl
	Triton X ad 10ml Homogenisierungs-
	Puffer
Laemmli- Puffer, 4x Protein-SDS-Gel	250 mM Tris HCL (FW. 157,6g/mol)
Ladepuffer	=1,97g, pH 6,8, 9,2% (w/v) SDS
	=4,6g, 40% Glycerol =20 ml, 0,2%
	(w/v) Bromphenolblau =0,10g, DTT
	(900μl Ladepuffer +100μl 1M DTT)
Transferpuffer	Pierce
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Pierce
4x Sammelgel- Puffer	Tris (0,5 M) 30,0g, EDTA 1,5g, pH6,8,
	SDS 2g ad 500 ml aq. dest
4x Trenngel- Puffer	Tris (0,5 M) 90,85g, EDTA 1,5g,
	pH8,8, SDS 2g ad 500 ml aq. dest

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelles Modell

Die im Rahmen des PAH-Projektes durchgeführten Versuche am Tiermodell waren in ihrer Gesamtheit durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien Hansestadt Hamburg gemäß des Tierschutzgesetztes genehmigt, Projektnummer: 29/10.

3.2.1.1 Tierkollektiv

Für die Versuche wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J) gewählt, kommerziell erworben durch das Jackson Laboratory (Main, USA). Im Verlauf des Projektes führten wir zwei Durchläufe des Versuchsaufbaus durch mit jeweils 20 Versuchstieren, von denen 10 Mäuse als Kontrollgruppe dienten und die verbleibenden Tiere die Versuchsgruppe ausmachten.

3.2.2 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden während des Ablaufs des Projektes in der Tierhaltung der Campus Forschung unter artgerechten Bedingungen gehalten. Durch einen automatischen Hell-Dunkel-Wechsel im 12 Stunden- Takt wurde ein regelgerechter Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Die Nahrung während des 31-tägigen Versuches bestand aus Trockenpellets und Wasser. Die Käfige wurden wöchentlich gewechselt. Ihre Unterbringung erfolgte in Hypoxiekäfigen, denen über Druckventile Stickstoff (N₂) und über eine Frischluftleitung Druckluft zugeführt wurde. Tägliche Kontrollen und Flaschenwechsel hielten einen Sauerstoffgehalt zwischen 11 und 11,5% aufrecht und induzierten so erfolgreich eine Hypoxie. Der Sauerstoffgehalt, mit Hilfe von Sauerstoffmessgeräten ermittelt, wurde ebenfalls über eine Standleitung via Skype mit Bildaufnahmen mehrmals täglich kontrolliert.

3.2.3 Implantation von osmotischen Pumpen

Den zehn zur Versuchsgruppe gehörigen Mäusen wurden zu Beginn des Projektes osmotische Minipumpen (Alzet, Mini-osmotic pump Model 2002, Kalifornien, USA) über einen Hautschnitt subkutan implantiert.

Diese förderten das Nitroalkengemisch (hergestellt durch das Pittsburgh Laboratory, Bruce Freeman) über 14 Tage mit einer Flussrate von 0,52 µl/h in einer Dosis von 1,04 nmol/g/h. Dann erfolgte ein Pumpenwechsel. Die Mäuse wurden zunächst gewogen (Gemini BV, Mettler PC4000 Waage) und der Mittelwert des Gewichtes bestimmt. Dem durchschnittlichen Gewicht entsprechend wurden die osmotischen Pumpen unter sterilen Bedingungen befüllt. Sie enthielten 10% Ethanol (EtOH) und 90% Polyethylenglykol (PEG, Sigma, P/N: 91893-250ML-F) sowie Nitroalkene (Nitroölsäure, hergestellt durch das Pittsburgh Laboratory, Bruce Freeman). Die kurzzeitige Lagerung der Pumpen in NaCl regte ihre osmotische Aktivität an. Die Implantation der osmotischen Pumpen wurde bei zehn männlichen Tieren im Alter von 8-10 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 21,5 g subkutan über einen ca. einen cm langen Hautschnitt, befindlich am rechten Schulterblatt der Tiere durchgeführt. Narkotisiert wurde mit 2-2,5 Vol% Isofluran (Forene, Servopharma Gmbh), P/N: 8692380) über einen Verdampfer (Penlon, Sigma Delta Vaporizer) als O₂- Gemisch (1:1,1). Zur Sicherstellung der ausreichenden Tiefe der Narkose erfolgte mittels Pinzette ein Reflexausschluss. Daraufhin erfolgte die Fixierung des Tieres auf der beheizten Operationsplatte (FMI, Föhr Medical Instruments). Zur Analgesie erhielten die Mäusen vor Beginn der Operation jeweils 200 µl Buprenorphin (0,01 mg/kg KG, Buprenorphinhydrochlorid, Temgesic, Reckitt Benkiser) subkutan injiziert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthensalbe abgedeckt. Nach ausreichender Desinfektion der Schnittstelle erfolgten ein ca. ein cm langer Hautschnitt auf Höhe des rechten Schulterblattes und die stumpfe Präparation einer Hauttasche, in die anschließend die osmotische Pumpe eingelegt wurde. Die Wunde wurde mit einer Klammernaht verschlossen. Zur Erholung wurden die Tiere nach Ablauf der Operation für einige Stunden unter normoxischen Bedingungen gehalten und anschließend in die Hypoxiekäfige im Tierstall der Campus Forschung verlegt.

3.2.4 Invasive rechtsventrikuläre Druckmessung

Nach Ablauf der 28- tägigen Hypoxie wurde sowohl bei der Versuchs- als auch bei der Kontrollgruppe invasiv der rechtsventrikuläre Druck gemessen. Die Tiere wurden erneut durch Inhalationsnarkose mit Isofluran 2-2,5 Vol% narkotisiert und mit 250 µl Buprenorphin subkutan analgesiert. Es folgten die Intubation und die weitere Beatmung der Maus durch Anschluss an eine Beatmungsmaschine (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus) mit 250 µl/Vol unter einer Beatmungsfrequenz von 160 /Minute Die Messung des rechtsventrikulären Druckes erfolgte durch einen 1 French Katheter (Miller, P/N: PVR-1035). Der Katheter wurde durch Infundierung mit 37° C NaCl erwärmt. Zunächst wurde die Vena Jugularis sinistra freipräpariert und ein mit NaCl gefüllter PE-10 Katheter in die Vene eingebracht und fixiert. Über den Jugulariszugang wurden 100 µl Pancuronium (Actavis, 2mg/ml) zur Relaxation sowie 100µl 12,5% Albumin (Sigma) zur Aufrechterhaltung des hydrostatischen und kolloidosmotischen Druckes injiziert. Daraufhin wurde die Vena jugularis dextra präpariert und der Katheter hierüber in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die korrekte Lage des Katheters war an entsprechender Morphologie der aufgezeichneten Druckkurven zu erkennen. Es wurden viermal unter kurzer Abschaltung der Beatmung und in unterschiedlichen Positionen die Druckwerte eines Tieres aufgezeichnet. Dadurch konnten atemabhängige Druckschwankungen sowie positionsabhängige Falschmessungen verhindert werden. Um narkoseabhängige Druckveränderungen zu detektieren, wurde die Herzfrequenz der Mäuse zwischen 400-500 Schläge konstant gehalten. Die Frequenzkontrolle erfolgte über die Anpassung der inhalativen Gabe von Isofluran. Die einzelnen Druckkurven wurden mittels eines Computerprogramms (AD Instruments Power Lab 8/30, Lab Chart7) aufgezeichnet.

3.2.5 Organentnahme

Nach erfolgreicher Druckmessung erfolgte der abdominelle Zugang mittels einer medianen Laparotomie zur finalen Organentnahme. Der linke Ast der Arteria pulmonalis wurde zunächst abgebunden, um eine Perfusion mit Formalin zu verhindern. Es folgte die Abtrennung des linken Lungenlappens nahe der trachealen Bifurkation. Der Lungenflügel wurde zweigeteilt; ein Teil wurde in einem Eppendorfer Reaktionsgefäß bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren, der andere Teil kryokonserviert und ebenfalls bei -80°C schockgefroren. Über die Vena jugularis sinistra wurde der Maus Formalin infundiert und damit die restlichen Organe mit Formalin getränkt. Um eine erfolgreiche Infundierung zu erreichen, wurde der Farbwechsel der Leber von dunkel zu hellrot beobachtet. Es folgte die Freipräparation des Herzens und dessen Absetzung an der Herzbasis. Das Herz wurde nach Entnahme auf Eis in einer Petrischale mit Formalin gelagert und unter dem Mikroskop (Leica MZ6) von Blutkoageln sowie Gefäß- und Bindgewebsresten befreit. Die Herzvorhöfe wurden durch eine feine Operationsschere abgetrennt und verworfen, da sie für die weitere Untersuchung nicht von Bedeutung waren. Es wurden Ventrikel dexter und sinister am Septum interventricular voneinander durch Scherenschnitt getrennt und einzeln gewogen (Mettler, PC 4000). Die Aorta wurde von der Wirbelsäule gelöst und unter mikroskopischer Sicht mit NaCl gespült und von Bindegewebsresten befreit. Die formalingetränkten Organe wurden bei Raumtemperatur in Formalin gelagert und dann in Paraffin gegossen. Die Organe der Mäuse des zweiten Durchlaufes wurden auf die gleiche Art freipräpariert und entnommen, jedoch nicht mit Formalin gespült, sondern in Eppendorfer Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80° C gelagert. Die bei – 80° C gelagerten Organe wurden für die Durchführung von PCRs und Western blots verwendet.

3.2.5.1 Blutentnahme

Zur ausreichenden Blutentnahme wurde der linke Ventrikel des Herzens bei noch vorhandenem Kreislauf punktiert , dabei 200-300µl Blut entnommen und dieses für sechs Minuten bei 6300 rpm zentrifugiert (Eppendorf, Mini spin plus). Zur Vermeidung der Koagulation wurde das Blut mit einer mit Heparin beschichteten Spritze entnommen. Das Plasma wurde nach der Zentrifugation abpipettiert und in einem Eppendorfer Reagenzgefäß bei -80°C gefroren.

Mit ca. 100µl des Vollblutes erfolgte in der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf am gleichen Tag die Bestimmung des Hämatokrits.

3.2.6 Bestimmung des Hämatokrits

100µl des durch Punktion der linken Herzkammer gewonnenen heparinisierten Vollblutes wurden in eine Hämatokritkapillaren aufgezogen. Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgte im Institut für Klinische Chemie/ Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Die Kapillaren wurden für 10 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert; dabei wurden die Blutbestandteile aufgrund der Zentrifugationskraft getrennt. Der schwere Teil, welcher die Erythrozyten enthielt, setzte sich am Boden ab; die Höhe des Sediments konnte mittels einer Schablone abgelesen werden.

3.2.7 Histologie

3.2.7.1 Fixierung und Einbettung

Der rechte und linke Ventrikel sowie die Aorta und einer der entnommenen Lungenflügel wurden in Formalin fixiert.

Der zweite Lungenflügel wurde in Kryomedium eingebettet und über flüssigem Stickstoff langsam eingefroren und bei -80°C gelagert, ebenso wie das durch Zentrifugation gewonnene Plasma. Bei einem zweiten Durchlauf mit erneut zwanzig Versuchstieren wurden die entnommenen Organe lediglich bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und eine Lungenhälfte der Versuchstiere in Formalin eingelegt. Die Einbettung der Organe in Paraffin und Verarbeitung der Paraffinblöcke zu Schnitten sowie deren Färbung erfolgte in der Neuropathologie des UKE.

3.2.7.2 Fibrosefärbung, Siriusred

Die rechten Ventrikel der Herzen wurden mit Hilfe der Sirius- Rot- Färbung nach einem Standard- Histologieprotokoll durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Eppendorf angefärbt. Es folgte die mikroskopische Auswertung (Olympus CK2) von jeweils vier Gesichtsfeldern bei zehnfacher Vergrößerung der Ventrikelschnitte mittels Scoring von 0-3. Es wurde sowohl die intramuskuläre als auch die perivaskuläre Fibrose verblindet ausgewertet, wobei sich stark fibrosierte Gewebeanteile mit einem hohen Kollagenanteil als rote Areale darstellten.

3.2.7.3 DHE-Färbung (Dihydroethidin Färbung)

Mittels der DHE-Färbung ist es möglich, reaktive Sauerstoffspezies anzufärben. Hierzu verwendeten wir die in Kryomedium eingelegten Lungenschnitte. Dihydroethidin (Sigma-Aldrich, C₂₁H₂₁N₃, P/N: 104821-25-2) ist ein Stoff, der mit Superoxid reagiert und dabei zum rot fluoreszierenden Ethidium konvergiert. Er bindet irreversibel an doppelsträngige DNA (Nadtochiy et al. 2008, 333,334). Zunächst wurde 1 mg Dihydroethidin zu 317 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) (10 µM DHE) gegeben und gevortext. Danach wurde die Lösung durch Aluminiumfolie vor lichtinduziertem Zerfall geschützt und auf Eis gelagert. In der Dunkelkammer wurden 5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen) zu 2,5 µl DHE/DMSO- Lösung hinzugegeben (1:2000-> 5µM DHE). Pro Lungenschnitt wurden 200 µl DHE/DMSO 1:2000 verwendet. Die Schnitte wurden später mit Hilfe des Lyca-Floureszenzmikroskops (Kamera: Chroma Phor, Q Imaging, Retiga 1300) und des I-Vision- Programms (IPLab) ausgewertet. Dabei wurde eine "Region of Interest' ausgewählt, mit dessen Farbspektrum der Rest des Schnittes verglichen wurde. So ist das Programm in der Lage, alle auffälligen Areale zu erkennen und deren Flächen zu addieren.

3.2.7.4 Iba- 1- Färbung

Die Iba-1- Färbung (ionized calcium binding adapter molecule 1) ist eine immunhistochemische Färbung und dient der Darstellung von Makrophagen. Während die Makrophagen aktiv sind, wird das Iba- Molekühl hochreguliert. Die Iba-1 Färbung wurde nach einem standardisierten histologischen Protokoll in der Neuropathologie des UKE durchgeführt. Pro Schnitt wurden später zehn Gesichtsfelder in 100x Vergrößerung (Olympus Blt-2) ausgezählt und die Ergebnisse in Excel verarbeitet.

3.2.8 Genexpression

3.2.8.1 Gewebehomogenisierung

Zur Isolierung der RNA wurden die Proben in Flüssigstickstoff gekühlter Umgebung gemörsert. Während dieses Vorgangs müssen die Proben dauerhaft auf unter -80°C gehalten werden, um das Auftauen und den damit verbundenen Zellzerfall und die Freisetzung von RNA abbauenden Enzymen zu vermeiden. Vor dem Arbeitsbeginn wurde die Oberfläche des Arbeitsplatzes gründlich mit RNase Zap gereinigt und damit oberflächlich vorhandene RNasen zerstört. Die Gewebeproben wurden in einem durch flüssigen Stickstoff gekühlten Tiegel mit einem Mörser zu Pulver zerrieben. Das Pulver wurde dann in ebenfalls durch flüssigen Stickstoff gekühlte 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt.

3.2.8.2 RNA – Isolation

Bei der RNA- Isolation werden nur die Gene erfasst, die zum Zeitpunkt der Organentnahme transkribiert wurden und als sogenannte messenger RNA (mRNA) in der Zelle vorlagen. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, P/N: 74104) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zuerst erfolgte die Reinigung des Arbeitsplatzes mit RNase-Zap. Die mit dem Homogenat gefüllten Reaktionsgefäße wurden gewogen, um zu ermitteln, welche Menge RLT-Puffer (RNeasy Lysis *Buffer*, P/N: 79216) hinzugegeben werden musste. ß-ME (ß-Mercaptoethanol) wurde nun in einem Verhältnis von 1:100 mit dem RLT-Puffer in einem sterilen Falcon unter dem Abzug vermengt. Der RLT- Puffer enthielt GITC (Guanidinium Isocyanate), welche temporär DNasen denaturierten. Zusätzlich konnte der Abbau der RNA durch RNasen infolge der irreversibel denaturierenden Eigenschaft von ß-ME aufgehalten werden (Quiagen 2012). Für Proben mit einem Gewicht bis 20 mg wurden 300µl RLT-Puffer mit ß-ME verwendet. Alle Proben über 20 mg wurden

mit 600µl RLT-Puffer mit ß-ME versetzt, mehrmals auf- und abpipettiert in QIA-Ex Zentrifugen-Säulen (QIAGEN) und für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 1 Volumen (300 bzw. 600µl) 70% Ethanol versetzt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und maximal 600µl auf die RNeasy- Zentrifugen-Säulen gegeben. Nach dem Abzentrifugieren für 15 Sekunden bei 10000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und der Schritt bei Bedarf mit dem restlichen Ethanol-Proben-Gemisch wiederholt. Bei diesem Vorgang wird die RNA an der Matrix der Extraktionssäule absorbiert. Die Säule wurde durch Zugabe von 600µl RWI- Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000 rpm gewaschen, der Durchfluss erneut verworfen. Nun wurden die Proben zweimalig mit 500µl RPE-Puffer (P/N: 1018013) gewaschen und das erste Mal für 15 Sekunden bei 10000 rpm und beim zweiten Mal für zwei Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNeasy Zentrifugen-Säulen wurden jetzt auf 2 ml Sammelgefäße gesteckt und wieder für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, so dass die Säulen trocken waren. Zur Probenelution wurden die RNeasy Zentrifugen-Säulen in RNase-freie, sterile 1.5ml Reaktionsgefäße gesteckt und jeweils 50µl RNasefreies Wasser vorsichtig hinzugefügt. Die RNA wurde in diesem letzten Schritt aus der Extraktionsmembran durch einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in das sterile 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20°C gelagert.

3.2.8.3 Bestimmung von Quantität und Reinheit der DNA und RNA

Um die Menge und Reinheit der RNA- Proben zu ermitteln, erfolgte eine photometrische Messung (Eppendorf, Bio Photometer) bei 230nm, 260nm, 280nm und 320nm. Nukleinsäuren können bei 260nm quantifiziert werden, da bekannt ist, dass RNA in einer Küvette von 1m Länge bei dieser Absorption eine Konzentration von 40µg/ml besitzt. Die RNA-Isolation aus Zellen extrahierter Nukleinsäure zeigt einen gewissen Grad an Verunreinigung durch Proteine. Die photometrische Messung der Proben bei 260 und 280nm (RNA/Protein) und deren Quotienten geben einen Indikator für den Grad der Reinheit an. Reine RNA-Präparate sollten einen Wert von 2.0 nicht unterschreiten. Die photometrische Messung bei 320nm liegt deutlich außerhalb der Nukleinsäure- und Proteinpeaks. Sie stellt die Hintergrundkorrektur da und sollte um 0 liegen. Der Quotient aus 260/230 (RNA/organische Verbindungen) sollte ebenfalls über 2,0 liegen. Ein kleinerer Wert zeigt eine eventuelle Verunreinigung an (Biochrom 2012). Zunächst wurden den Proben 2µl RNA entnommen und mit 58µl RNase –free- water in 1.5ml Reaktionsgefäßen und einem Verhältnis von 1:30 vermengt. Die 60µl wurden in eine Küvette überführt und im Photometer bei 230, 260, 280 und 320 nm gemessen. Keines der Verhältnisse lag unter 1,8. Daher ist davon auszugehen, dass die Proben nicht durch Proteine oder organische Verbindungen verunreinigt waren.

3.2.8.4 cDNA Synthese

Für die Synthese der cDNA wurden 1µg bzw. 0.1µg RNA mittels Reverse Transkription umgeschrieben. Die einzusetzende Menge an RNA konnte aus den photometrisch bestimmten Konzentrationen errechnet werden.

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, P/N: 4368813) verwendet. Um DNA amplifizieren zu können, muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt erfolgt durch eine RNA abhängige DNA-Polymerase, die durch Reverse Transkription aus der RNA DNA synthetisiert. Benötigt wird ein Primer, in diesem Fall ein random Hexamer Oligonukleotid, bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden. Eine DNA abhängige DNA- Polymerase synthetisiert dann den komplementären DNA-Strang zum cDNA-Einzelstrang. Zunächst wurde ein Reverse Transkriptase- "Master mix' aus den benötigten Reagenzien zusammengemischt, gevortext und auf Eis gelagert. Dazu wurde eine der Anzahl der Proben entsprechende Mischung aus RT- Puffer (2µl pro Probe, Reverse Transkriptase-Puffer), dNTP's, (0,8µl pro Probe, Desoxyribonukleosidtriphosphate), dem Zufallsprimer (2µl pro Probe, random primer) und der MultiScribe Reverse Transkriptase (2µl pro Probe) in einem autoklavierten Eppendorfer Gefäß hergestellt und je ein Ansatz auf ein RNase-freies 200µl-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die berechnete µl-Menge an RNA (1µg bzw.0.1µg) sowie RNase-freies Wasser (13,2µl -xµl RNase- free- water) wurden zugegeben, so dass das Endreaktionsvolumen in einem 200µl-Reaktionsgefäß 20µl

48

betrug. Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler (Programm 19) unter Verwendung folgenden Programms durchgeführt: 10 Minuten: 25°C, 120 Minuten: 37°C, 5 sec.: 85° C, °: 4°C . Die cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.8.5 Kontrolle der cDNA durch GAPDH- PCR

Die Synthese der cDNA wurde mittels PCR auf das Hauskeeping-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) überprüft. GAPDH ist ein Gen, das bei der Glycolyse eine zentrale Rolle spielt und als eines der Gene gilt, die konstitutiv exprimiert werden. Für die Kontroll-PCR wurde das HotStarTag Master Mix Kit von Quiagen (P/N: 203443) verwendet. Zunächst wurde der Reaktionsmix hergestellt aus 2µl Primer-Mix [1µl 10µM GAPDH-f (Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase, 5'-GCATCTGAGGGCCCACTGAAG-3'), 1µl 10µM GAPDH-r (5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'), 15µl HotStarTaqmaster mix(DNA-Polymerase, PCR-Puffer mit 3mM MgCl₂ und jeweils 400µM pro dNTP] und 12µl sterilem Wasser. Jedem sterilen Eppendorfer- Reaktionsgefäß wurden 29µl des Reaktionsmixes und 1µl der cDNA hinzugegeben. Danach wurden die Proben in den Thermocycler (Biometra, T3) gegeben und folgendes PCT-Programm verwendet: (Schritt 1: 95°C: 2 Minuten, Schritt 2: 94°C:30 Sekunden, Schritt 3: 55°C: 30 Sekunden, Schritt 4: 72°C: 30 Sekunden, 25x Wiederholung von Schritt 2-4, Schritt 5: 72°C: 2 Minuten, Schritt 6: 4°C ∝). Dabei wurden die Nukleinsäuren zuerst bei 94°C denaturiert, darauf erfolgte die Primerhybridisierung (Anlagerung eines Primers bei 55°C) und zuletzt bei 72°C die Extension (Verlängerung der gewünschten Nukleotidsequenz, GAPDH). Nach Beendigung der PCR wurden die Proben mit 6x DNA Ladepuffern (DNA Loading Dye, Pierce) versetzt. Um die GAPDH-Bande darstellen zu können, wurde ein 1% Agarosegel angefertigt aus 3g Agarose-Pulver (Gibro, BRL) und mit TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer, Pierce) auf 300 ml aufgegossen. Die Agaroselösung wurde im Mikrowellenherd aufgekocht und kühlte danach auf ca. 60°C ab. Der Lösung wurde 5µl Ethidiumbromid (Biorad , Konzentration der Ausgangslösung) pro 100ml Agaroselösung hinzugegeben, damit die aufgetrennten Stränge später unter dem UV-Licht floureszierten, und dann in ein Trägertablett für

Gelelektrophorese mit Kamm gegossen. 10-20µl der mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben sowie - als Marker - 5µl einer DNA-Leiter (100bp ladder) wurden in die Taschen aufgetragen. In 1% TBE-Laufpuffer wurde das Agarosegel für 30 Minuten an eine elektrische 120 Volt Spannung gelegt. Nach Auftrennen der DNA-Stränge erfolgte die Aufnahme der Banden unter dem UV-Licht (Santec PeqLab, Vilber Lourmat).

3.2.8.6 RT-PCR (Real time Polymerase Chain Reaction)

Die RT-PCR dient der in vitro Amplifikation kleiner DNA-Mengen mittels Fluoreszenz-Detektion. Die RT- PCR basiert auf Vergleichsmessungen mit definierten Standard Referenzgenen, die konstant exprimiert und nicht reguliert werden. Die Primer sind mit einem Fluorezenzreporter markiert, der erst nach Abspaltung von den Primern und erfolgter Anlagerung der Primer an die cDNA leuchtet. Nach jedem Zyklus der Amplifikation am Ende der Elongationsphase wird die Reporter-Fluoreszenz analysiert. Die Messung findet in der exponentiellen Phase der PCR statt, wenn optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional mit der Menge der PCR- Produkte an. Die Fluoreszenzmessung basiert auf dem "Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer' (FRET). Dabei gibt ein Donor Fluorochrom Energie an einen Akzeptor Quencher ab. Je größer der Abstand des Donors und Akzeptors voneinander, desto geringer ist das ,FRET'- Signal. Das Fluoreszenzsignal des Akzeptors nimmt ab und das des Donors nimmt proportional zu. Benötigt wird dazu eine TagMan-Sonde, die an ihrem einen Ende mit dem Quencher und an ihrem anderen Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Tamra) markiert ist. Die Taq- Polymerase, die eine 5'-3'- Exonuklease- Aktivität besitzt, baut diese Sonden dann ab, wobei sich Quencher und Fluorophor voneinander entfernen. (TaqMan-Sonden; Berechnung nach der AACt-Methode) Diese Löschung des Fluoreszenzsignals ist ein Phänomen, welches sich leicht messen lässt.

Zur Durchführung der PCR wurde die zuvor synthetisierte cDNA mit dem zum gesuchten Gen komplementären Oligonukleotidprimer, einer thermostabilen DNA-Polymerase, Nukleotiden und Puffern inkubiert. Vorab wurde die cDNA 1:10 verdünnt, indem zu 20µl der cDNA 180µl RNase-freies-Wasser hinzugegeben wurden. In jedes Well einer speziellen 96-well-Platte (Applied Biosystems) wurden jeweils 10µl Master Mix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, P/N: 4324018 und 4326614), 9µl des cDNA-Mixes und 1µl des Primer Mixes [Applied Biosystems: Nppb (mCG11731) natriuretic pepdtide precursor type B, GAPDH: NM 008084.2] gegeben. Nun wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und im Real Time Cycler (Real Time PCR device StepOne, v. 2.0, Applied Biosystems), der auf 95°C vorgeheizt war, platziert. Zuerst wurde die DNA bei 92°C (1 sec.) denaturiert, dann folgte in 40 Zyklen die Anlagerung des Primers und die Elongation bei 60°C (20 sec.). In der Auswertung wurde ein Referenzgen, auch "Houskeeping-Gene" genannt, betrachtet, dessen Expression als konstant gilt. In diesem Fall wurde der CT-Wert (,Cycle treshhold') von GAPDH mit dem CT- Wert des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis gesetzt durch die Delta-Delta-CT-Methode, um eventuelle Störfaktoren zu detektieren. Der ,Cycle treshhold'-Wert wird ermittelt, wenn sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Es ist der Wert, bei dem die Menge der PCR- Produkte anfängt exponentiell zu wachsen. Je niedriger der CT-Wert, desto höher war die cDNA-Menge im Ansatz zu Beginn. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Applied Biosystems Step one Software 2.0.2.

3.2.9 Western blot

3.2.9.1 Proteinbestimmung

Den verwendeten gemörserten Gewebeproben aus dem rechten Ventrikel und der Lunge wurde ein Homogenisierungspuffer hinzugegeben. Dieser beinhaltete Tris-HCL: 0,121g, Sucrose: 4,28g, EGTA: 0,057g und EDTA: 0,292g und wurde auf einen pH von 7,5 eingestellt. Zu den Lungenproben wurden jeweils 200µl Homogenisierungspuffer, zu den Myokardhomogenaten 70µl hinzugefügt. Die Proben wurden für 1h unter regelmäßigem Vortexten (alle 5-10 Minuten) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden für 10min bei 10000 rpm und 4°C alle nicht-löslichen Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand (= Zellhomogenat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jeder der verdünnten Proben wurde zur Proteinbestimmung 2µl entnommen, mit 98µl aqua dest vermengt und auf Eis gelagert. Die restlichen Zellhomogenate wurden bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung der Proteinmenge der einzelnen Gewebehomogenate erfolgte mit Hilfe des BCA Protein -Kits (BCA Protein Assay Kit, Pierce Protein, P/N: 23225): Dabei wurden in einer 96-well-Platte jeweils 25µl der Probengemische sowie BSA-Standard-Lösungen definierter Konzentrationen (von 0µg/ml bis 2000µg/ml) in Doppelbestimmung gegeben und dazu jeweils 200µl der working solution (BCA-Reagenz B+ BCA- Reagenz A, 1:50, Bicichoninic acid). Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562nm in einem Spektrophotometer (Dynex technologies, MRX TC) abgelesen. Von den errechneten Absorptionswerten wurde jeweils die Absorption des Standard-Wertes (Blank: well ohne Probe, nur mit working solution) abgezogen und aus den BSA-Standard-Lösungen eine Standardkurve erstellt, aus der man die Proteinkonzentrationen ablesen konnte.

3.2.9.2 Gelelektrophorese

Um die Proteine in Banden linear auftrennen zu können, wurde eine diskontinuierliche SDS-Page Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet. Diese bestand aus einem 10% Sammelgel [Tris (0,5M): 30,3g, EDTA: 1,5g, pH auf 6,8 mit HCL, danach 2g SDS (Natriumdodecylsulfat) und 500 ml aq.dest hinzugeben] und einem 4% Trenngel [Tris(1,5M):90,85g, EDTA: 1,5g, pH auf 8,8 mit HCL einstellen, danach 2g SDS und 500ml ag. dest hinzugeben]. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel in die Vorrichtung, bestehend aus vier Glasplatten und vier Spacern, gegossen und ein 15-Kamm luftblasenfrei in das noch flüssige Sammelgel eingebracht. Für die Protein-Gelelektrophorese wurden 20µl der Zellhomogenate mit 80µl Homogenisierungspuffer 1:5 verdünnt, mit 4x Protein-Ladepuffern nach Laemmli [mit 100mM DTT (Dithiothreitol)] versetzt. Es folgte die Denaturierung der Proben im Thermoblock bei 95°C für fünf Minuten. Danach wurden die errechneten Proteinmengen (20-40µg) sowie Protein-Marker in die Taschen gegeben, jeweils ein stained und ein unstained Marker zum erleichterten Größenvergleich der Proteinbanden. Nun wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer gesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 130V für 1 1/2 - 2 Stunden, bis der Blau-Marker ausgelaufen war.

3.2.9.3 Blotting

Nach dem Auftrennen der Proteinbanden erfolgte der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Dazu wird das Trenngel in einem "Western-Blot-Sandwich", bestehend aus (von unten nach oben) Schaumstoffpad, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Trenngel, Filterkarton und Schaumstoff, in ein Gitter eingespannt und bei 100 mA 90 Minuten unter stetiger Kühlung durch einen Eisakku und gekühlten Transferpuffer geblottet. Die Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran wurden mit der Ponceau-S für eine Minute angefärbt und danach zur Überprüfung des Transfers mit ag dest für eine Minute gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 2x eine halbe Stunde in Blockpuffer (je nach Antikörper Milch oder bovine serum albumin) auf einem Schüttler geschwenkt. Über Nacht wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (1:10000) bei 4°C in Blockpuffer unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem zehnminütigen Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem HRP (horse-raddish-peroxidase) konjugierten zweiten Antikörper (1:10000) in Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschritte mit TBS-T für jeweils zehn Minuten. Wir verwendeten folgende Antiköper für die Durchführung der Western blots: HO-1, Vasp/ pVasp, eNos, p-NFkB und Nrf-2.

3.2.9.4 Chemielumineszenz

Um die Proteinbanden der Nitrocellulosemembran sichtbar zu machen und auswerten zu können, wurde eine Chemielumineszenzreaktion mit Hilfe eines Reaktions-Kits [Enhanced Chemiluminescent Kit (ECL) und SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (femto-ECL), (Pierce P/N: 34094)] nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Zur besseren Detektion der Antikörpersignale wurden je nach Antikörper verschiedene Mischungen aus ECL und femto-ECL eingesetzt (1:20 – 1:1) und 2 ml des Gemisches auf die Membran pipettiert. Nach fünfminütiger Einwirkzeit wurde die Nitrocellulosemembran in einer Entwicklungskasette positioniert. In der Dunkelkammer wurde die Filmfolie auf den Blot in die Filmkassette gelegt, nach ca. 30 Sekunden – 30 Minuten (je nach Antikörpersignal) entfernt und in einer Entwicklermaschine (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm) entwickelt.

3.2.9.5 Stripping der Banden

Um die Proteinmembranen erneut verwenden zu können, wurde die Nitrocellulosemembran durch "Stripping" (Abziehen) vom ersten und zweiten Antikörper gereinigt. Das Stripping erfolgte durch 2x 20 Minuten Inkubation auf dem Schüttler mit 0,2 M Glycin-Puffer (Mg =75,5g/mol, pH 2,5) und 2x 20 Minuten Inkubation mit 50 mM Tris-Puffer (121,14g/mol, pH 7,5). Nach kurzem Waschen mit TBS-T konnte die Membran mit der jeweiligen Blocklösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt werden, bevor die neuen Antikörper zugeben wurden.

3.2.9.6 Auswertung der Proteinbanden

Um die Intensität des Chemilumineszenzsignals umdeuten zu können als gesuchte Proteinmenge der jeweiligen murinen Lungen- oder Myokardprobe, wurden die Entwicklerfolien der Blots eingescannt und mittels eines Computerprogramms (Image J, Wayne Rasband Java- based Bildbearbeitungsprogramm, National Institut of Health') ausgewertet. Diese quantifizierten Bandenstärken (ausgedrückt als area under curve) wurden in Excel übertragen und in einem Balkendigramm dargestellt.

3.2.10 Bestimmung der Muskularisierung pulmonalarterieller Lungengefäße

Um die Muskularisierung der kleinen pulmonalarteriellen Gefäße sichtbar zu machen, wurden die Gefäße immunhistochemisch doppelgefärbt gegen den von Willebrand Faktor (Faktor VIII), der als Endothelzellmarker gilt, sowie gegen alpha-SMA (alpha- smooth-muscle-actin) zur Kennzeichnung der glatten Mus-

kelzellen. Der vWF wurde mit einem braunen Chromogen und das alpha- SMA mit einem violetten Chromogen entwickelt. Betrachtet und ausgewertet wurden pulmonalarterielle Gefäße mit einem Durchmesser von 40-70 µm. Dabei wurde "vollmuskularisierte" (full) von "teilmuskularisierten" (partial) und "nichtmuskularisierten" (none) Gefäßen unterschieden. Diese Untersuchung wurde von der AG Prof. Schermuly im 'Cellular and Molecular Biology Lab' des Max-Planck Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt.

3.2.11 In Vitro Proliferation von pulmonalen glatten

Muskelzellen

Die in vitro Proliferation glatter pulmonalarterieller Muskelzellen wurde mit humanen PASMC von Lonza (Köln, Deutschland) durchgeführt. Diese wurden von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen isoliert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte an einer Sterilbank, die über einen Abzug und UV-Beleuchtung verfügt. Es wurde stets steril gearbeitet, um die Kontamination der Zellen durch Pilze oder Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden zu Beginn bei Raumtemperatur aufgetaut und in Zellkulturflaschen (Sarstedt) überführt. Zur Anzüchtung wurden sie mit 15ml Basalmedium (SmBM, Smooth muscle cell basal medium, CC3181, Clonestics, Lonza), FBS (5% FBS, fetal bovine sera, 14-471F, Clonestic, Lonza), Wachstumsfaktoren (PDGF, Platelet- Derived Growth Factor-BB, AF-100-14B, PeproTech) und Antibiotikum (Pen/Strep) im Brutschrank (Heracell 150 i- Co₂-incubator) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt für vierundzwanzig Stunden inkubiert. Nach drei Tagen und einer Wachstumsdichte von ca. 50% wurde das Basalmedium auf 20 ml aufgefüllt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 24- Well- Platten (Becton Dickinson Labware) überführt ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und Serum, um die Zellen im Stadium G1 zu synchronisieren, und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Zeiss) determiniert. Das Medium wurde nach Ablauf der Inkubation mit einer Pumpe (Vacuubrand GmbH+ Co KG) abgesaugt und durch Medium mit Serum unterschiedlicher Konzentrationen (FBS, fetal bovine sera, 14-471F, Clonestic, ohne, 0,2%, 0,5%) ersetzt. Zudem wurde einigen Wells 10 ng PDGF (Platelet- Derived Growth Factor-BB, AF-100-14B, PeproTech) und

Ethanol (Vehicle), entsprechend dem Anteil der Nitroalkene, hinzugefügt. Einer dritten Zellpopulation wurden neben FBS ebenfalls PDGF und Nitroalkene (1/ $2,5 / 5 \mu M \text{ OA-NO}_2$) hinzugefügt. Mit 500 μ l Nährmedium wurden die Wells jeweils beimpft und die Zellen erneut für vierundzwanzig Stunden im Brutschrank mit den neuen Nährmedien inkubiert.

Basalmedium	/	/	/
Basalmedium	FBS 0,2%	/	/
Basalmedium	FBS 0,5%	/	/
Basalmedium	FBS 0,2%	10ng PDGF	Vehicle (Alc.)
Basalmedium	FBS 0,5%	10ng PDGF	Vehicle (Alc.)
Basalmedium	FBS 0,2%	10ng PDGF	1 /2,5/5 μM
			OA-NO ₂
Basalmedium	FBS 0,5%	10ng PDGF	1 / 2,5/ 5 μM
			OA-NO ₂

Tabelle 2: Nährmedien Aufteilung

3.2.11.1 Determination der Proliferation

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellkulturen wurden jeweils 10 mg Thiazolium Blue Tetrazolium Bromide 98% (Sigma, P/N: 298-93-1) in 10 ml PBS gelöst und davon jeweils 50 µl pro Well zum Medium gegeben. Es folgte die Inkubation der Zellen für vier Stunden im Brutschrank. Danach wurde das Medium mittels Pumpe abgesaugt und 100 µl PBS und 200µl DMSO auf die Zellen gegeben. Nach der zehnminütigen Inkubation wurden die Zellen in 96-well Platten mit je 150 µl pro Well überführt. Der Farbausschlag in den einzelnen Wells wurde mit einem Photometer gemessen.

4. Ergebnisse

Den Ergebnissen der Untersuchungen liegen zwei unabhängig voneinander durchgeführte Durchläufe zu Grunde, die sich jeweils über 28 Tage erstreckten. Nach 28 Tagen begannen die Messungen an den ersten Versuchstieren und konnten am 31. Tag mit dem letzten Tier beendet werden. Die Versuchstiergruppen bestanden beim ersten Durchlauf aus zehn Wildtyp- Hypoxie-Tieren (n=10) und zehn OA-NO₂ Hypoxie-Tieren (n=10). Als Kontrollgruppe dienten drei Wildtyp- Normoxie- Tiere. Während der vierwöchigen Hypoxie verstarben zwei der Wildtyp- Hypoxie- Tiere und konnten daher in den finalen Messungen nicht mit berücksichtigt werden. Am 26. Tag zeigten sich bei beiden Tieren Wundheilungsstörungen an der Nackentasche, die trotz täglich manuellen Drehens der Minipumpen nicht rückläufig waren. Beide Tiere verstarben nach der Kurznarkose mit Isofluran (2-2,5 Vol%) und erneutem Wundverschluss durch Einzelknopfnaht. Im zweiten Durchlauf befanden sich erneut zehn OA-NO₂- Hypoxie-Tiere (n=10) und neun Wildtyp-Hypoxie-Tiere (n=9). Die Kontrollgruppe bestand aus sieben Wildtyp-Normoxie-Tieren (n=7).

4.1 Systolische Blutdruckwerte im murinen rechten Ventrikel

Die Mittelwerte der invasiv gemessenen rechtsvenDtrikulären systolischen Blutdrücke (RR/mmHg) der Versuchs- und Kontrollgruppe sind in Tabelle 3 aufgelistet, gemeinsam mit dem Standardfehler der jeweiligen Mittelwerte (SEM) und den Tierzahlen (N).

Systolischer RR (mmHg)	Mittelwert	SEM	N
WT/NOX-ctrl (n=3)	22,81	1,6	3
WT/HOX (n=8)	41,23	1,8	8
OA-NO ₂ /HOX	30,47	2,53	10

Tabelle 3: Systolischer Blutdruck





Diagramm 1: Balkendiagramm der systolischen Mitteldrücke, Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

Die Messung der systolischen Blutdrücke nach Beendigung der vierwöchigen Hypoxie zeigte einen signifikanten (p<0,001,oneway ANOVA) Unterschied zwischen dem mittleren rechtsventrikulären Druck der Wildtypen (WT/HOX), von 41,23 mmHg und dem der mit Nitroalkenen behandelten Tieren (OA-NO₂/HOX), von 30,57 mmHg. Der Mittelwert des rechtsventrikulären Drucks der OA--NO₂/HOX- Tiere unterschied sich nicht signifikant (p>0,093, Post-Hoc-Test) vom durchschnittlichen rechtsventrikulären Druck der Kontrollgruppe (WT/NOX-ctrl), der bei 22,81 mmHg lag und sich im normotensiven Bereich befand. Die mittleren Druckunterschiede zwischen den mit Vehikel behandelten Wildtypen und der Kontrollgruppe erwiesen sich jedoch als signifikant (p<0,001. Post-Hoc-Test).

4.2 Durchschnittlicher pBNP- Gehalt im murinen

rechten Ventrikel

Die durchgeführte PCR zur Detektion der proBNP Menge in den murinen rechten Herzen zeigt eine deutlich angestiegene pBNP Menge in den mit Vehikel behandelten und der Hypoxie ausgesetzten Tieren (p=0,04). Die Unterschiede zu den mit OA-NO₂ behandelten Versuchstieren ist nur als Tendenz zu erkennen und noch nicht signifikant (p=0,04).



Diagramm 2: Balkendiagramm des proBNP-Gehaltes im murinen rechten Ventrikel, Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.3 Gewicht RV/LV+Septum

Der Quotient aus den Gewichten der rechten und linken Ventrikel ist ein Index für rechtsventrikuläre Hypertrophie. Die mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/HOX) zeigten einen signifikant (p< 0,001, oneway ANOVA) höheren RV/LV+Septum- Quotienten (0,372) als die mit OA-NO₂ behandelten Tiere (OA-NO₂/HOX, 0,251). Der Unterschied der Ventrikelgewichte zwischen der Kontrollgruppe (WT/NOX, 0,228) und den mit Nitroalkenen behandelten Tiere (OA-NO₂/HOX) war hingegen gering (p>0,387, Post-Hoc-Test).



Diagramm 3: Balkendiagramm der Mittelwerte RV/LV+Septum, Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.4 Hämatokrit

Die Messung des Hämatokrits erfolgte aus den Vollblutproben von vier Kontrolltieren (NOX/WT), fünf mit Vehikel (HOX/WT) und vier mit OA-NO₂ behandelten Versuchstieren (OA-NO₂/HOX). Der Hämatokrit der mit Nitroalkenen behandelten Tiere (OA-NO₂/HOX) war mit 48% wesentlich niedriger (p< 0,001, oneway ANOVA) als der Hämatokrit der mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/HOX), der bei 54% lag. Die Kontrollgruppe lag mit einem durchschnittlichen Hämatokrit von 42,25% im Normbereich und unterschied sich nicht signifikant (p<0,086 Post-Hoc-Test) von den OA-NO₂ - Hypoxie- Tieren.



Diagramm 4: Balkendiagramm, muriner Hämatokrit, Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.5 Perivaskulärer und intramuskulärer Fibrosegrad im murinen rechten Ventrikel

Das Scoring von 0-3 der intramuskulären Fibrose in den rechten Ventrikeln ergab deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die intramuskuläre Fibrose war erheblich stärker ausgebildet bei den mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/HOX) als bei den mit Nitroalkenen behandelten Tieren. Im Verlauf von Gefäßen ließen sich eindeutig rot gefärbte Kollagenstränge im Myokard identifizieren. Jedoch lies sich diese Beobachtung nur als Tendenz in der statistischen Auswertung darstellen und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtyp- Mäusen und den mit Nitroalkenen behandelten Tieren.



Abbildung 4: Fibrosefärbung: Siriusrotfärbung RV, perivaskuläre Fibrose, Repräsentative Darstellung von jeweils einem Gefäß pro Gruppe



Diagramm 5: Perivaskuläre Fibrose, murines Myokard, Siriusrotfärbung, Chi-Quadrattest, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.



Diagramm 6: Intramuskuläre Fibrose, murines Myokard, Siriusrotfärbung, Chi-Quadrattest, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.6 Immunfloureszenzfärbung reaktiver Sauerstoffspezies im murinen Lungengewebe

Als Marker für inflammatorische Prozesse dienen reaktive Sauerstoffspezies, die von Entzündungszellen produziert werden. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop konnte man in den Lungenschnitten von OA-NO₂ - behandelten Tieren (OA-NO₂/HOX) eine deutlich geringere rot fluoreszierende Aktivität des Ethidiums erkennen im Gegensatz zum markanten Immunfluoreszenzsignal der mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/HOX). Der Unterschied zwischen den mit OA-NO₂ und den mit Vehikel behandelten Versuchstieren war signifikant (p= 0,04 oneway ANOVA). Die Kontrolltiere zeigten ein schwaches Ethidium- Signal, leuchteten jedoch erheblich geringer (p=0,797, Post- Hoc- test) als die behandelten Nitroalkentiere. Mit Hilfe des I- Vision- Programms konnten die einzelnen fluoreszierenden Areale zu einer Fläche addiert werden.



Abbildung 5: Repräsentative DHE- Immunfluoreszenz Darstellung des murinen Lungengewebes von WT/HOX, WT/NOX und OA-NO₂/HOX.

P=0.008 (Anova)



Diagramm 7: Balkendiagramm der fluoreszierenden Fläche im murinen Lungengewebe nach der DHE- Färbung. Es werden die Prozente der DHE positiven Zellen, im Bezug auf das gesamte Gesichtsfeld angezeigt. Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.7 Makrophagenrekrutierung in der murinen Lunge

Das Iba-1 (ionisierendes, kalziumbindendes Adaptermolekül) ist ein Markerprotein für Makrophagen und färbt deren Zellkerne braun an. Die Bilder der immunhistochemischen Färbung zeigen einen deutlich repräsentativen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die Schnitte der mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/HOX) lassen mit durchschnittlich 62,58 Makrophagen signifikant (p=0,04) mehr Makrophagen erkennen als die Schnitte der mit Nitroalkenen behandelten Mäuse (OA-NO₂ /HOX) mit durchschnittlich 28,57 Makrophagen. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (WT/NOX), bei der sich im Schnitt 21,98 Makrophagen anfärben ließen, und der Versuchstiergruppe (OA-NO₂/HOX) zeigten sich als nicht signifikant. Pro Versuchstier wurden jeweils zehn Gesichtsfelder ausgezählt, von denen drei repräsentative Bilder ausgewählt wurden.

Α



Abbildung 6: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Iba-1-Färbung muriner Lungen



Diagramm 8: Balkendiagramm der Quantifizierung der Makrophagenanreicherung in der Lunge mit Hilfe der Iba-1-Färbung. Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.8 Muskularisierungsgrad pulmonalarterieller Lungengefäße mit einem Durchmesser zwischen 40-70 µm

Die in Bad Nauheim ausgewerteten Muskularisierungsdaten der pulmonalarteriellen Lungengefäße ergaben, dass die Lungengefäße der mit Nitroalkenen behandelten Tiere mit einem Durchmesser von 40-70 µm erheblich (p=0,002) geringer muskularisiert waren als die der mit Vehikel behandelten Wildtypen (WT/NOX). Besonders beeindruckend und signifikant (p<0,001) war der Unterschied zwischen den Normoxie-Tieren (WT/NOX) und den mit Vehikel behandelten Versuchstieren (WT/HOX).

NormoxieHypoxie VehikelHypoxie OA-NO2Image: A strain of the st

Α

Abbildung 7: Repräsentative Darstellung der Muskularisierung von jeweils drei Gefäßen eines Durchmessers von 40-70 µm pro Gruppe. Immunhistochemische Doppelfärbung des Von- Willebrand- Faktors (braun) und des alpha-SMA (alpha- smooth-muscle-actin, violett)



Diagramm 9: Darstellung des prozentualen Anteils der nicht-muskularisierten pulmonalarteriellen Gefäße (20-70 µm) in murinen Lungenschnitten der drei Gruppen nach morphometrischer Analyse im Balkendiagramm. Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.9 In vitro Proliferation von pulmonalarteriellen Zellen

Die in vitro Proliferation pulmonalarterieller Zellen unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren konnte durch die Applikation von 2,5 und 5 μ M Nitroölsäure signifikant (p=0,024/ p<0,001) reduziert werden. In der Auswertung zeigte sich, dass die Zellpopulationen, denen lediglich PDGF und keine Nitroalkenen hinzugefügt wurden, deutlich stärker proliferierten als die behandelten Zellpopulationen. Die Zugabe von 1 μ M Nitroölsäure erzeugte keinen signifikanten Unterschied (p=0,08), nur eine Tendenz im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Zellpopulation. Entsprechend zeigte die Kontrollpopulation, die lediglich mit Nährmedium gefüttert wurde, die geringste Muskularisierung kleiner pulmonalarterieller Gefäße.



Diagramm 10: In vitro Proliferation pulmonalarterieller Zellen ohne PDGF (Kontrolle), mit PDGF und mit Nitroalkenen 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M und PDGF. Anova, Fehlerbalken stellen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

4.10 Western blot zu HO-1 in den murinen rechten Ventrikeln und der Lunge

Um die Menge der HO-1 Konzentration in den murinen rechten Ventrikeln und Lungen quantifizieren zu können, führten wir Western blots durch. Die Untersuchung der HO-1 Menge in den Homogenaten ergab folgende Mittelwerte gemessen als Fläche unter der Kurve:

	average HO-1 RV	sd	SEM
HOX/OANO ₂	30216	6942	2314
HOX/WT	27844	2917	972
NOX/WT	14555	1351	450

Tabelle 4: Mittelwerte HO-1 in murinen rechten Ventrikeln als Fläche unter der Kurve (AUC) definiert, quantifiziert mittels Image J, Wayne Rasband Java- based Bildbearbeitungsprogramm.



Hypoxie Vehikel (1-3), Hypoxie OA-NO₂ (4-6), Normoxie (7-9)

Abbildung 8: Western blot HO-1 in murinen rechten Herzen



Diagramm 11: Western blot, HO-1 in murinen rechten Ventrikeln, t-Test, Fehlerbalken stellen SEM dar.

	average HO-1 Lunge	sd	SEM
HOX/OANO ₂	21215	1491	1491
HOX/WT	22195	646	646
NOX/WT	37666	3180	3180

Tabelle 5: Mittelwerte HO-1 in muriner Lunge als Fläche unter der Kurve (AUC) definiert, quantifiziert mittels Image J, Wayne Rasband Java- based Bildbearbeitungsprogramm.



Abbildung 9: Western blot HO-1 in der murinen Lunge



Diagramm 12: Western blot, HO-1 in muriner Lunge, t-Test, Fehlerbalken stellen SEM dar.

Die durchgeführten Western blots zeigten keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Auch die während der blots aufgetragenen Antikörper eNos, Vasp, p-NFkB und Nrf-2 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und der mit OA-NO₂ behandelten Gruppe.

5. Diskussion

Diese Arbeit zeigt die protektiven Effekte der nitrierten Fettsäuren im Rahmen der PAH durch in vitro und in vivo Untersuchungen. Die in der Einleitung verfasste Hypothese wird durch die Darlegung der antiinflammatorischen Eigenschaften von OA-NO₂ bestätigt.

5.1 Rechtsventrikuläre Drücke der Mauspopulationen

Ein entscheidender Parameter der PAH ist der progrediente Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP). Die PAH ist definiert als ein PAPmean von > 25 mmHg. Die Erhöhung des PAP wird besonders durch den Anstieg vasokonstringierender Faktoren begünstigt, die vaskuläres Remodeling zur Folge haben (Bogaard u. a. 2009, 794). Durch die Druckerhöhung kommt es zu einer Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast und in Folge dessen als Adaptationsprozess zu einer kompensierten Rechtsherzhypertrophie. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung dilatiert der Ventrikel und die Patienten erleiden eine Rechtsherzinsuffizienz. Der genaue Mechanismus der Dekompensation des rechten Ventrikels ist noch nicht geklärt (Bogaard et al. 2009, 794). Durch die invasive rechtsventrikuläre Druckmessung konnte ein signifikanter Druckanstieg auf 41,23 mmHg bei der mit Vehikel behandelten Versuchstierpopulation festgestellt werden. Die mit Nitroölsäure behandelten Tiere zeigten um 10 mmHg niedrigere rechtsventrikuläre Drücke. Die Erhöhung des Druckes ist höchstwahrscheinlich auf die zunehmende Vasokonstriktion und das vaskuläre Remodeling zurückzuführen. Schermuly et al. konnten zeigen, dass die Expression der NO - und sGC - (lösliche Guanylatcyclase) Rezeptoren in den glatten Muskelzellen kleiner pulmonaler Arterien von PAH Patienten deutlich erhöht ist, als
Hinweis für eine Reduktion des Substrates, in diesem Falle NO (R T Schermuly et al. 2008, 886). Die lösliche Guanylatcyclase wird durch NO aktiviert und spaltet GTP zu cGMP und freies Phosphat. cGMP dient als sekundärer Botenstoff und hält Na²⁺ und Ca²⁺ Kanäle in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien offen. Durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid steigt der intrazelluläre Ca²⁺- Spiegel und es kommt zur Vasorelaxation (R T Schermuly et al. 2008, 881, 882). Im Falle der PAH kann dies, bedingt durch die verminderten NO- Spiegel, nicht erfolgen. Bereits Ignarro et al. konnten 1981 zeigen, dass organische Nitrate und Stickstoffmonoxid durch die Aktivierung der Guanylylcyclase und die Akkumulation von cGMP zu einer Vasodilatation der Gefäße durch Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen führten (Ignarro et al. 1981, 745). Schmermuly et al. erkannten 2008, dass BAY 63-2521, eine dem Stickstoffmonoxid synergistische Substanz, welche das Ansprechen der sGC (lösliche Guanylatcycalse) auf Stickstoffmonoxid verbessert und die zellulären cGMP- Spiegel anhebt, protektiv gegen vaskuläre Inflammation wirkt, die Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen signifikant reduziert und die Ausbildung der pulmonalen Hypertonie partiell revidieren kann (R T Schermuly et al. 2008, 886;887). Giad et al. belegen in Immunhistochemien, dass die endotheliale NO-Synthase im vaskulärem Endothelium signifikant geringer exprimiert wird im Vergleich zur Kontrollgruppe (Giaid and Saleh 1995, 217). Khoo et.al. untersuchten die protektiven Effekte von NO₂-FA auf die endotheliale NO- Synthase Genexpression und Funktion im Hinblick auf Therapiestrategien von vaskulären Erkrankungen. Sie wiesen nach, dass NO₂-FA zur Vasodilatation führt, indem es die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen inhibiert und zudem inflammatorische Prozesse und vaskuläres Remodeling reduziert (N. K. H. Khoo et al. 2010, 179). Dabei spielt NO eine Schlüsselrolle in der Regulation der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase durch die Inhibition inflammatorischer Zellen und der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Inflammatorische Konditionen in Gefäßen bedingen einen erhöhten NO- Verbrauch durch die Redoxreaktionen (N. K. H. Khoo et al. 2010, 230). Die Behandlung von Mäusen durch subkutane Applikation von OA-NO₂ erhöhte die Expression der endothelialen NO- Synthase in murinen Aorten, führte zum deutlichen Anstieg der NO- Produktion und durch dessen vasoprotektiven Effekt zur Vasodilatation (N. K. H. Khoo et al. 2010, 230). Möglicherweise ist die Konzentration der endothelialen NO- Synthase im murinen Modell unter der Therapie mit OA-NO₂ erhöht, wodurch der NO- Spiegel ansteigt. Dies würde zur Aktivierung der sGC führen und die Vasodilatation pulmonaler Gefäße ermöglichen. Dieser Mechanismus könnte die signifikante Senkung der murinen rechtsventrikulären Drücke, welche wir in unserer Studie unter der Therapie mit OA-NO₂ nachweisen konnten, erklären.

5.2 Zusammenhang zwischen dem signifikanten Anstieg des Hämatokrits und der pulmonalarteriellen Druckerhöhung

Die vorliegende Studie zeigt einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits bei der mit Vehikel behandelten Mauspopulation. Die Zellproliferation der Erythrozyten scheint maßgeblich durch den Reiz der Hypoxie ausgelöst zu werden. So zeigte bereits A. J. Fisher 1992, dass Ratten, die Hypoxie ausgesetzt waren, zur Verbesserung der Gewebeperfusion einen Anstieg ihres Hämatokrits boten (Bogaard et al. 2009, 794). Die dargestellte Druckerhöhung in den pulmonalarteriellen Gefäßen könnte unter anderem auf die erhöhten Hämatokritwerte der mit Vehikel behandelten Mäuse zurückgeführt werden. Barer et al. konnten zeigen, dass Ratten, die einer dreiwöchigen Hypoxie mit 10 % O₂ ausgesetzt waren, deutlich erhöhte Hämatokritwerte aufwiesen und eine Polycythämie entwickelten (Fisher, Schrader, and Klitzman 1992, 1881). Der Hämatokrit stieg dabei auf Werte zwischen 50 und 60 %. In einem zweiten Schritt wurden die Lungen der Ratten mit dem Blut der hypoxischen Ratten perfundiert und der pulmonalvaskuläre Widerstand bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der Anstieg des Hämatokrits deutlich mit der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie korreliert (Barer and Bee 1982, 27). In einer weiteren Studie von Fagan et al. konnte ebenfalls im Mausmodell nach Hypoxie ein signifikanter Anstieg des Hämatokrits nachgewiesen werden (Barer and Bee 1982, 27). Der Anstieg des Hämatokrits könnte auf eine vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hif- 1 alpha (Hypoxie- induzierter Faktor) zurückzuführen sein, der die Erythropoetinproduktion anregt (Wang und Semenza 1993, 4304). Steudel et al. zeigten zudem, dass der Hämatokrit auch bei eNOS- defizienten Mäusen erhöht war und zu einem Anstieg des pulmonal vaskulären Druckes führte (Wang and Semenza 1993, 4304). Die Veränderung der Blutviskosität scheint erheblichen Einfluss auf den systemischen und pulmonalarteriellen Widerstand zu haben und es ist fraglich, ob der Nutzen der erhöhten Sauerstoffbindungskapazität oder die negativen Auswirkungen der erhöhten Blutviskosität überwiegen (Steudel et al. 1998, 2476). Die Studie von Barer und Bee lässt erkennen, dass mit Zunahme des Hämatokrits auch der pulmonalarterielle Druck signifikant ansteigt (Barer and Bee 1982, 28). Höchstwahrscheinlich ist jedoch nicht nur die erhöhte Erythrozytenzahl für den Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes durch die gestiegene Blutviskosität verantwortlich, sondern auch die gestiegene Tendenz zur Plättchenaggregation, zur Ausschüttung vasoaktiver Mediatoren und zur Erythrozytendeformität und – aggregation (Barer and Bee 1982, 30). In welchem Zusammenhang nitrierte Fettsäuren mit der signifikanten Reduktion der Polycythämie stehen und welchen Einfluss Nitroalkene auf die Erythropoetinproduktion haben, ist bis dato nicht geklärt und bedarf der Durchführung weiterer Studien. Denkbar wäre eine verbesserte Oxygenierungskapazität der Lunge unter hypoxischen Bedingungen durch eine Reduktion des strukturellen Remodeling unter OA-NO₂.

5.3 Reduzierter pBNP- Gehalt in murinen rechten Herzen

BNP (brain natriuretic peptide) ist ein kardiales Hormon, das hauptsächlich vom Ventrikel als Antwort auf Dehnungsreize sezerniert wird (Barer and Bee 1982, 35). Dabei wird es in einen physiologisch aktiven Teil, das proBNP, und ein inaktives N- terminales Fragment NT proBNP gespalten (Nagaya et al. 2000, 1409). Es dient als Marker der ventrikulären Dysfunktion und als prognostischer Indikator bei Herzinsuffizienz. BNP ist ein vasodilatierender Botenstoff, der die membranständige Guanylatzyklase aktiviert, die den cGMP- Spiegel anhebt. Der Anstieg von cGMP führt zu einer Reduktion des intrazellulären Ca²⁺- Spiegels und zur Relaxation glatter Muskelzellen. Effekt der Relaxation glatter Muskelzellen ist eine Senkung von Vor- und Nachlast des Herzens. In einer Studie von Nagaya et al. konnte gezeigt werden, dass bei der pulmonalen Hypertonie der Plasmaspiegel des BNP proportional zur zunehmenden rechtsventrikulären Dysfunktion ansteigt (Nagaya u. a. 2000, 865). Pro- BNP korreliert zudem positiv mit der NYHA- Klassifikation, dem mittleren arteriellen Druck (PAP) und dem totalen pulmonalen Widerstand sowie negativ mit dem systolischen kardialen Auswurf (Nagaya et al. 2000, 867). Ob das BNP einen zuverlässigen Prädiktor für die Mortalitätsrate darstellt, ist noch nicht geklärt (Nagaya et al. 2000, 865). Die Studie fand jedoch heraus, dass die BNP- Spiegel der im Verlauf verstorbenen Probanden zu Beginn deutlich höher waren als die der überlebenden Probanden (Nagaya et al. 2000, 865). Des Weiteren zeigte sich eine starke, unabhängige positive Assoziation der BNP- Level mit einer erhöhten Mortalitätsrate der untersuchten Patienten (Nagaya et al. 2000, 869). Potenziell stellt der BNP- Spiegel aber einen guten Indikator für die Effektivität der vasodilatierenden Therapie dar und dient als simpler Marker zur Risikostratifizierung, der wiederholt gemessen werden kann (Nagaya et al. 2000, 867). Auch Leuchte et al. konnten in einer prospektiv longitudinalen Studie zeigen, dass der BNP-Spiegel mit klinischen und hämodynamischen Veränderung der PAH- Patienten korreliert. Sowohl der mittlere PAP als auch der pulmonale Widerstand steigen in gleichem Maße an wie der BNP-Spiegel der Patienten (Leuchte et al. 2005, 2371). Als klinischer Parameter wurde die 6 Minuten Laufdistanz gemessen, die negativ mit dem BNP- Serumspiegel korreliert (Leuchte et al. 2005, 2370). Der zu Grunde liegende Mechanismus der Sekretion des brain natriuretic peptides liegt in der Stimulation durch myokardialen Scherstress, ebenso wie in der Stimulation durch Hypoxie (Hall 2005, 81). Es folgt die myokardiale de novo Snythese und Sekretion des BNPs; dabei korreliert das Plasmalevel des BNPs mit dem Ausmaß der Wanddehnung der Ventrikel (Hall 2005, 82). BNP induziert Vasodilation, Diurese und eine reduzierte Renin- und Aldosteronausschüttung; dadurch sinkt der systemische vaskuläre Widerstand ebenso wie der zentralvenöse Druck, und letztlich reduziert sich das Blutvolumen und somit der systemische Blutdruck (Hall 2005, 81). In der vorliegenden Studie ist nach Hypoxie ebenfalls ein signifikanter Anstieg des pBNP- Gehaltes in den murinen rechten Herzen der mit Vehikel behandelten Mauspopulation zu erkennen. Unter dem Einfluss von OA-NO2 ließ sich eine deutlich reduzierte Tendenz der NTproBNP-Spiegel nachweisen (p= 0,24). Die Druckerhöhung im rechten Ventrikel bedingt durch die Umbauprozesse in den pulmonalarteriellen Gefäßen eine erhöhte Nachlast des rechten Ventrikels und führt im progredienten Verlauf der PAH zu einer Rechtsherzinsuffizienz (Nagaya et al. 2000, 867). Durch die Vasokonstriktion der pulmonalarteriellen Gefäße und die Fibrosierung des myokardialen Gewebes der Kontrollgruppe steigen der rechtsventrikuläre Druck und die Wanddehnung des Ventrikels sowie der Scherstress, der auf das Gewebe ausgeübt wird, signifikant an. Dieser Mechanismus führt zu einer erhöhten Sekretion von BNP durch die Myozyten der unbehandelten Mauspopulation und lässt sich durch erhöhte BNP- Plasmalevel evaluieren. Da pBNP als prognostischer Marker für die Rechtsherzinsuffizienz dient und bei der pulmonalen Hypertonie proportional zur Dysfunktion des rechten Ventrikels ansteigt (Bogaard et al. 2009, 796), ist davon auszugehen, dass bei der mit Nitroalkenen behandelten Mauspopulation der vasoprotektive Effekt auf pulmonalvaskulärer Ebene, ebenso wie möglicherweise die kardioprotektiven Eigenschaften zu einem geringeren kardialen Schaden durch die vierwöchige Hypoxie und verminderte pBNP- Ausschüttung führen. Diese Vermutung wird durch die reduzierten rechtsventrikulären Druckwerte der mit OA-NO₂ behandelten Mäuse unterstützt. Die direkt auf kardialer Ebene durch OA-NO₂ angesprochenen Veränderungen sind leider noch nicht ausführlich untersucht worden und bedürfen weiterer Studien.

5.4 Reduktion der rechtsventrikulären Hypertrophie und Fibrosierung durch den Einfluss von OA-NO₂

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Studie ist das verminderte rechtsventrikuläre Remodeling unter dem Einfluss von OA-NO₂, welches sich in signifikant reduzierten rechtsventrikulären Gewichten der mit OA-NO₂ behandelten Mäuse und einer Abnahme des rechtsventrikulären intramuskulären Fibrosegrades darstellt. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Hypoxie und die damit verbundenen Umbauprozesse der pulmonalarteriellen Gefäße zu einer Rechtsherzbelastung führen, welche die Adaptation der Kardiomyozyten bedingt, indem sie hypertrophieren, um der angestiegenen Nachlast gerecht zu werden (Nagaya et al. 2000, 865). Dementsprechend hypertrophierten die Kardiomyozyten der mit OA-NO₂ behandelten Mäuse geringgradiger, da die vaskuloprotektiven Effekte der Nitroalkene die Nachlast reduzieren und konsekutiv den rechtsventrikulären Druck senken. Daraus folgt eine signifikante Reduktion der Hypertrophie des Myokards und konsekutiv eine Minimierung der Fibrosierung des myokardialen Gewebes. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie wird unter anderem durch die vermehrte Kollagensynthese kardialer Fibroblasten hervorgerufen (Bogaard et al. 2009, 795), die in der vorliegenden Studie ebenfalls bei den mit Nitroalkenen behandelten Mäusen geringgradiger ausgebildet war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Fibrose entsteht vor allem durch die vermehrte Produktion von Bindegewebe, deren Hauptbestandteil Kollagenfasern sind. Bishop et al. konnten zeigen, dass durch rechtsventrikuläre Duckbelastung die Kollagensynthese rasch signifikant ansteigt und der Kollagenabbau reduziert wird (Bishop u. a. 1994, 1584). Auch in der vorliegenden Studie wurde die reduzierte intramuskuläre Fibrose der mit OA-NO₂ behandelten Mäuse nachgewiesen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der zuvor erläuterten Studien überein und impliziert, dass die Behandlung mit Nitroalkenen antifibrotische Effekte hat, die die rechtsventrikuläre Hypertrophie minimiert. Zusätzlich beeinflusst OA-NO₂ extrazelluläre Matrixmetalloproteinasen, deren vermehrte Aktivität Gewebeschaden, Inflammation und Remodeling verursacht (Bonacci et al. 2011, 16074). Ein zentraler Aspekt vieler inflammatorisch degenerativer Prozesse ist die Dysregulation der Matrixmetalloproteinasen, deren Anstieg eine Imbalance proteolytischer Vorgänge hervorruft (Ra and Parks 2007, 6,16). Die Matrixmetalloproteinasen werden durch Fibroblasten der Gefäßwand, Endothelzellen und Makrophagen sezerniert, unter anderem ausgelöst durch oxidativen Stress (Rajagopalan et al. 1996, 2577). In der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in der Versuchsgruppe deutlich reduziert war. Dementsprechend ist es denkbar, dass die verminderte Konzentration von ROS einen Einfluss auf die Matrixmetalloproteinasen hatte und dadurch das Remodeling des Herzens geringgradiger ausfiel. Fibroblasten sind ebenfalls Hauptbestandteil der Adventitia. Sie reagieren rasch auf vaskuläre Scherbeanspruchung, ausgelöst durch Hypoxie oder den erhöhten Perfusionsdruck, mit einer vermehrten Produktion von Kollagenfasern (Bishop, Guerreiro, and Laurent 1990, 450–455). Diese extensiven fibroproliferativen Veränderungen konnten bis jetzt nur in der Adventitia pulmonaler Arterien als zelluläre Antwort auf die Hypoxie nachgewiesen werden. Stenmark et al. zeigten, dass die pulmonale Adventitiadicke von Kälbern, die unter hypoxischen Bedingungen auf 4,300 m Höhe gehalten wurden, durch fibroblastische Kollagenproduktion zunahm (K R Stenmark and Mecham 1997, 124). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls exzessive Fibrosierung in rechtsventrikulären perivaskulären Arealen der murinen Vehikelpopulation nachgewiesen, welche höchstwahrscheinlich der Adventita angehören. Die myokardialen Schnitte der mit OA-NO₂ behandelten Mäuse zeigten hingegen tendenziell geringer fibrosiertes perivaskuläres Gewebe, obwohl die statistische Auswertung nicht signifikant ausfiel. Folglich ließ sich lediglich eine signifikante Reduktion der rechtsventrikulären intramuskulären Fibrosierung unter dem protektiven Einfluss der Nitroalkene nachweisen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine der maßgebenden Ursachen für die bereits zuvor diskutierte Reduktion der rechtsventrikulären Drücke darstellt. Um ebenfalls signifikante Ergebnisse mittels Scoring in der perivaskulären Fibroseauswertung zu erhalten, müsste die Fallzahl an Versuchstieren erhöht werden.

5.5 Bedeutung der Nitroalkene als antiproliferative Mediatoren - Inhibition des vaskulären Remodelings und der Proliferation PSMC's

Die in vitro Untersuchungen der vorliegenden Studie belegen eine signifikante Reduktion der Proliferation glatter pulmonalarterieller Muskelzellen unter dem Einfluss von OA-NO₂. Die reduzierte Proliferation verhindert eine Querschnittsreduktion der pulmonalarteriellen Gefäße und führt zu einer geringeren pulmonalarteriellen Druckerhöhung unter hypoxischen Bedingungen. So zeigten sich deutlich niedrigere rechtsventrikuläre Druckwerte bei der mit Nitroalkenen behandelten Mauspopulation. Auch die histologische Auswertung von Lungenschnitten in Bad Nauheim ergab signifikante Unterschiede der Muskularisierung pulmonaler Gefäße der mit OA-NO₂ und der mit Vehikel behandelten Tiere. Dabei wurden die Unterschiede in den kleinen pulmonalen Gefäßen mit vasalem Durchmesser von 40- 70 µm bestimmt. Diese Studienergebnisse entsprechen denen von Villacorta et al., die ebenfalls im in vitro Experiment eine reduzierte Proliferation glatter aortaler Muskelzellen von Ratten durch die Gabe von LNO₂ erreichten. Nitrierte Fettsäuren scheinen die vaskuläre Homöostase aufrecht zu halten und protektiv gegen vaskulären Zellschaden zu wirken (Villacorta et al. 2007, 5). Die Inhibition des vaskulären Remodelings scheint einer der Mechanismen zu sein, der den geringeren Druckanstieg bei den mit OA-NO₂ behandelten Mäusen bedingt. Der zu Grunde liegende Mechanismus der Inhibition der Proliferation wurde in der bereits beschriebenen Aktivierung der Keap1/Nrf2 Signalkaskade gefunden, die zu einer Aktivierung von p27^{kip1} führt, welche ein Wachstumsarrest der PSMC's induziert (Villacorta et al. 2007, 1). Durch die Nitroalkylation von Keap-1 wird die Translokation von Nrf2 in den Zellkern begünstigt. Die Überexpression von Nrf2 und die Aktivierung von p27^{kip1} bedingen die Inhibition der Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (Villacorta et al. 2007, 5). Durch die Translokation von Nrf2 in den Zellkern pausiert der Zellzyklus der glatten Muskelzellen in der G1- Phase (Villacorta et al. 2007, 5). Im Vergleich dazu zeigten sich die mit Vehikel behandelten Zellen zum Großteil in der S-Phase (Villacorta et al. 2007, 1). Cole et al. behandelten Mäuse mit OA-NO₂, denen sie zuvor eine endoluminale Verletzung der linken Femoralarterie zugefügt hatten und beobachteten eine signifikante Reduktion der neointimalen Hyperplasie, die sich in einer reduzierten Intima zu Media Ratio darstellte, durch die verminderte Migration der glatten Muskelzellen von Media zu Intima (Cole et al. 2009, 971). Diese Veränderung war auf die Induktion der Expression und Aktivität von HO-1 zurückzuführen. Ein in vitro Experiment, in welchem OA-NO₂ zu aortalen glatten Muskelzellen von Ratten zugegeben wurde, zeigte des Weiteren eine signifikant reduzierte Zellproliferation glatter vaskulärer Muskelzellen (Cole et al. 2009, 968). Eine Veränderung der HO-1- Spiegel konnte in der vorliegenden Studie durch die Western Blot- Auswertung nicht als Ursache der reduzierten Proliferationsrate der vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. In neusten Studien der Arbeitsgruppe Klinke et al. wurde der ursächliche Mechanismus der reduzierten Proliferationsrate der PSMC's durch den Einfluss von Nitroalkenen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Inhibition der ERK 1/2- Kinase zur Reduktion der Proliferation der humanen PSMC's unter dem Einfluss von PDGF führt, die unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen betrachtet wurden (in press, AJRCMB). Der

Zusammennhang des ERK- Signalweges mit der Proliferation der glatten pulmonalarteriellen Muskelzellen wurde bereits von Liu et al. beschrieben. Durch die Aktivierung des Rho A/ROCK- Signalweges mittels PDGF erfolgte die Translokation von ERK in den Zellkern, wodurch die Phosphorylierung von p27 kip1 angeregt wurde, was die Muskularisierung von PSMC'S zur Folge hatte (Liu et al. 2011, 3103).

5.6 Bedeutung der Nitroalkene als antiinflammatorische Mediatoren

Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie ist die Reduktion der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und die histologisch darstellbare signifikante Abnahme der Makrophagenrekrutierung im pulmonalen Gewebe. Beide Aspekte sprechen für einen Rückgang inflammatorischer Prozesse in der Lunge, welche die pulmonalarterielle Hypertonie maßgeblich beeinflussen (Villacorta et al. 2007, 7). Auf molekularer Ebene wird dies durch den Abfall des NO-Spiegels und die Reduktion der endothelialen NO-Synthase- Aktivität hervorgerufen sowie durch den Anstieg von ROS und RNS (reaktiven Sauerstoff- und Nitrogen-Spezies) (Tabima, Frizzell, and Gladwin 2012, 1970). Das Absinken des NO-Spiegels wird vor allem durch den Verbrauch von Stickstoffmonoxid bei Redoxreaktionen von inflammatorischen Prozessen in der Lunge ausgelöst (Tabima, Frizzell, and Gladwin 2012, 1970). Auch Makrophagen selbst dienen als Quelle der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Liegt Hypoxie vor, kommt es bei der PAH zur Einwanderung inflammatorischer Zellen in das pulmonale Gewebe. Alveolare Endothelzellen regen, aktiviert durch Hypoxie, vaskuläre Endothelzellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen an, die zirkulierende Makrophagen anziehen (N. K. Khoo and Freeman 2010, 1). Die in den Lungengefäßen akkumulierten Makrophagen sezernieren ROS sowie mitogene und fibrogene Zytokine und induzieren dadurch Zellproliferation und Fibrosierung der Gefäßwände, die in einer Progression des vaskulären Remodelings resultieren (DeMarco 2010, 316). Die chronische Inflammation führt zu Lipidakkumulation und Intimahypertrophie, gefolgt von einer Querschnittsreduktion der pulmonalen Gefäße. Dieses pathologische Remodeling begünstigt den pulmonalarteriellen Druckanstieg auf pathologische Werte > 25 mmHg (DeMarco 2010, 316). Mittels Dehydroethidinfärbung konnte gezeigt werden, dass in den mit Nitroölsäure behandelten Mäusen signifikant weniger reaktive Sauerstoffspezies in den pulmonalen Gefäßschnitten akkumulierten als bei den mit Vehikel behandelten Mäusen. Die oxidative Inflammation durch Derivate von NO und O₂ setzt das Gewebe dem oxidativen Stress aus, der zur Reduktion der NO- Bioverfügbarkeit, endothelialer Dysfunktion, vaskulärer Zellproliferation und vaskulärem Remodeling führt (N. K. Khoo and Freeman 2010, 1). Im Zusammenhang mit diesem Sachverhalt steht die vermehrte Akkumulation von Makrophagen im pulmonalen Gewebe, die mit Hilfe der Iba-1 Färbung markiert wurden. Vorangegangene Studien belegen bereits, dass OA-NO₂ und LNO₂ die Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF-kB alkylieren und dadurch dessen Translokation in den Nukleus verhindern. Inflammation induziert die Translokation von NF-kB in den Nukleus und folgend die Expression von Entzündungsmediatoren (N. K. Khoo and Freeman 2010, 1). Die Gabe von OA-NO₂ und LNO₂ konnte die LPS (Lipopolysaccharid)- induzierte Expression von Cytokinen wie IL-6, TNF alpha und MCP-1 in Makrophagen und Monozyten unterbinden (Cui et al. 2006, 8,9). Nitrierte Fettsäuren verhindern zudem die durch inflammatorische Stimuli hervorgerufene Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und deren Migration in die Intima (Cui et al. 2006, 6). Die Migration von Monozyten in die Intima ist die initiale Veränderung, die erfolgen muss, bevor eine Entzündung der Gefäße entstehen kann. Innerhalb der Intima erfolgt die Entdifferenzierung der Monozyten in Makrophagen, welche durch die Expression von Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und chemotaktischen Mediatoren die Funktion vaskulärer und nichtvaskulärer Zellen regulieren (Cui et al. 2006, 10). Unter dem Einfluss von OA-NO₂ und LNO₂ ist die Expression von VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) stark gemindert. VCAM-1 ist verantwortlich für die Adhäsion und transendotheliale Migration der Monozyten und wird vermutlich durch NF-kB als Transkriptionsfaktor auf DNA- Ebene reguliert (Cui et al. 2006, 10). Des Weiteren konnte in einer Arbeit von T. K. Rudolph et al. gezeigt werden, dass mit der inhibierten Makrophagenadhäsion an endothelialen Läsionen durch die gehemmte Phosphorylierung von STAT-1 (proinflammatory signal transducer and activator of transcription-1) die Bildung von atherosklerotischen Plagues in Apolipoprotein E- defizienten Mäusen deutlich reduziert wurde. STAT-1, ein Protein,

welches als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor für lipopolysaccharidaktivierte Makrophagen dient, moduliert ebenfalls die NF-kb- Aktivität an der p65 Untereinheit und induziert die Translokation des Komplexes in den Zellkern (Cui et al. 2006, 10). OA-NO₂ minimiert die Akkumulation von Lipiden in Makrophagen und reduziert dadurch die Bildung von Schaumzellen in Apolipoprotein E- defizienten (apoE^{-/-}) Mäusen (Kramer 2006, 480). Auch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der NADPH Oxidase- 2 (NOX-2) in Makrophagen signifikant reduziert wurde in inflammatorischem Milieu unter dem Einfluss von Nitroarachidonsäure (AANO₂), welche ebenfalls eine Untergruppe der nitrierten Fettsäuren darstellt (González-Perilli et al. 2013, 126). Die NOX-2 stellt die Hauptquelle für ROS in Makrophagen und Monozyten dar, indem sie Sauerstoff zu O2⁻ reduziert (González-Perilli et al. 2013, 126). Die beobachtete Inhibition der NOX-2 durch AANO₂ ist auf eine verminderte Phosphorylierung von Untereinheiten des Zytosols wie p40^{phox} und p47^{phox} zurückzuführen. Dadurch kann der korrekte Zusammenbau des aktiven Enzyms nicht mehr erfolgen und der Einbau der NOX-2 in die Zellmembran unterbleibt. Diese antiinflammatorische Eigenschaft der AANO₂ konnte sowohl in vitro als auch in vivo anhand eines murinen Thyoglycolat- Modells durch die Reduktion der Makrophagenzahl dargestellt werden (González-Perilli et al. 2013, 130).

Diese Erkenntnisse stehen sicherlich im Zusammenhang mit der reduzierten Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies in den pulmonalen Lungenschnitten bei ebenfalls reduzierter Makrophagenzahl. Höchstwahrscheinlich inhibieren die nitrierten Fettsäuren die NADPH- Oxidase und bewirken direkt eine Reduktion der Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies. Zudem könnte auch auch über den NF-kB- Signalweg die Expression von VCAM-1 verhindert werden, wodurch die Adhäsion und Migration von Monozyten und ihre endotheliale Entdifferenzierung zu Makrophagen unterbunden wird. Somit unterbleibt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies, die ein inflammatorisches Milieu schaffen. Durch die Reduktion inflammatorischer Mediatoren in den pulmonalen Gefäßen werden das pathologische vaskuläre Remodeling und die Querschnittsreduktion verhindert und folglich der pulmonalarterielle Druckanstieg deutlich reduziert. Dies ist besonders ersichtlich in den signifikant reduzierten rechtsventrikulären Druckwerten der mit Nitroalkenen behandelten Mäuse, die den pulmonalarteriellen Werten gleichzusetzen sind.

83

5.7 Vasoprotektion durch die Induktion von HO-1

HO-1 ist das initiale und geschwindigkeitslimitierende Enzym des Hämmetabolismus, indem es Häm zu Biliverdin, Eisen und CO oxidiert (Durante et al. 1997). HO-1 wird unter anderem durch sein eigenes Substrat, Hyperthermie, Hypoxie und als Antwort auf inflammatorsiche Mediatoren und oxidativen Stress hochreguliert (Durante et al. 1997). Es spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Hämostase durch Bereitstellung von Häm und CO. CO führt zur Relaxation der Blutgefäße und Inhibition der Plättchenaggregation (Zakhary et al. 1996, 797). Weitere Studien belegen, dass es durch die HO-1 Expression ebenfalls zu einer Senkung des Blutdruckes kommt (Levere et al. 1990, 213–219). Wright et.al. konnten zeigen, dass LNO₂ die Expression der HO-1 mRNA in humanen aortalen Endothelzellen und glatten Muskelzellen durch einen NO- unabhängigen Mechanismus induziert (Wright 2006, 4299-4304). Dementsprechend wird das metabolische und inflammatorische Signaling über die Induktion von HO-1 durch LNO₂ im positiven Sinne beeinflusst. Auch die subkutane Applikation von OA-NO₂ bei Mäusen führte zu einem Anstieg der HO-1 mRNA in murinen Aorten (N. K. H. Khoo et al. 2010, 1). Ebenso wie die in vitro Behandlung muriner Endothelzellen mit OA-NO2 einen signifikanten Anstieg der Expression von HO-1 auslöst (N. K. H. Khoo et al. 2010, 7). So wird vermutet, dass der durch oxidativen Stress ausgelöste Gefäßschaden positiv beeinflusst wird mittels der Aufrechterhaltung der Redoxbalance und der Regulierung der Zellfunktion und der Genexpression durch HO-1, welches zur Inhibition prooxidativer und proinflammatrischer Mediatoren und dessen Metabolite führt (N. K. H. Khoo et al. 2010, 9). In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Anstieg der HO-1 Konzentration mittels der Durchführung von Western blots nicht nachgewiesen werden, obwohl wir diesen auf Grund der vorliegenden Studien erwartet hätten. Dieses von anderen Studien abweichende Ergebnis erklären wir uns durch die lediglich eingefangene Momentaufnahme der Konzentration von Enzymen wie HO-1. Desweiteren wurden bis jetzt nur Aorten auf ihre HO-1 Konzentration untersucht. Eine Expression in murinen Lungen und Ventrikeln konnte noch nicht nachgewiesen werden. Würden zusätzliche Messungen zu einem früheren Zeitpunkt während der Versuchsdurchführung erfolgen, hätte es durchaus zu einem positiven Ergebnis kommen können. Abschließend ist zu erwähnen, dass die Induktion von HO-1 nicht der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der protektiven Effekte der Nitroalkene zu sein scheint.

5.8 Limitation des Modells

Ein eindeutig limitierender Faktor des murinen Modells stellt die Übertragbarkeit der laborchemischen Ergebnisse der vorliegenden Studie auf den Menschen dar. Des Weiteren ist nicht eindeutig gewiss, ob die hämodynamischen Veränderungen und kardialen sowie pulmonalen Umbauprozesse, welche durch die vierwöchige Hypoxie induziert wurden, dem komplexen Remodeling der idiopathischen PAH entsprechen. Beispielsweise zeigten sich keine plexiformen Veränderungen der murinen Pulmonalgefäße, die normalerweise bei der PAH beobachtet werden (Levere et al. 1990, 213-214). Jedoch ist der angewandte Versuchsaufbau neben der Applikation von Monocrotalin eines der am häufigsten verwendeten Modelle, um die pulmonale Hypertonie hervorzurufen und zu untersuchen (Kurt R Stenmark et al. 2009, L1017). Die gute Reproduzierbarkeit, die zurückzuführen ist auf die unter Säugetieren stets ähnlichen strukturellen Veränderungen, wie beispielsweise die Proliferation der glatten alpha Muskelzellen und die erhöhte Rekrutierung von Fibroblasten, sind für die Akzeptanz des Modells verantwortlich (Kurt R Stenmark et al. 2009, L1017). Um jedoch auch Aussagen über den Einfluss von OA-NO₂ auf gesunde Tiere treffen zu können, müsste man neben den beiden bereits in diesem Tiermodell untersuchten Gruppen eine größere Gruppe von Tieren unter Normoxie und OA-NO2 -Einfluss betrachten. Dadurch würde eine angemessene Kontrollgruppe geschaffen und die unter Hypoxie und OA-NO₂ Applikation beobachteten Ergebnisse würden an Signifikanz gewinnen. Die subkutane Applikation der nitrierten Fettsäuren mittels osmotischer Pumpen führt möglicherweise zu variabler Resorption und dementsprechend abweichenden OA-NO₂- Serumspiegeln der behandelten Mäuse. In weiteren Studien könnten die OA-NO₂- Serumspiegel sowie die endogene Produktion von OA-NO₂ gemessen werden, um eventuell Abweichungen in der subkutanen Resorption und verminderte endogene Produktion von OA-NO₂ zu detektieren und Ergebnisse, welche nicht signifikant ausfallen, adäquat interpretieren zu können. Ein wichtiger limitierender Faktor der Studie zeichnet sich nach Ablauf der vierwöchigen Hypoxie ab. Die aus dem murinen Gewebe immunhistochemisch gemessenen Enzyme sind lediglich eine Momentaufnahme, welche die zum Zeitpunkt der Entnahme im Gewebe aktiven Enzyme darstellten. Daher ist davon auszugehen, dass frustran verlaufende Western Blot Messungen auf einen bereits abgelaufenen Expressionsund Aktivitätszustand des gemessenen Enzyms, wie beispielsweise HO-1, zurückzuführen sind. Dies könnte in folgenden experimentellen Studien durch die rechtzeitige Gewebeentnahme zum Zeitpunkt des maximalen Aktivitätszustandes des entsprechenden Enzyms umgangen werden, indem man ebenfalls Gewebeproben einer Mauspopulation nach zwei Wochen Hypoxie entnimmt und immunhistochemisch sowie durch Western blot untersucht. Auch wäre es sinnvoll, Studien durchzuführen, bei denen eine Intervention durch subkutane Applikation von Nitroalkenen erst nach zweiwöchiger Hypoxie erfolgt. Dadurch könnte man den Einfluss von Nitroalkenen auf Veränderungen durch inflammatorische Prozesse untersuchen und die Reversibilität der Fibrose und des erhöhten rechtsventrikulären Druckes nachweisen. Diese Ergebnisse hätten einen höheren wissenschaftlichen Stellenwert als der vorliegende Nachweis der Prävention der PAH durch OA-NO₂.

6. Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist definiert als eine Erkrankung, die durch einen kontinuierlich ansteigenden pulmonalarteriellen Druck gekennzeichnet ist, der zu einer Dilatation und letztlich Dekompensation des rechten Ventrikels führt (T. K. Rudolph et al. 2010, 4). Sowohl das pathologische vaskuläre Remodeling durch die Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen als auch eine Imbalance vasoaktiver Substanzen sind an der Entstehung der PAH beteiligt (Galie et al. 2009, 2245). In der vorliegenden Studie wurden die protektiven Eigenschaften nitrierter Fettsäuren auf die Pathophysiologie der PAH untersucht. Dabei konnten wir durch die signifikante Abnahme des rechtsventrikulären Druckes und die geringere Muskularisierung pulmonaler Gefäße und Proliferation pulmonaler glatter Muskelzellen unter OA-NO₂- Einfluss die antiproliferativen Eigenschaften der Nitroölsäure darstellen. Mit der Gabe von Nitroalkenen wird das vaskuläre Remodeling pulmonaler Gefäße aufgehalten, das maßgeblich das Outcome der an PAH erkrankten Patienten beeinflusst. Zudem fanden wir heraus, dass auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Akkumulation von Makrophagen im pulmonalen Gewebe der mit Nitroalkenen behandelten Mäuse deutlich geringer ausfiel. Dieses Forschungsergebnis demonstriert die antiinflammatorischen Eigenschaften der nitrierten Fettsäuren. Auch die Langzeitfolgen der PAH, die durch intramuskuläre Fibrosierung und kardiale Hypertrophie gekennzeichnet sind, zeigten sich deutlich gemildert in der mit OA-NO₂ behandelten Mauspopulation und deuten auf eine Limitation der ursprünglich stetigen pulmonalarteriellen Druckerhöhung hin. Die Studienergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die subkutane Applikation von nitrierten Fettsäuren das Auftreten und die Perpetuierung der pulmonalarteriellen Hypertonie deutlich reduziert. Ob dieser im Mausmodell vorhandene Benefit auf den Menschen übertragbar ist, wird sich erst in klinischen Studien zeigen. Doch liefern die vorliegenden experimentellen Studienergebnisse wertvolle Informationen für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze und tragen zum grundlegenden Verständnis der Pathophysiologie der PAH bei.

7. Abkürzungsverzeichnis

AANO ₂	Nitroarachidonsäure	ММР	Matrixmetalloprotein
AJRCM	American Journal of Respirato-	mRNA	messenger RNA
В	ry Cell and Molecular Biology		
ALK-1	Activin Rezeptor like kinase- 1	N ₂	Stickstoff
Alpha-	Alpha smooth muscle actin	Na ²⁺	Natrium
SMA			
ANOVA	Analysis of variance	NaCl	Natriumchlorid
ANT	Adenin- Nukleotid- Translo-	NADH	Nikotinamidadenin-dinukleotid
	kase		
ароЕ	Apolipoprotein E	NADPH	Nikotinsäureamid- Adenin-
			Dinukleotid- Phosphat
ARE	Antioxident Response Element	NF-kb	Nuclear factor "kappa- light-
			chain- enhancer" of activated B-
			cells
Aq. dest.	Destiliertes Wasser	NO	Stickstoffmonoxid
BME	ß- Mercaptoethanol	NO ₂	Stickstoffdioxid
BMP	Bone morphogenic protein	NO ₂ -FA	Nirierte Fettsäure
BMPR-2	Bone morphogenic protein Re-	NOS-1	NO- Synthase-1
	zeptor- 2		
BSA	Bovine serum albumin	NOX	Normoxie
Ca ²⁺	Kalzium	NOX- 2	NADPH Oxidase-2
cAMP	Cyclisches Adenosinmono-	Nrf-2	Nuclear factor -erythroid 2- rela-
	phosphat		ted factor- 2
cDNA	Cyclische Desoxyribonuklein-	NT-	N-terminales Fragmet- pro-
	säure	proBNP	Brain natriuretic peptid
cGMP	Cyclisches Guanosinmono-	NYHA	New York Heart Association
	phosphat		
СО	Kohlenstoffmonoxid	O ₂	Sauerstoff
COPD	Chronisch obstruktive Lun-	O ²⁻	Superoxid
	generkrankung		
СТД	Connective tissue disease	OA-NO ₂	Nitroölsäure

CTEPH	Chronische thrombembolische	ONOO	Peroxynitratanionen
	pulmonale Hypertonie		
Ctrl.	Kontrolle	PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
CT- Wert	Cycle Treshhold- Wert	paO ₂	Sauerstoffpartialdruck
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kar-	PAP	Pulmonalarterieller Widerstand
	diologie		
DHE	Dihydroethidin	PASMC	Pulmonary arterial smooth
			muscle cell
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	Phosphat buffered salin
dNTP's	Desoxyribonukleosid-	PCWP	Pulmonalkapillärer Wedge-
	triphosphate		Druck
ECL	Enhanced Chemiluminescent	РСН	Pulmonale kapilläre Hämangio-
	Kit		matose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PDE-5	Phosphodiesterase- Typ- 5
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid	PDGF	Platelet- Derived- Growth Factor
	Synthase		
ERK 1/2	Extrazelluläre signalregulierte	PEG	Polyethylenglycol
	Kinase 1 und 2		
ESC	European Society of Cardiolo-	PGI ₂	Prostacyclin
	ду		
EtOH	Ethanol	ΡΡΑRγ	Peroxisom- Proliferator- Aktiva-
			tor- Rezeptor- γ
FADH ₂	Flavin- Adenin- Dinukleotid	PVOP	Pulmonal venookklusive Erkran-
			kung
FAK	Fokale Adhesionskinase	PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
FBS	Fetal bovine sera	PVOD	Pulmonary Veno- Occlusive
			Disease
FRET	Floureszenz Resonanz Ener-	RhoA	Rock- Signalweg
	gie Transfer		
GAPDH	Glyceraldehyd-3- Phosphat-	RLT- Puf-	RNeasy Lysis Puffer
	Dehydrogenase	fer	
GTP	Guanosintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
GITC	Guanidium Isocyanat	RNS	Reaktive Nitrogen Spezies

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	ROI	Region of interest
HHV	Humanes Herpes- Virus	ROS	Reactive Oxygen Species
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor- 1	RR	Blutdruckmessung nach Riva
			Rocci
HIV	Humanes immundefizienz-	RT-PCR	Real time Polymerase Chain
	Virus		Reaction
HO-1	Hämoxigenase- 1	RT- Puffer	Reverse- Transkriptase- Puffer
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	RV	Rechter Ventrikel
НОХ	Нурохіе	RyR	Ryanodin Rezeptor
HRP	Horse- Raddish- Peroxidase	SDS-Page	Natriumdodecylsulfat
5-HT	5- Hydroxitryptamin	SEM	Standartfehler des Mittelwertes
lba-1	Ionized calcium binding adap-	sGC	Lösliche Guanylatcyclase
	ter molecule- 1		
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmole-	STAT-1	Signal transducer and activator
	kül		of transcription-1
IL-6	Interleukin-6	TBE	Tris- Borat- EDTA- Puffer
IPAH	ideopathische pulmonalarteri-	TBS-T	Tris buffered salin with tween 20
	elle Hypertonie		
IPC	Ischämische Präkonditionie-	TNF	Tumornekrosefaktor
	rung		
LNO ₂	Nitrolinolsäure	UCP-2	Uncoupling protein- 2
LV	Linker Ventrikel	VASP	Vasodilator- stimulated- phos-
			phoprotein
Ν	Stickstoff	VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
NO	Stickstoffmonoxid	WHO	World Health Organisation
МАРК	Mitogen- activated- protein-	WT	Wildtyp
	kinase		
MCP-1	Monozyten- Chemotaxis- Pro-	XDH	Xanthindehydrogenase
	tein- 1		
MKP-1	MAPK- Phosphatase- 1	ХО	Xanthinoxidase
MLP	N- Formylmethionyl- Lencyl-	XOR	Xanthinoxidoreduktase
	Phenylalanin		

8. Literaturverzeichnis

Baker, Paul R S, Yiming Lin, Francisco J Schopfer, Steven R Woodcock, Alison L Groeger, Carlos Batthyany, Scott Sweeney, et al. 2005. "Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: Multiple Nitrated Unsaturated Fatty Acid Derivatives Exist in Human Blood and Urine and Serve as Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 42464–75. doi:10.1074/jbc.M504212200.

Baker, Paul R.S., Francisco J. Schopfer, Valerie B. O'Donnell, and Bruce A. Freeman. 2009. "Convergence of Nitric Oxide and Lipid Signaling: Anti-Inflammatory Nitro-Fatty Acids." *Free Radical Biology and Medicine* 46 (8): 989–1003. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.021.

Barberà, J A, N Roger, J Roca, I Rovira, T W Higenbottam, and R Rodriguez-Roisin. 1996. "Worsening of Pulmonary Gas Exchange with Nitric Oxide Inhalation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Lancet* 347 (8999): 436–40.

Barer, G. R., and D. Bee. 1982. "Contribution of Polycythaemia to Pulmonary Hypertension in Simulated High Altitude in Rats." *Journal of Physiologie* 336: 27–38.

Barst, R J, L J Rubin, W A Long, M D McGoon, S Rich, D B Badesch, B M Groves, V F Tapson, R C Bourge, and B H Brundage. 1996. "A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group." *The New England Journal of Medicine* 334 (5): 296–302. doi:10.1056/NEJM199602013340504.

Barst, Robyn J, David Langleben, David Badesch, Adaani Frost, E Clinton Lawrence, Shelley Shapiro, Robert Naeije, and Nazzareno Galie. 2006. "Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension with the Selective Endothelin-A Receptor Antagonist Sitaxsentan." *Journal of the American College of Cardiology* 47 (10): 2049–56. doi:10.1016/j.jacc.2006.01.057.

Bédard, Elisabeth, Konstantinos Dimopoulos, and Michael A Gatzoulis. 2009. "Has There Been Any Progress Made on Pregnancy Outcomes among Women with Pulmonary Arterial Hypertension?" *European Heart Journal* 30 (3): 256–65. doi:10.1093/eurheartj/ehn597.

Biochrom. 2012. "DNA, RNA and Oligonucleotide Characterisation, Concentration and Calculation'." Accessed May 26. www.biochrom.co.uk/download/70.

Bishop, J E, D Guerreiro, and G J Laurent. 1990. "Changes in the Composition and Metabolism of Arterial Collagens during the Development of Pulmonary Hypertension in Rabbits." *The American Review of Respiratory Disease* 141 (2): 450–55.

Bogaard, H. J., K. Abe, A. Vonk Noordegraaf, and N. F. Voelkel. 2009. "The Right Ventricle Under Pressure: Cellular and Molecular Mechanisms of Right-Heart Failure in Pulmonary Hypertension." *Chest* 135 (3): 794–804.

doi:10.1378/chest.08-0492.

Bonacci, Gustavo, Francisco J Schopfer, Carlos I Batthyany, Tanja K Rudolph, Volker Rudolph, Nicholas K H Khoo, Eric E Kelley, and Bruce A Freeman. 2011. "Electrophilic Fatty Acids Regulate Matrix Metalloproteinase Activity and Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (18): 16074–81. doi:10.1074/jbc.M111.225029.

Bowers, Rebecca, Carlyne Cool, Robert C Murphy, Rubin M Tuder, Matthew W Hopken, Sonia C Flores, and Norbert F Voelkel. 2004. "Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (6): 764–69. doi:10.1164/rccm.200301-147OC.

Budhiraja, Rohit, Rubin M Tuder, and Paul M Hassoun. 2004. "Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension." *Circulation* 109 (2): 159–65. doi:10.1161/01.CIR.0000102381.57477.50.

Champion, Hunter C. 2011. "Pulmonary Hypertension: A Common Complication of Left Heart Disease" 1 (10). Advances in Pulmonary Hypertension.

Chan, Stephen Y, and Joseph Loscalzo. 2008. "Pathogenic Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44 (1): 14–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006.

Channick, Richard N, Gérald Simonneau, Olivier Sitbon, Ivan M Robbins, Adaani Frost, Victor F Tapson, David B Badesch, et al. 2001. "Effects of the Dual Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan in Patients with Pulmonary Hypertension: A Randomised Placebocontrolled Study." *The Lancet* 358 (9288): 1119–23. doi:10.1016/S0140-6736(01)06250-X.

Chiche, J D, S M Schlutsmeyer, D B Bloch, S M de la Monte, J D Roberts Jr, G Filippov, S P Janssens, A Rosenzweig, and K D Bloch. 1998. "Adenovirus-Mediated Gene Transfer of cGMP-Dependent Protein Kinase Increases the Sensitivity of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells to the Antiproliferative and pro-Apoptotic Effects of Nitric oxide/cGMP." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 34263–71.

Christman, B W, C D McPherson, J H Newman, G A King, G R Bernard, B M Groves, and J E Loyd. 1992. "An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 327 (2): 70–75. doi:10.1056/NEJM199207093270202.

Clanton, Thomas L. 2007. "Hypoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Skeletal Muscle." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 102 (6): 2379–88. doi:10.1152/japplphysiol.01298.2006.

Cole, M. P., T. K. Rudolph, N. K.H. Khoo, U. N. Motanya, F. Golin-Bisello, J. W. Wertz, F. J. Schopfer, et al. 2009. "Nitro-Fatty Acid Inhibition of Neointima Formation After Endoluminal Vessel Injury." *Circulation Research* 105 (10): 965–72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.199075.

Coles, B. 2001. "Nitrolinoleate Inhibits Platelet Activation by Attenuating Calcium Mobilization and Inducing Phosphorylation of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein through Elevation of cAMP." *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 5832–40. doi:10.1074/jbc.M105209200.

Coles B. 2002. "Nitrolinoleate Inhibits Superoxide Generation, Degranulation, and Integrin Expression by Human Neutrophils: Novel Antiinflammatory Properties of Nitric Oxide-Derived Reactive Species in Vascular Cells." *Circulation Research* 91 (5): 375–81. doi:10.1161/01.RES.0000032114.68919.EF. Crosswhite, Patrick, and Zhongjie Sun. 2010. "Nitric Oxide, Oxidative Stress and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of Hypertension* 28 (2): 201–12. doi:10.1097/HJH.0b013e328332bcdb.

Cui, T., F. J. Schopfer, J. Zhang, K. Chen, T. Ichikawa, P. R. S. Baker, C. Batthyany, et al. 2006. "Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-Inflammatory Signaling Mediators." *Journal of Biological Chemistry* 281 (47): 35686–98. doi:10.1074/jbc.M603357200.

D'Alonzo, G E, R J Barst, S M Ayres, E H Bergofsky, B H Brundage, K M Detre, A P Fishman, R M Goldring, B M Groves, and J T Kernis. 1991. "Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. Results from a National Prospective Registry." *Annals of Internal Medicine* 115 (5): 343–49.

D'Orléans-Juste, P., J. Labonté, G. Bkaily, S. Choufani, M. Plante, and J.C. Honoré. 2002. "Function of the endothelinB Receptor in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology." *Pharmacology & Therapeutics* 95 (3): 221–38. doi:10.1016/S0163-7258(02)00235-8.

De Gruyter, Walter. 2011. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Berlin: Boston : De Gruyter.

DeMarco, Vincent G. 2010. "Contribution of Oxidative Stress to Pulmonary Arterial Hypertension." *World Journal of Cardiology* 2 (10): 316. doi:10.4330/wjc.v2.i10.316.

Demarco, Vincent G, Adam T Whaley-Connell, James R Sowers, Javad Habibi, and Kevin C Dellsperger. 2010. "Contribution of Oxidative Stress to Pulmonary Arterial Hypertension." *World Journal of Cardiology* 2 (10): 316–24. doi:10.4330/wjc.v2.i10.316.

Durante, W, M H Kroll, N Christodoulides, K J Peyton, and A I Schafer. 1997. "Nitric Oxide Induces Heme Oxygenase-1 Gene Expression and Carbon Monoxide Production in Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation Research* 80 (4): 557–64.

Fagan, Karen A. 2001. "Selected Contribution: Pulmonary Hypertension in Mice Following Intermittent Hypoxia." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 90: 2502–7.

Fisher, A J, N W Schrader, and B Klitzman. 1992. "Effects of Chronic Hypoxia on Capillary Flow and Hematocrit in Rat Skeletal Muscle.

" The American Journal of Physiology 262 (6 Pt 2): H1877–1883.

Fourie, P R, A R Coetzee, and C T Bolliger. 1992. "Pulmonary Artery Compliance: Its Role in Right Ventricular-Arterial Coupling." *Cardiovascular Research* 26 (9): 839–44.

Frost, A. E., H. W. Farber, R. J. Barst, D. P. Miller, C. G. Elliott, and M. D. McGoon. 2012. "Demographics and Outcomes of Patients Diagnosed With Pulmonary Hypertension With Pulmonary Capillary Wedge Pressures of 16-18 mmHg: Insights From REVEAL." *Chest.* doi:10.1378/chest.11-1387. http://www.chestjournal.org/cgi/doi/10.1378/chest.11-1387.

Fuster, V., P. M. Steele, W. D. Edwards, B. J. Gersh, M. D. McGoon, and R. L. Frye. 1984. "Primary Pulmonary Hypertension: Natural History and the Importance of Thrombosis." *Circulation* 70 (4): 580–87. doi:10.1161/01.CIR.70.4.580.

Gaine, Sean P, and Lewis J Rubin. 1998. "Primary Pulmonary Hypertension." *The Lancet* 352 (9129): 719–25. doi:10.1016/S0140-6736(98)02111-4.

Galie, N., N. Galie, M. M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J.-L. Vachiery, J. A. Barbera, et al. 2009. "Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), Endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)." *European Heart Journal* 30 (20): 2493–2537. doi:10.1093/eurheartj/ehp297.

Galie, N., A. Manes, L. Negro, M. Palazzini, M. L. Bacchi-Reggiani, and A. Branzi. 2008. "A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials in Pulmonary Arterial Hypertension." *European Heart Journal* 30 (4): 394–403. doi:10.1093/eurheartj/ehp022.

Galiè, Nazzareno, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiéry, Carmine Dario Vizza, Meinhard Kneussl, Alessandra Manes, Olivier Sitbon, et al. 2002. "Effects of Beraprost Sodium, an Oral Prostacyclin Analogue, in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Journal of the American College of Cardiology* 39 (9): 1496–1502.

Galiè, Nazzareno, Horst Olschewski, Ronald J Oudiz, Fernando Torres, Adaani Frost, Hossein A Ghofrani, David B Badesch, et al. 2008. "Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy (ARIES) Study 1 and 2." *Circulation* 117 (23): 3010–19. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510.

Ghofrani, Hossein A, Robert Voswinckel, Frank Reichenberger, Horst Olschewski, Peter Haredza, Burcu Karadaş, Ralph T Schermuly, Norbert Weissmann, Werner Seeger, and Friedrich Grimminger. 2004. "Differences in Hemodynamic and Oxygenation Responses to Three Different Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Randomized Prospective Study." *Journal of the American College of Cardiology* 44 (7): 1488–96. doi:10.1016/j.jacc.2004.06.060.

Giaid, A, and D Saleh. 1995. "Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 333 (4): 214–21. doi:10.1056/NEJM199507273330403.

Giaid, A, M Yanagisawa, D Langleben, R P Michel, R Levy, H Shennib, S Kimura, T Masaki, W P Duguid, and D J Stewart. 1993. "Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 328 (24): 1732–39. doi:10.1056/NEJM199306173282402.

González-Perilli, Lucía, María Noel Álvarez, Carolina Prolo, Rafael Radi, Homero Rubbo, and Andrés Trostchansky. 2013. "Nitroarachidonic Acid Prevents NADPH Oxidase Assembly and Superoxide Radical Production in Activated Macrophages." *Free Radical Biology & Medicine* 58: 126–33. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.020.

Hall, Christian. 2005. "NT-ProBNP: The Mechanism behind the Marker." *Journal of Cardiac Failure* 11 (5 Suppl): S81–83.

Hervé, Philipe, Jean-Marie Launay, Marie-Laurène Scrobohaci, François Brenot, Gérald Simonneau, Patrick Petitpretz, Patrice Poubeau, Jacques Cerrina, Pierre Duroux, and Ludovic Drouet. 1995. "Increased Plasma Serotonin in Primary Pulmonary Hypertension." *The American Journal of Medicine* 99 (3): 249– 54. doi:10.1016/S0002-9343(99)80156-9.

Hirata, Y, T Emori, S Eguchi, K Kanno, T Imai, K Ohta, and F Marumo. 1993. "Endothelin Receptor Subtype B Mediates Synthesis of Nitric Oxide by Cultured Bovine Endothelial Cells." *Journal of Clinical Investigation* 91 (4): 1367–73. doi:10.1172/JCI116338.

Hoeper, M M, I Markevych, E Spiekerkoetter, T Welte, and J Niedermeyer. 2005. "Goal-Oriented Treatment and Combination Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension." *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 26 (5): 858–63. doi:10.1183/09031936.05.00075305.

Humbert, Marc, Nicholas W Morrell, Stephen L Archer, Kurt R Stenmark, Margaret R MacLean, Irene M Lang, Brian W Christman, et al. 2004. "Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S): 13S–24S. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029.

Ichikawa, T., J. Zhang, K. Chen, Y. Liu, F. J. Schopfer, P. R. S. Baker, B. A. Freeman, Y. E. Chen, and T. Cui. 2008. "Nitroalkenes Suppress Lipopolysaccharide-Induced Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling in Macrophages: A Critical Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1." *Endocrinology* 149 (8): 4086–94. doi:10.1210/en.2007-1639. Ignarro, L J, H Lippton, J C Edwards, W H Baricos, A L Hyman, P J Kadowitz, and C A Gruetter. 1981. "Mechanism of Vascular Smooth Muscle Relaxation by Organic Nitrates, Nitrites, Nitroprusside and Nitric Oxide: Evidence for the Involvement of S-Nitrosothiols as Active Intermediates." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 218 (3): 739–49.

Jeffery, T K, and N W Morrell. 2002. "Molecular and Cellular Basis of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension." *Progress in Cardiovascular Diseases* 45 (3): 173–202. doi:10.1053/pcad.2002.130041.

Kelley, E. E., C. I. Batthyany, N. J. Hundley, S. R. Woodcock, G. Bonacci, J. M. Del Rio, F. J. Schopfer, J. R. Lancaster, B. A. Freeman, and M. M. Tarpey. 2008. "Nitro-Oleic Acid, a Novel and Irreversible Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase." *Journal of Biological Chemistry* 283 (52): 36176–84. doi:10.1074/jbc.M802402200.

Khoo, Nicholas K.H., Volker Rudolph, Marsha P. Cole, Franca Golin-Bisello, Francisco J. Schopfer, Steven R. Woodcock, Carlos Batthyany, and Bruce A. Freeman. 2010. "Activation of Vascular Endothelial Nitric Oxide Synthase and Heme Oxygenase-1 Expression by Electrophilic Nitro-Fatty Acids." *Free Radical Biology and Medicine* 48 (2): 230–39. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.046.

Khoo, Nicholas KH, and Bruce A Freeman. 2010. "Electrophilic Nitro-Fatty Acids: Anti-Inflammatory Mediators in the Vascular Compartment." *Current Opinion in Pharmacology* 10 (2): 179–84. doi:10.1016/j.coph.2009.11.003.

Kramer, O. H. 2006. "Acetylation of Stat1 Modulates NF- B Activity." *Genes & Development* 20 (4): 473–85. doi:10.1101/gad.364306.

Launay, J-M, P Hervé, K Peoc'h, C Tournois, J Callebert, C G Nebigil, N Etienne, et al. 2002. "Function of the Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2B Receptor in Pulmonary Hypertension." *Nature Medicine* 8 (10): 1129–35. doi:10.1038/nm764.

Leuchte, Hanno H, Michael Holzapfel, Rainer A Baumgartner, Claus Neurohr, Michael Vogeser, and Jürgen Behr. 2005. "Characterization of Brain Natriuretic Peptide in Long-Term Follow-up of Pulmonary Arterial Hypertension." *Chest* 128 (4): 2368–74. doi:10.1378/chest.128.4.2368.

Levere, R D, P Martasek, B Escalante, M L Schwartzman, and N G Abraham. 1990. "Effect of Heme Arginate Administration on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats." *The Journal of Clinical Investigation* 86 (1): 213–19. doi:10.1172/JCI114686.

Lim, D. G. 2002. "Nitrolinoleate, a Nitric Oxide-Derived Mediator of Cell Function: Synthesis, Characterization, and Vasomotor Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (25): 15941–46. doi:10.1073/pnas.232409599. Liu, Ai-Jun, Feng Ling, Dong Wang, Qiang Wang, Xiao-Dong Lü, and Ying-Long Liu. 2011. "Fasudil Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Induced Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation by up-Regulation of p27kip¹ via the ERK Signal Pathway." *Chinese Medical Journal* 124 (19): 3098–3104.

Melichar, V. O. 2004. "Reduced cGMP Signaling Associated with Neointimal Proliferation and Vascular Dysfunction in Late-Stage Atherosclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.0405509101. http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0405509101.

Michelakis, Evangelos D. 2003. "The Role of the NO Axis and Its Therapeutic Implications in Pulmonary Arterial Hypertension." *Heart Failure Reviews* 8 (1): 5–21.

Miyamoto, S, N Nagaya, T Satoh, S Kyotani, F Sakamaki, M Fujita, N Nakanishi, and K Miyatake. 2000. "Clinical Correlates and Prognostic Significance of Six-Minute Walk Test in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. Comparison with Cardiopulmonary Exercise Testing." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (2 Pt 1): 487–92. Nadrous, H. F. 2005. "Pulmonary Hypertension in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Chest* 128 (4): 2393–99. doi:10.1378/chest.128.4.2393.

Nadtochiy, S. M., P. R.S. Baker, B. A. Freeman, and P. S. Brookes. 2008. "Mitochondrial Nitroalkene Formation and Mild Uncoupling in Ischaemic Preconditioning: Implications for Cardioprotection." *Cardiovascular Research* 82 (2): 333–40. doi:10.1093/cvr/cvn323.

Nagaya, N., T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Kakishita, et al. 2000. "Plasma Brain Natriuretic Peptide as a Prognostic Indicator in Patients With Primary Pulmonary Hypertension." *Circulation* 102 (8): 865–70. doi:10.1161/01.CIR.102.8.865.

Nana-Sinkam, Patrick, Ryan J Oyer, R S Stearman, Sylk Sotto-Santiago, Mark D Moore, Todd M Bull, M C Grady, et al. 2005. "Prostacyclin Synthase Promoter Regulation and Familial Pulmonary Arterial Hypertension." *Chest* 128 (6 Suppl): 612S. doi:10.1378/chest.128.6_suppl.612S.

Newman, J H, L Wheeler, K B Lane, E Loyd, R Gaddipati, J A Phillips 3rd, and J E Loyd. 2001. "Mutation in the Gene for Bone Morphogenetic Protein Receptor II as a Cause of Primary Pulmonary Hypertension in a Large Kindred." *The New England Journal of Medicine* 345 (5): 319–24. doi:10.1056/NEJM200108023450502.

Newman, J. H., and I. M. Robbins. 2006. "Exercise Training in Pulmonary Hypertension: Implications for the Evaluation of Drug Trials." *Circulation* 114 (14): 1448–49. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649079.

Olschewski, Horst, Gerald Simonneau, Nazzareno Galiè, Timothy Higenbottam, Robert Naeije, Lewis J Rubin, Sylvia Nikkho, et al. 2002. "Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 347 (5): 322–29. doi:10.1056/NEJMoa020204.

Orens, Jonathan B, Marc Estenne, Selim Arcasoy, John V Conte, Paul Corris, Jim J Egan, Thomas Egan, et al. 2006. "International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update--a Consensus Report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation." *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 25 (7): 745–55. doi:10.1016/j.healun.2006.03.011.

Pak, O, Janssen, W, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, and Weissmann, N. 2010. "Animal Models of Pulmonary Hypertension: Role in Translational Research." *Drug Discovery Today* (7).

Quiagen. 2012. "Handbook." Accessed May 26.

http://www.qiagen.com/faq/faqview.aspx.

Ra, Hyun-Jeong, and William C Parks. 2007. "Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 26 (8): 587–96. doi:10.1016/j.matbio.2007.07.001.

Radi, Rafael. 2004. "Nitric Oxide, Oxidants, and Protein Tyrosine Nitration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (12): 4003–8. doi:10.1073/pnas.0307446101.

Rajagopalan, S, X P Meng, S Ramasamy, D G Harrison, and Z S Galis. 1996. "Reactive Oxygen Species Produced by Macrophage-Derived Foam Cells Regulate the Activity of Vascular Matrix Metalloproteinases in Vitro. Implications for Atherosclerotic Plaque Stability." *The Journal of Clinical Investigation* 98 (11): 2572–79. doi:10.1172/JCI119076.

Rich, S, E Kaufmann, and P S Levy. 1992. "The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 327 (2): 76–81. doi:10.1056/NEJM199207093270203.

Rich, S, M Seidlitz, E Dodin, D Osimani, D Judd, D Genthner, V McLaughlin, and G Francis. 1998. "The Short-Term Effects of Digoxin in Patients with Right Ventricular Dysfunction from Pulmonary Hypertension." *Chest* 114 (3): 787–92.

Rubin, L J, J Mendoza, M Hood, M McGoon, R Barst, W B Williams, J H Diehl, J Crow, and W Long. 1990. "Treatment of Primary Pulmonary Hypertension with Continuous Intravenous Prostacyclin (epoprostenol). Results of a Randomized Trial." *Annals of Internal Medicine* 112 (7): 485–91.

Rubin, Lewis J, David B Badesch, Robyn J Barst, Nazzareno Galie, Carol M Black, Anne Keogh, Tomas Pulido, et al. 2002. "Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 346 (12): 896–903. doi:10.1056/NEJMoa012212.

Rudarakanchana, N. 2001. "New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Primary Pulmonary Hypertension." *Thorax* 56 (11): 888–90. doi:10.1136/thorax.56.11.888.

Rudolph, T. K., V. Rudolph, M. M. Edreira, M. P. Cole, G. Bonacci, F. J. Schopfer, S. R. Woodcock, et al. 2010. "Nitro-Fatty Acids Reduce Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (5): 938–45. doi:10.1161/ATVBAHA.109.201582.

Rudolph, V., T. K. Rudolph, F. J. Schopfer, G. Bonacci, S. R. Woodcock, M. P. Cole, P. R.S. Baker, R. Ramani, and B. A. Freeman. 2009. "Endogenous Generation and Protective Effects of Nitro-Fatty Acids in a Murine Model of Focal Cardiac Ischaemia and Reperfusion." *Cardiovascular Research* 85 (1): 155–66. doi:10.1093/cvr/cvp275.

Schermuly, R T, J-P Stasch, S S Pullamsetti, R Middendorff, D Müller, K-D Schlüter, A Dingendorf, et al. 2008. "Expression and Function of Soluble Guanylate Cyclase in Pulmonary Arterial Hypertension." *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 32 (4): 881–91. doi:10.1183/09031936.00114407.

Schermuly, Ralph T., Hossein A. Ghofrani, Martin R. Wilkins, and Friedrich Grimminger. 2011. "Mechanisms of Disease: Pulmonary Arterial Hypertension." *Nature Reviews Cardiology* 8 (8): 443–55. doi:10.1038/nrcardio.2011.87.

Schopfer, F. J., A. L. Groeger, C. S. Chen, N. K. H. Khoo, S. R. Woodcock, F. Golin-Bisello, U. N. Motanya, et al. 2010. "Covalent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Adduction by Nitro-Fatty Acids: SELECTIVE LIGAND AC-TIVITY AND ANTI-DIABETIC SIGNALING ACTIONS." *Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 12321–33. doi:10.1074/jbc.M109.091512.

Seo, B, B S Oemar, R Siebenmann, L von Segesser, and T F Lüscher. 1994. "Both ETA and ETB Receptors Mediate Contraction to Endothelin-1 in Human Blood Vessels." *Circulation* 89 (3): 1203–8.

Sim, Ji-Yeon. 2010. "Nitric Oxide and Pulmonary Hypertension." *Korean Journal of Anesthesiology* 58 (1): 4. doi:10.4097/kjae.2010.58.1.4.

Simonneau, Gerald, Robyn J Barst, Nazzareno Galie, Robert Naeije, Stuart Rich, Robert C Bourge, Anne Keogh, et al. 2002. "Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil, a Prostacyclin Analogue, in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (6): 800–804.

Simonneau, Gérald, Ivan M Robbins, Maurice Beghetti, Richard N Channick,

Marion Delcroix, Christopher P Denton, C Gregory Elliott, et al. 2009. "Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension." *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1 Suppl): S43–54. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.012.

Sitbon, Olivier, Marc Humbert, Hilario Nunes, Florence Parent, Gilles Garcia, Philippe Hervé, Maurizio Rainisio, and Gérald Simonneau. 2002. "Long-Term Intravenous Epoprostenol Infusion in Primary Pulmonary Hypertension: Prognostic Factors and Survival." *Journal of the American College of Cardiology* 40 (4): 780–88.

Sorescu, D. 2002. "Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis." *Circulation* 105 (12): 1429–35. doi:10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66.

Stenmark, K R, and R P Mecham. 1997. "Cellular and Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling." *Annual Review of Physiology* 59: 89–144. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.89.

Stenmark, Kurt R, Evgenia Gerasimovskaya, Raphael A Nemenoff, and Mita Das. 2002. "Hypoxic Activation of Adventitial Fibroblasts: Role in Vascular Remodeling." *Chest* 122 (6 Suppl): 326S–334S.

Stenmark, Kurt R, Barbara Meyrick, Nazzareno Galie, Wolter J Mooi, and Ivan F McMurtry. 2009. "Animal Models of Pulmonary Arterial Hypertension: The Hope for Etiological Discovery and Pharmacological Cure." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6): L1013–1032. doi:10.1152/ajplung.00217.2009.

Steudel, W, M Scherrer-Crosbie, K D Bloch, J Weimann, P L Huang, R C Jones, M H Picard, and W M Zapol. 1998. "Sustained Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy after Chronic Hypoxia in Mice with Congenital Deficiency of Nitric Oxide Synthase 3." *Journal of Clinical Investigation* 101 (11): 2468–77. doi:10.1172/JCI2356.

Sweeney, M. et. al. 2000. "Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Role of Voltage- Gated Potassium Channels." *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* (1 (1)): 40– 48.

Tabima, Diana M., Sheila Frizzell, and Mark T. Gladwin. 2012. "Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pulmonary Hypertension." *Free Radical Biology and Medicine* 52 (9): 1970–86. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.041.

Tapson, Victor F, and Marc Humbert. 2006. "Incidence and Prevalence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: From Acute to Chronic Pulmonary Embolism." *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (7): 564–67. doi:10.1513/pats.200605-112LR.

Trulock, Elbert P, Leah B Edwards, David O Taylor, Mark M Boucek, Berkeley M Keck, and Marshall I Hertz. 2006. "Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-Third Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report--2006." *The Journal of Heart and Lung Transplan-*

tation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation 25 (8): 880–92. doi:10.1016/j.healun.2006.06.001.

Umar, Soban, Marleen Hessel, Paul Steendijk, Wilhelmina Bax, Cindy Schutte, Martin Schalij, Ernst van der Wall, Douwe Atsma, and Arnoud van der Laarse. 2007. "Activation of Signaling Molecules and Matrix Metalloproteinases in Right Ventricular Myocardium of Rats with Pulmonary Hypertension." *Pathology - Research and Practice* 203 (12): 863–72. doi:10.1016/j.prp.2007.08.006.

Villacorta, Luis, Jifeng Zhang, Minerva T Garcia-Barrio, Xi-lin Chen, Bruce A Freeman, Yuqing E Chen, and Taixing Cui. 2007. "Nitro-Linoleic Acid Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (1): H770–776. doi:10.1152/ajpheart.00261.2007.

Wang, Guang L., and Gregg L. Semenza. 1993. "General Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Transcriptional Response to Hypoxia." *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* (90): 4304– 4308.

Weber, M. 2005. "Role of B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and NT-proBNP in Clinical Routine." *Heart* 92 (6): 843–49. doi:10.1136/hrt.2005.071233.

Weitzenblum, E, A Sautegeau, M Ehrhart, M Mammosser, and A Pelletier. 1985. "Long-Term Oxygen Therapy Can Reverse the Progression of Pulmonary Hypertension in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *The American Review of Respiratory Disease* 131 (4): 493–98.

Whitman, E. M., S. Pisarcik, T. Luke, M. Fallon, J. Wang, J. T. Sylvester, G. L. Semenza, and L. A. Shimoda. 2007. "Endothelin-1 Mediates Hypoxia-Induced Inhibition of Voltage-Gated K+ Channel Expression in Pulmonary Arterial My-ocytes." *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (2): L309–L318. doi:10.1152/ajplung.00091.2007.

Wright, M. M. 2006. "Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: Nitrolinoleic Acid Potently Activates Endothelial Heme Oxygenase 1 Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (11): 4299–4304. doi:10.1073/pnas.0506541103.

Yuan, X J, J Wang, M Juhaszova, S P Gaine, and L J Rubin. 1998. "Attenuated K+ Channel Gene Transcription in Primary Pulmonary Hypertension." *Lancet* 351 (9104): 726–27. doi:10.1016/S0140-6736(05)78495-6.

Zakhary, R, S P Gaine, J L Dinerman, M Ruat, N A Flavahan, and S H Snyder. 1996. "Heme Oxygenase 2: Endothelial and Neuronal Localization and Role in Endothelium-Dependent Relaxation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2): 795–98.

9. Danksagung

Mein Dank gilt dem ehemaligen Leiter des Instituts der experimentellen Kardiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf Herrn Prof. Dr. med Stephan Baldus, der mir an seinem Institut die Durchführung meiner experimentellen Arbeit ermöglichte und mich stets motivierte. Ebenfalls danke ich meiner Doktormutter Frau PD. Dr. med. Tanja Rudolph für die Erarbeitung der spannnenden Fragestellung, die kreativen Beiträge und die konstruktiven Verbesserungsvorschlägen auf dem Weg zur Promotion sowie die hervorragende Betreuung. Daran anschließend möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Matti Adam bedanken, der mich tatkräftig bei der statistischen Auswertung meiner Dissertation unterstützte. Besonders danke ich der ehemaligen Laborleitung der experimentellen Kardiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf Frau Dr. rer. nat. Anna Klinke, die mich stets bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Dissertation unterstützt hat, ebenso wie auch allen weiteren Mitarbeiter des Instituts für die wertvollen Ratschläge und eine lehrreiche Zeit im Labor.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: