

**AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
Prof. Dr. Michael Pfeifer  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**UNTERSUCHUNG ZUR BEDEUTUNG DER PROPHYLAKTISCHEN UND  
THERAPEUTISCHEN GABE VON SIMVASTATIN BEI BLEOMYCIN  
INDUZIERTER LUNGENFIBROSE AM TIERMODELL**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin***

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
*Agata Nowrotek***

**2013**



**Dekan:** **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

**1. Berichterstatter:** ***Prof. Dr. Michael Pfeifer***

**2. Berichterstatter:** ***PD Dr. Stefan Denzinger***

**Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 2014**

|

# **INHALTSVERZEICHNIS**

- 1. Einleitung**
  - 1.1. Ätiologie**
  - 1.2. Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose**
  - 1.3. Bildgebende Diagnostik bei interstitiellen Lungenerkrankungen**
  - 1.4. Klinischer Verlauf und Komplikationen**
  - 1.5. Therapie und Prognose der interstitiellen Lungenfibrose**
  - 1.6. Stand der experimentellen Forschung zur idiopathischen Lungenfibrose und deren Therapie**
  - 1.7. Fragestellung zur vorliegenden Untersuchung**
  
- 2. Methoden**
  - 2.1. Tierexperimentelle Versuchsphase**
    - 2.1.1. Tierhaltung und Randomisierung**
    - 2.1.2. Induktion der Lungenfibrose**
    - 2.1.3. Medikamentöse Behandlung**
    - 2.1.4. Laufbandbelastungstest**
      - 2.1.4.1. Laufbandaufbau**
      - 2.1.4.2. Laufband-Trainingsprogramm**
      - 2.1.4.3. Abbruchkriterien des Laufbandbelastungstests**
      - 2.1.4.4. Ermittlung der individuellen Ausgangsleistung und Leistungsabnahme**
      - 2.1.4.5. Berechnung der Laufleistungen**
    - 2.1.5. Hämodynamische Messungen**
      - 2.1.5.1. Systemische Blutdruckmessung**
      - 2.1.5.2. Messung des rechtsventrikulären Druckes**
    - 2.1.6. Blutentnahme**
    - 2.1.7. Organentnahme**
      - 2.1.7.1. Durchführung**
      - 2.1.7.2. Makroskopische Beurteilung des Sektionssitus**

- 2.2. Funktionelle und laborexperimentelle Versuchsphase**
  - 2.2.1. Compliance-Bestimmung**
    - 2.2.1.1. Durchführung**
    - 2.2.1.2. Berechnung**
  - 2.2.2. Hydroxyprolin-Bestimmung**
    - 2.2.2.1. Ursprung und Bedeutung von Hydroxyprolin**
    - 2.2.2.2. Probenvorbereitung und -lagerung**
    - 2.2.2.3. Photometrische Messung der Hydroxyprolin-Konzentration**
  - 2.2.3. Messung von Endothelin1 im Plasma**
    - 2.2.3.1. Ermittlung des Endothelin1-Gehalts**
    - 2.2.3.2. Photometrische Messung des Endothelin1-Gehalts im Plasma**

### **2.3. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse**

## **3. Ergebnisse**

- 3.1. Ermittlung der „in vivo“-Reaktionen der randomisierten Versuchstier-Gruppen**
  - 3.1.1. Laufleistung**
  - 3.1.2. Versuchstier-Endgewicht**
- 3.2. Hämodynamische und funktionelle Studienergebnisse der einzelnen Untersuchungsgruppen**
  - 3.2.1. Systolischer Blutdruck**
  - 3.2.2. Rechtsventrikulärer Blutdruck (RVSP)**
  - 3.2.3. Compliance**
  - 3.2.4. Herzquotientenbestimmung**
- 3.3. Lungengewicht**
- 3.4. Laborchemische und molekularpathologische Versuchsergebnisse im Untersuchungsverlauf**
  - 3.4.1. Hämatokrit**

**3.4.2. Hydroxyprolingehalt**

**3.4.3. Endothelin1-Spiegel**

## **4. Diskussion**

### **4.1. Induktion der Lungenfibrose im Tiermodell**

#### **4.1.1. Induktion der Lungenfibrose mit Bleomycin**

#### **4.1.2. Induktion der Lungenfibrose mit Nanopartikeln**

#### **4.1.3. Induktion der Lungenfibrose durch Bestrahlung**

### **4.2. Erfahrungen mit Leistungsmessungen am Tiermodell und Anwendung bei interstieller Fibrose**

### **4.3. Vergleich von Methoden und Ergebnissen zu funktionellen Untersuchungen bei Lungenfibrose am Tiermodell**

### **4.4. Möglichkeiten der makroskopischen und mikroskopischen Evaluierung interstitieller Lungenfibrosen vor und während ihrer Behandlung**

### **4.5. Laborchemische und molekularpathologische Parameter zur Quantifizierung von Lungenfibrose und Behandlungserfolg**

#### **4.5.1. Hydroxyprolin**

#### **4.5.2. Hämatokrit**

#### **4.5.3. Endothelin1**

## **5. Zusammenfassung**

**Literaturverzeichnis**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## 1. Einleitung

Die Lungenfibrose stellt eine schwerwiegende interstitielle Erkrankung dar, die durch chronisch verlaufende Entzündungen und durch Zunahme des Bindegewebes der Lunge charakterisiert ist. Für die Patienten bringt sie sowohl eine stark reduzierte Lebensqualität, als auch im Vergleich zur gesunden Bevölkerung eine deutlich niedrigere Lebenserwartung mit sich. Die Angaben bezüglich der mittlere Überlebensdauer ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung schwanken zwischen im Durchschnitt zweieinhalb und vier Jahre (1,2). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt in etwa bei 66 Jahren (3). Die Symptome, die zur Diagnosestellung beitragen, sind insbesondere Dyspnoe, ferner ein in ca. 73% der Fälle Husten, zudem beobachten ca. 57% der Patienten die Produktion von Sputum über einen Zeitraum von durchschnittlich fünf Jahren. Klinisch kann bei ca. 96% aller Patienten diffuses Knisterrasseln auskultiert werden, zudem präsentieren sich ca. 66% mit den typischen Hypoxiezeichen der Hände, nämlich Uhrglasnägel und Trommelschlägelfingern (4). Wesentliches Symptom ist zudem eine in ca. 92% der Fälle im Durchschnitt knapp über zwei Jahre bestehende Dyspnoe unterschiedlicher Stärke. Dabei leidet einer von fünf Patienten an einer Atemnot der Kategorie NYHA III oder NYHA IV und ist damit in seinem Alltag deutlich eingeschränkt (4). Die Dauer der Dyspnoe korreliert nicht mit der Schwere der Erkrankung, wohl aber die Ausprägung der Atemnot: Patienten mit stärkerer Dyspnoe zeigen deutlicher ausgeprägte radiologische Veränderungen der Lunge und ferner eine höhergradig reduzierte Vitalkapazität (4) – beides Faktoren, die mit einer schlechteren Prognose bezüglich der Überlebensdauer verbunden sind (2).

Die Diagnose „Lungenfibrose“ kann jedoch nicht nur anhand klinischer Aspekte gestellt werden, sondern erfordert die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Pneumologie, Radiologie und Pathologie. Dabei gelingt die Einstufung der Erkrankung in großen akademisch geprägten Kliniken genauer als in kommunalen Krankenhäusern. Wenn möglich sollten demzufolge Patienten bei



V.a. eine diffuse Erkrankung des Lungenparenchyms an Zentren mit höherer Expertise verwiesen werden (5).

### 1.1 Ätiologie

Unter dem Oberbegriff der interstitiellen Lungenerkrankungen und Lungenfibrosen findet man solche mit bekannter und solche mit unbekannter Ursache (6). Dabei entfallen in etwa 50% der Erkrankungen auf die eine, 50% auf die andere Gruppe. Als Ursache für die Entwicklung einer interstiellen Lungenerkrankung und -fibrose konnte bereits eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden:

1. Infektionen (z.B. Pneumocystis jiroveci, Viren)
2. Inhalative Noxen
  - Anorganische Stäube: Pneumokoniosen
  - Organische Stäube: Exogen-allergische Alveolitis, Byssinose durch Inhalation von Baumwollstaub
  - Gase, Dämpfe, Rauche, Aerosole verschiedener Gefahrstoffe, Haarspray
3. Nichtinhalative Noxen, z.B.:
  - Pharmaka (z.B. Bleomycin, Busulfan)
  - Herbizide (z.B. Paraquat)
  - Ionisierende Strahlen (Strahlenpneumonitis)
4. Kreislaufbedingte Lungenschäden, z.B.:
  - Chronische Stauungslunge bei Linksherzinsuffizienz
  - Fluid lung (bei chronischer Niereninsuffizienz)
  - Akutes Lungenversagen (ARDS)
5. Systemerkrankungen, z.B.:
  - Sarkoidose
  - Rheumatoide Arthritis
  - Kollagenosen
  - Vaskulitiden

## - Speicherkrankheiten

Die Erkrankungsfälle, in denen eine Zuordnung zu einer der oben genannten Gruppen nicht möglich ist, werden unter dem Begriff der idiopathischen interstitiellen Pneumonie zusammengefasst. Da diese Gruppe allerdings Erkrankungen umfasst, welche sich sowohl unter klinischen als auch histopathologischen Gesichtspunkten erheblich unterscheiden, ist eine weitere Differenzierung notwendig.

Der erste Versuch einer Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonie wurde 1969 von Liebow und Carrington unternommen. Diese ursprüngliche Einteilung umfasste fünf Gruppen (7):

1. UIP: usual interstitial pneumonia
2. DIP: desquamative interstitial pneumonia
3. Broncholitis obliterans interstitial pneumonia and diffuse alveolar damage
4. LIP: Lymphoid interstitial pneumonia
5. GIP: Giant cell interstitial pneumonia

1997 wurde von Katzenstein eine überarbeitete Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonie etabliert (8). Diese umfasste, wie bereits die ursprüngliche Klassifikation die UIP und die DIP als Untergruppen, hinzu kamen die akute interstitielle Pneumonie und die nichtspezifische interstitielle Pneumonie. Eine von Müller und Colby vorgeschlagene Einteilung beinhaltete zusätzlich noch die broncholitis obliterans organizing pneumonia (=COP: cryptogenic organizing pneumonia) als weitere Entität (9). Die LIP und die GIP wurden in die neuen Klassifikationen nicht mehr mit aufgenommen. Es wurde beobachtet, dass sich auf dem Boden einer LIP des öfteren Lymphome entwickelten, so dass dies nun den lymphoproliferativen Erkrankungen zugeordnet wurde. Hinsichtlich der GIP konnten diverse Erkrankungsfälle als Hartmetallpneumokoniosen identifiziert werden.

2002 wurde die Gruppe der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) von American Thoracic Society und European Respiratory Society erneut klassifiziert. Diese Einteilung ist bis dato gültig (10). Diese Leitlinie zu

Diagnostik und Behandlung der IPF/UIP wurde 2011 von „consensus based“ zu „evidence based“ heraufgestuft. (11) Die Klassifikation der American Thoracic Society und der European Respiratory Society gliedert die idiopathische interstitielle Pneumonie in sieben Unterformen.

1. IPF: idiopathic pulmonary fibrosis (klinische Diagnose)/UIP: usual interstitial pneumonia (pathologisches Muster)
2. DIP: desquamative interstitial pneumonia
3. RB-ILD: respiratory broncholitis interstitial lung disease
4. AIP: acute interstitial pneumonia
5. NSIP: nonspecific interstitial pneumonia
6. COP: cryptogenic organizing pneumonia/ BOOP: bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
7. LIP: lymphocytic interstitial pneumonia

Da ca. 60% aller Fälle von idiopathischer interstitieller Pneumonie auf die IPF/UIP entfallen, ist eine Einteilung in IPF und „IIP other than IPF“ nach Meinung der ATS und ERS sinnvoll und praktikabel.

Histopathologisch wird die IPF/UIP durch ein heterogenes Bild charakterisiert: typisch ist das Nebeneinander von gesundem Lungengewebe, unterschiedlichen Stadien der interstitiellen Entzündung und fibrotischen Veränderung z.T. mit Honigwabenstruktur. Dabei überwiegen im Falle der IPF/UIP die fibrotischen Anteile gegenüber den entzündlichen Bereichen. Es finden sich so genannte fibroblastische Foci, welche aus linear angeordneten Fibroblasten und Myofibroblasten bestehen. In der HE-Färbung sind diese von nur schwach anfärbarer Matrix umgeben. Bei den fibroblastischen Foci handelt es sich um Zeichen chronischer Lungenschädigung. Sie sind nicht spezifisch für die IPF/UIP, stellen jedoch insbesondere bei einem gleichzeitigen Vorliegen von narbigem Gewebe als Kennzeichen der chronischen Erkrankung ein wichtiges diagnostisches Kriterium dar. Ein weiteres zur Diagnose führendes Charakteristikum stellen die als Honigwaben bezeichneten Veränderungen der Lunge dar. Es handelt sich hierbei um in narbig-fibrotischen Lungengewebe

vorkommende zystisch aufgeweitete Bronchiolen, welche vom Zylinderepithel des Respirationstraktes begrenzt werden. Sie enthalten Mukus und Entzündungszellen. Ferner sind auch bereits fibrotische Narben an sich typische Zeichen der IPF/UIP. Sowohl in den letztgenannten wie auch in den Honigwabenstrukturen findet sich regelmäßig eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hyperplasie der glatten Muskulatur. Von den genannten Veränderungen ist insbesondere das subpleurale Gewebe charakteristischerweise betroffen. Die interstitielle Entzündung ist bei der IPF/UIP eher gering ausgeprägt. Man findet eine ungleichmäßig verteilte Infiltration der Alveolarsepten durch mononukleäre Entzündungszellen, wie Lymphozyten und Plasmazellen. Nur selten kommt es peribronchial zu Ansammlungen von Lymphozyten. Auch können Bronchiektasien und zuweilen eine peribronchiale Fibrose gefunden werden. Bei chronischem Nikotinabusus finden sich zudem regelmäßige auch schwach pigmentierte Histiocyten, welche für die DIP charakteristisch sind und zu Verwechslungen führen können (12). Kommt es zu einer akuten Exazerbation der IPF/UIP finden sich mitunter diffuse alveoläre Schäden, ferner kann auch eine organisierte Pneumonie beobachtet werden (13). Histopathologisch zeichnet sich die Exazerbation durch eine vermehrte Proliferation von Fibroblasten, durch eine Hyperplasie der Typ 2 Pneumozyten und durch Reste hyaliner Membranen aus.

## 1.2. Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose

Die Pathogenese der IPF/UIP ist letztendlich bis dato nicht geklärt. Eine chronische Infektion des Interstitiums wurde als Ursache angenommen. Dagegen spricht jedoch, dass die Entzündung nicht das charakteristische Merkmal der IPF/UIP darstellt, ferner führt eine chronische Infektion in den meisten Fällen nicht zu Fibrose. Des Weiteren konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass eine Fibroseentwicklung nicht zwangsweise eine vorhergehende Entzündung voraussetzt: mit Silicium behandelte Interleukin10-knock-out-Mäuse zeigten stärkere Entzündungsreaktionen als Wildtyp-Mäuse, gleichzeitig wurde jedoch eine niedrigere Fibroserate als bei den Wildtyp-

Mäusen beobachtet (14). Mit Hilfe des Bleomycinmodells konnte gezeigt werden, dass  $\alpha\beta6$ -Knock-Out-Mäuse, sprich Mäuse, denen ein Ligand und Aktivator des transforming-growth-factor- $\beta$  fehlt, im Vergleich zum Wildtyp zwar höhere Entzündungslevel, jedoch keine Fibrose entwickeln (15). Auch konnte in Kulturen Hyperoxie-geschädigter-Mäuselungen eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten und vermehrte Kollagenablagerung nachgewiesen werden und somit Fibrosemarker in Abwesenheit von Blut und damit Entzündungszellen nachgewiesen werden (16). Der Nachweis einer Entzündung und deren Ausprägung mit BAL, mit HRCT oder auch die Bestimmung von Immunkomplexen in Blut und Gewebe lässt nicht auf das Stadium der IPF/UIP schließen (17). Eine antiinflammatorische Hochdosis-Therapie mit Glukokortikoiden verbessert das Outcome von IPF/UIP-Patienten nicht. (18, 19, 20). Man geht davon aus, dass die IPF/UIP auf einer Lungenschädigung und einer sich anschließenden defekten Wundheilung beruht. Charakteristisch sind dabei Schäden der Basalmembran. Nachfolgend ist eine überschießende Aktivierung von Fibroblasten sowie Myofibroblasten durch fibrosebegünstigende Zytokine und Wachstumsfaktoren – darunter der platelet-derived growth factor, der transforming growth factor- $\beta_1$ , der tumor necrosis factor- $\alpha$  und Interleukin-18 wie auch dessen Rezeptor – zu beobachten. Myofibroblasten induzieren die Apoptose hyperplastischer Pneumozyten, erschweren damit die Reepithelialisierung und führen zudem über eine mangelnde Sekretion von antifibrotischen Zytokinen wie z.B. dem hepatocyte growth factor zu einer weiteren Gewebeschädigung (12). Eine verstärkte Ablagerung extrazellulärer Matrix behindert über erhöhte Werte von prokoagulatorischen und antifibrinolytischen Faktoren, wie tissue factor und des plasminogen activator-Inhibitors die Wundheilung und führt zu Remodeling (17). Ausgangspunkt der gestörten Wundheilung scheinen dabei die Fibroblasten-Foci zu sein; diese ähneln den bei der organisierenden Pneumonie (BOOP) vorkommenden Masson-Bodies. Da die BOOP allerdings selbstlimitierend und reversibel ist, wird davon ausgegangen, dass diese als Model für korrekte Wundheilung im Gegensatz zur pathologischen bei der IPF/UIP dienen kann. Die Unterschiede zwischen den Fibroblasten-Foci und den Masson-Bodies liegen dabei im

Ausmaß der Entzündungsreaktion, im Fibroblastenaufbau, in der Apoptoserate der Myofibroblasten, Kollagenablagerung wie auch dem Ausmaß von Reepithelialisierung und Neovaskularisation (17).

Die ATS/ERS/JRS/ALAT erkennt in den Leitlinien einige Risikofaktoren für die Entwicklung einer IPF/UIP an. Dazu gehören der Nikotinabusus, diverse Umwelteinflussfaktoren wie Metall- und Holzstaub, Steinverarbeitung, tierische und pflanzliche Ausdünstungen, zudem auch virale Infektionen insbesondere mit dem Epstein-Barr-Virus, gastroösophagealer Reflux sowie genetische Faktoren (11).

### 1.3. Bildgebende Diagnostik bei interstitiellen Lungenerkrankungen

Bildgebende Verfahren leisten einen beträchtlichen Beitrag zur Diagnose der IPF/UIP. Auf konventionellen Röntgenaufnahmen des Thorax können Veränderungen in einem frühen Stadium der Erkrankung vollkommen fehlen (21). Charakteristika der IPF/UIP stellen in konventionellen Aufnahmen kleine, ca. 1,5-3mm messende, irreguläre periphere Verschattungen dar, welche im Bereich der Lungenbasis am auffälligsten ausgeprägt sind (22). Begleitend ist in ca. 30% der Fälle eine Honigwabenstruktur des Lungengewebes zu erkennen (23). Auch wird regelmäßig ein Volumenverlust der Unterlappen beobachtet. Das Lungenvolumen kann aber auch normal oder vergrößert erscheinen, wenn zusätzlich ein Emphysem der oberen Partien vorliegt.

Zielführender in der Diagnostik der IPF/UIP sind die Veränderungen, die mit Hilfe einer hochauflösenden Computertomographie (HRCT) gefunden werden können und die nach den neuen Leitlinien der ATS/ERS/JRS/ALAT für die Diagnosestellung ausreichen. Sie stellen hinsichtlich Art und Verteilung eines der fünf von der ATS-ERS herausgearbeiteten Hauptkriterien für die Diagnose einer IPF/UIP dar, wenn keine Lungenbiopsie vorliegt. Mit der HRCT kann die Diagnose IPF/UIP laut aktueller Studienlage in 90-100% der Fälle korrekt gestellt werden. (11) In der HRCT findet sich die typische Verteilung und Größe der von apikal nach basal zunehmenden retikulären Verschattungen. Es werden ferner basale milchglasartige Verdichtungen beschrieben, die jedoch

deutlich schwächer ausgeprägt sind als die retikuläre Zeichnungsvermehrung. Zudem zeigen sich regelmäßig auch Traktionsbronchieektasien. Die typische Honigwabenstruktur kann im CT bei über 90% aller Patienten nachgewiesen werden (23). Die Größe der Lufträume variiert zwischen 3 und 10mm, kann aber auch 2,5cm betragen. Im Verlauf der Erkrankung nehmen die Honigwaben in der Regel an Größe zu und sind irreversibel (24). Honigwabenmuster sind insbesondere subpleural zu finden. Die sich im CT als retikuläre Verschattungen darstellenden Bereiche korrelieren mit Gebieten einer histologisch nachgewiesenen Fibrose, Honigwabenmuster im CT entsprechen Arealen mit histopathologischer Honigwabenstruktur (25). Wie mit Hilfe von Lungenbiopsien und anschließenden histopathologischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, verbirgt sich hinter einer Kombination aus milchglasartigen Verdichtungen und retikulärer Zeichnungsvermehrung oder Traktionsbronchieektasien mitunter eine Fibrose. Alleinige milchglasartige Veränderungen entsprechen dagegen entzündlichen Bereichen des Interstitiums, makrophagenhaltigen Atemwegen oder einer fleckförmigen Fibrose (26). Insgesamt stellt sich das Bild der IPF/UIP heterogen dar, da neben den typischen Veränderungen auch in unterschiedlichem Ausmaß normales Lungengewebe zu sehen ist.

#### 1.4. Klinischer Verlauf und Komplikationen

Wie die Klassifikation der interstitiellen Lungenerkrankungen unterlag auch die Einteilung der pulmonalen Hypertonie mit zunehmenden Erkenntnissen über Ätiologie, Histopathomorphologie, Klinik und Therapie einer Wandlung. Im Rahmen der WHO-Konferenz in Genf 1973 wurde eine Unterscheidung in primäre und sekundäre (chronisch thromboembolische, venookklusive) pulmonale Hypertonie getroffen; die primäre PH stellte dabei eine Ausschlussdiagnose dar (27). 1998 wurde auf dem zweiten Weltsymposium der pulmonalen Hypertonie in Evian eine neue Kategorisierung angestrebt, die die oben genannten Aspekte berücksichtigen sollte. Mit einigen wenigen Änderungen, die im Rahmen des dritten Weltsymposiums vorgenommen wurden – im einzelnen wurde der Begriff der „primären pulmonalen Hypertonie“

durch den der „idiopathischen pulmonalen Hypertonie“ ersetzt, ferner wurden die venookklusive pulmonale Erkrankung wie auch die pulmonale kapilläre Hämangiomatose nun unter der pulmonalarteriellen Hypertonie subsummiert – gilt diese Einteilung bis heute (28).

## Pulmonale Hypertonie

### 1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

#### 1.1 Idiopathisch (IPAH)

#### 1.2 Fämiilär (FPAH)

#### 1.3 Assoziiert mit (APAH)

##### 1.3.1 Kollagenosen

##### 1.3.2 Kongenitalen systemisch-pulmonalen Shuntvitien

##### 1.3.3 Portaler Hypertension

##### 1.3.4 HIV-Infektion

##### 1.3.5 Drogen/Medikamente

##### 1.3.6 Andere (Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Splenektomie, hereditäre Teleangiektasien, Hämoglobinopathien, Myoproliferative Erkrankungen)

#### 1.4 Assoziiert mit signifikanter venöser/kapillärer Beteiligung (PVOD, PCH)

#### 1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

### 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen

#### 2.1 Linksatriale oder linksventrikuläre Erkrankungen

#### 2.2 Linksseitige Klappenerkrankungen

### 3. Pulmonale Hypertonie mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

#### 3.1 Chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD)

#### 3.2 Interstitielle Lungenkrankheit

#### 3.3 Schlafapnoesyndrom

#### 3.4 Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation

#### 3.5 Höhenbewohner

#### 3.6 Pulmonale Entwicklungsstörungen

### 4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer thrombotischer und/oder thrombembolischer Erkrankungen (CTEPH)



- 4.1 Thrombembolie der proximalen Lungenarterien
- 4.2 Obstruktion der distalen Lungenarterien
- 4.3 Nichtthrombotische Lungenembolie (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)
- 5. Sonstige
  - Sarkoidose, Histiozytosis X, Lymphangiomatosis, Gefäßkompression von Lungengefäßen (Lymphknoten, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

In Bezug auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie geht man von einer generellen Prädisposition, auf deren Basis sich durch Mitwirkung eines oder mehrerer stimulierender Faktoren die Erkrankung entwickelt, im Sinne einer „multiple-hit“-Theorie (29). Bereits im Rahmen des zweiten Weltsymposiums in Evian wurden bestimmte Risikofaktoren für die Entstehung der PH festgehalten:

- 1. Medikamente und Toxine
  - 1.1 Sicherer Zusammenhang
    - Aminorex
    - Fenfluramin
    - Dexfenfluramin
    - Toxisches Rapsöl
  - 1.2 Sehr wahrscheinlicher Zusammenhang
    - Amphetamine
    - L-Tryptophan
  - 1.3 Möglicher Zusammenhang
    - Metaamphetamine
    - Kokain
    - Antitumoröse Chemotherapeutika
  - 1.4 Unwahrscheinlicher Zusammenhang
    - Antidepressiva
    - Orale Kontrazeptiva
    - Östrogen-Therapie
    - Nikotinabusus

## 2. Demographische und medizinische Risikofaktoren

### 2.1 Sicherer Zusammenhang

Geschlecht

### 2.2 Möglicher Zusammenhang

Schwangerschaft

Systemische Hypertonie

### 2.3 Unwahrscheinlicher Zusammenhang

Übergewicht

## 3. Assoziation mit anderen Erkrankungen

### 3.1 Sicherer Zusammenhang

HIV-Infektion

### 3.2 Sehr wahrscheinlicher Zusammenhang

Lebererkrankungen mit portaler Hypertonie

Kollagenosen

Kongenitale systemisch-pulmonale Shunts

### 3.3 Möglicher Zusammenhang

Schilddrüsenerkrankungen

Nach wie vor ist die Pathogenese der PH nur unzureichend geklärt, wie auch ihre Pathophysiologie unvollständig verstanden. Jedoch scheint sich, begünstigt durch die oben genannten Faktoren, das typische Bild der PH mit (hypoxischer) Vasokonstriktion, Proliferation glatter Muskelzellen, Remodeling der Lungengefäße, Endothelschäden und einer thrombembolischen Neigung unterschiedlichen Ausmaßes auszubilden (30). Die Prognose einer IPF wird durch die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) vehement verschlechtert; wird diese diagnostiziert, so beträgt die mittlere Überlebenszeit unbehandelt nur mehr drei Jahre (31).

Als pulmonale Hypertonie ist ein mittlerer pulmonalarterieller Druck von mehr als 25mmHg in Ruhe oder mehr als 30mmHg unter Belastung definiert, wobei der pulmonalkapilläre Verschlussdruck und der linksventrikuläre enddiastolische Druck Werte von 15mmHg nicht überschreiten dürfen und ein pulmonalvaskulärer Widerstand von mehr als 3mmHg/l/min vorzuliegen hat

(32). Als schwere PH werden dabei Werte >45mmHg eingestuft, Drücke zwischen 35-45mmHg gelten als mittelschwere PH, unter 35mmHg spricht man von einer milden PH (33).

Die familiäre Häufung der PH legt einen genetischen Hintergrund nahe. So konnte mit dem Bone morphogenetic protrin type receptor II (BMPR II) ein für die Regelung von Apoptose und Zellproliferation glatter Gefäßmuskelzellen wesentlicher Genkomplex identifiziert werden. Der Rezeptor gehört der transforming growth factor  $\beta$ -Familie an. Eine Mutation dieses Gens fördert zunächst eine verstärkte Apoptoserate von Endothelzellen der Lunge; dies führt jedoch zur Ausbildung und Überwiegen apoptoseresistenter Klone und zur Freisetzung von TGF- $\beta$ , wodurch es insgesamt zu einer verstärkten Zellproliferation kommt. Ferner entstehen Endothelschäden, woraus eine vermehrte Aktivierung der vaskulären Elastase und somit vaskuläres Remodeling resultiert (34).

#### 1.5. Therapie und Prognose der interstitiellen Lungenfibrose

Die Zusammenhänge und Vorgänge, die zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie im Rahmen der idiopathischen Lungenfibrose führen, konnten bisher nicht ausreichend geklärt werden. Die Angaben zum Anteil der Fibrosepatienten, die auch an einer pulmonale Hypertonie leiden, schwanken erheblich, zwischen 32% und 85% - die Hauptursache liegt hierbei in unterschiedlichen Messzeitpunkten im Rahmen der Erkrankung. Die beste Einschätzung des Vorkommens der pulmonalen Hypertonie, liefern daher Daten aus Transplantationslisten, die zeigen, dass bei ca. 45% aller für eine Lungentransplantation aufgrund einer IPF gelisteten Patienten mit Hilfe der Rechtsherzkatheterisierung eine PH bewiesen werden konnte (35). Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der PH-Betroffenen mit der Dauer und dem Fortschreiten der IPF zunimmt, von ca. 38% am Ausgangspunkt, auf 86% zum Zeitpunkt der Transplantation (36). Je ausgeprägter die PH umso kürzer auch die Überlebensdauer. Bei systolischen Drücken der Lungenarterie bis 35mmHg

lag das mediane Überleben bei 4,8 Jahren, bei Werten über 50mmHg nur mehr bei 0,7 Jahren (37). Daher erscheint es hinsichtlich der Therapie der IPF essentiell, der Entwicklung einer PH vorzubeugen oder diese bei Auftreten suffizient zu behandeln.

Je nach Schweregrad der pulmonalen Hypertonie kommen neben Allgemeinmaßnahmen wie einer moderaten körperlichen Aktivität, der Vermeidung von Aufhalten über 1500 Höhenmetern, der Verhütung von Schwangerschaft, der Behandlung von Anämien, Vermeidung von Infektionen, Antikoagulation, Sauerstofftherapie, Behandlung von Grunderkrankungen, welche mit der PH assoziiert sind sowie der Behandlung einer begleitenden Rechtsherzinsuffizienz besondere Bedeutung zu. Dazu stehen für die medikamentöse Therapie vier Wirkstoffklassen zur Verfügung, Prostaglandine, Endothelin 1-Rezeptor Antagonisten, Phosphodiesteraseinhibitoren und Kalziumantagonisten – Substanzen mit vasoaktiven Eigenschaften, von denen man sich einen positiven Erfolg hinsichtlich der endothelialen Dysfunktion im Rahmen der PH verspricht (38).

#### 1.6. Stand der experimentellen Forschung zur idiopathischen Lungenfibrose und deren Therapie

Die Erforschung der idiopathischen Lungenfibrose gestaltet sich schwierig, da bis heute keine klare Ursache für deren Entwicklung identifiziert werden konnte. Jedoch konnten in tierexperimentellen Studien zumindest unterschiedliche Wege etabliert werden, eine Lungenfibrose bzw. die aus ihr resultierende pulmonale arterielle Hypertonie zu induzieren. Zu nennen wären dabei die Hypoxie, die Bestrahlung, die Instillation von Monocrotaline sowie Gabe von Bleomycin. Dem Bleomycinmodell wird dabei aufgrund der klinischen Relevanz einer durch dieses Medikament induzierten Lungenfibrose gerne der Vorzug gegeben.

Bei Bleomycin handelt es sich um ein zytostatisch wirkendes Antibiotikum, genauer gesagt um ein von *Streptomyces verticillus* produziertes metallbindendes Glykoprotein. Es wird angenommen, dass die zytotoxische

Wirkung von Bleomycin auf der Induktion von DNA-Fragmentierung in Form von Einzel- sowie Doppelstrangbrüchen und einer daraus resultierenden Unterbrechung des Zellzyklus beruht. Dabei kommt es zunächst zur Bildung eines Komplexes aus Bleomycin, O<sub>2</sub> und Fe(II)-Ionen, der unter Bildung eines Superoxidradikalanions und Bleomycin-Fe(III) zerfällt. Reaktiv entstehen freie Hydroxidradikale, welche schließlich die DNA wie oben erklärt zerstören. Die Inaktivierung von Bleomycin erfolgt mittels Deamidierung durch eine spezifische Hydrolase (39). Je geringer die Aktivität der Bleomycin-Hydrolase, desto höher ist die zytotoxische Wirksamkeit von Bleomycin. Gewebe mit niedriger Hydrolase-Aktivität sind z.B. das Plattenepithel oder das Lungengewebe. Letzteres ist aufgrund der sehr niedrigen Enzym Spiegel besonders anfällig für durch Bleomycin verursachte Schäden: durch Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies kommt es zunächst zu einer toxisch wirkenden Entzündung und nachfolgend zu einer Aktivierung von Fibroblasten und schließlich zur Entwicklung einer progressiven interstitiellen Fibrose (40).

Die Bleomycin-Applikation ist im Tierversuch eine äußerst wirkungsvolle Art und Weise zügig eine Lungenfibrose zu induzieren. In den Siebziger Jahren wurde diese Methode zunächst an Hunden, so dann an Mäusen, nachfolgend an Hamstern und schließlich, wie auch in unserer Versuchsreihe, an Ratten etabliert (41-44). Dabei werden zwei Stadien durchlaufen: Zunächst die Inflammation und nachfolgend die eigentliche Fibroseentwicklung. Nach Applikation von Bleomycin kommt es dabei zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, im Einzelnen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, und IFN- $\gamma$  in den ersten drei Tagen; die Spiegel bleiben dabei bis zum neunten Tag nach Applikation erhöht und zeigen ab dem 14. Tag schließlich einen signifikanten Abfall bis hin zum Ausgangsniveau. Ein Anstieg von Fibrosemarkern wie Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 und Procollagen-1 ist in etwa ab dem sechsten Tag nach Installation zu beobachten und erreicht Höchstwerte um den 14. Tag, so dass ein Umschlagen von der inflammatorischen zur fibrotischen Phase um Tag 9 vermutet wird; dies wird durch eine vermehrte Kollagenablagerung, welche ein wichtiges histopathologisches Kennzeichen der Fibrose darstellt, ab Tag 9 untermauert (40).

Je nach Applikationsweise kommt es zu einer unterschiedlichen Hauptlokalisation der Fibrose: so zeigt die am häufigsten verwendete intratracheale Applikation eine bronchiennah betonte Fibrose, während es bei intravenöser oder intraperitonealer Gabe eher zu einer subpleuralen Schädigung des Lungenparenchyms kommt. Letztere entspricht in etwa der Verteilung, wie sie auch bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose des Menschen zu beobachten ist. Im Bleomycinmodell konnten ferner eine ungleichmäßige Verteilung von Parenchymarealen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Entzündung, Defekte der Basalmembran, epitheliale Zellschäden mit reaktiver Hyperplasie sowie eine interstitielle und intraalveoläre Fibrose gezeigt werden; diese Beobachtung deckt sich mit den histopathologischen Charakteristika der humanen Lungenfibrose. Auch wurden spindelzellohnliche mesenchymale Zellen beschrieben, welche an die für die IPF typischen Fibroblastenansammlungen erinnern (45). Neben den histopathologischen Gemeinsamkeiten sind die einfache Durchführbarkeit, die sehr gute Reproduzierbarkeit und die kurze Zeitdauer bis zur Fibroseentwicklung entscheidende Vorteile des Bleomycinmodells.

Kritisch anzumerken ist allerdings, dass die Bleomycingabe zu einer akuten Lungenschädigung führt, während sich die IPF in einem nicht ermittelbaren Zeitraum entwickelt. Ferner ist das Fortschreiten der IPF, wenn es auch oft schubweise vonstatten geht, irreversibel und der Ausgang letztendlich letal. Dagegen konnte gezeigt werden, dass eine Bleomycin induzierte Lungenfibrose auch ohne jegliche Intervention zumindest partiell reversibel ist; so kann ab Tag 21 nach Bleomycininstillation nicht nur ein Rückgang der Hydroxyprolin Spiegel, sondern auch ein Fibroserückgang hinsichtlich histomorphologischer Kriterien beobachtet werden (46). Das langsame und irreversible Fortschreiten der IPF kann mit dem Bleomycinmodell nicht reproduziert werden.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des Bleomycin-Modells gezeigt werden, dass die zur pulmonalen Fibrose führenden Mechanismen zum einen inflammatorische zum anderen fibrotische Vorgänge umfassen. Zwischen 1980 und 2006 konnten insgesamt 232 Veröffentlichungen – und da zum Teil auch zwei Substanzen getestet wurden beläuft sich die Zahl der experimentellen

Studien auf 246 – identifiziert werden, die positive Effekte in der Therapie der Bleomycin induzierten Lungenfibrose im Tiermodell aufweisen konnten. Jedoch zeigte sich, dass bei lediglich zehn Studien die getestete Substanz mit einem zeitlich so weiten Abstand zur Bleomycinapplikation verabreicht wurde, dass die Entwicklung einer Fibrose erlaubte und somit durch Testung der antifibrotischen Wirkung einen therapeutischen Ansatz hatte (47). Im Rahmen einer ergänzenden Pubmed-Recherche konnten seit 2006 noch weitere 56 Studien identifiziert werden, von diesen hatten lediglich zwei einen therapeutischen Ansatz. In den übrigen Studien wurde, soweit rekonstruierbar, bereits am ersten Versuchstag mit einer medikamentösen Substitution begonnen, so dass dies als prophylaktische Gabe einzustufen ist. Ferner ist im zuletzt genannten Studienansatz eine suffiziente Differenzierung zwischen den antiinflammatorischen und den antifibrotischen Eigenschaften einer Substanz nicht möglich. Letztendlich dürften v.a. Studiendesigns mit therapeutischem Ansatz eine klinische Relevanz aufweisen.

Mit dieser Studie erweitern wir die Anzahl der Versuche mit therapeutischem Ansatz und fügen mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin eine weitere Substanz mit möglicher Wirkung bei Lungenfibrose hinzu. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob Simvastatin die Ausbildung der Lungenfibrose und der pulmonalen Hypertonie im Bleomycinmodell verhindern kann und ob das Medikament ferner im Stande ist, eine durch Bleomycin induzierte bereits manifeste Fibrose zu therapieren und den Blutdruck im Lungenkreislauf zu senken. Mit Hilfe dieses Studiendesigns war es uns möglich zu unterscheiden, ob sich der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor eher auf die entzündliche oder die proliferative Phase in der Pathogenese der Lungenfibrose auswirkt und somit zu zeigen, ob und in welchem Stadium der Einsatz von Simvastatin erfolgsversprechend ist.

Statine, die primär zur Therapie der Hypercholesterinämie angewandt werden, zeigen eine Reihe so genannter pleiotroper Effekte, welche von der Wirkung als „Cholesterinsenker“ unabhängig sind. Dazu zählen zum einen die Fähigkeit die Endothelfunktion zu verbessern, bzw. wiederherzustellen und durch

Stabilisierung von Gefäßplaques antithrombotisch zu wirken, ferner antioxidative und antiinflammatorische Effekte (48).

Bereits in zuvor durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren antiproliferativ wirken, indem sie zu einem Verbleib in der G1-Phase des Zellzyklus führen und ferner im Stande sind in der glatten Muskulatur der Pulmonalarterien Apoptose zu induzieren und damit wohl auch vaskuläres Remodeling, welches bei der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie eine Schlüsselrolle spielt, zu verhindern (49). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Simvastatin im Hypoxie-Model der Ratte in der Lage ist, den pulmonalarteriellen Druck zu senken, die Muskeldicke der alveolären Gefäße wie auch eine Rechtsherzhypertrophie zu reduzieren (50). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Wirkung von Simvastatin in der Behandlung der durch Monocrotalin induzierten pulmonalen Hypertonie (51). Die Fähigkeit Apoptose zu induzieren, die Arterienwanddicke zu reduzieren und zu einer erhöhten Aktivität von endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) – dessen Mangel mit der Entwicklung von pulmonaler Hypertonie in Zusammenhang gebracht wird – zu führen, konnte auch für weitere HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, nämlich für Pravastatin und Atrovastatin nachgewiesen werden, wobei hinsichtlich der antiproliferativen Kompetenz Pravastatin dem Atrovastatin überlegen zu sein scheint (52). Eine Steigerung der eNOS-Aktivität ist auch durch die Gabe von Fluvastatin möglich (53). Ebenfalls mit Hilfe des Monocrotalin-Models konnte gezeigt werden, dass Simvastatin Apoptose in glatten Muskelzellen von Pulmonalarterien induzieren kann und bei einer bereits manifesten pulmonalen Hypertonie (mittlerer pulmonalarterieller Druck von 42mmHg) zu einem Rückgang dieser führen kann (mittlerer pulmonalarterieller Druck 36mmHg nach zweiwöchiger Behandlungsdauer, 24mmHg nach sechswöchiger Behandlungsdauer) (54). Dies konnte für die manifeste pulmonale Hypertonie auch im Hypoxie-Model rekonstruiert werden (55). Auch wird die Sekretion des potenten Vasokonstriktors und Wachstumsfaktors Endothelin-1, welcher neben anderen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Lungenfibrose spielt, sowohl durch Atrovastatin als auch durch Simvastatin gesenkt (56, 57). Des Weiteren scheint



Simvastatin in der Lage zu sein, die Expression des Bone morphogenetic protein-Typ-2-Rezeptors (BMP2) zu induzieren, dessen Mutationen mit familiärer und idiopathischer arterieller pulmonaler Hypertonie in Zusammenhang gebracht werden (58).

Hinsichtlich der pulmonalen Fibrose konnte in Zellkulturen nachgewiesen werden, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, so z.B. Simvastatin, über die Fähigkeit verfügen, antiproliferativ zu wirken und zu einer Reduzierung des Connective tissue growth factors (CTGF) zu führen. Dieser ist als potenter profibrotischer Wachstumsfaktor bekannt ist und zeigt auch bei der Lungenfibrose erhöhtes Vorkommen, was mit Fibroblastenproliferation und extrazellulärer Ablagerung von Matrixbestandteilen in Zusammenhang gebracht wird (59, 60, 61). Mit Hilfe des Bleomycinmodells konnten erneut sowohl antiinflammatorische als auch antifibrotische Effekte im Rahmen der Lungenfibrose für Simvastatin gezeigt werden. Im einzelnen konnte demonstriert werden, dass die Behandlung mit Simvastatin das Ausmaß der Einwanderung von Entzündungszellen – nämlich neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten – signifikant zu reduzieren vermag, ferner zeigt sich unter Simvastatingabe ein niedrigerer Spiegel des entzündunginduzierenden Zytokins TNF- $\alpha$ . Zudem zeigte sich bei mit Simvastatin behandelten Mäusen eine niedrigere Expression von TGF- $\beta$  und von Connective tissue growth factor, was mit einer Abnahme der Produktion von Kollagen I und Kollagen II im Lungengewebe einherging. Mittels des Ashcroft-Scores konnte auch histologisch eine weniger stark ausgeprägte Fibroseentwicklung verzeichnet werden (62). Ferner konnte anhand von Zelllinien, welche von an idiopathischer Lungenfibrose erkrankten Patienten stammten, gezeigt werden, dass Simvastatin dosisabhängig zu einem Verbleib von Fibroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus führt und damit die Umwandlung von Fibroblasten zu den für die Fibrose essentiellen und charakteristischen Myofibroblasten verhindert (63). Jedoch sind die antiproliferativen Eigenschaften der Statine in vivo zum heutigen Zeitpunkt kaum untersucht.

### 1.7. Fragestellung zur vorliegenden Untersuchung

Ziel dieser Studie war, die Wirkung von Simvastatin im Hinblick auf die pulmonale Fibrose sowie die pulmonale Hypertonie an der Ratte mit Hilfe des Bleomycin-Modells zu untersuchen und dabei zwischen einer potentiell prophylaktischen und einer therapeutischen Wirkung zu unterscheiden – ein Studienansatz, der in dieser Form zum ersten Mal von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde.

Deutlich verschlechtert wird die Prognose der Lungenfibrose durch die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie; wird diese diagnostiziert, so beträgt die mittlere Überlebenszeit unbehandelt lediglich drei Jahre. Obwohl seit 2003 mit der Zulassung des Endothelin-1-Rezeptor-Inhibitors Bosentan zum ersten Mal in der Therapie der pulmonalen Hypertonie ein oral wirksames Medikament mit A-Evidenz verfügbar ist, ist im Moment letzten Endes immer noch die Lungentransplantation die einzige Chance auf Heilung. Jedoch kann diese Behandlungsform in Anbetracht der Nebenwirkungen einer notwendigen Immunsuppression für den Betroffenen, ihrer Kosten und insbesondere aufgrund der Tatsache, dass nicht annähernd genügend Organe zur Verfügung stehen, nicht die einzige Heilung bringende Therapieoption bleiben. So sind Möglichkeiten zu finden, die Lungenfibrose und die auf ihr basierende pulmonale Hypertonie zu beseitigen und damit das kranke Organ selbst zu heilen. Um dieses Ziel zu erreichen, sieht man heute drei Wege, die alle die für die Fibrose charakteristische Vermehrung der Fibroblasten und der Matrixbestandteile als Zielstrukturen zur Grundlage haben: zum einen kann versucht werden, die Ablagerung von Matrixkomponenten wie den Kollagenen I und III durch Fibroblasten zu verhindern; zum anderen wäre die Blockade der Hyperplasie der Fibroblasten selbst eine mögliche Therapieform; die dritte – und im Hinblick auf eine Restitutio ad integrum einzige – Option könnte die Induktion von Apoptose der Fibroblasten sein.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin die Ausbildung der Lungenfibrose und der pulmonalen Hypertonie im Bleomycinmodell verhindern kann und ob das Medikament ferner im Stande ist, eine durch Bleomycin induzierte bereits manifeste Fibrose zu therapieren

und den Blutdruck im Lungenkreislauf zu senken. Unsere Überlegungen basierten dabei auf Beobachtungen, dass Simvastatin zum einen vasoprotektiv wirkt, indem es ein Remodeling der Gefäßwände verhindert, bzw. sogar im Stande ist, dieses wieder umzukehren. Dies konnte für die Koronare Herzkrankheit bewiesen werden. Zum anderen verfügen Statine über die Fähigkeit, sowohl in vitro als auch in vivo Apoptose in Fibroblasten zu induzieren, was mit Hilfe von Lovastatin – einer dem Simvastatin nah verwandten Substanz – gezeigt werden konnte. Ferner ist vom Simvastatin bekannt, dass es auch anti-inflammatorische Wirkung besitzt. All dies sind „Nebenwirkungen“ eines bereits zugelassenen, weit verbreiteten und im Allgemeinen gut verträglichen Medikaments, die allesamt nicht von seiner Wirkung als Lipidsenker abzuhängen scheinen.

Die Lungenfibrose ist eine Erkrankung, die in zwei Stadien verläuft: dem entzündlichen und dem von fibrotischen Veränderungen gekennzeichneten. Zunächst steht die Entzündung im Vordergrund, anschließend kommt es durch diese zum Zellschaden, der zu einer Sekretion von Wachstumsfaktoren wie dem transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dem platelet-derived growth factor (PDGF), dem insulin-like growth factor 1 und dem Endothelin 1 (ET1) führt. Diese wiederum stimulieren Fibroblasten zum einen zur Proliferation, zum anderen fördern sie deren Umwandlung in aktive Myofibroblasten. Letztgenannte verfügen über die Fähigkeit, weitere Wachstumsfaktoren zu sezernieren, die zu einer vermehrten Produktion von Kollagenen und zur verstärkten Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix führen. Sowohl die erhöhten Fibroblastenzahlen als auch vermehrtes Kollagen sind kennzeichnend für die Fibrose. Es ist bekannt, dass der Umschlag von der Entzündung zur fibrotischen Phase im Bleomycinmodell in etwa um den 9. Tag nach intratrachealer Gabe des Bleomycins stattfindet. Da unser Studiendesign vorsah, eine Unterscheidung zwischen anti-inflammatorischen und antiproliferativen bzw. antifibrotischen Wirkungen des Simvastatins vorzunehmen, bot sich das Bleomycin zur Induktion der Fibrose in unserer Studie besonders an.

Wir verwendeten in unserer Studie männliche Wistar-Ratten, die auf vier Gruppen randomisiert wurden: eine Kontrollgruppe, eine reine Bleomycingruppe, eine Bleomycingruppe, die ab Tag 1 im Sinne einer Prophylaxe Simvastatin erhielt und eine Bleomycingruppe, die Simvastatin ab Tag 13 als potentielles Therapeutikum erhielt. Mit Hilfe dieser Aufteilung sollte es uns möglich sein, zu unterscheiden, ob sich der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor eher auf die entzündliche oder die proliferative Phase der Pathogenese der Lungenfibrose auswirkt und somit zu zeigen ob und in welchem Stadium der Einsatz von Simvastatin erfolgsversprechend erscheint. Die Quantifizierung der Fibrose erfolgte zum einen durch Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts der Lunge, zum anderen durch Messung der Lungencompliance und zusätzlich auch durch Bestimmung der Lungengewichte. Die Ausbildung von pulmonaler Hypertonie wurde anhand der rechtsventrikulären Drücke und der rechtsventrikulären Gewichte beurteilt. Als im Verlauf der Erkrankung typischerweise sezernierter Wachstumsfaktor wurde exemplarisch Endothelin 1 gewählt. Wir bestimmten den Hämatokrit als indirekten Parameter für Hypoxie. Ferner führten wir Belastungstests am Laufband durch und konnten somit die Leistungsfähigkeit der Tiere objektivieren. Somit war eine umfassende, weil auf immunhistologischen, laborchemischen und klinischen Untersuchungen basierende Beurteilung der Erkrankung gewährleistet.

Für den Fibrosepatienten steht neben der Frage nach der Lebenserwartung v.a. die Frage nach der Qualität des täglichen Lebens mit der Erkrankung im Vordergrund. Diese äußert sich für den Patienten am ehesten in seiner Leistungsfähigkeit. Mit Hilfe des Laufbandmodells versuchten wir die Leistungsfähigkeit der Tiere im Laufe des Untersuchungszeitraums zu simulieren und Rückschlüsse auf den Erfolg einer Behandlung mit Simvastatin zu ziehen.

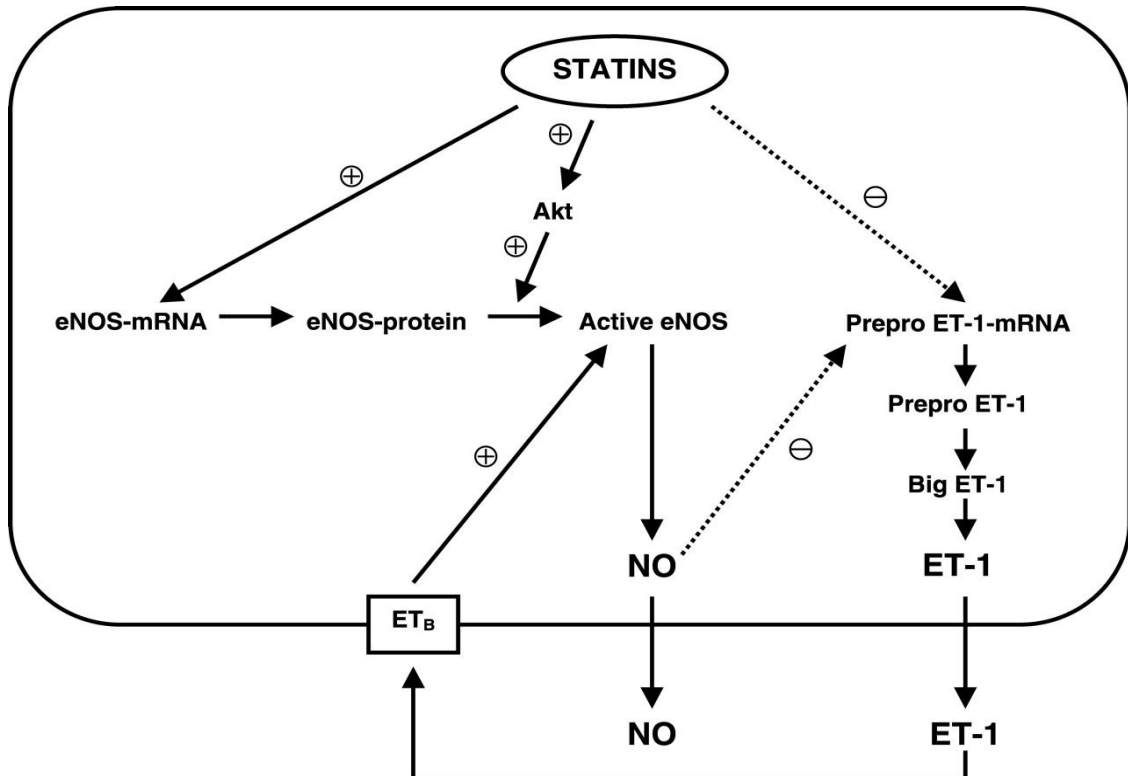


Abb. 1: Wirkung von Statinen auf verschiedene intrazelluläre Mechanismen (aus: Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant? Eur Heart J 2003; 24:225-48)

Im Einzelnen sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

Ist Simvastatin in der Lage die Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu verhindern?

Ist eine Bleomycin-induzierte Lungenfibrose mit Hilfe von Simvastatin behandelbar?

Kann die Entwicklung der pulmonal-arteriellen Hypertonie im Bleomycin-Modell durch Simvastatin vermieden werden?

(Welches Stadium der Lungenfibrose kann im Bleomycin-Modell durch den Einsatz von Bleomycin beeinflusst werden?)

Kann Simvastatin die Abnahme der Lungencompliance, die Zunahme des Hydroxyprolinegehalts oder die Produktion des Wachstumsfaktors Endothelin 1 bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beeinflussen?

Wirkt Simvastatin einem Leistungsabfall bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose entgegen?

## 2. Methoden

### 2.1. Tierexperimentelle Versuchsphase

#### 2.1.1. Tierhaltung und Randomisierung

Für die Studie wurden 60 männliche, an Tag 0 vier Wochen alte Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 250g verwendet. Das Forschungsvorhaben wurde von der Tierethikkommission der Universität Regensburg bewilligt und wurde in den Räumen des Forschungsbaues H1 der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

Hierzu wurden die Tiere wie folgt in vier Gruppen randomisiert:

1. Kontrollgruppe (n=13)
2. Bleomycingruppe (n=16)
3. Bleomycin+Simvastatin ab Tag 1 (n=16)
4. Bleomycin+Simvastatin ab Tag 13 (n=15)

Im Rahmen der fünfwöchigen Studie wurden die Tiere bei einem konstanten 12 h Tag-Nacht-Rhythmus in Einzelkäfigen gehalten. Sie erhielten Trockennahrung und Wasser ad libitum.

#### 2.1.2. Induktion der Lungenfibrose

Am Tag 0 wurde zur Induktion der Lungenfibrose das Zytostatikum Bleomycin (cell-pharm-GmbH, Hannover, Deutschland) verwendet. Die benötigte Bleomycindosis war im Vorversuch auf 2,5 U/kg Körpergewicht (1Unit=1mg) festgelegt worden.

Um das Bleomycin intratracheal verabreichen zu können, wurden die Tiere der Gruppen 2, 3 und 4 mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (Florene „R“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einer flachen Narkose gehalten. Bei senkrechter Lagerung der Tiere wurde unter Sichtkontrolle ein G16-Katheter

(Johnson&Johnson, Haan, Deutschland) in die Trachea eingeführt. Das Bleomycin wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien zum Arbeiten mit Zytostatika in 0,9%igen NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst. Bei der Verabreichung der individuellen Bleomycinmenge mittels Insulinspritze (BD Plastikpak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) wurde bei allen Tieren auf ein gleich bleibendes Gesamtvolumen von 0,25 ml geachtet. Abschließend wurde mit 1 ml Luft nachgespült, um eine adäquate Verteilung des Medikaments in der Lunge zu gewährleisten.

#### 2.1.3. Medikamentöse Behandlung

Simvastatin (Zhejiang Hengdian Imp. & Exp. Co., Ltd., China) wurde den Tieren der Gruppen 3 und 4 täglich gewichtsadaptiert in einer Dosis von 20mg/kg KG verabreicht. Zur Dosisanpassung wurden die Ratten zweimal wöchentlich gewogen. Die Reinsubstanz wurde in 1ml Olivenöl gelöst und mit Hilfe einer Schlundsonde (1,2 x 80 mm, Scanbur BK, Schweden) per os verabreicht. Dabei erhielt die Gruppe 3 das Medikament im Sinne einer Prophylaxe beginnend ab Tag 1 nach Bleomycingabe. Dahingegen wurde das Simvastatin bei den Tieren der Gruppe 4 ab Tag 13, dem Zeitpunkt an dem die Ausbildung einer bleomycininduzierten Lungenfibrose bei Ratten zu erwarten ist, therapeutisch eingesetzt.

#### 2.1.4. Laufbandbelastungstest

Alle Versuchstiere absolvierten vor dem eigentlichen Versuchsbeginn zunächst ein 5-tägiges Trainingsprogramm am Laufband. Anschließend wurde an zwei Tagen die Ausgangsleistung bestimmt. Am Tag 0 wurde den Gruppen 2, 3 und 4 Bleomycin, wie unter 2.1.3 beschrieben, verabreicht. Dem schloss sich die 28-tägige Versuchsphase an. Dabei erhielt die Gruppe 3 ab Tag 1 Simvastatin per os, die Gruppe 4 ab Tag 13. Den Tieren wurde an den Tagen 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 sowie 25 die Laufleistung abgenommen.

#### 2.1.4.1. Laufbandaufbau

Das Laufband (siehe Abb. 2) wurde in der Biowerkstatt der Universität Regensburg konstruiert. Bei dem Gerät handelt es sich um ein motorbetriebenes Laufband, an dessen Ende ein Einsatz mit 15 Bügeln eingeschoben werden kann. Diese Bügel dienen zur Weiterleitung des Stroms von der Stromquelle und führen bei Kontakt zur Auslösung eines milden Stromschlags. Die Stromstärke kann mittels Schalter in 0,5mA Schritten zwischen 0,5 und 1,5 mA, die Geschwindigkeit zwischen 0 und 30m/min reguliert werden, Die Neigung kann auf 0, 6 oder 12 Grad eingestellt werden. Das Laufband wird durch einen Plexiglaskasten begrenzt. Nur durch den Verschluss des Systems kann der Stromkreis geschlossen werden, so dass es bei offenem System nicht zu einem akzidentiellen Stromschlag des Untersuchers kommen kann. An der Außenseite des Laufbandes ist ein Notausschalter angebracht, der sowohl das Laufband stoppt als auch den Stromfluss unterbricht.



Abb. 2: Darstellung und Beschreibung des Laufbandes im Rahmen der durchgeführten Studie



#### 2.1.4.2. Laufband-Trainingsprogramm

Um die Tiere an das Laufband zu konditionieren und im Anschluss die individuelle Ausgangsleistung zu bestimmen durchliefen sie ein 5-tägiges Trainingsprogramms.

Das Laufband wurde so konstruiert, dass sich zwischen Ende der Lauffläche und den Bügeln, die den Stromschlag auslösen, eine für die Tiere deutlich wahrnehmbare Absenkung befand. Somit wurden die Tiere nicht direkt auf den Stromschlag konditioniert, sondern auf die vorgeschaltete Absenkung. Im Vorversuch wurde ausgetestet, dass jede Ratte in den 5 Stufen 10, 15, 20, 25 und 30m/min je 5 Minuten laufen musste, um eine volle Auslastung zu erzielen. Dies war auch Ziel des Trainingsprogramms, das wie folgt verlief:

Tag	Zeit in Minuten	Winkel in Grad
1	1min	12
2	2	12
3	3	12
4	4	12
5	5	12

#### 2.1.4.3. Abbruchkriterien des Laufbandbelastungstests

Folgende Abbruchkriterien wurden festgelegt, um die Erschöpfung der Tiere zu objektivieren:

1. Kontakt des Tiers für länger als zwei Sekunden mit der Stromquelle ohne dass das Laufband berührt wurde

2. Kontakt des Tiers für länger als drei Sekunden mit den Hinterbeinen auf der Stromquelle während die Vorderbeine noch auf dem Band weiterliefen

Wenn ein Kriterium erfüllt war, wurde die Zeit angehalten, das Laufband zunächst gestoppt und anschließend erneut gestartet. Erst beim dritten Abbruch wurde die Leistungsabnahme endgültig abgebrochen.

2.1.4.4. Ermittlung der individuellen Ausgangsleistung und Leistungsabnahme  
Idealerweise liefen die Tiere nach Abschluss des Trainings, welches einmalig vor dem Beginn des eigentlichen Experiments absolviert wurde, je 5 Minuten in jeder der 5 Stufen. Da die Tiere vor den Leistungstests randomisiert worden waren, gab es innerhalb jeder Gruppe schlechte und gute Läufer. Daher musste von jedem Tier die individuelle Maximalleistung (Ausgangsleistung) an zwei aufeinander folgenden Tagen ermittelt werden. Die Werte wurden gemittelt und die Ausgangskondition auf den errechneten Mittelwert festgelegt. Die Ausgangskondition stellte hierbei den oberen cut-off für die Leistung dar, die jedes Tier im Rahmen des Belastungstests maximal erbringen musste. Als erreicht wurde die Ausgangskondition angesehen, wenn ein Tier dreimal eines der Abbruchkriterien erfüllte. Die hierbei gefundene Zeit in Sekunden wurde für die Berechnung als 100% der Leistung festgesetzt.

#### 2.1.4.5. Berechnung der Laufleistungen

Die Laufleistungen der Tiere wurden an den Tagen 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 und 25 ( $t_4$ ,  $t_7$ ,  $t_{10}$  etc.) nach Bleomycingabe ermittelt. Für die Berechnung wurden die Leistungen zweier aufeinander folgender Tage gemittelt und der errechnete Wert ins Verhältnis zur Ausgangsleistung gesetzt. Die Ausgangsleistung ( $t_0$ ) in Sekunden entsprach dabei 100%. Abweichungen der Laufleistungen wurden in Prozent zum Ausgangswert ausgedrückt. Diese Werte wurden für die einzelnen Gruppen gemittelt und in einer Verlaufskurve graphisch dargestellt.

#### 2.1.5. Hämodynamische Messungen

#### 2.1.5.1. Systemische Blutdruckmessung

Um einen systemischen Hypertonus der Versuchstiere auszuschließen, wurde gegen Ende der Belastungsphase der systolische Blutdruck nicht invasiv bestimmt. Dies geschah mittels Tail-Cuff-Methode mit Hilfe des blood pressure BP Rekorders 8005 (W+W Electronics, Hofheim, Deutschland). Hierzu wurden die Tiere in Käfige eingespannt, die zur Förderung der Durchblutung auf einer 37°C warmen Heizdecke gelagert wurden. Am Schwanz der Ratten wurde eine Druckmanschette und ein Pulsaufnehmer angebracht, über die mittels Transducer eine computergestützte Pulsationskurve aufgenommen werden konnte.

#### 2.1.5.2. Messung des rechtsventrikulären Drucks

Der rechtsventrikuläre Druck (RVSP) wurde mittels Rechtsherzkatheter gemessen. Dieser wurde einmalig am Tag der Section ermittelt. Hierzu wurden die Tiere initial mit Isofluran in Narkose versetzt, die anschließend mit Trapanal (100mg/kgKG i.p.) (Altana Pharma, Konstanz, Deutschland) aufrechterhalten wurde. Am rechten Halsdreieck wurde die V. jugularis externa freigelegt, mit einer Gefäßschere ein Zugang geschaffen und über diesen der zuvor mit Liquemin (500IU/ml, Roche Pharma, Deutschland) gespülte Kindervenenkatheter (1mm\*80mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in das rechte Atrium vorgeschoben. Unter Beobachtung der Blutdruckamplitude wurde der RVSP mit dem Druckabnehmer der Firma Hellige (Programm 19) gemessen.

#### 2.1.6. Blutentnahme

Im Rahmen der Studie sollten verschiedene Verlaufsp Parameter, wie etwa Endothelin 1 (ET1) und der Hämatokrit bestimmt werden. Hierzu wurde den Versuchstieren über die Schwanzvene an den Tagen 4, 13, 19, und 25 nach Bleomycingabe EDTA-Blut abgenommen.

Die Tiere wurden dazu in Zwangskäfige gesetzt, um den Schwanz für die Punktion zu fixieren. Dieser wurde zunächst mit Emlasalbe lokal betäubt und im Anschluss mit 70 % Alkohol desinfiziert. Durch Aufdrücken des Daumens ca. 1 cm vor der Einstichstelle wurde das Gefäß gestaut und mit einer Kanüle punktiert. Mit einer Kapillare wurde das gewonnene Blut gesammelt und in EDTA-Mikrogefäße überführt. Zur Plasmagewinnung schloss sich eine zehninütige Zentrifugation (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) bei 4°C und 3000G an. Der Überstand wurde abpipettiert und das gewonnene Plasma bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

An Tag 28 wurde nach der RVSP-Messung über den im Ventrikel befindlichen Katheter ebenfalls ein EDTA-Röhrchen venöses Blut abgenommen. Die Verarbeitung und Lagerung des Blutes erfolgte wie oben beschrieben.

Nach Abschluss der Blutabnahme aus der Schwanzvene wurde zusätzlich eine Mikrokapillare zu drei Vierteln mit Blut befüllt, mit Knetmasse verkittet und nach Zentrifugation der Hämatokrit mit Hilfe einer vom Hersteller mitgelieferten Skala abgelesen. Die Hämatokrit-Bestimmung erfolgte an den Tagen 4, 13, 19, 25 nach Bleomycingabe. Ferner wurde aus dem am Tag 28 mittels Katheter gewonnenen Blut ebenfalls eine Hämatokritmessung durchgeführt.

## 2.1.7. Organentnahme

### 2.1.7.1. Durchführung

Nach der Messung des RVSP und der Blutentnahme über den Rechtsherzkatheter an Tag 28 musste den Ratten für die anschließende Compliance-Messung das Herz-Lungenpaket entnommen werden. Die Präparation erfolgte wie folgt:

Zunächst wurde beginnend auf Höhe des Larynx bis hin zum Beckenbereich ein Hautschnitt gesetzt (Abb. 3).



Abb. 3

Das Sternum wurde mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und die Thoraxeröffnung durch Sternotomie vorgenommen (Abb. 4). Die Trachea wurde freipräpariert und unterhalb des Kehlkopfs durchtrennt. Dabei war streng darauf zu achten, dass kein Blut über die Trachea in die Lunge gelangte; hierzu wurde die Luftröhre mit Hilfe einer anatomischen Pinzette abgedrückt.

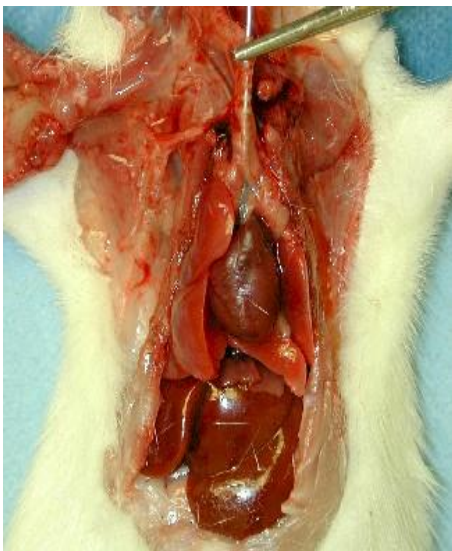


Abb. 4

Durch leichten Zug an der Trachea und stumpfes Wegpräparieren der trachea- und lungennahen Strukturen wurde das Organpaket en bloc entnommen, wobei jegliche Traumatisierung der Lunge zu vermeiden war (Abb. 5).

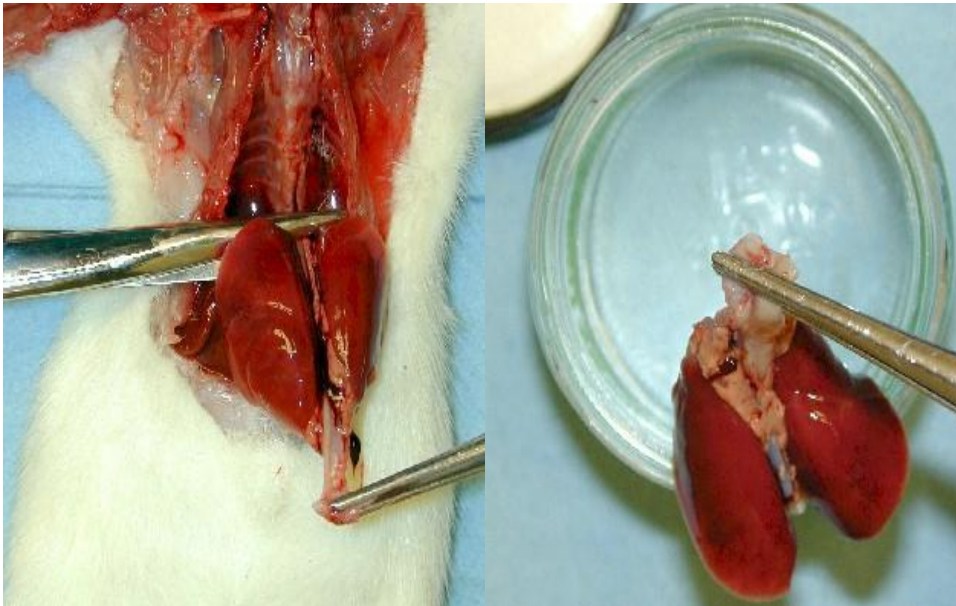


Abb. 5

Das Herz wurde von der Lunge an der Herzbasis abgetrennt. Nach Applikation der cardioplegen Lösung wurde das Herz nach Entfernung der Vorhöfe in Septum, rechten und linken Ventrikel getrennt. Da das Herz Teil einer anderen Doktorarbeit war, wird im Weiteren nicht mehr auf dessen Weiterverarbeitung eingegangen. Hiernach erfolgte die Compliance-Messung wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Im Anschluss wurde die Trachea von der Lunge abgetrennt und verworfen. Die Lungenlappen wurden voneinander getrennt und im Hinblick auf die sich anschließenden Untersuchungen wie folgt verarbeitet: Der linke Lungenlappen wurde unbehandelt gewogen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Hydroxyprolinbestimmung gelagert. Der rechte Oberlappen wurde mit 4%igem PBS gepufferten Formalin mit Hilfe einer Braunüle gespült und in Einbettkassetten gelegt, die für weitere 24 Stunden bis zur Paraffineinbettung in Formalin gelagert wurden. Die verbleibenden Lungenlappen wurden ebenfalls mit einer Braunüle mit 0,9%igem NaCl gespült und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren molekularbiologischen Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.7.2. Makroskopische Beurteilung des Sektionssitus

Nach Eröffnung des Thorax wurde die Lunge auf Veränderungen, wie etwa Marmorierung, Bullae, etc., untersucht. Zur Erfassung einer eventuellen Mitbeteiligung der Leber im Rahmen der Lungenfibrose und Pulmonalen Hypertonie wurde das Organ nach Eröffnen des Abdomens auf makroskopische Veränderungen geprüft, zudem wurde bei Vorliegen von Aszites der Ausprägungsgrad beurteilt.

## 2.2. Funktionelle und laborexperimentelle Versuchsphase

### 2.2.1. Compliance-Bestimmung

#### 2.2.1.1. Durchführung

An den für die RVSP-Messung verwendeten Druckabnehmer wurde eine Heidelbergerverlängerung angeschlossen. Diese wurde mit NaCl befüllt und durch einen Dreiwegehahn mit einer Braunüle verbunden.

Zusätzlich wurde am Dreiwegehahn eine mit 20ml Luft gefüllte Spritze angeschraubt.

Für die Compliance-Messung wurde nur der linke Lungenflügel verwendet, da ein Überblähen des rechten Lungenflügels diesen für die weiteren Untersuchungen unbrauchbar gemacht hätte. Aus diesem Grund musste der mehrlappige rechte Lungenflügel auf Höhe des rechten Stammbronchus mit Hilfe eines chirurgischen Fadens durch einen Doppelknoten und zusätzliches Abdrücken durch eine Klemme luftdicht verschlossen werden. Über die Trachea wurde die am Dreiwegehahn angebrachte Braunüle in den linken Stammbronchus eingeführt und durch Verknotung wiederum luftdicht abgebunden; somit war gewährleistet dass sich ein definiertes Luftvolumen ausschließlich im linken Lungenflügel verteilen konnte.

Vor der eigentlichen Compliance-Messung wurde ein Nullabgleich des Druckabnahmesystems gegen Luft vorgenommen.

Für die Messung wurde der linke Lungenflügel schrittweise mit 1ml, 2ml und 3ml Luft inflatriert und der Druck am Druckabnehmer abgelesen. Zwischen den Einzelschritten wurde der Lungenflügel jeweils deflatiert. So ergaben sich für

jedes Tier drei Druckwerte ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) bei definierten Luftvolumina von 1ml ( $V_1$ ), 2ml ( $V_2$ ) und 3ml ( $V_3$ ).

#### 2.2.1.2. Berechnung

Zunächst wurde für jedes Tier ein Druckvolumendiagramm erstellt. In den Bereich des linearen Kurvenverlaufs wurde zur Bestimmung von  $\Delta V$  und  $\Delta P$  ein Steigungsdreieck gezeichnet und die Compliance mit folgender Formel berechnet:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$$

Die Compliancewerte jeder Gruppe wurden anschließend gemittelt und diese Mittelwerte für die weitere statistische Auswertung verwendet.

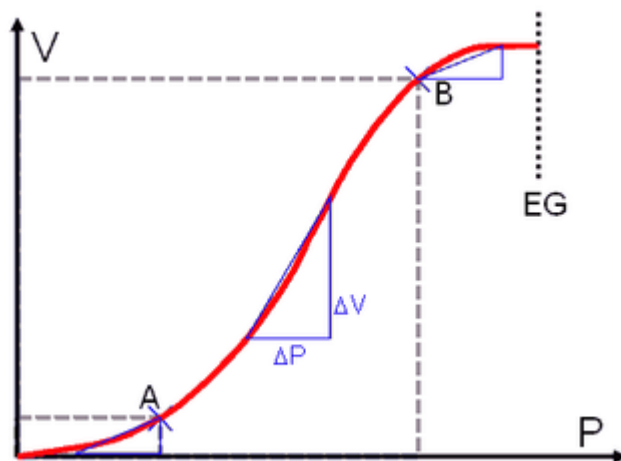


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Druck-Volumen-Diagramms zur Ermittlung der Compliance.

#### 2.2.2. Hydroxyprolinbestimmung

##### 2.2.2.1. Ursprung und Bedeutung von Hydroxyprolin

Bei Hydroxyprolin handelt es sich um eine nahezu ausschließlich im Bindegewebe vorkommende Aminosäure, die durch Hydroxylierung aus Prolin entsteht. Bei vermehrter Kollagenproduktion – wie etwa bei Lungenfibrose – nimmt die Menge an Hydroxyprolin zu und wird als Fibrosemarker verwendet.



Das chemische Prinzip besteht in einer basischen Hydrolyse des Gewebes zur Freilegung des Hydroxyprolins. Dieses wird anschließend durch Chloramin T schrittweise zu Pyrol oxidiert. Pyrol bildet zusammen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd, einem Bestandteil des Ehrlichs-Reagenz, einen Farbkomplex, der bei 540nm photometrisch vermessen wird. Die optische Dichte ist direkt proportional dem Hydroxyprolingehalt.

#### 2.2.2.2. Probenvorbereitung und -lagerung

Aus den ungespülten, bei -20°C gelagerten, linken Lungenflügeln wurde in 2,5ml 0,9%igen NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit Hilfe des Ultra Turrax (Ultra Turrax T25, IKA, Staufen, Deutschland) ein Gewebshomogenisat hergestellt. Im Anschluss wurde dieses bei 3000 Umdrehung und 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Es entstehen drei Phasen: Die oberste Schicht enthält fetthaltige Bestandteile, die mittlere wässrige Phase das hydrophile Hydroxyprolin und die unterste Zelldetritus. Die mittlere Phase wird abpipetiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.3. Photometrische Messung der Hydroxyprolinkonzentration

Zur Quantifizierung des Hydroxyprolins wurde eine Standardstocklösung aus trans-4-Hydroxyprolin (Fluka, Steinheim, Deutschland) angesetzt. Daraus wurden folgende Standardverdünnungsstufen hergestellt: 0,5; 0,7; 1; 5; 10; 15 und 20µg. Diese dienen zur Ableitung einer Standardkurve, anhand der im Anschluss der Hydroxyprolingehalt ermittelt wurde. Im folgenden Protokoll wurde der Standard und die Proben der Versuchstiere auf gleiche Art und Weise behandelt.

Zur Bestimmung des Hydroxyprolins wurden je 40 µl des Homogenisats, der einzelnen Standards und für den Leerwert 40µl NaCl in Eppendorfcups pipetiert. Um eine Hydrolyse zu ermöglichen wurde den Proben 10µl 10N NaOH (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben bei einem Druck von 1bar und 121°C für 25 Minuten autoklaviert. Zur Oxidation wurden nach erfolgter Hydrolyse pro Cup 450µl frisch angesetzter Chloramin-T-Lösung zugegeben und die Proben gevortext.

Die Chloramin-T-Lösung wurde wie folgt hergestellt: 1,27g Chloramin-T (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 20ml 50%igen n-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst und mit Acetat-Citratpuffer(pH 6,5) auf ein Endvolumen von 100ml aufgefüllt.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 25 Minuten inkubiert. Aus 3g Dimethylaminobenzaldehyds (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 13,3ml n-Propanol und 6,7ml Perchlorsäure wurde Ehrlichs-Reagenz hergestellt, von welchem je 500µl zu den Proben zugegeben wurden. Die Cups wurden abermals gevortext und bei 65°C 20 Minuten lang inkubiert. 200µl des Reaktionsansatzes wurden in 96well-Platten überführt und bei 540nm am Photometer vermessen.

Mit dem Programm Softmax wurde zunächst mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungen und den photometrisch gemessenen Werten für die zugehörigen optischen Dichten eine linear aufgetragene Eichkurve erstellt. Die optischen Dichten der einzelnen Proben wurden nach Abzug des Leerwerts auf die Standardkurve gefällt und so ihre jeweilige Konzentration an Hydroxyprolin ermittelt. Bei allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte zur weiteren statistischen Auswertung verwendet.

### 2.2.3. Messung von Endothelin1 im Plasma

#### 2.2.3.1. Ermittlung des Endothelin1-Gehalts

Die Bestimmung des Endothelins im Plasma erfolgt mittels kompetitivem Enzym Immunoassay (ELISA). Das Endothelin 1 (ET1) im Plasma konkurriert mit einem Biotin konjugierten Peptid um die Bindungsstellen am Fab-Fragment des spezifischen anti-Endothelin Antikörpers. Dieser Primärantikörper wiederum bindet mit seinem Fc-Fragment am Sekundärantikörper, mit dem die ELISA-Platte vorbeschichtet ist. Nur das Biotin markierte Peptid katalysiert mittels SA-HRP (Streptavidinperoxidase) die Reaktion zwischen dem Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, so dass es zu einer Farbentwicklung kommt, die photometrisch bei 450 nm gemessen wird. Die Optische Dichte ist umgekehrt proportional zum Endothelingehalt.

#### 2.2.3.2. Photometrische Messung des Endothelin1-Gehalts im Plasma

Die Bestimmung des ET1-Gehalts erfolgte mit dem ELISA-Kit der Firma Phoenix Europe GMBH (Karlsruhe, Deutschland) streng nach Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde eine Standardreihe hergestellt; hierzu wurde die Standardstocklösung stufenweise mit Puffer auf folgende Konzentrationen verdünnt: 25; 5; 1; 0,2; und 0,04ng/ml. In die 96well-Platte wurden pro Probe bzw. Standardverdünnungsstufe je 50µl pipetiert. Für den Leerwert wurden 50µl Puffer eingesetzt. In alle wells – mit Ausnahme des Leerwerts – wurden 25µl Primärantikörper und 25µl des Biotin markierten Peptids zugegeben. Nach Versiegelung der Platte wurde der Reaktionsansatz zwei Stunden bei Raumtemperatur und 300 r.p.m. auf dem Schüttler (IKA HS 260 basic, Staufen Deutschland) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der wells abgekippt, die Platte fünfmal mit Puffer gewaschen und anschließend trocken geklopft. Als nächstes wurde zu jedem well 100µl SA-HRP-Lösung zugefügt, die ELISA-Platte erneut versiegelt und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und 300 r.p.m. zur Inkubation auf den Schüttler gestellt. Hiernach wurde die Platte wie zuvor abgekippt, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die Wells mit je 100µl des TMB-Substrats (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) versetzt und abermals auf dem Schüttler lichtgeschützt inkubiert. Nach einer Stunde wurde zum Stoppen der Reaktion 100µl 2N HCl zugegeben. Die Optische Dichte des entstandenen Farbkomplexes wurde bei 450nm photometrisch vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Mit Hilfe des Softmax Programms wurde anhand der Optischen Dichten der Standardreihe eine 4-parametrisch aufgetragene Eichkurve erstellt. Die gemittelten optischen Dichten der einzelnen Proben wurden auf die Standardkurve gefällt und die ET1-Konzentration extrapoliert.

### 2.3. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die Datenerfassung und statistische Auswertung aller dargestellten Untersuchungen erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows®, Version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) bzw. SigmaPlot 2001.

Die Standardabweichung wurde festgelegt als +/-1. Zur Prüfung der Signifikanz wurde für alle Ergebnisse der Mann-Whitney-Test durchgeführt; die einzige Ausnahme bildete hierbei die Signifikanzprüfung der Laufleistungen, die mit dem Posthoc Bonferroni-Test ermittelt wurde. Für die Signifikanz wurde eine Schwelle von  $p < 0,05$  bestimmt.

### **3. Ergebnisse**

Zur Bezeichnung der jeweiligen Signifikanzen wurde nachfolgende Symbolik festgelegt:

\* für Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# für Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

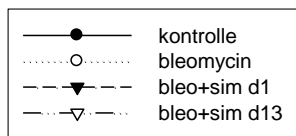
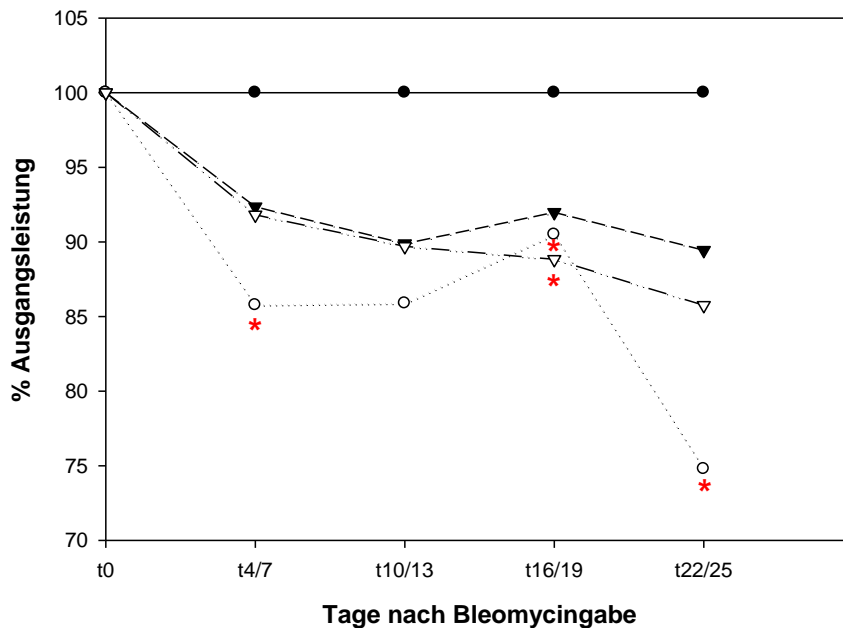
\$ für Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

#### 3.1. Ermittlung der „in vivo“-Reaktionen der randomisierten Versuchstier-Gruppen

##### 3.1.1. Laufleistung

Der Laufbandbelastungstest wurde durchgeführt, um die Leistungsabnahme und damit das Ausmaß der Erkrankung beobachten und quantifizieren zu können.

### Laufleistung im Verlauf



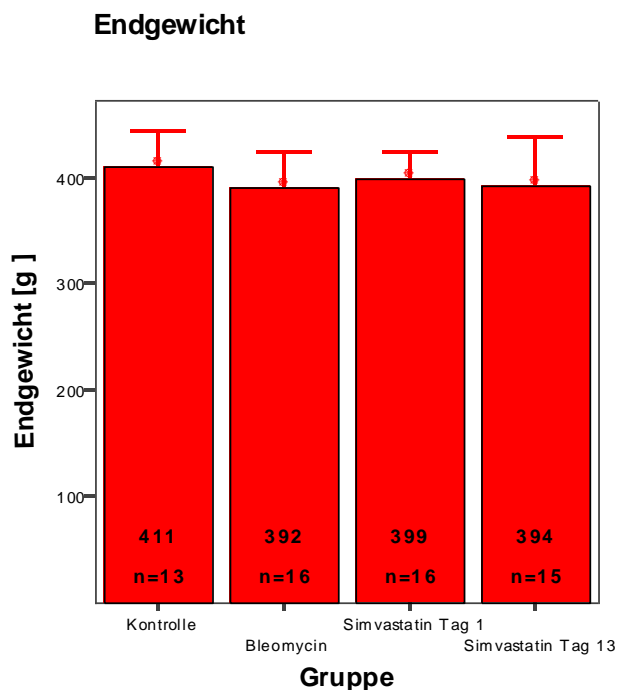
- \* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe
- # Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe
- \$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Die Werte zweier aufeinander folgender Tage wurden jeweils gemittelt und die so erhaltenen Leistungen für die Berechnung der Signifikanzen verwendet. Alle mit Bleomycin behandelten Tiere zeigten durchgehend schlechtere Leistungen als zum Kontrollzeitpunkt. An Tag 4/7 nach Bleomycingabe erwies sich dabei die Laufleistung der Bleomycingruppe statistisch signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0,012$ ). Dies war auch an Tag 16/19 bei einer Signifikanz von  $p=0,04$  der Fall, ebenso an Tag 22/25 nach Bleomycingabe ( $p=0,001$ ). Auch zwischen der Kontroll- und der Versuchstier-Gruppe, die ab Tag 13 Simvastatin erhalten hatte, zeigte sich an Tag 16/19 ein statistisch signifikanter Unterschied in der Leistungsfähigkeit ( $p=0,011$ ). Obwohl auch die Laufleistung der Tiere, die bereits ab dem ersten Tag mit Simvastatin behandelt wurden, schlechter war als die der Kontrolltiere, ergaben sich hier keinerlei

statistische Signifikanzen; ferner erbrachten die Tiere der Simvastatin Tag 1-Gruppe durchgehend bessere Laufleistungen als die Bleomycin- und die Simvastatin Tag 13-Gruppe, allerdings auch hier ohne statistisch signifikante Unterschiede.

### 3.1.2. Versuchstier-Endgewicht

Das Endgewicht der Tiere wurde bestimmt, um eine generelle, z.B. medikamentös bedingte Gewichtszunahme, die sich auch auf die Organgewichte von Herz und Lunge auswirken würde, auszuschließen.



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

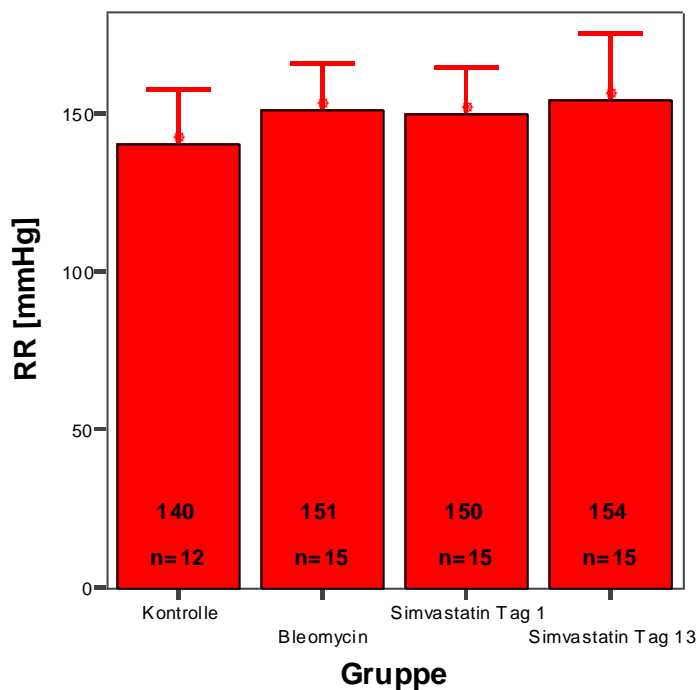
Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Endgewichten der einzelnen Versuchstier-Gruppen.

### 3.2. Hämodynamische und funktionelle Studienergebnisse der einzelnen Untersuchungsgruppen

#### 3.2.1 Systolischer Blutdruck

Um etwaige Veränderungen an Herz und Lunge auf die pulmonale Hypertonie zurückführen zu können, musste ein systemischer Hypertonus ausgeschlossen werden, was durch Messung des systolischen Blutdruckwertes geschah.

#### Systolischer Blutdruck



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Zwischen den einzelnen Gruppen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem systolischen Blutdruck der Versuchstier-Gruppen gefunden.

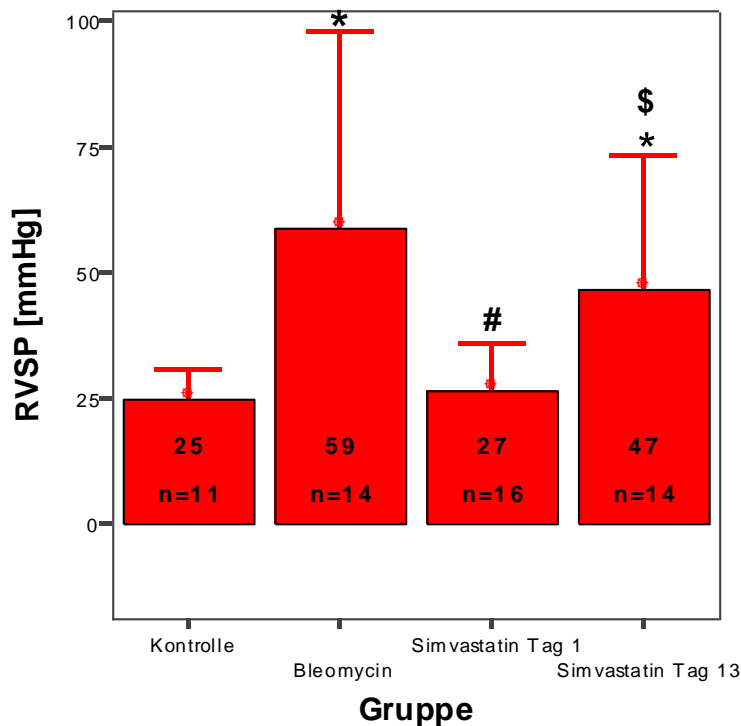
#### 3.2.2. Rechtsventikulärer Blutdruck (RVSP)

Die Messung des RVSP wurde vorgenommen als Maß für die Ausprägung der pulmonalen Hypertonie auf Basis der Lungenfibrose. Nur Ergebnisse der Tiere,



bei denen der RVSP ermittelt werden konnte, wurden für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

### Rechtsventrikulärer systolischer Druck



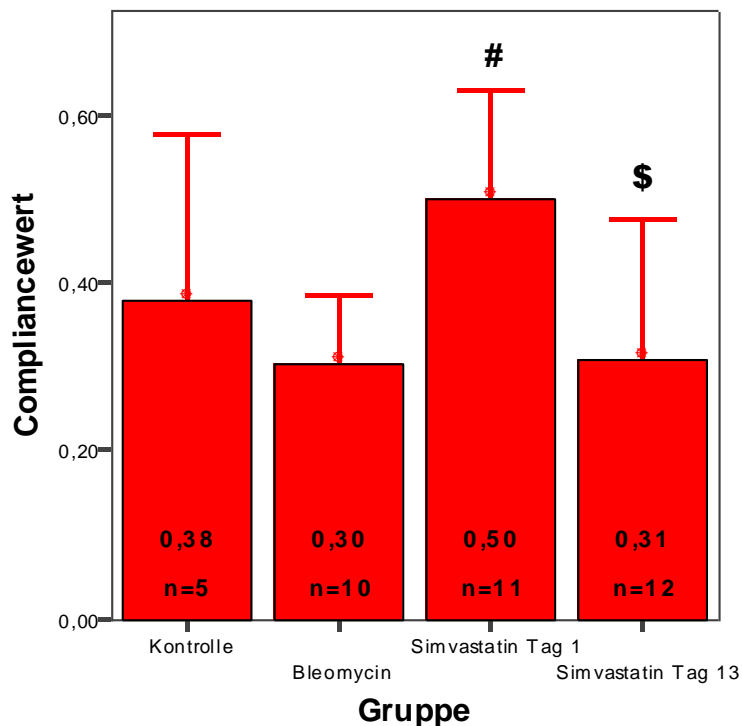
- \* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe
- # Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe
- \$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Als statistisch hochsignifikant erwies sich der Unterschied im RVSP der Bleomycingruppe im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,001$ ) und zur Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Auch bei den Tieren der Simvastatin Tag 13-Gruppe zeigte sich ein statistisch signifikant höherer RVSP in Bezug sowohl zur Kontroll- ( $p = 0,001$ ) als auch zur Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p = 0,001$ ). Die Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Simvastatin Tag 1-Gruppe sowie der Bleomycin- und der Simvastatin Tag 13-Gruppe erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

### 3.2.3. Compliance

Die Compliance wurde bestimmt als Maß für die Dehnbarkeit des Lungengewebes, woraus auf die Ausprägung der Fibrose geschlossen werden konnte.

#### Compliance



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

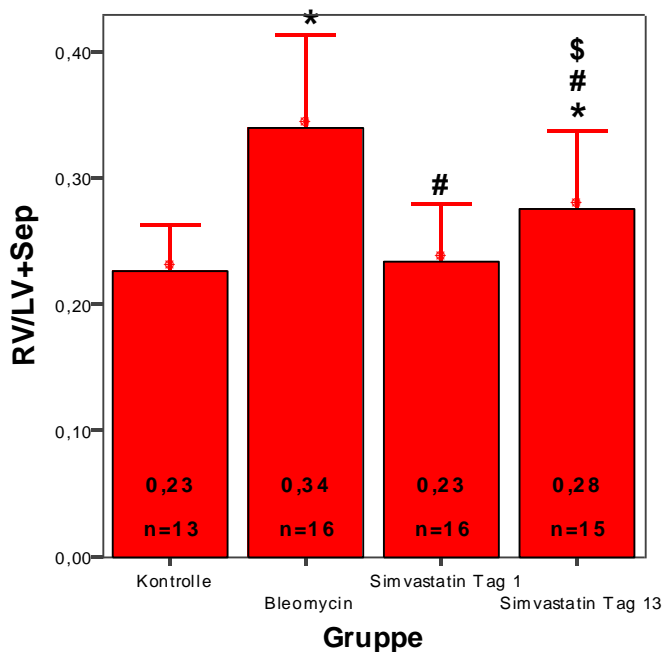
\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

In Bezug zur Simvastatin Tag 1-Gruppe zeigten die Tiere der Bleomycin-Gruppe eine statistisch signifikant niedrigere Compliance der Lunge ( $p=0,002$ ). Ferner war die Compliance in der Simvastatin Tag 1-Gruppe signifikant ( $p=0,012$ ) höher im Vergleich zur Simvastatin Tag 13-Gruppe.

### 3.2.4. Herzquotientenbestimmung

Als Herzquotient wurde das Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels (RV) zum Gewicht des linken Ventrikel (LV) + Septum (Sep) festgelegt, um das Ausmaß der rechtsventrikulären Hypertrophie zu bestimmen. Ferner kann man mit dem Quotienten Rückschlüsse auf die Ausprägung der pulmonalen Hypertonie ziehen.

**Rechtsventrikuläres Gewicht / Gewicht linker Ventrikel und Septum**



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

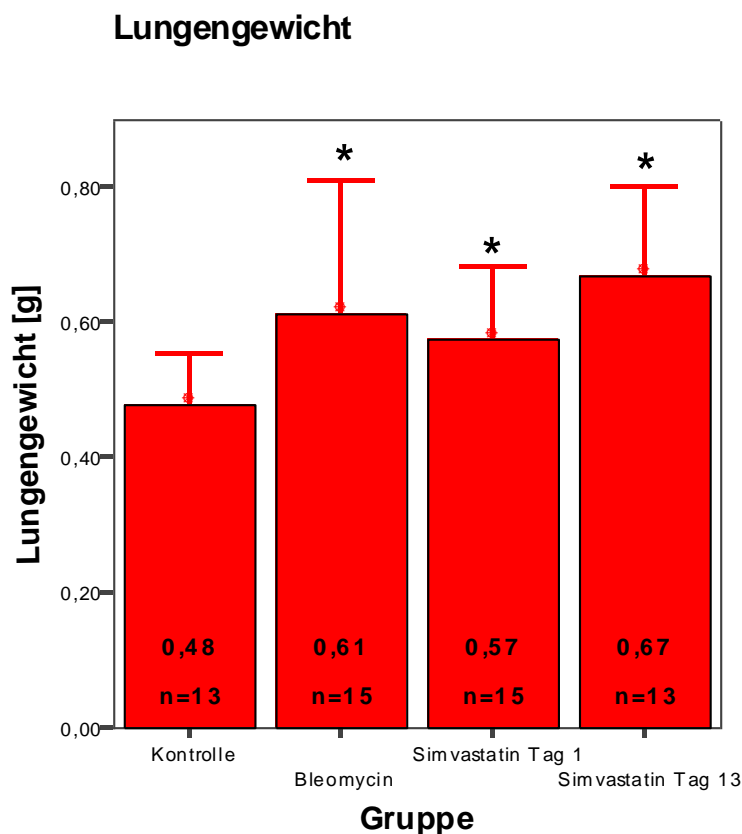
\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit statistisch hochsignifikantem Unterschied sowohl im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,001$ ) als auch zur Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p < 0,001$ ) zeigten die Versuchstiere, die nach Bleomycingabe keinerlei Simvastatin erhalten hatten. Ferner erwiesen sich die jeweiligen Herzquotienten der Simvastatin Tag 13-Gruppe statistisch signifikant

höher als die der Kontroll- ( $p=0,032$ ) und der Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p=0,036$ ) und niedriger als die der Bleomycingruppe ( $p=0,010$ ).

### 3.3. Lungengewicht

Im Rahmen der Fibrose kommt es zur Gewebeerneuerung innerhalb der Lunge. Die Lungengewichte wurden bestimmt, um einen weiteren Marker für das Ausmaß der Lungenfibrose zu untersuchen.



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

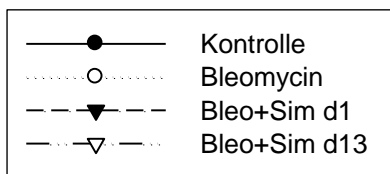
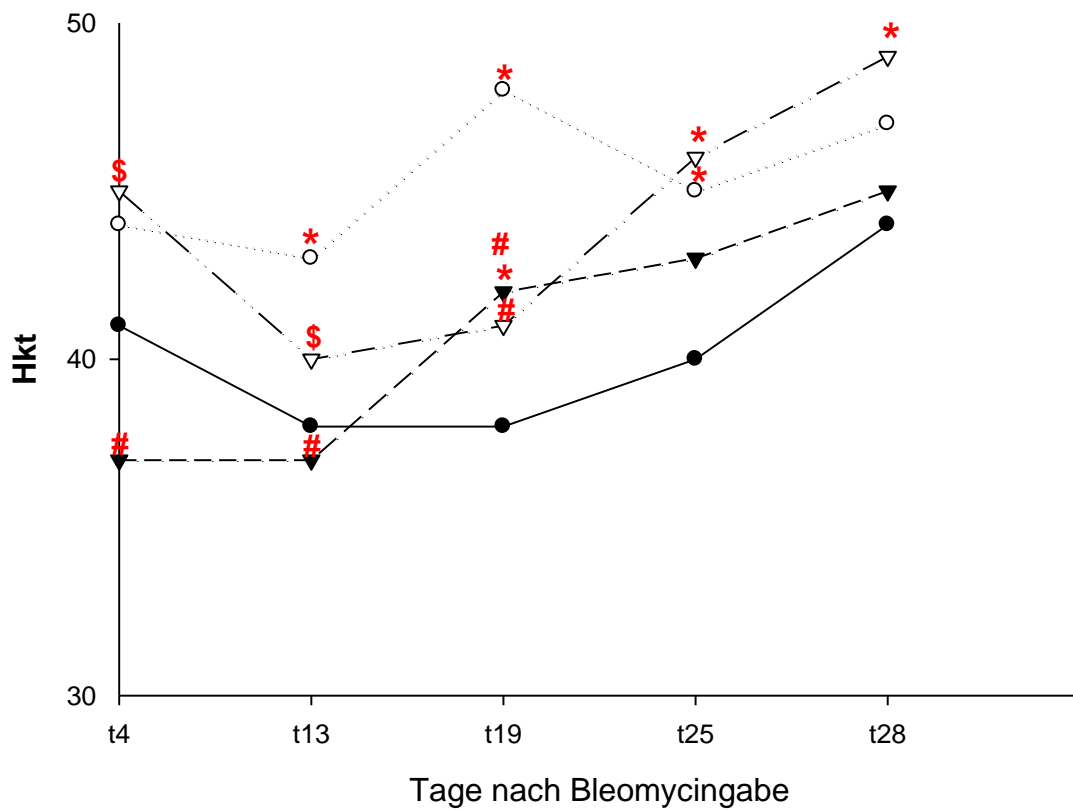
Die Lungengewichte waren im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen statistisch signifikant höher, wobei sich im einzelnen Signifikanzen von  $p=0,026$  in der Bleomycingruppe,  $p=0,005$  in der Simvastatin Tag 1-Gruppe und eine hohe Signifikanz von  $p<0,001$  in der Simvastatin Tag 13-Gruppe zeigten.

### 3.4. Laborchemische und molekularpathologische Versuchsergebnisse im Untersuchungsverlauf

#### 3.4.1. Hämatokrit

Der Hämatokrit wurde bestimmt als Marker für eine zunehmende Erythrozytenproduktion auf Basis der fibrosebedingten Hypoxie.

Hämatokrit im Verlauf



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

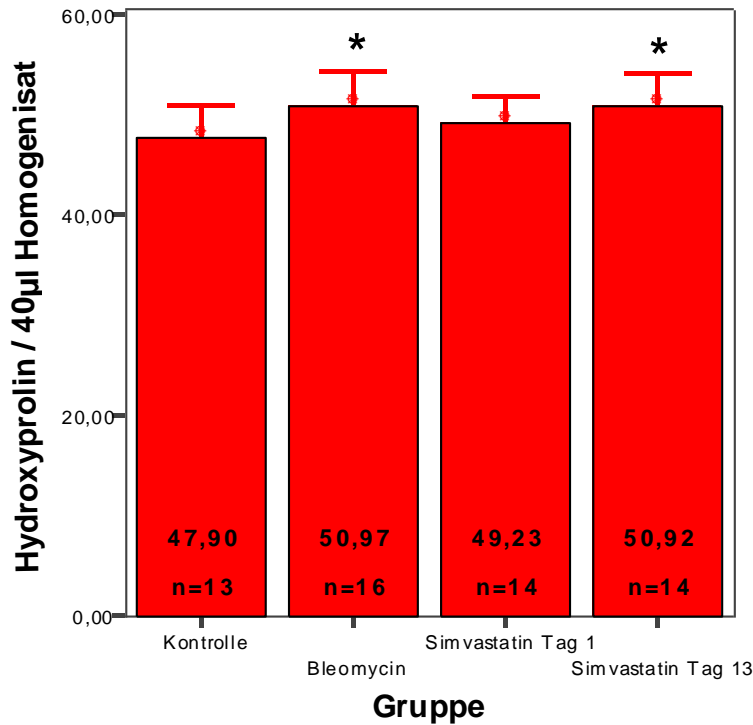
\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Bereits an Tag 4 nach Bleomycingabe fand sich in Bezug zur Kontrolle ein höherer Hämatokrit bei der Bleomycingruppe. Beginnend mit Tag 13 erreichte diese Erhöhung eine statistische Signifikanz ( $p=0,013$ ). Auch an Tag 28 war der Hämatokrit der Bleomycintiere höher als der der Kontrolle, verfehlte jedoch die statistische Signifikanz ( $p=0,059$ ). Ebenfalls wiesen die Tiere der Simvastatin Tag 13-Gruppe durchgehend höhere Hämatokritwerte auf als die Kontrollgruppe; dabei zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede an Tag 25 ( $p=0,006$ ) und Tag 28 ( $p=0,047$ ). Die Werte der Simvastatin Tag 1-Gruppe waren an den Tagen 4, 13 und 19 niedriger als die der Bleomycin- und die der Simvastatin Tag 13-Gruppe, im letzteren Fall mit Ausnahme von Tag 19. Zwischen der Simvastatin Tag 1-Gruppe und der Bleomycingruppe zeigten sich statistische Signifikanzen an Tag 4 ( $p=0,002$ ), Tag 13 ( $p=0,006$ ) und an Tag 19 ( $p=0,002$ ) nach Bleomycingabe; zwischen der Simvastatin Tag 1-Gruppe und der Simvastatin Tag 13-Gruppe erwiesen sich die Unterschiede an Tag 4 ( $p=0,003$ ) und an Tag 13 ( $p=0,034$ ) als statistisch signifikant. Mit Ausnahme von Tag 19 fanden sich weder Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p=0,011$  an Tag 19), noch zwischen der Bleomycin- und der Simvastatin Tag 13-Gruppe ( $p=0,001$ ).

#### 3.4.2. Hydroxyprolinegehalt

Die Messung der Konzentration des Hydroxyprolins wurde zur Quantifizierung der bleomycininduzierten Lungenfibrose durchgeführt.

## Hydroxyprolinkonzentration



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

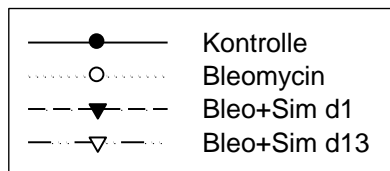
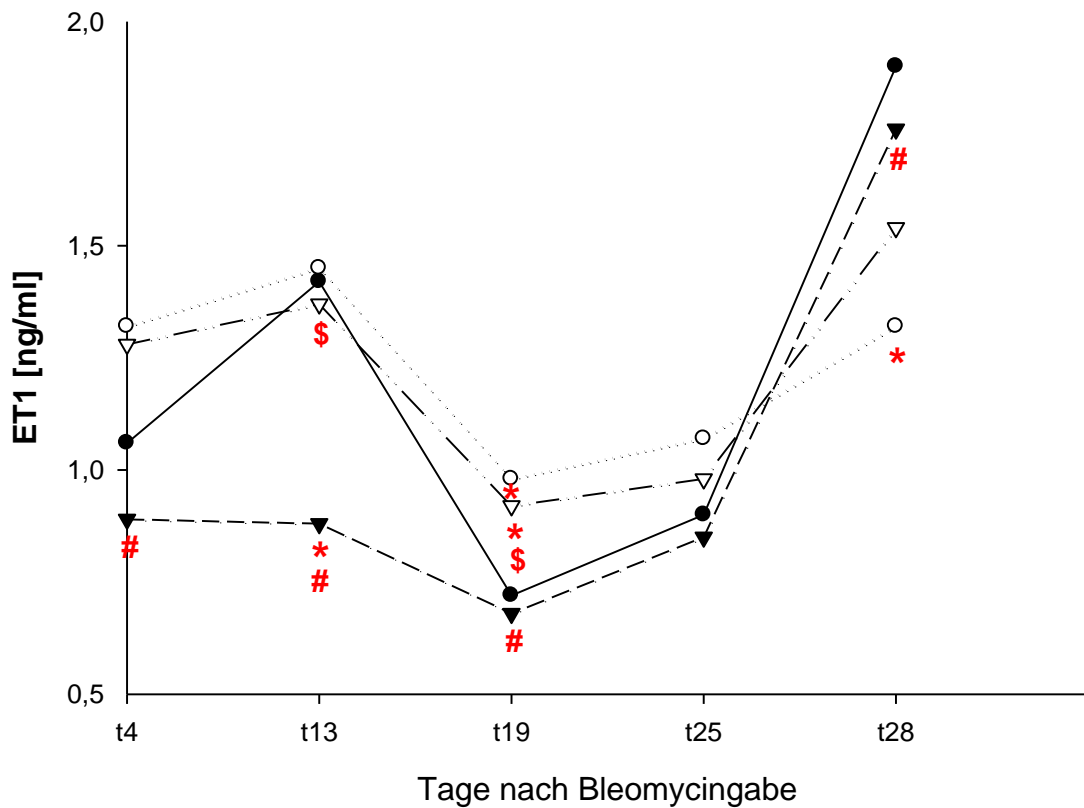
\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Verglichen mit der Kontrollgruppe kam es sowohl in der Bleomycin- ( $p=0,024$ ) als auch in der Simvastatin Tag 13-Gruppe ( $p=0,008$ ) zu einer signifikanten Erhöhung der Hydroxyprolin-Konzentration.

### 3.4.3. Endothelin1-Spiegel

Die Plasmakonzentration von Endothelin1 (ET1) wurde bestimmt als Parameter für endotheliale Dysfunktion und als Proliferationsmarker.

## Endothelin1-Plasmakonzentration



\* Signifikanz in Bezug zur Kontrollgruppe

# Signifikanz in Bezug zur Bleomycingruppe

\$ Signifikanz in Bezug zur Simvastatin-Tag1-Gruppe

Mit Beginn an Tag 4 bis hin zu Tag 25 nach Bleomycingabe war die ET1-Konzentration der Tiere der Bleomycingruppe höher als die der Kontrolle und zeigte an Tag 19 auch eine statistische Signifikanz von  $p=0,01$ . An diesem Tag fanden sich ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration von ET1 in der Simvastatin Tag 13-Gruppe als bei den Kontrolltieren ( $p=0,028$ ). Bis Tag 19 nach Bleomycingabe war die ET1-Konzentration der Simvastatin Tag 1-Gruppe



im Vergleich zur Bleomycingruppe durchgehend statistisch signifikant niedriger; dabei zeigten sich im einzelnen Signifikanzwerte von  $p=0,037$  an Tag 4,  $p=0,001$  an Tag 13 und  $p=0,004$  an Tag 19. Ebenfalls statistisch signifikant niedriger war die ET1-Konzentration an Tag 13 in der Simvastatin Tag 1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ( $p=0,009$ ); hier fand sich ein ungewöhnlich hoher Peak bei den Kontrolltieren. Schließlich zeigten die Lungen der Simvastatin Tag 13-Gruppe an den Tagen 13 ( $p=0,001$ ) und 19 ( $p=0,012$ ) signifikant höhere ET1-Werte als die der Simvastatin Tag 1-Gruppe. An Tag 25 nach Verabreichung des Bleomycins begannen sich die Werte einander anzunähern und nahmen an Tag 28 umgekehrte Verhältnisse an, sprich die Kontroll- und die Simvastatin Tag 1-Gruppe zeigten höhere ET1-Konzentrationen als die Bleomycin- und die Simvastatin Tag 13-Gruppe; diese waren im Fall der Kontroll- und der Bleomycingruppe ( $p=0,006$ ) und zwischen der Bleomycin- und der Simvastatin Tag 1-Gruppe ( $p=0,028$ ) signifikant.

## 4. Diskussion

Unbehandelt zum Tode führend, gehört die Lungenfibrose als interstitielle Erkrankung zu den schwerwiegendsten pneumologischen Krankheitsbildern. Nicht nur quantitativ durch eine verminderte Lebenserwartung (2), sondern auch qualitativ durch starke Einschränkungen bei der Bewältigung des Alltagslebens durch Dyspnoe, Husten und eine relevante Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit beeinträchtigt diese Krankheit den Erkrankten (1). Die Ausprägung der klinischen Symptome korreliert dabei gut mit dem radiologischen Bild und der Lebenserwartung der Patienten. Ein gutes Zusammenspiel von Pneumologie, Radiologie, aber auch Pathologie, wo eine histologische Sicherung der Lungenfibrose erfolgen kann, ist daher erforderlich, um die Diagnose möglichst frühzeitig stellen und die Behandlung einleiten zu können (5). Eine nicht minder große Rolle spielt die Grundlagenforschung, deren Resultate neue Behandlungswege aufzeigen können.

### 4.1. Induktion der Lungenfibrose im Tiermodell

#### 4.1.1. Induktion der Lungenfibrose mit Bleomycin

Bis heute konnte keine genaue Ursache für die Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose gefunden werden. Dennoch wurden diverse Faktoren identifiziert, die die Entwicklung dieser Erkrankung bewirken können. Von diesen konnten einige auch als Methode zur Induktion der pulmonalen Fibrose im Tiermodell etabliert werden. So sind an dieser Stelle die Schädigung des Lungenparenchyms durch Strahlung, Silicium und Asbest, ferner genetische Veränderungen an Tieren zu nennen. Zudem werden zahlreiche Medikamente wie z.B. Amiodaron, Cyclophosphamid, Penicillamin, Procainamid, Gold, Nitrofurantoin und insbesondere Bleomycin mit der Entstehung der Lungenfibrose in Zusammenhang gebracht (64). Unter den letztgenannten ist Bleomycin dasjenige Medikament, welches sich in der tierexperimentellen Induktion der pulmonalen Fibrose bewährt hat und auch als Standardmethode zur Induktion der Lungenfibrose gilt.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Bleomycinmodell für die experimentelle Induktion der Lungenfibrose und der daraus resultierenden pulmonalen Hypertonie der Ratte verwendet. Hierzu wurde den Versuchstieren einmalig 2,5 U/kg Körpergewicht (1Unit=1mg) Bleomycin intratracheal verabreicht.

Die intratracheale Gabe stellt im Hinblick auf das Bleomycinmodell den am häufigsten gewählten Applikationsweg dar. Daneben sind sowohl die intravenöse wie auch die intraperitoneale Verabreichungsform möglich. Das Bleomycinmodell birgt zahlreiche Vorteile im Tierversuch: da es bereits seit den Siebziger Jahren in zahlreichen Studien verwendet wird, konnte mittlerweile für jede der üblichen Versuchstierspezies die Medikamentendosis ermittelt werden, die zuverlässig zur Entwicklung der Lungenfibrose führt. Alle genannten Applikationsweisen sind einfach durchführbar, allenfalls ist eine kurze Narkotisierung der Tiere nötig. Ferner kann bei diesen Applikationswegen davon ausgegangen werden, dass das Versuchstier auch die erforderliche Dosis erhält. Des Weiteren genügt eine einmalige Verabreichung des Medikaments zur Ausbildung einer subchronischen Lungenfibrose, wiederholte Gaben können eine länger währende Fibrose bewirken (45). Bekannt ist auch der zeitliche Ablauf der verschiedenen Phasen, die bei der Entwicklung der pulmonalen Fibrose nach Instillation mit Bleomycin durchlaufen werden: nach Durchlaufen der initialen entzündlichen Phase, beginnt in etwa ab Tag 9 nach Bleomycingabe die fibrotische Phase, wobei Fibrosemarker wie Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 und Procollagen-1 an Tag 14 die höchsten Spiegel zeigen und zu diesem Zeitpunkt von einer vollständig ausgebildeten Fibrose ausgegangen werden kann (40). Dieses Wissen macht letztlich auch eine Trennung zwischen einem prophylaktischen und einem therapeutischen Ansatz möglich.

Nachteilig ist, dass die Bleomycin induzierte Lungenfibrose nicht zwingend mit einer Chronifizierung der Erkrankung einhergeht, während die idiopathische Lungenfibrose eine fortschreitende Erkrankung darstellt. Nach Tag 21 nach Bleomycingabe konnte beobachtet werden, dass charakteristische Fibroseparameter wie der Hydroxyprolinegehalt der Lunge oder auch

histopathomorphologische Parameter sich rückläufig zeigen oder sogar wieder dem Ausgangsniveau entsprechen können (46). Dies kann Schwierigkeiten bei der korrekten Festlegung des Versuchsendes bereiten.

Auch kann bei der intratrachealen Gabe keine gleichmäßige Verteilung von Bleomycin gewährleistet werden. Dies mag zur Ausbildung eines unterschiedlichen Grads der pulmonalen Fibrose in einzelnen Lungenabschnitten führen. Werden bestimmte Abschnitte nun für unterschiedliche anatomische und physiologische Untersuchungen verwendet, wie auch im Studiendesign, das dieser Arbeit zugrunde liegt, vorgesehen, sind die Ergebnisse dahingehend kritisch zu betrachten.

Wichtigster Kritikpunkt des Bleomycinmodells ist jedoch, dass es sich hierbei um ein konkretes Ereignis handelt, das zur Entwicklung der Lungenfibrose führt, während im Hinblick auf die idiopathische pulmonale Fibrose keine Ursache eruierbar ist. Die Bleomycin induzierte und die idiopathische Lungenfibrose können nicht gleich gesetzt, die Ergebnisse der Bleomycinstudien nicht ohne Weiteres auf Ursache, Entwicklung, Prophylaxe oder Behandlung der idiopathischen Lungenfibrose übertragen werden.

#### 4.1.2. Induktion der Lungenfibrose mit Nanopartikeln

Eine weitere Methode zur Induktion der Lungenfibrose im Tiermodell ist die Exposition der Versuchstiere gegenüber Asbest oder ähnlichen Nanopartikeln. Es ist bekannt, dass nicht organische Nanopartikel wie Asbest neben ihrem kanzerogenen Effekt und der Induktion von pleuralen Plaques und pleuraler Fibrosierung auch eine Fibrose des Lungenparenchyms selbst bedingen können, dies wurde in Versuchen an Ratten demonstriert (65). Applikationswege sind hierbei entweder die Inhalation, die der natürlichen Exposition gegenüber Asbest entspricht, oder die direkte Verbringung des Agens intratracheal. Auch eine intraperitoneale Gabe ist möglich. Wie im Bleomycinmodell konnten auch nach Verabreichung von Nanopartikeln entzündliche und fibrotische Reaktionen der Lunge beobachtet werden (66). Die chemische Struktur der Nanopartikel verursacht bei der Applikation jedoch gewisse Schwierigkeiten. Insbesondere die Neigung zur Bildung von

Konglomeraten hat sich hierbei als hinderlich erwiesen. Elektrostatische Reaktionen können dazu führen, dass sich Nanopartikel verbinden und aufgrund ihrer Größe nicht mehr inhaliert werden können (66). Ohnehin ist bei der Applikation mittels Inhalation nur schwer auf die wirklich resultierende Organdosis zu schließen, da die aufgenommene Substanzmenge u.a. von Atemfrequenz und Atemvolumen abhängt und diese nicht nur zwischen den einzelnen Spezies, sondern auch zwischen den einzelnen Tieren und sogar intraindividuell schwanken. Auch bei der intratrachealen Bolusapplikation kann es zum Verklumpen der Teilchen kommen, was eine gleichmäßige Verteilung in den distalen Luftwegen und damit die Induktion einer möglichst das gesamte Interstitium einnehmenden Fibrose verhindern kann (67, 68). Bis heute konnte kein konkretes Regime entwickelt werden, mit dem sicher die Induktion der Lungenfibrose durch Nanopartikel herbeigeführt wird. So ist dieser Ansatz in Zusammenschau der Erkenntnisse zum aktuellen Zeitpunkt dem Bleomycinmodell als unterlegen einzuordnen.

#### 4.1.3. Induktion der Lungenfibrose durch Bestrahlung

Des Weiteren steht zur Induktion der pulmonalen Fibrose der Einsatz von Bestrahlung zur Verfügung. Es ist bekannt, dass es nach Strahlentherapie im Rahmen der Behandlung des Lungen- oder des Mammakarzinoms wie auch des Ösophaguskarzinoms, mediastinaler Tumoren und Tumoren im Kopf- und Halsbereich zu fibrotischen Veränderungen der Lunge kommen kann. Dabei wurde am Menschen beobachtet, dass es zunächst in einem Zeitraum von in etwa 4-12 Wochen nach abgeschlossener Bestrahlung zur Entwicklung einer Pneumonitis kommt, ab 6-24 Monaten nach Radiatio können fibrotische Veränderungen beobachtet werden (69). So konnte an Ratten gezeigt werden, dass mit einer einmaligen Strahlendosis von 18 Gy eine pulmonale Fibrose induziert werden kann (70). Mit Hilfe von C57BL/6J-Mäusen konnte demonstriert werden, dass nach einer einmaligen Bestrahlung mit 24 Gy signifikant mehr Tiere eine Lungenfibrose ausbilden, als nicht bestrahlte, was zum einen an histopathomorphologischen Kriterien wie auch an einem signifikant höheren Vorkommen des profibrotischen Markers TNF- $\beta$

festgemacht werden konnte (71). Auch nach einer Bestrahlung mit 20Gy konnte ebenfalls anhand von C57BL/6J-Mäusen die Induktion von Lungenfibrose erreicht werden (72). Versuche an C57BL/6J-Mäusen gelten bei der Induktion der Lungenfibrose durch Bestrahlung als Standardmethode. Die Vorteile liegen hier wie auch beim Bleomycinmodell in einer sicheren Entwicklung der Fibrose. Dies gilt bis dato jedoch lediglich für die genannten C57BL/6J-Mäuse; Studien mit anderen Versuchstieren liegen – im Gegensatz zum Bleomycinmodell – nur vereinzelt vor. Nachteilig ist auch, dass der Zeitrahmen für die Fibroseinduktion durch Bestrahlung wesentlich länger angesetzt werden muss, histologisch sind fibrotische Veränderungen in etwa nach 12, radiologisch in etwa nach 16 Wochen nachweisbar, während wie oben beschrieben ein Anstieg fibrotischer Marker im Bleomycinmodell bereits 2 Wochen nach Instillation beobachtet werden kann (72). Ferner gilt auch hier, was in Hinsicht auf das Bleomycinmodell erläutert wurde: Strahlung ist ein konkretes Ereignis, dass zur Entwicklung einer pulmonalen Fibrose führt, die Ursache der idiopathischen Lungenfibrose ist nicht geklärt – Ergebnisse können daher auch in diesem Fall nicht eins zu eins übertragen werden.

#### 4.2. Erfahrungen mit Leistungsmessungen am Tiermodell und Anwendung bei interstitieller Fibrose

Die idiopathische pulmonale Fibrose ist eine Erkrankung, die die Lebenserwartung wie auch die Lebensqualität negativ beeinflusst. Dabei stellt Dyspnoe das Hauptsymptom dar. Sie tritt zunächst unter körperlicher Belastung und bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung auch in Ruhe auf und führt somit nach und nach zu einer Abnahme der Leistungsfähigkeit der Patienten (73). Zur Leistungserfassung am Menschen hat sich im Rahmen kardiopulmonaler Erkrankungen, wie auch der idiopathischen Lungenfibrose und der aus ihr resultierenden pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzinsuffizienz, die Messung der Gehstrecke in einem Zeitraum von sechs Minuten, die so genannte six-minute-walk-distance, bewährt. Dabei werden die Abnahme der zurückgelegten Distanz sowie eine Abnahme der Sauerstoffsättigung während der Leistungserfassung als Prognosefaktoren

angesehen (74). Auch im Tierversuch kann die Leistungsfähigkeit bei kardiopulmonalen Erkrankungen gemessen werden. Hierzu wurde in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie das Laufbandmodell verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere, bei denen mit Hilfe von Bleomycin eine Lungenfibrose induziert wurde, eine signifikant niedrigere Laufleistung erbrachten als gesunde Tiere der Kontrollgruppe. Ferner wurde am Ende der Studie sowohl für die prophylaktisch wie auch für die therapeutisch mit Simvastatin behandelten Tiere im Vergleich zur Bleomycingruppe wieder eine statistisch signifikant bessere Laufleistung beobachtet. Das Laufbandmodell hat sich bereits in einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe bewährt: hier konnte die Wirksamkeit der prophylaktischen Applikation von Bosentan im Bleomycinmodell demonstriert werden – die Bleomycingruppe zeigte eine signifikante Abnahme der Laufleistung im Vergleich sowohl zur Kontrollgruppe als auch zur Bosentan-Gruppe, während sich die Laufleistung der Bosentan- und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschieden (75). Das Laufbandmodell wurde auch in anderen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt. So konnte gezeigt werden, dass nach Induktion einer Herzinsuffizienz mittels Myokardinfarkt, die Laufleistung von Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe abnahm, dagegen Tiere, die eine Behandlung mit YM598, einem selektiven Endothelin-A-Antagonisten erhielten, im weiteren Verlauf eine bessere Laufleistung als die unbehandelten Versuchstiere erbrachten (76). Das Laufbandmodell wurde in der Literatur auch verwendet, um die Leistungsfähigkeit von Mäusen zu testen, bei denen mittels Aldosteroninfusion eine systemische Hypertonie und eine daraus folgende Linksherzhypertrophie und Herzinsuffizienz induziert worden war. Es konnte eine signifikant bessere Laufleistung bei den Tieren der Kontrollgruppe demonstriert werden (77). Insgesamt ist das Laufbandmodell ein etabliertes Verfahren zur Leistungsmessung in Studien zu Störungen des Herz-Kreislauf-Systems (78-81).

Eine weitere Methode zur Leistungserfassung im Tiermodell stellt das Schwimmbeckenmodell dar, das u.a. von Wunderlich et al. beschrieben wurde: Hierbei verwendete man *cav-1ko*-Mäuse, die aufgrund eines Mangels an

Caveolin 1 eine schwere Lungenfibrose sowie pulmonale Hypertonie entwickeln, als Versuchstiere. Da angenommen wird, dass der Caveolin 1-Defekt zu einer Überaktivierung des NO-Systems führt, wurde die körperliche Belastbarkeit von cav-1ko-Mäusen, bei denen die NO-Produktion mit NG-Nitro-L-Argininmethylester inhibiert wurde, mit der nicht behandelten Tiere sowie mit Wild-Typ-Mäusen verglichen. Hierzu wurden die Tiere in ein 4 Liter fassendes Schwimmbecken gelegt und die Zeit gemessen, die das jeweilige Tier sich an der Wasseroberfläche halten konnte. Hierbei zeigten die Wild-Typ-Mäuse eine signifikant höhere Leistungsfähigkeit im Vergleich zu den cav-1ko-Mäusen, deren Belastbarkeit aber wiederum durch die Applikation von NG-Nitro-L-Argininmethylester gesteigert werden konnte (82). Zwar ist die Erhebung der körperlichen Belastbarkeit mit Hilfe des Schwimmbeckenmodells möglich, kritisch anzumerken ist jedoch, dass die Versuchstiere hierbei durch die insgesamt unnatürliche Situation einem erhöhten Stresslevel ausgesetzt werden; so konnte das Schwimmbeckenmodell zum einen in Untersuchungen zum chronischen Fatigue-Syndrom etabliert werden (83, 84); zum anderen wurde demonstriert, dass Wiederholungen dieses Tests bei Mäusen zu Verhaltensänderungen mit Entwicklung von Angststörungen und depressiven Symptomen führt (85, 86).

So ist das Laufbandmodell als zuverlässige Methode zur Leistungserfassung der Vorzug zu geben. Die Leistungserfassung ist vergleichsweise einfach durchzuführen und zu bewerten. Die Versuchstiere werden keinem psychischen Stress zugeführt, der die Erfassung der physischen Leistungsfähigkeit verfälscht. Insgesamt stellt das Laufbandmodell zum heutigen Zeitpunkt das Standardverfahren zur Leistungserfassung im Tiermodell dar.

#### 4.3. Vergleich von Methoden und Ergebnissen zu funktionellen

##### Untersuchungen bei Lungenfibrose am Tiermodell

Nach Erhebung der korrekten Diagnose stellt sich die Frage nach Einstufung der Schwere der Erkrankung, eng verbunden mit der Prognose des Patienten. Dabei spielen, wie auch bei der Diagnosefindung, klinische, radiologische und



histopathologische Parameter eine wichtige Rolle. Aber auch funktionelle Tests zeigen prognostische Relevanz.

Es konnte gezeigt werden, dass die Schwere der Dyspnoe, die mit Hilfe geeigneter Scores, wie z.B. dem Medical Research Chronic (MRC) chronic dyspnea score erhoben, Rückschlüsse auf die oben genannten Punkte erlaubt; je ausgeprägter die Dyspnoe, desto schlechter die Prognose (87). Es ist bekannt, dass die Leistungsfähigkeit – gemessen mit Hilfe des 6-Minuten-Gehtests – als Prognosefaktor für die Lebenserwartung dienen kann und man von dieser ferner auch auf die Schwere der Erkrankung schließen kann (88). Besonders aussagekräftig erscheint dabei das Ausmaß der Abnahme der Sauerstoffsättigung unter Belastung zu sein (89).

Physiologische Parameter, die mit Hilfe von Lungenfunktionstests erhoben werden können, spielen bei der Ermittlung der Schwere der Erkrankung sowie der Lebenserwartung dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Dabei wird der forcierten expiratorischen Vitalkapazität (FVC) und der Diffusionskapazität von Kohlenmonoxid (DLCO) der höchste Stellenwert zugeschrieben, wobei auch diese in der Literatur unterschiedlich gewertet werden. So wurden in der INSPIRE-Studie, in der insgesamt 1373 Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose Aufnahme fanden, keine wesentlichen Veränderungen hinsichtlich der FVC und der DLCO gefunden; auch die IFIGENIA-Studie erklärte die DLCO als prognostisch nicht geeignet. Dagegen konnten Flaherty et al. zeigen, dass die FVC als ein eigenständiger Prognosefaktor gesehen werden kann, nicht aber die DLCO (90). Dagegen ist seit langem bekannt, dass der Grad der Lungencompliance auf die Ausprägung der Lungenfibrose schließen lässt (91). Die Messung der Lungencompliance ist dabei ein etabliertes, wenn auch aufgrund der Invasivität der Prozedur nicht regelmäßig eingesetztes Werkzeug zur Evaluierung der Schwere der Erkrankung im klinischen Alltag (92).

Während die Messung von Parametern wie der FVC oder der totalen Lungenkapazität (TLC) sich am Tiermodell schwierig gestaltet, kann die Compliance zuverlässig gemessen werden, wie auch in unserer Studie ex vivo erfolgt. Wir konnten zeigen, dass die prophylaktische Gabe von Simvastatin zu

einer signifikant höheren Lungencompliance der Versuchstiere führt im Vergleich zu denjenigen Versuchstieren, bei denen eine Lungenfibrose mittels Bleomycin induziert wurde. Wurde Simvastatin dagegen in therapeutischer Absicht mit Beginn an Tag 13 verabreicht, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dieser Gruppe und der Bleomycingruppe. Dafür aber zeigten die Tiere der Simvastatin Tag 13 Gruppe eine signifikant niedrigere Compliance als die der Simvastatin Tag 1 Gruppe. Somit konnte wiederum gezeigt werden, dass eine prophylaktische Gabe von Simvastatin einen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Lungenfibrose hat, jedoch nach Ausbildung dieser Erkrankung nicht zu ihrer Behandlung beizutragen vermag. Die Messung der Compliance ist auch in vivo an Ratten möglich; die Ergebnisse korrelieren dabei mit histologischen Ergebnissen (93).

Zudem erscheint die Erfassung der Leistungsfähigkeit auch im Tiermodell für die Evaluierung der interstiellen Lungenfibrose vor und während Ihrer Behandlung nützlich zu sein; was auch in unserer Studie erfolgt ist und worauf unter 4.2.1. näher eingegangen wurde. Ein besonderes Augenmerk sollte für eine genaue Beurteilung der Fibrose im Rahmen von Tests zur Leistungserfassung in zukünftigen Studien auch am Tiermodell auf die Messung der Sauerstoffsättigung unter Belastung gelegt werden.

#### 4.4. Möglichkeiten der makroskopischen und mikroskopischen Evaluierung interstitieller Lungenfibrosen vor und während ihrer Behandlung

Was den Fibrosepatienten zum Arzt führt, sind zumeist klinische Symptome wie Dyspnoe, Husten und Leistungsabnahme, denen eine Vielzahl von Erkrankungen zugrunde liegen kann. Im Rahmen einer genauen körperlichen Untersuchung können die charakteristischen Trommelschlägelfinger auffallen sowie auskultatorisch die Fibrose typischen trockenen endinspiratorischen Rasselgeräusche, insbesondere in den basalen Lungenabschnitten. Im fortgeschrittenen Zustand der Erkrankung können auch Zyanose und periphere Ödeme beobachtet werden, zudem kann der zweite Herzton akzentuiert

erscheinen (94). Diese rein klinischen Merkmale allein reichen heute jedoch nicht aus für die Diagnosestellung einer interstitiellen Fibrose. Einen besonderen Stellenwert hat in den letzten Jahren die hochauflösende Dünnschicht-Computertomographie gewonnen, mit deren Hilfe fibrosetypische Veränderungen der Lunge wie die Bildung von so genannten Honigwaben, Verdickung der Lungensepten, Traktionsbronchiektasen sowie milchglasartige Verschattungen erkannt werden können (95). Als zur Diagnose führender Goldstandard gilt nach wie vor die offene oder thorakoskopische Lungenbiopsie und anschließende histopathologische Untersuchung mit einer Sensitivität von 62% und einer Spezifität von 97%. Allerdings erreicht auch die Diagnosestellung allein mit Hilfe klinischer Parameter eine Sensitivität von 48% bei einer Spezifität von 89%, so dass wenn die Klinik mit radiologischen Parametern kombiniert wird eine zuverlässige Diagnose gestellt werden kann. Insgesamt erscheint im Vergleich zu anderen Erkrankungen auch die Sensitivität der histologischen Untersuchung eher schwach; eine Erklärung hierfür wird darin gesehen, dass im Rahmen einer Biopsie stets nur ein kleiner Teil der Lunge untersucht wird; befällt die Lungenfibrose nicht die gesamte Lunge gleichmäßig, ist das Biopsat daher nicht zwingend repräsentativ (96, 97). Interessant wäre, ob die Sensitivität der histologischen Untersuchung in Zukunft durch gezielte Biopsie radiologisch detektierter Fibroseherde verbessert werden könnte.

Zur Evaluierung der Lungenfibrose ist die histopathologische Untersuchung bis dato Goldstandard. Die Einteilung geschieht üblicherweise mit Hilfe des Ashcroft-Scores.

Dabei werden HE-gefärbte Lungenpräparate systematisch beurteilt. Jedem Gesichtsfeld wird dabei ein Fibrosegrad zwischen 0 und 8 zugeordnet. Diese werden wie folgt beschrieben:

0: normales Lungengewebe

1: minimal fibrotisch verdickte Alveolar- sowie Bronchialwände

2/3: moderate Wandverdickung ohne Schädigung der Lungenarchitektur

4/5: gesteigerte Fibrose mit Schädigung der Lungenarchitektur

6/7: ernsthafte Schädigung der Lungenarchitektur durch große fibrotische Areale; Honigwabenbildung

8: Fibrose ohne erkennbare Lungenarchitektur

Es wird derjenige Fibrosegrad gewählt, der im jeweiligen Gesichtsfeld dominiert, d.h. mindestens 50% der Fläche einnimmt, wobei große Gefäße, Bronchien, Emphysemanteile und tumoröse Gewebe nicht zum beurteilten Areal gezählt werden dürfen. Die Summe der einzelnen Fibrosegrade geteilt durch die Anzahl der Gesichtsfelder ergibt schließlich den eigentlichen Fibrosegrad des Präparats (98). Die Ausbildung von Honigwaben sowie eine vermehrte retikuläre Zeichnung gelten dabei ebenso wie ein erhöhtes Vorkommen an fibroblastischen Foci als mit schlechtem Outcome verbunden (99, 100). Zusammenfassend muss im Hinblick auf die Beurteilung von Tiermodellen festgehalten werden, dass auch hier eine Evaluierung der Lungenfibrose mit Hilfe von histopathologischen Aspekten möglich ist.

Eine histopathologische Evaluierung ist im Tiermodell einfach durchzuführen und bringt reproduzierbare Ergebnisse. Allerdings erfordert diese Art der Evaluierung, soll sie auch den Krankheitsverlauf und deren Beeinflussung, etwa durch verschiedene Medikamente, erfassen, eine hohe Anzahl an Versuchstieren.

Daher sollte es Ziel zukünftiger Studien sein, nicht-invasive Möglichkeiten der Evaluierung der Lungenfibrose zu finden. Darunter fallen radiologische wie auch funktionelle Untersuchungen, die zudem den Vorteil haben, dass im Gegensatz zur Histologie hierbei die gesamte Lunge erfasst wird. Die Beurteilung der Lungenfibrose mittels micro-CT konnte sowohl an der Ratte als auch an der Maus etabliert werden (101, 102). Am Tiermodell ist allerdings eine sichere Unterscheidung zwischen fibrotischem und entzündlichem Gewebe radiologisch nur schwer möglich.

#### 4.5. Laborchemische und molekularpathologische Parameter zur Quantifizierung von Lungenfibrose und Behandlungserfolg

Neben klinischen, radiologischen und histopathologischen Kriterien, die zur Diagnose einer Lungenfibrose beitragen können, steht die Etablierung von messbaren und unkompliziert reproduzierbaren laborchemischen und molekularpathologischen Parametern heute im Mittelpunkt des Interesses. Die Ermittlung solcher Prognosefaktoren kann zudem wichtige Rückschlüsse auf den Erfolg oder Misserfolg bestimmter Therapien erlauben. Im Rahmen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie wurden zu diesem Zweck der Hydroxyprolingehalt, der Hämatokrit und die Plasmakonzentration von Endothelin-1 untersucht.

#### 4.5.1. Hydroxyprolin

Das durch Hydroxylierung aus Prolin entstehende Hydroxyprolin ist eine nahezu ausschließlich im Bindegewebe und hier insbesondere im Kollagen vorkommende Aminosäure. Die überschießende Produktion von Kollagen gilt als eines der wichtigsten Zeichen einer Fibrose. So wird der Hydroxyprolin-Gehalt eines Gewebes als Indikator für das Ausmaß des Kollagengehalts und damit für die in diesem Gewebe vorgehenden fibrotischen Veränderungen gesehen (103). Bereits in den 1950er Jahren konnte von Stegemann die Bestimmung von Hydroxyprolin etabliert werden, wenig später wurde die Methode weiterentwickelt, um auch kleine Mengen an Hydroxyprolin in Anwesenheit anderer Aminosäuren nachzuweisen (104, 105). Seitdem wurden die Methoden zur Hydroxyprolin-Bestimmung sukzessive weiterentwickelt, verändert und dank technischer Fortschritte und wissenschaftlicher Erkenntnisse verfeinert. Stets blieb das Hydroxyprolin ein elementarer Bestandteil der Quantifizierung von Fibrose und gilt heute als seit langem etablierte Standardmethode.

Signifikant erhöhte Konzentrationen von Hydroxyprolin konnten nach Induktion einer Lungenfibrose mit dem H1N1-Virus bei Mäusen 30 Tage post infectionem gefunden werden, was auch mit histopathologischen Ergebnissen korrelierte (103). Ferner wurde nach Induktion fibrotischer Veränderungen mittels Asbest ein signifikant höheres Vorkommen an Hydroxyprolin beobachtet (106). Ebenso konnte 4 Monate nach Strahlentherapie an der Ratte ein signifikanter Anstieg

des Hydroxyprolin-Gehalts im Vergleich zu Kontrolltieren und im Vergleich zu nicht bestrahlten Lungenarealen bestrahlter Tiere demonstriert werden (107). Des Weiteren konnte ein Anstieg der Hydroxyprolin-Konzentration nach Induktion der Umwandlung von Fibroblasten der Lunge zu den aktiven und für die Lungenfibrose charakteristischen Myofibroblasten mit Hilfe des TGF $\beta$ 1 gezeigt werden (108).

Die meisten Untersuchungen, die sich der Bestimmung des Hydroxyprolin-Gehalts zur Quantifizierung der Lungenfibrose bedienten, stützen sich auf das Bleomycinmodell. Anhand der Bleomycin induzierten Lungenfibrose konnte im Tiermodell vielfach demonstriert werden, dass der Hydroxyprolin-Gehalt bei mit Bleomycin behandelten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Werte zeigt, so konnten bei Mäusen an Tag 14 nach intratrachealer Bleomycin-Instillation, aber auch sechs Wochen nach intratrachealer Bleomycingabe signifikant höhere Hydroxyprolin-Konzentrationen beobachtet werden als in Kontrolltieren (109-111). Der Hydroxyprolin-Gehalt zeigte sich auch 28 Tage nach Bleomycininstillation in einer Simvastatin-Studie mit prophylaktischem Behandlungsansatz in der Kontrollgruppe signifikant niedriger; hier wurde auch bei den mit Simvastatin behandelten Mäusen ein signifikant niedrigerer Hydroxyprolin-Gehalt gefunden als in der Bleomycingruppe; diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe (112). Auch in unserer Studie fanden sich im Vergleich zu den lediglich mit Bleomycin behandelten Tieren in der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die Simvastatin in einem prophylaktischen Therapieregime mit Beginn an Tag 1 nach Bleomycin-Instillation erhielt, signifikant niedrigere Hydroxyprolin-Konzentrationen. Zusätzlich konnte anhand unseres Studiendesigns aber demonstriert werden, dass Simvastatin als Therapeutikum nach Ausbildung der Fibrose den Hydroxyprolingehalt und somit die Kollagenproduktion nicht zu reduzieren vermag.

#### 4.5.2. Hämatokrit

Die alveoläre Hypoxie spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung pulmonaler Hypertonie basierend auf unterschiedlichen Ursachen, wie z.B. der COPD, dem

Schlafapnoesyndrom, der Höhenkrankheit oder interstitieller Lungenerkrankungen wie der Lungenfibrose (113). Als Reaktion auf chronische Hypoxie steigt die Produktion von Erythropoetin, damit wird eine höhere Anzahl an Sauerstoffträgern zur Verfügung gestellt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus zu gewährleisten; dies kann in Form erhöhter Hämatokritwerte beobachtet werden (114). Durch Hypoxie bedingter Anstieg des Hämatokrits wurde im Tiermodell beschrieben (115). Wiederholt konnte dabei demonstriert werden, dass Interventionen, z.B. die kontinuierliche Inhalation von Stickstoffmonoxid oder die Verabreichung von L-Arginin zwar die unter Hypoxie auftretende für die pulmonale Hypertonie charakteristische Rechtsherzhypertrophie reduzieren können, jedoch keinen Einfluss auf den Hämatokrit zeigen (116, 117). Werden dagegen Tiere, die eine Überexpression von Angiostatin aufweisen und Tiere mit normaler Produktion dieses Angiogeneseinhibitors Hypoxie ausgesetzt, zeigen erstere eine schwerere pulmonale Hypertonie mit vermehrter Rechtsherzhypertrophie, die Hämatokritwerte sind jedoch bei beiden Hypoxie-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ohne signifikanten Unterschied untereinander (118). Erhöhte Hämatokritwerte bei Ratten, die an einer Bleomycin induzierten Lungenfibrose litten, wurden zuvor in der Literatur beschrieben, allerdings stellte sich die Hämatokrit-Erhöhung im Bleomycinmodell weniger ausgeprägt dar als z.B. nach Induktion pulmonaler Fibrose mittels Monocrotalin oder Hypoxie (119). In unserer Studie zeigten sich im Verlauf zwar tendentiell höhere Hämatokritwerte in der Bleomycin- und der Simvastatin Tag 13-Gruppe als in der Kontroll- und der Simvastatin Tag 1-Gruppe, teilweise auch mit statistischer Signifikanz, eine kontinuierliche Anstieg, wie er bei zunehmender Hypoxie im Rahmen des Fortschreitens der Lungenfibrose erwartet hätte werden können, fand sich dabei aber nicht. Insgesamt ist der Hämatokritwert kein zuverlässiger Prädiktor bezüglich des Ausmaßes der pulmonalen Fibrose; insbesondere im Bleomycinmodell bedarf dies weiterführender Studien.

#### 4.5.3. Endothelin-1

Besonderes wissenschaftliches Interesse galt in den letzten Jahren der Bedeutung des Vasokonstriktors Endothelin-1 für die idiopathische Lungenfibrose. Eine entscheidende Rolle spielt das Endothelinsystem bei der Wundheilung. In der inflammatorischen Phase fördert es die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und stimuliert Monozyten zur Produktion von Zytokinen, im Rahmen der Proliferations- und Remodellingphase wirkt es chemotaktisch auf Fibroblasten, ist an deren Umwandlung zu Myofibroblasten beteiligt und fördert die Produktion von Prokollagen (120). Insbesondere letztgenannte Eigenschaften führten zu der Annahme, dass Endothelin-1 eine Rolle in fibrotischen Prozessen spielen könnte. Es wird in der Lunge von Endothelzellen wie von glatten Muskelzellen sezerniert (121). So wurden erhöhte Endothelin-1-Plasmaspiegel bei Patienten mit Lungenfibrose und pulmonaler Hypertonie festgestellt (122). Auch im Tiermodell konnten bei gleichzeitiger histopathologischer Sicherung fibrotischer Veränderungen des Lungenparenchyms und hämodynamisch gesicherter pulmonaler Hypertonie erhöhte Plasmalevel von Endothelin-1 sowie mit Hilfe immunhistochemischer Methoden eine erhöhte Dichte an Endothelin-Rezeptoren im pulmonalen Gefäßbett nachgewiesen werden (123-127). Mäuse mit einer genetisch bedingten Überexpression an Endothelin-1 entwickeln eine pulmonale Fibrose (128). Es konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 die Apoptose von Fibroblasten in der Lunge durch Aktivierung der Phosphatidylinositol-3'-OH-Kinase (PI3K)/AKT verhindert (129). Auch ist bekannt, dass der Zusatz von Endothelin-1 zu Fibroblasten zur Produktion von Proteinen wie  $\alpha$ -smooth, muscle actin, Ezrin, Moesin und Paxillin führt, die zur für Myofibroblasten typischen Kontraktilität beitragen; Fibroblasten von Patienten mit fibrotischen Erkrankungen zeigen ebenfalls erhöhte Werte der eben genannten Proteine. Ferner konnten bei gesteigerten Endothelin-1-Leveln erhöhte Werte an Fibronectin sowie an connective tissue growth factor wie auch erniedrigte Werte an aktiver Kollagenase beobachtet werden. Diese Parameter sind für die gesteigerte Kollagenablagerung im Rahmen der Lungenfibrose von Bedeutung (120). Zudem wird ein Synergismus angenommen zwischen der Wirkung von



Endothelin-1 und anderen für die Fibroseentwicklung wichtigen Parametern, wie dem platelet-derived growth factor (PDGF), dem epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor und dem TGF- $\beta$  (130).

Auch in unserer Arbeit zeigten sich nach Induktion der Lungenfibrose mittels Bleomycin beginnend mit Tag 4 nach Instillation in der Bleomycingruppe wie auch in der Simvastatin Tag 1-Gruppe tendentiell höhere Endothelin 1-Plasmaspiegel als in der Kontroll- und in der Simvastatin Tag 13-Gruppe. Umgekehrte Verhältnisse konnten dabei an Tag 28 nach Bleomycin-Instillation beobachtet werden. Auch zeigte sich kein zunehmender Anstieg des Endothelinspiegels im Verlauf, was bei einer chronisch fortschreitenden Erkrankung zu erwarten wäre. Letzterem könnte als Ursache zu Grunde liegen, dass Endothelin-1-Level insbesondere in der inflammatorischen Phase der Erkrankung erhöht sind. Auch ist an dieser Stelle nochmals hervorzuheben, dass eine Bleomycin induzierte Fibrose sich mit der Zeit selbst limitieren kann. Die deutlich erhöhten Endothelin-Plasmaspiegel der Kontroll- und der sofort mit Simvastatin Tag 1-Gruppe werfen weitere Fragen auf. So wird es zukünftigen Studien vorbehalten bleiben, zu klären, wie schnell Endothelinspiegel ansteigen, ob Narkose oder hämodynamische Untersuchungen wie die Rechtsherzkatheruntersuchung einen Einfluss auf die Ausschüttung haben oder ob es z.B. eine pulsatile Ausschüttung gibt.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Verabreichung von Simvastatin zu einer Abmilderung einer durch Bleomycin induzierten pulmonalen Fibrose führt, wenn sie an Tag 1 nach Bleomycingabe begonnen wird. Die prophylaktische Behandlung mit Simvastatin führt zu besseren Laufleistungen der Versuchstiere, statistisch signifikant niedrigerem rechtsventrikulären systolischen Blutdruck und höheren Lungencompliance der Versuchstiere, ferner zu einer weniger stark ausgeprägten Rechtsherzhypertrophie, was an den statistisch signifikant niedrigeren Herzquotienten abgelesen werden kann. Zudem konnten tendentiell niedrigere Lungengewichte und ein niedrigerer Hydroxyprolinegehalt gefunden werden. Auch zeigten Tiere, die Simvastatin ab dem ersten Tag nach Induktion der Lungenfibrose mit Bleomycin erhielten, teils niedrigere Hämatokritwerte und mit Ausnahme der Endphase des Versuchs auch statistisch signifikant niedrigere Konzentrationen an Endothelin1.

Dagegen scheint Simvastatin als Therapeutikum, d.h. nach vollständiger Ausbildung einer pulmonalen Fibrose keinen Vorteil in der Behandlung dieser Erkrankung zu bringen. Wird Simvastatin erst ab dem 13. Tage nach Induktion der Lungenfibrose mittels Bleomycin gegeben, resultieren schlechtere Laufleistungen als in der Kontrollgruppe, signifikant erhöhte rechtsventrikuläre systolische Drücke, niedrigere Lungencompliancewerte und eine ausgeprägte Rechtsherzhypertrophie. Zudem konnten bei den Simvastatin Tag 13 Tieren statistisch signifikant höhere Lungengewichte gefunden werden, was eine fibrosetypische Gewebeerneuerung vermuten lässt und in dieser Gruppe signifikant höhere Hämatokritwerte lassen auf einen chronischen Sauerstoffmangel schließen. Zeitweise zeigen die Tiere der Simvastatin Tag 13 Gruppe zudem höhere Serumkonzentrationen von Endothelin1. Der Hydroxyprolinegehalt war signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Unsere Ergebnisse betonen deutlich, wie wichtig es ist, den richtigen Zeitpunkt für eine medikamentöse Intervention im Bleomycinmodell zu wählen, um die Wirksamkeit eines Medikaments in der Behandlung der Erkrankung zu eruieren: eine Substanz wie Simvastatin, die zwar hervorragende Ergebnisse

in der Prophylaxe der Ausbildung einer Lungenfibrose erzielt, scheint sich als völlig ungeeignet in der Behandlung der voll entwickelten Erkrankung zu erweisen. Diese Ergebnisse zu verifizieren wird Aufgabe weiterführender Untersuchungen sein.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:717–723
2. Maple DW, Hunt WC, Utton R, Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB. Idiopathic pulmonary fibrosis: survival in population based and hospital based cohorts. *Thorax*. 1998;53:469-76
3. Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;26;3:8
4. Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A. Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival. *Thorax*. 1980;35:171-80
5. Flaherty KR, Andrei AC, King TE Jr, Raghu G, Colby TV, Wells A, Bassily N, Brown K, du Bois R, Flint A, et al. Idiopathic interstitial pneumonia: do community and academic physicians agree on diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1054-1060
6. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2011; 208(7):1339-50
7. Liebow AA, Carrington CB. The interstitial pneumonias. In: Simon M, Potchen EJ, LeMay M, editors. *Frontiers of pulmonary radiology*, 1st edition. New York: Grune & Stratton; 1969. p. 102-141
8. Katzenstein A-LA. *Katzenstein and Askin's surgical pathology of nonneoplastic lung disease*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997
9. Müller NL, Colby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. *Radiographics* 1997; 17: 1016-1022
10. American Thoracic Society/European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277–304

11. Rhagu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schünemann HJ. ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Pulmonary Idiopathic Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnostic and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(6):788-824
12. Visscher DW, Meyers JL. Histological spectrum of Idiopathic Interstitial Pneumonias, *The Proceedings of the American Thoracic Society* 2006; 3.322-329
13. Parambil J, Myers JL, Ryu JH. Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest* 2005;128:3310–3315
14. Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renaud JC, et al. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:51-9
15. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin  $\alpha\beta 6$  binds and activates latent TGF  $\beta$  1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis *Cell*. 1999;96:319-28
16. Adamson IY, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis *Am J Pathol*. 1988;130:377-83
17. Selman M, King TJ, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136–151
18. Douglas WW, Ryu JH, Schroeder DR. Idiopathic pulmonary fibrosis. Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1172-8
19. Douglas WW, Ryu JH, Swensen SJ, Offord KP, Schroeder DR, Caron GM, et al. Colchicine versus prednisone in the treatment of idiopathic

- pulmonary fibrosis. A randomized prospective study. Members of the Lung Study Group *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:220-5
20. Selman M, Carrillo G, Salas J, Pérez-Padilla P, Pérez R, Sansores R, et al. Colchicine, D-penicillamine, and prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a controlled clinical trial *Chest.* 1998;114:507-12
  21. Mueller-Mang C, Grosse C, Schmid K, Stiebellehner L, Bankier A, What Every Radiologist Should Know about Idiopathic Interstitial Pneumonias, May 2007 *RadioGraphics*, 27, 595-615
  22. Müller NL, Guerry-Force ML, Staples CA, Wright JL, Wiggs B, Coppin C, Paré P, Hogg JC. Differential diagnosis of bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia and usual interstitial pneumonia: clinical, functional, and radiologic findings. *Radiology* 1987; 162: 151-156
  23. Staples CA, Muller NL, Vedal S, Abboud R, Ostrow D, Miller RR. Usual interstitial pneumonia: correlation of CT with clinical, functional, and radiologic findings. *Radiology* 1987; 162: 377-381
  24. Akira M, Sakatani M, Ueda E. Idiopathic pulmonary fibrosis: progression of honeycombing at thin-section CT. *Radiology* 1993; 189: 687-691
  25. Müller NL, Miller RR, Webb WR, Evans KG, Ostrow DN. Fibrosing alveolitis: CT-pathologic correlation. *Radiology* 1986; 160: 585-588
  26. Nishimura K, Kitaichi M, Izumi T, Nagai S, Kanaoka M, Itoh H. Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology* 1992; 182: 337-342
  27. McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2006 Sep 26;114(13):1417-31
  28. Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):5-12
  29. Yuan JXJ, Rubin LJ. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulation.* 2005; 111: 534–538

30. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):13–24
31. Morrell NW, Davies RJ. Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest* 2008 Dec;134(6):1271-7
32. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of cardiology* 2004; 43: 40-47
33. Tsapenko MV, Tsapenko AV, Comfere TB, Mour GK, Mankad SV, Gajic O. Arterial pulmonary hypertension in noncardiac intensive care unit. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):1043-60
34. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- $\beta$  in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 1999;163:6164–6172
35. Nathan SD, Noble PW, Tuder RM, Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Hypertension: Connecting the Dots, *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 May 1;175(9):875-80. Epub 2007 Jan 25
36. Nathan SD, Ahmad S, Koch J, Barnett S, Ad N, Burton N. Serial measures of pulmonary artery pressures in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005;128:168S
37. Narous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA. Pulmonary Hypertension in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2005; 128:2393-2399
38. Galiè N, Torbicki A, Barst R, Dartevelle P, Haworth S et al., Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2004 Dec;25(24):2243-78

39. Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag München, Jena; 8. Auflage 2001; 971-972
40. Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacological Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin-Model. *Am J Respir Crit. Care Med.* 2006
41. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR, Schaeppi UH, Illievski VR, Cooney DA, et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax.* 1971;26(6):675–682
42. Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 1974;77(2):185–197
43. Snider GL, Celli BR, Goldstein RH, O'Brien JJ, Lucey EC. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. Lung volumes, volume-pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studied. *Am Rev Respir Dis.* 1978;117(2):289–297
44. Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, McReynolds RA, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol.* 1979;95(1):117–130
45. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(1):9–13
46. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2002; 83 (3):111–119
47. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):362-82. Epub 2007 Aug 30
48. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1712–1719



49. Fouty BW, Rodman DM. Mevastatin can cause G1 arrest and induce apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells through a p27Kip1-independent pathway. *Circ Res* 2003; 92:501-9
50. Girgis RE, Li D, Zhan X, Garcia JG, Tudor RM, Hassoun PM. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H938-45
51. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 1403–1408
52. Rakotoniaina Z , Guerard P, Lirussi F, Goirand F, Rochette L, Dumas M, Bardou M. The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 374:195-206
53. Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H, Karaki H, Ozaki H. Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25:2335-42
54. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108:1640-5
55. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Cool C, Wood K, Tudor RM, Burns N, Kasper M, Voelkel NF. Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291:L668-L676
56. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101:2711-9

57. Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant? *Eur Heart J* 2003; 24:225-48
58. Hu H, Sung A, Zhao G, Shi L, Qiu D, Nishimura T, Kao PN. Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339:59-64
59. Watts KL, Sampson EM, Schultz GS, Spiteri MA. Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32:290-300
60. Watts KL, Spiteri MA. Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor-beta is abrogated by simvastatin via a Rho signaling mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L1323-32
61. Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001; 133:1172-80
62. Ou XM, Feng YL, Wen FQ, Huang XY, Xiao J, Wang K, Wang T. Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chin Med J* 2008; 121(18): 1821-9
63. Watts KL, Cottrell E, Hoban PR, Spiteri MA. RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2006; 7:88
64. Daba MH, El-Tahir KE, Al-Arifi MN, Gabara OA. Drug-induced pulmonary fibrosis. *Saudi Med J.* 2004; 25(6):700-6
65. Kamp DW, Israbian VA, Yeldandi AV, Panos RJ, Graceffa P, Weitzman SA. Phytic acid, an iron chelator, attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in rats after intratracheal instillation of asbestos. *Toxicol Pathol.* 1995; 23(6):689-95
66. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heillier JF. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207(3):221–231

67. Sanchez VC, Pietruska JR, Miselis NR, Hurt RH, Kane AB. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? *Wiley Interdiscip. Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1(5):511-529
68. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289(5):L698–L708
69. Park KJ, Chung JY, Chun MS, Suh JH. Radiation-induced lung disease and the impact of radiation methods on imaging features. *Radiographics.* 2000; 20(1):83-98
70. Yi ES, Williams ST, Lee H, Malicki DM, Chin EM, Yin S, Tarpley J, Ulich TR. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol.* 1996; 149(6):1963-70
71. Kato H, Ishikawa H, Hasegawa M, Yoshida Y, Suzuki Y, Ohno T, Takahashi T, Nakano T. Protective Effect of Urinary Trypsin Inhibitor on the Development of Radiation-Induced Lung Fibrosis in Mice. *J Radiat Res (Tokyo).* 2010; 51(3):325-32
72. Li M, Abdollahi A, Gröne HJ, Lipson KE, Belka C, Huber PE. Late Treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model. *Radiat Oncol.* 2009; 21;4:66
73. King TE Jr, Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, Stähler G, Leconte I, Roux S, Raghu G. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177(1):75-81
74. Rasekaba T, Lee AL, Naughton MT, Williams TJ, Holland AE. The six-minute walk test: a useful metric for the cardiopulmonary patient. *Intern Med J.* 2009; 39(8):495-501
75. Schroll S, Arzt M, Sebah D, Nüchterlein M, Blumberg F, Pfeifer M. Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist Bosentan. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010; 170(1):32-6

76. Miyauchi T, Fujimori A, Maeda S, Iemitsu M, Sakai S, Shikama H, Tanabe T, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I. Chronic administration of an endothelin-A receptor antagonist improves exercise capacity in rats with myocardial infarction-induced congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44 Suppl 1:S64-7
77. Wilson RM, De Silva DS, Sato k, Izumiya Y, Sam F. Effects of fixed-dose Isosorbide Dinitrate/Hydralazine on diastolic function and exercise capacity in hypertensio-induced diastolic heart failure. *Hypertension.* 2009; 54(3):583-90
78. Biolo A, Greferath R, Siwik DA, Qin F, Valsky E, Fylaktakidou KC, Pothukanuri S, Duarte CD, Schwarz RP, Lehn JM, Nicolau C, Colucci WS. Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with an allosteric effector of hemoglobin, myo-inositol trispyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(6):1926-9
79. Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283(5):H1838-45
80. Musch TI, Wolfram S, Hageman KS, Pickar JG. Skeletal muscle ouabain binding sites are reduced in rats with chronic heart failure. *J Appl Physiol.* 2002; 92(6):2326-34
81. Yamaguchi F, Kawana K, Tanonaka K, Kamano I, Igarashi T, Gen E, Fujimoto Y, Maki T, Sanbe A, Nasa Y, Takeo S. Improvement of exercise capacity of rats with chronic heart failure by long-term treatment withtrandolapril. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(7):1585-92
82. Wunderlich C, Schmeisser A, Heerwagen C, Ebner B, Schober K, Braun-Dullaes RC, Schwencke C, Kasper M, Morawietz H, Strasser RH. Chronic NOS inhibition prevents adverse lung remodeling and pulmonary arterial hypertension in caveolin-1 knockout mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21(3):507-15

83. Kumar A, Garg R, Kumar P. Nitric oxide modulation mediates the protective effect of trazodone in a mouse model of chronic fatigue syndrome. *Pharmacol Rep.* 2008; 60(5):664-72
84. Kumar A, Garg R. Protective effects of antidepressants against chronic fatigue syndrome-induced behavioral changes and biochemical alterations. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009; 23(1):89-95
85. Walf AA, Frye CA. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav.* 2010; 99(2):169-74
86. Kumar A, Garg R, Gaur V, Kumar P. Venlafaxine involves nitric oxide modulatory mechanism in experimental model of chronic behavior despair in mice. *Brain Res.* 2010; 1311:73-80
87. Manali ED, Lyberopoulos P, Triantafyllidou C, Kolilekas LF, Sotiropoulou C, Milic-Emili J, Roussos C, Papiiris SA. MRC chronic Dyspnea Scale: Relationships with cardiopulmonary exercise testing and 6-minute walk test in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a prospective study. *BMC Pulm Med.* 2010; 10:32
88. Holland AE. Exercise limitation in interstitial lung disease - mechanisms, significance and therapeutic options. *Chron Respir Dis.* 2010; 7(2):101-1
89. Flaherty KR, Andrei AC, Murray S, Fraley C, Colby TV, Travis WD, Lama V, Kazerooni EA, Gross BH, Toews GB, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: prognostic value of changes in physiology and six-minute-walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(7):803-9
90. Thomeer M, Grutters JC, Wuyts WA, Willems S, Demedts MG. Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2010; 11:89
91. Fulmer JD, Roberts WC, von Gal ER, Crystal RG. Morphologic-physiologic correlates of the severity of fibrosis and degree of cellularity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1979; 63:665–676
92. Zhang X, Qiang B, Hubmayr RD, Urban MW, Kinnick R, Greenleaf JF. Noninvasive ultrasound image guided surface wave method for measuring the wave speed and estimating the elasticity of lungs: A feasibility study. *Ultrasonics.* 2010

93. Ask K, Labiris R, Farkas L, Moeller A, Froese A, Farncombe T, McClelland GB, Inman M, Gauldie J, Kolb MR. Comparison between conventional and "clinical" assessment of experimental lung fibrosis. *J Transl Med.* 2008; 6:16
94. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. American Thoracic Society. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 2000; 161 (2):646-664
95. Schmidt SL, Sundaram B, Flaherty KR. Diagnosing fibrotic lung disease: when is high-resolution computed tomography sufficient to make a diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respirology.* 2009; 14(7):934-9
96. Wang ZL. Advances in understanding of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chin Med J (Engl).* 2009; 122(7):844-57
97. Sverzellati N, De Filippo M, Bartalena T, Piciucchi S, Zompatori M. High-resolution computed tomography in the diagnosis and follow-up of idiopathic pulmonary fibrosis. *Radiol Med.* 2010; 115(4):526-38
98. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41: 467-470
99. Shin KM, Lee KS, Chung MP, Han J, Bae YA, Kim TS, Chung MJ. Prognostic determinants among clinical, thin-section CT, and histopathologic findings for fibrotic idiopathic interstitial pneumonias: tertiary hospital study. *Radiology.* 2008; 249(1):328-37
100. King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1025–1032
101. Cavanaugh D, Travis EL, Price RE, Gladish G, White RA, Wang M, Cody DD. Quantification of bleomycin-induced murine lung damage in vivo with micro-computed tomography. *Acad Radiol.* 2006; 13:1505–1512
102. Johnson KA. Imaging techniques for small animal imaging models of pulmonary disease: micro-CT. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:59–64

103. Qiao J, Zhang M, Bi J, Wang X, Deng G, He G, Luan Z, Lv N, Xu T, Zhao L. Pulmonary fibrosis induced by H5N1 viral infection in mice. *Respir Res.* 2009; 10(1):107
104. Stegemann H. Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T and p-Dimehylamino-benzaldehyd. *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem* 1958; 311:41-5
105. Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 93:440–447
106. Fattman CL, Tan RJ, Tobolewski JM, Oury TD. Increased sensitivity to asbestos-induced lung injury in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(4):601-7
107. Pauluhn J, Baumann M, Hirth-Dietrich C, Rosenbruch M. Rat model of lung fibrosis: comparison of functional, biochemical, and histopathological changes 4 months after single irradiation of the right hemithorax. *Toxicology.* 2001; 161(3):153-63
108. Zhao L, Xiao K, Wang H, Wang Z, Sun L, Zhang F, Zhang X, Tang F, He W. Thalidomide has a therapeutic effect on interstitial lung fibrosis: evidence from in vitro and in vivo studies. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157(2):310-5
109. Zhu Y, Liu Y, Zhou W, Xiang R, Jiang L, Huang K, Xiao Y, Guo Z, Gao J. A prostacyclin analogue, iloprost, protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res.* 2010; 11(1):34
110. Fujibayashi T, Hashimoto N, Jijiwa M, Hasegawa Y, Kojima T, Ishiguro N. Protective effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein 70, against drug-induced lung injury/fibrosis in an animal model. *BMC Pulm Med.* 2009; 9:45
111. Padua AI, Silva CL, Ramos SG, Faccioli LH, Martinez JA. Influence of a DNA-hsp65 vaccine on bleomycin-induced lung injury. *J Bras Pneumol.* 2008; 34(11):891-9

112. Ou XM, Feng YL, Wen FQ, Huang XY, Xiao J, Wang K, Wang T. Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Sep 20;121(18):1821-9
113. Preston IR. Clinical perspective of hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(6):711-21
114. Koulmann N, Novel-Chaté V, Peinnequin A, Chapot R, Serrurier B, Simler N, Richard H, Ventura-Clapier R, Bigard X. Cyclosporin A inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension and right ventricle hypertrophy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174(6):699-705
115. Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA, Khalil RA. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 332(2):455-62
116. Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol* 2003; 547:133–145
117. Roberts JD Jr, Roberts CT, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD. Continuous nitric oxide inhalation reduces pulmonary arterial structural changes, right ventricular hypertrophy, and growth retardation in the hypoxic newborn rat. *Circ Res*. 1995; 76(2):215-22
118. Pascaud MA, Griscelli F, Raoul W, Marcos E, Opolon P, Raffestin B, Perricaudet M, Adnot S, Eddahibi S. Lung overexpression of angiostatin aggravates pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 29(4):449-57
119. Williams JH Jr, Bodell P, Hosseini S, Tran H, Baldwin KM. Haemodynamic sequelae of pulmonary fibrosis following intratracheal bleomycin in rats. *Cardiovasc Res*. 1992; 26(4):401-8
120. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs*. 2010; 24(1):49-54
121. Ross B, D'Orléans-Juste P, Giaid A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42(1):16-20



122. Trakada G, Nikolaou E, Pouli A, Tsiamita M, Spiropoulos K. Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep. *Sleep Breath* 2003; 7: 111-118
123. Zhao L, Wang X, Chang Q, Xu J, Huang Y, Guo Q, Zhang S, Wang W, Chen X, Wang J. Neferine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2010; 627(1-3):304-12
124. Falcão-Pires I, Gonçalves N, Henriques-Coelho T, Moreira-Gonçalves D, Roncon-Albuquerque R Jr, Leite-Moreira AF. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296(6):H2007-14
125. Blumberg FC, Wolf K, Arzt M, Lorenz C, Riegger GA, Pfeifer M. Effects of ET-A receptor blockade on eNOS gene expression in chronic hypoxic rat lungs. *J Appl Physiol.* 2003; 94(2):446-52
126. Blumberg FC, Wolf K, Sandner P, Lorenz C, Riegger GA, Pfeifer M. The NO donor molsidomine reduces endothelin-1 gene expression in chronic hypoxic rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280(2):L258-63
127. Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rimmelink M, Brimiouille S, McEntee K, Wauthy P, Salmon I, Ketelslegers JM, Naeije R. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2003; 107(9):1329-35
128. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:19–26
129. Kulasekaran P, Scavone CA, Rogers DS, Arenberg DA, Thannickal VJ, Horowitz JC. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 41(4):484-93

130. Teder P, Noble PW. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23(1):7-10

## **DANKSAGUNG**

**Mein Dank gilt meinen Eltern, die mich stets mit Geduld, Humor und v.a. Liebe unterstützt haben.**

**Ich danke Stefan Beherns für seine Liebe und seinen unerschütterlichen Glauben an mich.**

**Besonders danke ich Wolfgang Otto für seine geduldige und selbstlose Unterstützung.**

## **LEBENS LAUF**

### **ANGABEN ZUR PERSON**

**Name:** Nowrotek  
**Vorname:** Agata Paulina  
**Geburtsdatum:** 13.05.1982  
**Geburtsort:** Nikolai (Polen)  
**Anschrift:** Neuprüll 4  
93051 Regensburg

### **SCHULAU SBILDUNG**

1989 -1993 Grunds chule Cham  
1993 -2002 Joseph-von-Fraunhofer-Gymnasium Cham

### **STUDIUM DER HUMANMEDIZIN**

Oktober 2002 - September 2004 vorklinischer Abschnitt,  
Naturwissenschaftliche Fakultät III –  
Biologie und Vorklinische Medizin  
Universität Regensburg

Oktober 2004 - Dezember 2008 klinischer Abschnitt, Medizinische Fakultät,  
Universität Regensburg

## **PRAKTISCHES JAHR**

Chirurgie

Universität Regensburg, Klinik und Poliklinik für Chirurgie

Urologie

Caritas-Krankenhaus St. Josef, Klinik und Poliklinik für Urologie

Innere Medizin

Universität Regensburg, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I/II

## **ÄRZTLICHE PRÜFUNG**

Ärztliche Vorprüfung bestanden am 16.09.2004

Ärztliche Prüfung bestanden am 03.12.2008

## **APPROBATIONSERTEILUNG**

18.12.2008

## **ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT**

Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin am Caritas-Krankenhaus St. Josef in Klinik für Urologie am 01.01.2009

Regensburg, 21.07.2013

Agata Nowrotek

