

Aus dem Zentrum für Kardiologie, Kardiologie 1
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Behandlung von pulmonaler arterieller Hypertonie mit dem organischen Nitrat
Pentaerythryltetranitrat

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Elisabeth Ullmann
aus Jena

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungen	VII
Tabellen	XI
1 Einleitung und Ziel der Dissertation	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Ziel der Dissertation	2
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Pulmonale Hypertonie	4
2.1.1 <i>Definition und Einteilung</i>	4
2.1.2 <i>Pathogenese</i>	5
2.1.3 <i>Symptome</i>	6
2.1.4 <i>Behandlung</i>	8
2.2 Tiermodell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie	9
2.3 Vaskuläre Dysfunktion	11
2.3.1 <i>Oxidativer Stress</i>	11
2.3.2 <i>NO-Signalweg</i>	15
2.3.3 <i>Antioxidative Mechanismen</i>	19
2.3.4 <i>Endothelin-Signalweg</i>	22
2.3.5 <i>Inflammation</i>	25
2.4 Organische Nitrate	27
2.4.1 <i>PETN</i>	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 <i>Chemikalien</i>	32
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	36
3.1.3 <i>Antikörper</i>	35
3.1.4 <i>Geräte</i>	36
3.1.5 <i>Auswertungsprogramme</i>	38
3.1.6 <i>Puffer und Lösungen</i>	39
3.2 Methoden	44

3.2.1	<i>Behandlung der Tiere</i>	44
3.2.2	<i>Echokardiografie</i>	45
3.2.3	<i>Tötung und Organentnahme</i>	45
3.2.4	<i>Organgewichtsbestimmung</i>	46
3.2.5	<i>Präparation der Aorten</i>	47
3.2.6	<i>Isometrische Gefäßtonusstudien (Organbad)</i>	47
3.2.7	<i>Chemilumineszenztests zur Messung freier Radikale</i>	49
3.2.8	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	51
3.2.9	<i>DPPH-Assay</i>	51
3.2.10	<i>Xanthinoxidase-Assay</i>	52
3.2.11	<i>DHE-Färbung</i>	53
3.2.12	<i>Western Blot</i>	54
3.2.13	<i>Dot Blot</i>	58
3.2.14	<i>Histologische Untersuchung</i>	58
3.2.15	<i>Zellkultur</i>	59
3.2.16	<i>qRT-PCR</i>	60
3.2.17	<i>Statistische Analysen</i>	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Charakterisierung des Tiermodells	63
4.2	Untersuchungen am Tiermodell	66
4.2.1	<i>Pulmonale Hypertonie</i>	67
4.2.2	<i>Fibrosierung und Organhypertrophie</i>	67
4.2.3	<i>Relaxationsfähigkeit</i>	68
4.2.4	<i>Oxidativer Stress</i>	69
4.2.5	<i>Hämoxygenase-1-Expression</i>	72
4.2.6	<i>Inflammation</i>	73
4.2.7	<i>Endothelin-1-Signalweg</i>	75
4.3	In-vitro Versuche	75
4.3.1	<i>Versuche in Zellkultur</i>	75
4.3.2	<i>Versuche in humanen Blutproben</i>	75
5	Diskussion	77
5.1	Tiermodell der MCT-induzierten pulmonalen arteriellen Hypertonie	80
5.2	Nitrate in der Therapie der PAH	83
5.3	Oxidativer Stress	84
5.3.1	<i>NADPH-Oxidase-Aktivität</i>	85
5.3.2	<i>Xanthinoxidase-Aktivität</i>	87
5.3.3	<i>3-Nitrotyrosinbildung im Lungengewebe</i>	88

5.3.4	<i>Relaxationsfähigkeit der Gefäße</i>	88
5.4	Induktion der Hämoxxygenase-1	90
5.5	Endothelin-1-Signalweg	90
5.6	Inflammation	92
6	Zusammenfassung	94
7	Referenzen	96
8	Danksagung.....	112
9	Lebenslauf	113
10	Publikationen und Stipendien	114

Abkürzungsverzeichnis

3-NT	3-Nitrotyrosin
5-HT	Serotonin
ACh	Acetylcholin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AP-1	Activator protein-1
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calciumsensitiver Rezeptor (calcium-sensing receptor)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
DHE	Dihydroethidium
ECE	Endothelin-konvertierendes Enzym (endothelin converting enzyme)
ecSOD	Extrazelluläre Superoxid Dismutase
eNOS	Endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase
ET-1	Endothelin-1
ET _A	Endothelin-1-Rezeptor Typ A
ET _B	Endothelin-1-Rezeptor Typ B
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GTN	Nitroglycerin
h/b-ratio	Herz/Körpergewicht-Verhältnis
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HO-1	Hämoxygenase-1
i.v.	intravenös
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (Intercellular adhesion molecule-1)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor)
IL-1	Interleukin 1

IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IPAH	Idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbid-5-mononitrat
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
MCT	Monocrotalin
MCT30	30 mg/kg KG Monocrotalin
MCT40	40 mg/kg KG Monocrotalin
MCT60	60 mg/kg KG Monocrotalin
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	Neutrophil extracellular trap ("Neutrophile extrazelluläre Falle")
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric oxide)
NOS	NO-Synthase
Nox	NADPH-Oxidase
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
O ₂ ⁻	Superoxid
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p.o.	Per os
PAAT	Pulmonalarterielle Beschleunigung (pulmonary arterial acceleration time)
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarteriendruck (pulmonary arterial pressure)
PDGF	Thrombozytärer Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PETN	Pentaerythryltetranitrat
PETriN	Pentaerythryltrinitrat
PGI ₂	Prostazyklin
PHE	Phenylephrin
PKG	Proteinkinase G
PVR	Pulmonaler vaskulärer Widerstand (pulmonary vascular resistance)
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species)
RONs	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)

RVSP	Systolischer rechtsventrikulärer Druck (right ventricular systolic pressure)
s.c.	Subkutan
sGC	Lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase)
SMC	Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
SOD	Superoxiddismutase
SR	sarcoplasmatisches Retikulum
SSRI	Selektiver Serotonin Wiederaufnahme Inhibitor (selective serotonin reuptake inhibitor)
STAT3	Signalumwandler und Aktivator der Transkription 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor beta)
VCAM-1	Vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül 1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
XO	Xanthinoxidase

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen ROS und pulmonalen vaskulären Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Ca²⁺: Calcium; ROS: reactive oxygen species; SR: sarcoplasmatisches Retikulum; 5-HT: Serotonin; ET-1: Endothelin-1; IL-6: Interleukin 6; IL-1: Interleukin 1; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; HIF-1: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1; C/EBPβ: CCAAT/enhancer-binding protein beta; PDGF-B: platelet-derived growth factor subunit B; VEGF: vascular endothelial growth factor; IGF-1: insulin-like growth factor; ONOO⁻: peroxynitrite; ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin; eNOS: endotheliale NO-Synthase; iNOS: induzierbare NO-Synthase; BH4: Tetrahydrobiopterin; VDCCs: voltage-dependent calcium channels; O₂⁻: Superoxidanion; H₂O₂: Hydrogenperoxid; CaMK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Abbildung aus (31).....6
- Abbildung 2: Übersicht über verschiedene vasodilatatorische und vasokonstriktorische Signalwege und jeweilige Behandlungsansätze der PAH. Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt über Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) eine Vasodilatation und Antiproliferation der glatten Muskelzellen. Inhalatives NO, Nitrate, sGC-Stimulatoren (Riociguat), Phosphodiesterase-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) und Tetrahydrobiopterin (BH4) sind hier mögliche Therapieansätze. Prostazyklin führt über Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zu einer Vasodilatation und Antiproliferation der glatten Muskelzellen. Prostazyklinderivate (Epoprostenol, Treprostinil, Iloprost, Beraprost) und Rezeptoragonisten (Selexipag) sind hier mögliche Therapieansätze. Endothelin-1 (ET-1) stimuliert die Vasokonstriktion und Proliferation glatter Muskelzellen über Endothelinrezeptoren (ET_A und ET_B). Endothelinrezeptorantagonisten (Ambristentan, Bosentan und Macitentan) sind hier mögliche Therapieansätze. AC: Adenylzyklase. BH₂: Dihydrobiopterin. COX: Cyclooxygenase. ECEs: Endothelin konvertierende Enzyme. eNOS: endotheliale NO-Synthase. Abbildung adaptiert aus (33).....9
- Abbildung 3: schematische Darstellung der Monocrotalin-Wirkung. GSH: reduziertes Glutathion; MPO: Myeloperoxidase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TGF-β: transforming growth factor beta; TNFα: Tumornekrosefaktor alpha. Abbildung aus (53) 10
- Abbildung 4: phagozytische NADPH-Oxidase in inaktiver und aktiver Form. Die NADPH-Oxidase überträgt ein Elektron von NADPH auf molekularen Sauerstoff, dabei entstehen zwei Superoxidanionradikale und NADP⁺+H⁺. Die katalytische Untereinheit gp91phox bildet mit p22phox zusammen die membranständige Untereinheit des Enzyms, Flavocytochrom b558 genannt. Die drei Phoxproteine p47, p67 und p40 („phox“ steht für phagocytic oxidase und die Zahl gibt das Molekulargewicht an) stellen die zytosolischen, regulatorischen Untereinheiten im inaktiven Zustand dar, die bei Aktivierung an das Flavocytochrom b558 binden. Daneben ist das G-Protein Rac im inaktivem Zustand an GDP gebunden und durch RhoGDI stabilisiert und bindet ebenfalls bei Aktivierung an Flavocytochrom b558. Abbildung aus (70)..... 12
- Abbildung 5: Funktionsweise der Xanthinoxidoreduktase (XOR): die Purinbasen Adenosin und Guanosin werden über Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure abgebaut. Dabei entsteht entweder über die Dehydrogenaseform (XDH) NADH aus NAD⁺ oder über die Oxidaseform (XO) Superoxid aus molekularem Sauerstoff, welches weiter zu Wasserstoffperoxid zerfällt bzw. durch SODs generiert wird. Abbildung übersetzt und nachgebildet aus (72)..... 14
- Abbildung 6: Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation. NO wird entweder aus Nitraten bioaktiviert oder aus Endothelzellen freigesetzt, diffundiert nach intrazellulär und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC), was zu einer Zunahme des cGMP führt. cGMP aktiviert die Proteinkinase 1 (cGKI), was über eine Inhibition der Inositoltriphosphat-(IP₃-)regulierten Kalziumkanäle, Aktivierung von Kaliumkanälen mit

daraus folgender Hemmung von Kalziumkanälen und Aktivierung der Kalziumpumpe in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) zu einer Abnahme der intrazellulären Kalziumlevel führt. Niedrige Kalziumlevel reduzieren die Kontraktilität der Aktin-/Myosinfilamente über eine Inhibierung der Myosin-Leichtkettenphosphorylierung (MLCP) und führen damit zur Relaxation. Abbildung aus (104), modifiziert nach (105) 16

- Abbildung 7: Funktionsweisen der NO-Synthase im physiologischen (III) und im durch oxidative Schäden entkoppelten (I und II) Zustand. (I): Funktion als Monomer: Produktion von Superoxid durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff. (II): Funktion als Homodimer in Abwesenheit von L-Arginin und BH₄: Produktion von Superoxid durch direkte Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff. (III): in Anwesenheit von L-Arginin und Tetrahydrobiopterin (BH₄) werden die Elektronen von NADPH über FAD und FMN sowie Calmodulin (CaM) auf die prosthetische Hämgruppe (Haeme Fe) übertragen und in einer Oxidationsreaktion L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch zu NO und L-Citrullin oxidiert. Wird BH₄ durch ROS oxidiert, entsteht das BH₃-Radikal und die eNOS entkoppelt. Als kompetitive Hemmstoffe fungieren ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) und Arginase, die die NO-Produktion verlangsamen. Abbildung aus (110)..... 17
- Abbildung 8: Biochemie freier Radikale: NO reagiert mit Superoxid zu dem hochreaktiven Peroxynitrit. Die Superoxiddismutase entgiftet Superoxid, indem es daraus Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff bildet. Abbildung aus (121).....20
- Abbildung 9: Enzymatische Reaktion von Hämoxxygenasen (HO). Häm wird aus Hämproteinen freigesetzt und wird durch die HO unter Energieverbrauch (Sauerstoff und NADPH) zu Eisen, Kohlenmonoxid und Biliverdin abgebaut. Eisen induziert die Bildung von Ferritin. Biliverdin wird weiter zu Bilirubin reduziert. Abbildung aus (134).....21
- Abbildung 10: Oxidativer Stress aus Erythrozyten und Adaptationswege über HO-1: 1) Verlust von Hämoglobin aus Erythrozyten; 2a/b) Oxidation von Hämoglobin; 3) Abbau von Häm aus Methämoglobin; 4) Aufnahme von Häm in Endothelzellen und Sensitivierung für oxidativen Stress; 5) Hämaufnahme in LDL; 6) oxidative Modifizierung von LDL; 7a/b) oxidativer Stress durch oxLDL und Oxidantien aus Leukozyten; 8) Adaptation an oxidativen Stress und erhöhte freie Eisenspiegel aus Häm-Abbau via Hochregulation der HO-1 und Ferritin. Ferritin-Hochregulation führt mittelfristig zu verringerten freien Eisenspiegeln und damit vermindertem oxidativen Stress durch die Fenton Reaktion. Abbildung aus (133).....22
- Abbildung 11: Synthese und Wirkung von ET-1. ET-1 wird kontinuierlich aus Vesikeln der Endothelzellen freigesetzt und ist damit an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt. Außerdem wird ET-1 durch externe Stimuli aus Weibel-Palade-Körperchen freigesetzt. Das abluminal freigesetzte ET-1 wirkt in humanen Gefäßen hauptsächlich an den ET_A-Rezeptoren der angrenzenden glatten Muskelzellen, wobei einige wenige ET_B-Rezeptoren ebenfalls an der glatten Muskelzelle sitzen und zur Vasokonstriktion führen. Ein Teil des ET-1 interagiert autokrin mit endothelialen ET_B-Rezeptoren und führt über eine Freisetzung von NO zu einer Limitierung der Vasokonstriktion. Abbildung aus (144).....24
- Abbildung 12: Adhäsion und Immigration der Leukozyten während einer Inflammationsreaktion. Im ersten Schritt werden durch Stimulation mittels proinflammatorischer Zytokine E-Selektine auf Endothelzellen exprimiert, an denen Leukozyten mithilfe von Liganden lose anhaften können und dann in Richtung des Blutflusses am Endothel entlang „rollen“. Diese rollenden Leukozyten werden dann im zweiten Schritt mittels lokal freigesetzter Chemokine aus Makrophagen und Endothelzellen aktiviert und exprimieren daraufhin Integrine auf ihrer Zelloberfläche, die es ihnen ermöglichen, durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 fester an den Endothelzellen zu haften. Dies ermöglicht den dritten Schritt, die transendotheliale Migration. Abbildung aus (169)26
- Abbildung 13: Wirkung von Nitraten bei akuten Brustschmerzen. Abbildung aus (121).....27

- Abbildung 14: Bioaktivierung organischer Nitrate. Links sind die hochpotenten organischen Nitrate abgebildet (GTN, PETN), die in niedrigen Dosierungen (<1 $\mu\text{mol/l}$) über die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) bioaktiviert werden. Über die Reduktaseaktivität werden diese in ihre denitrierten Metabolite (1,2-Glyceroldinitrat, PETriN, PEDN) abgebaut. Über drei Wege erfolgt die Bildung von NO: 1.) über direkte NO-Bildung über die ALDH-2, 2.) über eine Reduktion von NO_2^- (Nitritanion) zu NO über mitochondriale Cytochrom C-Oxidase und 3.) über eine Reduktion von NO_2^- über die zytosolische Xanthinoxidase. Auf der rechten Seite ist die Bioaktivierung von den niedrigpotenten organischen Nitraten ISDN und ISMN, aber auch GDN, PEDN sowie von hochdosierten GTN und PETN (>1 $\mu\text{mol/l}$) über P450-Enzyme im endoplasmatischen Retikulum dargestellt, die zu einer direkten NO-Freisetzung führt. Abbildung aus (121)28
- Abbildung 15: Molekulare Mechanismen der Nitrattoleranz. Bereits nach einem Tag kontinuierlicher Verabreichung einer niedrigen Dosis Glyceroltrinitrat (GTN) kommt es zu einer neurohormonalen Gegenregulation durch erhöhte Katecholamin- und Vasopressin-Plasmalevel, erhöhtes intravasales Volumen und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Pseudotoleranz). Nach drei Tagen entwickelt sich eine endotheliale und muskuläre Dysfunktion (vaskuläre und Kreuztoleranz) durch verschiedene Mechanismen: 1) erhöhte Superoxidproduktion durch Proteinkinase C (PKC)-vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase und in Mitochondrien; 2) direkte Hemmung der NO-Synthase (NOS) durch die PKC; 3) Entkopplung der eNOS durch reduzierte Verfügbarkeit von BH_4 durch Peroxynitrit-induzierte Oxidation des BH_4 und reduzierte Expression der GTP-Cyclohydrolase-1 (GTPCH); 4) Überempfindlichkeit auf Vasokonstriktoren durch erhöhte PKC-Aktivität in glatten Muskelzellen; 5) verminderte GTN-Aktivierung durch Hemmung der Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH-2); 6) Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Superoxid und Peroxynitrit; 7) vermehrter Abbau des cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE); 8) Hemmung der Prostazyklinsynthese (PGI2-S) durch Peroxynitrit und damit verminderte Prostazyklinsynthese. Abbildung aus (121)29
- Abbildung 16: Strukturformel PETN30
- Abbildung 17: Vorbeugung einer Nitrattoleranz und endothelialer Dysfunktion durch Therapie mit PETN. Im Gegensatz zu GTN stimuliert PETN die Expression des protektiven Enzyms Hämoxygenase 1 (HO-1), die durch ihre antioxidativen Reaktionsprodukte wie Bilirubin und Kohlenmonoxid (CO) zu einer Reduktion der ROS und einer Aktivierung der sGC beiträgt. Durch die ebenfalls beim Metalloporphyrinabbau entstehenden freien Eisenmoleküle wird die Produktion von Ferritin angeregt, was langfristig toxische Spiegel freien Eisens senkt. Somit wird einer Entkopplung der eNOS, mitochondrialem oxidativen Stress sowie einer Inaktivierung der ALDH-2 vorgebeugt. Dies bewirkt eine dauerhaft erhaltene vasodilatative Wirkung von PETN und eine erhaltene Gefäßfunktion. Abbildung aus (194)31
- Abbildung 18: Schematische Darstellung der Organe, die für die weiteren Versuche verwendet wurden: Lunge: blau. Herz: braun. Aorta: rot. Truncus pulmonalis und Pulmonalarterien: pink.....46
- Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Organbad-Kammer.....47
- Abbildung 20: Acetylcholinabhängige Gefäßrelaxation an isolierten Ratten-Gefäßsegmenten mittels isometrischer Tonusbestimmung im Organbad. A: Aorta nach vier Wochen Behandlung mit 30, 40 oder 60 mg/kg KG MCT. B: Pulmonalarterie nach vier Wochen Behandlung mit 30, 40 oder 60 mg/kg KG MCT. C: Aorta nach Behandlung mit MCT60 für zwei oder vier Wochen. D: Pulmonalarterie nach Behandlung mit MCT60 für zwei oder vier Wochen. MCT= Monocrotalin, MCT30= Behandlung mit 30 mg/kg KG Monocrotalin, MCT40= Behandlung mit 40 mg/kg KG Monocrotalin, MCT60= Behandlung mit 60 mg/kg KG Monocrotalin. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle, # = $p < 0,05$ versus MCT30 bzw. 2 Wochen MCT, § = $p < 0,05$ versus MCT40.....63

- Abbildung 21: 3-Nitrotyrosin-Level im Lungengewebe mittels Dot Blot-Analyse nach vierwöchiger Behandlung mit Monocrotalin. Oben: quantitative Analyse mittels Densitometrie. Unten: Originalbild (repräsentatives Beispiel). * = $p < 0,05$ versus Kontrolle, # = $p < 0,05$ versus MCT30. Ctr: Kontrolle. MCT30: Monocrotalin 30 mg/kg KG. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. MCT60: Monocrotalin 60 mg/kg KG. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-8 Tiere/ Gruppe. 64
- Abbildung 22: Trichromfärbung des Lungengewebes nach vierwöchiger Behandlung mit Monocrotalin 40 mg/kg KG im Vergleich zu Kontrolltieren in 100-, 200- und 400facher Vergrößerung. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. N = 3-8 Tiere/ Gruppe. 65
- Abbildung 23: Antioxidative Kapazität des Rattenserums mittels DPPH-Assay nach vierwöchiger Behandlung mit 40 mg/kg KG Monocrotalin im Vergleich zu Kontrolltieren. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe. 66
- Abbildung 24: Echokardiographisch gemessener pulmonalarterieller Mitteldruck in MCT-behandelten Ratten. Oben: Balkendiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung. Unten: fotografische Darstellung der Echokardiographie. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-4 Tiere/ Gruppe. 67
- Abbildung 25: Organgewichtsbestimmung von Herz (A) und Lunge (B) im Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht in MCT-behandelten Ratten. C: fotografische Darstellung der Pulmonalarterien. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 4 Tiere/ Gruppe. 68
- Abbildung 26: Die Gefäßfunktion an isolierten Ratten-Gefäßsegmenten wurde mittels isometrischer Tonusbestimmung im Organbad gemessen. A: Aorta. B: Pulmonalarterie. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. MCT40 +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 6-22 Gefäßabschnitte/ Gruppe. 69
- Abbildung 27: Wirkung von PETN-Therapie auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses in MCT-behandelten Ratten. A: Superoxidproduktion in kardialen Membranfraktionen nach Stimulation mit NADPH (zeigt die NADPH Oxidase-Aktivität an). B: Oxidativer Burst in Rattenvollblut (zeigt die Leukozyten NADPH Oxidase- und Myeloperoxidase-Aktivität an). C: DHE Färbung von Aorten-Kryoschnitten (zeigt die intrazelluläre ROS Bildung an). D: Xanthinoxidase-Aktivität in Rattenserum. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe. 70
- Abbildung 28: Wirkung von PETN-Therapie auf verschiedene Marker des oxidativen Stresses in MCT-behandelten Ratten. A: Nox2-Expression in der Aorta mittels Western Blot. B: 3-Nitrotyrosinpositive Proteine im Lungengewebe mittels Dot Blot. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe. 72
- Abbildung 29: HO-1 mRNA-Level in Lungengewebe MCT-behandelter Ratten mittels rt-PCR. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe. 73
- Abbildung 30: VCAM-1 mRNA-Level in Lungengewebe MCT-behandelter Ratten mittels rt-PCR. * $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe. 73

Abbildung 31: Einfluss von PETN auf den Endothelin-Signalweg in Lungengewebe von Ratten mit MCT-induzierter PAH. Die mRNA-Level für A: Endothelin-1, B: Endothelin konvertierendes Enzym (ECE), C: Endothelinrezeptor A, D: Endothelinrezeptor B wurden mittels qRT-PCR im Lungengewebe gemessen. * p<0,05 versus Ctr; # p<0,05 versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben, N = 6 Tiere/ Gruppe.	74
Abbildung 32: Einfluss des Endothelin-Analogons BQ-3020 sowie PETN auf die ICAM-1 mRNA-Level in EA.hy-Zellen mittels qRT-PCR. * p<0,05 versus ohne Behandlung; # p<0,05 versus BQ-3020 Behandlung. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben, N = 3-7 Zellansätze/ Gruppe.	76
Abbildung 33: Einfluss des Endothelin-Analogons BQ-3020 sowie PETN auf den oxidativen Burst in Vollblut. A: zeitlicher Verlauf des oxidativen Bursts in Vollblut gesunder humaner Probanden mit BQ-3020 in steigenden Konzentrationen mittels L-012 ECL. B: Oxidativer Burst in Vollblut gesunder humaner Probanden nach Inkubation mit PETN und/oder BQ-3020 sowie Co-Simulation mit dem Pyrogen Zymosan A (0,5 µg/ml) mittels L-012 ECL. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben, N = 16 Zellansätze/ Gruppe. Signifikanzsymbole in A: * p<0,05 versus Ctr; # p<0,05 versus 0,05 µM BQ-3020; \$ p<0,05 versus 0,5 µM BQ-3020. Signifikanzsymbole in B: * p<0,05 versus ohne Behandlung; # p<0,05 versus 100 µM PETN; \$ p<0,05 versus 5 µM BQ-3020.	76
Abbildung 34: Endotheliale Dysfunktion durch Behandlung mit organischen Nitraten. A: Endotheliale Dysfunktion durch GTN in peripheren Arteriolen. B: Endotheliale Dysfunktion durch GTN in Coronararterien. C: Endotheliale Dysfunktion durch ISMN in peripheren Arteriolen. D: PETN löste keine endotheliale Dysfunktion in Brachialarterien aus. E: Endotheliale Dysfunktion durch ISDN in Brachialarterien. Abbildung aus (121).....	77
Abbildung 35: Auswirkungen der HO-1-Expression/-Inhibition auf die Nitrattoleranz. Hemmt man die HO-1 bei PETN-behandelten Tieren, wird eine Toleranz und erhöhte Superoxidproduktion induziert. Induziert man die HO-1 bei GTN-behandelten Tieren, konnte eine Toleranzentwicklung sowie Superoxidproduktion gehemmt und die Aktivität der ALDH-2 (bioaktivierendes Enzym des GTN) normalisiert werden. Abbildung aus (121), Originaldaten aus (18)	80
Abbildung 36: Wirkung von inhalativem NO. Inhalatives NO diffundiert von den Alveolen in die glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (GC), welche aus GTP (Guanosintriphosphat) cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) synthetisiert. sGMP aktiviert die Proteinkinase, wodurch es zu einem verminderten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie zur Dephosphorylierung von Myosin und damit zur Relaxation führt. Abbildung aus (236).....	84
Abbildung 37: Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie der pulmonalen arteriellen Hypertonie und deren Therapieansätze. Endothelin-Signalweg, NO-Signalweg, Prostazyklinsignalweg. Abbildung aus (259).....	95

Tabellen

Tabelle 1: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie nach dem 6. WSPH 2018 (Aus: (24))	5
Tabelle 2: Herstellungsanleitung der Trenn- und Sammelgele.	56

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Die pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung, die etwa 1% der Weltbevölkerung betrifft (1). Meist ist sie ein Symptom einer zugrundeliegenden Erkrankung der Lunge oder des Herzens, erst nach Ausschluss dieser Ursachen spricht man von einer pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH). Im Jahr 2014 lag die Prävalenz der PAH in Deutschland bei 25,9 pro 1 Million Erwachsener, wobei Frauen mit 67% der Gesamtfälle häufiger betroffen waren (2).

In einigen Fällen ist die PAH assoziiert mit Kollagenosen, HIV, portaler Hypertonie, angeborenen Herzfehlern, pulmonaler venookklusiver Erkrankung oder pulmonalen Hämangiomasen, in den meisten Fällen tritt sie jedoch idiopathisch auf (idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie, IPAH) (2).

Insbesondere die IPAH betrifft gehäuft Frauen im jüngeren Alter, wobei in den letzten Jahren ein demographischer Wandel in Richtung älterer Patienten sowie eine Annäherung der Geschlechterunterschiede stattgefunden hat (3). Die 3-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung betrug 2012 etwa 70-80% trotz Therapie (3). Somit ist die PAH zwar eine seltene, aber schwerwiegende Erkrankung.

Auf molekularer Ebene geht die PAH mit erhöhtem oxidativem Stress, verstärkter Inflammation sowie einer Endotheldysfunktion einher. Hierbei spielen insbesondere das Stickstoffmonoxid-(NO-)System sowie ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden Substanzen wie Prostazyklin und vasokonstriktiven Stoffen wie Endothelin-1 eine Rolle (4).

An dieser Stelle setzen verschiedene therapeutische Optionen an. In Deutschland sind derzeit zugelassene Medikamente den folgenden Gruppen zuzuordnen: Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Prostazyklin-Analoga, Prostazyklinrezeptor-Agonisten, Phosphodiesterase 5-Hemmer, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase sowie Kalziumkanalblocker (5). Diese können je nach Risikoprofil und Schweregrad der Erkrankung in Monotherapie oder kombiniert eingesetzt werden (6).

Weiterhin wird zur Therapie der persistierenden pulmonalen Hypertonie des Neugeborenen NO inhalativ eingesetzt (7).

Organische Nitrate werden seit über 100 Jahren erfolgreich zur Therapie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie chronische Angina pectoris (8), akutes Koronarsyndrom (9), Herzinsuffizienz (10) und hypertensive Notfälle (11) eingesetzt.

Ihr Einsatz wird durch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Hypotonie, Kopfschmerzen, Schwindel sowie die Nitrattoleranz und Tachyphylaxie beschränkt. Dies limitiert insbesondere die Anwendung von Nitroglycerin, Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) sowie Isosorbiddinitrat (ISDN) (12-14).

Pentaerythryltetranitrat (PETN) führt im Gegensatz zu anderen Nitraten bei chronischer Gabe nicht zu einer Nitrattoleranz und Kreuztoleranz und induziert keinen oxidativen Stress im Gefäßsystem (15-17).

1.2 Ziel der Dissertation

Da die PAH immer noch eine schwer behandelbare und nicht heilbare Erkrankung ist und mit einer hohen Mortalität einhergeht, ist es sinnvoll, nach weiteren alternativen Behandlungsmöglichkeiten und supportiven Therapien zu suchen. Dabei steht neben der Verbesserung der Prognose laut modernen medizinischen Leitlinien auch eine verbesserte Lebensqualität als zentrales Ziel im Fokus einer Therapie. (18)

Ein Medikament mit Wirkung auf das NO-System und vergleichsweise gutem Nebenwirkungsprofil stellt PETN dar, das bisher erfolgreich als NO-Donor zur Behandlung der chronischen stabilen Angina Pectoris angewendet wird.

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass PETN sowohl eine antioxidative, protektive Wirkung auf das Endothel (19) als auch positive Einflüsse auf Gefäßdysfunktion bei Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie hat (20, 21). Daneben wurden Komplikationen, die typischerweise beim Schwangerschaftsbluthochdruck (Präeklampsie) auftreten, durch die PETN-Therapie sowohl in einer klinischen Studie (22) als auch im Tiermodell verbessert (23).

Daher soll diese Arbeit den Einfluss von PETN auf pulmonale arterielle Hypertonie im Rattenmodell untersuchen.

Dafür wurde bei Wistar-Ratten mittels intravenöser Monocrotalin-(MCT-)Injektion eine pulmonale arterielle Hypertonie induziert und der Erfolg der Behandlung mittels

Echokardiographie, histologischer Untersuchung der Lungen sowie Relaxationsfähigkeit der Pulmonalgefäße kontrolliert.

Anschließend wurden die Effekte von PETN auf die folgenden Parameter bei MCT-induzierter PAH untersucht:

- Echokardiographisch gemessener pulmonalarterieller Druck
- Acetylcholin-vermittelte Gefäßrelaxationsfähigkeit
- Organhypertrophie als Parameter für Fibrose und Insuffizienz
- Enzymveränderungen und veränderte vaskuläre Signalwege als Marker für oxidativen Stress mittels Dot Blot und Western Blot
- Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in Herz, Gefäßen und Blut mittels direkter Detektion
- Expression oxidativer und antioxidativer Enzyme mittels rt-PCR

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: gesunde Kontrollgruppe (CTR), erkrankte MCT-behandelte Gruppe (MCT) sowie mit MCT und PETN behandelte Behandlungsgruppe (MCT+PETN).

Außerdem wurden die Effekte von PETN und einem Endothelin-Rezeptor-Agonisten (BQ-3020) ex vivo in Zellkulturen und humanen Blutproben untersucht.

2 Literaturdiskussion

2.1 Pulmonale Hypertonie

2.1.1 Definition und Einteilung

Nach „Herold Innere Medizin 2016“ ist pulmonale Hypertonie definiert durch eine chronische Erhöhung des mittleren Pulmonalarteriendrucks (mPAP) auf über 25 mmHg in Ruhe, gemessen mittels Herzkatheteruntersuchung (24).

Eine der neuesten Einteilungen erfolgt nach der Nizza-Klassifikation, die beim 6. World Symposium on Pulmonary Hypertension (WSPH) 2018 aktualisiert wurde (25):

1. Pulmonal-arterielle Hypertonie
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. Idiopathisch 1.2. Hereditär <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. BMPR2-Mutation (bone morphogenetic protein receptor type 2) 1.2.2. Andere Mutationen 1.3. Medikamenten- und toxininduziert 1.4. Assoziiert mit: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Kollagenose 1.4.2. HIV-Infektion 1.4.3. Portale Hypertonie 1.4.4. Angeborene Herzfehler 1.4.5. Schistosomiasis 1.5. PAH mit Langzeitwirkung von Kalziumkanalblockern 1.6. PAH mit venöser/kapillärer Beteiligung (Pulmonale venookklusive Erkrankung PVOD und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose PCH) 1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> 2.1. Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion 2.2. Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion 2.3. Klappenerkrankungen 2.4. Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Erkrankungen, die zu postkapillärer PH führen
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
<ul style="list-style-type: none"> 3.1. Obstruktive Lungenerkrankung 3.2. Restriktive Lungenerkrankung 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt-restriktiven/obstruktiven Anteilen 3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung 3.5. Anlagebedingte Lungenerkrankungen
4. PH bei pulmonalarterieller Obstruktion
<ul style="list-style-type: none"> 4.1. Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) 4.2. Andere pulmonalarterielle Obstruktionen <ul style="list-style-type: none"> 4.2.1. Sarkom oder Angiosarkom 4.2.2. Andere maligne Tumoren (z.B. Nieren-, Uterus-, Keimzelltumoren) 4.2.3. Nicht-maligne Tumoren (Uterus-Leiomyom) 4.2.4. Arteriitis ohne Kollagenose 4.2.5. Angeborene Pulmonalarterienstenose 4.2.6. Parasiten (Echinokokkose)

<p>5. Pulmonale Hypertonie unklarer und/oder multifaktorieller Genese</p> <p>5.1. Hämatologische Erkrankungen: chronisch-hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie</p> <p>5.2. Systemische und metabolische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Neurofibromatose, Morbus Gaucher, Glykogenspeichererkrankungen</p> <p>5.3. Andere: chronische Nierenerkrankungen mit oder ohne Dialyse, fibrosierende Mediastinitis</p> <p>5.4. Komplexe angeborene Herzfehler</p>

Tabelle 1: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie nach dem 6. WSPH 2018 (Aus: (25))

2.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz von PAH in Industrienationen beträgt etwa 1,1-7,6 pro Millionen Einwohner und Jahr, die Prävalenz etwa 6,6-26 pro Millionen Einwohner (1). Diese Zahlen variieren sehr von Land zu Land und unterscheiden sich deutlich von Entwicklungsländern (1). In Deutschland geht man von einer Inzidenz von 3,9 pro Millionen Einwohner und Jahr sowie einer Prävalenz von 25,9 pro Millionen Einwohner aus (2). Die Ein-Jahres-Überlebensrate betrug hier 2014 92%, die Drei-Jahres-Überlebensrate 68% bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65 Jahren (2). In der Todesursachenstatistik für Deutschland des statistischen Bundesamts werden im Jahr 2018 180 Todesfälle auf primäre pulmonale Hypertonie zurückgeführt, etwa 10 Mal so viele (1826 Todesfälle) auf sekundäre pulmonale Hypertonie (26).

2.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) ist noch nicht abschließend geklärt. In den Widerstandsgefäßen der Lunge spielt die Trias aus Vasokonstriktion, Thrombosen und Remodeling mit Intimafibrose, Endothelzellwucherung und Obliteration eine tragende Rolle. Zusätzlich trägt ein Ungleichgewicht zwischen protektiven (Prostazyklin, NO-System, ANP-System) und aggressiven (Thromboxan, Endothelin) Faktoren zur Entwicklung der Trias bei (24, 27).

Dieses Ungleichgewicht geht einher mit der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS), die ihrerseits wiederum zur Funktionseinschränkung bzw. -änderung verschiedener Enzyme beitragen. Als Quellen für oxidativen Stress konnten u.a. NADPH-Oxidasen (Nox), Xanthinoxidase (XO), die entkoppelte endotheliale NO-Synthase (eNOS) sowie Mitochondrien identifiziert werden (4, 28).

In Lungenbiopsien von Patienten mit PAH wurde eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase festgestellt, die in die Entstehung von Peroxynitrit und Superoxid involviert ist (29). Außerdem konnten erhöhte Biomarker für oxidativen Stress wie 3-Nitrotyrosin, 8-Hydroxy-Guanosin und 5-Oxoecosatetraensäure nachgewiesen werden (30).

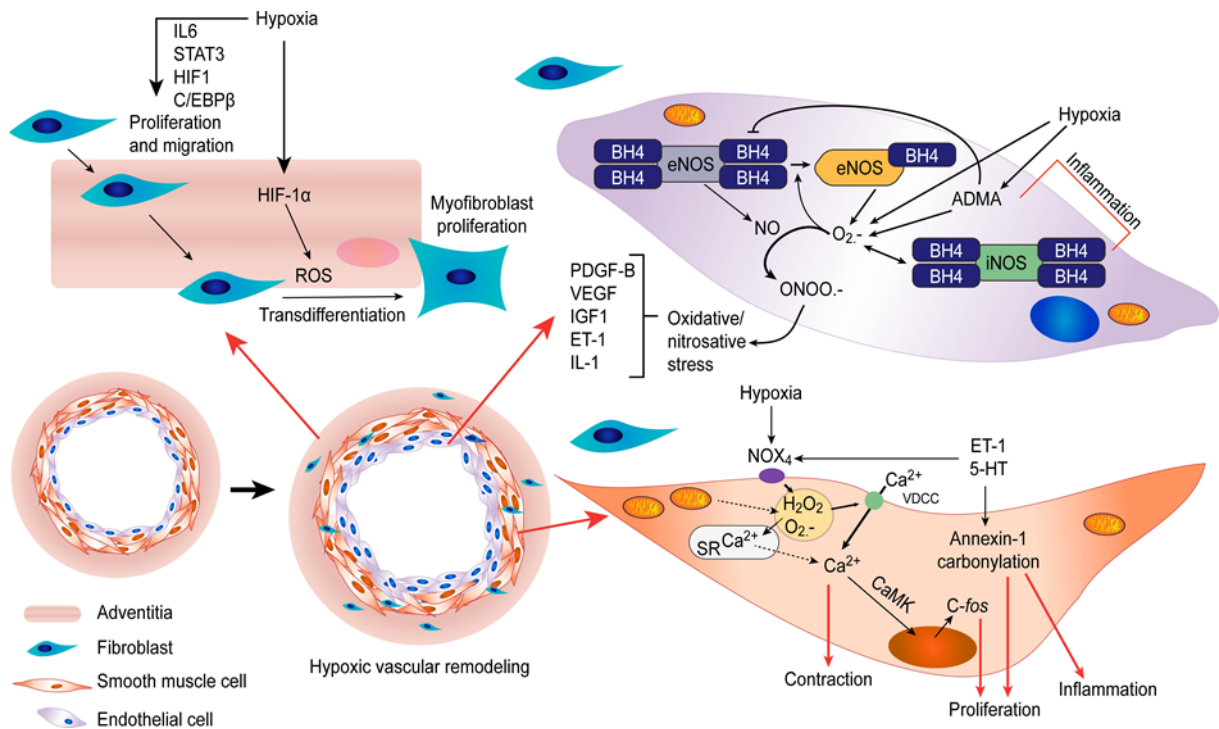


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen ROS und pulmonalen vaskulären Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Ca²⁺: Calcium; ROS: reactive oxygen species; SR: sarcoplasmatisches Retikulum; 5-HT: Serotonin; ET-1: Endothelin-1; IL-6: Interleukin 6; IL-1: Interleukin 1; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; HIF-1: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1; C/EBPβ: CCAAT/enhancer-binding protein beta; PDGF-B: platelet-derived growth factor subunit B; VEGF: vascular endothelial growth factor; IGF-1: insulin-like growth factor; ONOO⁻: peroxynitrite; ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin; eNOS: endotheliale NO-Synthase; iNOS: induzierbare NO-Synthase; BH4: Tetrahydrobiopterin; VDCCs: voltage-dependent calcium channels; O₂⁻: Superoxidanion; H₂O₂: Hydrogenperoxid; CaMK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Abbildung aus (31)

Eine schematische Darstellung zur Pathogenese der PAH ist am Beispiel der hypobaren Hypoxie in Abbildung 1 dargestellt (aus (31)). Durch Sauerstoffmangel werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt. In den Endothelzellen spielt die NO-Synthase eine große Rolle. Sie entkoppelt durch Einwirkung des Superoxidanions und produziert dann selbst Superoxid. Dies führt zu vermehrtem oxidativen und nitrosativen Stress, was mit einer erhöhten Bildung von vasokonstriktiven, proinflammatorischen und proliferativen Molekülen (PDGF, VEGF, IGF, ET-1, IL-1) einhergeht. Dies wiederum führt zu endothelialer Dysfunktion und

Hypertrophie. Fibroblasten werden durch ROS zur Proliferation, Migration und Differenzierung zu Myofibroblasten angeregt. In den glatten Muskelzellen wird über eine Hypoxie die NADPH-Oxidase induziert, welche über die Produktion von ROS zur Kontraktion, Proliferation und Inflammation beiträgt. All diese Prozesse tragen zum Remodeling bei, welches letztendlich in einer pulmonalen Hypertonie mündet (31).

Risikofaktoren für andere nicht idiopathische Formen der PAH sind genetische Prädisposition, Drogen und Medikamente wie Aminorex, Fenfluramin, Benfluorex oder SSRI (6). Es konnten Mutationen im BMPR2-(bone morphogenetic protein-), BMPR1B- und im SMAD9-Gen, in Genen, die für Endoglin und Activin receptor-like kinase 1 kodieren, sowie in seltenen Genen (CAV1, KCNK3) gefunden werden (6).

2.1.4 Symptome

Die Symptome der pulmonalen Hypertonie sind unspezifisch und meist auf eine nachfolgende Rechtsherzbelastung zurückzuführen. Sie treten zuerst unter körperlicher Aktivität auf und sind erst im Endstadium in Ruhe zu finden. Dazu gehören unter anderem Kurzatmigkeit, Schwäche, Schwindel, Engegefühl und Synkopen. Einige Patienten beschreiben trockenen Husten und Übelkeit und Erbrechen bei Anstrengung. Auch Ödeme der Extremitäten können als Folge der Rechtsherzbelastung auftreten (6).

Einige Patienten können durch Symptome auffallen, die auf mechanische Probleme und eine veränderte Blutverteilung zurückzuführen sind. Dazu gehören Hämoptysis durch Ruptur hypertrophierter Bronchialarterien, Heiserkeit durch Kompression des Nervus laryngeus recurrens durch dilatierte Pulmonalarterien, Giemen durch Kompression der Atemwege, Angina durch Kompression der linken Koronararterie sowie Ruptur der Pulmonalarterie mit daraus folgender Herzbeutelamponade (6).

Bei der klinischen Untersuchung können Herzgeräusche auffallen, wie ein pansystolisches Geräusch durch Rückfluss über die Trikuspidalklappe oder ein diastolisches Geräusch durch Pulmonalinsuffizienz. Außerdem kann ein akzentuierter zweiter Herzton oder ein dritter Herzton über dem rechten Ventrikel vorliegen. Normalerweise liegen keine pathologischen Atemgeräusche vor (6).

Weiterhin sollte bei der klinischen Untersuchung auf Hinweise für eine ursächliche Erkrankung geachtet werden, wie Sklerodermie (Teleangiektasien, digitale

Ulzerationen), interstitielle Lungenerkrankungen (Rasselgeräusche) oder Lebererkrankungen (Spider naevi, Palmarerythem...) (6).

Zu den diagnostischen Maßnahmen zählen EKG, Röntgen Thorax, Lungenfunktionstests, Blutgasanalyse, Echokardiographie, Ventilations-/Perfusionsscan der Lunge, CT, Pulmonalangiographie, kardiales MRT, verschiedene Bluttests inklusive immunologischer Untersuchungen, Abdomenultraschall, genetische Untersuchung sowie als Goldstandard der Diagnosesicherung eine Rechtsherzkatheteruntersuchung. Genauere Informationen finden sich in der aktuellen ESC-Leitlinie (6).

2.1.5 Behandlung

Die Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie ist sehr komplex und erfolgt neben physiotherapeutischen und zahlreichen anderen supportiven Maßnahmen medikamentös (6, 32). Sie sollte aufgrund der Seltenheit der Erkrankung in spezialisierten Zentren stattfinden.

Die supportiven Maßnahmen umfassen vor allem eine Influenza- und Pneumokokkenimpfung, Schwangerschaftsverhütung (bzw. Schwangerschaft nur bei gut kontrollierten Symptomen und in enger klinischer Überwachung) sowie psychosoziale Unterstützung. Außerdem können supervisierte Trainingseinheiten und Sauerstoffapplikation erwogen werden. Exzessives Training wird nicht empfohlen (6).

In der medikamentösen Therapie werden supportiv neben Sauerstoff vor allem Diuretika eingesetzt. Orale Antikoagulation kann erwogen werden, insbesondere bei Patienten mit idiopathischer PAH (6).

Als spezifische medikamentöse Therapieoptionen stehen Kalziumkanalblocker (Nifedipin, Diltiazem und Amlodipin) (34, 35), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Ambrisentan, Bosentan, Macitentan) (36-38), Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) (39, 40), sGC-Stimulatoren (Riociguat) (41) und Prostazyklin-Analoga (Beraprost, Epoprostenol, Iloprost, Treprostinil, Selexipag) (42, 43) in Monotherapie oder verschiedenen Kombinationen zur Verfügung. In Abbildung 2 sind einige der verschiedenen medikamentösen Therapiestrategien abgebildet.

Als Ultima Ratio kann eine Lungentransplantation sinnvoll sein (6).

Trotz vieler Fortschritte und Neuentwicklungen in der Therapie ist die Mortalität der PAH weiterhin hoch (44).

Wie in Abbildung 1 zu sehen, hat RONS-Bildung sowie Inflammation einen großen Stellenwert in der Entstehung der PAH. PETN als antiinflammatorisches, antioxidatives Medikament kann hier an verschiedenen Stellen unterstützend ansetzen, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit bei PAH untersucht werden soll.

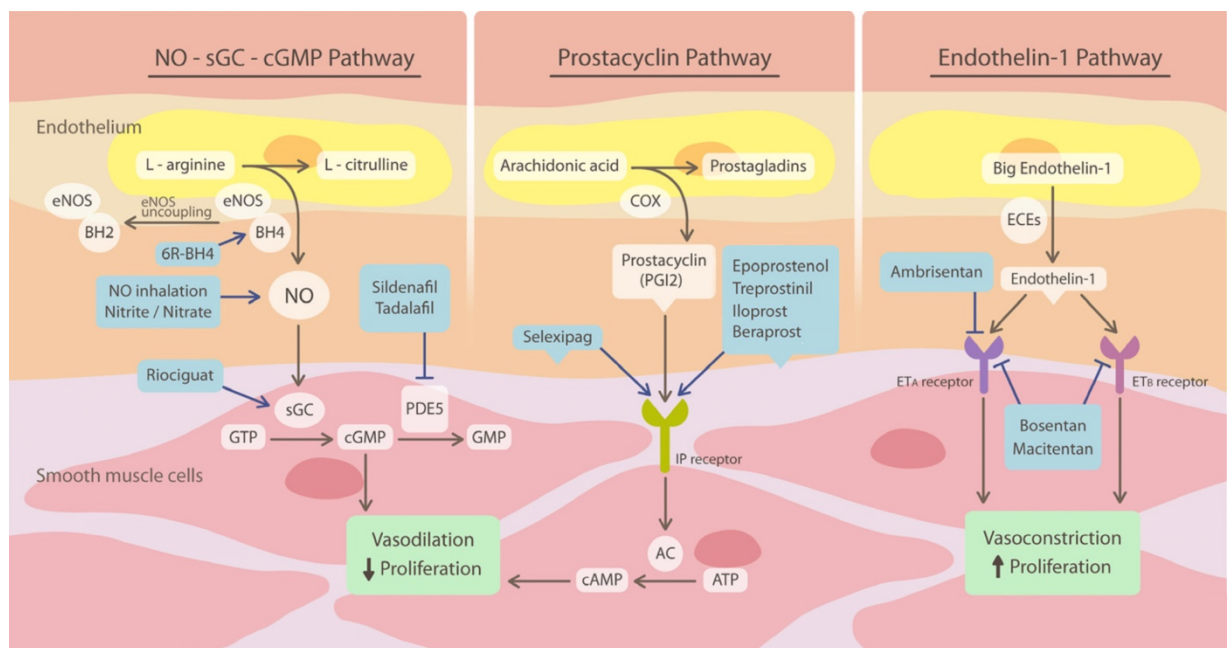


Abbildung 2: Übersicht über verschiedene vasodilatatorische und vasokonstriktorisches Signalwege und jeweilige Behandlungsansätze der PAH. Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt über Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) eine Vasodilatation und Antiproliferation der glatten Muskelzellen. Inhalatives NO, Nitrate, sGC-Stimulatoren (Riociguat), Phosphodiesterase-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) und Tetrahydrobiopterin (BH4) sind hier mögliche Therapieansätze. Prostacyclin führt über Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zu einer Vasodilatation und Antiproliferation der glatten Muskelzellen. Prostacyclin-Derivate (Epoprostenol, Treprostinil, Iloprost, Beraprost) und Rezeptoragonisten (Selexipag) sind hier mögliche Therapieansätze. Endothelin-1 (ET-1) stimuliert die Vasokonstriktion und Proliferation glatter Muskelzellen über Endothelinrezeptoren (ETA und ETB). Endothelinrezeptorantagonisten (Ambrisentan, Bosentan und Macitentan) sind hier mögliche Therapieansätze. AC: Adenylylzyklase. BH2: Dihydrobiopterin. COX: Cyclooxygenase. ECEs: Endothelin konvertierende Enzyme. eNOS: endotheliale NO-Synthase. Abbildung adaptiert aus (33)

2.2 Tiermodell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie

Monocrotalin (MCT) ist ein toxisches Pyrrolizidinalkaloid der Pflanze *Crotalaria spectabilis*. Es führt nach oraler Aufnahme zu einer progressiven pulmonalen Hypertonie in verschiedenen Spezies. Dies wurde erstmals in den 1960er Jahren unter anderem von Kay et al. nach wiederholter Aufnahme von Samen der *Crotalaria spectabilis* bei Ratten beschrieben (45).

Die derzeit angewendeten Methoden zur Induktion einer PAH sehen eine einmalige intraperitoneale oder subkutane Injektion von Monocrotalin zur Induktion von morphologischen und funktionellen Veränderungen im Lungengewebe vor (46). Wie wir in unserem Tiermodell zeigen konnten, kann auch mit einer intravenösen Injektion z.B. in die Vena dorsalis penis eine PAH induziert werden (siehe Ergebnisteil).

Der genaue Wirkmechanismus ist derzeit noch nicht bekannt. MCT besitzt keine direkte toxische Wirkung an der Injektionsstelle, sondern wird erst in der Leber über Cytochrom P450-Enzyme zum aktiven Metaboliten Dehydromonocrotalin oder Monocrotalinpyrol aktiviert. Seine toxische Wirkung speziell auf das Endothel der Lungengefäße kommt dann vermutlich durch die räumlichen Blutflussverhältnisse von der Leber zur Lunge zustande (47-49). Es konnte bereits vor 20 Jahren gezeigt werden, dass MCT in Zellkultur zu einer Apoptose der Zellen führt (49). MCT-Behandlung führt zu einem alveolären Kapillarleck und Thrombozytenaggregation.

In einer aktuelleren Studie konnte CaSR (*extracellular calcium-sensing receptor*) als Rezeptor für MCT ausfindig gemacht werden (50). CaSR ist für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase verantwortlich, aber auch an der Entstehung von Krankheiten wie zum Beispiel der essentiellen Hypertonie beteiligt (51, 52). Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht über die Monocrotalin-Wirkung.

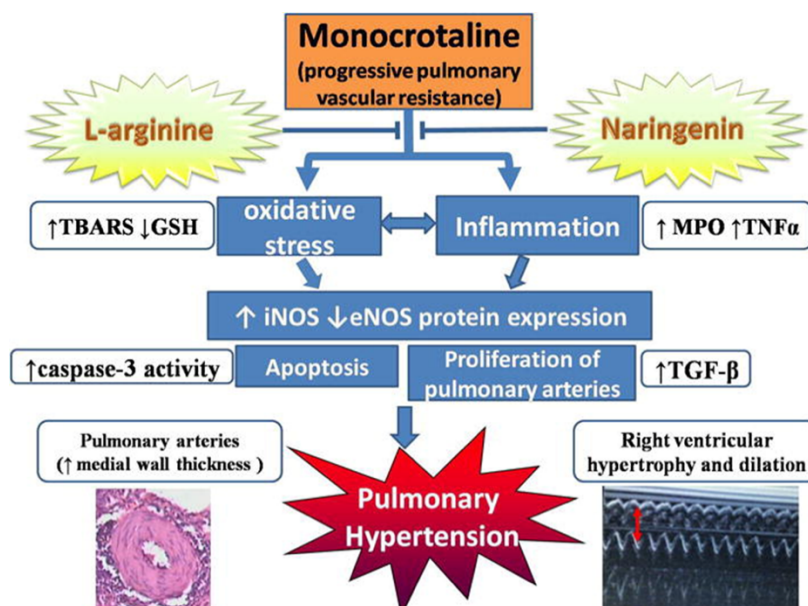


Abbildung 3: schematische Darstellung der Monocrotalin-Wirkung. GSH: reduziertes Glutathion; MPO: Myeloperoxidase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TGF-β: transforming growth factor beta; TNFα: Tumornekrosefaktor alpha. Abbildung aus (53)

2.3 Vaskuläre Dysfunktion

2.3.1 Oxidativer Stress

Viele kardiovaskuläre und assoziierte Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder Arteriosklerose gehen mit oxidativem Stress einher.

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde 1985 von Helmut Sies geprägt und wird seither in der medizinischen Forschung verwendet (54).

Oxidativer Stress beschreibt eine Imbalance zwischen pro- und antioxidativen Prozessen, die im menschlichen Körper stattfinden und somit ein Ungleichgewicht im Redoxstatus mit einer Überforderung der antioxidativen Mechanismen. Dabei spielen insbesondere reaktive Sauerstoff- (ROS, *reactive oxygen species*) und Stickstoffspezies (RNS, *reactive nitrogen species*) eine Rolle, von denen einige radikalischen Charakter, d.h. ein ungepaartes Elektron, besitzen und daher hochreaktiv sind. Wichtige Vertreter der ROS sind das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), das Superoxidanion ($\text{O}_2\cdot^-$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Vertreter der RNS sind Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) und das Peroxynitritanion (ONOO^-).

Quellen für Radikale sind z.B. NADPH-Oxidasen (Nox), Xanthinoxidase (XO), entkoppelte NO-Synthasen (NOS), Lipoxygenasen, Cytochrom-P450-Monooxygenasen und die mitochondriale Atmungskette (55).

Als antioxidative Mechanismen existieren verschiedene Enzyme wie die Superoxiddismutasen (SOD), die in den 60er Jahren von Fridovich und McCord erstmals charakterisiert wurden (56).

Solange ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen im Körper herrscht, spielen die Oxidantien eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Genexpression und Proteinaktivitäten des Körpers (57). Erst wenn sich das Gleichgewicht in Richtung der Oxidantien verschiebt, entstehen Schäden an Zellen, Proteinen und DNA-Molekülen, die zum Zelltod und letztlich zum Tod des Gesamtorganismus führen können (58).

Im Folgenden soll auf einige wichtige Schlüsselenzyme eingegangen werden, die an der Entstehung von oxidativem Stress beteiligt sind.

2.3.1.1 NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen (Nox) sind membranständige Enzymkomplexe, deren alleinige Funktion die Produktion von ROS (Superoxid oder H_2O_2) in vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen ist (59). Für die Produktion von Superoxid wird ein Elektron von

Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) auf molekularen Sauerstoff übertragen (siehe Abbildung 4).

Superoxid ist wiederum an der Entstehung anderer reaktiver Spezies, der Immunabwehr und der Regulation der physiologischen Gefäßfunktion beteiligt (60-62).

Es existieren verschiedene Isoformen der NADPH-Oxidasen. Die erste beschriebene Isoform, Nox2 oder früher gp91phox, wurde in Phagozyten entdeckt und spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr des Körpers, einerseits direkt durch die Produktion des zytotoxischen Superoxids, andererseits durch Aktivierung von Proteasen und Bildung der NETs (neutrophil extracellular traps) als Reaktion auf Bakterienkontakt (63, 64).

Inzwischen sind sieben Isoformen der Nox bekannt, die sich in ihrem Expressionsmuster, ihrer Lokalisation, dem Aktivierungsmodus und der produzierten ROS unterscheiden (60, 62). Ihre Funktion besteht unter anderem in der Beteiligung an Stoffwechselprozessen wie Immunabwehr, Zellkommunikation, posttranslationale Modifikation und Hormonsynthese (65, 66).

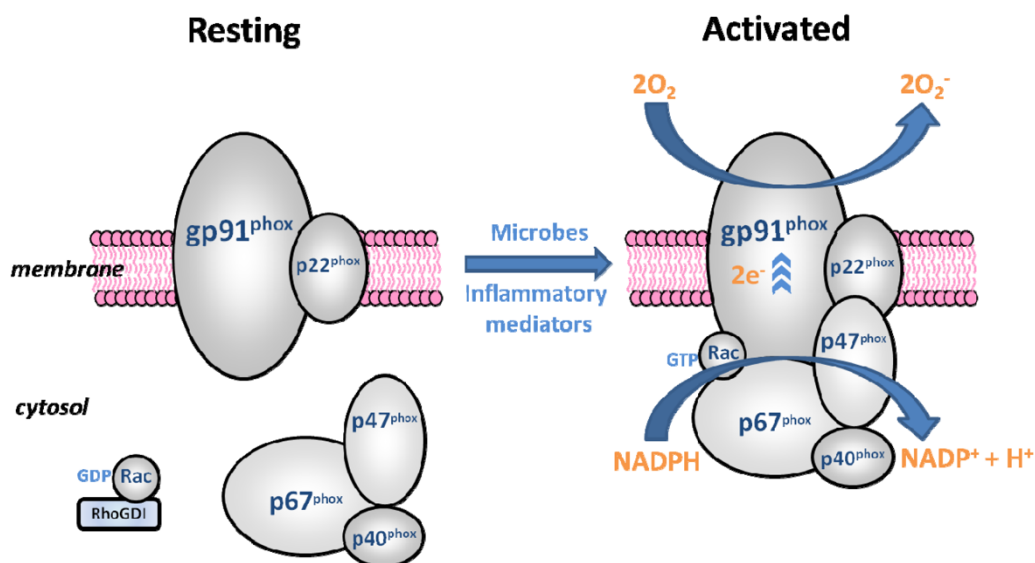


Abbildung 4: phagozytische NADPH-Oxidase in inaktiver und aktiver Form. Die NADPH-Oxidase überträgt ein Elektron von NADPH auf molekularen Sauerstoff, dabei entstehen zwei Superoxidanionradikale und $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$. Die katalytische Untereinheit gp91phox bildet mit p22phox zusammen die membranständige Untereinheit des Enzyms, Flavocytochrom b558 genannt. Die drei Phoxproteine p47, p67 und p40 („phox“ steht für phagocytic oxidase und die Zahl gibt das Molekulargewicht an) stellen die zytosolischen, regulatorischen Untereinheiten im inaktiven Zustand dar, die bei Aktivierung an das Flavocytochrom b558 binden. Daneben ist das G-Protein Rac im inaktivem Zustand an GDP gebunden und durch RhoGDI stabilisiert und bindet ebenfalls bei Aktivierung an Flavocytochrom b558. Abbildung aus (70)

Einige Isoformen, u.a. Nox1, Nox2, Nox4 und Nox5, werden im Endothel, in glatter Gefäßmuskulatur, Fibroblasten und perivaskulärem Fett exprimiert. Nox1 und Nox2, welche hauptsächlich Superoxid produzieren, scheinen an der Entwicklung von Hypertonie, Gefäßdysfunktion und Inflammation beteiligt zu sein, während für die H₂O₂ produzierende Nox4 eher protektive Eigenschaften nachgewiesen wurden (67, 68).

Als Aktivatoren der NADPH-Oxidase gelten verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Scherspannung (69).

2.3.1.2 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist unter physiologischen Bedingungen im Körper für den Abbau von Purinen zuständig. Sie katalysiert die Schritte von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure.

Die Xanthinoxidoreduktase ist ein Molybdän-haltiges Flavoprotein und kann als Oxidase oder als Dehydrogenase vorliegen, wobei die „Oxidase-Form“ ROS produziert (siehe Abbildung 5) (71, 72).

Erstmals beschrieben wurde das Enzym 1902 in seiner Reduktase-Form von Schardinger (73). 1920 wurde die Oxidase-Form entdeckt (74), wobei erst einige Jahre später erkannt wurde, dass es sich dabei um dasselbe Enzym handelte, lediglich nach posttranslationaler Modifikation (75).

Die Umwandlung von der Dehydrogenase zur Oxidase erfolgt entweder reversibel durch ROS getriggert mittels Bildung von Disulfidbrücken über eine Oxidation von Sulfhydrylgruppen in Cysteinresten oder irreversibel durch Proteolyse (72, 76).

Die XOR kommt im menschlichen Körper in verschiedenen Geweben vor, unter anderem in Herz, Lunge, Leber, Darm, Gehirn, Nieren und im Plasma. Dabei ist der Abbau von Purinen zwar ihre Hauptfunktion, aber nicht ihre einzige. Sie verarbeitet auch Pterine, aromatische Heterozyklen und aliphatische und aromatische Aldehyde, ist also auch an der Aktivierung und dem Abbau verschiedener körpereigener Stoffe oder Xenobiotika beteiligt (72). Unter anderem wurde die Xanthinoxidoreduktase auch für die Bioaktivierung von Nitroglyzerin diskutiert (77).

Als Superoxid produzierendes Enzym ist die endotheliale XO auch an der Entstehung der vaskulären Dysfunktion beteiligt. Die Expression und Aktivität wird erhöht durch proatherogene Stimuli wie Angiotensin-2 oder Scherkräfte (78, 79). Auch zirkulierende XO kann über Glykosaminoglykane an Endothelzellen binden und dadurch zur Gefäßdysfunktion beitragen (80). Außerdem konnte in

atherosklerotischen Plaques eine erhöhte Expression der XO detektiert werden, was für eine Beteiligung der XO an der Entwicklung von Atherosklerose spricht (80-82). Weiterhin spielt die XOR eine Rolle während Ischämie-Reperfusion-Zwischenfällen in verschiedenen Organen. Hierbei kommt es während einer Ischämie zur Verminderung des transmembranösen Ionengradienten mit erhöhtem Kalziumeinstrom. Dies aktiviert Proteasen, die eine irreversible proteolytische Umwandlung der XDH zur XO bewirken. Gleichzeitig fallen durch den Sauerstoffmangel erhöhte Mengen am ATP-Abbauprodukt Hypoxanthin an, welches bei Reperfusion durch die XO unter Sauerstoffverbrauch und Produktion von Superoxid abgebaut wird (siehe Abbildung 5) (83, 84).

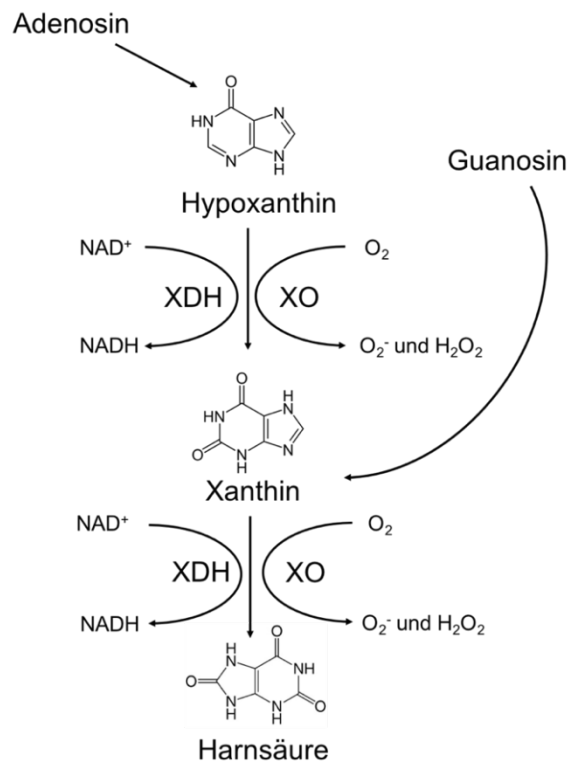


Abbildung 5: Funktionsweise der Xanthinoxidoreduktase (XOR): die Purinbasen Adenosin und Guanosin werden über Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure abgebaut. Dabei entsteht entweder über die Dehydrogenaseform (XDH) NADH aus NAD⁺ oder über die Oxidaseform (XO) Superoxid aus molekularem Sauerstoff, welches weiter zu Wasserstoffperoxid zerfällt bzw. durch SODs generiert wird. Abbildung übersetzt und nachgebildet aus (72)

Diese These wird unterstützt durch die Beobachtung, dass durch Hemmstoffe der XOR wie Allopurinol, Oxypurinol oder Febuxostat eine Verminderung des Reperfusionsschadens erreicht werden kann (85, 86). In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass eine Hemmung der XOR die Bildung von Atherosklerose in ApoE-Knockout-Mäusen verringern konnte (87, 88). Weiterhin führten die XO-

Hemmstoffe zu einer verbesserten Gefäßfunktion sowohl im Tiermodell als auch bei Rauchern (80, 89).

Therapeutisch wird Allopurinol zur Behandlung von Gicht und Hyperurikämie eingesetzt (90).

2.3.2 NO-Signalweg

NO ist ein hochreaktives Molekül, das von NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert wird. Als Vasodilatator spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus im Lungenkreislauf (91).

Zusätzlich inhibiert es die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Plättchenaggregation, es sorgt also auch über diese Mechanismen für eine verbesserte Durchblutung (59).

Wie zuvor bereits erwähnt, spielt bei der Pathogenese der PAH ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Molekülen eine große Rolle. NO ist dabei neben Prostazyklin der wichtigste vasodilatierende Faktor, während Thromboxan A₂ und Endothelin zu den vasokonstriktiven Faktoren zählen (92).

Unter physiologischen Umständen diffundiert NO aus den Endothelzellen in die glatte Muskulatur und bindet dort an die lösliche Guanylatzyklase, welche aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) herstellt (91). cGMP ist ein wichtiger Signaltransmitter und hat über die Bindung an die cGMP-abhängige Proteinkinase G, cGMP-regulierte Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle Einfluss auf den Gefäßtonus, die Proliferation und Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen sowie den Phosphodiesterase-Haushalt (siehe Abbildung 6) (91, 93, 94).

Es konnte schon in den frühen 80er Jahren gezeigt werden, dass NO (damals noch unter dem Namen EDRF, endothelium-derived relaxing factor bekannt) mit Superoxid reagieren und damit inaktiviert werden kann (95). Einige Jahre später wurde das Reaktionsprodukt Peroxynitrit (ONOO⁻) identifiziert (siehe Abbildung 8, Kapitel 2.3.3.1) (96, 97).

Peroxynitrit reagiert im Gewebe weiter mit Tyrosinresten in Proteinen und bildet dadurch 3-Nitrotyrosin. Peroxynitrit führt unter anderem zur Gefäßdysfunktion durch Entkopplung der eNOS (98-100) (siehe unten, BH₄-Depletion oder S-Glutathionylierung), Nitrierung der Prostazyklinsynthase (101, 102) und Inhibierung der löslichen Guanylatzyklase (103).

Die Reaktion von NO mit Superoxid führt also nicht nur direkt über eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, sondern auch durch Inhibierung anderer vasodilatativer Mechanismen sowie der Hemmung der NO-Synthese in einem Teufelskreis zu vermehrter Vasokonstriktion.

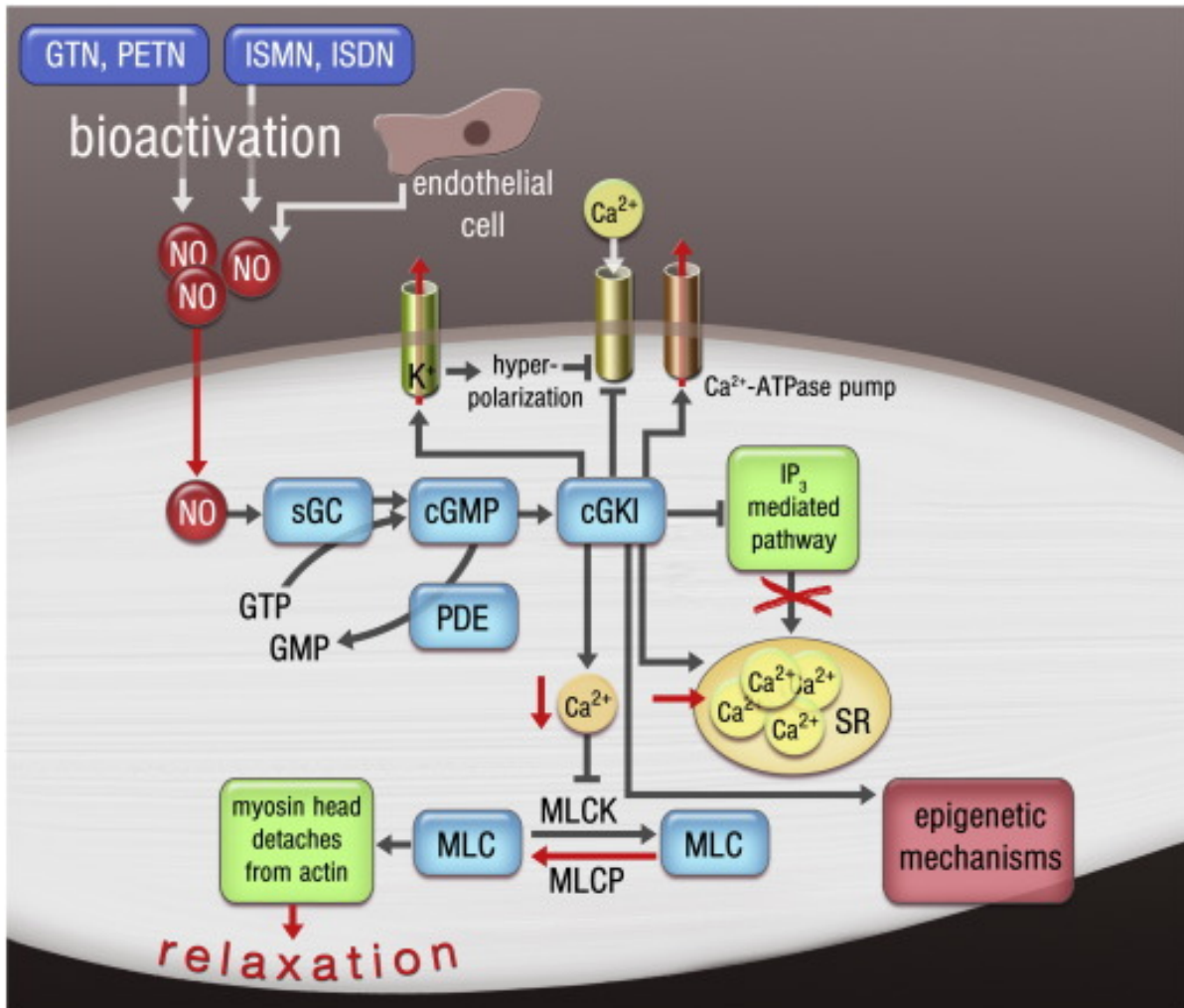


Abbildung 6: Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation. NO wird entweder aus Nitraten bioaktiviert oder aus Endothelzellen freigesetzt, diffundiert nach intrazellulär und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC), was zu einer Zunahme des cGMP führt. cGMP aktiviert die Proteinkinase 1 (cGKI), was über eine Inhibition der Inositoltriphosphat-(IP₃)-regulierten Kalziumkanäle, Aktivierung von Kaliumkanälen mit daraus folgender Hemmung von Kalziumkanälen und Aktivierung der Kalziumpumpe in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) zu einer Abnahme der intrazellulären Kalziumlevel führt. Niedrige Kalziumlevel reduzieren die Kontraktilität der Aktin-/Myosinfilamente über eine Inhibierung der Myosin-Leichtkettenphosphorylierung (MLCK) und führen damit zur Relaxation. Abbildung aus (104), modifiziert nach (105)

2.3.2.1 NO-Synthasen

NO wird von verschiedenen Isoenzymen der NO-Synthase (NOS, *nitric oxide synthase*) produziert, wobei derzeit drei Isoformen bekannt sind (91). Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS-1) ist ein low output-Enzym, das konstitutiv in Neuronen

exprimiert ist. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS-2) ist ein high output-Enzym, das durch Zytokine induziert wird und in fast allen Zelltypen exprimiert werden kann. Die endotheliale NOS (eNOS, NOS-3) ist ein low output-Enzym, das konstitutiv in Endothelzellen exprimiert ist. High und low output bedeutet in diesem Zusammenhang nicht die Arbeitsgeschwindigkeit, sondern die Ca^{2+} -abhängige (low output, da pulsatil) bzw. Ca^{2+} -unabhängige (high output, da dauerhaft aktiv) NO-Produktion (106).

Die in Zusammenhang mit Hypertonie wichtigste Isoform ist die eNOS, da das von ihr im Endothel produzierte NO einen Hauptfaktor zur Vasodilatation der Lungengefäße darstellt (91). Daher soll im Folgenden hauptsächlich die eNOS beschrieben werden.

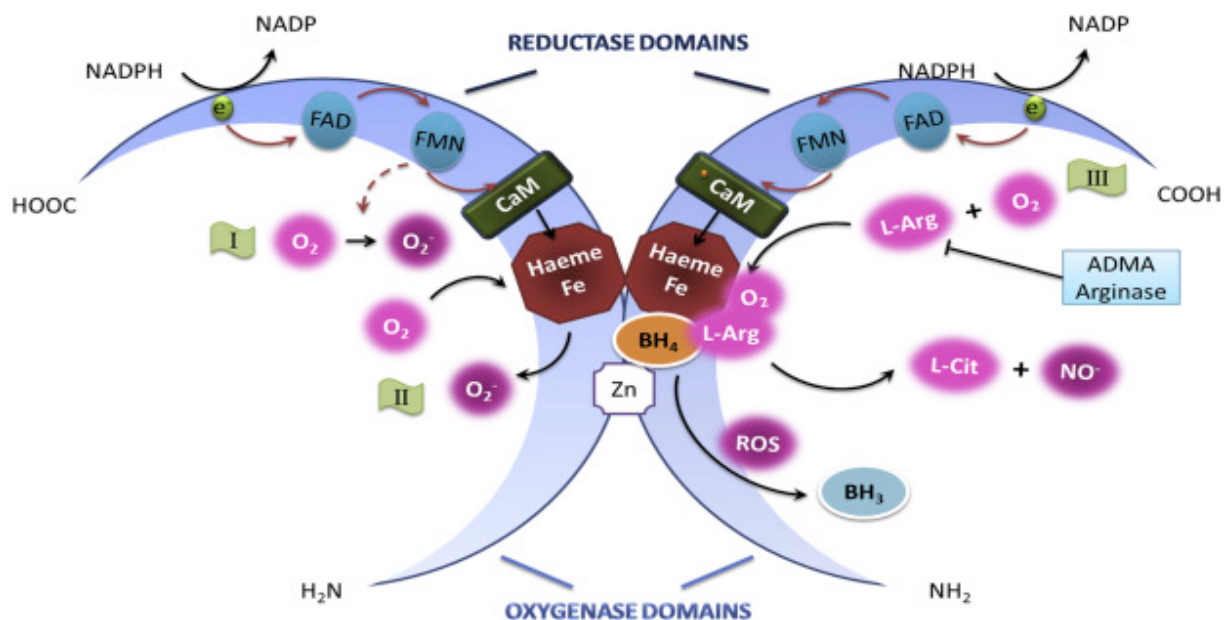


Abbildung 7: Funktionsweisen der NO-Synthase im physiologischen (III) und im durch oxidative Schäden entkoppelten (I und II) Zustand. (I): Funktion als Monomer: Produktion von Superoxid durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff. (II): Funktion als Homodimer in Abwesenheit von L-Arginin und BH_4 : Produktion von Superoxid durch direkte Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff. (III): in Anwesenheit von L-Arginin und Tetrahydrobiopterin (BH_4) werden die Elektronen von NADPH über FAD und FMN sowie Calmodulin (CaM) auf die prosthetische Hämgruppe (Haeme Fe) übertragen und in einer Oxidationsreaktion L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch zu NO und L-Citrullin oxidiert. Wird BH_4 durch ROS oxidiert, entsteht das BH_3 -Radikal und die eNOS entkoppelt. Als kompetitive Hemmstoffe fungieren ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) und Arginase, die die NO-Produktion verlangsamen. Abbildung aus (110)

Endotheliale NO-Synthasen sind Homodimere, d.h. zwei identische miteinander verbundene Monomere. Sie enthalten jeweils eine Oxygenasedomäne und eine Reduktasedomäne und sind über eine Hämgruppe und ein Tetrahydrobiopterin- (BH_4 -) Molekül miteinander verbunden (106). An der Reduktasedomäne binden die

Koenzyme NADPH, FAD und FMN, die für den Elektronentransport zuständig sind. Die Oxygenasedomäne bindet die prosthetische Hämgruppe sowie BH_4 , Sauerstoff und L-Arginin (107, 108). Die Reaktion kann durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von Calmodulin (CaM) beschleunigt werden, und zwar sowohl innerhalb der Reduktasedomäne (Elektronentransport von NADPH zu den Flavonukleotiden) als auch die Übertragung von der Reduktase- auf das Hämzentrum der Oxygenasedomäne (109). Die Funktionsweise ist in Abbildung 7 dargestellt.

Neben der pulsatilen Aktivierung des Enzyms über Ca^{2+} und Calmodulin findet auch eine Enzyminduktion durch Phosphorylierung der Aminosäureseitenkette Ser1177 als Reaktion auf Scherkräfte im Gefäß statt (111).

Eine Phosphorylierung an Thr495 dagegen führt zu einer verminderten Enzymaktivität. Dies passiert hauptsächlich in Abwesenheit aktivierender Reize vermittelt durch die Proteinkinase C (111, 112)

Verschiedene Reize können dazu führen, dass die eNOS ihre Funktion von einem NO-produzierenden zu einem Superoxid-produzierenden Enzym ändert, was als entkoppelte eNOS bezeichnet wird (siehe Abbildung 7).

Zu diesen Reizen gehört eine erhöhte Konzentration von ROS (z.B. durch NADPH-Oxidaseaktivität), was zu einer Phosphorylierung und S-Glutathionylierung an verschiedenen Aminosäureseitenketten der eNOS führt (113, 114).

Außerdem sind verminderte L-Arginin- und BH_4 -Verfügbarkeit sowie Peroxynitrit-vermittelte Oxidation des Zink-Schwefel-Clusters an der Bindungsstelle der eNOS-Dimere Auslöser für eine Entkopplung (106, 115).

Entkopplung bedeutet dabei, dass es zu einem Verlust der Elektronen im Verlauf der Elektronentransportkette kommt. Diese werden dann auf molekularen Sauerstoff übertragen, sodass anstelle von NO nun O_2^- entsteht (114).

BH_4 als wichtiges Enzym zur Stabilisierung der eNOS sowie als Elektronenlieferant wird durch die Einwirkung von RONS oxidiert und steht damit nicht mehr als Reaktionspartner zur Verfügung. Physiologischerweise ist BH_4 an der Elektronübertragung von NADPH auf den Eisenkomplex und weiter auf L-Arginin beteiligt und wird dabei zum BH_4^+ -Radikal oxidiert. Dieses wird in einer angeschlossenen Reaktion direkt wieder zu BH_4 recycelt. Da BH_4 sehr reaktionsfreudig mit Oxidantien reagiert, führt eine ROS-Belastung schnell zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von BH_4 (113).

Auch Peroxynitrit reagiert mit BH_4 und oxidiert es zu Dihydrobiopterin (BH_2), wodurch das Koenzym nicht mehr für die o.g. Reaktion zur Verfügung steht (116).

Somit wirken RONS nicht nur direkt über eine Enzymschädigung, sondern auch indirekt über eine Depletion von BH₄ negativ auf die NO-Produktion.

Verminderte NO-Level führen wiederum zu einer verminderten Gefäßdilataion und damit zu einer vaskulären Dysfunktion und Hypertonie.

2.3.3 Antioxidative Mechanismen

Der Körper ist ständig oxidativen Prozessen ausgesetzt, die potentiell schädigend auf Zellen, Proteine und Signalwege wirken können. Daher gibt es schützende Mechanismen, welche durch Superoxiddismutasen, Hämoxigenasen, Katalasen, Glutathionperoxidasen und Thioredoxinsysteme RONS abfangen und in unschädliche Moleküle wie Wasser und Sauerstoff umwandeln können (117). Im Folgenden soll auf einige Mechanismen genauer eingegangen werden.

2.3.3.1 Superoxiddismutasen

Ein Hauptabwehrmechanismus des Körpers gegen ROS, insbesondere gegen Superoxid, besteht in der Umwandlung mithilfe der Superoxiddismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid, welches dann über die Katalasen weiter zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden kann (117).

In Säugetieren existieren drei Isoformen der SOD: die zytoplasmatische Cu/ZnSOD (SOD1), die mitochondriale MnSOD (SOD2), und die extrazelluläre Cu/ZnSOD (SOD3 oder ecSOD) (117, 118). Alle Isoformen enthalten ein katalytisches Metall (Kupfer oder Mangan) im aktiven Zentrum, das während der Reaktion seine Oxidationszahl ändert (119).

Wie in Abbildung 8 zu sehen, reagiert Superoxid mit NO zu Peroxynitrit und inaktiviert es damit. Peroxynitrit ist ein hochreaktiver oxidativer Stoff, der weitere Schäden in der Zelle anrichtet, wie Membranschädigung, DNA-Schäden oder Nitrierung und damit Inaktivierung von Enzymen (117, 120). Die SOD sorgt also durch ihre Arbeit dafür, dass NO bioverfügbar bleibt und seine protektiven Aufgaben erfüllen kann und verhindert Zellschäden, die durch Peroxynitrit oder Superoxid entstehen würden (121).

Für die Gefäßfunktion spielt insbesondere die SOD3 oder ecSOD eine wichtige Rolle, da diese extrazellulär zwischen Endothel und glatter Muskelschicht lokalisiert ist, dort, wo NO entlangdiffundieren muss, um von seinem Produktions- zum Wirkort zu gelangen (117, 122, 123). Dies konnte in verschiedenen tierexperimentellen

Studien gezeigt werden. Dabei führte ein Einschleusen der ecSOD mittels adenovirenvermitteltem Gentransfer zu einer Verbesserung von altersbedingter Gefäßdysfunktion, vaskulärem Widerstand und hohem Blutdruck bei Hypertonie und Herzinsuffizienz im Tiermodell (123-126). Andersherum entwickelten Tiere mit ecSOD-Defizienz eine vaskuläre Dysfunktion, die sich durch Zuführen von externer ecSOD verhindern ließ (117).

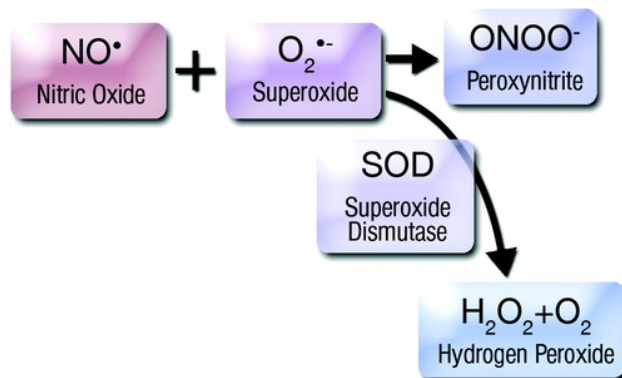


Abbildung 8: Biochemie freier Radikale: NO reagiert mit Superoxid zu dem hochreaktiven Peroxynitrit. Die Superoxiddismutase entgiftet Superoxid, indem es daraus Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff bildet. Abbildung aus (121)

Allerdings kann die ecSOD durch Wasserstoffperoxid, also durch ihr eigenes Reaktionsprodukt, inaktiviert werden. Dabei bindet Wasserstoffperoxid an das aktive Zentrum, das Kupferion, und verändert dabei dessen Oxidationsstufe. Experimentell konnte dies durch die Gabe von Harnsäure als Antioxidans oder Katalase als Wasserstoffperoxid-abbauendes Enzym verhindert werden (127, 128).

2.3.3.2 Hämoxygenasen

Hämoxygenasen (HO) sind für den Abbau von Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid zuständig (siehe Abbildung 9). Es existieren zwei bekannte Isoformen, die induzierbare HO-1 und die konstitutive HO-2 (129). Die HO-2 scheint insbesondere bei der Neuroprotektion eine Rolle zu spielen (130), während die HO-1 eine protektive Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen übernehmen kann (131). Seine protektive Wirkung entfaltet die HO-1 einerseits über den Abbau von Häm-Molekülen, die im Endothel zu oxidativen Schäden führen würden, und andererseits über seine Abbauprodukte Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid (siehe Abbildung 10). Häm ist ein pro-oxidatives Molekül, das an der Entstehung von oxidativen Radikalen beteiligt ist (132).

Eisen an sich ist ebenfalls ein pro-oxidatives Molekül, das allerdings die Bildung von Ferritin, dem Speicherprotein für Eisen, stimuliert und damit unter dem Strich zu niedrigeren Mengen an freiem Eisen führt (133).

Kohlenmonoxid (CO) ist ein Aktivator der sGC, ein Stimulator von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen, verhindert eine Plättchenaggregation und hat antiatherosklerotische, antiapoptotische und proangiogenetische Effekte (132, 134).

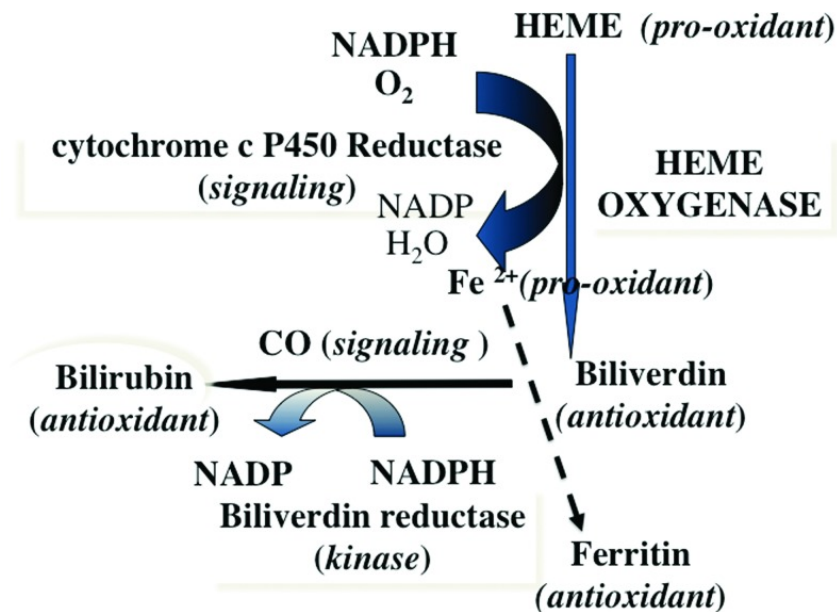


Abbildung 9: Enzymatische Reaktion von Hämoxigenasen (HO). Häm wird aus Hämproteinen freigesetzt und wird durch die HO unter Energieverbrauch (Sauerstoff und NADPH) zu Eisen, Kohlenmonoxid und Biliverdin abgebaut. Eisen induziert die Bildung von Ferritin. Biliverdin wird weiter zu Bilirubin reduziert. Abbildung aus (134)

Biliverdin wird über die Biliverdin-Reduktase weiter zu Bilirubin abgebaut und ist ebenso ein antioxidatives Molekül wie sein Abbauprodukt Bilirubin. Beide konnten z.B. effektiv eine Lipidperoxidation sowohl in Zellkultur als auch im Tiermodell verhindern (132, 135, 136). Bilirubin konnte jedoch in Versuchen noch potenter einer 3-Nitrotyrosinbildung entgegenwirken als Biliverdin (137, 138).

Durch eine vermehrte HO-1-Expression konnten nicht nur die Level an 3-Nitrotyrosin, sondern auch an zellulärem Häm und Superoxid signifikant verringert werden (139). Zu den induzierenden Reizen der HO-1 zählen NO (z.B. durch PETN-Therapie), Schwermetalle, reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (über Nrf2), freies Häm, z.B. in Form von Protoporphyrin IX, und einige Transkriptionsfaktoren, die durch oxidativen Stress aktiviert werden, wie Nrf2, AP-1, HIF-1, heat-shock factor und NF- κ B (139-141).

Allerdings scheint die HO-1 nicht nur positive Eigenschaften zu haben, sondern bei Übergewichtigen auch eine Rolle bei der Entwicklung von Folgekrankheiten wie Diabetes mellitus zu spielen (142).

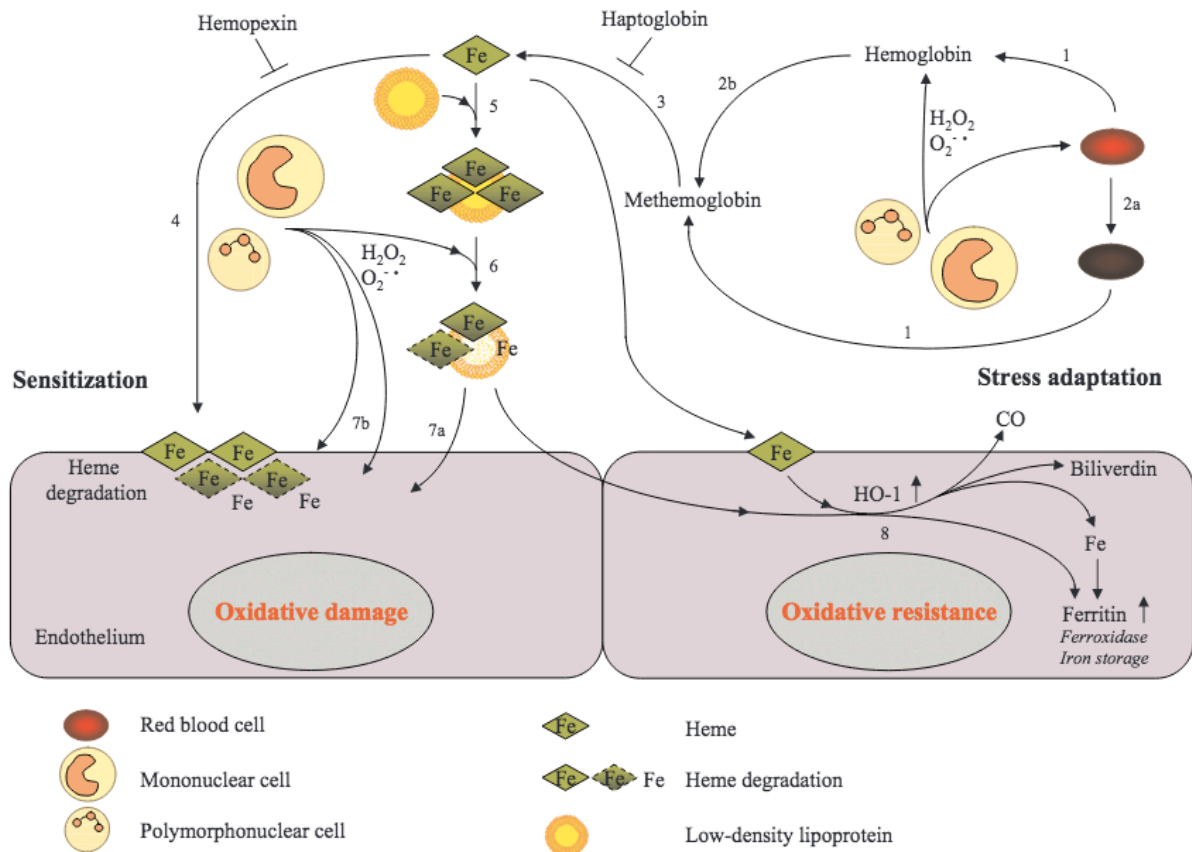


Abbildung 10: Oxidativer Stress aus Erythrozyten und Adaptationswege über HO-1: 1) Verlust von Hämoglobin aus Erythrozyten; 2a/b) Oxidation von Hämoglobin; 3) Abbau von Häm aus Methämoglobin; 4) Aufnahme von Häm in Endothelzellen und Sensitivierung für oxidativen Stress; 5) Hämaufnahme in LDL; 6) oxidative Modifizierung von LDL; 7a/b) oxidativer Stress durch oxLDL und Oxidantien aus Leukozyten; 8) Adaptation an oxidativen Stress und erhöhte freie Eisenspiegel aus Häm-Abbau via Hochregulation der HO-1 und Ferritin. Ferritin-Hochregulation führt mittelfristig zu verringerten freien Eisenspiegeln und damit vermindertem oxidativen Stress durch die Fenton Reaktion. Abbildung aus (133)

2.3.4 Endothelin-Signalweg

Endothelin-1 (ET-1) ist ein sehr stark vasokonstriktorisch wirkendes Peptidhormon, das hauptsächlich in den Gefäßendothelzellen gebildet wird und seine Wirkung über die membranständigen G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptoren A und B (ET_A/ET_B) entfaltet (143).

Neben ET-1 existieren noch zwei weitere bekannte Isoformen, ET-2 und ET-3, die unter anderem in Gefäßen, Herz, Lunge, Nieren, Darm, Magen, Ovarien und Gehirn exprimiert werden (144).

Hier soll speziell auf ET-1 eingegangen werden, da diese Isoform eine wichtige Rolle in der PAH spielt (143).

Eine Aktivierung des in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten ET_A-Rezeptors führt über die Kopplung mit der Phospholipase C, Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP3) und Öffnung des IP3-regulierten Kalzium-Kanals im endoplasmatischen Retikulum zu einer Vasokonstriktion sowie Zellproliferation, während die Aktivierung des endothelständigen ET_{B1}-Rezeptors über NO- und Prostazyklinfreisetzung zur Vasodilatation führt und für eine Clearance des zirkulierenden ET-1 zuständig ist (143). Der ET_A-Rezeptor ist dabei mit 85% deutlich ausgeprägter in Gefäßen exprimiert (144).

Des weiteren können ET_{B2}-Rezeptoren insbesondere bei Hypertonie auch in den glatten Muskelzellen exprimiert sein, wo sie wie ET_A-Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion und Zellproliferation führen (145).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 zu einer erhöhten Superoxidproduktion sowohl in vivo als auch ex vivo führt, wobei unter anderem eine erhöhte Expression der NADPH-Oxidase als Superoxidquelle aufgefunden werden konnte (146-149). Hierbei kann eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Diacylglycerol (als Nebenprodukt der IP3 Generierung durch die Phospholipase C) und nachfolgende PKC-vermittelte NADPH Oxidase-Aktivierung vermutet werden (150, 151). Andersherum konnte aber auch gezeigt werden, dass Superoxid die endothelinvermittelte Vasokonstriktion und die Endothelinexpression selbst durch eine oxidative Stabilisierung des ET-1 Promotors verstärkte, sodass von einer gegenseitigen Wechselwirkung ausgegangen werden kann (152-155). Die Freisetzung und Wirkung von ET-1 im Gefäßsystem ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die Hauptmenge an ET-1 scheint im Endothel aller Gefäßtypen produziert zu werden, wobei auch in vielen anderen Zelltypen ET-1 gemessen werden kann (144).

ET-1 entsteht über die Zwischenstufen Pro-ET-1 und Big ET-1 aus Preproendothelin (preproET-1). Es wird einerseits kontinuierlich aus Endothelzellen freigesetzt und trägt damit zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus bei, andererseits führen Stimuli wie Scherkräfte, Hypoxie, Hyperoxie, ROS, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Katecholamine, Insulin, Thrombin oder Angiotensin II zu einer Erhöhung der preproET-1 mRNA und Ausschüttung von Endothelin aus speziellen Vesikeln (144, 156).

ET-1 ist nicht nur für den Gefäßtonus wichtig, sondern spielt eine entscheidende Rolle auch für neurologische Funktionen, für den Wasser- und Säure-Basen-Haushalt, bei Karzinomwachstum und -progression sowie Autoimmunkrankheiten (157-161).

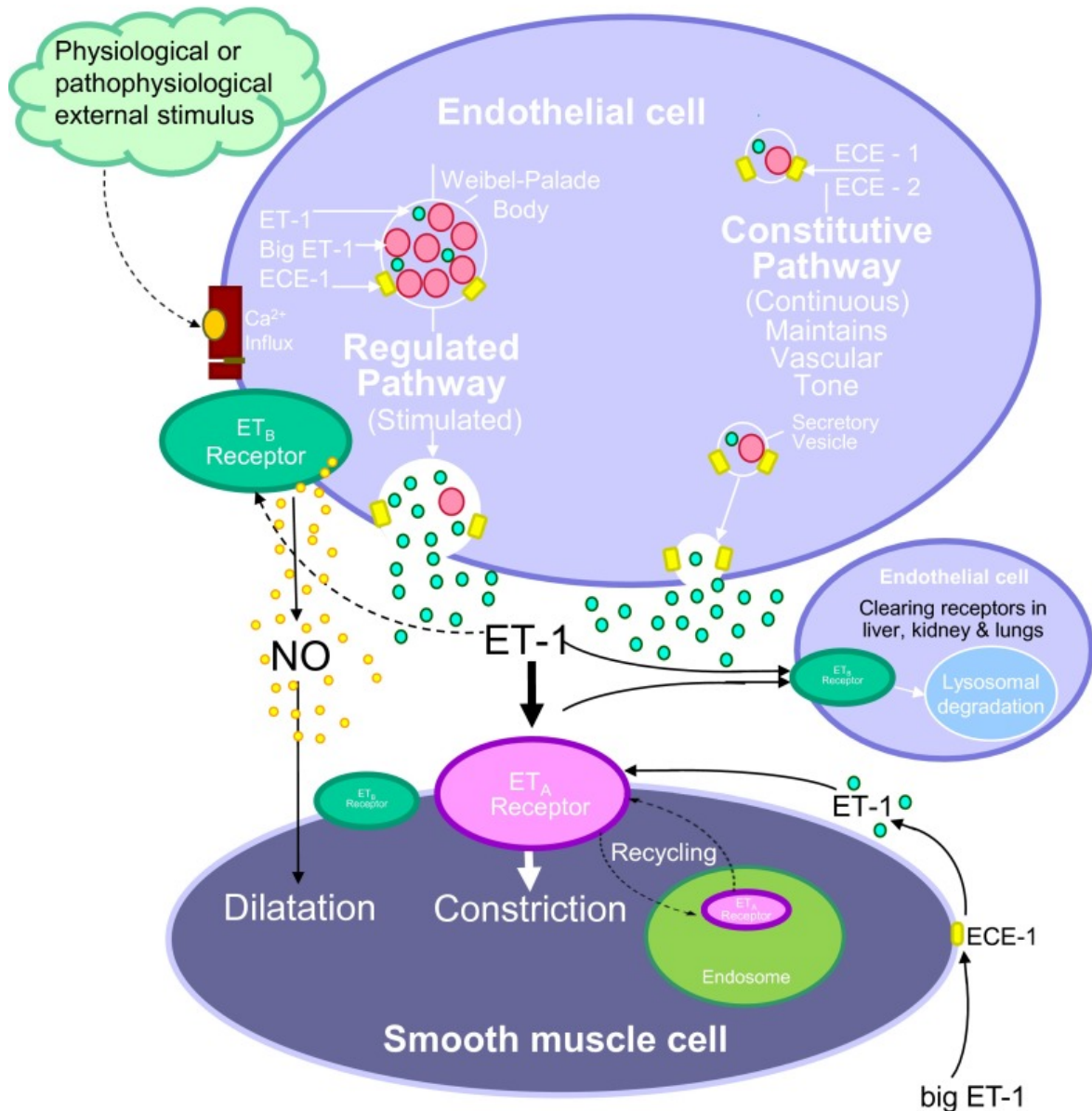


Abbildung 11: Synthese und Wirkung von ET-1. ET-1 wird kontinuierlich aus Vesikeln der Endothelzellen freigesetzt und ist damit an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt. Außerdem wird ET-1 durch externe Stimuli aus Weibel-Palade-Körperchen freigesetzt. Das abluminal freigesetzte ET-1 wirkt in humanen Gefäßen hauptsächlich an den ET_A -Rezeptoren der angrenzenden glatten Muskelzellen, wobei einige wenige ET_B -Rezeptoren ebenfalls an der glatten Muskelzelle sitzen und zur Vasokonstriktion führen. Ein Teil des ET-1 interagiert autokrin mit endothelialen ET_B -Rezeptoren und führt über eine Freisetzung von NO zu einer Limitierung der Vasokonstriktion. Abbildung aus (144)

Auch bei der Pathogenese der PAH spielt ET-1 eine große Rolle. Generell sind ET-Rezeptoren schon früh in der neonatalen Entwicklung in der Lunge ausgebildet und an der Lungenreifung beteiligt (162). In unterschiedlichen Modellen der PAH und bei Erkrankten wurden erhöhte Level an Endothelin gemessen (163-165).

2.3.5 Inflammation

Vaskuläre Dysfunktion, oxidativer Stress und Inflammation gehen bei kardiovaskulären Erkrankungen oft Hand in Hand. Die Zusammenhänge wurden von Siti et al. in einem Review zusammengefasst (166).

Inflammatorische Prozesse gehen einher mit erhöhter Interleukinproduktion, vermehrter Produktion von Kolonien-stimulierenden Faktoren (CSF) und Produktion verschiedener Chemokine (167). Im Endothel kommt es zu vermehrter Immigration von Leukozyten und Granulozyten, die wiederum die Produktion von Zytokinen induzieren. Am Beginn des Regelkreises stehen unter anderem Scherkräfte und Hypoxie, was die Verbindung mit der PAH deutlich macht.

Für die Immigration von Leukozyten und Granulozyten werden Adhäsionsmoleküle benötigt, von denen bereits eine ganze Reihe identifiziert wurde. Unter anderem zählen hierzu Selektine, Integrine und Superimmunglobuline (168). Letztere bzw. speziell ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) sollen aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit näher beleuchtet werden.

Beide sind Adhäsionsmoleküle und damit integrale Membranproteine mit extrazellulärer Glykosylierung an den Bindungsregionen.

ICAM-1 wird exprimiert auf Leukozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen. Es ist an der Zell-Zellkommunikation beteiligt, indem es zum Beispiel die Extravasation der Leukozyten bei einer Inflammationsantwort oder die Einwanderung in Lymphknoten ermöglicht. Es ist aber auch Angriffsfläche für Viren und Parasiten. So konnte ICAM-1 zum Beispiel als Rezeptor für Rhinoviren und Plasmodium falciparum identifiziert werden (170-173).

VCAM-1 wird auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Hauptsächlichste Funktion ist die Interaktion zwischen Endothel und Lymphozyten und Makrophagen im Falle einer Entzündungsreaktion (174).

Eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle wird unter anderem induziert durch Interleukine und Tumornekrosefaktoren (TNF) (172-174).

Abbildung 12 zeigt schematisiert den Ablauf einer Adhäsion und Immigration während einer Inflammationsreaktion.

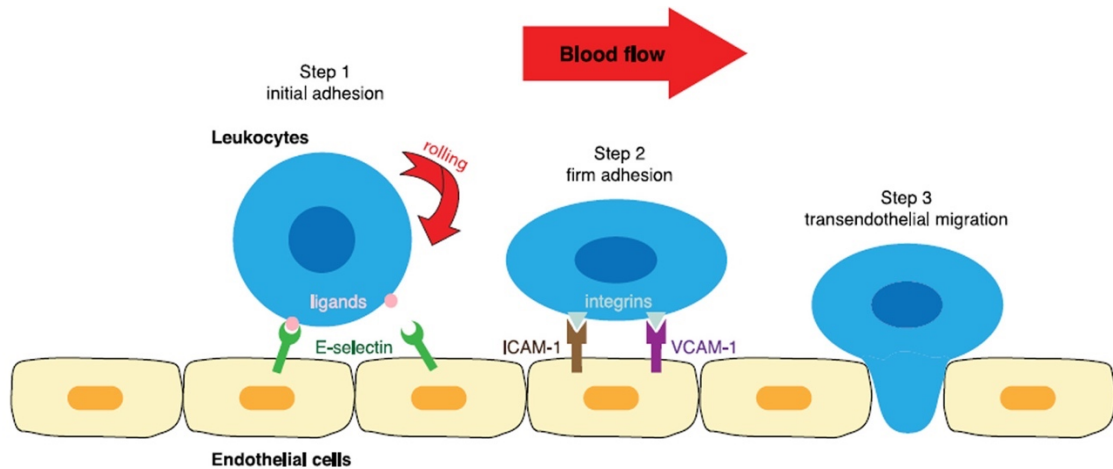


Abbildung 12: Adhäsion und Immigration der Leukozyten während einer Inflammationsreaktion. Im ersten Schritt werden durch Stimulation mittels proinflammatorischer Zytokine E-Selektine auf Endothelzellen exprimiert, an denen Leukozyten mithilfe von Liganden lose anhaften können und dann in Richtung des Blutflusses am Endothel entlang „rollen“. Diese rollenden Leukozyten werden dann im zweiten Schritt mittels lokal freigesetzter Chemokine aus Makrophagen und Endothelzellen aktiviert und exprimieren daraufhin Integrine auf ihrer Zelloberfläche, die es ihnen ermöglichen, durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 fester an den Endothelzellen zu haften. Dies ermöglicht den dritten Schritt, die transendotheliale Migration. Abbildung aus (169)

2.4 Organische Nitrate

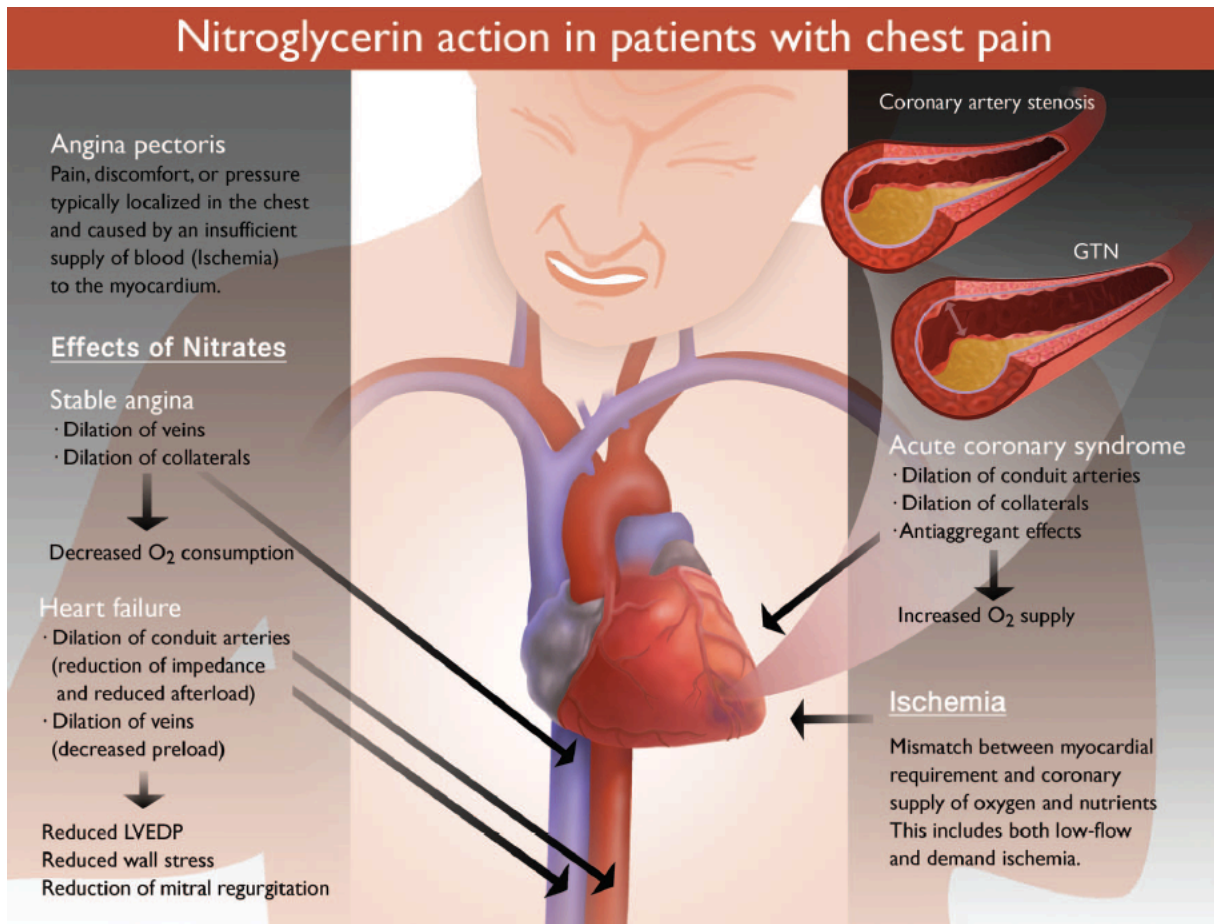


Abbildung 13: Wirkung von Nitraten bei akuten Brustschmerzen. Abbildung aus (121)

Organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5-mononitrat (ISMN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Pentaerythryltetranitrat (PETN) sind NO-Donoren und werden zur akuten Therapie von Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und Hypertonie angewendet (121).

Sie wirken über eine Dilatation der venösen Kapazitätsgefäße, der größeren Koronararterien und der Aorta, während Arteriolen mit einem Gefäßdurchmesser <100 µm nitratresistent sind (175, 176). Dies führt zu einem venösen Pooling und Vorlastreduktion, was wiederum zu einer verminderten Druckbelastung in den Ventrikeln und damit zu einer verminderten Wandspannung führt, wodurch einerseits der kardiale Sauerstoffverbrauch vermindert und andererseits über eine Steigerung des diastolischen Flusses in den Koronararterien die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels verbessert wird (177). Auch die Nachlast wird über Mechanismen wie das Pooling und über direkte vasodilatative Wirkung in der Aorta gesenkt und damit

eine bestehende Herzinsuffizienz verbessert (178). Veranschaulicht wird dies in Abbildung 13.

Ihre Wirkung entfalten organische Nitrate über eine NO-Freisetzung (siehe Abbildung 14), was zur weiter oben beschriebenen Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, Ca^{2+} -Inhibition und Relaxation der glatten Muskelzellen führt (siehe Kapitel 2.3.2).

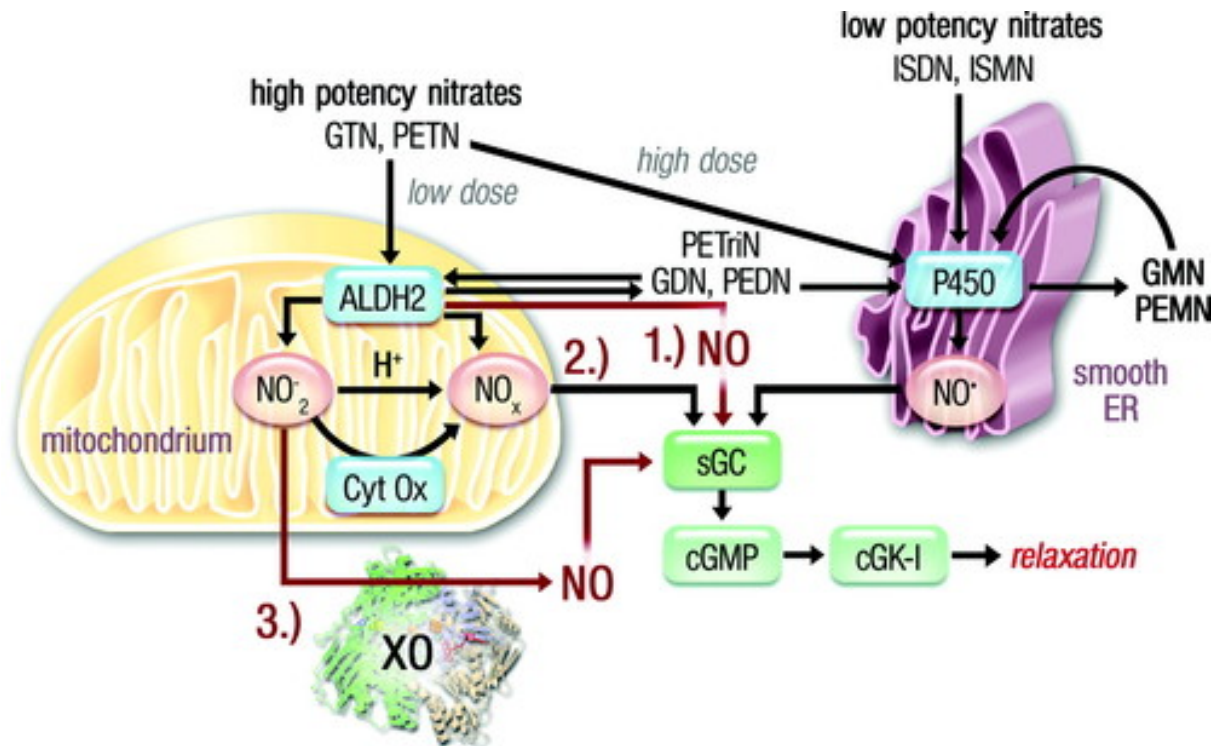


Abbildung 14: Bioaktivierung organischer Nitrate. Links sind die hochpotenten organischen Nitrate abgebildet (GTN, PETN), die in niedrigen Dosierungen ($<1 \mu\text{mol/l}$) über die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) bioaktiviert werden. Über die Reduktaseaktivität werden diese in ihre denitrierten Metabolite (1,2-Glyceryldinitrat, PETriN, PEDN) abgebaut. Über drei Wege erfolgt die Bildung von NO: 1.) über direkte NO-Bildung über die ALDH-2, 2.) über eine Reduktion von NO_2^- (Nitritanion) zu NO über mitochondriale Cytochrom C-Oxidase und 3.) über eine Reduktion von NO_2^- über die zytosolische Xanthinoxidase. Auf der rechten Seite ist die Bioaktivierung von den niedrigpotenten organischen Nitraten ISDN und ISMN, aber auch GDN, PEDN sowie von hochdosierten GTN und PETN ($>1 \mu\text{mol/l}$) über P450-Enzyme im endoplasmatischen Retikulum dargestellt, die zu einer direkten NO-Freisetzung führt. Abbildung aus (121)

Allerdings konnte durch die Behandlung mit Nitraten zwar eine Verbesserung von Symptomen, aber kein Vorteil im Langzeitüberleben von Patienten mit Myokardinfarkt festgestellt werden (179, 180). Im Gegenteil war die Prognose in einigen Studien sogar schlechter durch eine chronische Nitratbehandlung nach Myokardinfarkt (181, 182) oder bei Diabetes mellitus und Koronarintervention (183).

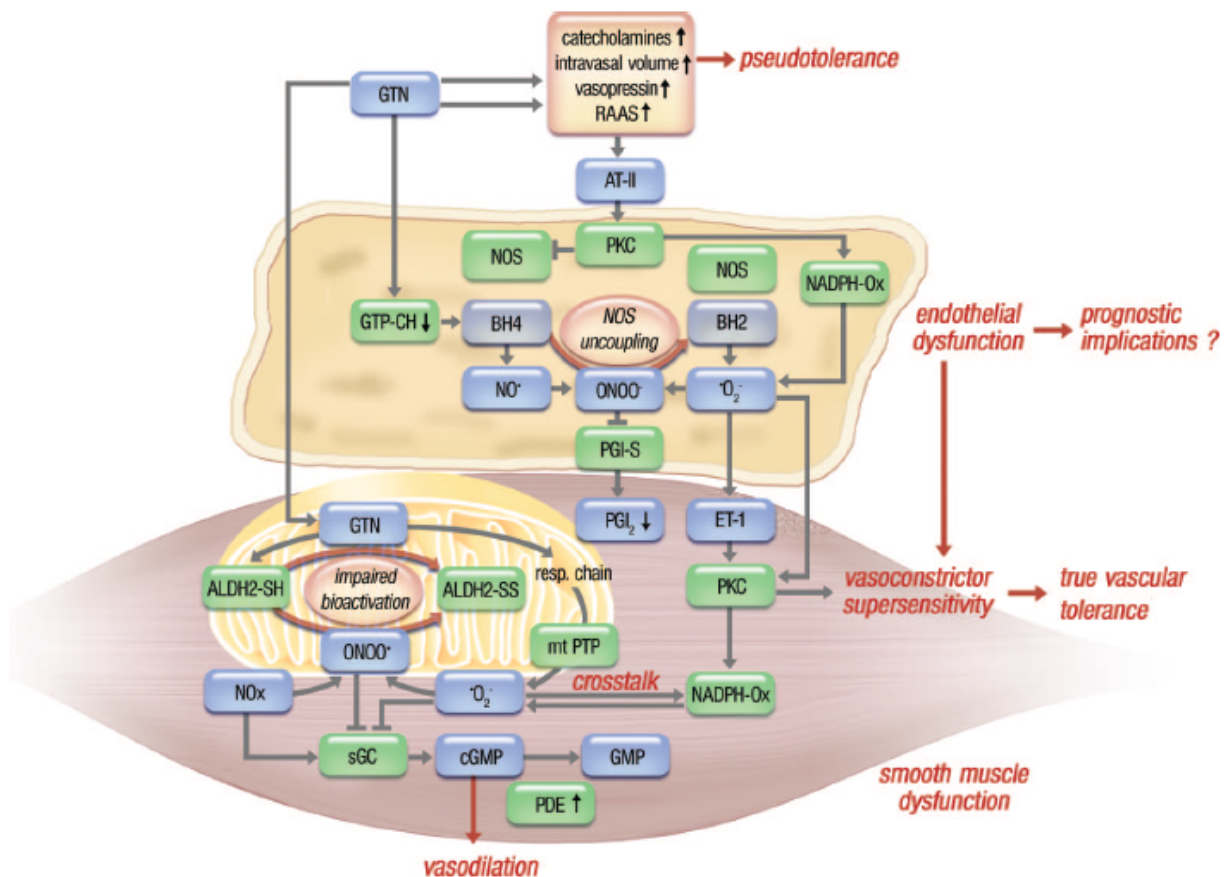


Abbildung 15: Molekulare Mechanismen der Nitratoleranz. Bereits nach einem Tag kontinuierlicher Verabreichung einer niedrigen Dosis Glyceroltrinitrat (GTN) kommt es zu einer neurohormonalen Gegenregulation durch erhöhte Katecholamin- und Vasopressin-Plasmalevel, erhöhtes intravasales Volumen und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Pseudotoleranz). Nach drei Tagen entwickelt sich eine endotheliale und muskuläre Dysfunktion (vaskuläre und Kreuztoleranz) durch verschiedene Mechanismen: 1) erhöhte Superoxidproduktion durch Proteinkinase C (PKC)-vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase und in Mitochondrien; 2) direkte Hemmung der NO-Synthase (NOS) durch die PKC; 3) Entkopplung der eNOS durch reduzierte Verfügbarkeit von BH₄ durch Peroxynitrit-induzierte Oxidation des BH₄ und reduzierte Expression der GTP-Cyclohydrolase-1 (GTPCH); 4) Überempfindlichkeit auf Vasokonstriktoren durch erhöhte PKC-Aktivität in glatten Muskelzellen; 5) verminderte GTN-Aktivierung durch Hemmung der Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH-2); 6) Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Superoxid und Peroxynitrit; 7) vermehrter Abbau des cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE); 8) Hemmung der Prostazyklinsynthase (PGI₂-S) durch Peroxynitrit und damit verminderte Prostazyklinsynthese. Abbildung aus (121)

In ihrer langfristigen Anwendung sind organische Nitrate außerdem limitiert, da es zu einer Toleranzentwicklung, oxidativem Stress und Gefäßdysfunktion kommt (13, 121), siehe Abbildung 15. Dies könnten Gründe für das schlechte Outcome bei einer Nitratbehandlung sein (178).

Aktiviert werden die meisten Nitrate über die Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) (184). Durch die Entstehung von oxidativem Stress durch chronische Nitrattherapie kommt es allerdings zur Inaktivierung der ALDH-2, so dass die Nitrate nicht mehr zu NO biotransformiert werden können und ihre Wirkung verlieren (185).

Diese negativen Effekte bei chronischer Administration konnten allerdings nicht bei PETN beobachtet werden (13, 121, 186). Daher wurde dieses Nitrat in Hinblick auf möglicherweise bessere Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen Studien getestet, unter anderem in experimentellem Diabetes mellitus, experimenteller ATII-induzierter Hypertonie sowie in einer klinischen Phase-III-Studie bei stabiler Angina pectoris (20, 21, 187) und konnte dabei jeweils als bevorzugte Behandlungsmöglichkeit identifiziert werden (Vergleich Diskussion).

Im Folgenden daher ein Überblick über PETN:

2.4.1 PETN

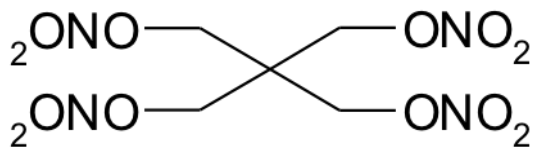


Abbildung 16: Strukturformel PETN

Pentaerythrityltetranitrat (PETN) gehört zu den organischen Nitraten und findet sowohl als Medikament als auch als Sprengstoff Verwendung. Im Gegensatz zu GTN enthält PETN 4 Nitratgruppen (Abbildung 16).

In Studien an gesunden humanen Probanden konnte gezeigt werden, dass eine dauerhafte Behandlung mit PETN im Gegensatz zu GTN einen gleichbleibenden vasodilatatorischen Effekt hatte, keine Entwicklung von oxidativem Stress begünstigte und keine Gefäßdysfunktion auslöste (15, 16).

Diese protektiven Effekte werden über eine Induktion der Hämoxxygenase (HO-1) mit einhergehender Erhöhung der Ferritin-, Bilirubin- und Kohlenmonoxid-(CO-)Level sowie eine Induktion der ecSOD hervorgerufen (19, 20, 188-191). Ferritin bindet Eisen und verhindert damit eine Bildung von Hydroxylradikalen, Bilirubin ist ein Antioxidans und CO aktiviert die sGC, was zu einer Vasodilatation führt (siehe auch Kapitel 2.3.3.2).

Allerdings führt PETN wie andere organische Nitrate zu den nitrattypischen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Hypotonie und Tachykardie, wobei die Toxizität aber sehr gering und damit die therapeutische Breite groß ist (192).

Die Aktivierung erfolgt wie auch bei GTN über die ALDH-2, wobei es durch die fehlende Entwicklung von oxidativem Stress nicht zur Inaktivierung der ALDH-2 und damit nicht zur Toleranzentwicklung kommt (193).

Die Zusammenfassung der protektiven Effekte von PETN findet sich in Abbildung 17.

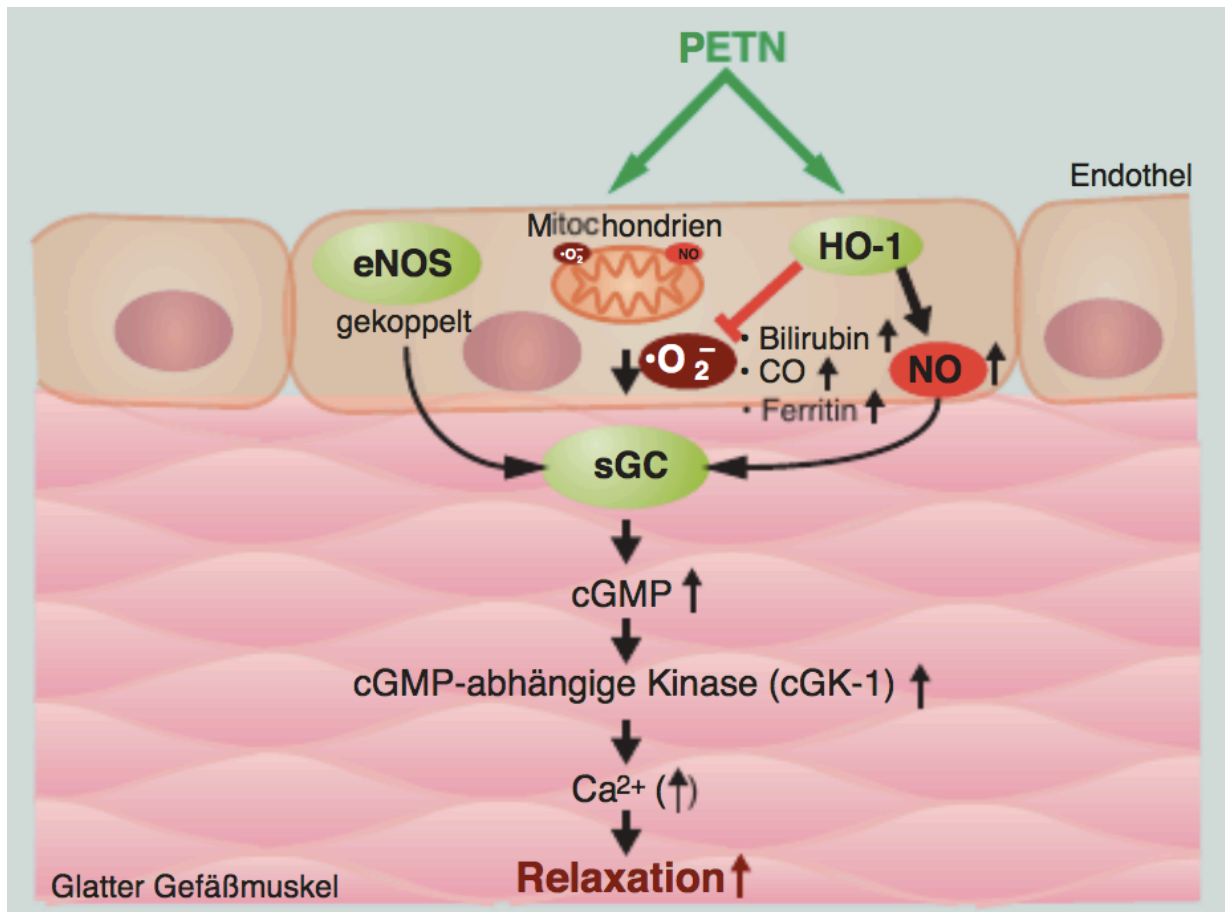


Abbildung 17: Vorbeugung einer Nitrattoleranz und endothelialer Dysfunktion durch Therapie mit PETN. Im Gegensatz zu GTN stimuliert PETN die Expression des protektiven Enzyms Hämoxygenase 1 (HO-1), die durch ihre antioxidativen Reaktionsprodukte wie Bilirubin und Kohlenmonoxid (CO) zu einer Reduktion der ROS und einer Aktivierung der sGC beiträgt. Durch die ebenfalls beim Metalloporphyrinabbau entstehenden freien Eisenmoleküle wird die Produktion von Ferritin angeregt, was langfristig toxische Spiegel freien Eisens senkt. Somit wird einer Entkopplung der eNOS, mitochondrialem oxidativen Stress sowie einer Inaktivierung der ALDH-2 vorgebeugt. Dies bewirkt eine dauerhaft erhaltene vasodilatative Wirkung von PETN und eine erhaltene Gefäßfunktion. Abbildung aus (194)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamide-bis solution 40%	Bio-Rad Laboratories, München
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham Protran 0,45 μ m Nitrocellulose Blottingmembran	GE Healthcare, Chicago, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Aqua B. Braun	B. Braun, Melsungen
Benchmark™ Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl_2)	Fluka & Riedel, Seelze
Cytochrom C (12384 g/mol)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Detection Solution 1 Peroxidase	Thermo Fisher Scientific, USA
Detection Solution 2 Luminol	Thermo Fisher Scientific, USA
Dextran 500 (500000g/mol)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dihydroethidium 95% (DHE)	Fluka & Riedel, Seelze
DMSO (Dimethylsulfoxid 99,5%)	Sigma-Aldrich, Hamburg
DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)- Radikal	Sigma-Aldrich, Hamburg
DTT (Dithiothreitol)	AmershamLife Science, Buckinghamshire, Großbritannien
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Hamburg

EDTAfree COMPLETE Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Essigsäure 100% (Eisessig)	AppliChem, Darmstadt
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acetyl-(Ala11.15)-Endothelin-1 (6-21) (BQ3020)	Bachem, Schweiz
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis (aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Cölbe
Glukose 45%	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GTN (Glyceroltrinitrat)	G. Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Guanidinthiocyanat	AppliChem, Darmstadt
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
Hepes	Sigma-Aldrich, Hamburg
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, Hamburg
Hypoxanthin (136,11 g/mol)	Fluka & Riedel, Seelze
Indomethazin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Isopropanol (2-Propanol)	Aug. Hedinger, Stuttgart
Isopropylalkohol 100%, 96%, 70%	Hedinger, Stuttgart
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Hamburg
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido [3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)Dion)	Wako Chemicals, Neuss
Leupeptin HCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Luzigenin	Fluka & Riedel, Seelze

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Mallory Rot	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR International, Darmstadt
Milchpulver (MLK)	Carl Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosine	Sigma-Aldrich, Hamburg
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Sigma-Aldrich, Hamburg
NaCl-Lösung, isoton (0,9%)	B. Braun, Melsungen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Nitrolingual	G. Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Phorbolesterdibutyrat (PDBu)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg
PETN (Pentaerythryltetranitrat, 25% PETN, 75% Lactose)	Actavis, Langenfeld
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Merck, Darmstadt
Phenol (wassergesättigt)	AppliChem, Darmstadt
Phenylephrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail (P2850)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphormolybdänsäure 1%	VWR, Darmstadt
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau-S Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg
Povidon-Iod-Lösung (Braunol)	B. Braun, Melsungen
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, München
Protease-Inhibitor-Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, München
Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, München

Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Laboratories, München
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Roti [®] -Quant	Carl Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Spezialdiät PETN	Ssniff Spezialdiäten
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Succinat	Fluka & Riedel, Seelze
Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich, Hamburg
TEMED	Sigma-Aldrich, Hamburg
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden
Trichlormethan (CHCl ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-base)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris-HCl(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Triton X-100	Fluka & Riedel, Seelze
Tween-20	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe
Zymosan A	Sigma-Aldrich, Hamburg

3.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Firma
Peroxidase labeled anti-mouse made in horse (1:10.000)	PI-2000	Vector Lab, Burlingame
Peroxidase labeled anti-rabbit made in goat (1:10.000)	PI-1000	Vector Lab, Burlingame
Anti-β-Actin-AK (1:2500) - rabbit	A5060	Sigma Aldrich, Hamburg
Anti-NADPH-Oxidase-2-AK (1:500) - mouse	611414	BD Bioscience, USA
Anti-3-Nitrotyrosin-AK (1:1000) - mouse	05-233	Millipore, Billerica, USA

3.1.3 TaqMan® Primer

Bezeichnung	Assay ID	Firma
Hämoxxygenase 1 (Hmox1)	Rn00561387_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
Endothelin-1 (Edn1)	Rn00561129_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
Endothelin-1 Rezeptor A (Ednra)	Rn00561137_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
Endothelin-1 Rezeptor B (Ednrb)	Rn00569139_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
Endothelin konvertierendes Enzym-1 (ECE-1)	Rn00585943_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1)	Hs00365485_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	Hs99999152_m1	Thermo Fisher Scientific, USA
TATA-Box bindendes Protein (TBP)	Hs00427620_m1, Rn01455646_m1	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
S-Monovette Blutentnahmesystem (7,5 ml Heparinröhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
96-well plate Nunclon™ Surface	Thermo Fisher Scientific, USA
Cellstar® PP-Test tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro PS	Brand, Wertheim/Grossostheim
Pipetten 10 ml	Greiner, Bischofsheim
Einmalskalpell	Feather Safety Razer, Osaka, Japan
Eppendorfgefäße 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Gel Blotting Papier	Whatman-Schleicher & Schuell, Dassel
MicroAmpFastOptical96wellPlate	Thermo Fisher Scientific, USA
Mini-Trans-Blot Filterpapier	BioRad Laboratories, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman-Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht

RNA-sterile Eppendorfggefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Starlab, Belgien
Injekt F Spritzen	B.Braun, Melsungen
Sterican ® Injektionskanüle Gr.18	B.Braun, Melsungen
Tissue-Tek® OCT™ Compound	Sakura Finetek, Staufen
Petrischalen	Greiner, Bischofsheim

3.1.5 Geräte

Gerät	Firma
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex, Norderstedt
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, USA
ChemiLux Imager CsX-1400M	Intas, Göttingen
Cryostat CM3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar
FeinwaageARJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
HBO 50 W/AC Lampe	Osram GmbH, München
Heiztisch	Visual Sonics, Kanada
Homogenisator RW16 Basic	IKA Werk Laboratory Equipment
In-vivo Micro-Imaging System Vevo 770	Visual Sonics, Kanada
LEICA TP1020 Einbettungskarussell	Leica Biosystems, Wetzlar
Durchlichtmikroskop MZ 5400	A.KRÜSS Optronik GmbH, Hamburg
Mini Trans-Blot Cell System	BioRad Laboratories, München
Mini-Protean-III-System	BioRad Laboratories, München
Minifold I vacuum dot blot device	Whatman –Schleicher & Schuell
Mikropräparierschere + Pinzette	Fine Science Tools, USA
NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Organbadanlage Handgeblasene Organbäder, Transducer und Bridge Amplifier 2x4 von Kent und PowerLab 8sp	ADInstruments, Neuseeland

Organbäder und Transducer von Radnoti, Octal Bridge Amplifier und 8/30 Power-Lab	ADInstruments, Neuseeland
PCR-device StepOnePlus™	Thermo Fisher Scientific, USA
PH-Meter Microprozessor PH211	Hanna Instruments, Vöhringen
Photometer Helios α v4.60	Thermo Electron Corporation, USA
Platereader Lumat LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Platereader MRX _c	DYNEX Technologies, USA
Scanner	Epson, Japan
Semimikrowaage LE225D	Sartorius, Göttingen
Tube luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Thermostat 2761	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallhomogenisator Sonopuls	Bandelin, Berlin
Ultraschallnadel HD 2070	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Discovery M120SE	Sorvall Kendro Laboratory Products
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, USA
Zentrifuge Mikro 22R	Andreas Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotofix 32	Andreas Hettich, Tuttlingen

3.1.6 Auswertungsprogramme

Axio Vision Mikroskop Software	Carl Zeiss, Jena
Gel Pro Analyzer Software	Media Cybernetics, Bethesda, MD
Revelation Software	DYNEX Technologies, USA
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.7 Puffer und Lösungen

3.1.7.1 Krebs-HEPES-(KH-)Puffer

Natriumchlorid	99,01 mM
Kaliumchlorid	4,69 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat	1,03 mM
Glukose	11,1 mM
Na-HEPES	20 mM
Natriumhydrogenkarbonat	25 mM

pH 7,4

3.1.7.2 Organbadpuffer

Natriumchlorid	118,3 mM
Kaliumchlorid	4,69 mM
Calciumchlorid	1,87 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat	1,03 mM
Glukose	11,1 mM
Natriumhydrogenkarbonat	25 mM
Indometacin	17,875 mg in 15 ml

pH 7,35

Temperatur 37°C

3.1.7.3 Krebs-HEPES-Inhibitoren-puffer

Aprotinin (1,2 mg/ml H ₂ O)	100 µl
Pepstatin (2,5 mg/ml EtOH)	40 µl
Leupeptin (5 mg/ml H ₂ O)	10 µl

auf 10 ml KH-Puffer

3.1.7.4 PBS Ca²⁺/Mg²⁺

Kalziumchlorid	1 mM
Magnesiumchlorid	1 mM

in PBS

3.1.7.5 Tris-Mem-Puffer

Tris-HCl	50 mM
EDTA-free COMPLETE	1 Tablette ad 50 ml

pH 7,4

3.1.7.6 Tris-DTT-Puffer

Tris-Mem-Puffer	10 ml
DTT	1 mM

3.1.7.7 Homogenisierungspuffer (Hg-Puffer)

Tris-HCl	20 mM
Saccharose	250 mM
EGTA	3 mM
EDTA	20 mM

pH 7,5

3.1.7.8 Homogenisierungslösung (Hg-Lösung)

Protease Inhibitor Cocktail	100 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail	100 µl
PMSF (0,1 M in Methanol, final 0,5 mM)	50 µl
Triton X-100	100 µl

auf 10 ml Homogenisierungspuffer

3.1.7.9 Western Blot Waschlösung PBS (Phosphat Buffered Saline)

NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	200 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM

pH 7,6

3.1.7.10 Western Blot Waschlösung PBS-T

Tween-20 1 %

in PBS

3.1.7.11 Western Blot Waschlösung PBS-TT

TritonX-100 3 %

Tween-20 1 %

*in PBS***3.1.7.12 Western Blot Waschlösung TBS (Tris Buffered Saline)**

Tris base 200 mM

Natriumchlorid 1,4 M

*pH 7,6***3.1.7.13 Western Blot Waschlösung TBS-T**

Tween-20 1%

*in TBS***3.1.7.14 Lämmli-Puffer (3x)**

Tris-HCl (pH 6,8) 0,188 mol

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 60 mmol

Glycerol 30 %

Bromphenolblau 0,01 %

 β -Mercaptoethanol 1,5 % (erst vor Gebrauch hinzufügen)**3.1.7.15 SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)**

TRIS-Base 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 3,5 mM

*pH nicht adjustiert***3.1.7.16 SDS-PAGE-Transfer-Puffer (= Blotting-Puffer)**

TRIS-Base 25 mM

Glycin 192 mM

Methanol 20 %

pH nicht adjustiert

3.1.7.17 Trenngelpuffer

Tris-HCl 1,5 M

*pH 8,8***3.1.7.18 Sammelgelpuffer**

Tris-HCl 0,5 M

*pH 6,8***3.1.7.19 SDS-Lösung (Sodium Dodecylsulfat) 10 %**

SDS 10 g

*auf 100 ml H₂O_{dest}***3.1.7.20 Ammoniumpersulfat (APS) 10%**

APS 10 g

*auf 100ml H₂O_{dest}***3.1.7.21 Blockmedien**

TBS-T + 3 % BSA

TBS-T + 5 % MLK

PBS-T + 3 % BSA

PBS-T + 5 % MLK

3.1.7.22 Sammelgel 4 %

Acrylamid (40 %)	1	ml
APS (10 %)	50	µl
SDS (10 %)	50	µl
TEMED	5	µl
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,6)	1,2	ml
H ₂ O _{dest}	3,2	ml

3.1.7.23 Trenngel 10 %

Acrylamid (40 %)	2,5 ml
APS (10 %)	100 µl
SDS (10 %)	100 µl
TEMED	10 µl
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
ad H ₂ O _{dest}	4,8 ml

3.1.7.24 Git-Puffer

Guanidinthiocyanat	4 M
Na-Citrat (pH 7)	25 mM
N-Laurylsarcosine	0,5 %
β-Mercaptoethanol	360 µl/50 ml (vor Gebrauch zugeben)

3.1.7.25 DPPH-Arbeitslösung

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl, 394,32 g/ mol)
in Methanol, finale Konzentration 50µM

3.2 Methoden

3.2.1 Behandlung der Tiere

Für die Experimente wurden 90 männliche, 8 Wochen alte und ca. 250g schwere Wistar Ratten benötigt. Alle Tiere wurden nach dem Leitfaden für die Pflege und Verwendung von Labortieren (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) des US National Institutes of Health behandelt und der Versuchsaufbau von der Ethikkommission der Mainzer Universität und dem Landesuntersuchungsamt genehmigt (#23 177-07/G 10-1-039).

Das Monocrotalin (MCT)-Rattenmodell ist ein allgemein anerkanntes Modell zur Induktion einer PAH, allerdings mit Einschränkungen in Bezug auf die genaue Wiedergabe aller pathophysiologischen Merkmale der PAH beim Menschen (46-48, 195).

Bei den Ratten wurde durch die einmalige Injektion von MCT in die Vena dorsalis penis eine pulmonale arterielle Hypertonie induziert. Wir wählten diese Applikationsart, da wir in unserem Labor damit bereits bei dem Tiermodell des streptozotocininduzierten Diabetes mellitus gute Erfahrungen gesammelt und eine sehr gute Wirksamkeit festgestellt hatten (21, 196).

Zunächst wurde durch die Gabe verschiedener Dosen MCT das beste Dosis-Wirkungs-Verhältnis insbesondere in Hinblick auf die geringste Sterblichkeit ermittelt. Es wurden jeweils 30, 40 oder 60mg/kg KG MCT gespritzt und die Tiere nach jeweils 2, 4 und 6 Wochen untersucht.

Es zeigte sich, dass die Dosis von 40 mg MCT nach einer Behandlungsdauer von 4 Wochen in Bezug auf Effektivität und Mortalität die besten Ergebnisse brachte, weshalb dieses Modell für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde (siehe Ergebnisteil).

Die Behandlung der Tiere mit Pentaerythryltetranitrat (PETN) erfolgte p.o. über die Nahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Germany) in einer Dosierung von 10 mg/kg KG/Tag. Die Kontroll- und MCT-Gruppe erhielten Standardfutter.

Die Behandlung mit PETN wurde 3 Tage nach der MCT-Injektion begonnen und erfolgte über 3,5 Wochen.

3.2.2 Echokardiografie

Die Echokardiographie wurde angewendet, um den pulmonalarteriellen Druck (PAP) zu ermitteln. Der PAP korreliert mit der pulmonalarteriellen Beschleunigungszeit (PAAT, pulmonary arterial acceleration time), die sich anhand der parasternalen Doppler-Messung am rechtsventrikulären Ausflusstrakt ermitteln lässt und als das Intervall vom Beginn des Flusses bis zur maximalen Flussgeschwindigkeit während der Systole definiert ist (197).

Nach Urboniene et al. lässt sich der PAP anhand der Formel $mPAP = 58.7 - (1.21 \times PAAT)$ errechnen und die Genauigkeit der Messung ist mit der invasiven Kathetermessung vergleichbar (198).

Beim Menschen wird der sPAP nach Yock et al. mithilfe der Gleichung $sPAP = JVP + \Delta P$ berechnet, wobei JVP der klinisch ermittelte mittlere jugularvenöse Druck ist und ΔP der transtrikuspidale Gradient in mmHg, der wiederum mithilfe der modifizierten Bernoulli-Gleichung $\Delta P = 4V^2$ berechnet wird. Hierbei steht V für die durchschnittliche maximale Geschwindigkeit des trikuspidalen Refluxflusses in m/s (199).

Für die Untersuchung wurden die Tiere in einer Kammer mit 2-4% Isofluran und 0,2L/min O₂ in Narkose versetzt und diese durch eine Maske mit 1-2% Isofluran und 0,2L/min O₂ aufrechterhalten.

Während der Untersuchung wurden die Herzfrequenz und die rektale Körpertemperatur gemessen und die Temperatur über eine heizbare Unterlage (Visual Sonics) bei 37°C gehalten.

Das verwendete Ultraschallgerät war ein hochauflösendes Vevo 770 System mit 25MHz Transducer (Visual Sonics) und einer Sweepgeschwindigkeit von 400-800mm/s.

Es wurden zweidimensionale Bilder der Pulmonalklappe in der parasternalen kurzen Achse und Doppleraufnahmen des Blutflusses an der Pulmonalklappe erstellt.

Die Echokardiographie wurde von Dr. Moritz Brandt (AG Wenzel) durchgeführt und mit seiner Hilfe ausgewertet.

3.2.3 Tötung und Organentnahme

Den Ratten wurden unter einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran der Bauchraum eröffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Um die Blutgerinnung in den Gefäßen zu verhindern und um die Gefäße weiter verwenden zu können, wurde den Tieren 1 ml Heparin in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens injiziert.

Dann wurde aus dem rechten Ventrikel mit einer Spritze die maximal mögliche Menge Blut entnommen. Die Organe wurden wie in Abbildung 18 dargestellt entnommen. Das Herz wurde entnommen, indem es von allen Gefäßen abgetrennt wurde. Die Aorta wurde von der Aufteilung in die Iliakalgefäße bis zum Aortenbogen im Ganzen aus den Tieren herausgeschnitten. Die Pulmonalarterien wurden entnommen, ebenso die Lungen selbst. Alle Organe wurden bis zur Weiterverwendung in KH-Puffer und auf Eis gelagert.

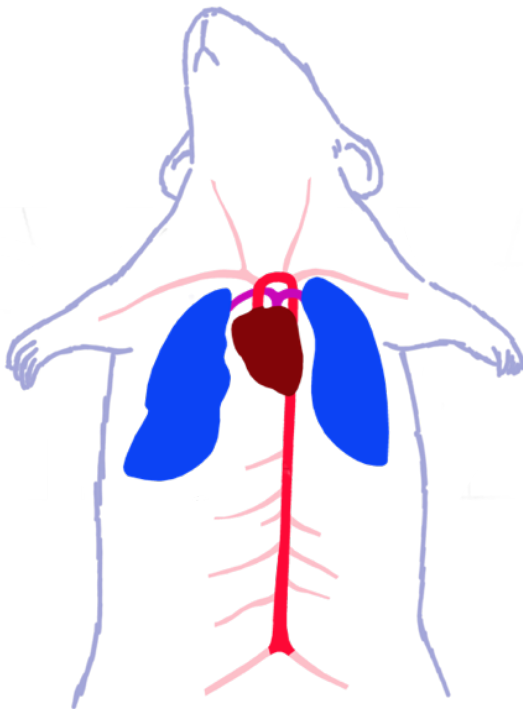


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Organe, die für die weiteren Versuche verwendet wurden: Lunge: blau. Herz: braun. Aorta: rot. Truncus pulmonalis und Pulmonalarterien: pink.

3.2.4 Organgewichtsbestimmung

Alle Tiere wurden vor der Tötung gewogen.

Für die Gewichtsbestimmung der Herzen und Lungen wurden diese auf einem Filterpapier trocken getupft und dann mit einer Semimikrowaage gewogen.

Für jedes einzelne Tier wurden die Relationen der Herz- und Lungengewichte zum Körpergewicht errechnet.

3.2.5 Präparation der Aorten

Die Aorten wurden unter Sicht durch das Mikroskop von umliegendem Fett und Bindegewebe befreit, ohne sie zu quetschen oder zu zerren, um das Endothel nicht zu verletzen.

Alle Schritte wurden in KH-Puffer und auf Eis gelagert durchgeführt.

3.2.6 Isometrische Gefäßtonusstudien (Organbad)

Hintergrund:

Im Organbad wurde die Relaxationsfähigkeit bzw. die Endothelfunktion der Aorten und Pulmonalarterien wie von Münzel et al. vorgeschrieben überprüft (12). Gefäßendothelien reagieren auf Acetylcholin (ACh) mit einer Relaxation. Ist das Endothel geschädigt, diffundiert ACh zu den glatten Muskelzellen der Gefäße und bewirkt hier eine Kontraktion (siehe auch Kapitel 5.3.4). Zusätzlich wurde die alleinige Relaxationsfähigkeit der Gefäßmuskulatur mittels Zugabe von Nitroglycerin als NO-Donator überprüft.

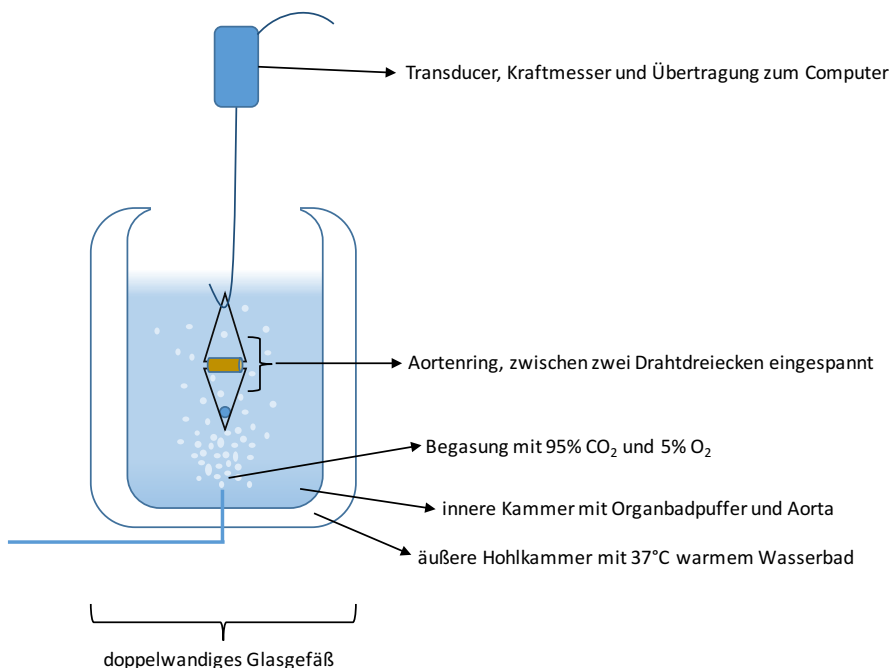


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Organbad-Kammer

Durchführung:

Für die Messung der Relaxationskurven im Organbad wurden die thorakalen Aorten der Ratten von Fett und Bindegewebe befreit und in drei bis fünf Millimeter lange

Ringe geschnitten. Diese wurden in KH-Puffer auf Eis gelagert. Verwendete Geräte waren Organbadanlage Handgeblasene Organbäder, Transducer und Bridge Amplifier 2x4 von Kent und PowerLab 8sp, ADInstruments sowie Organbäder und Transducer von Radnoti, Octal Bridge Amplifier und 8/30 Power-Lab, ADInstruments. Die Aortenringe wurden zwischen zwei triangelförmig gebogenen Drähten aufgespannt und ein Draht am Transducer (Kraftmesser) und einer an einem festen Haken eingehängt. So befand sich die Aorta frei hängend im doppelwandigen Organbad-Glasgefäß (siehe Abbildung 19).

Die äußere Kammer des Glases war mit 37°C warmem Wasser durchspült. Die innere Kammer wurde mit dem auf 37°C vorgewärmten Organbadpuffer befüllt, der in der Anlage mit 95% CO₂ und 5% O₂ begast wurde, um ein möglichst körperähnliches Milieu zu schaffen.

Dann wurde eine manuelle Vorspannung der Gefäße vorgenommen, um eine Nulllinie festzulegen. Dazu wurden die Transducer auf 0,4 g Zuggewicht eingestellt und alle sieben Minuten um ca. 0,6 g erhöht bis auf einen Zug von 3 g, welcher als Nulllinie festgelegt wurde.

Nun folgte die Stimulation zur Kontraktion durch Kaliumchlorid (KCl), um die Funktionsfähigkeit der Aorten zu prüfen und die maximale Konstriktion festzustellen. Nach Zugabe von 1 ml 2 M KCl je Aorta wurde gewartet, bis sich ein Plateauzustand eingestellt hatte. Anschließend wurde das Stimulans ausgewaschen und der Vorgang nochmals wiederholt.

Nach erneutem Auswaschen wurde 10 Minuten gewartet, bis sich die Gefäße wieder auf ihrer Nulllinie eingependelt hatten. Die KCl „Trainingsrunden“ förderten auch die nachfolgende Reaktionsfähigkeit auf den Vasokonstriktor Phenylephrin und die Vasodilatoren.

Anschließend wurden die Dosiswirkungskurven erstellt, indem KCl in steigenden Dosen von 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM und 80 mM zugefügt wurde.

Anschließend wurde das Gefäß wieder ausgewaschen und zehn Minuten gewartet, bis es sich auf der Nulllinie eingependelt hatte. Gegebenenfalls wurde manuell nachgestellt.

Für die Gefäßrelaxationsmessung wurde das Gefäß zunächst durch Zugabe von 33 µM Phenylephrin vorkontrahiert und eine stabile Plateaueinstellung abgewartet, die idealerweise bei ca. 65% der maximalen KCl-induzierten Konstriktion lag.

Dann wurden die Relaxationskurven für Acetylcholin erstellt, anhand derer die Endothelfunktion überprüft wurde.

Das Vorgehen ist wie bei der KCl-Dosiswirkungskurve: ansteigende kumulative Konzentrationen ACh wurden zugegeben (finale Konzentration von 10^{-9} bis $10^{-5,5}$ M) und jeweils bis zum Erreichen eines Plateaus bzw. zwei Minuten gewartet.

Nachdem das letzte Plateau erreicht war, wurde die Substanz wieder ausgewaschen und das Einpendeln auf der Nulllinie abgewartet.

Im Anschluss wurde die dritte Dosiswirkungskurve erstellt, eine Relaxationskurve mit Nitroglycerin (GTN) zur Überprüfung der Gefäßmuskulatur.

Das Vorgehen war wie oben beschrieben: nach Vorkontraktion mit PHE wurden ansteigende Dosen GTN (10^{-9} bis $10^{-4,5}$ M) zugegeben und jeweils eine Plateaueinstellung abgewartet.

3.2.7 Chemilumineszenztests zur Messung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

3.2.7.1 Oxidativer Burst

Hintergrund:

Mithilfe dieser Methode lässt sich die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in Vollblut oder isolierten Leukozyten messen (200).

RONS reagieren mit dem Farbstoff L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione), einem Luminol-Derivat (201, 202), indem sie seine Elektronen auf ein höheres Energieniveau, also in einen angeregten Zustand bringen. Beim Übergang zurück in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Lichtquant emittiert und kann vom Chemilumineszenz-Counter gemessen und als Counts per minute (cpm) quantifiziert werden (203).

Die Freisetzung der RONS aus den Zellen (oxidativer oder respiratorischer Burst) wird durch Stimulantien wie Zymosan A (TLR-2-Aktivator) oder PDBu (Phorbol 12,13-dibutyrate, Aktivator der Proteinkinase C) bewirkt. Nach neueren Erkenntnissen reagieren RONS wie Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit mit Peroxidasen in Leukozyten (z.B. Myeloperoxidase). Die oxidierten Eisenspezies im katalytischen Zentrum der Peroxidasen oxidieren dann den Farbstoff zu einem angeregten Molekülzustand, der Chemilumineszenz-Licht aussenden kann (204).

Durchführung:

Für die Messung von Superoxid im Vollblut wurde das Blut in Citratröhrchen abgenommen und direkt weiterverarbeitet.

Zuerst wurde eine 100 μM Lösung aus L-012 in PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (siehe 3.1.7.4) hergestellt. Darin wurde das Blut 1:50 verdünnt. Die Messung erfolgte in einer 96-well-Platte in 8-fach-Bestimmung. Es wurden die basale und die mit PDBu oder Zymosan A stimulierte Superoxidproduktion gemessen. Dafür wurde Zymosan A in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und PDBu in einer Endkonzentration von 10 μM zugegeben. Abschließend wurde die Chemilumineszenz im Platerader Lumat LB 960, Berthold Technologies im Zeitverlauf über eine Stunde in fünfminütigen Abständen bei 37°C gemessen. Daneben wurde der Effekt eines Endothelin-1-Rezeptor-Agonisten (BQ-3020, 0,05-5 μM) sowie die antioxidative Wirkung von PETN (100 μM) auf den oxidativen Burst in Vollblut bestimmt, indem die L-012 Chemilumineszenz im Zeitverlauf über zwei Stunden bei 37°C gemessen wurde.

3.2.7.2 Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz in Membranfraktionen

Hintergrund:

Mit dieser Methode wird analog zum oxidativen Burst die Superoxid-Produktion in kardialen Membranfraktionen gemessen. Durch die Zugabe von NADPH wird hier speziell die Aktivität der NADPH-Oxidase und somit deren Superoxidproduktion gemessen (200). Lucigenin reagiert mit Superoxid unter Bildung eines Dioxetan-Zwischenprodukts, welches unter Emission von Chemilumineszenz-Licht zu N-Methylacridon reagiert (205).

Durchführung:

Für die Isolation der kardialen Membranfraktionen wurden die Herzen trocken getupft, mit einem Skalpell zerkleinert, mit Tris DTT (siehe 3.1.7.6) versetzt und in einem Glaszylinder mit konischem Pistill homogenisiert. Anschließend folgten mehrere Zentrifugationsschritte: zuerst 10 Minuten bei 2000 g, der Überstand anschließend 20 Minuten bei 20050 g (jeweils in der Hettich Zentrifuge Mikro 22R), der Überstand wiederum für eine Stunde bei 100000 g in der Ultrazentrifuge Discovery M120SE, Sorvall Kendro Laboratory Products, jeweils bei 4°C. Das zuletzt entstandene Pellet mit den isolierten Membranfraktionen wurde in 500 μl Tris Mem (siehe 3.1.7.5) resuspendiert. Nun folgte die Proteinbestimmung nach Lowry (siehe unten). Die Proteinkonzentrationen im Assay wurden auf 0,2 mg/ml eingestellt.

Anschließend wurden die Proben mit dem Farbstoff Lucigenin (5 μM) versetzt, die Reaktion durch Zugabe von NADPH (200 μM) gestartet und die Chemilumineszenz im Tube luminometer Lumat LB 9507, Berthold Technologies alle 30 Sekunden über

einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen. Die Ergebnisse wurden in Counts pro mg Protein pro Minute angegeben.

3.2.8 Proteinbestimmung nach Lowry

Hintergrund:

Es handelt sich um eine photometrische Farbumschlagmessung basierend auf zwei hintereinandergeschalteten Reaktionen der Proteine mit Kupfer und Folin modifiziert nach Lowry (206, 207).

Im ersten Schritt werden die zu messenden Proben in einer alkalischen Kupferratratlösung inkubiert, wobei sich ein Farbstoffkomplex zwischen den Peptidbindungen und zweiwertigem Kupfer bildet.

In einem zweiten Schritt wird Folinreagenz zugegeben, welches reduziert wird und dadurch zu einem weiteren Farbumschlag führt. Dies erhöht die Sensitivität der Messung um den Faktor 100 (206, 207).

Durchführung:

Die zu messende Proteinmischung wurde in 0,1% SDS für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Zu 1,5 ml Reagenz A (Bio-Rad Laboratories) wurden 30 µl Reagenz S gegeben und gut gemischt. Dann wurden 125 µl der Reagenz A+S-Mischung in Küvetten vorgelegt und 25 µl der Probe und 1000 µl Reagenz B zugegeben. Als Leerwert wurde Tris DTT Puffer genommen. Die Proben wurden mit dem Rührspatel kurz vermischt, für 10 Minuten dunkel inkubiert und dann bei 700 nm die Extinktion gemessen. Es wurde das Photometer Helios α v4.60 der Firma Thermo Electron Corporation verwendet.

3.2.9 DPPH-Assay

Hintergrund:

Der DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)-Assay ist ein Assay zur Analyse der antioxidativen Kapazität des Serums.

Hierfür werden Serumproben mit dem stabilen Radikal DPPH versetzt. DPPH hat ein Absorptionsmaximum bei 517 nm (lila). Wird DPPH nun durch serumeigene Antioxidantien reduziert, entsteht 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine, welches eine gelbe Farbe besitzt und keine Absorptionsfähigkeit bei 517 nm besitzt. Je mehr antioxidative Kapazität das Serum also besitzt, desto mehr DPPH wird reduziert und desto schneller nimmt die Absorption bei 517 nm ab (208).

Durchführung:

Das zu untersuchende Blut wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1450g (Hettich Zentrifuge Rotofix 32) zentrifugiert und der Überstand, also das Serum, abgenommen.

Anschließend folgte die Deproteinisierung des Serums mit Acetonitril, indem beide Substanzen im Verhältnis 1:1 vermischt, 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 9500g zentrifugiert wurden (Hettich Zentrifuge Mikro 22R). Der Überstand wurde für die Messung verwendet.

Die DPPH-Arbeitslösung (siehe 3.1.7.25) wurde immer frisch angesetzt und dunkel aufbewahrt.

Zur photometrischen Bestimmung der oxidativ umgesetzten DPPH-Moleküle wurden je 50 µl des deproteinisierten Serums in Küvetten vorgelegt und 950 µl der DPPH-Arbeitslösung zugegeben. Anschließend wurde nach 10, 20 und 30 Minuten dunkler Inkubation bei Raumtemperatur die photometrische Messung bei 517nm vorgenommen. Es wurde das Photometer Helios α v4.60 der Firma Thermo Electron Corporation verwendet.

3.2.10 Xanthinoxidase-Assay

Hintergrund:

Die Xanthinoxidase ist ein Metalloenzym, welches den Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure katalysiert (siehe Kapitel 2.3.1.2).

Dieser Assay basiert darauf, dass Cytochrom C durch die entstehenden Superoxidradikale reduziert wird, wobei photometrisch die Menge des durch die Radikale reduzierten Cytochrom C bei 550 nm gemessen werden kann.

Cytochrom C ist an der Atmungskette als Elektronencarrier beteiligt, es besitzt eine Hämgruppe mit zentralem Eisen-(III-)Ion, welches durch Superoxid zu zweiwertigem Eisen-(II-)Ion reduziert wird und dabei seine Absorptionseigenschaften ändert (209).

Um die basale Produktion von Superoxid von der durch die Reaktion der Xanthinoxidase unterscheiden zu können, wird der Assay mit zwei verschiedenen Puffern durchgeführt: ein Puffer enthält Hypoxanthin als spezifisches Substrat der Xanthinoxidase, der andere enthält Allopurinol als Hemmstoff der Xanthinoxidase. So kann jeweils die basale Superoxidproduktion von der Gesamtmenge abgezogen werden, um die tatsächliche Aktivität der Xanthinoxidase zu ermitteln.

Durchführung:

Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur und 1450g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand (=Serum) weiterverwendet (Zentrifuge Rotofix 32, Andreas Hettich).

Für die Pufferherstellung wurde Cytochrom C in einer finalen Konzentration von 50 μM jeweils mit PBS + Hypoxanthin (1 mM) bzw. PBS + Allopurinol (1 mM) (Backgroundpuffer) gemischt. Für die Lösung von Hypoxanthin wurde der Ultraschallhomogenisator Sonopuls der Firma Bandelin benötigt.

Anschließend wurde das Serum im Verhältnis 1:20 mit dem jeweiligen Puffer versetzt, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach 10, 20 und 30 Minuten die Absorption im Photometer bei 550 nm gemessen. Es wurde das Photometer Helios α v4.60 der Firma Thermo Electron Corporation verwendet. Die XO-Aktivität wurde als Differenz der OD_{550} (OD = optical density) der Messung mit Hypoxanthin bzw. Allopurinol angegeben.

3.2.11 DHE-Färbung

Hintergrund:

Diese Methode dient dem Nachweis von intrazellulären ROS. Der Farbstoff Dihydroethidium (DHE) kann die Zellwand durchdringen und wird durch Superoxid und andere ROS zu 2-Hydroxyethidium (2-HE) bzw. Ethidium (E⁺) oxidiert (weshalb die Methode nicht für die spezifische Detektion von Superoxid im Gewebe ohne weitere Zusätze von spezifischen Superoxid-Fängern verwendet werden kann). Dieses interkaliert in die DNA, fluoresziert durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm rot und kann im Fluoreszenzmikroskop bei 570 nm sichtbar gemacht werden (210).

Durchführung:

Die Pulmonalarterien wurden mitsamt dem umgebenden Fettgewebe in 4 mm dicke Ringe geschnitten und für 10 Minuten bei 37°C im Inhibitorenpuffer (Proteaseinhibitoren) (siehe 3.1.7.3) inkubiert. Anschließend wurden sie in TissueTek® eingebettet und vorsichtig auf flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die in TissueTek® eingebetteten Pulmonalarterien wurden am Cryostat (CM3050 S, Leica Biosystems) in 8 μm dicke Schnitte geschnitten und jeweils zwei Schnitte pro Gruppe auf einem Objektträger fixiert. Diese wurden direkt wieder auf Trockeneis eingefroren.

Um die Superoxide im Gewebe sichtbar zu machen, wurden die Objektträger mit den Proben mit 1 ml der DHE-Lösung (1 μ M in PBS + 0,5% DMSO) gleichmäßig beträufelt und für 30 Min. bei 37°C dunkel inkubiert. Anschließend wurde ein Deckglas aufgebracht und die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40 CFL Mikroskop, Carl Zeiss Jena; Lampe: HBO 50 W/AC, Osram GmbH) wurden zunächst die Belichtungseigenschaften eingestellt und diese für die restlichen Messungen beibehalten.

Pro Ring wurden dann 3-4 Bilder mit einem Grünfilter aufgenommen, mit dem das durch intrazelluläre ROS oxidierte DHE dargestellt wird.

Mithilfe eines Bildprogramms wurden die einzeln erstellten Fotos der Schnitte zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

Mithilfe der Analysesoftware Gel Pro Analyzer von Media Cybernetics wurde die optische Dichte der fluoreszierenden Punkte in der Lamina media densitometrisch gemessen.

3.2.12 Western Blot

3.2.12.1 Proteingewinnung:

Durchführung:

Die zur Western oder Dot Blot-Analyse verwendeten Gewebe (Aorta und Lunge) wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und zur Proteingewinnung in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das so gewonnene Pulver wurde in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß gefüllt und direkt wieder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Anschließend erfolgte die Homogenisierung in Hg-Lösung. Dafür wurde zunächst das Volumen der gemörserten Proben anhand von Vergleichseppendorfgefäßen abgeschätzt und dann die jeweilige Menge an Hg-Lösung 1:1 zugefügt. Zur Homogenisierung wurden die Proben mithilfe eines Vortexmischers (Vortex Genie 2 G560E, Scientific Industries) gründlich geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten auf Eis inkubiert und währenddessen alle fünf bis zehn Minuten geschüttelt. Die in der Hg-Lösung enthaltenen Proteasen schützten das Gewebe vor ungewolltem Abbau, während das Triton-X die Proteine aus den Zellmembranen lösen sollte.

Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 10.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten Proteinen weiterverwendet, während das Pellet mit ungelösten Zellfragmenten verworfen wurde.

3.2.12.2 Proteinbestimmung (Bradford-Assay):

Durchführung:

Für die Proteinbestimmung wurde die photometrische Quantifizierung anhand der Komplexbildung kationischer und unpolarer Proteinseitenketten mit Coomassie brilliant blue (RotiQuant®) durchgeführt. Der Komplex aus Farbstoff und Protein kann bei 595 nm detektiert werden, während der freie Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm besitzt. Je nach Proteinart ist die Intensität des Farbwechsels allerdings unterschiedlich, sodass ein Proteinstandard mitlaufen musste. Für unser Proteingemisch wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

Nach Verdünnung der Proben in H₂O_{dest} (Aorta 1:200, Herz 1:600) wurden diese neben den Blanks (H₂O_{dest}) und den Standards (BSA in Konzentrationen von 1-30 ng/μL) auf die 96-well-Platte aufgetragen. Zu den Proben wurden jeweils 200μl des RotiQuant-Farbstoffes, der vorher 1:5 in H₂O_{dest} verdünnt worden war, gegeben und die Platte im Platerreader (MRXc, DYNEX Technologies) photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Revelation Software von DYNEX Technologies.

3.2.12.3 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Electrophoresis

Herstellung der Trenn- und Sammelgele:

Die beiden Gele wurden nach der untenstehenden Anleitung (Tabelle 2) hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel vorsichtig blasenfrei in den dafür vorgesehenen Gießstand gegossen. Zur Entfernung der Luftblasen an der Oberfläche und eine glatte Phasengrenze wurde Isopropanol über das Gel geschichtet.

Nach einer Polymerisationsdauer von ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Isopropanol abgegossen und mit H₂O_{dest} gespült.

Dann wurde das Trenngel darüber gegossen und ein Kamm mit 3-5 mm Breite (10 oder 15 Slots) für die Probeneinfüllung eingesetzt. Dabei wurde auf Luftblasenfreiheit geachtet.

Nach weiteren 20 Minuten Polymerisationsdauer konnten die Kämmen entfernt und das Gel weiterverwendet werden.

	Trenngele:				Sammelgel:
	5%	7,5%	10%	15%	4%
H₂O dest.	6 ml	5,4 ml	4,8 ml	3,5 ml	3,2 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	----
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,6)	----	----	----	----	1,2 ml
Acrylamide/Bis (40% BioRad)	1,25 ml	1,88 ml	2,5 ml	3,75 ml	0,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Tabelle 2: Herstellungsanleitung der Trenn- und Sammelgele.

Probenauftragung:

Zunächst wurden die Gele in die SDS-Page-Apparatur (Mini-Protean-III-System, BioRad Laboratories) eingebaut. Die innere Kammer wurde vollständig, die äußere zu zwei Dritteln mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Slots vorsichtig mit dem Puffer gespült.

Dann wurden die Gele 10 Minuten bei 60 V vorlaufen gelassen.

Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann in der gewünschten Reihenfolge in die Slots gefüllt, wobei an erster bzw. letzter Stelle ein Molekulargewichtsmarker (Bench-Mark-Unstained Protein Ladder) und ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Dual Color Standard) zur Bestimmung der Auftrennungsweite aufgetragen wurden.

Dann wurden die Gele ca. 15 Minuten bei 60 V laufen gelassen, bis die Proben vom Sammel- ins Trenngel übergetreten waren. Anschließend wurde die Spannung auf ca. 130-140 V erhöht und bis zur gewünschten Auftrennung (Proteingrößen anhand des Dual Color Markers ablesbar) laufen gelassen.

3.2.12.4 Blotting:

Durchführung:

Das Gel wurde auf eine vorbereitete Nitrozellulosemembran in eisgekühltem Transferpuffer gelegt und die Apparatur (Mini Trans-Blot Cell System, BioRad Laboratories) nach Herstelleranleitung zusammengebaut (Reihenfolge: Schwamm,

Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm). Dann wurde die Blotting-Kassette in die Blotting-Kammer gestellt, mit Transferpuffer befüllt und in eine Eisbox gestellt. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurde bei 250 mA ca. 2,5-5h (je nach Proteingröße) geblottet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Nitrozellulosemembran zur Anode gerichtet war.

3.2.12.5 Ponceau S-Färbung

Durchführung:

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde die geblottete Membran aus der Blottingvorrichtung genommen, ca. 1-2 Minuten in Ponceau S-Farbstoff geschwenkt und anschließend mit H₂O_{dest} gespült. Anhand der somit sichtbar gemachten Proteinbanden wurde die Membran entsprechend der Größenbereiche verschiedener Proteintargets von Interesse in Streifen geschnitten, sodass verschiedene Proteine anhand verschiedener Antikörperinkubationen nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurden die Membranen mit dem jeweiligen Waschpuffer (PBS-T oder TBS-T) gewaschen.

3.2.12.6 Immunologischer Nachweis der Proteine

Durchführung:

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an der Membran zu verhindern, wurde die Membran zuerst geblockt, indem sie eine Stunde lang im Blockingmedium (Actin: TBS-T + 5% BSA, Nox2: TBS-T + 3% BSA) bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Danach wurde der Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C leicht schwenkend inkubiert.

Wir verwendeten für diese Studie als Kontrolle einen β -Actin-Antikörper (monoclonal mouse β -actin, Verdünnung wie in 3.1.2) sowie einen Nox2-Antikörper (polyclonal mouse NADPH oxidase 2, Verdünnung wie in 3.1.2).

Am nächsten Morgen erfolgte ein zweiter Waschschrift. Anschließend wurde die Membran ca. 1,5-2h in der Sekundärantikörperlösung (anti-mouse oder anti-rabbit, Verdünnung wie in 3.1.2) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift und anschließend der Nachweis der Proteine mithilfe der ECL-Lösung (Luminol-basiert), die durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase mit Hilfe eines Peroxids oxidiert wird und damit durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden kann.

Die Bilder wurden im ChemiLux Imager aufgenommen und anschließend mithilfe der Gel Pro Analyzer Software der Firma Media Cybernetics quantitativ ausgewertet.

3.2.13 Dot Blot

Die Dot Blot Analyse funktioniert ähnlich wie der Western Blot, nur dass hier die Proben nicht der Größe und Ladung nach aufgetrennt, sondern als natives Proteingemisch punktförmig auf eine Membran übertragen werden.

Die Gewinnung der Proteine und die Bestimmung der Konzentration wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 3.2.12.1 und 3.2.12.2). Anschließend erfolgte eine Konzentrationseinstellung auf 2,5 µg/µl mit Homogenisierungslösung und die direkte Übertragung der Proteine (10 µl = 25 µg pro Slot) auf eine PVDF-Membran mithilfe des Minifold-I-Gerätes der Firma Whatman-Schleicher & Schuell. Dieses Gerät besteht aus einer 96-well-Platte, in die die Proben gegeben werden, einem Unterbau, bestehend aus einer Auflageplatte für die Filterpapiere und die Membran, auf die die Proben übertragen werden und einer Vakuumkammer, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen werden kann, sowie einem Metallgestell zum Zusammenpressen der anderen Teile.

Die Proben wurden auf die 96-well-Platte aufgetragen und mittels Vakuum auf die Membran gesaugt. Durch Nachspülen mit PBS wurde sichergestellt, dass die Probe komplett auf die Membran übertragen wurde. Danach wurde die Membran bei 60°C für eine Stunde getrocknet und anschließend nach Blocking im Blockmedium (PBS + 5% MLK) in der entsprechenden Antikörperlösung inkubiert.

Wir verwendeten als primären Antikörper einen Anti-Nitrotyrosin-Antikörper (mouse monoclonal nitrotyrosine antibody) in einer Verdünnung von 1:1000. Als Sekundärintikörper wurde ein Anti-Maus-Antikörper 1:10000 verwendet, der mit einer Peroxidase gekoppelt war und damit durch die ECL/Peroxid-Lösung sichtbar gemacht werden konnte.

Die Detektion und Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben (siehe 3.2.12.6).

3.2.14 Histologische Untersuchung

3.2.14.1 Vorbereitung

Für die histologische Untersuchung des Lungengewebes wurden Lungengewebsproben in 4% Paraformaldehyd (PFA) gelagert und anschließend mit Hilfe des Einbettungskarussells von LEICA TP 1020 in einer aufsteigenden

Alkoholreihe entwässert und nach Xylolbehandlung in Paraffin eingebettet: Spülen mit Aqua dest. für 30 Minuten; anschließend jeweils 120 Minuten in 70% Isopropylalkohol, 80% Isopropylalkohol, zwei Mal 96% Isopropylalkohol, zwei Mal 100% Isopropylalkohol, 2 Mal Xylol (Roti-Histol) und zuletzt 240 Minuten in Paraffin. Die Gewebeproben wurden mithilfe eines Mikrotoms der Firma Leica in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden 2-3 Tage bei 37°C getrocknet.

Vor dem Färben wurden die eingebetteten Gewebe zur Demaskierung der Antigene in ein Schiffchen einsortiert und durch jeweils zehnmünütige Inkubation in 3 Mal Xylol (Roti-Histol) und einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropylalkohol, 96% Isopropylalkohol, 70% Isopropylalkohol und Aqua dest.) entparaffiniert.

3.2.14.2 Trichrom-Färbung (Goldner-Färbung)

Für die Trichromfärbung nach Meloy und Puchtler (211) wurden zunächst die Zellkerne mit Hämatoxylin vorgefärbt.

Anschließend wurden die Proben zunächst für 5 Minuten in Mallory Rot (bestehend aus 100% Essigsäure, Fuchsin und Orange G) gefärbt, dann für 15 Minuten in 1% Phosphormolybdänsäure und zuletzt für 5 Minuten in Lichtgrün. Abschließend wurden die Proben in wasserfreier hochkonzentrierter Essigsäure (Eisessig)/Ethanol und dann 100% Ethanol dehydriert, in Xylol fixiert und mit Entellan eingedeckt.

3.2.15 Zellkultur

Es wurden humane endotheliale Zellen der Reihe EA.hy 926 verwendet, die vom Labor von C.-J. S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt wurden (212).

Die Zellen wurden bei 10% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin gelagert. Für die Weiterverarbeitung wurden 6-well-Platten verwendet, in denen die Zellen semikonfluent ausgesät wurden. Es folgte eine Inkubation mit 5 µM BQ-3020 (einem selektivem ET_B-Rezeptor-Agonisten), 100 µM PETN sowie DMSO als Kontrollmedium über 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen für die qRT-PCR-Analyse der ICAM-1-Expression weiterverwendet. Die Zellkultur wurde in einem Brutschrank der Firma Thermo Scientific, Heracell 150i durchgeführt.

3.2.16 qRT-PCR

Hintergrund:

Das Ziel der quantitativen real-time Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion ist die Umwandlung eines RNA-Templates in einen DNA-Abschnitt, die Vervielfältigung des Genabschnitts und anschließende quantitative Bestimmung der Häufigkeit.

Die rt-PCR ist somit in zwei Abschnitte gegliedert: im ersten Teil erfolgt die Umwandlung von RNA in cDNA (komplementäre DNA) mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, im zweiten Teil werden die DNA-Abschnitte mithilfe der Taq-Polymerase vervielfältigt.

Durchführung:

Zur Vorbereitung wurden die Zellen und Gewebe mittels saurer Phenolextraktion (siehe unten) bearbeitet, um die RNA zu isolieren.

Anschließend wurden jeweils 50ng des isolierten RNA-Gemisch auf einer 96-well-Platte mit sequenzspezifischen Primern und der Reversen Transkriptase versetzt und bei 50°C, dem Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase, für 30 Minuten inkubiert. Die Primer setzten sich an die komplementären RNA-Abschnitte, wo die Reverse Transkriptase binden und die Abschnitte verlängern kann. Hierbei entstanden die komplementären DNA-Abschnitte. Dies ist nötig, da im zweiten Teil für die Vervielfältigung das Enzym Taq-Polymerase verwendet wird, welches nur mit DNA-Abschnitten arbeiten kann. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten wurden die Proben für 15 Minuten auf 95°C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu deaktivieren und die entstandenen DNA-Abschnitte zu denaturieren und so Einzelstränge herzustellen. Hierbei wurde außerdem die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert und somit der zweite Abschnitt eingeleitet.

Für den zweiten Teil wurden wieder sequenzspezifische Primer benötigt, die genau an die DNA-Abschnitte binden, die untersucht werden sollten. Durch die Taq-DNA-Polymerase wurden die DNA-Abschnitte dann vervollständigt. Dafür wurden die Proben für 1 Minute bei 60°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, inkubiert. Es folgte eine weitere Denaturierung (15 Sekunden bei 94°C) für die Auftrennung in Einzelstränge und ein erneuter Zyklus von 1 Minute bei 60°C, um die Einzelstränge zu vervollständigen.

Dieser Wechsel aus 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute wurde ca. 40-45 Mal wiederholt, sodass am Ende theoretisch die Anfangsmenge der RNA-Abschnitte mit einer Potenz von 40-45 vervielfältigt wurde.

Für die Quantifizierung konnte allerdings nicht einfach die Menge der gebildeten DNA herangezogen werden, da die Amplifikation großen Schwankungen unterliegt. Daher musste jeweils ein sogenanntes Haushaltsgen (TBP) mituntersucht werden, dessen Expression möglichst konstant ist und das als Vergleichsmenge für jede einzelne Probe herangezogen werden kann.

Für unsere Versuche wurde ein Kit (QuantiTect Probe RT-PCR Kit von Qiagen) verwendet, das alle Substanzen für die oben genannten Schritte enthält und somit eine vereinfachte Durchführung ermöglicht. Es wurde die PCR-device StepOnePlus™ von Thermo Fisher Scientific verwendet.

Als Primer wurden TaqMan® Genexpressionsassays von Thermo Fisher Scientific für die folgenden Genabschnitte verwendet: Hämoxygenase 1 (Hmox1), Endothelin-1 (Edn1), Endothelin-1 A Rezeptor (Ednra), Endothelin-1 B Rezeptor (Ednrb), Endothelin konvertierendes Enzym-1 (ECE-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und als Haushaltsgen das TATA-Box bindende Protein (TBP), Assay IDs siehe 3.1.3.

3.2.16.1 RNA-Isolation aus Zellen (saure Phenolextraktion)

Das Medium der Zellen wurde vollständig abgesaugt und stattdessen 600µl Git-Puffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde lang bei -20°C eingefroren und damit lysiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt.

Zu den Zellen wurden 60 µl Na-Acetat, 600 µl wassergesättigtes Phenol und 300 µl CHCl₃/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) gegeben. Die Lösung wurde 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und dann 20 Minuten bei 4°C und 13000 rpm (=18360 g) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 1 Vol (1:1) kaltem Isopropanol gemischt und über Nacht bei -20°C zur Fällung stehen gelassen. Im Anschluss folgte eine weitere zwanzigminütige Zentrifugation bei 4°C und 18360 g. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und 5 Minuten über Kopf trocknen gelassen. Schließlich wurde die RNA in DEPC-H₂O aufgenommen und die RNA-Konzentration in einem Probenvolumen von 1µl mithilfe des NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer von Thermo Fisher Scientific (bei 260nm) bestimmt.

3.2.16.2 RNA-Isolation aus Geweben (saure Phenolextraktion)

Die zu messenden tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mit einer Stahlkugel in 600 µl Git-Puffer (siehe 3.1.7.24) gegeben und im TissueLyser homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend wieder eingefroren (-20°C) und eine Stunde lang lysiert. Alle weiteren Schritte sind wie bei der RNA-Isolation aus Zellen.

3.2.17 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der Versuche wurden mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism ausgewertet und als Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM, engl. standard error of the mean) und Anzahl der Messwerte (N) angegeben. Die Werte wurden in Balkendiagrammen oder Verlaufskurven dargestellt.

Der T-Test wurde angewendet zum Vergleich der Mittelwerte der MCT-induzierten Veränderungen der Endothelfunktion zwischen zwei Gruppen.

Zum Vergleich der Mittelwerte der Vasodilatationsstudien sowie der Messung des oxidativen Bursts wurde der Two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für den Vergleich von mehreren Mittelwerten herangezogen.

Zum Vergleich der Mittelwerte folgender Untersuchungen wurde der One-way ANOVA mit Bonferroni- bzw. Dunn-Korrektur für multiples Testen herangezogen:

Organgewichte, Echokardiographie, ROS-Bildung in Blut, kardialen Membranfraktionen und Aorta sowie Protein- und mRNA-Level.

Es wurde ein Signifikanzniveau von 5%, d.h. $p < 0,05$ festgelegt. Messwerte, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt lagen, wurden als „Ausreißer“ aus der Wertung herausgenommen.

In den Grafiken sind signifikante Unterschiede durch Markierungen (*, #, \$, §) gekennzeichnet, eine Legende befindet sich unter der jeweiligen Grafik.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Tiermodells

Die hier vorgestellten Daten wurden alle aus der dieser Dissertation zugrunde liegenden Publikation entnommen (213). Vor Beginn der eigentlichen Studie wurden die optimalen Dosen und Zeitintervalle der Monocrotalinbehandlung getestet, um bei den Tieren eine signifikante pulmonale Hypertonie zu induzieren. Dafür wurden den Tieren 30, 40 oder 60 mg/kg KG Monocrotalin (MCT) in die Vena dorsalis penis injiziert und nach jeweils 2, 4 und 6 Wochen die Endothelfunktion, die pulmonale Fibrosierung, die 3-Nitrotyrosinbildung sowie die antioxidative Kapazität des Serums untersucht (siehe Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23).

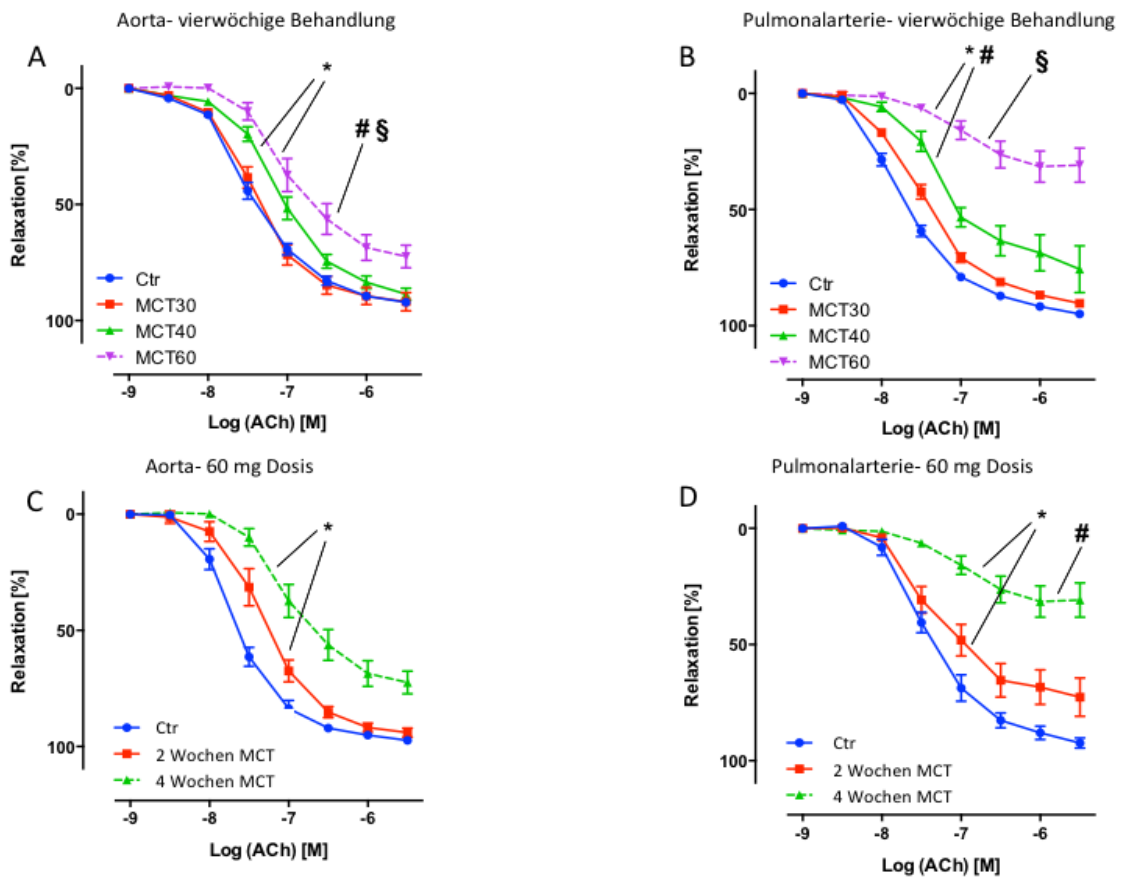


Abbildung 20: Acetylcholinabhängige Gefäßrelaxation an isolierten Ratten-Gefäßsegmenten mittels isometrischer Tonusbestimmung im Organbad. A: Aorta nach vier Wochen Behandlung mit 30, 40 oder 60 mg/kg KG MCT. B: Pulmonalarterie nach vier Wochen Behandlung mit 30, 40 oder 60 mg/kg KG MCT. C: Aorta nach Behandlung mit MCT60 für zwei oder vier Wochen. D: Pulmonalarterie nach Behandlung mit MCT60 für zwei oder vier Wochen. MCT= Monocrotalin, MCT30= Behandlung mit 30 mg/kg KG Monocrotalin, MCT40= Behandlung mit 40 mg/kg KG Monocrotalin, MCT60= Behandlung mit 60 mg/kg KG Monocrotalin. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle, # = $p < 0,05$ versus MCT30 bzw. 2 Wochen MCT, § = $p < 0,05$ versus MCT40.

Zunächst wurde die Gefäßrelaxationsfähigkeit mittels isometrischer Gefäßtonusstudien überprüft. Nach einer Behandlungsdauer von vier Wochen zeigten sich bei einer Dosierung von 30 mg/kg KG MCT (MCT30) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe, während sowohl die 40 mg als auch die 60 mg-Dosierung eine signifikante Verschlechterung der Gefäßfunktion bewirkten (siehe Abbildung 20 A und B).

Um unser Rattenmodell genauer zu untersuchen, führten wir die Relaxationsstudien im Zeitverlauf durch. Der zweite Teil der Abbildung (C und D) zeigt den zeitlichen Verlauf der Gefäßfunktion bei einer Monocrotalindosierung von 60 mg/kg KG. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der Gefäßfunktion bereits nach einer zweiwöchigen und noch deutlicher nach einer vierwöchigen Behandlungsdauer. Nach einer sechswöchigen Behandlungsdauer wurde eine Mortalität von über 50% festgestellt.

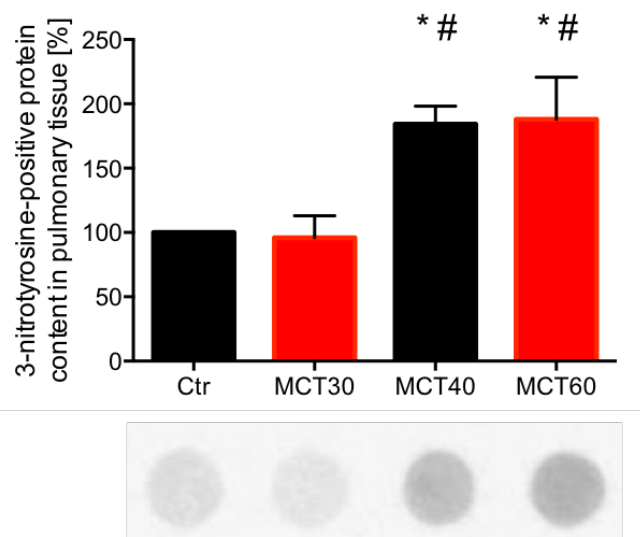


Abbildung 21: 3-Nitrotyrosin-Level im Lungengewebe mittels Dot Blot-Analyse nach vierwöchiger Behandlung mit Monocrotalin. Oben: quantitative Analyse mittels Densitometrie. Unten: Originalbild (repräsentatives Beispiel). * = $p < 0,05$ versus Kontrolle, # = $p < 0,05$ versus MCT30. Ctr: Kontrolle. MCT30: Monocrotalin 30 mg/kg KG. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. MCT60: Monocrotalin 60 mg/kg KG. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-8$ Tiere/ Gruppe.

Weiterhin zeigte sich die verminderte Relaxationsfähigkeit nicht nur in den Pulmonalarterien, sondern auch in der Aorta (siehe Abbildung 20 A und C).

Zudem konnte gezeigt werden, dass in den erkrankten Tieren ab einer Dosis von 40 mg/kg KG und vierwöchiger Behandlungsdauer eine vermehrte 3-Nitrotyrosinbildung stattfand. In der Abbildung 21 sieht man die durch Antikörperfärbung sichtbar gemachten nitrotyrosinhaltigen Proteine im Lungengewebe der Kontrolltiere im

Vergleich zu denen der Versuchstiere mit 30 mg/kg KG, 40 mg/kg KG bzw. 60 mg/kg KG MCT. Das Balkendiagramm zeigt die Auswertung der Densitometrie aller Dot Blots, darunter sieht man einen jeweils repräsentativen Dot zur Veranschaulichung. In der histologischen Untersuchung des Lungengewebes mittels Trichromfärbung konnte eine deutliche Vermehrung des Bindegewebes sowie eine Gefäßwandhypertrophie der kleinen und mittleren Pulmonalgefäße nach vierwöchiger Behandlungsdauer mit 40 mg/kg KG Monocrotalin sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 22).

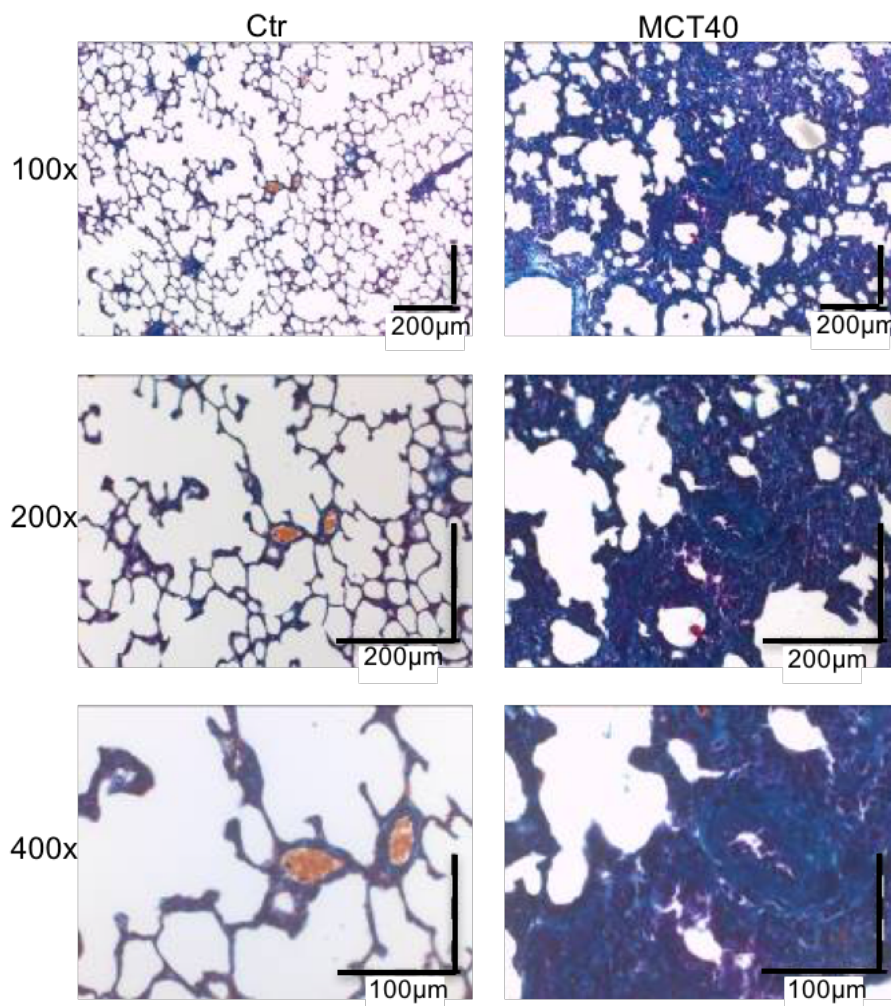


Abbildung 22: Trichromfärbung des Lungengewebes nach vierwöchiger Behandlung mit Monocrotalin 40 mg/kg KG im Vergleich zu Kontrolltieren in 100-, 200- und 400facher Vergrößerung. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. N = 3-8 Tiere/ Gruppe.

Auch die antioxidative Kapazität im Serum war bereits nach vierwöchiger Behandlungsdauer mit 40 mg/kg KG Monocrotalin signifikant vermindert (siehe Abbildung 23). Hierbei wird durch Zugabe eines stabilen Radikals (DPPH[•]) die

Fähigkeit des Serums überprüft, dieses Radikal zu reduzieren und damit abzufangen. Durch die Reduktion ändern sich die Absorptionseigenschaften des DPPH und somit kann die Reaktion photometrisch gemessen werden. Je stärker die gezeigte Abnahme in Abbildung 23, desto höher die antioxidative Kapazität des Serums.

Da die hohe Dosis MCT (60 mg/kg KG) neben den gewünschten Effekten auf Gefäße und Gewebe auch mit einer erhöhten Mortalität einherging und die niedrige Dosis von 30 mg/kg KG keine signifikanten Änderungen der gemessenen Parameter erbrachte, wurden für die weiteren Versuche mit PETN die mittlere Dosis von 40 mg/kg KG und eine Behandlungsdauer von 4 Wochen gewählt.

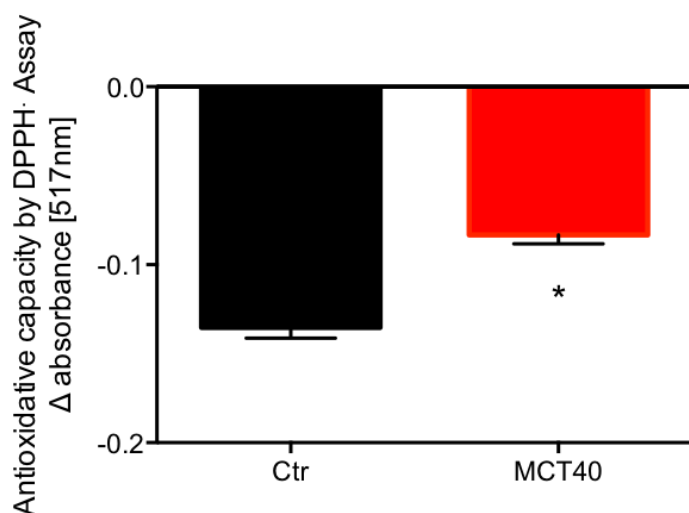


Abbildung 23: Antioxidative Kapazität des Rattenserums mittels DPPH-Assay nach vierwöchiger Behandlung mit 40 mg/kg KG Monocrotalin im Vergleich zu Kontrolltieren. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-6$ Tiere/ Gruppe.

4.2 Untersuchungen am Tiermodell

Für die in-vivo Versuche wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe ohne Interventionen (CTR), eine Gruppe mit PAH durch einmalige MCT-Injektion mit 40 mg/kg KG (MCT40) und eine Gruppe mit PAH durch MCT40-Injektion und anschließender oraler Therapie mit PETN (MCT+PETN). Die folgenden Versuche wurden parallel mit etwa 3-6 Tieren jeder Gruppe durchgeführt.

4.2.1 Pulmonale Hypertonie

Der pulmonalarterielle Blutdruck wurde in regelmäßigen Abständen echokardiographisch gemessen. Hierbei zeigten sich nach einer vierwöchigen Behandlungsdauer mit 40 mg/kg KG bereits stark erhöhte Mittelwerte von 53,96 mmHg, während bei den Kontrolltieren stabile Mittelwerte um 26,96 mmHg gemessen wurden (siehe Abbildung 24). Der stark erhöhte pulmonalarterielle Blutdruck wurde durch die PETN Therapie abgeschwächt und zeigte eine Verringerung um ca. 10 mmHg.

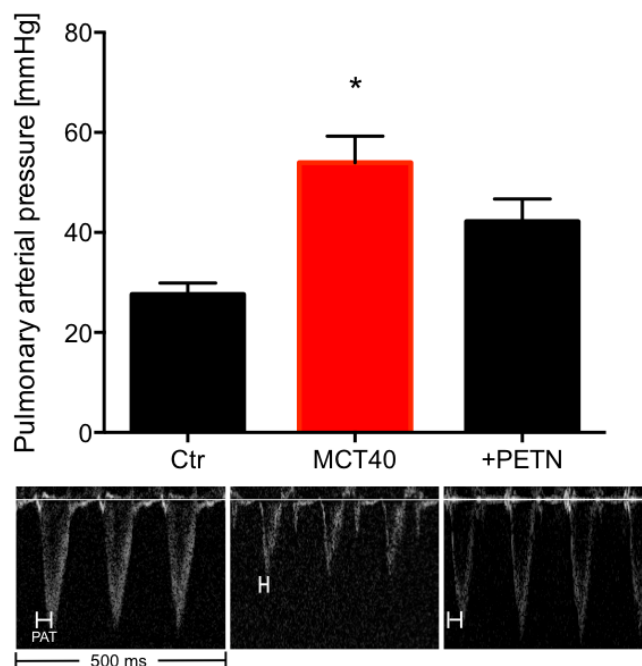


Abbildung 24: Echokardiographisch gemessener pulmonalarterieller Mitteldruck in MCT-behandelten Ratten. Oben: Balkendiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung. Unten: fotografische Darstellung der Echokardiographie. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-4$ Tiere/ Gruppe.

4.2.2 Fibrosierung und Organhypertrophie

Von allen Tieren wurde jeweils das Gesamtkörpergewicht sowie das Gewicht der Lunge und des Herzens gemessen und daraus das Verhältnis des Organgewichts in Bezug auf das Körpergewicht errechnet. Die Zunahme des Gewichts wurde als Korrelat der Fibrosierung des Lungengewebes sowie der Herzinsuffizienz durch Hypertrophie angenommen.

Abbildung 25 zeigt das Verhältnis von Herz- bzw. Lungengewicht zum jeweiligen Körpergewicht. Es zeigt sich eine starke Gewichtszunahme in der MCT-Gruppe,

während durch PETN eine deutliche Gewichtsreduktion erreicht und somit Fibrosierung bzw. Hypertrophie verhindert werden konnte. Auch die qualitativ erfasste Hypertrophie der Pulmonalarterie in der MCT40 Gruppe wurde durch die PETN Therapie merklich verringert.

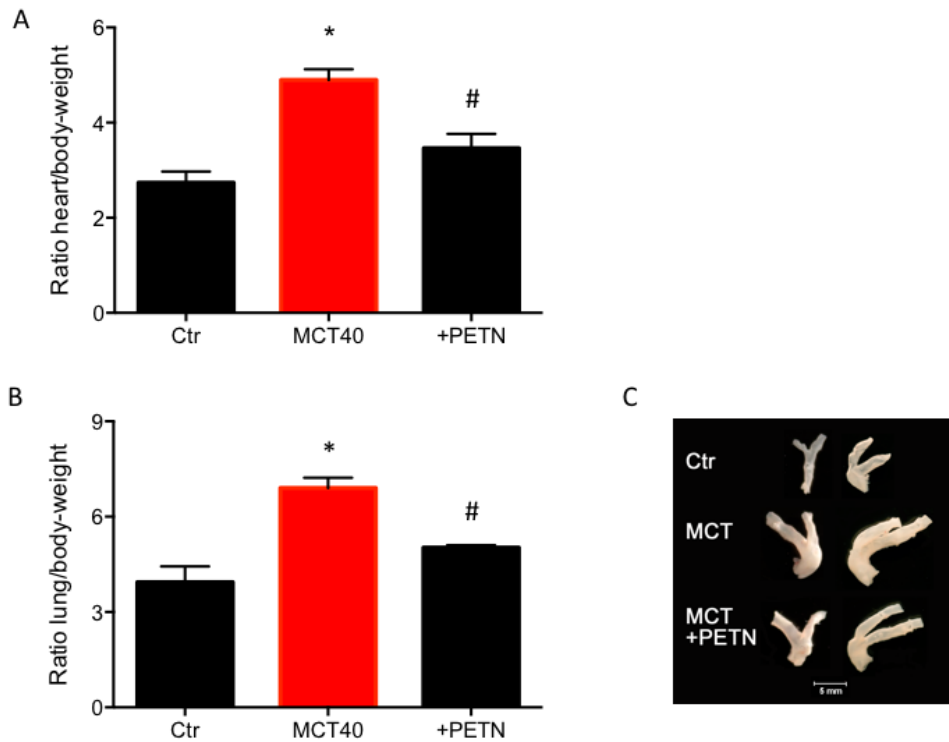


Abbildung 25: Organgewichtsbestimmung von Herz (A) und Lunge (B) im Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht in MCT-behandelten Ratten. C: fotografische Darstellung der Pulmonalarterien. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 4$ Tiere/ Gruppe.

4.2.3 Relaxationsfähigkeit

Die Gefäßfunktion wurde mittels isometrischer Tonusstudien im Organbad untersucht. Hierfür wurden 3-4 Aortenringsegmente pro Versuchstier verwendet und die acetylcholinvermittelte Vasodilatation gemessen. Wie oben schon beschrieben, konnte durch die MCT-induzierte pulmonale Hypertonie eine Verschlechterung der Gefäßfunktion beobachtet werden. PETN war in der Lage, diese teilweise zu beheben, insbesondere in den Pulmonalarterien bei einer Dosierung von 40 mg/kg KG Monocrotalin (siehe Abbildung 26).

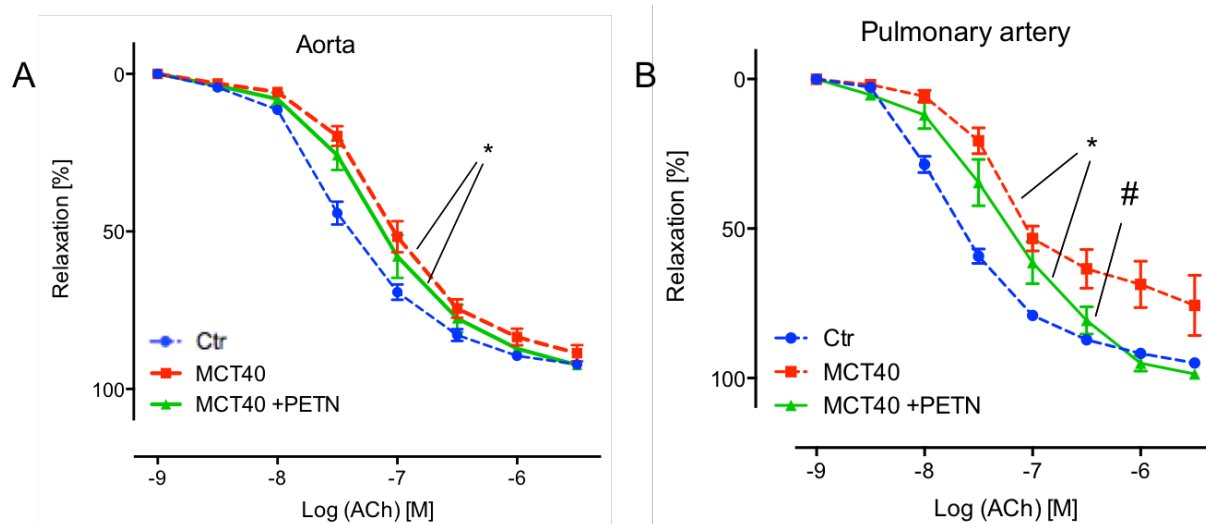


Abbildung 26: Die Gefäßfunktion an isolierten Ratten-Gefäßsegmenten wurde mittels isometrischer Tonusbestimmung im Organbad gemessen. A: Aorta. B: Pulmonalarterie. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. MCT40 +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 6-22$ Gefäßabschnitte/ Gruppe.

4.2.4 Oxidativer Stress

Um die Level an oxidativem Stress zu messen, wurden verschiedene Methoden angewandt: die Messung der NADPH-Oxidaseaktivität in kardialen Membranfraktionen, die Messung des oxidativen Bursts in Vollblut, die DHE-Färbung des Endothels in Pulmonalgefäßen, die Messung der Xanthinoxidaseaktivität im Serum sowie die Messung der NOX-Expression mittels Western Blot und die Messung der 3-Nitrotyrosinspiegel in Lungengewebe mittels Dot Blot (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

4.2.4.1 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase-(Nox-)Aktivität wurde in kardialen Membranfraktionen mittels lucigeninvermittelter Chemilumineszenz detektiert. Hierbei wird Superoxid, welches hauptsächlich von der NADPH-Oxidase gebildet wird, gemessen. In den erkrankten Tieren wurden deutlich erhöhte Werte bestimmt, während PETN eine vermehrte Produktion an Superoxid verhindern konnte (Abbildung 27 A).

4.2.4.2 Oxidativer Burst

Beim oxidativen Burst wird die Menge an freigesetztem Superoxid aus Leukozyten, welches ebenfalls von der Nox produziert wird, durch Abbau zu Wasserstoffperoxid,

dessen Umsetzung mit Peroxidasen in den Leukozyten und anschließende Reaktion mit dem Farbstoff L-012 gemessen.

Hierbei zeigte sich ein Anstieg der Superoxidproduktion in der MCT40-Gruppe, während durch die Behandlung mit PETN eine Normalisierung der Werte erreicht werden konnte (Abbildung 27 B).

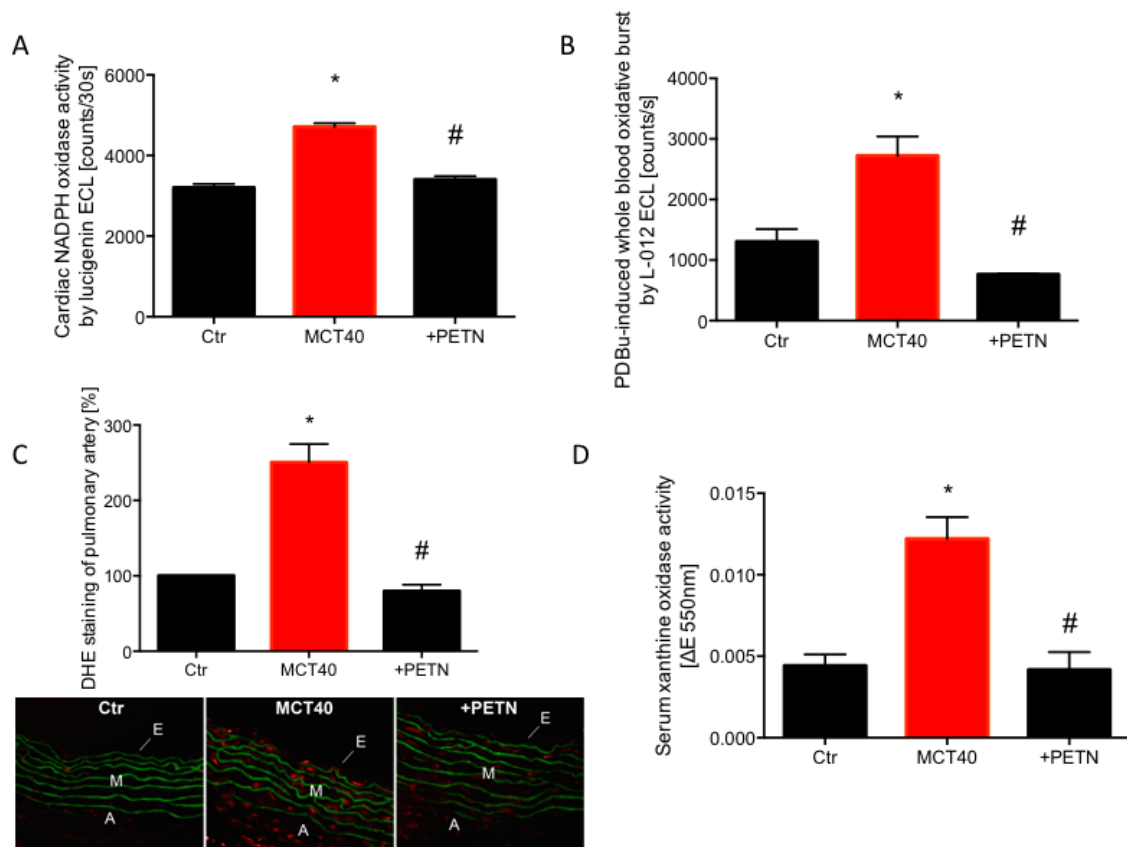


Abbildung 27: Wirkung von PETN-Therapie auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses in MCT-behandelten Ratten. A: Superoxidproduktion in kardialen Membranfraktionen nach Stimulation mit NADPH (zeigt die NADPH Oxidase-Aktivität an). B: Oxidativer Burst in Rattenvollblut (zeigt die Leukozyten NADPH Oxidase- und Myeloperoxidase-Aktivität an). C: DHE Färbung von Aorten-Kryoschnitten (zeigt die intrazelluläre ROS Bildung an). D: Xanthinoxidase-Aktivität in Rattenserum. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctrl: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-6$ Tiere/ Gruppe.

4.2.4.3 DHE-Färbung

Bei der Färbung eines Gewebes mit Dihydroethidium (DHE) reagiert der Farbstoff mit ROS zu 2-Hydroxyethidium sowie Ethidium und kann dann durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Es wurden die intrazellulären Superoxidmengen in der Lamina media der Pulmonalarterien gemessen. Hierbei konnten wir in der MCT40-Gruppe erhöhte

Fluoreszenz-Signale feststellen, die durch die Behandlung mit PETN verhindert werden konnten (Abbildung 27 C). Abgebildet ist eine repräsentative fotografische Darstellung der Gefäßendothelien sowie die quantitative Auswertung mittels Densitometrie.

4.2.4.4 Xanthinoxidase-Aktivität

Die Xanthinoxidase (XO) geht durch posttranslationale Modifikation aus der Xanthindehydrogenase hervor und ist ein ROS produzierendes Enzym. Für die Messung ihrer Aktivität gibt es einen speziellen Assay, den Xanthinoxidase-Assay.

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass in den MCT-Gruppen eine deutliche Zunahme der Xanthinoxidaseaktivität vorlag, während PETN diese vollständig normalisieren konnte (Abbildung 27 D).

4.2.4.5 Nox2-Expression

Die NADPH-Oxidase Isoform 2 (Nox2) ist ein superoxidproduzierendes Enzym. Ist sie in verstärktem Maße vorhanden, geht dies mit erhöhtem oxidativen Stress einher. Wir untersuchten die Menge an Nox2 in den Aorten der Tiere mittels Western Blot. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Enzymexpression in den erkrankten Tieren, nicht jedoch in den mit PETN behandelten (Abbildung 28 A).

4.2.4.6 3-Nitrotyrosin-Level

3-Nitrotyrosin entsteht bei der Reaktion von tyrosinhaltigen Proteinen mit Peroxynitrit, dem Reaktionsprodukt aus Superoxid und Stickstoffmonoxid. Diese veränderten Proteine können durch Bindung an spezifische Antikörper zum Beispiel mittels Dot Blot Analyse sichtbar gemacht werden.

Auch hier konnte eine Zunahme der 3-Nitrotyrosinbildung in den Gruppen mit MCT-induzierter PAH verzeichnet werden, die durch PETN verhindert werden konnte (Abbildung 28 B). Es ist die quantitative Auswertung der Densitometrie als Blockdiagramm sowie eine repräsentative fotografische Abbildung zu sehen.

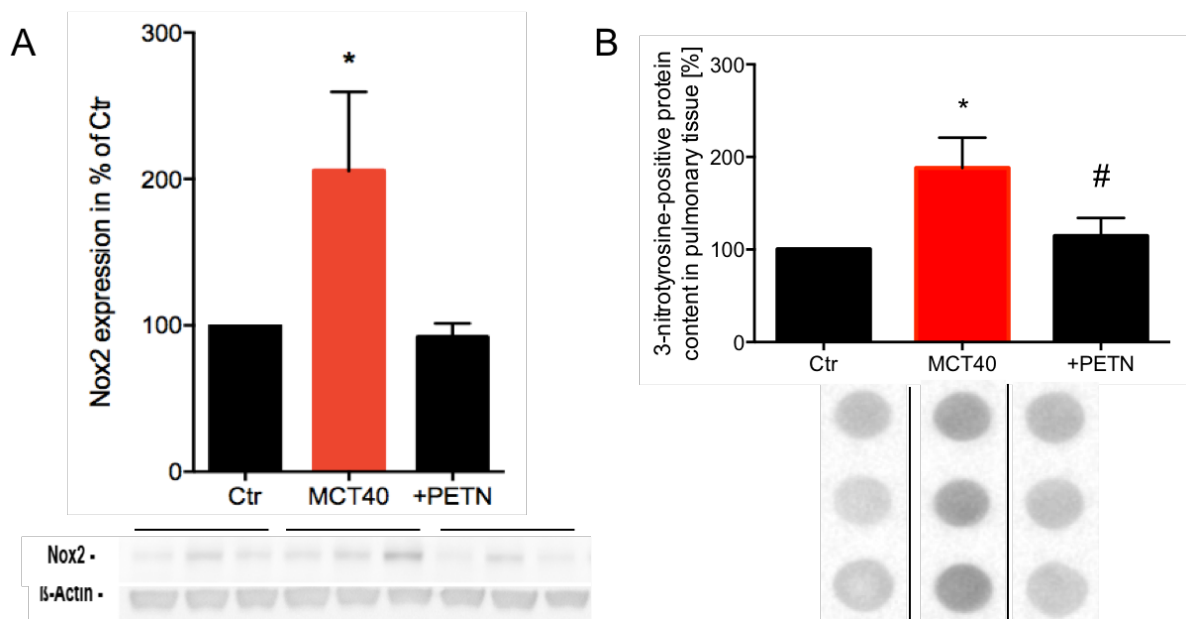


Abbildung 28: Wirkung von PETN-Therapie auf verschiedene Marker des oxidativen Stresses in MCT-behandelten Ratten. A: Nox2-Expression in der Aorta mittels Western Blot. B: 3-Nitrotyrosinpositive Proteine im Lungengewebe mittels Dot Blot. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-6$ Tiere/ Gruppe.

4.2.5 Hämoxygenase-1-Expression

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid abbaut. Die HO-1 stellt ein Stress-Antwort-Gen dar, d.h. unter zellulären Stressbedingungen wird es hochreguliert und stellt damit einen Marker für zellulären (oxidativen) Stress dar. Gleichzeitig wirkt die HO-1 stark antioxidativ und protektiv und stellt damit ein wichtiges enzymatisches Schutzsystem im Organismus dar. D.h. die Expression der HO-1 kann zum einen bedeuten, dass zellulärer Stress vorhanden ist, aber auch gleichzeitig zelluläre Schutzmaßnahmen induziert wurden, um diesen zellulären Stress einzudämmen.

Wir untersuchten die mRNA-Expression der HO-1 als Korrelat der Proteinexpression mittels rt-PCR.

Es zeigten sich erhöhte mRNA-Level der HO-1 im Lungengewebe der MCT-Gruppe. Zusätzlich kam es zu einer weiteren Erhöhung der mRNA-Level durch die Behandlung mit PETN (siehe Abbildung 29).

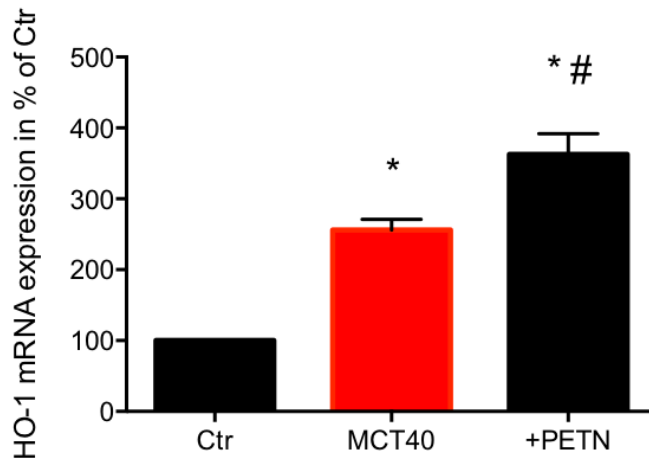


Abbildung 29: HO-1 mRNA-Level in Lungengewebe MCT-behandelter Ratten mittels rt-PCR. * $p < 0,05$ versus Kontrolle, # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe.

4.2.6 Inflammation

4.2.6.1 VCAM-1-Expression

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) ist ein Adhäsionsmolekül des Gefäßendothels, das für die Bindung und Migration von Entzündungszellen zuständig ist (siehe Kapitel 2.3.5).

Im Lungengewebe der erkrankten Tiere wurde eine erhöhte Expression der VCAM-1-mRNA-Level mittels rt-PCR nachgewiesen. Die Behandlung mit PETN bewirkte zwar

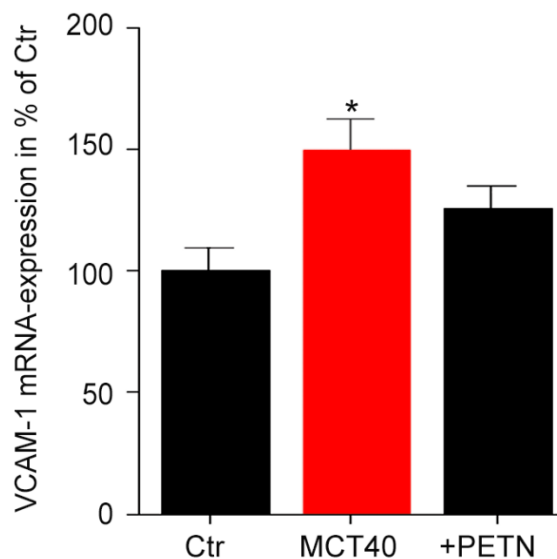


Abbildung 30: VCAM-1 mRNA-Level in Lungengewebe MCT-behandelter Ratten mittels rt-PCR. * $p < 0,05$ versus Kontrolle. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, N = 3-6 Tiere/ Gruppe.

keine signifikante Verringerung gegenüber der MCT40 Gruppe, aber zumindest auch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 30).

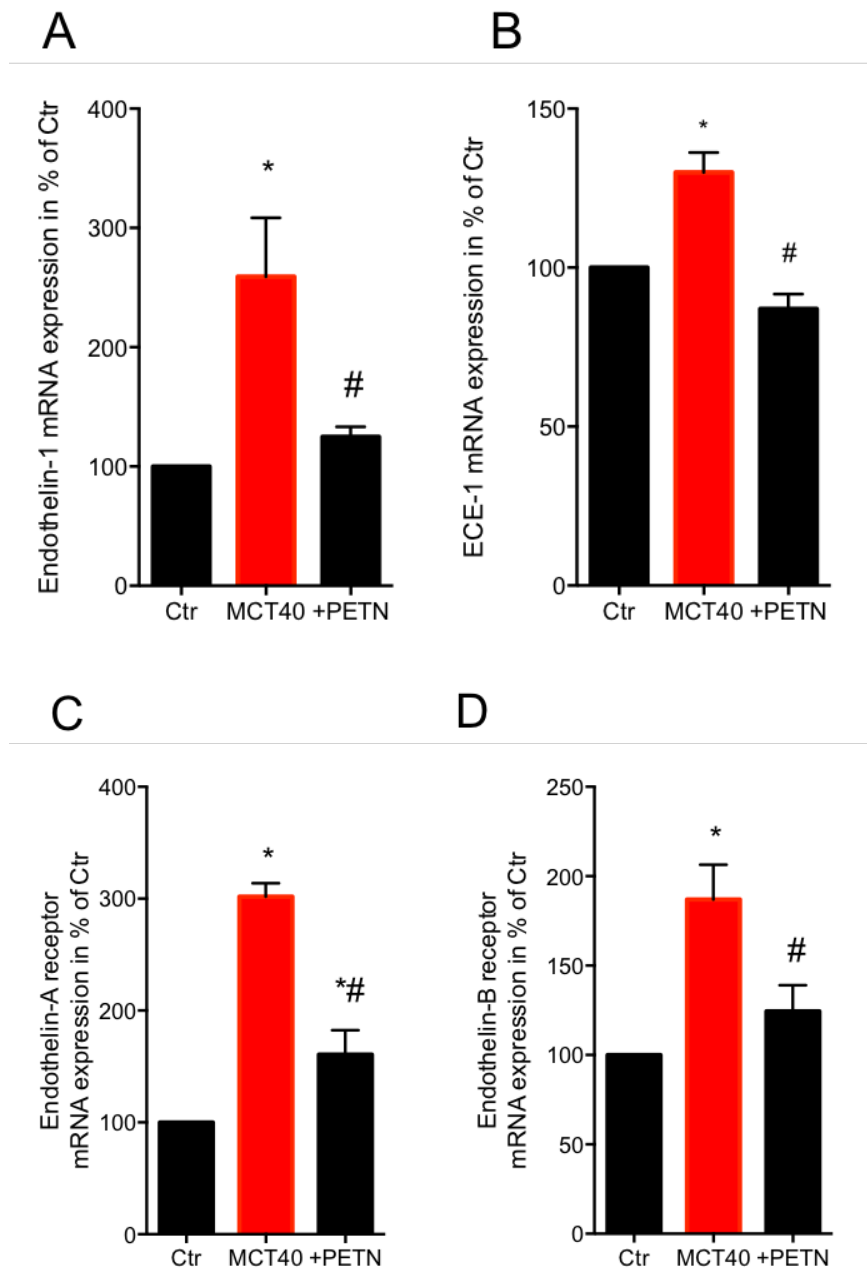


Abbildung 31: Einfluss von PETN auf den Endothelin-Signalweg in Lungengewebe von Ratten mit MCT-induzierter PAH. Die mRNA-Level für A: Endothelin-1, B: Endothelin konvertierendes Enzym (ECE), C: Endothelinrezeptor A, D: Endothelinrezeptor B wurden mittels qRT-PCR im Lungengewebe gemessen. * $p < 0,05$ versus Ctr; # $p < 0,05$ versus MCT40. Ctr: Kontrolle. MCT40: Monocrotalin 40 mg/kg KG. +PETN: Monocrotalin 40 mg/kg KG + PETN-Therapie. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 6$ Tiere/ Gruppe.

4.2.7 Endothelin-1-Signalweg

Endothelin-1 (ET-1) spielt als hochpotenter Vasokonstriktor eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der PAH.

Wir untersuchten die mRNA-Level von ET-1, Endothelin converting Enzyme (ECE), Endothelinrezeptor A (ET_A) und Endothelinrezeptor B (ET_B) im Lungengewebe der Versuchstiere. Hier zeigten sich konkordante Ergebnisse: in der MCT-Gruppe waren die Werte jeweils erhöht, die Behandlung mit PETN konnte eine Hochregulation weitestgehend verhindern (siehe Abbildung 31).

4.3 In-vitro Versuche

Um die Rolle des Endothelins weiter zu untersuchen, führten wir Versuche mit humanen Blutproben gesunder Probanden sowie in kultivierten Endothelzellen (EA.hy 926) durch.

Für diese Versuche verwendeten wir das Endothelin-Analogon BQ-3020, welches ein ET_B-selektiver ET-Agonist ist. Er vermittelt neben der ET-Clearance auch eine pulmonale Vasokonstriktion und endotheliale Dysfunktion (siehe Kapitel 2.3.4).

4.3.1 Versuche in Zellkultur

Die kultivierten Endothelzellen wurden über 24 Stunden mit BQ-3020 sowie PETN inkubiert, anschließend die mRNA isoliert und mittels rt-PCR die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) untersucht. ICAM-1 ist wie VCAM-1 ein Oberflächenadhäsionsprotein, welches an der Interaktion von Endothel und Immunzellen beteiligt ist (siehe Kapitel 2.3.5).

BQ-3020 bewirkte hier eine erhöhte Expression der ICAM-1-mRNA, die durch PETN signifikant reduziert werden konnte (siehe Abbildung 32).

4.3.2 Versuche in humanen Blutproben

Humanes Blut von gesunden Probanden wurde in vitro mit verschiedenen Dosen BQ-3020 sowie PETN inkubiert und anschließend der oxidative Burst gemessen. Hierbei konnten mit steigender BQ-3020-Konzentration steigende Werte im oxidativen Burst gemessen werden, während PETN eine protektive Wirkung zeigte (siehe Abbildung 33).

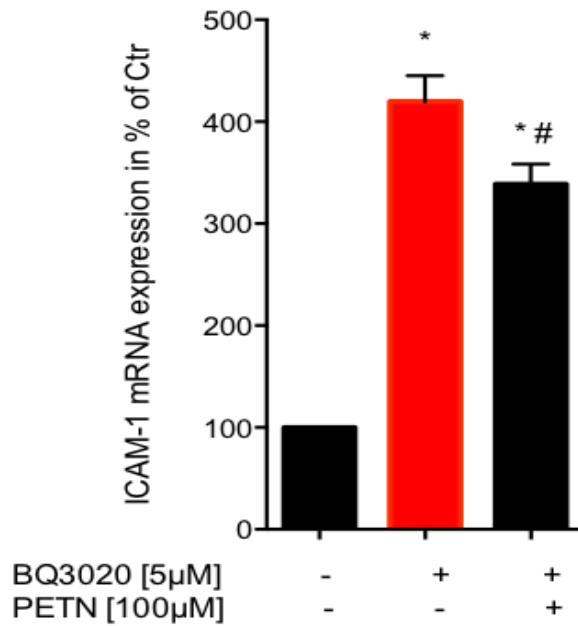
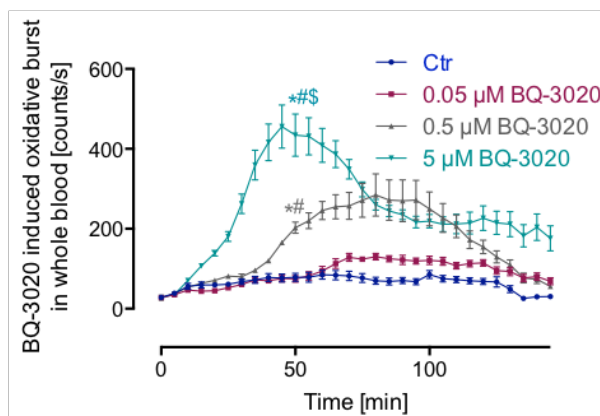


Abbildung 32: Einfluss des Endothelin-Analogons BQ-3020 sowie PETN auf die ICAM-1 mRNA-Level in EA.hy-Zellen mittels qRT-PCR. * $p < 0,05$ versus ohne Behandlung; # $p < 0,05$ versus BQ-3020 Behandlung. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 3-7$ Zellansätze/ Gruppe.

A



B

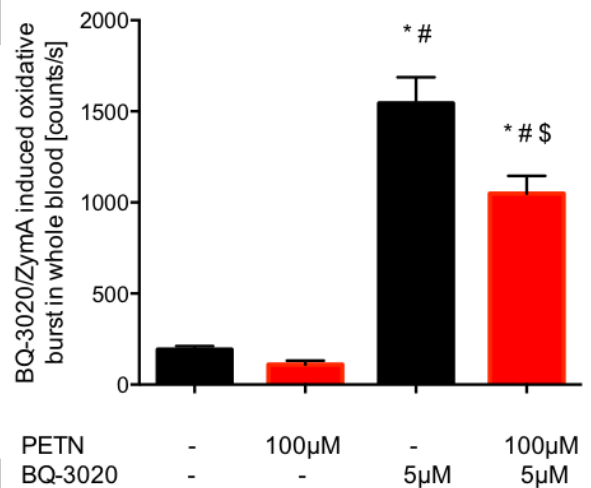


Abbildung 33: Einfluss des Endothelin-Analogons BQ-3020 sowie PETN auf den oxidativen Burst in Vollblut. A: zeitlicher Verlauf des oxidativen Bursts in Vollblut gesunder humaner Probanden mit BQ-3020 in steigenden Konzentrationen mittels L-012 ECL. B: Oxidativer Burst in Vollblut gesunder humaner Probanden nach Inkubation mit PETN und/oder BQ-3020 sowie Co-Simulation mit dem Pyrogen Zymosan A ($0,5 \mu\text{g/ml}$) mittels L-012 ECL. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, $N = 16$ Zellansätze/ Gruppe. Signifikanzsymbole in A: * $p < 0,05$ versus Ctr; # $p < 0,05$ versus $0,05 \mu\text{M}$ BQ-3020; \$ $p < 0,05$ versus $0,5 \mu\text{M}$ BQ-3020. Signifikanzsymbole in B: * $p < 0,05$ versus ohne Behandlung; # $p < 0,05$ versus $100 \mu\text{M}$ PETN; \$ $p < 0,05$ versus $5 \mu\text{M}$ BQ-3020.

5 Diskussion

Die Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass PETN oxidativen Stress reduzieren und endotheliale Dysfunktion im Tiermodell der PAH verbessern kann. Dies deckt sich mit früheren Erkenntnissen hinsichtlich der protektiven Eigenschaften von PETN unter anderem in einem Modell der arteriellen Hypertonie durch Angiotensin-II Behandlung (20), in spontan hypertensiven Ratten (214) und bei experimentellem Diabetes (21) sowie in klinischen Studien der eigenen (187, 215), aber auch anderer Forschungsgruppen (15). Die Behandlung mit PETN zeigte auch protektive Effekte bei experimenteller Präeklampsie in Ratten (23) sowie bei Risikoschwangerschaften von Frauen mit Präeklampsie (22), wobei PETN die stärksten Schutzeffekte im Nachwuchs zeigte. Generell kann festgehalten werden, dass PETN im Gegensatz zu allen anderen klinisch verwendeten organischen Nitraten im Patienten weder eine Nitratoleranz noch eine Kreuztoleranz (endotheliale Dysfunktion) verursacht (zusammengefasst in Abbildung 34) (121).

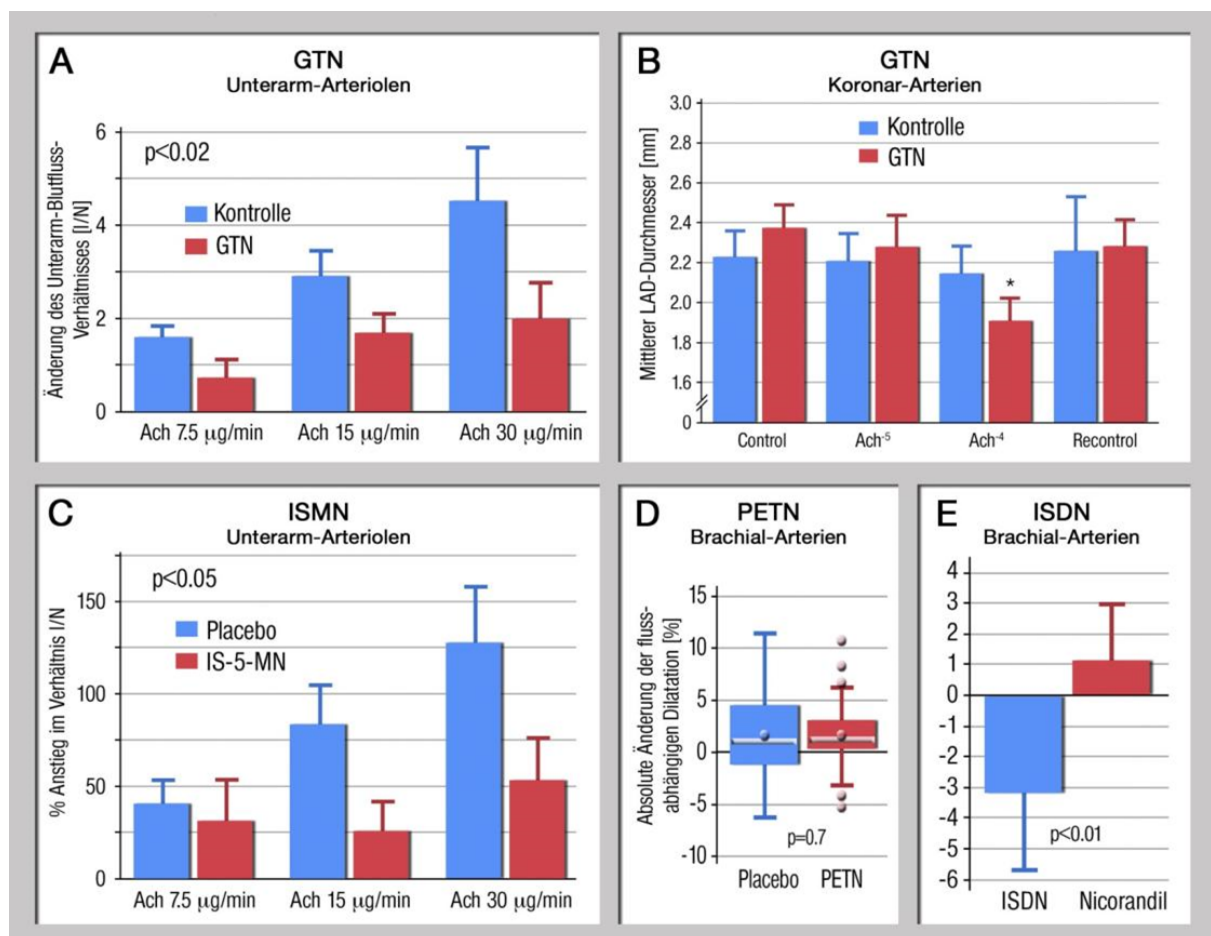


Abbildung 34: Endotheliale Dysfunktion durch Behandlung mit organischen Nitraten. A: Endotheliale Dysfunktion durch GTN in peripheren Arteriolen. B: Endotheliale Dysfunktion durch GTN in Koronararterien. C: Endotheliale Dysfunktion durch ISMN in peripheren Arteriolen. D: PETN löste keine endotheliale Dysfunktion in Brachialarterien aus. E: Endotheliale Dysfunktion durch ISDN in Brachialarterien. Abbildung aus (121)

So kam es unter PETN-Therapie im Gegensatz zu allen anderen Nitraten nicht zu einer Abschwächung der Acetylcholin-vermittelten Relaxation, als Indiz der Aufrechterhaltung der Endothelfunktion durch die protektiven Effekte des PETN.

PETN ist wie bereits eingangs beschrieben ein organisches Nitrat, das sich deutlich von anderen organischen Nitraten wie Nitroglycerin (GTN), Isosorbidmononitrat oder -dinitrat unterscheidet (15, 105, 121, 178). Allen gemein ist, dass sie sehr potente Vasodilatoren mit antiischämischen Effekten sind und unter anderem bei akutem Koronarsyndrom, Herzinsuffizienz oder hypertensiver Entgleisung verwendet werden können. Bei chronischer Anwendung kommt es allerdings bei den organischen Nitraten zur Nitrattoleranz und endothelialen Dysfunktion, wobei PETN dabei eine Ausnahme darstellt (15, 16, 121, 215). Zum Beispiel konnte in einer Studie an 30 gesunden jungen Männern der Unterschied zwischen GTN und PETN in der chronischen Anwendung demonstriert werden (15). Die Autoren verabreichten den Probanden jeweils über eine Woche Nitroglycerin, PETN oder Placebo und untersuchten die Effekte auf Blutdruck, Herzfrequenz, die Endothelfunktion mittels Verschlussplethysmographie und als Marker für oxidativen Stress Isoprostane und Aldehyde. In der GTN-behandelten Gruppe zeigte sich nach einwöchiger Therapie eine Nitrattoleranz, erkennbar an fehlendem Blutdruckabfall sowie erhöhten Parametern für oxidativen Stress, während die PETN-Behandelten auch nach der einwöchigen Therapie auf die Nitratgabe mit Blutdruckabfall reagierten und die Isoprostan- und Aldehydlevel auf dem Niveau der placebobehandelten Kontrollgruppe lagen (15).

Im Jahr 2014 wurden Daten einer größeren randomisierten und kontrollierten Studie veröffentlicht, die PETN in einer Dosierung von 80 mg bei der Behandlung von Patienten mit stabiler Angina pectoris im Vergleich zu Placebo untersuchte (CLEOPATRA Studie) (187). Hierbei konnte im Vergleich zu Placebo eine Verbesserung der Trainingsdauer bei Patienten mit niedriger Belastungsfähigkeit erreicht werden, während in dem unselektierten Gesamtpatientenkollektiv bei stabiler Angina pectoris keine Vorteile gegenüber der Placebogabe bestanden (187). Es bleibt also weiterhin zu untersuchen, welche weiteren Patientensubgruppen gegebenenfalls von einer Behandlung mit PETN profitieren könnten.

Auch in Tierstudien konnte ein protektiver Effekt des PETN zum Beispiel bei Atherosklerose belegt werden (216). Hier wurde an einem Kaninchenmodell der diätinduzierten Hypercholesterinämie mit Ausbildung von Atherosklerose der Effekt von PETN auf Superoxidproduktion, Größe der atherosklerotischen Läsionen sowie

die Relaxationsfähigkeit der Aorten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass PETN sowohl die Gefäßfunktion erhalten, die atherosklerotischen Läsionen reduzieren als auch die Ausbildung von oxidativem Stress verhindern konnte (216).

Als ein zugrundeliegender Mechanismus für die protektive Wirkung von PETN konnte die Induktion der Hämoxigenase (HO-1) aufgefunden gemacht werden (188). Hierfür wurden kultivierte humane Endothelzellen mit dem aktiven Metabolit von PETN, Pentaerythryltrinitrat (PETriN), inkubiert und die Expression der HO-1 in Reaktion auf steigende PETriN-Konzentrationen gemessen. Zusätzlich wurden als Parameter die Konzentrationen der Produkte der HO-1-Aktivität, Bilirubin und Kohlenmonoxid, gemessen und jeweils erhöhte Werte bei steigenden PETriN-Konzentrationen detektiert (188).

Die Hämoxigenase spielt auch im Tiermodell bei kardiovaskulären Erkrankungen eine protektive Rolle (19, 139, 217-220). Dies wurde gezeigt in verschiedenen experimentellen Studien, z.B. in HO-1-Knockoutmäusen, die einer Hypoxie ausgesetzt wurden und daraufhin eine pulmonale Hypertonie entwickelten (217), oder durch eine Induktion der HO-1 bei Diabetes oder chronischer GTN-Therapie, die zu einer verbesserten Situation der diabetischen Komplikationen und der GTN-induzierten Gefäßdysfunktion führte (19, 139). Weiterhin konnte eine protektive Wirkung vor hypoxischen Herzmuskelschäden durch einen HO-1-Gentransfer im Mausmodell beschrieben werden (221).

Die Arbeitsgruppe um Daiber und Münzel konnte an Wistar-Ratten die unterschiedliche Wirkung von GTN und PETN insbesondere auf die Expression der HO-1 demonstrieren (19). Nach viertägiger Infusion von GTN oder PETN wurden die Gefäßfunktion, HO-1-Expression, Ferritinlevel, oxidativer Stress und ALDH-2-Aktivität sowie der Einfluss einer HO-1-Induktion oder -Inhibition untersucht. Neben den bereits erwarteten Effekten der ausbleibenden Nitratoleranz durch PETN-Behandlung konnte auch gezeigt werden, dass eine Induktion der HO-1 durch Hämin zu einer verminderten Toleranzentwicklung in den GTN-behandelten Tieren und Inhibition durch Apoginin zu einer vermehrten Toleranzentwicklung in den PETN-behandelten Tieren führte. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 35 gezeigt. Weiterhin ging der protektive Effekt von PETN in einem Hypertoniemodell verloren, wenn die HO-1 genetisch zu 50% deletiert wurde. (20)

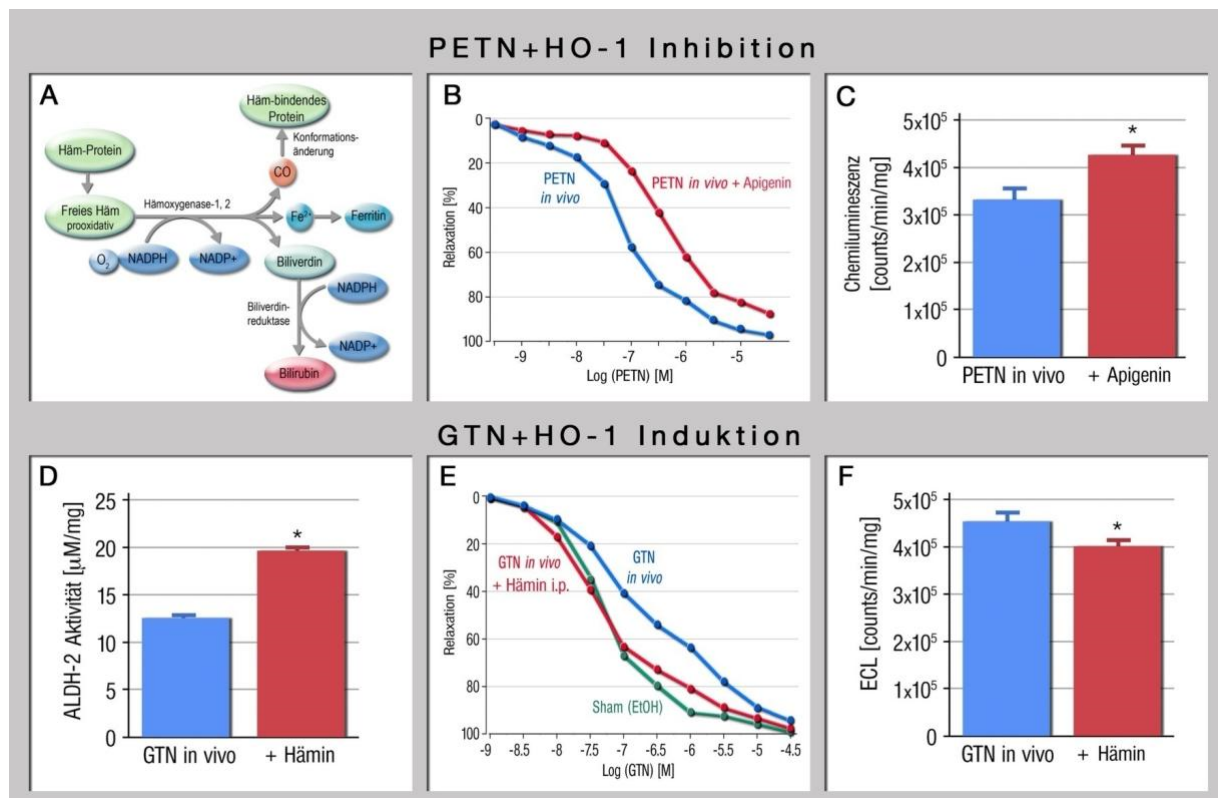


Abbildung 35: Auswirkungen der HO-1-Expression/-Inhibition auf die Nitrattoleranz. Hemmt man die HO-1 bei PETN-behandelten Tieren, wird eine Toleranz und erhöhte Superoxidproduktion induziert. Induziert man die HO-1 bei GTN-behandelten Tieren, konnte eine Toleranzentwicklung sowie Superoxidproduktion gehemmt und die Aktivität der ALDH-2 (bioaktivierendes Enzym des GTN) normalisiert werden. Abbildung aus (121), Originaldaten aus (18)

Anhand der oben aufgeführten Studien wird ersichtlich, warum in der vorliegenden Studie der Effekt von PETN auf die PAH als eine kardiovaskuläre Erkrankung mit erhöhtem oxidativen Stress und Gefäßdysfunktion untersucht wurde.

5.1 Tiermodell der MCT-induzierten pulmonalen arteriellen Hypertonie

In unserem Tiermodell wurde Monocrotalin intravenös über die Vena dorsalis penis verabreicht. Dies unterscheidet sich von anderen Studien, in denen die Verabreichung meist intraperitoneal oder subkutan geschieht (48).

Zur Überprüfung der Wirksamkeit unserer Methode führten wir einige Versuche durch, die bestätigten, dass man eine signifikante Wirkung auf verschiedene Parameter der PAH durch einmalige Gabe von 40 mg/kg KG intravenös und einer Wartezeit von 4 Wochen erreichen kann.

Die 6-wöchige Behandlung führte zu einer hohen Sterblichkeit der Tiere, ebenso eine Behandlung mit 60 mg/kg KG MCT. Die niedrigere Dosis von 30 mg/kg KG zeigte

zum Teil nicht die gewünschten Effekte, ebenso wie eine kürzere Behandlungsdauer von 2 Wochen (siehe auch Kapitel 4.1).

Die Übertragbarkeit des PAH-Modells auf den Menschen ist allerdings umstritten (195). Obwohl das Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie ein weitverbreitetes ist, gibt es einige Limitationen, was den Vergleich mit der PAH beim Menschen angeht.

Viele pathophysiologische Merkmale, die in den Ratten durch MCT ausgelöst werden, existieren beim Menschen mit PAH nicht. Dazu gehören Lungenödem, Myokarditis, renale Veränderungen und hepatoookklusive Erkrankung (195, 222-224). Auch die Beteiligung von Venen und extrapulmonalen Gefäßen ist kein Merkmal der PAH, im Rattenmodell allerdings ausgeprägt. Monocrotalin wirkt toxisch auf Gefäße des Körperkreislaufs sowie weitere Organe wie Leber, Herz und Niere (46, 48, 225). Außerdem konnte für eine große Reihe an Substanzen eine heilende Wirkung auf MCT-induzierte PAH gezeigt werden, von denen sich viele nicht auf humane Situationen übertragen ließen, darunter auch einige, die sogar an der Pathogenese der PAH beteiligt zu sein scheinen, wie Elastase oder der inzwischen verbotene Appetitzügler Dexfenfluramin (46, 226, 227).

Erschwerend kommt hinzu, dass der genaue Wirkmechanismus des MCT nicht bekannt ist. Es wird angenommen, dass eine direkte Endothelschädigung im Verlauf zu einer pulmonalen Hypertonie führt. Diese Theorie wird auch unterstützt durch unsere Untersuchungsergebnisse, bei denen eine Gefäßdysfunktion nicht nur in den Pulmonalarterien, sondern auch in den Aorten unserer Versuchstiere zu verzeichnen war (siehe Abbildung 20). Dies ist vermutlich auf die systemische toxische Wirkung des Monocrotalins zurückzuführen (48).

Eine Zusammenfassung der kritischen Studien haben Gomez-Arroyo et al. in einem Review (195) vorgelegt.

Auf der anderen Seite ist das Tiermodell in Bezug auf den hämodynamischen und histopathologischen Schweregrad und die hohe Mortalität aber mit der PAH vergleichbar (228). Die sekundären Veränderungen, die auf die Gefäßdysfunktion folgen, lassen sich ebenfalls gut abbilden (47).

So wurde auch in der vorliegenden Studie mittels Echokardiographie der pulmonalarterielle Druck nichtinvasiv gemessen. Dabei zeigte sich deutlich ein erhöhter pulmonalarterieller Blutdruck in den MCT-behandelten Tieren. Die Behandlung mit PETN konnte einen signifikanten Blutdruckanstieg verhindern, was zum einen durch seine bekannte Wirkung als Vasodilatator zu erklären ist, aber

daneben vermutlich auf den antioxidativen und anti-inflammatorischen Effekten beruht.

Die pulmonale Hypertonie geht mit einer Fibrosierung der Lungen und einer erhöhten Steifigkeit der Gefäße einher, welche durch die erhöhte Druckbelastung im rechten Herzen mit der Zeit zu einer Rechtsherzhypertrophie führt.

Wir führten also, um den Erfolg unserer MCT-Behandlung zu überprüfen, auch eine Bestimmung der Organgewichte der Herzen und der Lungen unserer Versuchstiere durch und bezogen das jeweils gemessene Organgewicht auf das Gesamtgewicht des jeweiligen Tiers.

Das Gewicht der Herzen wurde dabei als Korrelat der kardialen Hypertrophie angesehen. Dies kommt zustande, da das Herz aufgrund des hohen pulmonalarteriellen Widerstands einer Mehrbelastung ausgesetzt ist, was das Zellwachstum anregt und damit eine Hypertrophie begünstigt.

Die Lungen werden ebenfalls durch eine Zunahme des Parenchyms schwerer, hier allerdings aufgrund der Fibrosierung, welche durch eine Zunahme von Kollagenfasern und Bindegewebszellen gekennzeichnet ist. Die Fibrosierung wird im Tiermodell durch MCT ausgelöst, beim Menschen ist die Ursache letztendlich noch unklar. Durch die Zunahme des Gewebes sinkt die Gefäßflexibilität dann zusätzlich zur bereits vorhandenen Gefäßdysfunktion noch weiter.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass durch die Behandlung mit MCT sowohl die Herzen als auch die Lungen der Versuchstiere schwerer wurden. Die Behandlung mit PETN machte diesen Effekt rückgängig (siehe Abbildung 25, Seite 68).

Unter Einbeziehung der oben genannten Faktoren können einige wichtige Aspekte der PAH, wie die rechtsventrikuläre Hypertrophie, vaskuläres Remodelling, Lungenfibrose, Inflammation und oxidativer Stress, dennoch gut im MCT-Rattenmodell untersucht werden (48).

Somit sind unsere Ergebnisse mit PETN zwar sehr positiv und vielversprechend, eine Wirkung beim Menschen ist aber offen und muss weiter untersucht werden.

Seit einigen Jahren läuft eine Studie von Actavis Deutschland GmbH, die die „Wirksamkeit einer 12-wöchigen oralen Therapie mit Pentalong® (PETN) auf die Belastbarkeit und Lebensqualität von Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz und sekundärer pulmonaler Hypertonie“ (229) überprüfen möchte. Es handelt sich um eine multizentrische interventionelle Studie mit placebokontrolliertem, randomisiertem, doppelblindem Design. Als primärer Endpunkt wurde dabei eine

Überlegenheit in der Verbesserung des pulmonalen vaskulären Widerstands (PVR) nach einer 12-wöchigen oralen Pentalong®-Therapie im Vergleich zur Placebothherapie zusätzlich zu einer Standardtherapie der Herzinsuffizienz festgelegt (229). Bisher wurden dazu keine Ergebnisse veröffentlicht.

5.2 Nitrate in der Therapie der PAH

Die Idee, Nitrate zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zu verwenden, ist nicht neu. Versuche scheiterten aber häufig an der fehlenden Selektivität für Lungengefäße (230). Somit wurden bereits verschiedene inhalative Behandlungsoptionen ausgetestet, zum Beispiel mit NO oder Nitroglycerin (231-233). Hierbei konnte jeweils eine selektive Wirkung der inhalativen Therapie mittels NO und Nitroglycerin auf den Lungenkreislauf (Reduktion des pulmonalarteriellen Drucks und des pulmonalen vaskulären Widerstands) gezeigt werden (siehe Abbildung 36). Systemischer Blutdruck, systemischer vaskulärer Widerstand und Herzfrequenz blieben davon unbeeinträchtigt. Somit sind diese Anwendungsformen für eine Therapie auf der Intensivstation gut geeignet, als Dauertherapie aber impraktikabel. Auch der NO-Donor und K⁺-Kanalöffner Nicorandil konnte positive Effekte auf rechtsventrikulären Druck, endotheliale Gefäßläsionen und eNOS-Expression in einem Tiermodell der PAH verzeichnen (234).

Eine schwedische Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von nitratreichem Rote-Beete-Saft auf Patienten mit PAH. Es wurde gezeigt, dass nach einwöchiger täglicher Applikation von etwa 16 mmol Nitrat pro Tag ein Anstieg der NO-Konzentration in der Ausatemluft zu verzeichnen war, einhergehend mit einer niedrigeren Atemfrequenz in der Spiroergometrie und eine tendenzielle Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion. Auch die untersuchten Biomarker und Metabolite des NO-Stoffwechsels zeigten sich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (235). Die genannten Beispiele zeigen den Nutzen einer Therapie der PAH mit organischen Nitraten bzw. NO-Donoren.

Der sGC-Stimulator Riociguat findet als Medikament, das etwas weiter unten im NO-Signalweg eingreift (sowohl NO als auch Riociguat aktivieren die sGC), bereits Anwendung in der first-line-Therapie der PAH.

Aufgrund seines bereits mehrfach erwähnten positiven Nebenwirkungsprofils und seiner insgesamt positiven Wirkung in der vorliegenden Studie scheint PETN ein vielversprechender Ansatz zur unterstützenden Therapie der PAH.

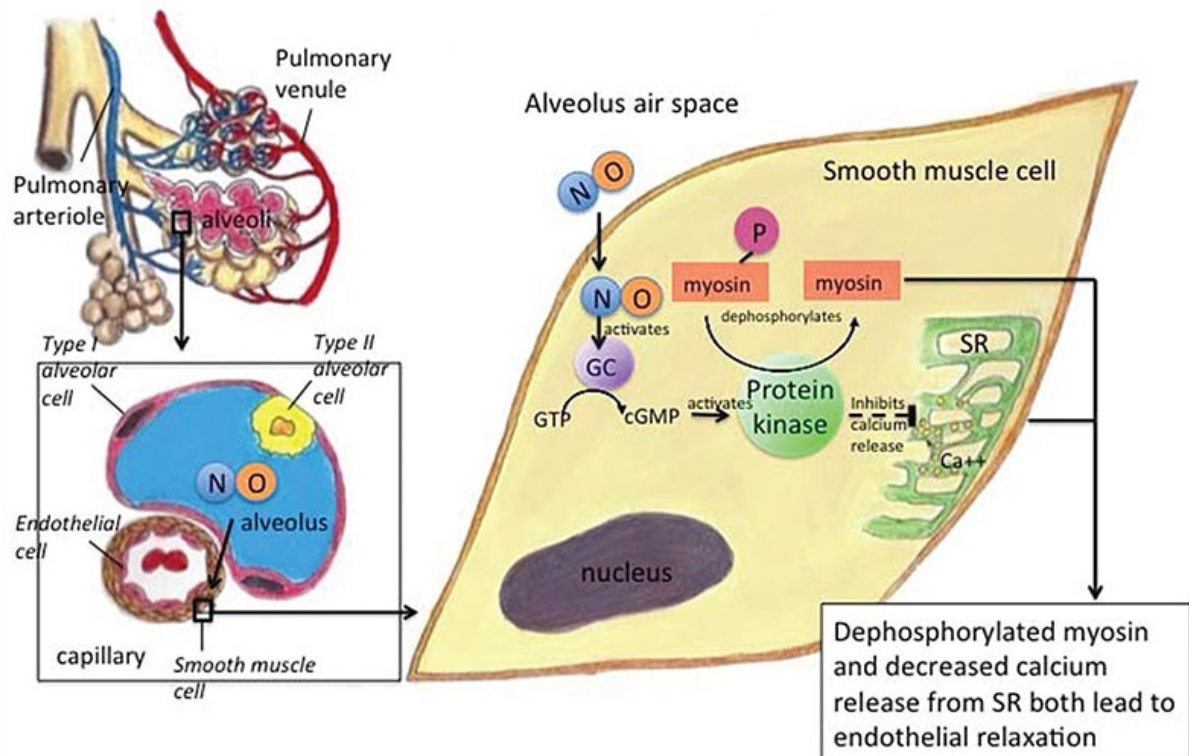


Abbildung 36: Wirkung von inhalativem NO. Inhalatives NO diffundiert von den Alveolen in die glatten Gefäßmuskulzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (GC), welche aus GTP (Guanosin triphosphat) cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) synthetisiert. cGMP aktiviert die Proteinkinase, wodurch es zu einem verminderten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie zur Dephosphorylierung von Myosin und damit zur Relaxation führt. Abbildung aus (236)

5.3 Oxidativer Stress

Wie bereits erwähnt, ist der oxidative Stress einer der Haupt-Pathomechanismen der PAH. Dies wird unter anderem in Studien deutlich, die den Einfluss der Superoxiddismutase (SOD) auf die PAH untersuchten.

In einem Rattenmodell der MCT-induzierten PAH konnte eine Überexpression der extrazellulären SOD (ecSOD) die Hypertonie sowie Gefäßproliferation und Remodeling verbessern (237). Eine Inaktivierung der ecSOD führte zu einer schweren Lungenschädigung und hohen Mortalität bei Mäusen (238).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit PETN über eine erhöhte NO-Bildung eine Induktion der ecSOD stattfand, was zum Teil zu den antioxidativen und antiatherosklerotischen Eigenschaften von PETN beiträgt (189).

Daher konzentrierten sich unsere Untersuchungen zu einem großen Teil auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses.

Mit der DHE-Färbung wurde durch Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs DHE und anschließende Interkalation in die DNA die intrazelluläre Superoxidproduktion in der

Lamina media der Pulmonalarterien fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (203). Mit dieser Methode wird hauptsächlich Superoxid gemessen (239), allerdings ist eine Reaktion mit anderen reaktiven Spezies wie Hydroxyl-Radikalen und Wasserstoffperoxid möglich.

In den abgebildeten Fotos der mikroskopischen Präparate der Pulmonalgefäße (Abbildung 27) sieht man deutlich die Zunahme der rot fluoreszierenden Zellkerne in der Gruppe der erkrankten Tiere. Durch die PETN-Behandlung normalisierte sich das Bild.

Auch hier ließ sich also erhöhter oxidativer Stress im Tiermodell nachweisen, der sich durch PETN reduzieren ließ.

5.3.1 NADPH-Oxidase-Aktivität

Wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben, sind NADPH-Oxidasen (Nox) ROS-produzierende Enzyme, die unter anderem zur Erregerabwehr benötigt werden und durch hormonelle Regulation und physikalische Einwirkung auf die Gefäßwände induziert werden. Eine vermehrte Expression bedeutet also vermehrte ROS-Produktion. Die Nox2 ist unter anderem im Endothel, in glatter Gefäßmuskulatur, Fibroblasten und perivaskulärem Fett exprimiert und spielt neben der Nox1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Hypertonie, Gefäßdysfunktion und Inflammation (67, 68). PETN verhinderte einen Anstieg der NADPH-Oxidase-Expression (siehe Abbildung 28).

Die Regulation der Nox ist komplex und multifaktoriell. Hierbei spielt auch die Proteinkinase C (PKC) eine Rolle, da sie durch ROS stimuliert werden kann und dann durch Phosphorylierung der p47phox-Untereinheit zu einer Aktivierung der Nox2 führt (112).

Auf Transkriptionsebene sind verschiedene proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor-kappaB (NF- κ B), Activator protein-1 (AP-1) und STAT an der Aktivierung der Nox beteiligt, ebenso wie epigenetische Modifikationen wie posttranslationale Modifikation über Acetylierung und Hyperacetylierung oder Micro-RNA-Regulation (240).

Superoxid als Produkt der NADPH-Oxidase (Nox) kann direkt mittels Chemilumineszenz gemessen werden. Dabei wird mithilfe eines Chemilumineszenzfarbstoffs wie z.B. Lucigenin eine chemische Reaktion ausgelöst.

Luminol und L-012 benötigen für diese Reaktion Wasserstoffperoxid und Peroxidase-Aktivität.

Lucigenin wurde in unseren Messungen zur Bestimmung der NADPH-Oxidaseaktivität in kardialen Membranfraktionen verwendet, L-012 zur Messung des oxidativen Bursts in Vollblut (siehe Abbildung 27, Kapitel 3.2.7.1) (200).

Lucigenin wird durch die Reaktion mit Superoxid angeregt und somit Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht. Bei der anschließenden Rückführung des Elektrons wird Energie frei, die mittels Luminometer quantitativ gemessen werden kann. Diese Reaktion wird Chemilumineszenz genannt. Im Gegensatz zur Fluoreszenz wird hier die Energie für die Lichtemission nicht durch Licht, sondern durch eine chemische Reaktion ausgelöst.

Generell wird davon ausgegangen, dass die Methode der lucigeninvermittelten Chemilumineszenz in Membranfraktionen speziell die NADPH-Oxidase-Aktivität misst, da den Messungen NADPH als Substrat zugesetzt wird und in verschiedenen Studien durch unspezifische Nox-Inhibitoren wie Apocynin (210), aber auch spezifischen Inhibitoren eine Reduktion des Signals erreicht werden konnte (241, 242).

Es gibt allerdings Studien, die die Selektivität der Messung bezweifeln, z.B. von Rezende et al. 2016 (243). Laut den Autoren der genannten Studie kommt es auch bei Triple-Nox-Knockout-Mäusen zu einer vermehrten ROS-Bildung nach Stimulation und eine vermehrte Expression von NOS oder Cytochrom P450-Enzymen führte ebenfalls zu einer vermehrten ROS-Bildung in Membranfraktionen, so dass die gemessenen Werte möglicherweise auch unspezifische ROS-Bildung mit einbeziehen. Dennoch steht außer Frage, dass oxidativer Stress gemessen wird.

Eine weitere Limitation in der lucigeninvermittelten Chemilumineszenzmessung ist die Beobachtung, dass durch die Zugabe von Lucigenin eine zusätzliche Bildung von Superoxid induziert wird, so genanntes „Redox-Cycling“ (210). Daher ist nur eine semi-quantitative Aussage über die ROS-Produktion möglich, es besteht die Gefahr, dass man die ROS-Produktion überschätzt. Jedoch muss festgehalten werden, dass Lucigenin bei Zugabe in niedrigen Konzentrationen $<10\mu\text{M}$ keinen nennenswerten zusätzlichen Superoxidanteil generierte, wie anhand von ESR-basierten Spin-Trap Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (200).

In unseren Untersuchungen zur PAH sieht man einen deutlichen Anstieg der Superoxidproduktion in den erkrankten Tieren, während durch die Gabe von PETN das Level der Kontrollgruppe wiederhergestellt wurde.

Neben der vermehrten ROS-Produktion in der Chemilumineszenzmessung konnte auch mittels Western Blot eine erhöhte Expression der NADPH-Oxidase in den erkrankten Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 28).

Über welchen Mechanismus PETN an der Regulation beteiligt ist, bleibt zu untersuchen. Möglicherweise spielt auch hier die antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung eine Rolle, durch die zumindest die ROS-abhängige Induktion der Nox und vermehrte vaskuläre Präsenz der phagozytären NADPH-Oxidase durch infiltrierte Immunzellen verhindert wird.

5.3.2 Xanthinoxidase-Aktivität

Die Xanthinoxidoreduktase ist wie die NOS ein Enzym, das unter anderem durch Scherkräfte induziert wird und dessen Funktionsänderung von einer Dehydrogenase zur Oxidase durch oxidativen Stress getriggert wird (siehe Kapitel 2.3.1.2). Sie kommt im Plasma unter normalen Bedingungen nur in geringen Mengen vor (244). Unter pathophysiologischen Bedingungen ist sie jedoch in erhöhten Konzentrationen im Plasma messbar. Durch Zugabe von Cytochrom C, welches durch Superoxid reduziert wird und dadurch seine Absorptionseigenschaften ändert, und Xanthin als Substrat der Xanthinoxidase, lässt sich dann im Plasma photometrisch feststellen, wieviel Cytochrom C in einer bestimmten Zeit reduziert wurde. Um tatsächlich feststellen zu können, dass dieser Effekt durch die Xanthinoxidase hervorgerufen wird, wird gleichzeitig in einer zweiten Probe der Hemmstoff Allopurinol hinzugegeben. Damit lässt sich die Superoxidproduktion durch andere Quellen wie den NADPH-Oxidasen von der durch die Xanthinoxidase unterscheiden.

Wir konnten in unseren Versuchen eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase in den erkrankten Tieren feststellen (siehe Abbildung 27). Die Beobachtung lässt sich durch den erhöhten Scherstress erklären, welcher eine Induktion des Enzyms hervorruft, und die bereits vorhandenen RONS, die die Umwandlung von der Dehydrogenase in die Oxidaseform triggern. PETN konnte dies durch seine antioxidativen sowie dilatativen Eigenschaften verhindern und somit auch hier die Enzymaktivität auf Kontrollniveau senken.

5.3.3 3-Nitrotyrosinbildung im Lungengewebe

Vermehrte Bildung von 3-Nitrotyrosin wird in vielen kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, Lungenerkrankungen, Asthma oder Diabetes mellitus beobachtet (245). Dies ist unter anderem auf den Effekt der Reaktion von Superoxid mit NO zu Peroxynitrit zurückzuführen (siehe Kapitel 2.3.2). Peroxynitrit reagiert im Gewebe weiter mit den Tyrosinseitenketten in Proteinen zu 3-Nitrotyrosin, welches zum Beispiel mithilfe immunologischer Methoden sichtbar gemacht werden kann. Neben einer Funktionsänderung oder eines Funktionsverlustes der betroffenen Enzyme wie der Prostazyklinsynthese (246) kommt es dabei auch zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit, da NO durch die Reaktion mit Superoxid nicht mehr für seine eigentliche Funktion zur Verfügung steht. Dies führt zur Gefäßdysfunktion, da NO neben Prostazyklin der wichtigste relaxierende Faktor im Gefäßsystem ist.

Der der 3-Nitrotyrosinbildung zugrundeliegende Pathomechanismus wird nitrooxidativer Stress genannt, wobei neben Peroxynitrit auch weitere reaktive Stickstoffspezies wie zum Beispiel Stickstoffdioxid eine Rolle spielen (247, 248).

Durch die MCT-Behandlung kam es in unseren Versuchen ebenfalls zu einer vermehrten 3-Nitrotyrosinbildung im Lungengewebe, welche mittels spezifischer Antikörper im Dot Blot detektiert wurde (siehe Abbildung 21).

Auch hier ist die Wirkung dosisabhängig, die niedrige Dosierung von 30 mg/kg KG MCT zeigte keine Wirkung, während 40 mg/kg KG sowie 60 mg/kg KG MCT ähnlich hohe Werte für 3-Nitrotyrosin in den Lungengeweben hervorbrachten.

Zu beachten ist allerdings, dass die angewendete Methode aufgrund von Kreuzreaktionen und unspezifischen Bindungen der Antikörper nicht absolut spezifisch ist (245). Dennoch sind die deutlichen Unterschiede zwischen den Lungengeweben der gesunden und denen der MCT-behandelten Tiere hinweisend auf den Einfluss des Peroxynitrits. PETN konnte die Bildung von 3-Nitrotyrosin aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften verhindern (siehe Abbildung 28).

5.3.4 Relaxationsfähigkeit der Gefäße

Die Relaxationsfähigkeit der Gefäße lässt sich durch die Wirkung von Acetylcholin (ACh) überprüfen (siehe Kapitel 3.2.6). ACh bewirkt in der glatten Muskulatur über die Freisetzung von Calcium eine Kontraktion, die bei intaktem Endothel allerdings überlagert wird von der Wirkung in den Endothelzellen. Auch hier bewirkt ACh eine

Freisetzung von Calcium, dies führt im Endothel allerdings zur Aktivierung der eNOS, welche die Freisetzung von NO katalysiert und damit eine Relaxation bewirkt. Somit führt die Zugabe von ACh bei intaktem Endothel zu einer Relaxation. Je weniger intakt das Endothel ist (endotheliale Dysfunktion), desto weniger kann eine Relaxation stattfinden, bis es schließlich zur gegenteiligen Reaktion durch die Wirkung des ACh in den glatten Muskelzellen kommt. Im Rahmen des Acetylcholintests im Katheterlabor wird diese paradoxe Vasokonstriktion durch ACh in den Koronarien in stenotischen, Endothel-geschädigten Bereichen diagnostisch zunutze gemacht.

Dabei geht es nicht nur um eine mechanische Intaktheit des Endothels, sondern auch um die reguläre Funktion der eNOS. Wie bereits weiter oben beschrieben, kann die eNOS durch Einwirkung von oxidativem Stress entkoppelt werden. Es kommt zum Redoxswitch, was bedeutet, dass durch die Einwirkung von oxidativem Stress eine Änderung der Enzymaktivität von einer NO-Synthase zu einem Superoxid-produzierenden Enzym bewirkt wird (114). Es kommt also zu einem Mangel an NO und zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses. Somit fehlt, vereinfacht gesagt, das entscheidende vasorelaxierende Molekül NO und es kommt zur endothelialen Dysfunktion.

Wie in Abbildung 26 gezeigt, führte die Behandlung mit MCT in unseren Versuchstieren zu einer Zunahme der Gefäßdysfunktion, auch hierbei in einer dosisabhängigen Stärke. Zumindest partiell konnte dies durch die Behandlung mit PETN verhindert werden, da PETN sowohl selbst NO freisetzt als auch durch die Induktion der HO-1 die ROS-Level senkt und dadurch NO bioverfügbar macht. Dieser Effekt konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, z.B. von Hacker et al. in einer Studie an Kaninchen mit Atherosklerose (216).

Wie bei den meisten kardiovaskulären Erkrankungen konnte also auch in unserem Tiermodell der PAH mit allen genannten Methoden erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen werden. Dabei sind sowohl NADPH-Oxidasen als auch Xanthinoxidasen involviert. Der bereits bei anderen Erkrankungen mit erhöhtem oxidativen Stress nachgewiesene protektive Effekt von PETN ließ sich bei uns ebenfalls nachweisen (20, 21, 249).

5.4 Induktion der Hämoxxygenase-1

Die Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid abbaut (siehe Kapitel 2.3.3.2). Diese Metabolite, insbesondere Biliverdin und das daraus entstehende Bilirubin sowie Kohlenmonoxid, haben eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung. Induziert wird die HO-1 unter anderem durch Inflammation und oxidativen Stress (134). Eine protektive Wirkung durch vermehrte Induktion der HO-1 konnte wie bereits weiter oben beschrieben in verschiedenen Modellen kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden (19, 139, 217-220).

In mehreren Studien konnte auch eine protektive Wirkung der HO-1 auf die Entwicklung der PAH nachgewiesen werden (250-252). Durch Induktion der HO-1 in Ratten mittels Nickel(II)-chlorid (NiCl_2) oder Hämin konnte eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie verhindert werden (251). In gentechnisch veränderten Mäusen mit konstitutiver HO-1-Expression im Lungengewebe konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe weder eine Inflammationsreaktion noch eine Hypertonie durch Hypoxie induziert werden (252).

Wie erwartet zeigten sich auch in unseren Versuchen erhöhte mRNA-Level der HO-1 im Lungengewebe der MCT-Gruppe. Zusätzlich kam es durch die Behandlung mit PETN zu einer weiteren Erhöhung der HO-1-mRNA-Level, was darauf hindeutet, dass PETN neben der vasodilatativen Wirkung mittels NO-Freisetzung auch über diesen Mechanismus seine protektive, insbesondere seine antioxidative Wirkung entfaltet. Dieser Effekt wurde bereits beobachtet und konnte in unseren Versuchen nun bestätigt werden (19, 188, 253).

5.5 Endothelin-1-Signalweg

In unseren Versuchen haben wir gezeigt, dass PETN oxidativen Stress reduziert und die endotheliale Dysfunktion bei MCT-induzierter PAH verbessern kann. Dabei stellt sich als möglicher Vermittler dieser positiven Effekte neben den bekannten vasodilatativen Mechanismen eine verstärkte Expression der Hämoxxygenase-1 (siehe oben) dar. Die ROS-reduzierenden Eigenschaften des PETN sind dabei vermutlich ein Grund für die ebenfalls verminderte Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 durch die PETN-Behandlung.

Endothelin-1 (ET-1) spielt als hochpotenter Vasokonstriktor eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der PAH (siehe Kapitel 2.3.4).

ET-1 wird aus seiner Vorstufe Big-ET-1 durch das endothelinkonvertierende Enzym (ECE, endothelin converting enzyme) aktiviert und wirkt über die Endothelinrezeptoren A und B (ET_A und ET_B) in glatter Muskulatur und im Endothel. Wie am Anfang dieser Arbeit bereits diskutiert, vermittelt der ET_A-Rezeptor, der hauptsächlich in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert ist, eine starke Vasokonstriktion sowie Zellproliferation, während die Aktivierung des endothelständigen ET_B-Rezeptors über NO- und Prostazyklinfreisetzung zur Vasodilatation führt und für eine Clearance des zirkulierenden ET-1 zuständig ist. Die deutlich überwiegende vasokonstriktorische Wirkung des Endothelins ergibt sich dadurch, dass der ET_B-Rezeptor sehr viel schwächer im Gefäßsystem exprimiert wird als der ET_A-Rezeptor (143, 144).

Es konnte bereits an diabetischen Mäusen gezeigt werden, dass Endothelin-1 in die Entstehung von oxidativem Stress und vaskulärer Dysfunktion involviert ist (146). Es wurde ein Mausmodell mit einer Überexpression an ET-1 verwendet und mittels Streptozotocin-Injektion ein Diabetes mellitus induziert. Verglichen wurde mit einem Wildtyp mit selbigem Diabetes mellitus. Es zeigten sich in den ET-1-Mäusen deutlich erhöhte vaskuläre Dysfunktion sowie ROS-Level (146).

Außerdem wird die Expression von Endothelin aber auch durch ROS induziert (155). Kultivierte Endothelzellen wurden oxidativem Stress mittels Xanthinoxidase oder Wasserstoffperoxid ausgesetzt und die Konzentration der Endothelin-1-Promoteraktivität, die Preproendothelin-mRNA-Level sowie die Konzentration des Big Endothelin-1 gemessen. Durch steigenden oxidativen Stress konnten steigende ET-1-Parameter gemessen werden. Eine gleichzeitige Zugabe von SOD oder Katalase konnte den Effekt verhindern, während eine Inhibition der eNOS keinen Unterschied zeigte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ROS für den Effekt verantwortlich sind und nicht beispielsweise eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit (155).

In unseren Versuchen konnten wir mittels rt-PCR eine erhöhte Expression der mRNA verschiedener Parameter des ET-1-Signalweges im Lungengewebe der Versuchstiere nachweisen. Speziell untersuchten wir die mRNA-Level von ET1, dem Endothelin Converting Enzyme sowie den beiden Endothelinrezeptoren ET_A und ET_B. Alle vier genannten wurden durch die Behandlung mit PETN signifikant reduziert, was wohl auf den antioxidativen Effekt von PETN und den somit verminderten ROS-induzierten ET-1-Signalweg zurückzuführen ist (siehe Abbildung 31).

Durch Endothelinrezeptorantagonisten (ETRA) wie Bosentan, Macitentan und Ambrisentan konnte ein großer Fortschritt in der Behandlung der PAH erzielt werden (156). Allerdings musste eine Substanz der Gruppe, Sitaxentan, bereits vom Markt genommen werden, da es zwei Todesfälle im Zusammenhang mit der Einnahme durch Leberversagen gab (254). Obwohl auch unter Einnahme anderer ETRA eine Leberwerterhöhung festgestellt wurde, gehören sie weiterhin zu den First-line-Medikamenten bei der Behandlung der PAH (6, 143).

Somit könnte PETN als Wirkverstärker der bekannten Therapeutika Eingang in die Behandlung der PAH finden.

5.6 Inflammation

VCAM-1 und ICAM-1 sind Proteine, die zur Familie der Super-Immunglobuline gehören. Sie werden als Adhäsionsmoleküle auf Endothel und Leukozyten exprimiert, sind somit an inflammatorischen Prozessen beteiligt und spielen eine Rolle bei der Atherogenese (siehe Kapitel 2.3.5). Es ist bekannt, dass die PAH phänotypisch mit vermehrten inflammatorischen Prozessen einhergeht. Unter anderem sind Zytokine, Chemokine, T-Zellen und Makrophagen in erhöhtem Maße vorhanden (255).

Die Inflammation wird über Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, die für die Immigration von Leukozyten und damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen benötigt werden. Diese sind unter anderem ICAM-1 und VCAM-1, die wir in unseren Versuchen untersuchten.

Es konnte bereits in einem Tiermodell einer DOCA-Salz-induzierten Hypertonie ein Zusammenhang zwischen Endothelin-1-Wirkung und VCAM-1-Expression festgestellt werden (149). Die Autoren der Studie beschreiben, dass die VCAM-1-Expression direkt über eine Induktion der NADPH-Oxidase und damit Superoxid durch Endothelin induziert wird (149). Auch andere Studien konnten zeigen, dass die Expression von VCAM-1 genauso wie die von ICAM-1 durch Endothelin induziert wird (256, 257).

In unserer Studie wollten wir somit untersuchen, welchen Einfluss die Behandlung mit PETN auf die inflammatorischen Prozesse hat. Dafür wurde einerseits in den Lungen der Versuchstiere die Expression der VCAM-1-mRNA mittels rt-PCR untersucht und andererseits die Expression von ICAM-1 in der Zellkultur nach Inkubation mit dem Endothelin-Analogon BQ3020.

Im Lungengewebe der erkrankten Tiere wurde eine erhöhte Expression der VCAM-1-mRNA-Level nachgewiesen. Die Behandlung mit PETN brachte hierbei keine signifikante Reduktion, zeigte dann aber auch keinen signifikanten Anstieg mehr gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 30).

Die ICAM-1-Expression wurde in der Zellkultur mittels 24-stündiger Inkubation mit dem ET-1 Analogon BQ3020 induziert. Hierbei führte eine PETN-Zugabe zu einer signifikanten Verminderung der ICAM-1-mRNA-Expression, allerdings blieb die Expression deutlich über der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 32).

Wir konnten damit zeigen, dass PETN auch Einfluss auf die Inflammation im Gefäßsystem hat. Wahrscheinlich geschieht dies über die antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung des PETN, da ROS und RNS die Inflammation begünstigen und HO-1 sowohl den oxidativen Stress reduziert als auch direkt antientzündlich wirkt.

6 Zusammenfassung

PETN wird wie andere Nitrate bereits seit vielen Jahrzehnten therapeutisch eingesetzt. Die Wirkungen und Nebenwirkungen wurden bereits von Daiber et al. und anderen (17, 19-21, 104, 178, 186, 190, 193, 253, 258) gründlich untersucht und die früheren Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie reproduziert werden. Insbesondere konnten die antioxidativen und pleiotropen Eigenschaften des PETN bestätigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass PETN sowohl das antioxidative Enzym Hämoxigenase-1 induziert als auch die Expression von Endothelin im MCT-Modell sowie einen inflammatorischen Phänotyp unterdrücken kann. Dies hat möglicherweise einen großen Anteil an der Wirkung von PETN.

Die pulmonale arterielle Hypertonie ist eine schwer therapierbare Erkrankung, die mit einer stark eingeschränkten Lebenserwartung einhergeht. Hierbei spielen unter anderem Mechanismen eine Rolle, die mit erhöhter Produktion von oxidativem Stress sowie einem Überwiegen von vasokonstriktiven Botenstoffen wie Endothelin-1 einhergehen.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Effekt von PETN auf die pulmonale arterielle Hypertonie im MCT-Tiermodell untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass PETN sowohl oxidativen Stress als auch Gefäßdysfunktion und Inflammation bei MCT-induzierter PAH reduzieren bzw. verbessern kann. Dies geschieht unter anderem über die Induktion der Hämoxigenase-1 und die Repression des Endothelin-Signalwegs. Da die bisherige Behandlung der PAH sich zu einem großen Teil auf die Gabe von Endothelinantagonisten stützt, könnte PETN hier als antioxidativ und pleiotrop wirkendes Medikament mit endothelinunterdrückender Wirkung einen zusätzlichen Nutzen bringen. Weitere Behandlungsansätze der PAH umfassen PDE5-Inhibitoren, Prostazyklinanaloga und einen sGC-Stimulator. Diese Medikamente wirken über eine direkte Vasodilatation in den Pulmonalgefäßen, so dass auch hier PETN als Vasodilatator von zusätzlichem Nutzen sein könnte. Nicht zuletzt wurde auch bei der PAH beim Menschen eine erhöhte Belastung mit oxidativem Stress und Inflammation festgestellt, so dass PETN auch hier als antioxidativ, antiinflammatorisch und pleiotrop wirkendes Medikament einen positiven Effekt haben könnte. Im Vergleich zu anderen Nitraten wie Nitroglycerin, ISMN oder ISDN liegt hier der Nutzen insbesondere darin, dass PETN keine Nitrattoleranz und Gefäßdysfunktion auslöst. Damit wirkt PETN auf allen Ebenen, auf denen die etablierten Medikamente für PAH

wirken (siehe Abbildung 37): Vasodilatation, verbesserte NO Wirkung durch geringeren oxidativen Stress sowie direkte NO-Freisetzung aus PETN, verbesserte Verfügbarkeit von Prostazyklin durch Reduktion der Prostazyklinsynthese-Nitrierung, Unterdrückung des Endothelin-1-Signalwegs und daneben weitere protektive Wirkungen wie die Reduktion der Entzündung.

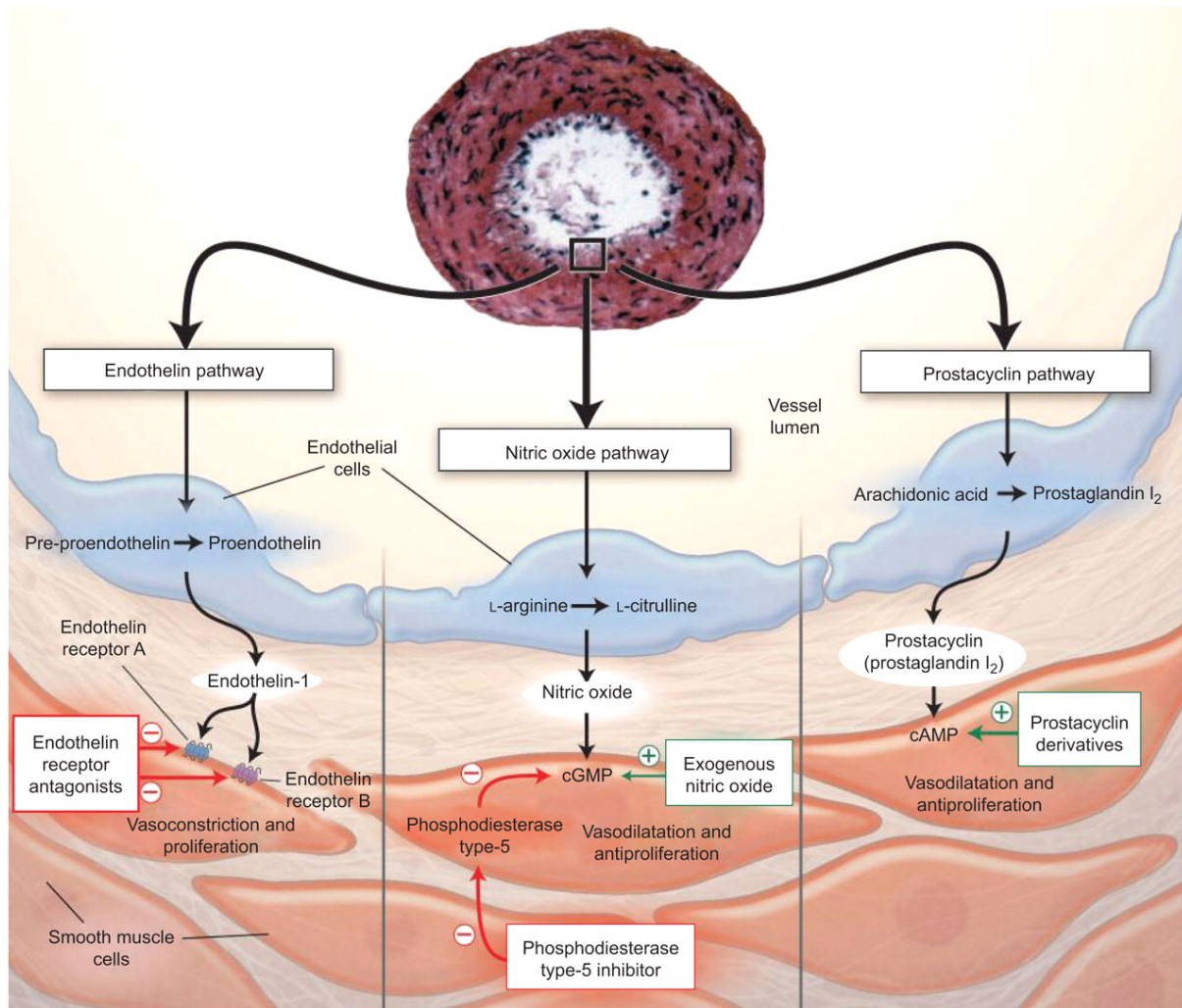


Abbildung 37: Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie der pulmonalen arteriellen Hypertonie und deren Therapieansätze. Endothelin-Signalweg, NO-Signalweg, Prostazyklinsignalweg. Abbildung aus (259)

7 Referenzen

1. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory medicine*. 2016;4(4):306-22.
2. Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *International journal of cardiology*. 2016;203:612-3.
3. Hoeper MM, Huscher D, Ghofrani HA, Delcroix M, Distler O, Schweiger C, et al. Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *International journal of cardiology*. 2013;168(2):871-80.
4. Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(9):1970-86.
5. Hoeper MM, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonale Hypertonie. *Dtsch Arztebl International*. 2017;114(5):73-84.
6. Galie N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. 2015(1885-5857 (Electronic)).
7. Peliowski A. Inhaled nitric oxide use in newborns. *Paediatrics & child health*. 2012;17(2):95-100.
8. Ohman EM. CLINICAL PRACTICE. Chronic Stable Angina. *The New England journal of medicine*. 2016;374(12):1167-76.
9. Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevationThe Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2011;32(23):2999-3054.
10. den Uil CA, Brugts JJ. Impact of intravenous nitroglycerin in the management of acute decompensated heart failure. *Current heart failure reports*. 2015;12(1):87-93.
11. Aronow WS. Treatment of hypertensive emergencies. *Annals of translational medicine*. 2017;5(Suppl 1):S5.
12. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(1):187-94.
13. Oelze M, Knorr M, Kroller-Schon S, Kossmann S, Gottschlich A, Rummler R, et al. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. *Eur Heart J*. 2013;34(41):3206-16.
14. Sekiya M, Sato M, Funada J, Ohtani T, Akutsu H, Watanabe K. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005;46(1):63-7.
15. Jurt U, Gori T, Ravandi A, Babaei S, Zeman P, Parker JD. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38(3):854-9.
16. Gori T, Al-Hesayen A, Jolliffe C, Parker JD. Comparison of the effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on endothelium-dependent vasorelaxation in male volunteers. *The American journal of cardiology*. 2003;91(11):1392-4.

17. Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Munzel T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2008;97(1):12-20.
18. Apitz C, Kozlik-Feldmann R, Kaemmerer H, Gorenflo M, Lammers A. Pulmonale Hypertonie. 2020.
19. Wenzel P, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, et al. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(8):1729-35.
20. Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, et al. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *Hypertension*. 2010;55(4):897-904.
21. Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, et al. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythritol tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes*. 2011;60(10):2608-16.
22. Schleussner E, Lehmann T, Kähler C, Schneider U, Schlembach D, Groten T. Impact of the nitric oxide-donor pentaerythritol-tetranitrate on perinatal outcome in risk pregnancies: a prospective, randomized, double-blinded trial. *Journal of perinatal medicine*. 2014;42(4):507-14.
23. Man AWC, Chen M, Zhou Y, Wu Z, Reifenberg G, Daiber A, et al. Fetal programming effects of pentaerythritol tetranitrate in a rat model of superimposed preeclampsia. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2020;98(9):1287-99.
24. Mitarbeiter GHu. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold; 2016.
25. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*. 2019;53(1):1801913.
26. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - Ausführliche 4-stellige ICD-Klassifikation - 2018: Statistisches Bundesamt 19.05.2020 [Artikelnummer: 5232101187015]. Available from: www.destatis.de.
27. Barst RJ. A review of pulmonary arterial hypertension: role of ambrisentan. *Vascular health and risk management*. 2007;3(1):11-22.
28. Hansen T, Galougahi KK, Celermajer D, Rasko N, Tang O, Bubb KJ, et al. Oxidative and nitrosative signalling in pulmonary arterial hypertension - Implications for development of novel therapies. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;165:50-62.
29. Spiekermann S, Schenk K, Hoepfer MM. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;34(1):276.
30. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, et al. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(6):764-9.
31. Siques P, Brito J, Pena E. Reactive Oxygen Species and Pulmonary Vasculature During Hypobaric Hypoxia. *Frontiers in physiology*. 2018;9:865.
32. Sahni S, Ojrzanowski M, Majewski S, Talwar A. Pulmonary arterial hypertension: a current review of pharmacological management. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2016;84(1):47-61.
33. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circulation research*. 2014;115(1):115-30.

34. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1992;327(2):76-81.
35. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Iosifescu V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-11.
36. Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, et al. 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*. 2008;117(23):3010-9.
37. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet (London, England)*. 2001;358(9288):1119-23.
38. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):809-18.
39. Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(7):1149-53.
40. Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2009;119(22):2894-903.
41. Grimminger F, Weimann G, Frey R, Voswinckel R, Thamm M, Bolkow D, et al. First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;33(4):785-92.
42. Badesch DB, McLaughlin VV, Delcroix M, Vizza CD, Olschewski H, Sitbon O, et al. Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12 Suppl S):56s-61s.
43. Noel ZR, Kido K, Macaulay TE. Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2017;74(15):1135-41.
44. Hoepfer MM, Kramer T, Pan Z, Eichstaedt CA, Spiesshoefer J, Benjamin N, et al. Mortality in pulmonary arterial hypertension: prediction by the 2015 European pulmonary hypertension guidelines risk stratification model. *The European respiratory journal*. 2017;50(2).
45. Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*. 1967;22(2):176-9.
46. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297(6):L1013-32.
47. Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2006;373(6):391-400.
48. Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2015;35:8-16.
49. Thomas HC, Lame MW, Dunston SK, Segall HJ, Wilson DW. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 1998;151(2):236-44.

50. Xiao R, Su Y, Feng T, Sun M, Liu B, Zhang J, et al. Monocrotaline Induces Endothelial Injury and Pulmonary Hypertension by Targeting the Extracellular Calcium-Sensing Receptor. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(4).
51. Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *eLife*. 2016;5.
52. Qu YY, Hui J, Wang LM, Tang N, Zhong H, Liu YM, et al. Reduced Expression of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Is Associated with Activation of the Renin-Angiotensin System (RAS) to Promote Vascular Remodeling in the Pathogenesis of Essential Hypertension. *PLoS one*. 2016;11(7):e0157456.
53. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2014;62:161-70.
54. Sies H. *Oxidative stress*. London Elsevier 1985.
55. Daiber A, Steven S, Vujacic-Mirski K, Kalinovic S, Oelze M, Di Lisa F, et al. Regulation of Vascular Function and Inflammation via Cross Talk of Reactive Oxygen and Nitrogen Species from Mitochondria or NADPH Oxidase-Implications for Diabetes Progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
56. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6056-63.
57. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free radical biology & medicine*. 2000;28(3):463-99.
58. Daiber A, Munzel T. *Pentaerithryltetranitrat Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte*. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2006.
59. Crosswhite P, Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of hypertension*. 2010;28(2):201-12.
60. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free radical biology & medicine*. 2007;43(3):319-31.
61. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hebert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(10):1512-8.
62. Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2012;4:1044-64.
63. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;397(2):342-4.
64. Singel KL, Segal BH. NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2016;130(7):479-90.
65. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal*. 2008;275(13):3249-77.
66. Sanders KA, Hoidal JR. The NOX on pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2007;101(3):224-6.
67. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(17):2794-814.

68. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25(9):452-63.
69. DeMarco VG, Habibi J, Whaley-Connell AT, Schneider RI, Heller RL, Bosanquet JP, et al. Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(6):H2659-68.
70. McCann SK, Roulston CL. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain sciences*. 2013;3(2):561-98.
71. Schuchardt M, Herrmann J, Tolle M, van der Giet M. Xanthine Oxidase and its Role as Target in Cardiovascular Disease: Cardiovascular Protection by Enzyme Inhibition? *Current pharmaceutical design*. 2017;23(23):3391-404.
72. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*. 2006;58(1):87-114.
73. Schardinger F. Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 1902;5(22):1113-21.
74. Hopkins FG. Note on the Vitamine Content of Milk. *The Biochemical journal*. 1920;14(6):721-4.
75. Dixon M. Studies on Xanthine Oxidase: The Specificity of the System. *The Biochemical journal*. 1926;20(4):703-18.
76. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS journal*. 2008;275(13):3278-89.
77. O'Byrne S, Shirodaria C, Millar T, Stevens C, Blake D, Benjamin N. Inhibition of platelet aggregation with glyceryl trinitrate and xanthine oxidoreductase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000;292(1):326-30.
78. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):943-8.
79. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, et al. Role of xanthine oxidoreductase and the NAD (P) H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003.
80. White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(16):8745-9.
81. Patetsios P, Song M, Shutze WP, Pappas C, Rodino W, Ramirez JA, et al. Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque. *The American journal of cardiology*. 2001;88(2):188-91.
82. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybyłowski P, et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(2):333-9.
83. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England journal of medicine*. 1985;312(3):159-63.
84. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine*. 2002;33(6):774-97.

85. Massey V, Komai H, Palmer G, Elion GB. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines. *Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(11):2837-44.
86. Tsuda H, Kawada N, Kaimori JY, Kitamura H, Moriyama T, Rakugi H, et al. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427(2):266-72.
87. Nomura J, Busso N, Ives A, Matsui C, Tsujimoto S, Shirakura T, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Scientific reports*. 2014;4:4554.
88. Schröder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(9):1353-60.
89. Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation*. 2003;107(3):416-21.
90. Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science (New York, NY)*. 1989;244(4900):41-7.
91. Wilkins MR, Wharton J, Grimminger F, Ghofrani HA. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2008;32(1):198-209.
92. Granton J, Moric J. Pulmonary vasodilators--treating the right ventricle. *Anesthesiology clinics*. 2008;26(2):337-53, vii.
93. Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(1):105-13.
94. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews*. 2000;52(3):375-414.
95. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320(6061):454-6.
96. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1620-4.
97. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
98. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):817-26.
99. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(6):1115-26.
100. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(25):22546-54.
101. Zou MH, Ullrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS letters*. 1996;382(1-2):101-4.

102. Zou M, Martin C, Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biological chemistry*. 1997;378(7):707-13.
103. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(11):1360-7.
104. Munzel T, Steven S, Daiber A. Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. *Vascular pharmacology*. 2014;63(3):105-13.
105. Münzel T, Daiber A, Gori T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. *European heart journal*. 2013;34(34):2666-73.
106. Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological chemistry*. 2006;387(12):1521-33.
107. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science (New York, NY)*. 1998;279(5359):2121-6.
108. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*. 2001;357(Pt 3):593-615.
109. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods in molecular biology*. 1998;100:1-32.
110. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of pharmacological sciences*. 2015;129(2):83-94.
111. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;284(1):R1-12.
112. Chen F, Kumar S, Yu Y, Aggarwal S, Gross C, Wang Y, et al. PKC-dependent phosphorylation of eNOS at T495 regulates eNOS coupling and endothelial barrier function in response to G+ - toxins. *PloS one*. 2014;9(7):e99823.
113. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(22):3579-94.
114. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(1):187.
115. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(8):1201-9.
116. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;263(3):681-4.
117. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1583-606.
118. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(8):1367-73.
119. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(2):263-74.

120. Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation research*. 2000;86(9):960-6.
121. Munzel T, Daiber A, Gori T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. *Circulation*. 2011;123(19):2132-44.
122. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free radical biology & medicine*. 2003;35(3):236-56.
123. Brown KA, Chu Y, Lund DD, Heistad DD, Faraci FM. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(6):H2600-5.
124. Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circulation research*. 2003;92(4):461-8.
125. Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, Hamilton CA, Alexander MY, Nicklin SA, et al. Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene therapy*. 2002;9(2):110-7.
126. Iida S, Chu Y, Francis J, Weiss RM, Gunnett CA, Faraci FM, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(2):H525-32.
127. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(9):1402-8.
128. Wedgwood S, Lakshminrusimha S, Fukai T, Russell JA, Schumacker PT, Steinhorn RH. Hydrogen peroxide regulates extracellular superoxide dismutase activity and expression in neonatal pulmonary hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1497-506.
129. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews*. 2008;60(1):79-127.
130. Doré S, Takahashi M, Ferris CD, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):2445-50.
131. Immenschuh S, Schröder H. Heme oxygenase-1 and cardiovascular disease. *Histology and histopathology*. 2006;21(6):679-85.
132. Dennery PA. Signaling function of heme oxygenase proteins. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(11):1743-53.
133. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(11):1030-43.
134. Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation*. 2008;117(2):231-41.
135. Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free radical biology & medicine*. 1995;19(4):395-404.
136. Mireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatric research*. 1999;45(3):355-62.

137. Florczyk UM, Jozkowicz A, Dulak J. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacological reports: PR.* 2008;60(1):38.
138. Jansen T, Hortmann M, Oelze M, Opitz B, Steven S, Schell R, et al. Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1-evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2010;49(2):186-95.
139. Kruger AL, Peterson SJ, Schwartzman ML, Fusco H, McClung JA, Weiss M, et al. Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2006;319(3):1144-52.
140. Yamamoto H, Saito M, Goto T, Ueshima K, Ishida M, Hayashi S, et al. Heme oxygenase-1 prevents glucocorticoid and hypoxia-induced apoptosis and necrosis of osteocyte-like cells. *Medical molecular morphology.* 2019.
141. Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2007;36(2):166-74.
142. Jais A, Einwallner E, Sharif O, Gossens K, Lu TT, Soyala SM, et al. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell.* 2014;158(1):25-40.
143. Correale M, Ferraretti A, Monaco I, Grazioli D, Di Biase M, Brunetti ND. Endothelin-receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: where do we stand? *Vascular health and risk management.* 2018;14:253-64.
144. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):357-418.
145. Iglarz M, Steiner P, Wanner D, Rey M, Hess P, Clozel M. Vascular Effects of Endothelin Receptor Antagonists Depends on Their Selectivity for ETA Versus ETB Receptors and on the Functionality of Endothelial ETB Receptors. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2015;66(4):332-7.
146. Idris-Khodja N, Ouerd S, Mian MOR, Gornitsky J, Barhoumi T, Paradis P, et al. Endothelin-1 Overexpression Exaggerates Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction by Altering Oxidative Stress. *American journal of hypertension.* 2016;29(11):1245-51.
147. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2000;269(3):713-7.
148. Cerrato R, Cunningham C, Crabtree MJ, Antoniadis C, Pernow J, Channon KM, et al. Endothelin-1 increases superoxide production in human coronary artery bypass grafts. *Life sciences.* 2012;91(13-14):723-8.
149. Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003;42(5):997-1003.
150. Zhu L, Jones C, Zhang G. The Role of Phospholipase C Signaling in Macrophage-Mediated Inflammatory Response. *Journal of Immunology Research.* 2018;2018:5201759.
151. Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, et al. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis.* 2010;212(1):78-85.
152. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003;42(3):316-21.

153. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *British journal of pharmacology*. 2017;174(12):1670-89.
154. Ouyang JS, Li YP, Li CY, Cai C, Chen CS, Chen SX, et al. Mitochondrial ROS-K⁺ channel signaling pathway regulated secretion of human pulmonary artery endothelial cells. *Free radical research*. 2012;46(12):1437-45.
155. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32(8):1429-37.
156. Abman SH. Role of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Annual review of medicine*. 2009;60:13-23.
157. Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *Journal of cell communication and signaling*. 2010;4(1):51-62.
158. Kohan DE. Biology of endothelin receptors in the collecting duct. *Kidney international*. 2009;76(5):481-6.
159. Bagnato A, Spinella F, Rosano L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2008;86(8):473-84.
160. Ramos-Casals M, Fonollosa-Pla V, Brito-Zeron P, Siso-Almirall A. Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we? *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(5):269-78.
161. Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(5):1190-9.
162. Ivy DD, Abman SH. The role of endothelin in perinatal pulmonary vasoregulation. *The Fetal and Neonatal Pulmonary Circulations*. 1999:279-302.
163. Stelzner T, O'Brien R, Yanagisawa M, Sakurai T, Sato K, Webb S, et al. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1992;262(5):L614-L20.
164. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(24):1732-9.
165. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine*. 1991;114(6):464-9.
166. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular pharmacology*. 2015;71:40-56.
167. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 1999;19(2):91-104.
168. Mojcik CF, Shevach EM. Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(6):991-1004.
169. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018;32(8):4070-84.

170. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1989;341(6237):57-9.
171. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989;56(5):839-47.
172. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(8):4140-5.
173. Buck CA, editor *Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules*. *Seminars in cell biology*; 1992: Elsevier.
174. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 1990;60(4):577-84.
175. Abrams J. The role of nitrates in coronary heart disease. *Archives of internal medicine*. 1995;155(4):357-64.
176. Sellke FW, Myers PR, Bates JN, Harrison DG. Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1990;258(2):H515-H20.
177. Abrams J. A reappraisal of nitrate therapy. *Jama*. 1988;259(3):396-401.
178. Daiber A, Munzel T. *Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress*. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;23(11):899-942.
179. Group I-C. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet (London, England)*. 1995;345(8951):669-85.
180. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet (London, England)*. 1994;343(8906):1115-22.
181. Ishikawa K, Kanamasa K, Ogawa I, Takenaka T, Naito T, Kamata N, et al. Long-term nitrate treatment increases cardiac events in patients with healed myocardial infarction. *Japanese circulation journal*. 1996;60(10):779-88.
182. Kanamasa K, Hayashi T, Kimura A, Ikeda A, Ishikawa K, group sp. Long-term, continuous treatment with both oral and transdermal nitrates increases cardiac events in healed myocardial infarction patients. *Angiology*. 2002;53(4):399-408.
183. Yiu KH, Pong V, Siu CW, Lau CP, Tse HF. Long-term oral nitrate therapy is associated with adverse outcome in diabetic patients following elective percutaneous coronary intervention. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10(1):52.
184. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8306-11.
185. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, et al. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(1):792-9.

186. Gori T, Daiber A. Non-hemodynamic effects of organic nitrates and the distinctive characteristics of pentaerythryl tetranitrate. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2009;9(1):7-15.
187. Münzel T, Meinertz T, Tebbe U, Schneider HT, Stalleicken D, Wargenau M, et al. Efficacy of the long-acting nitro vasodilator pentaerythryl tetranitrate in patients with chronic stable angina pectoris receiving anti-anginal background therapy with beta-blockers: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J*. 2014;35(14):895-903.
188. Oberle S, Abate A, Grosser N, Hemmerle A, Vreman HJ, Dennery PA, et al. Endothelial protection by pentaerythryl trinitrate: bilirubin and carbon monoxide as possible mediators. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2003;228(5):529-34.
189. Oppermann M, Balz V, Adams V, Dao VT, Bas M, Suvorova T, et al. Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(7):1271-8.
190. Daiber A, Oelze M, Wenzel P, Bollmann F, Pautz A, Kleinert H. Heme oxygenase-1 induction and organic nitrate therapy: beneficial effects on endothelial dysfunction, nitrate tolerance, and vascular oxidative stress. *International journal of hypertension*. 2012;2012:842632.
191. Oberle S, Schwartz P, Abate A, Schroder H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;261(1):28-34.
192. Quinn MJ, Jr., Crouse LC, McFarland CA, LaFiandra EM, Johnson MS. Reproductive and developmental effects and physical and chemical properties of pentaerythritol tetranitrate (PETN) in the rat. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2009;86(1):65-71.
193. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Molecular pharmacology*. 2004;66(6):1372-82.
194. Daiber A, Gori T, Münzel T. Mechanismen und klinischer Stellenwert der Nitrattoleranz. Diversität und Nebenwirkungen organischer Nitrate. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2010;39(5):375-84.
195. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302(4):L363-9.
196. Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mulsch A, Sydow K, Schulz E, et al. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(3):381-91.
197. Urboniene D, Haber I, Fang YH, Thenappan T, Archer SL. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(3):L401-12.
198. Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(1):H364-71.
199. Yock PG, Popp RL. Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation*. 1984;70(4):657-62.
200. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(1):101-11.

201. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y. A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;193(2):554-9.
202. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007;49(4):717-27.
203. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(11):1761-8.
204. Zielonka J, Lambeth JD, Kalyanaraman B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:1310-4.
205. Okajima T, Ohsaka T. Chemiluminescence of lucigenin by electrogenerated superoxide ions in aqueous solutions. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2003;18(1):49-57.
206. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
207. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*. 1979;100(2):201-20.
208. Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, de Graft-Johnson J, Krajewski W, Krol M, et al. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2008;46(3):342-9.
209. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6049-55.
210. Peshavariya HM, Dusting GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free radical research*. 2007;41(6):699-712.
211. Meloan SN, Puchtler H. "Harris Hematoxylin," What Harris Really Wrote and the Mechanism of Hemalum Stains. *Journal of Histotechnology*. 1987;10 no. 4:257-61.
212. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(12):3734-7.
213. Steven S, Oelze M, Brandt M, Ullmann E, Kroller-Schon S, Heeren T, et al. Pentaerythritol Tetranitrate In Vivo Treatment Improves Oxidative Stress and Vascular Dysfunction by Suppression of Endothelin-1 Signaling in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:4353462.
214. Dovinová I, Cacányiová S, Fáberová V, Kristek F. The effect of an NO donor, pentaerythritol tetranitrate, on biochemical, functional, and morphological attributes of cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *General physiology and biophysics*. 2009;28(1):86-93.
215. Schnorbus B, Schiewe R, Ostad MA, Medler C, Wachtlin D, Wenzel P, et al. Effects of pentaerythritol tetranitrate on endothelial function in coronary artery disease: results of the PENTA study. *Clinical research in cardiology*. 2010;99(2):115-24.
216. Hacker A, Muller S, Meyer W, Kojda G. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. *British journal of pharmacology*. 2001;132(8):1707-14.

217. Yet S-F, Perrella MA, Layne MD, Hsieh C-M, Maemura K, Kobzik L, et al. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(8):R23-R9.
218. Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, et al. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature medicine*. 2001;7(6):693-8.
219. Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, et al. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circulation research*. 2007;100(12):1703-11.
220. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10925-30.
221. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Protection from ischemic heart injury by a vigilant heme oxygenase-1 plasmid system. *Hypertension*. 2004;43(4):746-51.
222. Copple BL, Ganey PE, Roth RA. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology*. 2003;190(3):155-69.
223. Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicology and applied pharmacology*. 1990;106(2):179-200.
224. Kurozumi T, Tanaka K, Kido M, Shoyama Y. Monocrotaline-induced renal lesions. *Experimental and molecular pathology*. 1983;39(3):377-86.
225. Sztuka K, Jasinska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacological research*. 2017;125(Pt B):201-14.
226. Kato T, Kitamura H, Kanisawa M. Comparative effects of isosorbide dinitrate, prednisolone, indomethacin, and elastase on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Experimental and molecular pathology*. 1989;50(3):303-15.
227. Mitani Y, Mutlu A, Russell JC, Brindley DN, DeAlmeida J, Rabinovitch M. Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2002;93(5):1770-8.
228. Naeije R, Dewachter L. [Animal models of pulmonary arterial hypertension]. *Revue des maladies respiratoires*. 2007;24(4 Pt 1):481-96.
229. Stalleicken D. Wirksamkeit einer 12-wöchigen oralen Pentalong® Therapie auf die Belastbarkeit und Lebensqualität von Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz und sekundärer pulmonaler Hypertonie. 2011 [10.02.2020]. Available from: https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00000629.
230. Packer M, Halperin JL, Brooks KM, Rothlauf EB, Lee WH. Nitroglycerin therapy in the management of pulmonary hypertensive disorders. *The American journal of medicine*. 1984;76(6a):67-75.
231. Krieg P, Wahlers T, Giess W, Rohde R, Hartrumpf M, Bund M, et al. Inhaled nitric oxide and inhaled prostaglandin E1: effect on left ventricular contractility when used for treatment of experimental pulmonary hypertension. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1998;14(5):494-502.
232. Yurtseven N, Karaca P, Kaplan M, Ozkul V, Tuygun AK, Aksoy T, et al. Effect of nitroglycerin inhalation on patients with pulmonary hypertension undergoing mitral valve replacement surgery. *Anesthesiology*. 2003;99(4):855-8.

233. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* (London, England). 1991;338(8776):1173-4.
234. Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai R. Nicorandil attenuates monocrotaline-induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension. *PLoS one*. 2012;7(3):e33367.
235. Henrohn D, Bjorkstrand K, Lundberg JO, Granstam SO, Baron T, Ingimarsdottir IJ, et al. Effects of Oral Supplementation With Nitrate-Rich Beetroot Juice in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension-Results From BEET-PAH, an Exploratory Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Journal of cardiac failure*. 2018;24(10):640-53.
236. Bhat T, Neuman A, Tantary M, Bhat H, Glass D, Mannino W, et al. Inhaled nitric oxide in acute pulmonary embolism: a systematic review. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2015;16(1):1-8.
237. Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Koide S, Nakata S, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(2):219-26.
238. Gongora MC, Lob HE, Landmesser U, Guzik TJ, Martin WD, Ozumi K, et al. Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. *The American journal of pathology*. 2008;173(4):915-26.
239. Benov L, Sztejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free radical biology & medicine*. 1998;25(7):826-31.
240. Manea SA, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox biology*. 2015;5:358-66.
241. Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, Young ME, Lionetti V, Labinsky V, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;41(2):340-9.
242. Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circulation research*. 2005;97(10):1055-62.
243. Rezende F, Lowe O, Helfinger V, Prior KK, Walter M, Zukunft S, et al. Unchanged NADPH Oxidase Activity in Nox1-Nox2-Nox4 Triple Knockout Mice: What Do NADPH-Stimulated Chemiluminescence Assays Really Detect? *Antioxidants & redox signaling*. 2016;24(7):392-9.
244. Battelli MG, Bolognesi A, Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(9):1502-17.
245. Duncan MW. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 2003;25(3):351-61.
246. Zou MH, Daiber A, Peterson JA, Shoun H, Ullrich V. Rapid reactions of peroxynitrite with heme-thiolate proteins as the basis for protection of prostacyclin synthase from inactivation by nitration. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;376(1):149-55.
247. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmune conditions. *Human immunology*. 2013;74(10):1392-9.
248. Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(20):17415-27.

249. Fraccarollo D, Galuppo P, Neuser J, Bauersachs J, Widder JD. Pentaerythritol Tetranitrate Targeting Myocardial Reactive Oxygen Species Production Improves Left Ventricular Remodeling and Function in Rats With Ischemic Heart Failure. *Hypertension*. 2015;66(5):978-87.
250. van Loon RL, Bartelds B, Wagener FA, Affara N, Mohaupt S, Wijnberg H, et al. Erythropoietin Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension through Interplay between Endothelial Progenitor Cells and Heme Oxygenase. *Frontiers in pediatrics*. 2015;3:71.
251. Christou H, Morita T, Hsieh CM, Koike H, Arkonac B, Perrella MA, et al. Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. *Circulation research*. 2000;86(12):1224-9.
252. Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, et al. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(15):8798-803.
253. Daiber A, Munzel T. Characterization of the antioxidant properties of pentaerythritol tetranitrate (PETN)-induction of the intrinsic antioxidative system heme oxygenase-1 (HO-1). *Methods in molecular biology*. 2010;594:311-26.
254. GmbH PP, Löschmann MDDP-A. Rote-Hand-Brief zu Thelin 2010 [updated 21.12.2010]. Available from: <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2010/rhb-thelin.html>.
255. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141(1):210-21.
256. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100(11):1223-9.
257. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003;42(1):49-55.
258. Wenzel P, Schulz E, Gori T, Ostad MA, Mathner F, Schildknecht S, et al. Monitoring white blood cell mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: implications for nitrate therapy in humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009;330(1):63-71.
259. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2004;351(14):1425-36.

8 Danksagung

Online nicht verfügbar

9 Lebenslauf

Online nicht verfügbar

10 Publikationen und Stipendien

Publikationen:

1. **Antagonization of IL-17A attenuates skin inflammation and vascular dysfunction in mouse models of psoriasis.** Schüler R, Brand A, Klebow S, Wild J, Veras FP, Ullmann E, Roohani S, Kolbinger F, Kossmann S, Wohn C, Daiber A, Münzel T, Wenzel P, Waisman A, Clausen BE, Karbach S. *J Invest Dermatol.* 2019 Mar;139(3):638-647.
2. **Basic in vitro Characterization of the Vasodilatory Potential of 2-Aminoethyl Nitrate Fixed-Dose Combinations with Cilostazol, Metoprolol and Valsartan.** Oelze M, Welschhof P, Knorr M, Tran LP, Ullmann E, Stamm P, Kröller-Schön S, Jansen T, Kopp M, Schulz E, Gori T, Burgin K, Scherhag A, Sartor D, Münzel T, Daiber A. *Pharmacology.* 2018;101(1-2):54-63.
3. **Pentaerythritol tetranitrate (PETN) in-vivo treatment improves oxidative stress and vascular dysfunction by suppression of endothelin-1 signaling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** Steven S, Oelze M, Brandt M, Ullmann E, Kröller-Schön S, Heeren T, Tran LP, Daub S, Dib M, Stalleicken D, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4353462.
4. **Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice.** Münzel T, Daiber A, Steven S, Tran LP, Ullmann E, Kossmann S, Schmidt FP, Oelze M, Xia N, Li H, Pinto A, Wild P, Pies K, Schmidt ER, Rapp S, Kröller-Schön S. *Eur Heart J.* 2017 Oct 1;38(37):2838-2849.
5. **Nitroglycerin induces DNA damage and vascular cell death in the setting of nitrate tolerance.** Mikhed Y, Fahrer J, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Welschhof P, Zinßius E, Stamm P, Kashani F, Roohani S, Kress JM, Ullmann E, Tran LP, Schulz E, Epe B, Kaina B, Münzel T, Daiber A. *Basic Res Cardiol.* 2016 Jul;111(4):52.

Stipendien, Preise und Poster:

- **Stipendium des CTVB** (Zentrum Translationale Vaskuläre Biologie) für Doktorandinnen und Doktoranden der Humanmedizin (09/2015-08/2016)
- **Eberhard-Betz-Preis** für das beste Poster im Rahmen der 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung (04/2016)
- **Posterpräsentationen** im Rahmen internationaler Tagungen u.a. bei der DGK (Mannheim), DGAF (Rauischholzhausen), FEBS (Spetses) sowie JCET (Krakau) (2016-2017)