

Immunhistochemischer Nachweis von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bei pulmonaler Hypertonie im Kindesalter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stephanie Elisabeth Siebert
aus Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. J. Breuer
2. Gutachter: Professor Dr. med. G. Knöpfle

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. Juni 2007

Aus dem Universitätsklinikum Bonn
Zentrum für Kinderheilkunde
Abteilung für Kinderkardiologie
Komm. Direktor: Privatdozent Dr. med. J. Breuer
Adenauerallee 119, 53113 Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Abkürzungsverzeichnis	8
1.2	Einführung	11
2	Theoretischer Hintergrund	14
2.1	Pulmonale Hypertonie	14
2.2	Grundlegendes zu ICAM-1	17
2.2.1	Struktur	17
2.2.2	Rezeptoren	17
2.2.3	Physiologie und Pathophysiologie	18
2.3	Grundlegendes zu VEGF	20
2.3.1	Struktur	20
2.3.2	Rezeptoren	21
2.3.3	Physiologie und Pathophysiologie	22
2.4	HE-Klassifizierung	23
2.5	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	25
3.2	Hämodynamische Daten	26
3.3	Färbemethode	27
3.3.1	Prinzip der immunhistochemischen Färbung	27
3.3.2	Die LSAB-Methode	28
3.3.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	30
3.3.3.1	Entparaffinisieren und Rehydrieren	30
3.3.3.2	Färbung mit dem DAKO LSAB-Kit	30
3.3.4	Materialien	33
3.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbung	35

3.5	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	37
4.2	Analyse bezüglich der vorliegenden Diagnosen	40
4.3	Analyse bezüglich der HE-Klassifizierung	41
4.3.1	Gefäßdurchmesser	41
4.3.2	Umfang und Fläche des Gefäßlumens	42
4.3.3	Dicke der Gefäßwand	43
4.3.4	Dicke der Gefäßwand untergliedert nach der Gefäßgröße	44
4.3.5	Intensität der Anfärbung	46
4.3.6	Intensität der Anfärbung untergliedert nach der Gefäßgröße	47
4.3.7	Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck	49
4.3.8	Pulmonalarterieller Mitteldruck	50
4.3.9	Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck	51
4.3.10	Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung	52
4.3.11	Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung	52
4.4	Analyse bezüglich des Widerstandsverhältnisses	53
4.4.1	Gefäßdurchmesser	53
4.4.2	Umfang und Fläche des Gefäßlumens	54
4.4.3	Dicke der Gefäßwand	55
4.4.4	Intensität der Anfärbung	56
4.4.5	Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck	56
4.4.6	Pulmonalarterieller Mitteldruck	57
4.4.7	Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck	58
4.4.8	Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung	58
4.4.9	Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung	59
4.5	Analyse bezüglich des pulmonalarteriellen Drucks	60
4.5.1	Gefäßdurchmesser	60
4.5.2	Umfang und Fläche des Gefäßlumens	61
4.5.3	Dicke der Gefäßwand	62

4.5.4	Intensität der Anfärbung	63
4.5.5	Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung	64
4.5.6	Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung	64
4.6	Analyse bezüglich des Shuntverhältnisses	65
4.6.1	Gefäßdurchmesser	65
4.6.2	Umfang und Fläche des Gefäßlumens	66
4.6.3	Dicke der Gefäßwand	67
4.6.4	Intensität der Anfärbung	68
4.6.5	Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck	69
4.6.6	Pulmonalarterieller- zu systemarteriellem Druck	69
4.6.7	Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung	70
5	Diskussion	71
5.1	Immunhistochemische Färbung mit ICAM-1 und hämodynamische Untersuchung	71
5.2	Immunhistochemische Färbung mit VEGF und hämodynamische Untersuchung	76
5.3	Schlußfolgerungen	80
6	Zusammenfassung	82
7	Anhang	84
7.1	Literaturverzeichnis	84
7.2	Abbildungsverzeichnis	91
7.3	Tabellenverzeichnis	94
8	Danksagung	95
9	Lebenslauf	96

1 Einleitung

1.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Arg	Arginin
ASD	Atriumseptumdefekt
Asp	Aspergin
AVSD	Atriumventrikelseptumdefekt
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMPR-II	Bone morphogenetic protein receptor-II
CD	Cluster of differentiation (Nomenklatur für Oberflächenantigene gemäß der Vereinbarung des International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens)
CDH	Congenital diaphragmatic hernia
DAB	3,3'-Diaminobezidin
Flt-1	fms-like tyrosine kinase-1
Glu	Glutamin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE-Klasse	Heath-Edward-Klasse
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
His	Histamin
HIV	Human immunodeficiency virus
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
INR	International Normalized Ratio
kDa	Kilo-Dalton

KDR/Flk-1	Kinase insert domain-containing receptor/ fetal liver kinase-1
LFA-1	Leucocyte function associated antigen-1
LSAB	Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode
LT	Leukotrien
LVP	Linksventrikulärer Druck
Lys	Lysin
Mac-1	Integrin CD11 b/CD 18
Max	Maximum
Mg ²⁺	Magnesium
Min	Minimum
mRNA	messenger-ribonucleid-acid
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
PAH	pulmonalarterielle Hypertension
PAPd	diastolischer pulmonalarterieller Druck
PAPm	pulmonalarterieller Mitteldruck
PAPs	systolischer pulmonalarterieller Druck
pAVK	persistierender atrioventrikulärer Kanal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDGF	Platelet derived growth factor
PH	Pulmonale Hypertonie
PPH	Primäre pulmonale Hypertonie
ppm	Parts per million
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
Qp/Qs	Verhältnis der Lungen- und Körperdurchblutung
Rp/Rs	Widerstandsverhältnis zwischen Lungen- und Körperkreislauf
RRd	diastolischer Blutdruck nach Riva-Rocci
RRm	mittlerer Blutdruck nach Riva-Rocci

RRs	systolischer Blutdruck nach Riva-Rocci
RVP	Rechtsventrikulärer Druck
Σ	Summe
SAP	Systemarterieller Druck
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sICAM-1	soluble Intercellular adhesion molecule-1
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SO ₂ ao	Aortale Sauerstoffsättigung
SO ₂ pa	Pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung
SPH	Sekundäre pulmonale Hypertonie
SSRE	shear stress responsing element
SSW	Schwangerschaftswoche
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1
Tab.	Tabelle
TGA	Transposition der großen Gefäße
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vascular permeability factor
VSD	Ventrikelseptumdefekt
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation

1.2 Einführung

Definitionsgemäß wird bei Kindern und Jugendlichen von einer pulmonalen Hypertonie (PH) gesprochen wenn der pulmonalarterielle Mitteldruck über 20mmHg unter Ruhebedingungen bzw. über 30mmHg bei Belastung beträgt (Lang, 2004). Nach der WHO-Klassifikation (Venedig, 2003) wird die Erkrankung in fünf Subgruppen, nämlich die pulmonalarterielle Hypertension (PAH), die pulmonale Hypertension bei linksventrikulärer Herzerkrankung, die pulmonale Hypertension bei Lungenerkrankungen mit/ ohne Hypoxämie, die pulmonale Hypertension aufgrund chronisch thrombotischer und/ oder embolischer Erkrankungen sowie die pulmonale Hypertension aufgrund verschiedener anderer Grunderkrankungen gegliedert (Lang, 2004). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der pulmonalen Hypertonie in Folge kongenitaler Herzdefekte. Diese können über einen erhöhten pulmonalen Blutfluß, über erhöhte pulmonalarterielle oder über erhöhte pulmonalvenöse Drücke zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie führen. Zu den ursächlichen Herzfehlern zählen solche mit Links-Rechts-Shunt [z.B. Ventrikelseptumdefekt (VSD), Vorhofseptumdefekt (ASD), Persistierender Ductus arteriosus (PDA), Atriumventrikelseptumdefekt (AVSD), aortopulmonales Fenster], Zustände mit erhöhtem pulmonalvenösem Druck (z.B. Kardiomyopathie, Mitralstenose, Pulmonalvenenstenose) sowie Anomalien der Pulmonalarterie.

Da die Therapiemöglichkeiten der pulmonalen Hypertonien nach wie vor eingeschränkt sind und die Prognose ungünstig ist, gibt es zahlreiche Bemühungen, die der Erkrankung zugrunde liegenden pathophysiologischen, morphologischen und hämodynamischen Veränderungen zu erforschen. Beschrieben sind in diesem Zusammenhang verminderte Konzentrationen von Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazykline, erhöhte Konzentrationen von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 und Thromboxan A1, vermehrt thrombotische Läsionen und eine erhöhte Reaktivität des pulmonalen Gefäßbetts (Dunbar, 2001), ebenso wie eine verstärkte Muskularisation kleiner Pulmonalarterien und eine verringerte Gefäßdichte (Kobayashi et al., 2004).

Heath und Edwards untersuchten bereits 1958 detailliert die histologischen Veränderungen arterieller Lungengefäße bei Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie aufgrund kongenitaler Herzdefekte. Sie entwarfen eine Einteilung in sechs Schweregrade (HE-Klassen 1-6). Die

pathologischen Veränderungen nehmen ihren Ausgang bei kleinen Arterien und Arteriolen und greifen später auf die größeren Gefäße über. Zu Beginn der Erkrankung wird eine Verdickung der Media beobachtet, im weiteren Verlauf kommt es zur Intimaproliferation und –fibrose, die auch zu Gefäßokklusionen führen können. In fortgeschrittenen Stadien kann es distal der Gefäßverschlüsse zu Dilatationen und Aneurysmenbildung kommen, es entwickeln sich außerdem die sogenannten „plexiformen Läsionen“. Das Endstadium ist gekennzeichnet durch eine nekrotisierende Arteriitis.

Beim Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Supergen-Familie (van der Stolpe und van der Saag, 1996). ICAM-1 kommt in fast allen Geweben auf vaskulären Endothelzellen vor (Hogg et al., 1991). Zudem wird es von vielen weiteren Zelltypen exprimiert, wie z.B. Leukozyten (Hamacher und Schaberg, 1994) oder Pneumozyten Typ I (Feuerhake et al., 1998). Die beiden wichtigsten Liganden sind der LFA-1-Rezeptor (CD 11a/CD18) und der Mac-1-Rezeptor (CD11b/CD18) (Hamacher und Schaberg, 1994). Als Adhäsionsmolekül ist es an der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie an der Signalvermittlung für Wachstum, Differenzierung und Aktivierung von Zellen beteiligt (Hamacher und Schaberg, 1994). Die ICAM-1-Expression kann durch verschiedene Faktoren modifiziert werden (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Störungen der ICAM-1-Expression und –Regulation stehen im Verdacht zur Pathogenese vielzähliger Krankheiten beizutragen. In der Literatur fand sich allerdings lediglich eine Studie über das vermehrte Vorkommen von ICAM-1 in Endothelzellen bei der pulmonalen Hypertonie (Kobayashi et al., 2004).

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zählt zu den Wachstumsfaktoren und wurde erstmalig 1983 als Vascular permeability factor (VPF) beschrieben. Für VEGF sind zwei hochaffine transmembranöse Rezeptoren beschrieben, nämlich Flt-1 und KDR/Flk-1 (Boussat et al., 2000). Das Besondere an VEGF ist sein spezifischer und mitogener Effekt auf Endothelzellen. VEGF spielt eine physiologische Rolle in Entwicklung und Wachstum sowie der Wundheilung, außerdem trägt es zur pathophysiologischen Entstehung verschiedener Erkrankungen bei (Ferrara, 1993). Vermutet wird ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie (Voelkel et al., 1996). Einige Autoren konnten bereits einen

Zusammenhang zwischen der pulmonalen Hypertonie und einer pulmonalvaskulären VEGF-Erhöpfung bei kongenital herzkranken Patienten zeigen (Geiger et al., 2000).

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Pulmonale Hypertonie

Während früher die primäre pulmonale Hypertonie (PPH) von der sekundären pulmonalen Hypertonie (SPH) abgegrenzt wurde, wird diese Unterscheidung in den neueren WHO-Klassifikationen der pulmonalen Hypertonie von Evian (1998) bzw. der überarbeiteten Version von Venedig (2003) nicht mehr getroffen. Die Venedig-Klassifikation gliedert die Erkrankung in fünf Subgruppen, die in Tabelle 1 dargestellt sind (Lang, 2004). Die idiopathische PAH (früher primäre pulmonale Hypertension) kann familiär gehäuft (6-8%; autosomal-dominanter Erbgang mit variabler Penetranz; Granton und Rabinovitch, 2002) oder sporadisch auftreten. In 60% der familiären Fälle und 30% der sporadischen findet sich eine Mutation im BMPR-II (Bone morphogenetic protein receptor-II), einem Rezeptor aus der TGF- β -Superfamilie (Eddahibi et al., 2002).

Die häufigsten Gründe für eine PH bei Neugeborenen und Kleinkindern sind die alveoläre Hypoxie und der kongenitale Herzdefekt (Haworth, 1993). Für diese Arbeit von Interesse sind die kardialen Läsionen, die mit einer PH assoziiert sind. Diese sind entweder solche mit erhöhtem pulmonalem Blutfluß und erhöhtem pulmonalarteriellem Druck oder solche mit erhöhtem pulmonalvenösem Druck. Es zählen dazu Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt (z.B. VSD, ASD, PDA, AVSD, aortopulmonales Fenster), Zustände mit erhöhtem pulmonalvenösem Druck (z.B. Kardiomyopathie, Mitralstenose, Pulmonalvenenstenose), Anomalien der Pulmonalvene oder -arterie sowie vorausgegangene palliative Shuntoperationen, wie die Original-Waterston- oder Pott-Anastomose. Das Alter, in welchem irreversible Schäden entstehen, variiert unter den verschiedenen Typen. Nicht reversible pulmonalvaskuläre Erkrankungen im ersten Lebensjahr sind allerdings in der Regel sehr selten. Bei einem zugrunde liegenden Links-Rechts-Shunt scheinen die Shuntgröße sowie das Ausmaß mechanischer Belastungen der Gefäßwände durch den hohen pulmonalen Blutfluß Risikofaktoren darzustellen (Dunbar, 2001). Bei zugrunde liegenden genetischen Störungen, wie z.B. der Trisomie 21, sowie bei Herzfehlern mit ausgeprägtem Shunt in der Diastole (z.B. Truncus arteriosus communis oder großer PDA) wurden schnellere Krankheitsverläufe beobachtet (Steinhorn und Fineman, 1999). Als Komplikation der PH kann es zur sogenannten Eisenmenger-Reaktion kommen. Darunter versteht man eine Shuntumkehr aufgrund des hohen pulmonalarteriellen Widerstandes von einem Links-Rechts-Shunt hin zu einem Rechts-Links-Shunt mit zentraler Zyanose, Polyglobulie und

daraus resultierenden Thrombosen, Rechtsherzinsuffizienz und Rhythmusstörungen. Bei einer Eisenmenger-Reaktion sind die Patienten meist inoperabel. Neben den typischen strukturellen Veränderungen der Lungengefäße, die unter Punkt 2.4 näher beschrieben sind, finden sich bei Patienten mit PH eine erhöhte Reaktivität des pulmonalen Gefäßbettes, eine erhöhte Konzentration von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 und Thromboxan A1, eine verminderte Konzentration von Vasodilatoren wie NO und Prostacycline, vermehrt thrombotische Läsionen (Dunbar, 2001), eine Reduktion des pulmonalvaskulären Gefäßbettes sowie eine Dysfunktion des pulmonalen Endothels.

Die Diagnosestellung einer pulmonalen Hypertonie im Frühstadium wird dadurch erschwert, dass moderate Formen gerade bei Kindern und Jugendlichen über einen längeren Zeitraum gut toleriert werden bzw. Symptome zunächst sehr unspezifisch sind. Sie können sich z.B. als Dyspnoe, Synkope, Leistungsknick oder Brustschmerzen manifestieren (Dunbar, 2001). Mit dem vermehrten Auftreten manifester Symptome ist erst ab mittleren pulmonalarteriellen Ruhedrücken von 30-40mmHg zu rechnen. Eine stufenweise klinische Verschlechterung tritt ein, wenn die mittleren pulmonalarteriellen Drücke Werte von 60-70mmHg erreichen und das Herzzeitvolumen progressive abnimmt. Der klinische Zustand älterer Kinder und Jugendlicher kann basierend auf ihrer Belastbarkeit nach der funktionellen Klassifikation der New York Heart Association in vier Klassen eingeteilt werden (NYHA I-IV). Dabei korreliert die Höhe der pulmonalarteriellen Drücke allerdings nur bedingt mit der klinischen Symptomatik (Schranz, 2003).

Die therapeutischen Möglichkeiten bei der sekundären PH erstrecken sich auf die Behandlung der Grundkrankheit (z.B. operative Korrektur eines Herzfehlers), die Antikoagulation mit Phenprocoumon oder Warfarin mit einem Ziel-INR von 1,5-2,5 oder die Gabe von Vasodilatoren wie Ca-Kanal-Blockern (z.B. Diltiazem), Prostazyklinen (z.B. Iloprost) oder Stickstoffmonoxid (NO). Über den Einsatz von NO gibt es eine Studie von Breuer et al. (1995), in der gezeigt werden konnte, dass die kontinuierliche perioperative NO-Inhalation bei herz- oder thoraxchirurgischen Eingriffen im Rahmen der Korrektur angeborener kardiopulmonaler Fehlbildungen zu einer signifikanten Verbesserung der Hämodynamik und/ oder Oxygenierung der betroffenen Patienten führt. Der Vorteil dieser Behandlungsmethode ist die selektive Senkung des pulmonalen Gefäßwiderstandes mit einer konsekutiver Nachlastsenkung im subpulmonalen Ventrikel, ohne dass eine gleichzeitige Verminderung des koronaren Perfusionsdrucks eintritt, wie es für intravenös verabreichte Vasodilatoren typisch ist. Auch die Gabe von

Vasokonstriktorantagonisten, wie Endothelinrezeptorantagonisten (z.B. Bosentan) ist möglich. Der Einsatz des spezifischen Phosphodiesterase-Hemmers (PDE-5) Sildenafil wird derzeit in kontrollierten klinischen Studien überprüft. In Einzelfällen wird eine atriale Septostomie durchgeführt, wodurch ein Überdruckventil auf Vorhofebene geschaffen wird, was zu einer Verbesserung des systemischen Herzminutenvolumens und damit zu einer Verbesserung des Gesamtsauerstoffangebotes führt. Die ultima ratio stellt die Lungen- bzw. Herz-Lungen transplantation dar (Dunbar, 2001; Schranz, 2003; Veyssier-Belot, 1999).

<p>Pulmonalarterielle Hypertension (PAH)</p> <ul style="list-style-type: none"> · Idiopathisch (früher: Primäre pulmonale Hypertension) · Familiär · PAH in Verbindung mit Kollagenosen, Kongenitaler Herzerkrankung, Portaler Hypertension, HIV, Medikamenten/ Drogen, anderen Faktoren · PAH in Verbindung mit signifikanter venöser oder kapillärer Gefäßpathologie · Persistierende pulmonale Hypertension bei Neugeborenen
<p>Pulmonale Hypertension bei linksventrikulären Herzerkrankungen</p> <ul style="list-style-type: none"> · Atriale bzw. ventrikuläre Herzerkrankungen · Herzklappenerkrankungen
<p>Pulmonale Hypertension bei Lungenerkrankungen mit/ ohne Hypoxämie</p> <ul style="list-style-type: none"> · Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD) · Interstitielle Lungenerkrankungen · Schlaf-Apnoe-Syndrom · Zentrale alveoläre Hypoventilation · Chronische Höhenexposition · Entwicklungsbedingte Erkrankungen
<p>Pulmonale Hypertension aufgrund chronisch thrombotischer und/ oder embolischer Erkrankungen</p> <ul style="list-style-type: none"> · Obstruktion der proximalen Pulmonalarterien · Obstruktion der distalen Pulmonalarterien · Pulmonalembolien durch Tumor, Parasiten, Fremdkörper
<p>Verschiedenes</p> <ul style="list-style-type: none"> · Sarkoidose, Histiozytosis X, Lymphangiomatosis, Kompression der Lungengefäße (Adenopathie, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

Tab. 1: WHO-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Venedig, 2003)

2.2 Grundlegendes zu ICAM-1

2.2.1 Struktur

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Supergen-Familie. Es handelt sich um ein Glykoprotein, bestehend aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen, einer transmembranären Domäne und einem zytoplasmatischem Schwanz. Das Protein besteht aus 505 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren, von denen angenommen wird, dass sie in einer β -Faltblattstruktur angeordnet und über Disulfidbrücken stabilisiert sind. Das Molekulargewicht von ICAM-1 beträgt je nach Glykolisierung, die abhängig vom exprimierenden Zelltyp variiert, 80-114 kDa (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Das kodierende Gen wurde auf Chromosom 19 lokalisiert (Hogg et al., 1991). Es besteht aus 7 Exons und 6 Introns, wobei jede immunglobulinähnliche Domäne von einem separaten Exon kodiert wird (van de Stolpe und van der Saag, 1996).

Neben der beschriebenen membrangebundenen Form von ICAM-1, läßt sich in Plasma, Liquorflüssigkeit und Sputum die lösliche Form sICAM-1 (soluble ICAM-1) nachweisen, bei der es sich am ehesten um eine proteolytische Abspaltung eines extrazellulären Teils von ICAM-1 handelt. sICAM-1 kommt in mehreren zirkulierenden Isoformen vor, die wohl komplexierte Formen mit sich selbst oder anderen Proteinen darstellen (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß sICAM-1 mindestens drei verschiedene Topologien ausbilden kann, nämlich ringförmige Dimere, W-förmige Tetramere und U-förmige Moleküle (Jun et al., 2001).

2.2.2 Rezeptoren

Verschiedene zellassoziierte und lösliche Liganden binden an ICAM-1, wobei die wichtigste Rolle den membrangebundenen β_2 -Integrinen LFA-1 (CD11a/CD18) und – in geringerem Ausmaß – Mac-1 (CD11b/CD18) zukommt. LFA-1 wird von den meisten Leukozyten exprimiert, Mac-1 vornehmlich von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten (Hamacher und Schaberg, 1994). Eine besondere Eigenschaft der β_2 -Integrine ist es, dass die Rezeptoraffinität vorübergehend verstärkt werden kann. Dazu kommt es nach Phosphorylierung intrazellulärer Anteile über intrazytosolische Signale zu einer Mg^{2+} -abhängigen Konformitätsänderung der Rezeptorstruktur. Diese Strukturänderung ist unerlässlich für eine hochaffine Bindung an ICAM-1 (Hamacher und Schaberg, 1994). Auch einige Pathogene sind Liganden an ICAM-1, so das

Rhinovirus, das dieses zur Infektion nasaler Epithelzellen nutzt, das Coxsackie A-13-Virus und der Parasit Plasmodium falciparum, der Erythrozyten infiziert, die dann unter ICAM-1-Vermittlung in peripheren Gefäßen sequestrieren (Jun et al., 2001; van de Stolpe und van der Saag, 1996). Weitere Liganden sind Sialophorin (CD43), das auf Leukozyten und Thrombozyten vorkommt, das lösliche Molekül Fibrinogen und der Matrixfaktor Hyaluronsäure (van de Stolpe und van der Saag, 1996).

2.2.3 Physiologie und Pathophysiologie

Adhäsionsmoleküle regulieren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und vermitteln Signale für Wachstum, Differenzierung und Aktivierung von Zellen. Adhäsionsprozesse sind involviert in der embryonalen Entwicklung, der Organdifferenzierung, der Erhaltung der Organarchitektur und in immunologischen Prozessen. Immunologische Zellfunktionen, die durch Adhäsionsmoleküle beeinflusst werden, sind u.a. die zytotoxische T-Zell-Antwort, die CD4⁺-abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten durch T-Lymphozyten, die Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen, die Phagozytose opsonisierter Partikel durch Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, die antigenpräsentierende Funktion der Makrophagen, die antikörperabhängige Zytotoxizität der Makrophagen und die Aktivierung von Fibroblasten (Hamacher und Schaberg, 1994). Die Adhäsionskaskade ist in Abb. 1 dargestellt.

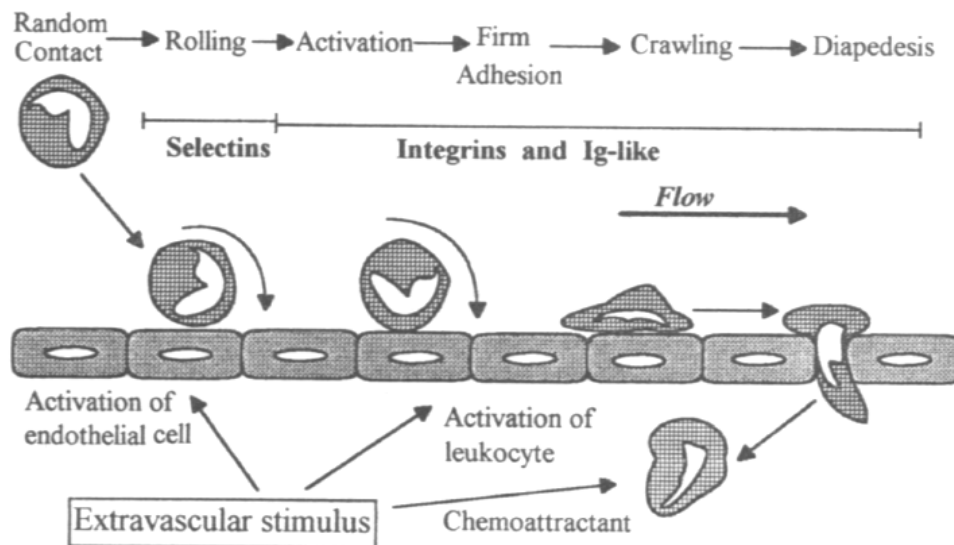


Abb. 1: Darstellung der Adhäsionskaskade am Gefäßendothel [modifiziert nach Carlos und Harlan, 1994]

ICAM-1 wird in sehr vielen Geweben und von verschiedensten Zelltypen exprimiert. Für diese Arbeit von Interesse ist seine Verteilung im Gefäß- und Lungengewebe sowie in Blutzellen. ICAM-1 kommt praktisch in allen Geweben auf Endothelzellen vor, mit Ausnahme der hepatischen Portalvenen und -arterien (Hogg et al., 1991). Den Endothelzellen kommt dabei aufgrund ihrer strategischen Position und Omnipräsenz eine fundamentale regulatorische Rolle in der Leukozytenadhäsion und -migration zu; Vorgänge, die nicht nur bei immunologischen Prozessen von Bedeutung sind, sondern u.a. auch für die Regulation des Gefäßtonus, für die Hämostase sowie die Fibrinolyse (Hamacher und Schaberg, 1994). Unter den Blutzellen findet sich ICAM-1 bei Makrophagen, Leukozyten, Fibroblasten und einigen Zellen der Hämatopoese (Hamacher und Schaberg, 1994; van de Stolpe und van der Saag, 1996). In der Lunge läßt sich ICAM-1 in folgenden Zelltypen nachweisen: Alveolarepithel, teilweise Bronchialepithel, Endothel (Feuerhake et al., 1998) und Alveolarmakrophagen (Hogg et al., 1991). Die ICAM-1-Expression in Alveolarepithelzellen beschränkt sich auf solche, die zu Typ I-Pneumozyten ausdifferenziert sind (Attar et al., 1999; Barton et al., 1995; Christensen et al., 1993; Paine et al., 1994). Die ICAM-1-Expression wird durch verschiedene Mechanismen zellspezifisch verstärkt bzw. induziert. Die universellste und wichtigste positiv verstärkende Rolle kommt dabei den Zytokinen $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und $\text{IFN-}\gamma$ zu. Inhibitorische Wirkung üben v.a. die Glukokortikoide aus.

Auf Endothelzellen haben des weiteren Stoffe wie IL-6, Thrombin, Endothlin 1-3, Östradiol, Lipopolysaccharide und physikalische Faktoren wie „shear stress“ eine induzierende Wirkung auf die ICAM-1-Expression (van de Stolpe und van der Saag, 1996).

Störungen in der ICAM-1-Expression und –Regulation tragen möglicherweise zu einer Vielzahl von Krankheiten bei, darunter entzündliche Erkrankungen (z.B. Asthma bronchiale, Autoimmunerkrankungen), Tumore (z.B. Melanome, Lymphome), Atherosklerose, Ischämie, neurologische Erkrankungen, Komplikationen bei allogenen Organtransplantationen (van de Stolpe und van der Saag, 1996) sowie chronisch obstruktive Bronchitiden, pulmonale Infektionen, Lungenparenchymschäden, Sarkoidose oder idiopathische Lungenfibrose (Hamacher und Schaberg, 1994).

2.3 Grundlegendes zu VEGF

2.3.1 Struktur

VEGF ist ein hitze- und säurestabiles Glykoprotein, bestehend aus einem Disulfid-verknüpften Homodimer. Seine Molekularmasse wird mit 42-46kDa angegeben (Voelkel et al., 1997; Bouszat et al., 2000). VEGF existiert in fünf Isoformen, die durch alternatives Splicing des kodierenden 8-Exon-Genes entstehen. Sie variieren in der Anzahl der Aminosäuren und ihren Sekretionsmustern bei ähnlichen biologischen Fähigkeiten. Die prädominante Isoform ist VEGF₁₆₅ (Exon 6 nicht translatiert) (Kaner und Crystal, 2000), das mit einem isoelektrischen Punkt von 8,5 basische Eigenschaften aufweist und heparinbindend ist, d.h. sich an Heparan-Sulfat-Proteoglykane der Zelloberflächen binden kann. Die kürzeren Varianten VEGF₁₂₁ (Exon 6 und 7 nicht translatiert) und VEGF₁₄₅ (Exon 7 nicht translatiert) haben leicht sauren Charakter und sind nicht heparinbindend. Die längeren Isoformen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ hingegen sind stärker basisch als VEGF₁₆₅ und binden mit noch größerer Affinität an Heparin. Die verschiedenen isoelektrischen Punkte wirken sich auf das Verhalten der translatierten Proteine aus: VEGF₁₂₁ wird sezerniert und ist frei löslich, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ werden ebenfalls sezerniert, aber ein signifikanter Teil bleibt auch an die Zelloberfläche oder an die Extrazellulärmatrix gebunden, wohingegen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ praktisch ausschließlich an die Extrazellulärmatrix gebunden sind. Durch Proteasen können von letzteren allerdings kürzere Fragmente abgespalten werden, wie z.B. VEGF₁₁₀ aus VEGF₁₈₉ (Ferrara, 1993; Neufeld et al.,

1999). Ursprünglich war VEGF als VPF (Vascular permeability factor) beschrieben worden - ein Protein, das die Extravasation von Proteinen aus tumorassoziierten Blutgefäßen unterstützt –, später konnte gezeigt werden, daß VPF und VEGF durch ein einziges Gen kodiert werden. Weiterhin sei erwähnt, dass das VEGF-Protein eine limitierte (18-20%), aber signifikante Homologie mit der A- und B-Kette von PDGF sowie dem Produkt des sis-Onkogens aufweist (Ferrara et al., 1992).

2.3.2 Rezeptoren

Für VEGF sind zwei hochaffine transmembranöse Tyrosinkinase-Rezeptoren beschrieben, nämlich Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1) und KDR/Flk-1 (kinase insert domain-containing receptor/ fetal liver kinase-1) (Boussat et al., 2000). Diese bestehen aus sieben immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Teil, einer transmembranären Sequenz und einer Tyrosinkinase-Sequenz im intrazellulären Part (Ferrara, 1993). Die VEGF-Rezeptoren finden sich vor allem auf Endothelzellen. Flt-1-Rezeptoren sind zusätzlich nachgewiesen für Trophoblastzellen, Monozyten und renale Mesangiumzellen, KDR/Flk-1-Rezeptoren für hämatopoetische Stammzellen, Megakaryozyten und retinale Progenitorzellen. Auch einige tumoröse Zellen können den einen oder anderen Rezeptor exprimieren (Neufeld et al., 1999). Allerdings scheinen alle anderen Zellen außer Endothelzellen keine Fähigkeiten zu besitzen, auf VEGF-Reize hin zu proliferieren. VEGF besitzt zwei separate Domänen, die mit den Rezeptoren interagieren, für Flt-1 Asp(63), Glu(64), Glu(67) und für KDR/Flk-1 Arg(82), Lys(84), His(86). Diese sind auf den gegenüberliegenden Enden des VEGF-Proteins lokalisiert, wobei die beiden Monomere in einer Kopf-Schwanz-Anordnung zueinander liegen, wodurch es zu einem Überlappungsbereich der beiden Rezeptorregionen kommen kann (Neufeld et al., 1999). Auf den Rezeptoren liegen die VEGF-Bindungsstellen in der zweiten und dritten immunglobulinähnlichen Schleife, die vierte Schleife dient eventuell als Dimerisationsdomäne. Die höchste Dichte an Bindungsstellen findet sich in folgenden Organen: Lunge, Gehirn, Rückenmark, Nebennierenrinde, Magendrüsen, Milz, Pankreas und somit sowohl auf fenestrierten (z.B. Hormondrüsen, Niere) als auch auf nicht fenestrierten (z.B. Gehirn) Gefäßen (Ferrara et al., 1992).

2.3.3 Physiologie und Pathophysiologie

Das Besondere an VEGF unter den Wachstumsfaktoren ist sein direkter und spezifischer mitogener Effekt auf Endothelzellen mit einer hohen Zielzellspezifität für diesen Zelltypus. VEGF wird von einer Vielzahl von Zellen produziert, allerdings nach bisherigem Wissen nicht von den Endothelzellen selbst. Es wird von einem parakrinen Wirkmechanismus ausgegangen. Im physiologischen Bereich spielt VEGF eine wichtige Rolle während Entwicklung und Wachstum, bei der Wundheilung sowie im Zyklus des Endometriums. In pathophysiologischer Hinsicht trägt es bei zur Entstehung von Tumoren, Retinopathien, rheumatoiden Artheritiden und der Psoriasis (Ferrara, 1993). Es könnte auch eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Formen der pulmonalen Hypertonie spielen, v.a. solchen mit Endothelzellproliferation (Voelkel et al., 1996). VEGF induziert Zellproliferation und –migration der Endothelzellen und verhindert deren Apoptose; Vorgänge, die in der Vaskulogenese und Angiogenese von Bedeutung sind. Unter der Vaskulogenese versteht man die embryonale in situ-Differenzierung von Mesenchymzellen in Hämangioblasten, die Vorläuferzellen für Endothelzellen und Blutzellen. Diese bilden Zellstränge aus, die bald darauf ein Lumen entwickeln. Die Angiogenese beschreibt hingegen die Formation neuer Blutgefäße durch Sprossung aus präexistentem Endothel; ein Vorgang, der sowohl beim Embryo als auch in den oben genannten physiologischen und pathophysiologischen Situationen beobachtet wird. Die Prozesskaskade besteht hierbei zunächst aus einer Degradation der Extrazellulärmatrix einer lokalen Venole durch die Einwirkung von Proteasen, gefolgt von einer Proliferation der kapillären Endothelzellen und schließlich einer Migration der kapillären Röhren in Richtung des angiogenetischen Stimulus (Ferrara et al., 1992). Zum anderen führt eine VEGF-Einwirkung auf tumoröse Gefäße zu einer erhöhten Permeabilität (daher das Synonym VPF), wodurch es zur vermehrten Extravasation von Blutproteinen und damit zur Bildung eines extravaskulären Fibringels kommt, welches das Wachstum von Endothel- und Tumorzellen unterstützt (Neufeld et al., 1999). Auch die Produktion von VEGF-ähnlichen Proteinen durch Viren kann eine Tumorangiogenese induzieren, so kann z.B. das HIV-1/tat an KDR/Flk-1-Rezeptoren binden, ein Vorgang, der vermutlich mit der Entwicklung des Kaposi-Sarkoms assoziiert ist. Eine vermehrte VEGF-Produktion kann als Antwort auf verschiedene Stimuli erfolgen, wie z.B. Hypoxie, Hypoglykämie, aktivierte Onkogene oder eine Vielzahl von Zytokinen (Neufeld et al., 1999).

2.4 HE-Klassifizierung

Heath und Edwards teilen die histologischen Veränderungen an arteriellen Lungengefäßen, die als Komplikation eines chronisch erhöhten pulmonalarteriellen Druckes bei kongenitalen kardialen Defekten mit Kommunikation zwischen systemischem und pulmonalem Kreislauf auftreten, in sechs Grade ein (Heath und Edwards, 1958).

Gesunde pulmonale Arteriolen bestehen, abgesehen von der Abgangsstelle aus ihrer muskulären Arterie, wo sie auch eine dünne Media besitzen, nur aus einer elastischen Lamina. Muskuläre pulmonale Arterien lassen normalerweise eine deutliche, v.a. aus glatten Muskelzellen bestehende Media erkennen. Die Media gesunder elastischer pulmonaler Arterien besteht hauptsächlich aus elastischen Fibrillen und ist relativ dicker als beim muskulären Typ.

Die HE-Klasse 1 beschreibt Veränderungen im Sinne einer Ausdehnung von glatten Muskelfasern nach distal in pulmonalen Arteriolen sowie einer verdickten Media bei Arteriolen und muskulären Arterien. Die HE-Klasse 2 weist eine zelluläre Intimaprolieration in kleinen muskulären Arterien und Arteriolen auf, die auch zur Okklusion des Gefäßlumens führen kann. In der HE-Klasse 3 kommt es zu einer progressiven Intimafibrose in den kleinen muskulären Arterien und Arteriolen, aber auch zu einem Übergreifen dieser Veränderung auf mittelgroße Arterien (fokale Plaques). Die Intimafibrose ist jetzt v.a. zellulär-fibrös. In den späteren Stadien kommt es, v.a. distal der fibrotischen Okklusionen, zunehmend zu Dilatationen mit Verdünnung der Media und Ausbildung von Mikroaneurysmata. Typisch für die HE-Klasse 4 sind die progressive generelle Arteridilatation, evtl. eine Intimaverdickung und -fibrose mit zwiebelschalenähnlichem Aufbau und sogenannte plexiforme Läsionen, eine Unterform der eben erwähnten dilatativen Läsionen. Die HE-Klasse 5 weist daneben weitere Typen der dilatativen Läsionen auf, wie angiomatoide Läsionen, kavernöse Läsionen und venenähnliche Äste hypertropher muskulärer pulmonaler Arterien. Außerdem kommt es zu einer pulmonalen Hämosiderose, sei es durch Platzen der kleinen dilatierten Gefäße oder durch eine vermehrte Diapedese von Blut. Die HE-Klasse 6 ist gekennzeichnet durch eine nekrotisierende Arteriitis, d.h. einer Muskelnekrose der Gefäße mit umgebender Entzündungsreaktion.

Es sei noch als Anmerkung hinzugefügt, dass heute, anders als bei Heath und Edward, davon

ausgegangen wird, dass die plexiformen Läsionen nicht nur durch eine abnorme Proliferation modifizierter glatter Muskelzellen gebildet werden, sondern dass an ihrer Entstehung auch ein dereguliertes Wachstum von Endothelzellen beteiligt ist (Tuder et al., 1994). Zudem konnte auf molekulargenetischer Ebene ein Unterschied in der Endothelzellproliferation bei der PPH und der SPH nachgewiesen werden. Bei der PPH finden sich nahezu ausschließlich monoklonale Endothelzellproliferate, bei der SPH sind diese hingegen polyklonal. Proliferate glatte Muskelzellen sind bei beiden Krankheitsbildern polyklonal (Lee et al., 1998; Tuder et al., 2001).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den pathophysiologischen Entstehungsmechanismen der pulmonalen Hypertonie im Kindesalter. Die zentrale Frage ist, ob dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 bzw. dem Wachstumsfaktor VEGF eine Rolle innerhalb der multifaktoriellen Entwicklung der pulmonalen Hypertonie zukommen könnte. Die vorliegende Arbeit untersucht mittels eines immunhistochemischen Färbeverfahrens das Vorhandensein von ICAM-1 und VEGF in pulmonalarteriellen Gefäßen bei 30 pädiatrischen Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie unterschiedlicher Schweregrade (HE-Klassen 0-2) bei kongenitalem Herzdefekt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne pulmonalvaskuläre Erkrankung. Die Ergebnisse werden hinsichtlich der erhobenen Diagnose, dem Krankheitsstadium (HE-Klassifizierung), den erhobenen morphometrischen Daten, den Widerstandsverhältnissen, dem pulmonalarteriellen Druck und der zugrunde liegenden Shuntverhältnisse untersucht. Das Besondere dieser Arbeit ist, dass humane Lungenpräparate für die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, wobei sich die pulmonale Hypertonie bei den Patienten *in vivo* entwickelt hatte.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Zur Untersuchung lagen 30 Lungenbiopsien kardiologischer Patienten vor. Die Biopsien stammen aus den Beständen von Frau Prof. H. Fischbach, Pathologisches Institut Spaichingen und Herrn Prof. H.-E. Hoffmeister, emeritierter Direktor der Abt. Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen. Sie waren in den Jahren 1983 und 1984 zu diagnostischen Zwecken während korrekativer oder palliativer Herzoperationen gewonnen worden. Die Präparate waren bereits von Frau Prof. Fischbach und Herrn Prof. em. Hoffmeister histologisch gemäß der Heath-Edwards-Klassifikation (Heath und Edwards, 1958) eingeteilt worden. Es lagen jeweils zehn Biopsien der HE-Klassen 0,1 und 2 vor. Das Alter der Patienten lag zwischen 1 Monat und 15 Jahren, der Altersdurchschnitt betrug bezogen auf alle Patienten $3,7 \pm 0,7$ Jahre. Für Patienten der HE-Klasse 0 lag das mittlere Alter bei $7,3 \pm 1,3$ Jahren, in der HE-Klasse 1 bei $2,8 \pm 1,1$ Jahren und in der HE-Klasse 2 bei $0,9 \pm 0,3$ Jahren. Als Grunderkrankung fanden sich 9 ASDs (25%), 13 VSDs (35%), 6 VSDs + PDAs (17%), 1 VSD + ASD (3%) und 1 pAVK (3%) (s. Abb. 2).

Als Kontrollgruppe dienten postmortale Biopsien von 6 Patienten (17%) aus den Jahren 2000-2003, die an einer nicht pulmonalvaskulären Erkrankung verstorben waren. Die Präparate wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Knöpfle, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Bonn, zur Verfügung gestellt. Die Kontrollgruppe enthält Präparate von fünf Kindern im Früh- bzw. Neugeborenenalter (24. SSW – 43. SSW) sowie Biopsien eines dreijährigen Kindes.

Die Analysen bezüglich der HE-Klassifizierung wurden mit den Daten aller 30 Patienten des Patientenkollektivs und der 6 Patienten der Kontrollgruppe durchgeführt.

Zur Analyse in Bezug auf die hämodynamischen Parameter R_p/R_s (Widerstand zwischen Lungen- und Körperkreislauf), PAPm (pulmonalarterieller Mitteldruck) und Q_p/Q_s (Verhältnis der Lungen- und Körperdurchblutung) standen Daten aus Herzkatheteruntersuchungen von insgesamt 12 Kindern aus dem Patientenkollektiv zur Verfügung. Darunter befanden sich 2 Patienten der HE-Klasse 0, 3 Patienten der HE-Klasse 1 und 7 Patienten der HE-Klasse 2. Als

zugrunde liegende Diagnosen fanden sich 4 ASDs (33%), 5 VSDs (42%) und 3 VSDs + PDAs (25%).

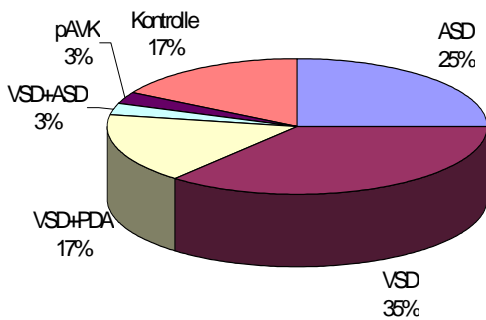


Abb. 2: Verteilung der Diagnosen im gesamten Patientenkollektiv

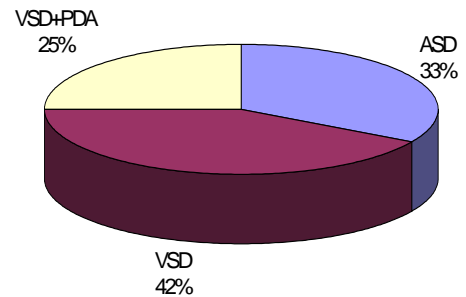


Abb. 3: Verteilung der Diagnosen im Teilpatientenkollektiv, für welches Daten zur hämodynamischen Analyse zur Verfügung standen

3.2 Hämodynamische Daten

Bei den präoperativen Herzkatheteruntersuchungen der Patientengruppe, von denen 12 Untersuchungsprotokolle vorlagen (s.Abs. 3.1) wurden folgende Parameter erhoben:

RVPs [mmHg]	Systolischer rechtsventrikulärer Druck
LVPs [mmHg]	Systolischer linksventrikulärer Druck
PAPs [mmHg]	Systolischer pulmonalarterieller Druck
PAPd [mmHg]	Diastolischer pulmonalarterieller Druck
PAPm [mmHg]	Pulmonalarterieller Mitteldruck
RRs [mmHg]	Systolischer Druck nach Riva-Rocci
RRd [mmHg]	Diastolischer Druck nach Riva-Rocci

RRm [mmHg]	Mittlerer Druck nach Riva-Rocci
Qp/Qs	Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung
Rp/Rs	Widerstandsverhältnis zwischen Lungen- und Körperdurchblutung
PAP/SAP	Verhältnis von pulmonalarteriell zu systemarteriellem Druck
SO ₂ ao [%]	Sauerstoffsättigung in der Aorta
SO ₂ pa [%]	Sauerstoffsättigung in der Pulmonalarterie
LVP-RVP [mmHg]	Druckdifferenz von linkem zu rechtem Ventrikel

Tab. 2: Bei präoperativen Herzkatheteruntersuchungen erhobene hämodynamische Parameter

3.3 Färbemethode

3.3.1 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die Immunhistochemie befasst sich mit Antigenen und Antikörpern sowie deren Wechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit IgG-Immunglobulinen gearbeitet. Diese bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Unterschiede in den schweren Ketten bestimmen die Klasse und Subklasse. Es gibt zwei antigenbindende Fragmente (Fab) und ein kristallines Fragment (Fc). Das IgG-Molekül wird weiter unterteilt in konstante und variable Domänen. Auf den variablen Domänen der leichten und schweren Ketten befinden sich die NH₂-Aminoenden der Polypeptidketten, welche die Antigenbindungsstelle bilden. Die konstanten Regionen der leichten und schweren Ketten enthalten das COOH-Carboxylende des Immunglobulinmoleküls.

Es wird unterschieden zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper (s. Abb. 4a) sind das Produkt eines einzelnen Klons von Plasmazellen. Sie sind in ihren immunochemischen Eigenschaften identisch und reagieren nur mit dem Epitop (struktureller Abschnitt des Antigens, an den der Antikörper bindet) des Antigens, gegen welches sie generiert wurden. Bei dem verwendeten ICAM-1-Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper.

Polyklonale Antikörper (s. Abb. 4b) werden von verschiedenen Plasmazellklonen gebildet und sind somit in ihren immunochemischen Eigenschaften verschieden. Sie reagieren folglich mit verschiedenen Epitopen des Antigens, gegen welches sie generiert wurden. Der verwendete VEGF-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper.

Vorteile der monoklonalen Antikörper sind ihre hohe Homogenität, das Fehlen unspezifischer Antikörper und meist fehlende chargenabhängige Qualitätsschwankungen. Andererseits geht ihre Spezifität verloren, wenn der Antikörper gegen ein Epitop gerichtet ist, das zwei oder mehreren Antigenen gemeinsam ist (Antikörper-Kreuzreaktivität) und sie sind stärker als polyklonale Antikörper von äußeren Faktoren, wie z.B. dem pH-Wert abhängig („Handbuch immunchemischer Färbemethoden“, Dako Corporation).

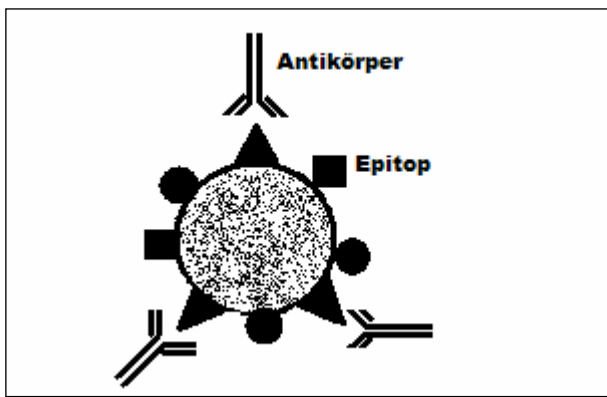


Abb. 4a: Schematische Darstellung monoklonaler Antikörper

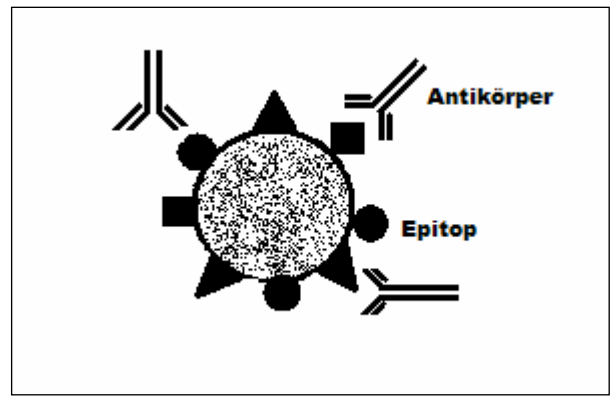


Abb. 4b: Schematische Darstellung polyklonaler Antikörper

3.3.2 Die LSAB-Methode

Die LSAB-Methode (Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode) ist eine immunenzymatische Färbung, die Enzym-Substrat-Reaktionen nutzt, um farblose Chromogene in gefärbte Endprodukte umzuwandeln. Sie basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (Streptomyces avidinii) für Biotin. Enzym und Substrat verbinden sich in Anwesenheit eines Elektronendonors zu einem, meist kurzlebigen, Enzym-Substrat-Komplex, der im weiteren Verlauf der Reaktion unter Oxidation des Elektronendonors zur Entstehung von Endprodukt und Enzym führt. Als Enzym im LSAB-Kit dient HRP (horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase). Dieses besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin) im aktiven Zentrum, welches einen Komplex mit H_2O_2 bildet, der anschließend in H_2O und O_2 zerfällt. HRP ist im LSAB-Kit an Streptavidin konjugiert.

Als Elektronendonator in der oben beschriebenen Reaktion dient im LSAB-Kit DAB (3,3'-Diaminobenzidin), ein Chromogen, das durch die Oxidation in ein braun gefärbtes, unlösliches Endprodukt umgewandelt wird. Um die endogenen Peroxidase-Aktivität im Untersuchungsmaterial zu unterdrücken, werden die Präparate für fünf Minuten mit H_2O_2 inkubiert. Endogene Peroxidase-Aktivität weisen u.a. Erythrozyten (Hämoglobin), Muskelzellen (Myoglobin) sowie Granulozyten und Monozyten (Cytochrom) auf.

Bezogen auf den Antikörpernachweis handelt es sich bei der LSAB-Methode um eine „Drei-Schritt indirekte Methode“ (s. Abb. 4c). Auf einen unkonjugierten Primärantikörper folgt ein biotinmarkierter („biotinylierter“) Brückenantikörper (Link-Antikörper), der gegen den Primärantikörper (jetzt als Antigen zu betrachten) gerichtet ist. Das Tertiärreagenz ist enzymmarkiertes (HRP) Streptavidin. In einem letzten Schritt wird für die Farbreaktion die Substrat-Chromogenlösung benötigt. Die „Drei-Schritt indirekte Methode“ ist um ein Vielfaches empfindlicher als die Anwendung einer direkten Methode - bei der lediglich ein enzymmarkierter Primärantikörper beteiligt ist - da hierbei mehrere Sekundärantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können bzw. mehrere Tertiärantikörper an den Sekundärantikörper binden können. Somit werden insgesamt mehr Enzymmoleküle in Kontakt zum Gewebsantigen gebracht, was eine Signalverstärkung im Sinne einer stärkeren Farbtintensität bewirkt („Handbuch immunchemischer Färbemethoden“, Dako Corporation).

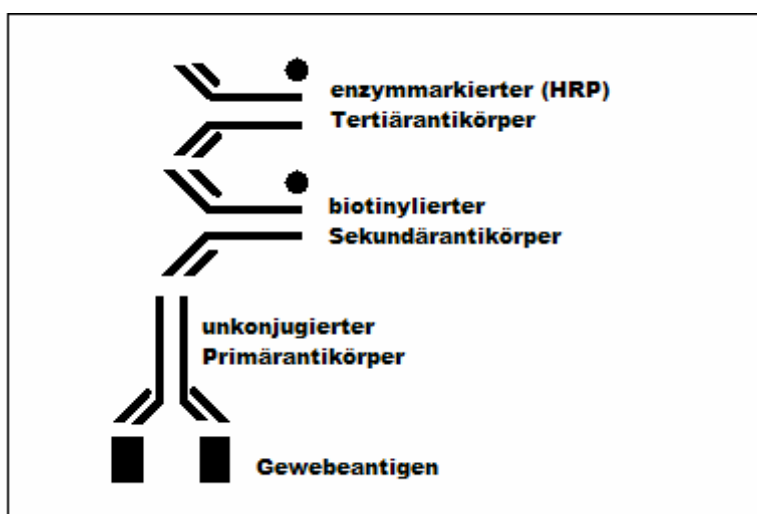


Abb. 4c: Schematische Darstellung der immunenzymatischen Färbung nach der LSAB-Methode (3-Schritt indirekte Methode)

3.3.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die Lungenpräparate waren in Paraffinblöcke eingebettet. Die Schnitte der Patienten- und Kontrollgruppen-Präparate wurden im Institut für Pathologie der Universität Bonn mit dem Mikrotom in einer Dicke von 1-2µm angefertigt und auf Superfrostobjektträger (Menzel Gläser) aufgezogen.

Die weitere Behandlung der Präparate erfolgte gemäß dem in Abb. 5 wiedergegebenen Laborprotokoll und ist im Folgenden beschrieben.

3.3.3.1 Entparaffinisieren und Rehydrieren

Zum Entparaffinisieren und Rehydrieren durchlaufen die Schnitte eine sogenannte absteigende Alkoholreihe. Dabei werden sie zwei mal für fünf Minuten in Xylol (Merck KGaA) gegeben, anschließend für zwei mal drei Minuten in 100%-iges Ethanol (Merck KGaA), dann für einmal drei Minuten in 96%-iges Ethanol (Apotheke der Universitätsklinik Bonn) sowie für zwei mal drei Minuten in 70%-iges Ethanol (Apotheke der Universtiätsklinik Bonn). Anschließend werden sie für zwei mal zwanzig Sekunden in destilliertem Wasser (Aqua ad iniectabilia; Delta-Pharma) gewaschen. Daraufhin werden die Schnitte in einem Gemisch aus 360ml Aqua dest. und 40ml Buffer for Antigen Retrieval (DAKO ChemMate) in einem mikrowelleneigneten Plastikgefäß mit Deckel für vierzehn Minuten in der Mikrowelle (Moulinex Micro-Chef, 850 W) erhitzt. Nachdem die Präparate für fünfzehn bis zwanzig Minuten in der Flüssigkeit abgekühlt haben, werden sie erneut kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Alle ab jetzt folgenden Schritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte während des Färbevorgangs zu verhindern.

3.3.3.2 Färbung mit dem DAKO LSAB-Kit

Zunächst werden die Präparate auf den Objektträgern mit dem DAKO Pen (DAKO Cytomation) umrandet und dann in einem ersten Schritt für fünf Minuten mit 3%-igem H₂O₂ (DAKO Corporation) gut bedeckt. Sodann werden sie tropfenweise mit PBS (Invitrogen Corporation) abgespült und für fünf Minuten ins PBS-Pufferbad gegeben. Zur Reduktion der unspezifischen

Hintergrundfärbung werden die Schnitte für acht Minuten mit einem Proteinblock (DAKO Protein Block Serum-Free) behandelt. Dieser wird mit PBS abgespült und die Schnitte werden für fünf Minuten im Pufferbad belassen. Anschließend erfolgt die dreißigminütige Inkubation mit dem Primärantikörper. Dabei wird ICAM-1 (Mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) in einer Konzentration von 1:200 bzw. VEGF (Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Die Verdünnung der Antikörper erfolgt durch Mischung mit AntibodyDiluent (DAKO ChemMate). Die optimale Antikörperverdünnung, mit dem Ziel einer deutlichen spezifischen Anfärbung bei möglichst geringer Hintergrundfärbung, war zuvor durch Färbereihen mit Variation der Antikörperkonzentration und der Inkubationszeit ermittelt worden. Nachfolgend werden die Schnitte wiederum mit PBS abgespült und für fünf Minuten in die Pufferlösung verbracht. Es folgt die fünfzehnminütige Inkubation mit dem Brückenantikörper (Link, DAKO Corporation). Dieser wird dann ebenfalls mit PBS abgespült und die Schnitte für fünf Minuten ins PBS gegeben. Im Anschluß daran werden die Präparate mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für fünfzehn Minuten inkubiert. Es erfolgt erneut das Abspülen und fünfminütige Waschen im PBS-Pufferbad. Schließlich werden die Präparate für fünf Minuten mit der DAB Substrat-Chromogen-Lösung bedeckt. Diese wurde zuvor aus einem Milliliter Buffered Substrate for Liquid DAB (DAKO Corporation) und einem Tropfen Liquid DAB-Chromogen (DAKO Corporation) hergestellt und lichtgeschützt aufbewahrt. Nachfolgend werden die Schnitte noch einmal mit PBS abgespült und für fünf Minuten in der Pufferlösung gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgt durch dreimaliges kurzes Eintauchen in Hämatoxylin (DAKO ChemMate). Anschließend wird das überschüssige Hämatoxylin unter fließendem Leitungswasser abgespült und die Schnitte bis zum Eindecken in Aqua dest. aufbewahrt. Das Eindecken erfolgt mit Hilfe eines wässrigen Eindeckmediums (DAKO Faramount Aqueous Mounting Medium) und Deckgläsern der Firma Marienfeld.

Laborprotokoll**Präp.-Nr.:****Datum:**

Arbeitsschritt	Anzahl	Minuten	Konzentration	Substanz	Anmerkung
<u>Entparaffinieren und Rehydrieren</u>	2	5	/	Xylol	
	2	3	100%	Ethanol	
	1	3	96%	Ethanol	
	2	3	70%	Ethanol	
	2	20 sec.	/	Aqua dest.	Waschen
<u>Mikrowelle</u>	1	14		40ml Target-Retrieval-Puffer+ 360ml Aqua dest.	Erhitzen
		15-20			Abkühlen
				Aqua dest.	Waschen
<u>ab jetzt in feuchter Kammer</u>					
					markieren mit Dako-Pen
	1	5	3%	H ₂ O ₂	gut bedecken
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	1	8		Proteinblock	
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	1	30	ICAM-1:1:200 VEGF: 1:100	Primärantikörper	Inkubieren
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	1	15		Brückenanti-Körper	Inkubieren
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	1	15		Streptavidin-Peroxidase-Konj.	Inkubieren
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	1	5		Substrat-Chromogen-Lsg.	Inkubieren
	1	5		PBS	waschen und in Pufferbad geben
	3			Hämatoxylin	kurz eintauchen
				Leitungswasser	Spülen
				Aqua dest.	aufbewahren bis zum Eindecken
<u>Eindecken</u>				wässriges Eindeckmedium	

Abb. 5: Verwendetes Laborprotokoll zur Darstellung der Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung

3.3.4 Materialien

Materialien	Hersteller
ICAM-1 (G-5) Mouse monoclonal IgG _{2a} (200µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology Sc-8439
VEGF (A-20) Rabbit polyclonal IgG (200µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology Sc-152
DAKO ChemMate™ AntibodyDiluent (250 ml)	DakoCytomation Denmark A/S Code No. S2022
DAKO ChemMate™ Buffer for Antigen Retrieval (0,5l)	DakoCytomation Denmark A/S Code No. S2031
DAKO® Protein Block Serum-Free (15ml)	DAKO Corporation, Carpinteria, Ca Code No. X0909
DAKO LSAB® + System, HRP (15ml) <i>Enthält:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Hydrogen Peroxide (15ml) • Link (15ml) • Streptavidin HRP (15ml) • Buffered Substrate for Liquid DAB+ (18ml) • Liquid DAB+ Chromogen (1ml) 	DAKO Corporation, Carpinteria, Ca Code No. 0679 Item No. 004400 Code No. K0679, Item No. 002263 Code No. K0679, Item No. 002274 Item No. 003186 Item No. 003187
DAKO ChemMate™ Hematoxylin (HEMA) (500ml)	DakoCytomation, Denmark A/S Code No. S2020
DAKO Pen	DakoCytomation, Denmark A/S Code No. S2002
DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium (15ml)	DAKO Corporaion, Carpinteria, CA Code No. S3025, Item No. 002972
GIBCO™ Phosphate Buffered Saline, 7.4 (500ml)	Invitrogen Corporation, UK Cat. No 10010-015
Xylol (Xylene GR for analysis ACS, ISO) (1l)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany 1.08681.1000
Ethanol absolute GR for analysis ACS, ISO (1l)	Merck KgaA, Darmstadt, Germany 1.00983.1011
Alkohol 96% (1l)	Apotheke der Universitätsklinik Bonn
Alkohol, vergällt 70% (Aethanol-/ Wasser-Gemisch) (1l)	Apotheke der Universitätsklinik Bonn
Aqua dest. (Aqua ad iniectabilia Delta-Pharma) (1l)	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen (Bochring Ingelheim) Zul.-Nr. 6186461.00.00

Objektträger Super Frost®Plus 72 Stück 25 x 75x 1,0 mm	Menzel-Gläser, Germany Art.No. 041300
Deckgläser 100 Stück 24 x 40mm, No.1	Marienfeld Supe-Rior, Germany
Pipetten • 0,5µl – 10µl • 10µl – 100 µl • 200 µl – 1.000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen • 0,5 µl – 10µl	Greiner bio-one Item.Nr. 765290
Pipettenspitzen • 10µl – 100 µl • 200µl – 1.000µl	Eppendorf
Plastik-Einmalpipetten	Labomedic
Parafilm® „M“ (Laboratory Film) 4 IN. x 125 Ft. Roll	Pechiney Plastic Packaging, Chicago PM-996
Mikrowellengefäß mit Deckel (0,5l)	Emsa-Superline, Germany 03271
Meßzylinder 1.00ml	
Reagenzgefäße	
Objektträgerhalter	
Feuchte Kammer	
Eppendorfggefäße	
Mikrowelle Moulinex 850 W Micro-Chef FM 3710A Electronic	Moulinex
Mikroskop Leica DML	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany
Hitachi 3 CCD-Farbkamera Modell HV-C20A	Hitachi
PC	HP Vectra Vli 8
Bildschirm	Eizo Flex Scan T561
PC-Programm DISKUS („Programm zur Aufnahme und Dokumentation mikroskopischer Bilder“ – Programm-Version 4.20)	C.H. Hilgers, Technisches Büro 53639 Königswinter, Germany
Excel 97®	Microsoft Corporation, USA
SPSS 10.0® für Windows	SPSS Software Inc., Chicago, Illinois
Prism 3.0®	GraphPad Software Inc., San Diego

Tab. 3: Auflistung der für die immunhistochemischen Färbungen und deren Auswertung verwendeten Materialien

3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Auflichtmikroskop (Leica Microsystems Wetzlar GmbH) unter Verwendung von 10er, 40er und 100er Objektiven untersucht und ausgewertet. Eine installierte CCD-Farbkamera (Hitachi, Modell HV-C20A) ermöglichte die digitale Dokumentation der Bilder. Alle Fotos wurden unter Verwendung des 40er-Objektivs erstellt und mit einer individuellen Identifikationsnummer versehen. Insgesamt wurden 573 Fotos von pulmonalen Arterien angefertigt und analysiert (270 aus der ICAM-1-Färbung und 303 aus der VEGF-Färbung). Nach Möglichkeit wurden in jedem Präparat annähernd gleich viele kleine, mittelgroße und große Gefäße aus verschiedenen Bereichen des Objekts digital dokumentiert. Die Fotos wurden im PC-Programm DISKUS 4.20 (Hilgers Technisches Büro, Königswinter) gespeichert und ausgewertet. Das Programm ermöglicht eine automatische Schärfeneinstellung und einen automatischen Weißabgleich. Desweiteren ist die direkte Vermessung von Strecken, Umfängen und Flächen möglich. Auf diese Weise wurden der Gefäßdurchmesser sowie der Umfang und die Fläche des Gefäßlumens ermittelt. Zur Bestimmung der Gefäßwanddicke wurde diese an vier verschiedenen Stellen radial vermessen und der Mittelwert aus den vier resultierenden Werten errechnet. Zur Bestimmung der Intensität der Anfärbung wurden für die ICAM-1- und die VEGF-Färbung jeweils drei digitale Bilder von Gefäßen bestimmt und die Intensität der Endothelanfärbung als schwache, mittelstarke bzw. starke Anfärbung definiert. Diese Bilder dienten im Folgenden als Referenzbilder zur Bestimmung der Anfärbungsintensität der weiteren Gefäße. Die Referenzbilder sind in den Abb. 6 - 13, unter Punkt 4.1 der Arbeit, abgebildet.

3.5 Statistische Auswertung

Die Datenbank wurde mit dem PC-Programm Microsoft Excel 97® (Microsoft Corporation) erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0® für Windows (SPSS Software Inc.).

Datendeskription: Innerhalb der verschiedenen statistischen Analysen wurden folgende statistische Kenngrößen erhoben: Fallzahl (n), Summe (Σ), Mittelwert (MW),

Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sowie der kleinste (Min) und der größte (Max) Wert.

Die Daten sind im Folgenden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) angegeben.

Es erfolgten Analysen bezüglich der vorliegenden Diagnosen, der HE-Klassifizierung (HE), des Widerstandsverhältnisses zwischen Lungen- und Körperdurchblutung (Rp/Rs), des systolischen pulmonalarteriellen Drucks (PAPs) sowie bezüglich des Shuntverhältnisses der Lungen- zur Körperdurchblutung (Qp/Qs).

Zur statistischen Auswertung bezüglich der HE-Klassifizierung wurde für Patienten, die keine pulmonalvenösen Veränderungen aufwiesen, eine HE-Klasse 0 definiert.

Für die Analyse bezüglich des Widerstandsverhältnisses erfolgte eine Einteilung des Patientenkollektivs nach den bei der Herzkatheteruntersuchung ermittelten Werten für Rp/Rs in drei Gruppen: Rp/Rs $<0,25$, Rp/Rs $0,25-0,35$ und Rp/Rs $>0,35$.

Für die Analyse bezüglich des systolischen pulmonalarteriellen Druck wurde das Patientenkollektiv ebenfalls anhand der Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchung in drei Gruppen eingeteilt: PAPs $<30\text{mmHg}$, PAPs $30-65\text{mmHg}$ sowie PAPs $>65\text{mmHg}$.

Ebenso wurde bei der Einteilung für die Analyse bezüglich des Verhältnisses Lungen- zu Körperdurchblutung verfahren. Es ergab sich die folgende Gruppeneinteilung: Qp/Qs <2 , Qp/Qs $2-3$ und Qp/Qs >3 .

Die statistische Prüfung auf Signifikanz erfolgte mittels t-Tests mit Bonferroni-Adjustierung. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Es wurden folgende Signifikanzniveaus definiert:

nicht signifikant	Signifikant
$p > 0,05$	$p < 0,05$

Tab. 3: Definition des Signifikanzniveaus für die statistische Auswertung

Die Grafiken wurden mit dem PC-Programm Prism3.0® (GraphPad Software Inc.) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung

Die Abbildungen (Abb.) 6 – 13 zeigen exemplarisch Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen. Die arteriellen Gefäße der Abb. 6-8 zeigen eine spezifische Anfärbung für ICAM-1 im Bereich des Endothels. Diese Bilder dienen in der Auswertung aller mit ICAM-1-Primärantikörper gefärbten Präparate als Referenzabbildungen. Die Abb. 6 wurde als schwach angefärbt definiert, die Abb. 7 als mittelstark und die Abb. 8 als stark gefärbt. Nebenbefundlich zeigt sich eine spezifische Anfärbung im Alveolarepithel, die bei ICAM-1 stärker ausgeprägt ist als bei VEGF. Hierbei sei erwähnt, dass in der Literatur eine immunhistochemische Studie über die Verteilung von ICAM-1 in pulmonalen Blutgefäßen existiert, die beschreibt, dass die vaskuläre Endothelanfärbung insgesamt sogar schwächer ausgefallen sei, als die Anfärbung des Alveolarepithels (Feuerhake et al., 1998). Des Weiteren findet sich in den ICAM-1-Färbungen trotz Optimierung der Antikörperkonzentration eine relativ ausgeprägte unspezifische Hintergrundfärbung. Abb. 9 demonstriert eine Negativkontrolle, d.h. im zugrunde liegenden Färbeprozess wurde kein ICAM-1-Primärantikörper verwendet; dieser wurde durch AntibodyDiluent (DAKO ChemMate) ersetzt. Abb. 9 weist keinerlei spezifische oder unspezifische Färbung für ICAM-1 auf.

Die arteriellen Gefäße auf den Abb. 10-13 zeigen eine spezifische Anfärbung für VEGF im Bereich des Endothels. Auch bei diesen Abbildungen fand eine Einteilung in „schwache Anfärbung“ (Abb. 10), „mittelstarke Anfärbung“ (Abb. 11) und „starke Anfärbung“ (Abb. 12) statt. Die Bilder wurden als Referenzabbildungen für die Bestimmung der Anfärbungsintensität aller mit VEGF-Primärantikörper behandelten Präparate verwendet. Nebenbefundlich zeigt sich in allen drei Abbildungen eine VEGF-positive Anfärbung vereinzelter Pneumozyten. Abb. 13 bildet eine Negativkontrolle aus der VEGF-Färbereihe ab. Hier wurde anstelle des VEGF-Primärantikörpers AntibodyDiluent (DAKO ChemMate) verwendet. Es zeigt sich dabei keine spezifische oder unspezifische Anfärbung für VEGF.

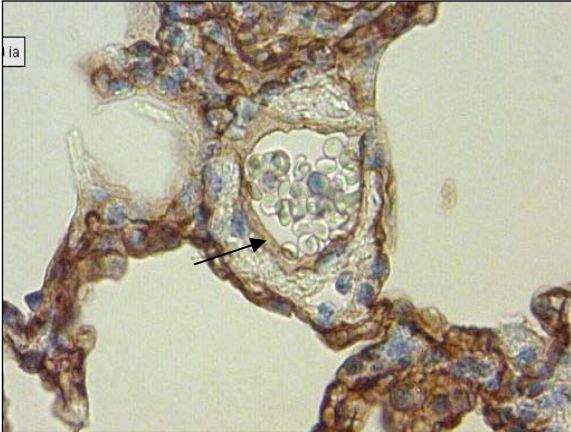


Abb. 6: ICAM-1-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer schwachen Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

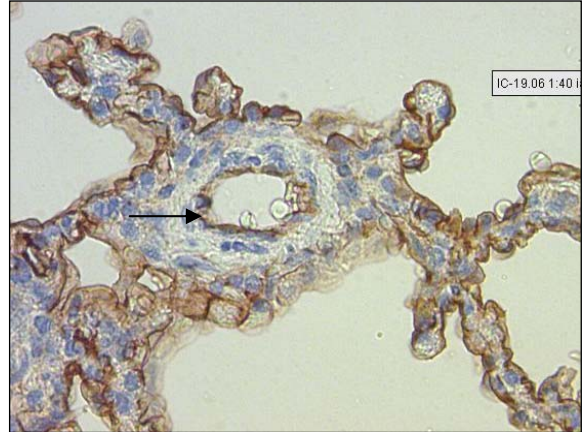


Abb. 7: ICAM-1-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer mittelstarken Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

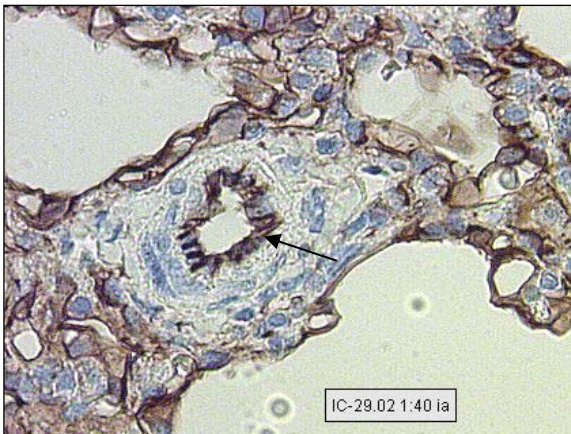


Abb. 8: ICAM-1-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer starken Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

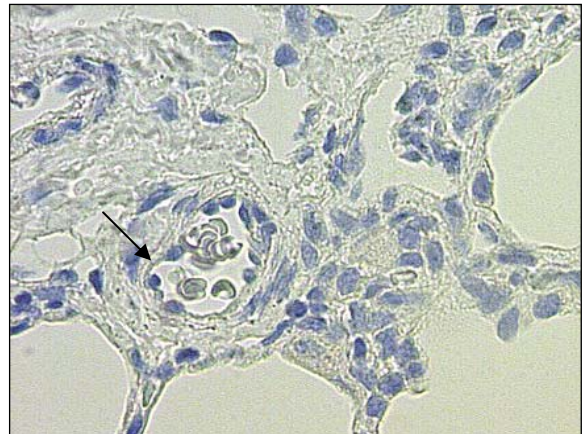


Abb.9: ICAM-1-Färbung – Negativkontrolle. Keine spezifische Anfärbung für ICAM-1 im pulmonalarteriellen Endothel

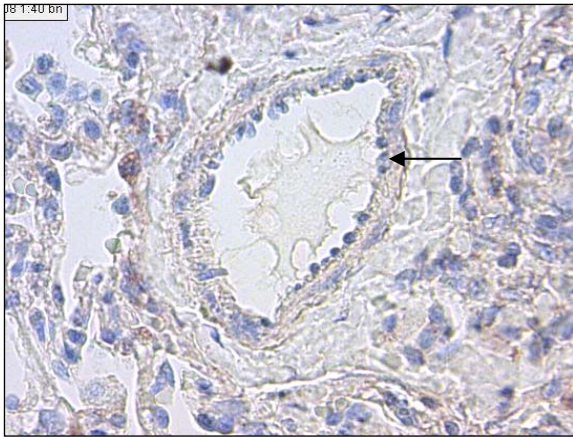


Abb. 10: VEGF-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer schwachen Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

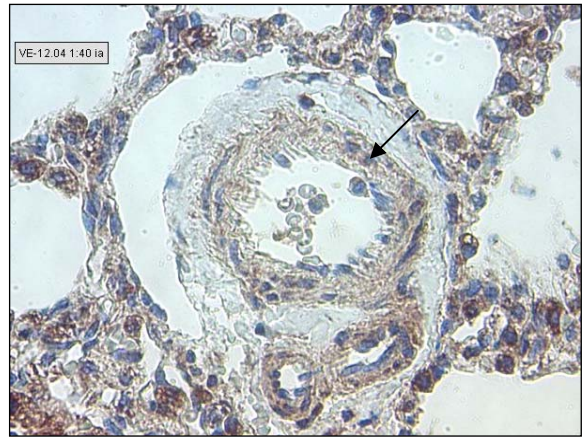


Abb. 11: VEGF-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer mittelstarken Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

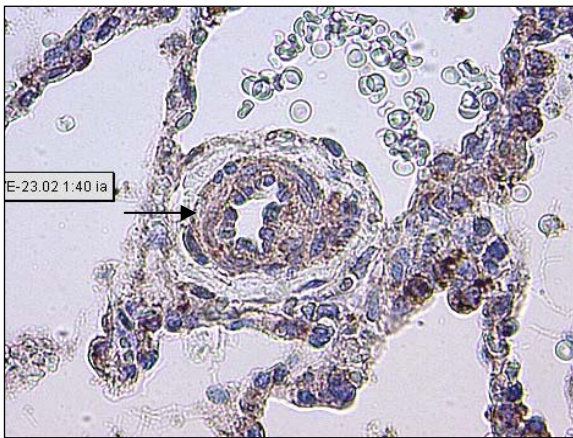


Abb. 12: VEGF-Färbung – Referenzabbildung zur Definition einer starken Anfärbung im pulmonalarteriellen Endothel

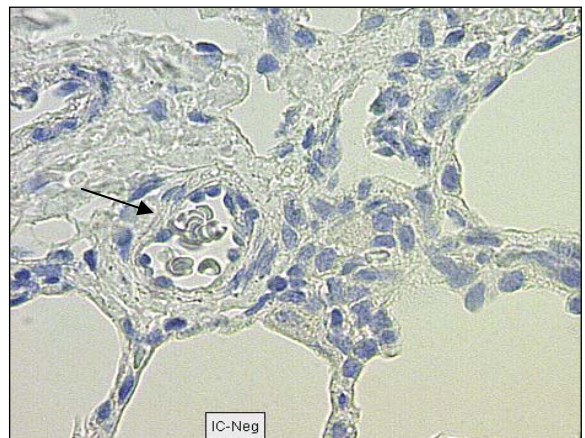


Abb. 13: VEGF-Färbung - Negativkontrolle. Keine spezifische Anfärbung für VEGF im pulmonalarteriellen Endothel

4.2 Analyse bezüglich der vorliegenden Diagnosen

Hämodynamische (Teilkollektiv) und morphologische (Gesamtkollektiv) Parameter	VSD/ VSD+PDA	ASD	Kontrollgruppe
RVPs [mmHg]	72,63 ± 7,36	35,5 ± 5,50	-
LVPs [mmHg]	89,75 ± 4,28	105,00 ± 10,00	-
PAPs [mmHg]	62,63 ± 7,20	27,00 ± 1,00	-
PAPd [mmHg]	22,38 ± 3,50	10,00 ± 0,00	-
PAPm [mmHg]	38,75 ± 4,98	18,5 ± 0,50	-
Qp/Qs	2,15 ± 0,18	3,15 ± 0,55	-
Rp/Rs	0,26 ± 0,05	0,07 ± 0,01	-
PAP/SAP	0,71 ± 0,08	0,26 ± 0,02	-
SO _{2ao} [%]	93,25 ± 1,40	95,50 ± 0,50	-
SO _{2pa} [%]	82,63 ± 1,81	87,50 ± 2,50	-
HE-Klasse	1,63 ± 0,18	0,00 ± 0,00	-
Fläche Gefäßlumen [μm^2] (ICAM)	1431,00 ± 167,40	2019,00 ± 196,90	550,50 ± 93,42
Fläche Gefäßlumen [μm^2] (VEGF)	1157,00 ± 127,90	2047,01 ± 204,60	889,3 ± 124,7
Umfang Gefäßlumen [μm] (ICAM-1)	139,60 ± 8,35	171,00 ± 12,11	78,62 ± 5,81
Umfang Gefäßlumen [μm] (VEGF)	129,80 ± 7,34	162,70 ± 8,39	111,7 ± 9,50
Dicke der Gefäßwand [μm] (ICAM-1)	14,33 ± 0,62	9,02 ± 0,76	8,00 ± 0,49
Dicke der Gefäßwand [μm] (VEGF)	14,19 ± 0,51	10,52 ± 0,42	9,16 ± 0,58
Intensität der Anfärbung (ICAM-1)	2,35 ± 0,06	1,65 ± 0,09	1,65 ± 0,12
Intensität der Anfärbung (VEGF)	1,75 ± 0,06	1,18 ± 0,05	1,19 ± 0,06

Tab. 4: Hämodynamische und morphometrische Daten geordnet nach Diagnosen

Der voranstehenden Tabelle 5 sind die hämodynamischen und morphometrischen Daten nach Diagnosen geordnet zu entnehmen. Bei den Patienten mit VSD/ VSD + PDA zeigt sich eine Erhöhung der Werte für RVP, PAPs, PAPd und PAPm sowie für Rp/Rs und für PAP/SAP gegenüber den Patienten mit ASD. Außerdem sind die Patienten mit VSD/ VSD + PDA im Durchschnitt höheren HE-Klassen zugeordnet als die Patienten mit ASD. Beim ASD liegen die Werte für LVP, Qp/Qs sowie für SO_{2ao} und SO_{2pa} höher als bei den Patienten mit VSD/ VSD + PDA.

In Bezug auf die morphometrischen Daten ergibt sich für die Präparate der VSD-/ VSD + PDA-Patienten eine signifikant höhere Anfärbungsintensität des pulmonalen Gefäßendothels im

Vergleich zu den ASD-Patienten und der Kontrollgruppe und zwar sowohl für die ICAM-1- als auch für die VEGF-Färbung. Zudem ist die Dicke der Gefäßwand bei Patienten mit VSD/ VSD + PDA im Vergleich zu den Patienten mit ASD bzw. im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vergrößert. Fläche und Umfang des Gefäßlumens sind bei den VSD-/ VSD + PDA-Patienten kleiner als bei den ASD-Patienten. Die sowohl im Vergleich zur VSD-/ VSD + PDA-Gruppe als auch im Vergleich zur ASD-Gruppe signifikant kleineren Werte für Fläche und Umfang des Gefäßlumens in der Kontrollgruppe dürften auf das niedrigere Durchschnittsalter der Patienten aus der Kontrollgruppe zurückzuführen sein. Die hohen Werte für Fläche und Umfang des Gefäßlumens in der Gruppe der ASD-Patienten dürften zusätzlich mit dem bei ASD erhöhten Lungendurchfluß zusammenhängen (Qp/Qs $3,15 \pm 0,55$ bei ASD versus Qp/Qs $2,15 \pm 0,18$ bei VSD/ VSD + PDA).

4.3 Analyse bezüglich der HE-Klassifizierung

4.3.1 Gefäßdurchmesser

Abb. 14a zeigt für ICAM-1 eine Abnahme des Gefäßdurchmessers mit steigender HE-Klasse. Die Mittelwerte des Gefäßdurchmessers betragen für die Klasse HE 0 $44,55 \pm 2,19\mu\text{m}$, in der Klasse HE 1 $37,55 \pm 2,90\mu\text{m}$, in der Klasse HE 2 $31,15 \pm 2,66\mu\text{m}$ und $20,61 \pm 1,88\mu\text{m}$ in der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergeben sich beim Vergleich zwischen den Klassen HE 0 und HE 2 sowie zwischen den Klassen HE 0 bzw. HE 1 und der Kontrollgruppe.

Abb. 14b demonstriert für VEGF ebenfalls eine Verkleinerung des Gefäßdurchmessers mit steigender HE-Klassifizierung. Die mittleren Gefäßdurchmesser liegen bei $42,73 \pm 2,35\mu\text{m}$ in der HE-Klasse 0, bei $34,63 \pm 2,64\mu\text{m}$ für die HE-Klasse 1, in der HE-Klasse 2 bei $30,53 \pm 2,38\mu\text{m}$ und schließlich bei $30,50 \pm 2,74\mu\text{m}$ in der Kontrollgruppe. Eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme des Gefäßdurchmesser besteht zwischen den HE-Klassen 0 und 2 sowie zwischen der HE-Klasse 0 und der Kontrollgruppe.

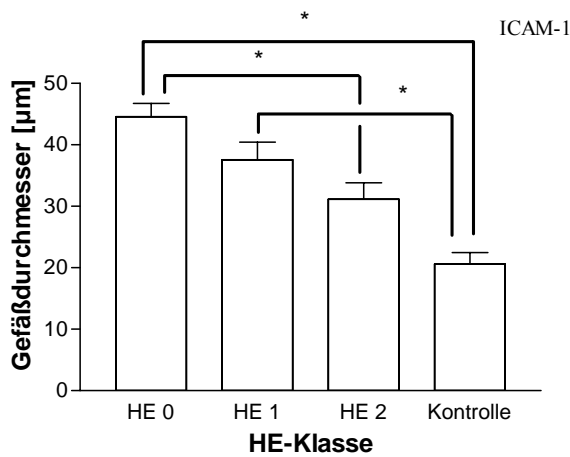


Abb. 14a: Darstellung des Gefäßdurchmessers bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1-Färbung (* = $p < 0,05$)

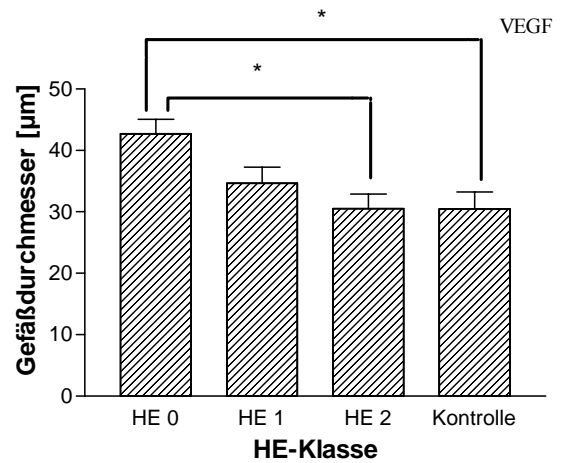


Abb. 14b: Darstellung des Gefäßdurchmessers bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.2 Umfang und Fläche des Gefäßlumens

Abb. 15a zeigt für ICAM-1 eine Abnahme des Umfangs des Gefäßlumens mit steigender HE-Klasse. Eine Signifikanz ($p < 0,05$) kann nicht nachgewiesen werden. Im Mittel betragen die Werte für den Umfang des Gefäßlumens $162,83 \pm 8,02\mu\text{m}$ in der HE-Klasse 0, $155,41 \pm 13,34\mu\text{m}$ in der HE-Klasse 1 und $133,39 \pm 11,40\mu\text{m}$ für Proben der HE-Klasse 2. In der Kontrollgruppe beträgt der Mittelwert für den Umfang des Gefäßlumens $78,62 \pm 5,81\mu\text{m}$, dieser erweist sich als signifikant ($p < 0,05$) kleiner im Vergleich zu den HE-Klassen 0, 1 und 2.

Für VEGF zeigt sich eine deutliche Verkleinerung des Umfangs des Gefäßlumens mit steigender HE-Klasse. Die Mittelwerte fallen von $162,71 \pm 8,39\mu\text{m}$ für HE 0, über $136,85 \pm 10,40\mu\text{m}$ für HE 1 auf $123,55 \pm 10,35\mu\text{m}$ in der HE-Klasse 2 ab. Als signifikant ($p < 0,05$) erweist sich dieser Unterschied zwischen den Klassen HE 0 und HE 2. In der Kontrollgruppe findet sich ein Mittelwert für den Umfang des Gefäßlumens von $111,71 \pm 9,50\mu\text{m}$, ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergibt sich hierbei zur HE-Klasse 0.

Abb. 15b zeigt für die Fläche des Gefäßlumens bei ICAM-1 eine geringfügige Abnahme der mittleren Fläche in der Klasse HE 2 im Vergleich zu den Klassen HE 1 und HE 0. Die Mittelwerte für die Gefäßlumenfläche betragen $2087,64 \pm 213,79 \mu\text{m}^2$ für HE 0, $2146,92 \pm 384,62 \mu\text{m}^2$ für HE 1 und $1699,20 \pm 322,55 \mu\text{m}^2$ für HE 2. In der Kontrollgruppe zeigt sich ein im Vergleich zu HE 0 und HE 1 signifikant ($p < 0,05$) kleinerer Mittelwert für die Fläche des Gefäßlumens von $550,48 \pm 93,42 \mu\text{m}^2$. Zwischen der Kontrollgruppe und der HE-Klasse 2 besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Für VEGF zeichnet sich eine Abnahme der Fläche des Gefäßlumens mit steigender HE-Klasse ab. Eine Signifikanz kann nicht gezeigt werden ($p > 0,05$).

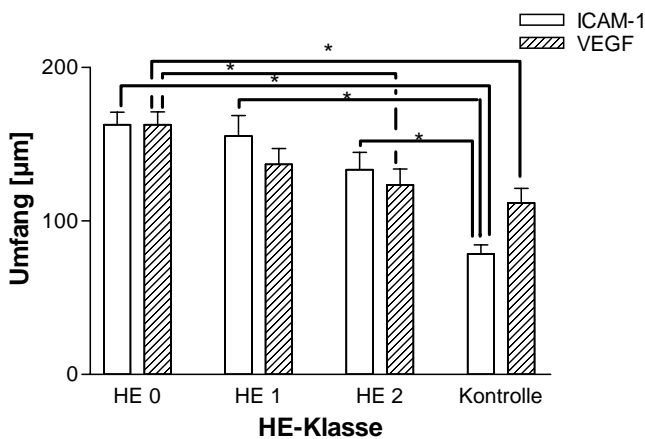


Abb. 15a: Darstellung des Umfangs des Gefäßlumens bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

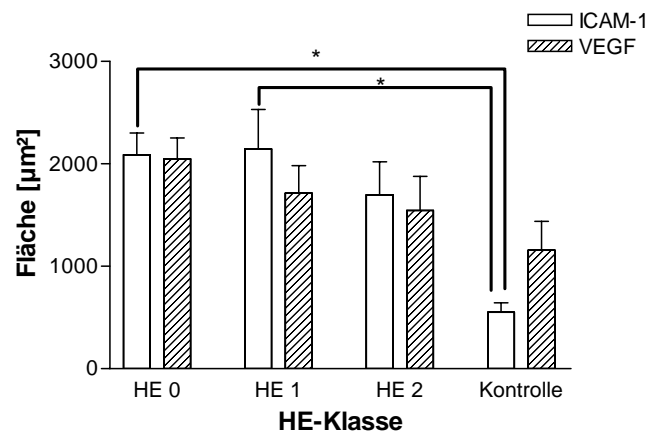


Abb. 15b: Darstellung der Fläche des Gefäßlumens bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.3 Dicke der Gefäßwand

Abb. 16a zeigt für ICAM-1 eine signifikant ($p < 0,05$) größere Dicke der Gefäßwand bei den HE-Klassen 1 und 2 im Vergleich zur HE-Klasse 0 und der Kontrollgruppe. Die durchschnittliche Gefäßwanddicke beträgt in der HE-Klasse 0 $7,93 \pm 0,29 \mu\text{m}$, in HE 1 $14,03 \pm 0,93 \mu\text{m}$, in HE 2

14,78 ± 0,85µm und 7,99 ± 0,49µm in der Kontrollgruppe. Zwischen den Klassen HE 1 und HE 2 sowie zwischen HE 0 und der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in der Dicke der Gefäßwand, allerdings stellt sich eine Tendenz zu einer größeren Gefäßwanddicke in der Klasse HE 2 im Vergleich zu HE 1 dar.

Abb. 16b demonstriert für VEGF ebenfalls eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Gefäßwanddicke in den HE-Klassen 1 und 2 im Vergleich zur HE-Klasse 0 und dem Kontrollkollektiv. Zwischen der Klasse HE 0 und der Kontrollgruppe sowie zwischen den Klassen HE 1 und HE 2 ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede.

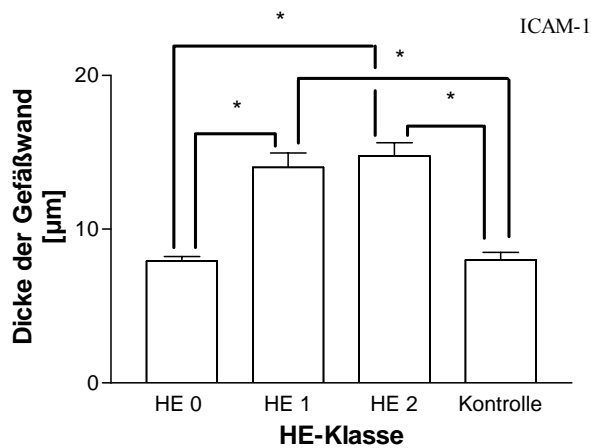


Abb. 16a: Darstellung der Dicke der Gefäßwand bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1-Färbung (* = $p < 0,05$)

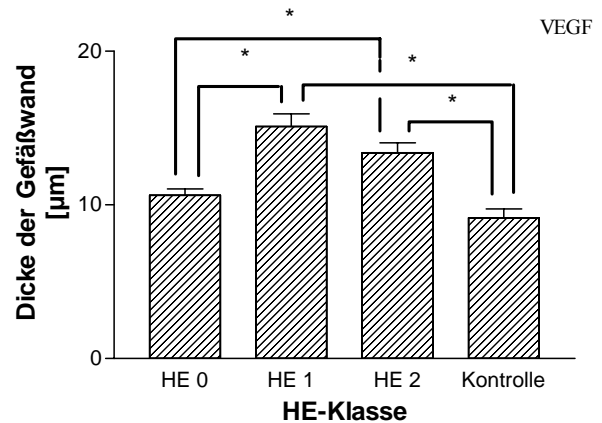


Abb. 16b: Darstellung der Dicke der Gefäßwand bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.4 Dicke der Gefäßwand untergliedert nach der Gefäßgröße

Abb. 17a zeigt für ICAM-1 die mittlere Gefäßwanddicke bezogen auf die HE-Klasse sowie untergliedert nach Gefäßgrößen. Dazu wurden alle untersuchten Gefäße in kleine (Gefäßdurchmesser $< 22\mu\text{m}$), mittelgroße (Gefäßdurchmesser $22-36\mu\text{m}$) und große (Gefäßdurchmesser $> 36\mu\text{m}$) Gefäße gruppiert. In der HE-Klasse 0 zeigt sich eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Gefäßwanddicke mit zunehmender Gefäßgröße. Die mittlere

Gefäßwanddicke beträgt für kleine Gefäße $1,50 \pm 0,29\mu\text{m}$, für mittelgroße $1,59 \pm 0,14\mu\text{m}$ und für große Gefäße $1,46 \pm 0,09\mu\text{m}$. In der HE-Klasse 1 läßt sich eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Dicke der Gefäßwand zwischen kleinen und großen bzw. mittelgroßen und großen Gefäßen nachweisen. Die Durchschnittswerte liegen bei $2,43 \pm 0,13\mu\text{m}$ für kleine, $2,00 \pm 0,13\mu\text{m}$ für mittelgroße und $2,12 \pm 0,10\mu\text{m}$ für große Gefäße. In der HE-Klasse 2 ist die mittlere Gefäßwanddicke bei den mittelgroßen Gefäßen mit $2,69 \pm 0,09\mu\text{m}$ signifikant ($p < 0,05$) kleiner als in den Gruppen der kleinen (Gefäßwanddicke $2,76 \pm 0,08\mu\text{m}$) und der großen (Gefäßwanddicke $2,21 \pm 0,18\mu\text{m}$) Gefäßen. Bei den großen Gefäßen ist die Dicke der Gefäßwand signifikant ($p < 0,05$) größer als bei den kleinen Gefäßen. Auch in der Kontrollgruppe weisen die mittelgroßen Gefäße eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Gefäßwanddicke auf als die kleinen und großen Gefäße, zwischen denen in diesem Fall kein signifikanter Unterschied besteht ($p > 0,05$). Die Mittelwerte liegen bei $1,48 \pm 0,12\mu\text{m}$ für kleine, $1,90 \pm 0,28\mu\text{m}$ für mittelgroße sowie $2,50 \pm 0,50\mu\text{m}$ für große Gefäße.

Abb. 17b stellt für VEGF die mittlere Gefäßwanddicke bezogen auf die HE-Klasse sowie untergliedert nach Gefäßgrößen dar. In der HE-Klasse 0 zeigt sich eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Gefäßwanddicke von den kleinen bzw. mittelgroßen Gefäßen hin zu den großen Gefäßen. Die Mittelwerte liegen für die kleinen Gefäße bei $1,00 \pm 0,00\mu\text{m}$, für die mittelgroßen bei $1,18 \pm 0,08\mu\text{m}$ und für die großen Gefäße bei $1,22 \pm 0,07\mu\text{m}$. In der HE-Klasse 1 ist eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Gefäßwanddicke sowohl zwischen kleinen (Gefäßwanddicke $2,09 \pm 0,13\mu\text{m}$) und mittleren (Gefäßwanddicke $2,06 \pm 0,10\mu\text{m}$) Gefäßen, als auch zwischen mittleren und großen (Gefäßwanddicke $1,79 \pm 0,13\mu\text{m}$) Gefäßen ersichtlich. Dies gilt ebenso für die HE-Klasse 2 mit durchschnittlichen Werten für die Gefäßwanddicke von $2,20 \pm 0,15\mu\text{m}$ bei den kleinen Gefäßen, $1,69 \pm 0,15\mu\text{m}$ bei den mittelgroßen Gefäßen sowie $1,32 \pm 0,13\mu\text{m}$ bei den großen Gefäßen und für die Kontrollgruppe. Für letztere liegen die Mittelwerte der Gefäßwanddicke bei $1,30 \pm 0,11\mu\text{m}$ für kleine Gefäße, bei $1,11 \pm 0,07\mu\text{m}$ für mittelgroße Gefäße und bei $1,15 \pm 0,10\mu\text{m}$ für große Gefäße.

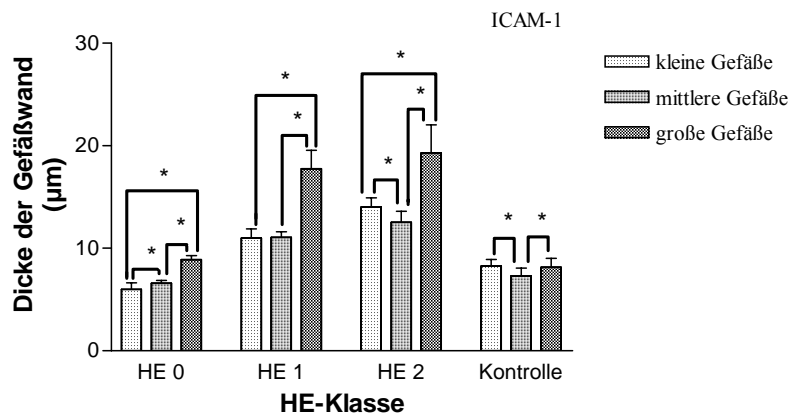


Abb. 17a: Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug auf die HE-Klasse und die Gefäßgröße bei der ICAM-1-Färbung (* = $p < 0,05$)

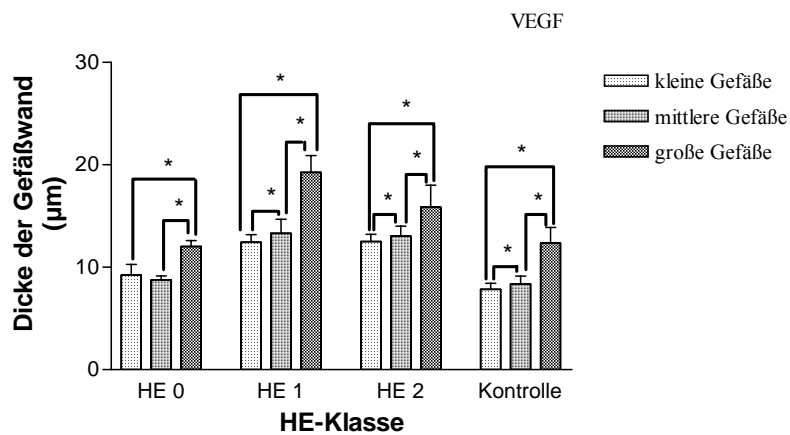


Abb. 17b: Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug auf die HE-Klasse und die Gefäßgröße bei der VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.5 Intensität der Anfärbung

Abb. 18a zeigt für ICAM-1 eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme in der Intensität der Anfärbung mit steigender HE-Klasse. In der HE-Klasse 0 beträgt die durchschnittliche Anfärbungsintensität $1,51 \pm 0,08$, in der Klasse HE 1 $2,18 \pm 0,07$ und in der Klasse HE 2 $2,61 \pm 0,07$. Die Kontrollgruppe ist mit einer durchschnittlichen Intensität der Anfärbung von $1,65 \pm 0,12$

signifikant ($p < 0,05$) geringer angefärbt als die HE-Klassen 1 und 2. Zwischen der Anfärbungsintensität der Kontrollgruppe und der HE-Klasse 0 besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Abb. 18b demonstriert für VEGF eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Intensität der Anfärbung der HE-Klassen 1 und 2 im Vergleich zur HE-Klasse 0 und der Kontrollgruppe. Zwischen der HE-Klasse 0 mit einer durchschnittlichen Anfärbungsintensität von $1,18 \pm 0,05$ und der Kontrollgruppe mit einem Durchschnittswert von $1,19 \pm 0,06$ besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Dies gilt ebenso für den Vergleich zwischen den HE-Klassen 1 mit einer durchschnittlichen Intensität der Anfärbung von $1,98 \pm 0,08$ und HE 2 mit einem Wert von $1,84 \pm 0,10$. Hierbei zeigt sich ein leichter Abfall in der Intensität der Anfärbung von HE 1 zu HE 2.

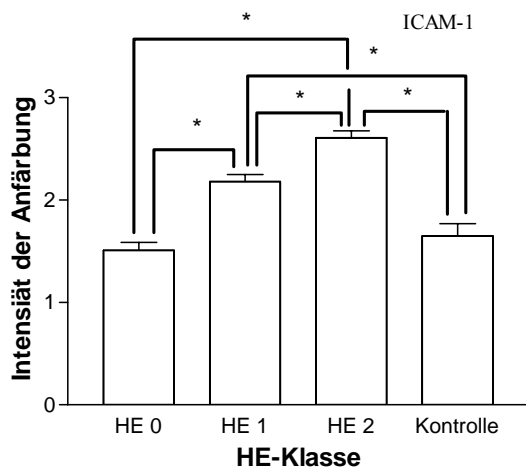


Abb. 18a: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die HE-Klassen-Gruppierung bei der ICAM-1-Färbung (* = $p < 0,05$)

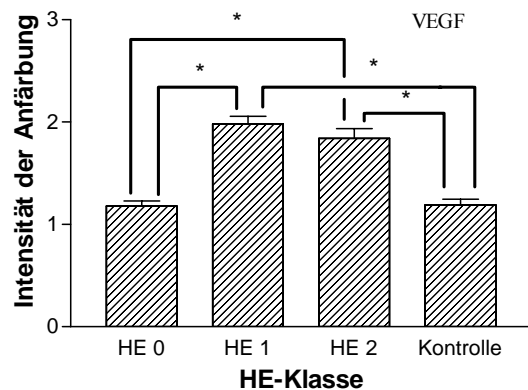


Abb. 18b: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die HE-Klassen-Gruppierung bei der VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.6 Intensität der Anfärbung untergliedert nach der Gefäßgröße

Abb. 19a zeigt für ICAM-1 die mittlere Intensität der Anfärbung bezogen auf die HE-Klasse sowie untergliedert nach Gefäßgrößen. Dazu wurden alle untersuchten Gefäße in kleine (Gefäßdurchmesser $< 22\mu\text{m}$), mittelgroße (Gefäßdurchmesser $22-36\mu\text{m}$) und große

(Gefäßdurchmesser > 36µm) Gefäße gruppiert. In der HE-Klasse 0 besteht die höchste Anfärbungsintensität bei den mittelgroßen Gefäßen. Ein signifikanter Unterschied zu den kleinen und großen Gefäßen besteht nicht ($p > 0,05$). In der HE-Klasse 1 zeigt sich die stärkste Anfärbung bei den kleinen Gefäßen mit einem Mittelwert von $2,40 \pm 0,13$. Dieser ist signifikant ($p < 0,05$) größer als die Werte für mittlere Gefäße ($2,00 \pm 0,13$) und große Gefäße ($2,10 \pm 0,10$). In der Klasse HE 2 sind ebenfalls die kleinen Gefäße diejenigen mit der stärksten Anfärbung ($2,80 \pm 0,08$), gefolgt von den mittelgroßen Gefäßen mit einem Mittelwert von $2,70 \pm 0,09$. Die großen Gefäße haben mit einem durchschnittlichen Wert von $2,20 \pm 0,18$ eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Intensität der Anfärbung als die kleinen Gefäße. In der Kontrollgruppe verhält es sich umgekehrt. Hier zeigen die großen Gefäße mit einer mittleren Anfärbungsintensität von $2,50 \pm 0,50$ eine signifikant ($p < 0,05$) stärkere Anfärbung als die kleinen Gefäße mit einem Wert von $1,50 \pm 0,12$. Die mittelgroßen Gefäße nehmen mit $1,90 \pm 0,28$ eine Mittelstellung ein und unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$) von den anderen beiden Gruppen.

Abb. 19b bildet die Intensität der Anfärbung in Bezug zur HE-Klasse und die Gefäßgröße für die VEGF-Färbung ab. In der HE-Klasse 0 erweisen sich die Unterschiede in der Anfärbungsintensität als nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Klasse HE 1 ist die geringste Intensität der Anfärbung mit einem Durchschnittswert von $1,80 \pm 0,13$ bei den großen Gefäßen zu finden. Die Anfärbungsintensität ist hier signifikant ($p < 0,05$) geringer als bei den kleinen und mittleren Gefäßen, für die sich mit $2,10 \pm 0,13$ (kleine Gefäße) bzw. $2,10 \pm 0,10$ (mittelgroße Gefäße) ähnliche Werte ergeben. In der HE-Klasse 2 zeigt sich eine Abnahme der Anfärbungsintensität mit zunehmender Gefäßgröße, wobei die Unterschiede zwischen kleinen und großen Gefäßen mit $p < 0,05$ signifikant sind. Die Mittelwerte für die Intensität der Anfärbung betragen für die kleinen Gefäße $2,20 \pm 0,15$, für die mittelgroßen Gefäße $1,70 \pm 0,15$ und für die großen Gefäße $1,30 \pm 0,13$. In der Kontrollgruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gefäßgrößen ($p > 0,05$).

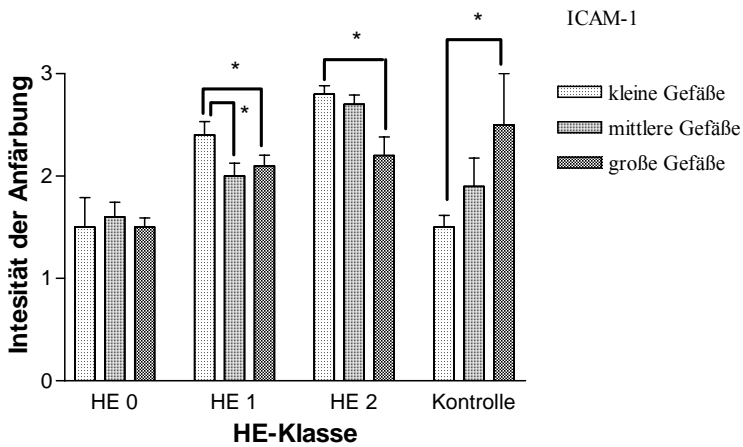


Abb. 19a: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zur HE-Klasse und der Gefäßgröße bei der ICAM-1-Färbung (* = $p < 0,05$)

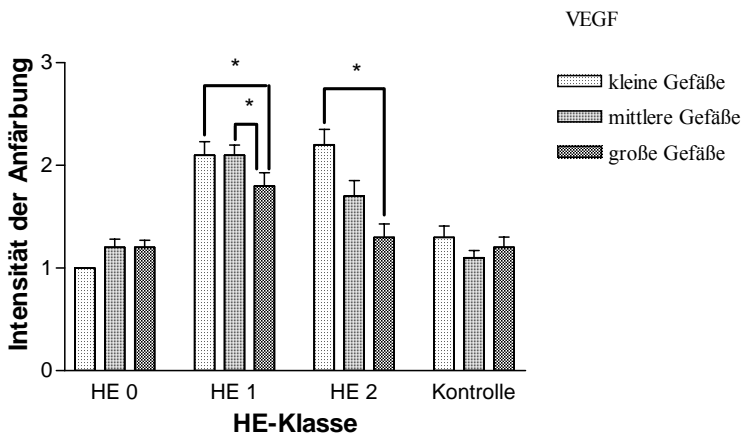


Abb. 19b: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zur HE-Klasse und der Gefäßgröße bei der VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.3.7 Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck

In Abb. 20 zeigt sich, wie zu erwarten, eine deutliche Zunahme des rechtsventrikulären Drucks (RVP) mit steigender HE-Klasse. Die Mittelwerte des RVP betragen für die HE-Klasse 0 35,50

$\pm 5,5\text{mmHg}$, in der HE-Klasse 1 $53,67 \pm 13,17\text{mmHg}$ und in der HE-Klasse 2 $91,43 \pm 6,96\text{mmHg}$. Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$) zwischen den Klassen HE 0 und HE 2.

Abb. 21 stellt für den linksventrikulären Druck (LVP) einen umgekehrten Trend, d.h. eine Abnahme des LVP mit steigender HE-Klasse, dar. Eine Signifikanz kann hierbei nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

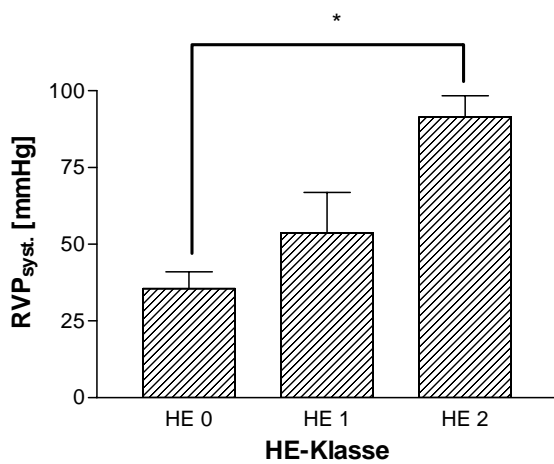


Abb. 20: Darstellung des rechtsventrikulären Drucks (RVP) in den Patientengruppen (* = $p < 0,05$)

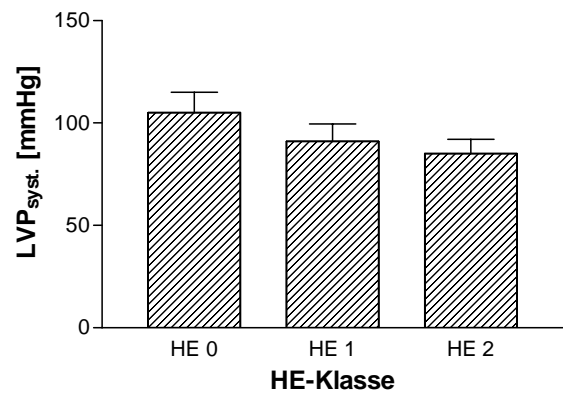


Abb. 21: Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVP) in den Patientengruppen

4.3.8 Pulmonalarterieller Mitteldruck

Abb. 22 zeigt einen stetigen Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (PAPm) mit steigender HE-Klasse. Ein signifikanter Unterschied kann nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

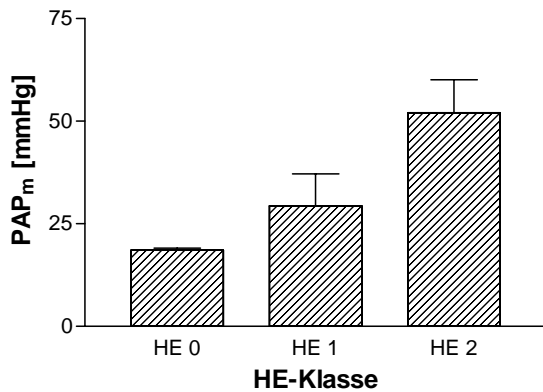


Abb. 22: Darstellung des pulmonalarteriellen Mittel- drucks (PAP_m) in den Patientengruppen bezogen auf die HE-Klassen-Gruppierung

4.3.9 Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck

Abb. 23 zeigt das Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck (PAP/SAP) in den unterschiedlichen HE-Klassen. Es läßt sich eine stetige Zunahme des Quotienten PAP/SAP mit steigender HE-Klasse beobachten. In der Klasse HE 0 beträgt der Mittelwert $0,25 \pm 0,02$, in der Klasse HE 1 $0,55 \pm 0,10$ und in der Klasse HE 2 $0,83 \pm 0,06$. Zwischen den Klassen HE 0 und HE 2 besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

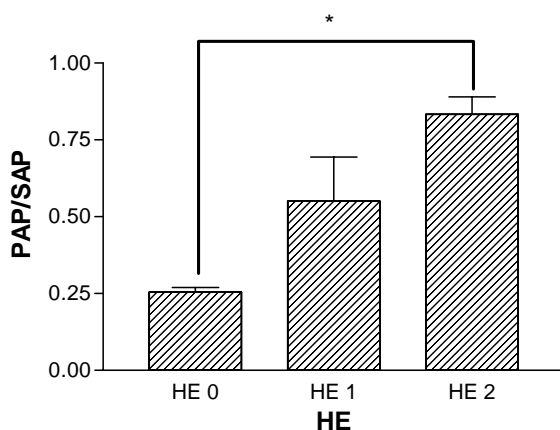


Abb. 23: Darstellung des Verhältnisses pulmonalarterieller Druck zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) in Bezug auf die HE-Klassifizierung (* = $p < 0,05$)

4.3.10 Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung

Abb. 24 zeigt eine Darstellung der Lungen- zur Körperdurchblutung (Q_p/Q_s) in Bezug auf die HE-Klassifizierung und damit eine Darstellung der Shuntverhältnisse. Ein signifikanter Zusammenhang kann nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

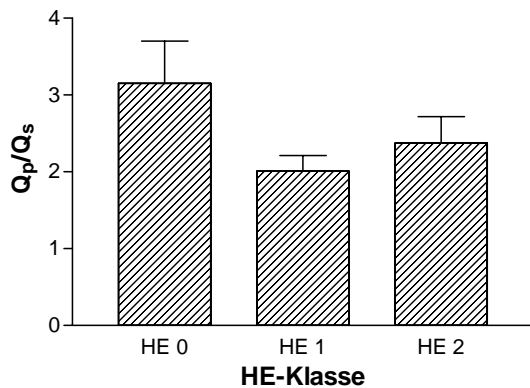


Abb. 24: Darstellung der Shuntverhältnisse in den Patientengruppen in Abhängigkeit von der HE-Klassifizierung

4.3.11 Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung

In der Abb. 25 sind die pulmonalarterielle sowie die systemarterielle Sauerstoffsättigung in Bezug auf die HE-Klassifizierung dargestellt. Für die systemarteriellen O_2 -Sättigungen (SO_{2ao}) zeigt sich eine Abnahme der aortalen Sauerstoffsättigung mit steigender HE-Klasse, ohne daß für diese Unterschiede eine Signifikanz nachgewiesen werden kann ($p > 0,05$). Die pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung (SO_{2pa}) nimmt ebenfalls mit steigender HE-Klasse ab. Eine Signifikanz ($p < 0,05$) kann nicht nachgewiesen werden.

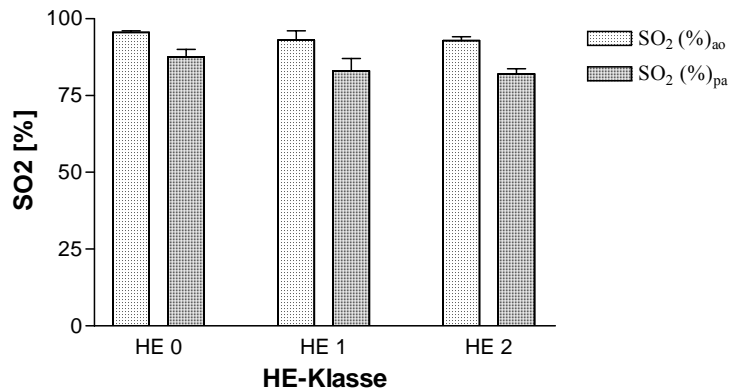


Abb. 25: Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO₂ao bzw. SO₂pa) in Bezug zur HE-Klassifizierung

4.4 Analyse bezüglich des Widerstandsverhältnisses

4.4.1 Gefäßdurchmesser

Abb. 26 stellt für die Färbung mit ICAM-1 die Beziehung zwischen Gefäßdurchmesser und Widerstandsverhältnis R_p/R_s dar. Der kleinste Mittelwert für den Gefäßdurchmesser zeigt sich in der Widerstandsgruppe 2 (R_p/R_s 0,25-0,35) mit $24,29 \pm 1,55 \mu\text{m}$. Dies ist signifikant ($p < 0,05$) kleiner als die mittleren Gefäßdurchmesser in den Widerstandsgruppen 1, mit einem Wert von $41,83 \pm 3,2 \mu\text{m}$, und 3, mit einem Wert von $39,97 \pm 2,00 \mu\text{m}$.

Auch für die VEGF-Färbung ist der Gefäßdurchmesser in Beziehung zum Widerstandsverhältnis R_p/R_s gesetzt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Widerstandsgruppen lässt sich hierbei nicht nachweisen ($p > 0,05$).

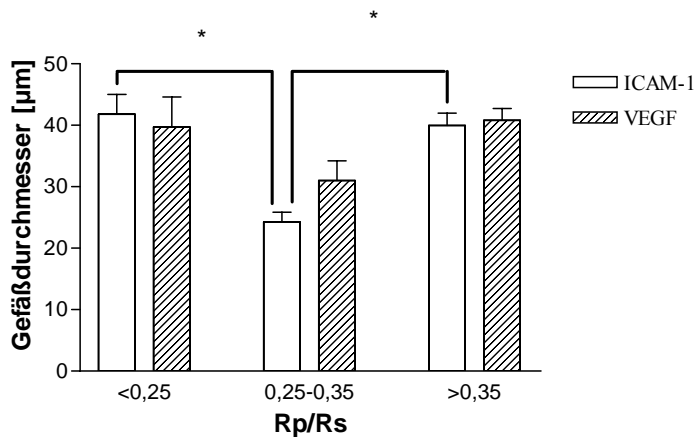


Abb. 26: Darstellung des Gefäßdurchmessers in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1 und VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

4.4.2 Umfang und Fläche des Gefäßlumens

Abb. 27a zeigt für ICAM-1 und VEGF den Umfang des Gefäßlumens in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs). Signifikante Unterschiede zwischen den Widerstandsgruppen können nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Abb. 27b zeigt in Bezug auf die Fläche des Gefäßlumens für die ICAM-1-Färbung eine durchschnittliche Fläche in der Gruppe 1 (Rp/Rs $< 0,25$) von $2457,45 \pm 302,51 \mu\text{m}^2$ und in der Gruppe 3 von $2748,60 \pm 160,96 \mu\text{m}^2$. Der Mittelwert für die Fläche des Gefäßlumens in der Widerstandsgruppe 2 (Rp/Rs 0,25-0,35) beträgt $921,80 \pm 303,03 \mu\text{m}^2$ und erweist sich als signifikant kleiner als in den Gruppen 1 und 3 ($p < 0,05$).

Für die VEGF-Färbung können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Widerstandsgruppen nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

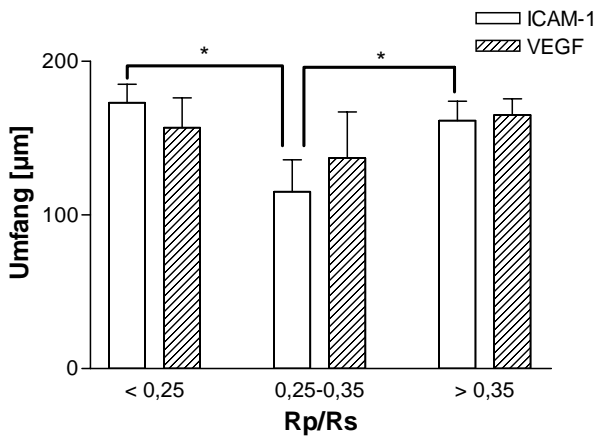


Abb. 27a: Darstellung des Umfangs des Gefäßlumens in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$)

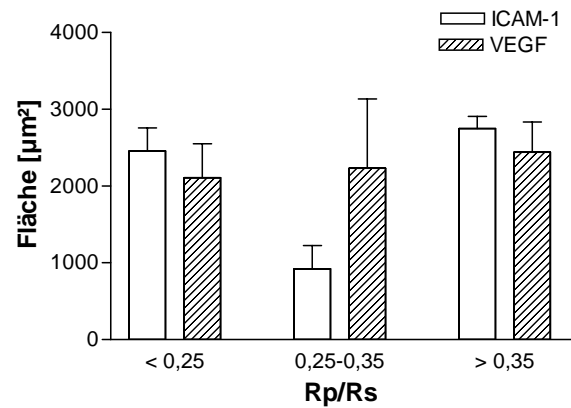


Abb. 27b: Darstellung der Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.4.3 Dicke der Gefäßwand

In Abb. 28 wird in der ICAM-1-Färbung eine Zunahme der Dicke der Gefäßwand mit steigendem Widerstandsverhältnis Rp/Rs ersichtlich. Eine Signifikanz kann ebenso wie für die VEGF-Färbung nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

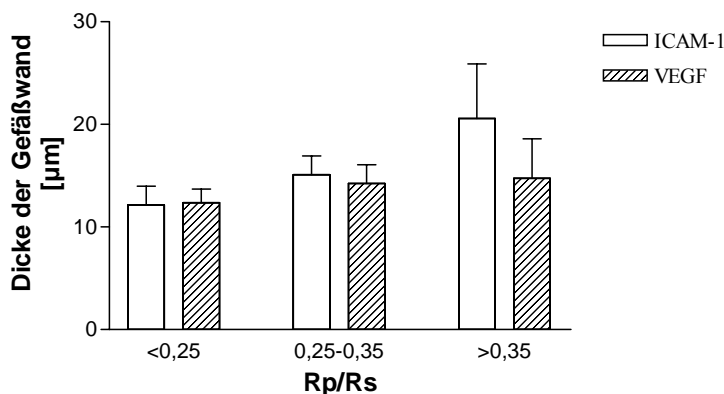


Abb. 28: Darstellung der Gefäßwanddicke in Abhängigkeit vom Widerstandsverhältnis bei der ICAM-1 und VEGF-Färbung

4.4.4 Intensität der Anfärbung

Abb. 29 stellt für die ICAM-1- und VEGF-Färbung die Intensität der Anfärbung in Bezug auf das Widerstandsverhältnis R_p/R_s dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Widerstandsgruppen können nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

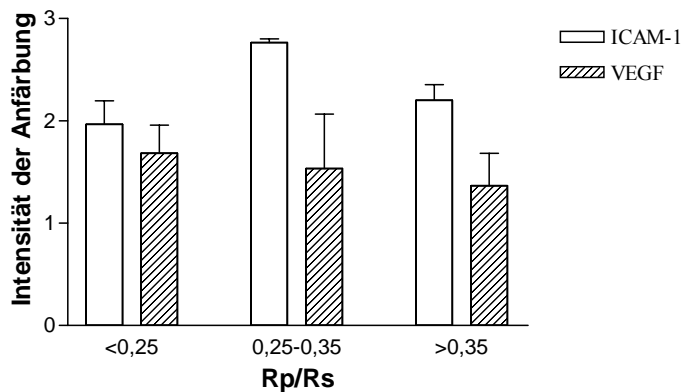


Abb. 29: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse (R_p/R_s) bei der ICAM-1 und VEGF-Färbung

4.4.5 Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck

Abb. 30 zeigt eine Zunahme des rechtsventrikulären Drucks (RVP) mit steigendem Widerstandsverhältnis R_p/R_s . In der Widerstandsgruppe 1 ($R_p/R_s < 0,25$) beträgt der Mittelwert für RVP $53,67 \pm 10,13$ mmHg, in der Widerstandsgruppe 2 ($R_p/R_s 0,25-0,35$) $81,67 \pm 4,41$ mmHg und in der Widerstandsgruppe 3 ($R_p/R_s > 0,35$) $101,67 \pm 14,81$. Der Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 3 erweist sich als signifikant ($p < 0,05$).

Abb. 31 stellte den linksventrikulären Druck (LVP) in Bezug zum Widerstandsverhältnis R_p/R_s dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Widerstandsgruppen können nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

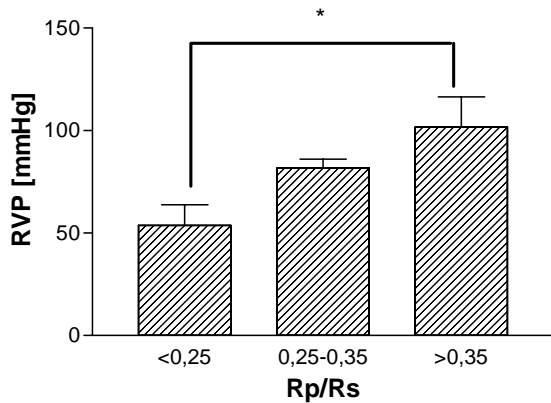


Abb. 30: Darstellung des rechtsventrikulären Drucks in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse Rp/Rs (* = $p < 0,05$).

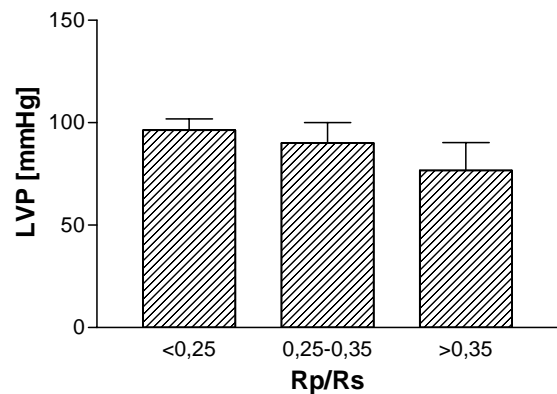


Abb. 31: Darstellung des linksventrikulären Drucks in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse Rp/Rs

4.4.6 Pulmonalarterieller Mitteldruck

Abb. 32 stellt den pulmonalarteriellen Mitteldruck PAPm in Bezug zum Widerstandsverhältnis Rp/Rs dar. In der Widerstandsgruppe 1 ($Rp/Rs < 0,25$) beträgt der PAPm $25,17 \pm 3,34$ mmHg, in der Widerstandsgruppe 2 ($Rp/Rs 0,25-0,35$) $47,67 \pm 6,94$ mmHg und in der Widerstandsgruppe 3 ($Rp/Rs > 0,35$) $65,00 \pm 15,28$ mmHg. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg des PAPm zwischen den Gruppen 1 und 3 ($p < 0,05$).

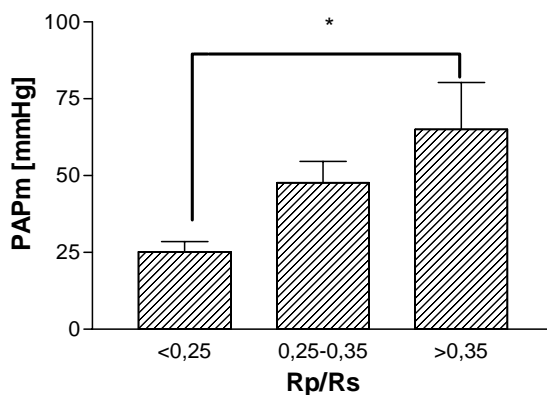


Abb. 32: Darstellung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (PAPm) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse Rp/Rs (* = $p < 0,05$).

4.4.7 Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck

Abb. 33 stellt das Verhältnis des pulmonalarteriellen zum systemarteriellen Druck (PAP/SAP) in Bezug zum Widerstandsverhältnis R_p/R_s dar. Das Verhältnis PAP/SAP erweist sich in der Widerstandsgruppe 1 ($R_p/R_s < 0,25$) mit einem Wert von $0,43 \pm 0,07$ als signifikant kleiner als in den Widerstandsgruppen 2 ($R_p/R_s 0,25-0,35$) und 3 ($R_p/R_s > 0,35$) mit Werten von $0,86 \pm 0,01$ bzw. $0,93 \pm 0,06$ ($p < 0,05$).

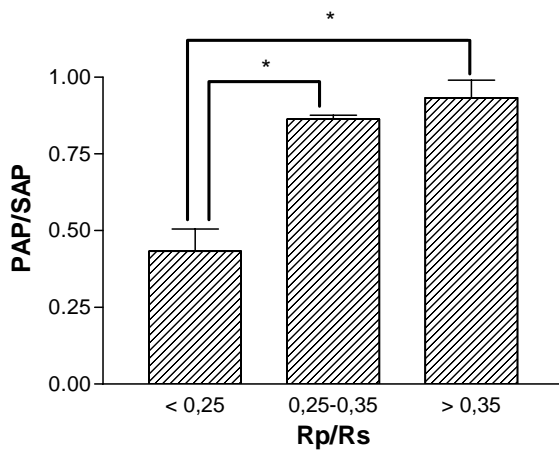


Abb. 33: Darstellung des Verhältnisses pulmonalarterieller Druck zu systemarterieller Druck (PAP/SAP) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s (* = $p < 0,05$).

4.4.8 Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung

Abb. 34 zeigt das Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung (Q_p/Q_s) in Bezug zum Widerstandsverhältnis R_p/R_s . In der Widerstandsgruppe 1 ($R_p/R_s < 0,25$) beträgt das Verhältnis Q_p/Q_s $2,48 \pm 0,28$, in der Gruppe 2 ($R_p/R_s 0,25-0,35$) $3,13 \pm 0,47$ und in der Gruppe 3 ($R_p/R_s > 0,35$) $1,54 \pm 0,10$. Der Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 erweist sich als signifikant ($p < 0,05$).

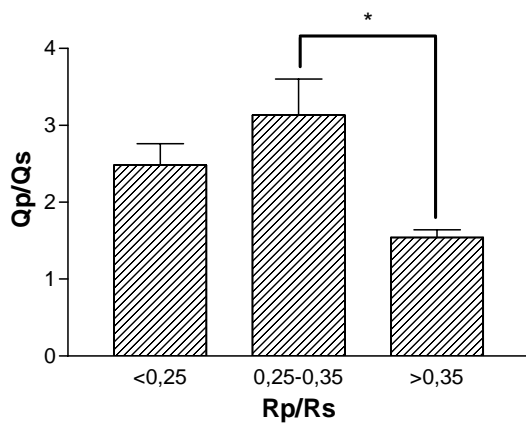


Abb. 34: Darstellung der Shuntverhältnisse Q_p/Q_s in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s (* = $p < 0,05$).

4.4.9 Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung

In der Abbildung 35 sind die pulmonalarterielle sowie die systemarterielle Sauerstoffsättigung in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s dargestellt. Für die systemarterielle Sauerstoffsättigung (SO_{2ao}) ergeben sich folgende Mittelwerte: in der Widerstandsgruppe 1 ($R_p/R_s < 0,05$) $95,17 \pm 0,71\%$, in der Widerstandsgruppe 2 ($R_p/R_s 0,25-0,35$) $94,33 \pm 1,67\%$ und in der Widerstandsgruppe 3 ($R_p/R_s > 0,35$) $88,67 \pm 1,67\%$. Die Mittelwerte in den Gruppen 1 und 2 erweisen sich als signifikant größer als derjenige in Gruppe 3 ($p < 0,05$).

Die pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung (SO_{2po}) nimmt ebenfalls mit steigendem Widerstandsverhältnis R_p/R_s ab und zwar von $86,00 \pm 1,77\%$ in der Gruppe 1 ($R_p/R_s < 0,25$) über $84,00 \pm 0,58\%$ in der Gruppe 2 ($R_p/R_s 0,25-0,35$) hin zu $76,67 \pm 0,88\%$ in der Gruppe 3 ($R_p/R_s > 0,35$). Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 und der Gruppe 3 erweist sich als signifikant ($p < 0,05$).

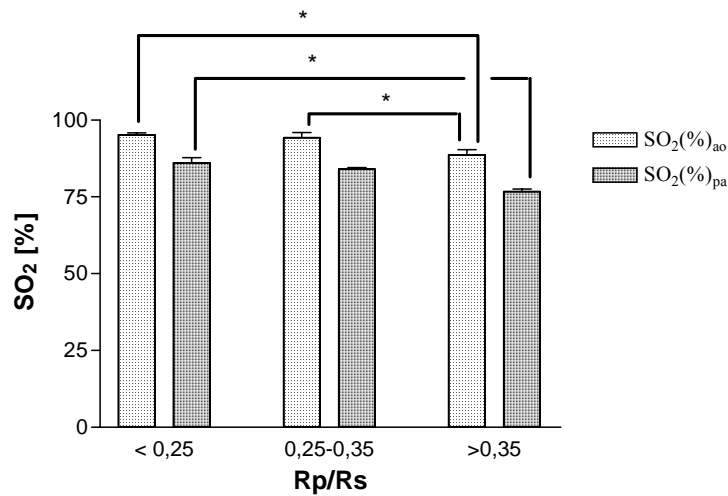


Abb. 35: Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO₂ao bzw. SO₂pa) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse Rp/Rs (* = p < 0,05)

4.5 Analyse bezüglich des pulmonalarteriellen Drucks

4.5.1 Gefäßdurchmesser

Abb. 36 stellt für die ICAM-1- und VEGF-Färbung den Gefäßdurchmesser im Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) dar. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen bestehen nicht (p > 0,05).

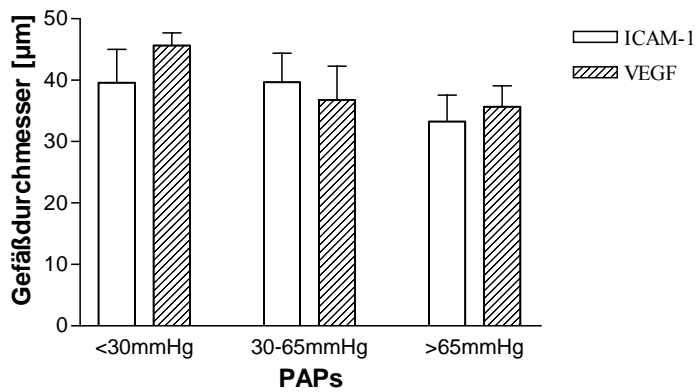


Abb. 36: Darstellung der Gefäßdurchmesser in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.5.2 Umfang und Fläche des Gefäßlumens

Abb. 37a stellt den Umfang des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen und pulmonalarteriellen Druck (PAPs) für die ICAM-1- und die VEGF-Färbung dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben sich nicht ($p > 0,05$).

Abb. 37b stellt die Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) für die ICAM-1- und VEGF-Färbung dar. Es zeigt sich eine Abnahme des Gefäßlumenumfanges mit steigenden Werten für PAPs. Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

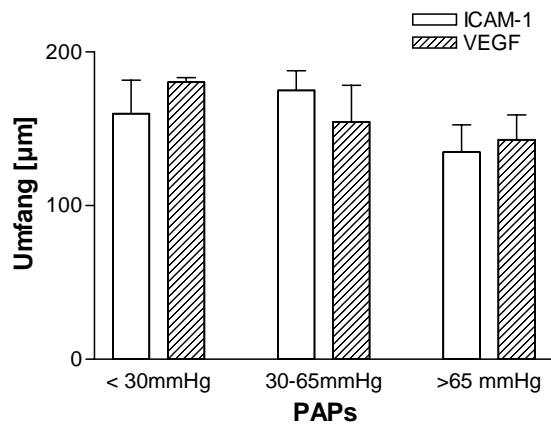


Abb. 37a: Darstellung von Umfang und Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1-Färbung

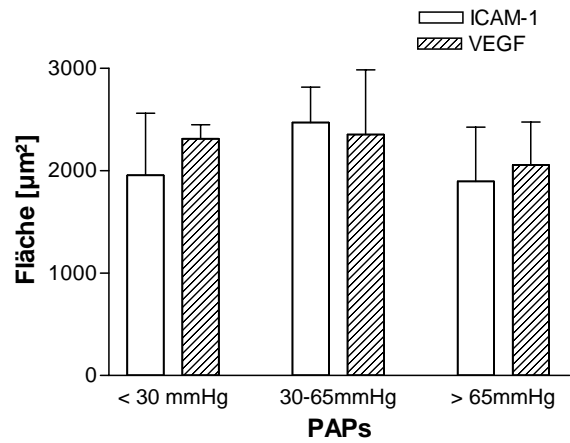


Abb. 37b: Darstellung von Umfang und Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der VEGF-Färbung

4.5.3 Dicke der Gefäßwand

Abb. 38 zeigt für die ICAM-1-Färbung eine Zunahme der Gefäßwanddicke mit steigendem systolischem pulmonalarteriellen Druck (PAPs). Eine Signifikanz kann nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Für die Färbung mit VEGF findet sich ebenfalls ein Anstieg der Gefäßwanddicke mit steigendem systolischem pulmonalarteriellen Druck (PAPs). Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

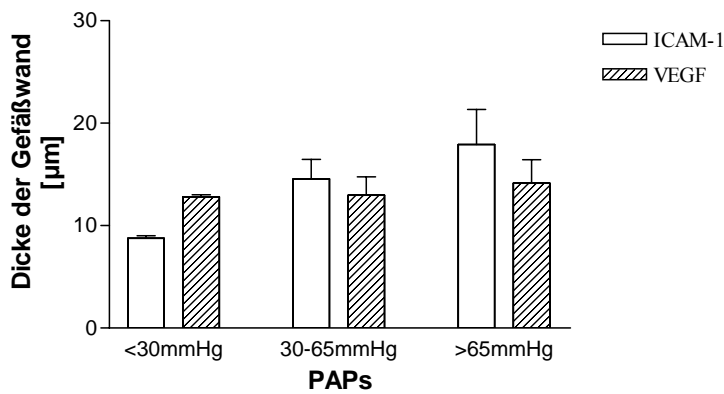


Abb. 38: Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug zum pulmonalarteriellen systolischen Druck bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.5.4 Intensität der Anfärbung

Abb. 39 zeigt für die ICAM-1-Färbung eine Zunahme in der Intensität der Anfärbung mit steigendem systolischem pulmonalarteriellen Druck (PAPs). Eine Signifikanz ist nicht nachzuweisen ($p > 0,05$).

Bei der VEGF-Färbung zeigt sich die höchste Intensität der Anfärbung mit $1,66 \pm 0,36$ in der zweiten Gruppe (PAPs 30-65mmHg). Eine Signifikanz kann nicht gezeigt werden ($p > 0,05$).

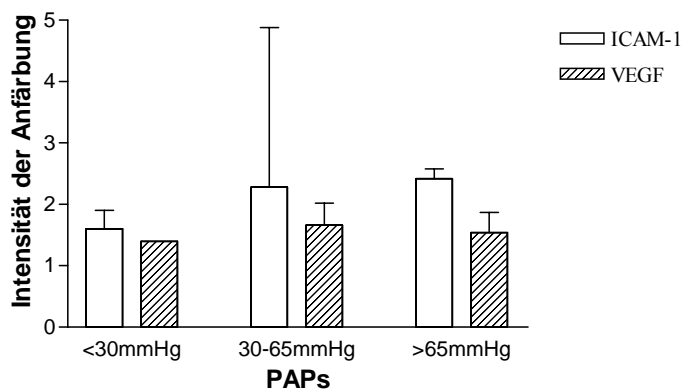


Abb. 39: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.5.5 Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung

Abb. 40 stellt die Beziehung zwischen dem Verhältnis der Lungen- zur Körperdurchblutung (Q_p/Q_s) und dem systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) dar. Das Shuntverhältnis Q_p/Q_s nimmt mit steigendem PAPs ab. Eine Signifikanz besteht nicht ($p > 0,05$).

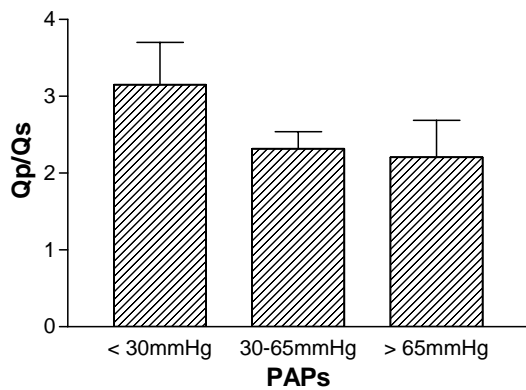


Abb. 40: Darstellung des Shuntverhältnisses (Q_p/Q_s) in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs)

4.5.6 Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung

Abb. 41 zeigt die system- und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung (SO_2) in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs). Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

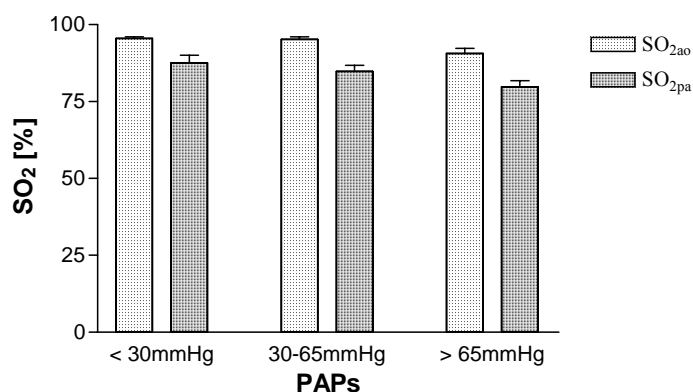


Abb. 41: Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO_{2ao} und SO_{2pa}) in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs)

4.6 Analyse bezüglich des Shuntverhältnisses

4.6.1 Gefäßdurchmesser

In der Abb. 42 zeigt sich für ICAM-1 eine Abnahme des mittleren Gefäßdurchmessers mit steigendem Shuntverhältnis (Q_p/Q_s). Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

Für die VEGF-Färbung zeigt sich eine Verringerung des Gefäßdurchmessers in den Gruppen 2 und 3 im Vergleich zur Gruppe 1. Eine Signifikanz ist nicht nachweisbar ($p > 0,05$).

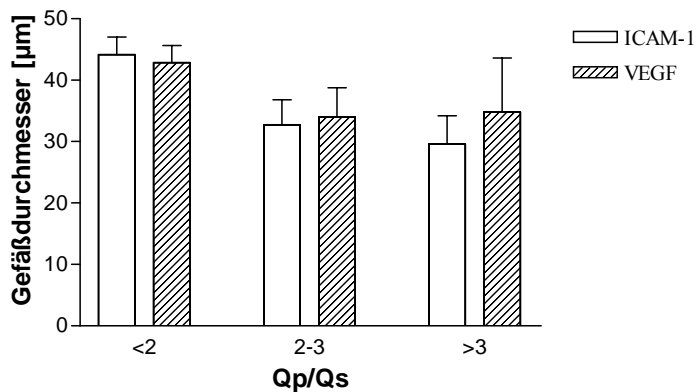


Abb. 42: Darstellung des Gefäßdurchmessers in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.6.2 Umfang und Fläche des Gefäßlumens

Abb. 43a zeigt für ICAM-1 und VEGF den Umfang des Gefäßlumens im Verhältnis zum Shuntvolumen Qp/Qs. Der durchschnittliche Umfang des Gefäßlumens nimmt sowohl bei der ICAM-1- als auch bei der VEGF-Färbung mit steigendem Shuntvolumen Qp/Qs ab. Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

Abb. 43b zeigt die Fläche des Gefäßlumens im Verhältnis zum Shuntvolumen Qp/Qs für die ICAM-1- und VEGF-Färbung. Die durchschnittliche Fläche des Gefäßlumens nimmt bei der ICAM-1-Färbung mit steigendem Verhältnis Qp/Qs ab. Die Mittelwerte betragen $2916,70 \pm 144,01 \mu\text{m}^2$ in der ersten Gruppe (Qp/Qs < 2), $1835,50 \pm 378,56 \mu\text{m}^2$ in der zweiten Gruppe (Qp/Qs 2-3) und $997,45 \pm 352,05$ in der dritten Gruppe (Qp/Qs > 3). Zwischen der ersten und der dritten Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Die Mittelwerte für die Fläche des Gefäßlumens nehmen auch bei der VEGF-Färbung mit steigendem Shuntverhältnis Qp/Qs ab. Eine Signifikanz kann hier nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

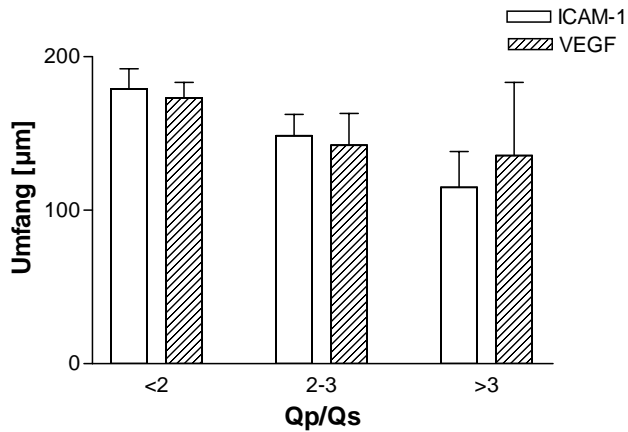


Abb. 43a: Darstellung des Umfangs des Gefäßlumens in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

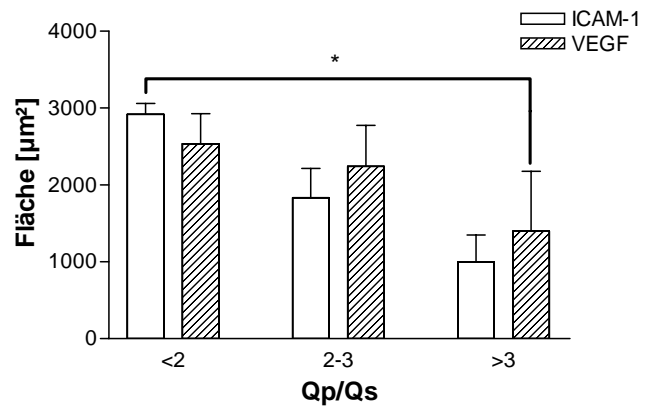


Abb. 43b: Darstellung der Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung (* = $p < 0,05$).

4.6.3 Dicke der Gefäßwand

Abb. 44 zeigt für ICAM-1 eine Abnahme der durchschnittlichen Gefäßwanddicke mit einer Vergrößerung des pulmonalsystemischen Shunts (Qp/Qs). Eine Signifikanz kann nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Bei der VEGF-Färbung zeigt sich die größte durchschnittliche Gefäßwanddicke in der Shuntgruppe 2. Signifikante Unterschiede zu den anderen Shuntgruppen können nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

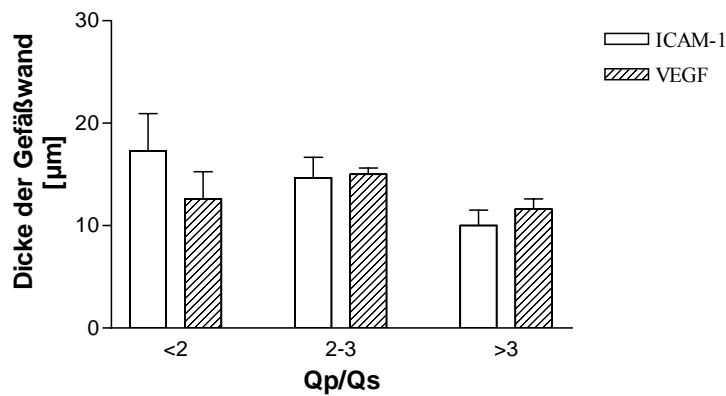


Abb. 44: Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei ICAM-1 und VEGF

4.6.4 Intensität der Anfärbung

Abb. 45 zeigt in der ICAM-1-Färbung die höchste Intensität der Anfärbung in der Shuntgruppe 2. Signifikante Unterschiede zu den anderen Shuntgruppen ergeben sich aus den vorliegenden Werten nicht ($p > 0,05$).

Für die VEGF-Färbung bildet sich eine Zunahme der Anfärbungsintensität mit steigendem Wert für Qp/Qs ab. Eine Signifikanz kann nicht gezeigt werden ($p > 0,05$).

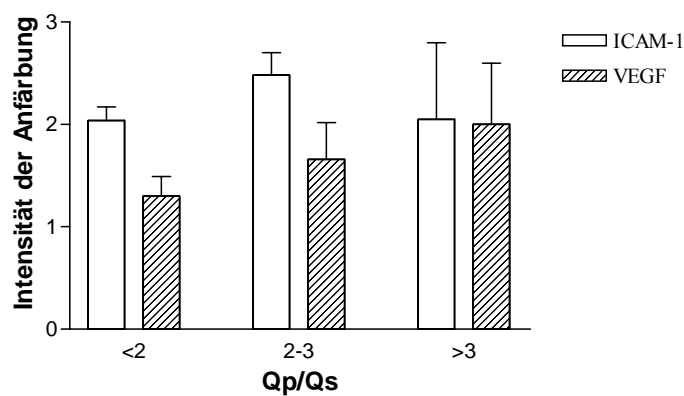


Abb. 45: Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zum Shuntverhältnis bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung

4.6.5 Rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Druck

Abb. 46a stellt den rechts- und linksventrikulären Druck in Bezug zum Shuntverhältnis (Q_p/Q_s) dar. Für den rechtsventrikulären Druck (RVP) ergibt sich eine Abnahme mit steigendem Shuntverhältnis Q_p/Q_s . Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

Wie Abb. 46b zeigt, ergibt sich für den linksventrikulären Druck (LVP) eine leichte Zunahme mit steigendem Shuntverhältnis Q_p/Q_s . Eine Signifikanz ist nicht nachweisbar ($p > 0,05$).

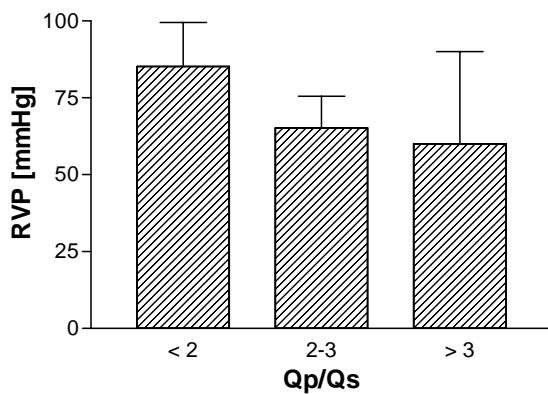


Abb. 46a: Darstellung des rechtsventrikulären Drucks (RVP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Q_p/Q_s)

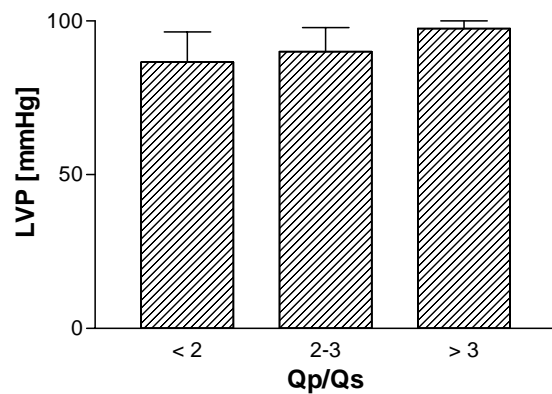


Abb. 46b: Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Q_p/Q_s)

4.6.6 Pulmonalarterieller- zu systemarteriellem Druck

Abb. 47 zeigt den Quotienten pulmonal- zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) im Verhältnis zum Shuntvolumen Q_p/Q_s . Eine Signifikanz ergibt sich nicht ($p > 0,05$).

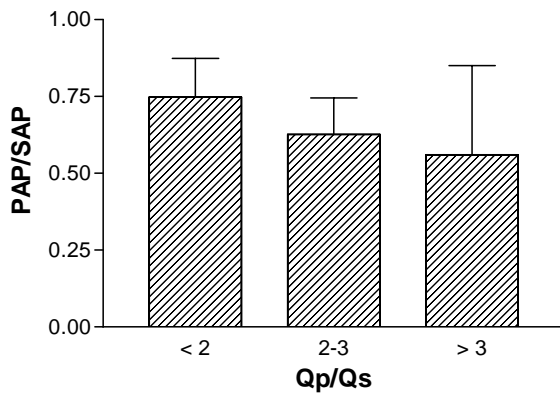


Abb. 47: Darstellung des Quotienten pulmonal- zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)

4.6.7 Systemarterielle und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung

Abb. 48 stellt die system- und pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung in Bezug zum Shuntverhältnis Qp/Qs dar. Für die systemarterielle Sauerstoffsättigung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Shuntgruppen ($p > 0,05$).

Die pulmonalarterielle Sauerstoffsättigung (SO_{2pa}) erhöht sich mit steigendem Shuntverhältnis Qp/Qs. Eine Signifikanz ist nicht nachweisbar ($p > 0,05$).

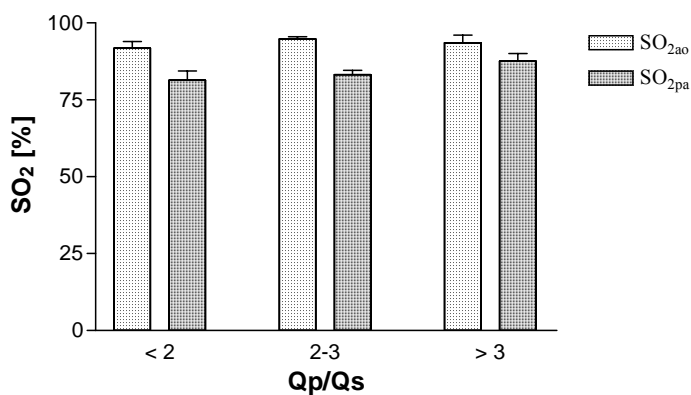


Abb. 48: Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)

5 Diskussion

5.1 Immunhistochemische Färbung mit ICAM-1 und hämodynamische Untersuchung

In der immunhistochemischen Färbung mit ICAM-1-Antikörper zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Zunahme der Intensität der Endothelanfärbung mit steigender HE-Klasse. In den HE-Klassen 1 und 2 läßt sich zusätzlich eine signifikant stärkere Anfärbung des Endothels bei kleinen Gefäßen im Vergleich zu großen Gefäßen beobachten. Die Kontrollgruppe zeigt eine ähnliche Anfärbungsintensität wie die HE-Klasse 0. Aus diesen Daten lässt sich auf ein vermehrtes Vorhandensein von ICAM-1 im pulmonalen Gefäßendothel bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien der pulmonalen Hypertonie schließen. Diese These wird unterstützt durch das Ergebnis der Analyse der hämodynamischen Parameter, bei der sich eine tendenzielle Zunahme der Anfärbungsintensität bei der ICAM-1-Färbung mit steigenden systolischen pulmonalarteriellen Drücken (PAPs) zeigt. In der Literatur findet sich nach eigener Kenntnis nur eine vergleichbare Studie über das Vorkommen von ICAM-1 in Endothelzellen bei der pulmonalen Hypertonie (Kobayashi et. al., 2004). Jene Studie untersucht die Beziehung zwischen den Serumspiegeln verschiedener zirkulierender Adhäsionsmoleküle (sICAM-1, sELAM-1, sVCAM-1) und der Entwicklung einer persistierenden pulmonalen Hypertonie bei neonatologischen Patienten mit kongenitaler diaphragmatischer Hernie (CDH). Zusätzlich werden Lungenschnitte von 5 verstorbenen Patienten mit CHD und PH immunhistochemisch auf das Vorhandensein der oben genannten Adhäsionsmoleküle untersucht. Für ICAM-1 zeigten sich erhöhte Serumspiegel bei Patienten mit CDH und PH im Vergleich zu Patienten mit CDH ohne komplizierende PH und einer Kontrollgruppe ohne CDH bzw. PH. In der Immunhistochemie wurde eine stark positive Anfärbung für ICAM-1 in pulmonalvaskulären Endothelzellen und Alveolarepithelzellen bei Patienten mit CDH und PH gefunden; in den anderen beiden Gruppen zeigte sich keine Anfärbung. Für die beiden anderen Adhäsionsmoleküle ergaben sich die gleichen Ergebnisse. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen ihrer Arbeit, dass die vermehrt im Serum zirkulierenden Adhäsionsmoleküle bei Patienten mit CDH und PH von den Endothelzellen der Lungengefäße gebildet werden und eine aktive Rolle in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie spielen. Da in der Studie die Höhe der Serumspiegel mit der Schwere der Erkrankung korrelierte, sehen sie für die Zukunft einen möglichen Nutzen in der Bestimmung der Serumspiegel zur Festlegung des Schweregrades der Erkrankung und für das Verlaufsmoitoring.

Für die systemarterielle Hypertonie sind erhöhte ICAM-1-Spiegel mehrfach beschrieben worden. In einer Studie über die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie wurden Endothelzellen aus Umbilikalvenen gewonnen und diese mit Sera von Patienten mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, Schwangeren ohne Hypertonie und solchen von nichtschwangeren Versuchspersonen inkubiert. Die ICAM-1-Expression in den Endothelzellen wurde daraufhin mittels Flowzytometrie und RT-PCR bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant höhere ICAM-1-Expression auf den mit Serum von Patienten mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie inkubierten Endothelzellen. Des Weiteren konnte eine signifikant erhöhte Expression der ICAM-1-Liganden CD11a und CD18 auf den Lymphozyten der Patientengruppe beobachtet werden. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten Hypertonie spielen. Dies könnte über eine Beteiligung an der Endothelzellaktivierung und an der Entstehung einer Endothelzellfunktionsstörung geschehen (Abe et al., 2003). In einer weiteren Arbeit wurden spontan hypertensive sowie normotensive Ratten untersucht. Die in-vivo-ICAM-1-Expression des Endothels wurde mittels radioaktiv markierten Antikörpern unter Basalbedingungen und fünf Stunden nach Gabe von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) bzw. Lipopolysacchariden (LPS) bestimmt. Die Basalwerte für ICAM-1 zeigten sich dabei in den untersuchten Organen der hypertensiven Tiere signifikant erhöht. Nach der Endothelzellaktivierung durch TNF- α bzw. LPS stieg die ICAM-1-Expression des Endothels sowohl bei den spontan hypertensiven Ratten, wie auch bei den normotensiven Tieren signifikant an. Die Autoren vertreten die Hypothese, dass es bei der chronischen systemarteriellen Hypertonie über eine veränderte ICAM-1-Expression auf dem Endothel zu einer vermehrten Bindung von Neutrophilen und Lymphozyten kommt, was zu Entzündungsreaktionen führt. Abnorme Leukozytenadhäsionen scheinen neueren Erkenntnissen zufolge zur Endothelzellverletzung und mikrovaskulären Dysfunktion beizutragen (Komatsu et al., 1997). In seiner Arbeit untersuchte Knies (1999), ob Stickstoffmonoxidinhalation der Entstehung solcher Endothelzellverletzungen, insbesondere in Form von Reperfusionsschäden nach Operationen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, entgegenwirken kann. In vitro konnte eine NO-abhängige Reduktion der Leukozytenadhäsion durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, auf der Zelloberfläche von Lymphozyten und Granulozyten gezeigt werden. Dieser Effekt stellte sich allerdings erst bei NO-Dosen ab 100ppm ein, im klinisch verwendeten Dosisbereich (< 40ppm) war er nicht nachweisbar. Wang et al. (2002) beschreiben

Zytoskelettveränderungen in Endothelzellen über einen ICAM-1-abhängigen Signalweg nach Neutrophilenadhäsion an TNF- α -behandelte pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen. Eine weitere Studie entwickelte ein Modell der chronisch venösen Hypertension bei Nagern. Hierbei wurde keine konstitutionell erhöhte ICAM-1-Expression auf den venösen Endothelzellen gefunden (Hahn et al., 2000).

Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, über welche die ICAM-1-Expression hochreguliert werden kann. Ein Mechanismus, der auch bei der pulmonalen Hypertonie eine Rolle spielen dürfte, ist eine Veränderung der Blutströmungsverhältnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 durch die Auswirkungen von „shear stress“ vermehrt exprimiert werden. Dazu wurden menschliche Nabelvenen laminarem „shear stress“ ausgesetzt. Es zeigte sich eine zeitabhängige, kraftunabhängige vermehrte ICAM-1-Expression auf der Oberfläche der Endothelzellen, die zudem mit einer verstärkten Leukozytenadhäsion korrelierte. Es wurde bereits zuvor ein sogenanntes „shear stress responding element“ (SSRE) gefunden, ein transkriptional-regulatorisches Element, welches eventuell einen typischen Signalweg darstellt, über den biomechanische Kräfte die Genexpression beeinflussen (Nagel et al., 1994).

Ein weiterer Mechanismus zur Hochregulation endothelialer ICAM-1-Level bedient sich der Vermittlung durch Entzündungsmediatoren. Eine Untersuchung mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie nach Verabreichung radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper an Ratten konnte keine konstitutive ICAM-1-Expression auf pulmonalen Endothelzellen nachweisen. Nach einer systemischen Gabe von TNF- α kam es zu einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg der ICAM-1-Expression. Der höchste Anstieg wurde nach vier Stunden ermittelt, möglicherweise die Zeit, welche zur mRNA-Synthese und Proteintranslation benötigt wird. Ein Abfall auf Basalwerte wurde innerhalb von 24h erreicht, dabei handelt es sich mutmaßlich um die Proteinturnover-Zeit (Fingar et al., 1997). Weitere Entzündungsmediatoren, die zu einer Erhöhung des ICAM-1-Levels führen, sind Interleukin-1 (IL-1), Leukotriene (LT) und Interferon- γ (INF- γ) (Hogg et al., 1991; Piela und Korn, 1990).

Eine Studie von Radisavljevic et al. (2000) zeigt an mikrovaskulären Endothelzellen aus Rattengehirnen, dass auch VEGF die Expression von ICAM-1 hochregulieren kann. Der Signalweg beinhaltet Phosphatidylinositol 3 OH-Kinase (PI3K), AKT und NO und führt schließlich zu einer Zytoskelettveränderung der mikrovaskulären Endothelzellen mit konsekutiver transendothelialer Migration von Lymphozyten ins Gewebe und beeinflusst somit die Blut-Hirnschranke.

Zur hämodynamischen Untersuchung in dieser Arbeit sei noch angemerkt, dass zur Analyse möglicher Korrelationen zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung und den hämodynamischen Parametern lediglich Daten von 12 Patienten aus dem Gesamtkollektiv von 30 Patienten vorlagen (s. Abs. 3.1), was die Aussagefähigkeit in diesem Bereich einschränkt. Wie zuvor bereits erwähnt, zeigte sich bei der ICAM-1-Färbung eine tendenzielle Zunahme der Anfärbungsintensität mit steigenden systolischen pulmonalarteriellen Drücken (PAPs). Mit zunehmendem Shuntverhältnis Qp/Qs bzw. steigendem Widerstandsverhältnis Rp/Rs konnte keine Zunahme der Anfärbungsintensität beobachtet werden. Der mangelnde Nachweis von Signifikanzen in diesem Bereich mag einerseits auf den kleinen Stichprobenumfang zurückzuführen sein, andererseits lassen sich in der Literatur etliche Studien finden, die ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen ihrer immunhistochemischen Untersuchungen und den erhobenen hämodynamischen Daten herstellen konnten.

In einer Studie von Preston et al. (2002) wurde die Aktivierung des Endothels durch die Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 sowie durch den von Willebrand-Faktor (vWF) in Abhängigkeit von verschiedenen hohen Blutdruckwerten untersucht. Die oben genannten Faktoren wurden bestimmt im Blut von Patienten mit einer schweren essentiellen Hypertonie (diastolischer Blutdruck ≥ 120 mmHg), bei solchen mit einer milden essentiellen Hypertonie (diastolischer Blutdruck 95-100mmHg) sowie bei einer normotensiven Kontrollgruppe (diastolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg). Die Autoren fanden bei den hypertensiven Patienten im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe erhöhte Werte für sICAM-1, sVCAM-1 und vWF. Zwischen den Patientengruppen mit einer milden bzw. schweren Form der Hypertonie bestand hingegen kein signifikanter Unterschied. Für die Gruppe der Normotensiven und der milden Hypertoniker konnte zudem eine signifikant positive Korrelation zwischen den Blutdruckwerten und den löslichen Adhäsionsmolekülen festgestellt werden, in der Gruppe der schweren Hypertoniker wurde hingegen keine signifikant positive Korrelation für diese beiden Parameter gefunden. Die Autoren schließen aus Ihren Ergebnissen, dass die Konzentration löslicher Adhäsionsmoleküle und des vWF stärker von anderen Faktoren des hypertensiven Mikromilieus abhängt als von den absoluten Blutdruckwerten selbst. Dennoch scheinen schon moderate Blutdruckerhöhungen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen beizutragen.

Eine Untersuchung von Choe et al. (2001) über die Korrelation zwischen der Hämodynamik und den histologischen Veränderungen in kleinen Pulmonalarterien bei Patienten der HE-Klassen 1-3 mit kongenitalen Links-Rechts-Shunt-Vitien erbrachte eine positive Korrelation der HE-

Klasseneinteilung mit der mittleren Gefäßwanddicke sowie eine positive Korrelation der mittleren Gefäßwanddicke mit dem pulmonalarteriellen Druck und dem pulmonalen Gefäßwiderstand. Diese Ergebnisse werden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Hier fand sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Gefäßwanddicke in den HE-Klassen 1 und 2 im Vergleich zur HE-Klasse 0, sowie eine tendenzielle Zunahme der Gefäßwanddicke mit steigendem pulmonalarteriellen Druck bzw. steigendem Widerstandsverhältnis zwischen Lungen- und Körperkreislauf. Auch Yamaki et al. (1997) stellten bei Ihrer histologischen Untersuchung kleiner Pulmonalarterien bei Patienten mit kongenitalen Herzerkrankungen eine signifikante Korrelation zwischen dem pulmonalarteriellen Druck und der mittleren Gefäßwanddicke, insbesondere der Dicke der Media, fest. Auch Hosada (1994) fand bei seiner histopathologischen Studie an Lungengewebebeobachten von Patienten mit pulmonaler Hypertonie eine signifikante Verdickung der Media im Vergleich zur Kontrollgruppe. Meyrick (2001) vermutet, dass zur Mediaverdickung ein Phänotyp-Switch von Zellen beiträgt, die zunächst als glatte Muskelzelle differenziert sind, sich dann aber im Rahmen der PH in einen eher synthetischen Zelltyp umwandeln und zur vermehrten Ablagerung von Bindegewebe beitragen. Andere Autoren fanden Hinweise, dass auch die Endothelzellen bei PH-Patienten vermehrt synthetisch aktiv sind. Rabinovitch et al. (1986) untersuchten elektronenmikroskopisch Lungengewebebeobachten von Patienten mit kongenitalem Herzfehler und pulmonaler Hypertonie. Bei den Gewebebeobachten der Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium wurde eine erhöht Dichte des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) in Endothelzellen präazitärer Arterien gefunden und daraus auf eine vermehrte metabolische Aktivität der Endothelzellen geschlossen. Diese könnte eine vermehrte Produktion von Zytoskelettelementen, Bindegewebsbestandteilen oder Enzymen darstellen.

Aus den Funktionen der Adhäsionsmoleküle werden sich in Zukunft eventuell Therapieoptionen ableiten lassen, sei es durch systemische Applikation von Leukozytenadhäsionsinhibitoren bei Organtransplantationen oder Autoimmunerkrankungen, sei es durch lokale Anwendung von Leukozytenadhäsionsinhibitoren bei allergischem Asthma bronchiale oder Rhinovirusinfektionen oder auch durch eine therapeutische ICAM-1-Induktion auf Tumorzellen, um damit eine verstärkte, tumorgerichtete T-Zell-Toxizität zu erzielen. Auch für die PH ist es denkbar, dass eine Verminderung oder Hemmung der ICAM-1-Wirkung auf das pulmonale Endothel therapeutische Optionen eröffnet, indem über eine verminderte Entzündungsreaktion konsekutive Endothelverletzungen und -dysfunktionen verhindert bzw. abgeschwächt werden. Zudem könnte

die Bestimmung von ICAM-1-Serumspiegeln, wie von Kobayashi et al. (2004) propagiert, zum Staging und Monitoring einer PH herangezogen werden.

5.2 Immunhistochemische Färbung mit VEGF und hämodynamische Untersuchung

In der immunhistochemischen Färbung mit VEGF-Antikörper zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikant höhere Intensität der Endothelfärbung in den HE-Klassen 1 und 2 im Vergleich zur HE-Klasse 0 und der Kontrollgruppe. Hieraus lässt sich auf ein vermehrtes Vorhandensein von VEGF im pulmonalen Gefäßendothel bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien der pulmonalen Hypertonie schließen. Des Weiteren fällt in den HE-Klassen 1 und 2 eine signifikant höhere Anfärbungsintensität des Endothels bei den kleinen Gefäßen im Vergleich zu den großen Gefäßen auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien erzielt. So konnte in einer prospektiven Studie an pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Formen kongenitaler Herzerkrankungen und pulmonaler Hypertonie in 13 von 34 Fällen VEGF in den intraoperativ gewonnenen Lungenbiopsien nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikant häufigere und stärkere positive Anfärbung des Endothels für VEGF bei fortgeschrittener pulmonaler Erkrankung. Zudem wurde eine häufig stärkere Anfärbung der kleineren abzweigenden Gefäße, der sogenannten „supernumerary arteries“, im Vergleich zu den größeren Ausgangsgefäßen beschrieben (Geiger et al., 2000). Starnes et al. (2000) untersuchten Serum-VEGF-Spiegel bei Kindern mit zyanotischen kongenitalen Herzfehlern im Vergleich zu solchen mit azyanotischen kongenitalen Herzerkrankungen. Sie fanden erhöhte VEGF-Spiegel im Serum der zyanotischen Patientengruppe und schlossen, dass VEGF möglicherweise die Ausbildung des für diese Patientengruppe typischen weitverzweigten Kollateralgefäßnetzes vermittelt, eventuell im Sinne einer abnormen Angiogenese. Eine andere Studie über Patienten mit zyanotischen kongenitalen Herzfehlern erbrachte ebenfalls Hinweise darauf, dass erhöhte VEGF-Spiegel im Zusammenhang mit den für zyanotische Herzfehler typischen kleinen Kollateralgefäßen stehen (Ootaki et al., 2003).

Shehata et al. (1999) veröffentlichten eine Arbeit über 21 neonatale Patienten mit kongenitaler Zwerchfellhernie und begleitender Lungenhypoplasie mit pulmonaler Hypertonie. Sie konnten ebenfalls eine signifikant erhöhte VEGF-Expression in den Lungenbiopsien der Patientengruppe

im Vergleich zu einer Neugeborenen-Kontrollgruppe ohne Lungenhypoplasie nachweisen. Die intensivste positive Färbung glatter Gefäßmuskelzellen zeigte sich auch hier in den kleinen pulmonalen Arterien. Eine positive Anfärbung des Endothels wurde nur in der Patientengruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe gefunden. Die Autoren erklären die stärkere VEGF-Expression in den kleinen pulmonalen Arterien mit deren wichtigen Rolle in der Regulation des pulmonalen Blutdrucks und des Gefäßwiderstands. Sie postulieren, dass eine erhöhte VEGF-Expression einen erfolglosen Versuch des Neugeborenen darstellen könnten, über eine Vergrößerung des pulmonal-vaskulären Gefäßbetts in der hypoplastischen Lunge, den hohen pulmonalen Druck zu senken. Aus der erhöhten VEGF-Expression in pulmonalen Arterien bei fortgeschrittenen Stadien der pulmonalen Hypertonie lässt sich nicht unmittelbar auf eine kausale Rolle in der Ätiologie schließen, allerdings legen Erkenntnisse über verschiedene Mechanismen, welche die VEGF-Expression hochregulieren, die Hypothese nahe, dass VEGF ein Faktor ist, der zur Entstehung der für die pulmonale Hypertonie typischen Gefäßläsionen beiträgt.

Eine besonders hohe Dichte an Bindungsstellen für VEGF beschreiben Ferrara et al. (1992) für das Endothel der Atrio-Ventrikularklappen des Herzens. Sie bringen dies in Zusammenhang mit der fortdauernden Notwendigkeit für Reparaturen kleiner Endothelschäden in dieser Lokalisation. Boussat et al. (2000) beschreiben eine hohe VEGF-Expression im Alveolarepithel von Nagern nach Verletzungen und bei Reparaturvorgängen. Erhöhte VEGF-Expression als Reaktion auf Endothelverletzungen sind auch für die pulmonale Hypertonie denkbar, da die Gefäße erhöhten mechanischen Belastungen ausgesetzt sind. Das Wirksamwerden erhöhter mechanischer Kräfte ist zusätzlich per se als Induktor einer erhöhten VEGF-Expression beschrieben. So kann es durch ungünstige rheologische Faktoren wie „shear stress“ oder lokale turbulente Blutflüsse zu einer Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF oder bFGF kommen, die ihrerseits VEGF hochregulieren (Fehrenbach et al., 1999). Hirose et al. (2000) untersuchten das Vorkommen von VEGF in plexiformen Läsionen, den für die fortgeschrittene pulmonale Hypertonie ab dem histologischen Stadium HE 3 bzw. 4 typischen Gebilde aus Endothelzellproliferation und modifizierten glatten Muskelzellen. Sie beschreiben hohe Konzentrationen des KDR-Rezeptors in den plexiformen Läsionen selbst, sowie hohe Konzentrationen des Flt-1-Rezeptors in unmittelbarer Umgebung. Diese auffällige Verteilung der VEGF-Rezeptoren in Verbindung mit den plexiformen Läsionen, führt die Autoren ebenfalls zu der Hypothese, dass fokale Faktoren wie turbulente Strömung oder lokale Hypoxie über eine erhöhte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen die vermehrte VEGF-Expression

triggern könnten. Die Hypoxie als Induktor erhöhter VEGF-Level wird des Weiteren auch von mehreren anderen Autoren beschrieben. Voelkel et al. (1993) ventilierten in ihrem Versuch Ratten mit einem hypoxischen Gasgemisch und eine Kontrollgruppe mit Raumluft. Bei der anschließenden Untersuchung der Rattenlungen zeigte sich sowohl nach Kurzzeit- wie auch nach Langzeithypoxie eine erhöhte Expression des VEGF-Gens sowie des VEGF-Rezeptorgens. Die hypoxieinduzierte Hochregulation von VEGF in Endothelzellen wird über einen transkriptionalen Mechanismus vermittelt, der über die spezifische Bindung des sogenannten „hypoxia inducible factor-1“ (HIF-1) an die 3'-Region des VEGF-Gens kontrolliert wird (Pham et al., 2002). Ebenfalls vorstellbar ist eine hypoxievermittelte erhöhte VEGF-mRNA-Stabilität (Neufeld et al., 1999). Becker et al. (2001) berichten über eine vermehrte Expression von VEGF und den zugehörigen Endothelzellrezeptoren infolge von kardialer und zerebraler Ischämie. Die lokale Hypoxie und lokale Entzündungsreaktionen sind neben den fokal erhöhten mechanischen Belastungen also auch mögliche Induktoren einer erhöhten VEGF-Expression bei der pulmonalen Hypertonie. Die erhöhten VEGF-Level selbst führen wiederum zu Endothelbarriere-dysfunktionen sowie einer vermehrten Gefäßpermeabilität und Zellmigration. Dies mag über Veränderungen im Zell-Zell-Kontakt entstehen. Eine mögliche zellbiologische Korrelation beschreiben Fehrenbach et al. (1999). Sie fanden in immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchungen VEGF-spezifische Anfärbungen in verschiedenen Zelltypen im Zytoplasma mit häufig granulärem Erscheinungsbild. Lediglich im Kapillarendothel war eine zusätzliche VEGF-Lokalisation in interzellulären Junctionen nachweisbar.

Einige Autoren erkennen im Endothelzellwachstum bei der schweren pulmonalen Hypertonie Ähnlichkeiten zum Krebszellwachstum. Voelkel et al. (2002) sehen einige der phänotypischen Hauptmerkmale von Krebszellen auch für die Endothelzellen bei der PH als gegeben, nämlich eine Missachtung von Signalen zum Proliferationsstopp bzw. von Differenzierungssignalen, ein Umgehen der Apoptose sowie die Ausbildung einer Angiogenese.

In der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass es auch in der Kontrollgruppe eine positive Anfärbung für VEGF gibt, die in etwa derjenigen der HE-Klasse 0 entspricht. Dies würde dafür sprechen, dass es eine konstante physiologische VEGF-Expression in den pulmonalen Gefäßen gibt, die bei pathologischen Prozessen hochreguliert wird. Hierzu gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Hirose et al. (2000) wiesen VEGF nur in den plexiformen Läsionen der Patientengruppe nach, nicht aber in den Pulmonalgefäßen der Kontrollgruppe. In einer anderen Studie über das Vorkommen von VEGF in pulmonalen plexogenen Arteriopathien aufgrund

kongenitaler Herzerkrankungen wurde hingegen kein Unterschied zwischen der VEGF-Expression der Kontrollgruppe und den Patienten mit milden pulmonalarteriellen Veränderungen festgestellt. Die Patienten mit schweren Lungengefäßveränderungen hingegen zeigten ein vermehrtes Vorkommen von VEGF (Geiger et al., 2000). Fehrenbach et al. (1999) erklären die teilweise positive Anfärbung für VEGF in ihrer Kontrollgruppe durch eine eventuelle temporäre physiologische VEGF-Ausschüttung in der Kindheit zur Regulierung des Lungengefäßwachstums. Bei der Kontrollgruppe in der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich größtenteils um Kinder im Früh- und Neugeborenenalter, so dass sich auch in diesem Fall die positive Anfärbbarkeit für VEGF durch eine physiologische Ausschüttung zur Kontrolle des Lungengefäßwachstums erklären lassen könnte.

Bezüglich der Korrelation zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung und den ausgewerteten hämodynamischen Parametern zeigte sich in der vorliegenden Arbeit für VEGF eine tendenzielle Zunahme der Anfärbungsintensität mit steigendem Shuntverhältnis Q_p/Q_s . Für einen zunehmenden systolischen pulmonalarteriellen Druck PAPs bzw. zunehmende Widerstandsverhältnisse zwischen Lungen- und Körperkreislauf R_p/R_s wurde keine Zunahme der Anfärbungsintensität beobachtet. Der mangelnde Nachweis von Signifikanzen in diesem Bereich mag hier ebenfalls auf den kleinen Stichprobenumfang zurückzuführen sein. Allerdings finden sich auch hierfür mehrere Studien in der Literatur, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen und hämodynamischen Untersuchung zeigen konnten. In der oben bereits angeführten Studie von Geiger et al. (2000) über die VEGF-Expression in pulmonalen plexogenen Läsionen bei Patienten mit kongenitaler Herzkrankheit wurde ebenfalls versucht, ein Zusammenhang zwischen der vermehrten VEGF-Expression in schweren Lungengefäßveränderungen bei pulmonaler Hypertonie und hämodynamischen Parametern zu erfassen. Untersucht wurden der pulmonalarterielle Druck, die Shuntgröße und der system- bzw. pulmonalarterielle Widerstand. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen VEGF-positiven und VEGF-negativen Patienten ermittelt werden.

In einer anderen Studie wurden vergleichend die Serum-VEGF-Spiegel pädiatrischer Patienten mit azyanotischen und solcher mit zyanotischen kongenitalen Herzfehlern untersucht. In der zyanotischen Patientengruppe fanden sich signifikant erhöhte VEGF-Spiegel im Serum. Eine signifikante Korrelation zwischen den VEGF-Spiegeln und den bei den Patienten gemessenen Sauerstoffsättigungen konnte allerdings nicht gezeigt werden (Ootaki et al., 2003).

Abschließend sei noch einmal die zuvor bereits angeführte Studie von Fehrenbach et al. (1999) erwähnt, in der ebenfalls davon ausgegangen wird, dass VEGF neben anderen Faktoren über veränderte mechanische Bedingungen hochreguliert wird. Auch hier war es den Autoren nicht möglich, eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten VEGF-Werten und der Hämodynamik aufzuzeigen.

Es besteht Hoffnung, die Funktionen von VEGF in Zukunft eventuell auch therapeutisch nutzen zu können, z.B. als Induktor einer Neovaskularisation/ Kollateralenbildung bei Atherosklerose oder zur Prävention einer Restenose nach PTA. Auf der anderen Seite könnten VEGF-Antikörper therapeutisches Potential in der Unterdrückung der Tumovaskularisation und damit des Tumorwachstums besitzen (Ferrara, 1993). Auch im Rahmen der Behandlung einer PH ist es denkbar, durch eine Hemmung oder Abschwächung der VEGF-Expression dessen negative Auswirkungen auf das Endothel, wie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, eine vermehrte Zellmigration oder die Entstehung einer Endothelbarrieredysfunktion, zu limitieren. Eventuell ließe sich so auch einem deregulierten Wachstum von Endothelzellen in den plexiformen Läsionen der höhergradigen PH vorbeugen.

5.3 Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine zunehmende Konzentration von ICAM-1 und VEGF in pulmonalarteriellen Gefäßen mit steigender HE-Klasse, d.h. mit fortschreitendem Krankheitsverlauf der pulmonalen Hypertonie gezeigt werden. Diese Beobachtung trifft in besonderem Maße auf die kleinen pulmonalen Arterien zu, die eine wichtige Rolle in der Regulation des pulmonalen Blutdrucks und des pulmonalen Gefäßwiderstandes spielen. Aus anderen Studien ist bekannt, dass die ICAM-1- und VEGF-Expression u.a. über mechanische Faktoren wie „shear stress“, über Entzündungsfaktoren und im hypoxischen Milieu hochreguliert werden. Dies sind Faktoren, denen auch die pulmonalen Gefäße bei einer PH ausgesetzt sind. Entstehende Endothelverletzungen führen mutmaßlich zu einer weiteren Erhöhung der VEGF-Expression mit konsekutiver Endothelbarrieredysfunktion sowie erhöhter Gefäßpermeabilität und vermehrter Zellmigration. ICAM-1 triggert vermutlich über eine gesteigerte bzw. abnorme Leukozytenadhäsion Entzündungsreaktionen, die ihrerseits wiederum

zu Endothelverletzungen und mikrovaskulärer Dysfunktion beitragen. Die Endotheldysfunktion scheint ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der für die PH typischen histopathologischen Veränderungen zu sein. In der Zusammenschau der eigenen Ergebnisse mit den Erkenntnissen anderer Autoren könnte eine Rolle von ICAM-1 und VEGF in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie gegeben sein.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der pulmonalen Hypertonie bei kongenitalen Herzerkrankungen. Neben den morphometrischen Daten des Lungengewebes wurde mittels eines immunhistochemischen Verfahrens die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) und des Wachstumsfaktors VEGF (Vascular endothelial growth factor) im pulmonalen Gefäßendothel bei einer Gruppe von 30 pädiatrischen Patienten sowie einer Kontrollgruppe aus 6 Kindern, die nicht an einer pulmonalvaskulären Erkrankung verstorben waren, untersucht. Zusätzlich wurden von 12 Personen aus der Patientengruppe die präoperativ mittels einer Herzkatheteruntersuchung gewonnenen hämodynamischen Daten ausgewertet. Als Grunderkrankungen in der Patientengruppe fanden sich 9 ASDs, 13 VSDs, 6 VSDs + PDAs, 1 VSD + ASD und 1 pAVK. Hinsichtlich der pulmonalen Hypertonie war bereits eine Einteilung in Schweregrade gemäß der Klassifizierung nach Heath-Edwards (HE) vorgenommen worden.

Analysen erfolgten bezüglich der vorliegenden Diagnosen, der HE-Klassifizierung, des Widerstandsverhältnisses (R_p/R_s), des pulmonalarteriellen Drucks (PAPs) und bezüglich des Shuntverhältnisses (Q_p/Q_s). Zielsetzung der Untersuchung war es, eine mögliche positive Korrelation zwischen der Expressionsstärke von ICAM-1 bzw. VEGF und dem Schweregrad der pulmonalen Hypertonie zu detektieren.

Als Ergebnis konnte für ICAM-1 eine signifikante Zunahme der Intensität der Endothelanfärbung mit steigender HE-Klasse nachgewiesen werden. Die Anfärbungsintensität in der HE-Klasse 0 entsprach in etwa derjenigen der Kontrollgruppe. Zusätzlich zeigte sich in den HE-Klassen 1 und 2 eine signifikant stärkere Anfärbung des Endothels bei kleinen Gefäßen im Vergleich zu großen Gefäßen. Bezüglich der hämodynamischen Auswertung zeigte sich eine Tendenz zur erhöhten Anfärbungsintensität für ICAM-1 mit steigenden Werten für den systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs).

Für VEGF ist eine signifikant stärkere Endothelanfärbung in den Klassen HE 1 und HE 2 im Vergleich zur Klasse HE 0 und der Kontrollgruppe beobachtet worden. Auch hier zeigte sich in den HE-Klassen 1 und 2 eine signifikant verstärkte Anfärbungsintensität des Endothels bei kleinen Gefäßen im Vergleich zu großen Gefäßen.

Bezüglich der hämodynamischen Auswertung zeigte sich eine Tendenz zu einer verstärkten Intensität der Anfärbung für VEGF bei größerem Shunt (Q_p/Q_s). Eine positive Korrelation zwischen der Anfärbungsintensität von ICAM-1 bzw. VEGF und steigendem Widerstandsverhältnis (R_p/R_s) war nicht zu beobachten.

Folgende Schlussfolgerungen können gezogen werden: Die oben genannten Ergebnisse unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die ICAM-1- und VEGF-Expression durch chemisch-physikalische Faktoren wie „shear stress“, Entzündungsmediatoren oder Hypoxie, die auch im Milieu des hypertensiven pulmonalen Gefäßbettes vorhanden sind, getriggert werden können, machen eine kausale Rolle von ICAM-1 und VEGF in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie wahrscheinlich. Eine wichtige Rolle dürfte dabei die durch hohe ICAM-1- bzw. VEGF-Level entstehende Endothelzellfunktion spielen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- (01) Abe E, Matsubara K, Ochi H, Ito M, Oka K, Kameda K.
Elevated levels of adhesion molecules derived from leukocytes and endothelial cells in patients with pregnancy-induced hypertension. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22: 31-43
- (02) Attar MA, Bailie MV, Christensen PJ, Brock TG, Wilcoxon SE, Paine R.
Induction of ICAM-1 expression on alveolar epithelial cells during lung development in rats and humans. *Exp Lung Res* Apr-May 1999; 25: 245-259
- (03) Barton WW, Wilcoxon S, Christensen PJ, Paine R.
Disparate cytokine regulation of ICAM-1 in rat alveolar epithelial cells and pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269: L127-L135
- (04) Becker PM, Verin AD, Booth MA, Liu F, Birukova A, Garcia JGN.
Differential regulation of diverse physiological responses to VEGF in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L1500-1511
- (05) Boussat S, Eddahibi S, Coste A, Fataccioli V, Gouge M, Housset B, Adnot S, Maitre B.
Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L371-L378
- (06) Breuer J, Irtel von Brenndorf C, Baden W, Sieverding L, Steil E, Häberle L, Fenchel G, Apitz J.
Verbesserung der perioperativen Hämodynamik und des Gasaustausches durch Inhalation mit Stickstoffmonoxid bei Kindern mit angeborenen kardiopulmonalen Fehlbildungen. *Z Kardiol* 1995; 84: 1009-1017
- (07) Choe KO, Cho BK, Choi BW, Park CI, Lee SK.
Histologic changes of pulmonary arteries in congenital heart disease with left-to-right shunt (part 1): correlated with preoperative pulmonary hemodynamics. Emphasizing the significance of pulmonary arterial concentration. *Yonsei Med J* 2002; 43: 73-81
- (08) Christensen PJ, Kim S, Simon RH, Toews GB, Paine R.
Differentiation-related expression of ICAM-1 by rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 9-15

- (09) Dunbar IVY.
Diagnosis and treatment of severe pediatric pulmonary hypertension. *Cardiol Rev* Jul-Aug 2001; 9: 227-237
- (10) Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho M-P, Naeije R, Adnot S.
Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2002; 20: 1559-1572
- (11) Fehrenbach H, Kasper M, Haase M, Schuh D, Müller M.
Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy. *Anat Rec* Jan 1999; 254: 61-73
- (12) Ferrara N.
Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 244-250
- (13) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW.
Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrin Rev* 1992; 13: 18-32
- (14) Feuerhake F, Füchsl G, Bals R.
Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung : immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 387-394
- (15) Feuerhake F, Füchsl G, Welsch U.
Immunhistologische Untersuchung zur Lokalisation von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) im Alveolarepithel der menschlichen Lunge. *Pneumologie* Dec 1998; 52: 707-713
- (16) Fingar VH, Taber SW, Buschemeyer WC, ten Tije A, Cerrito PB, Tseng M, Guo H, Johnston MN, Wieman TJ.
Constitutive and stimulated expression of ICAM-1 protein on pulmonary endothelial cells in vivo. *Microvasc Res* Sept 1997; 54: 135-144
- (17) Geiger R, Berger RMF, Hess J, Bogers AJJC, Sharma HS, Mooi WJ.
Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J Pathol* 2000; 191: 202-207

- (18) Gorenflo M, Ullmann M, Sebening C, Brockmeier K, Hagl S, Ulmer HE, Otto HF, Schnabel PA.
The index of pulmonary vascular disease in children with congenital heart disease: relationship to clinical and haemodynamic findings. *Virchows Arch Sep* 2002; 441: 264-270
- (19) Granton JT, Rabinovitch M.
Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease. *Cardiol Clin Aug* 2002; 20: 441-457
- (20) Hahn TL, Whitfield R, Salter J, Granger N, Unthank JL, Lalka SG.
Evaluation of the role of intercellular adhesion molecule 1 in a rodent model of chronic venous hypertension. *J Surg Res Feb* 2000; 88: 150-154
- (21) Hamacher J, Schaberg T.
Adhesion molecules in lung diseases. *Lung* 1994; 172: 189-213
- (22) Haworth SG.
Pulmonary hypertension in childhood. *Eur Respir J* 1993; 6: 1037-1043
- (23) Heath D, Edwards JE.
The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. *Circulation* 1958; 18: 533-547
- (24) Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E.
Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathology International* 2000; 50: 472-479
- (25) Hogg N, Bates PA, Harvey J.
Structure and function of intercellular adhesion molecule-1. *Chem Immunol* 1991; 50: 98-115
- (26) Hosoda Y.
Pathology of pulmonary hypertension: a human and experimental study. *Pathol Int* 1994; 44: 241-267
- (27) Jun C-D, Carman CV, Redick SD, Shimaoka M, Erickson HP, Springer TA.
Ultrastructure and function of demerig, soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) *J Biol Chem Aug* 2001; 276: 29019-29029

- (28) Kaner RJ, Crystal RG.
Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Med Apr* 2001; 7: 240-246
- (29) Knies RO.
Veränderung leukozytärer Oberflächenantigene bei Kindern durch herzchirurgische Eingriffe und NO-Inhalationstherapie. Medizinische Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen (1999)
- (30) Kobayashi H, Yamataka A, Okazaki T, Lane GJ, Puri P, Miyano T.
Increased levels of circulating adhesion molecules in neonates with congenital diaphragmatic hernia complicated by persistent pulmonary hypertension. *Pediatr Surg Int* Jan 2004; 20: 19-23
- (31) Komatsu S, Panés J, Russell JM, Anderson DC, Muzykantov VR, Miyasaka M, Granger DN.
Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 683-689
- (32) Lang I.
Neues über pulmonale Hypertension. *J Kardiol* 2004; 11: 21-9
- (33) Lee S-D, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM.
Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1998; 101: 927-934
- (34) Meyrick B.
The pathology of pulmonary artery hypertension. *Clin Chest Med* Sept 2001; 22(3): p393-404
- (35) Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE.
Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 1995; 78(6): 2245-2252
- (36) Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Gimbrone MA.
Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* Aug 1994; 94: 885-891

- (37) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22
- (38) Ootaki Y, Yamaguchi M, Yoshimura N, Oka S, Yoshida M, Hasegawa T.
Vascular endothelial growth factor in children with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1523-1626
- (39) Paine R, Christensen P, Toews GB, Simon RH.
Regulation of alveolar epithelial cell ICAM-1 expression by cell shape and cell-cell interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1994; 266: L476-L484
- (40) Pham E, Uchida T, Planes C, Ware L, Kaner R, Matthay MA, Clerici C.
Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L1133-L1142
- (41) Piela TH, Korn JH.
ICAM-1-dependent fibroblast-lymphocyte adhesion: discordance between surface expression and function of ICAM-1. *Cell Immunol* 1990; 129: 125-137
- (42) Preston RA, Materson MLBJ, Baltondano NM, Memon A, Alonso A.
Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. *J Hypertens* May 2002; 20: 871-877
- (43) Quinn TP, Schlueter M, Soifer SJ, Gutierrez JA.
Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L897-L903
- (44) Rabinovitch M, Bothwell T, Hayakawa BN, Williams WG, Trusler GA, Rowe RD, Olley PM, Cutz E.
Pulmonary artery endothelial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension. *Lab Invest* 1986; 55: 632-653
- (45) Radisavljevic Z, Avraham H, Avraham S.
Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 20770-20774

- (46) Schranz D.
Pulmonale Hypertonie im Kindes- und Jugendalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 2003; 151: 424-441
- (47) Shehata SMK, Mooi WJ, Okazaki T, El-Banna I, Sharma HS, Tibboel D.
Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54: 427-431
- (48) Starnes S, Duncan B, Kneebone J, Rosenthal G, Jones T, Grifka R, Cecchin F, Owens D, Fearneyhough C, Lupinetti F.
Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in children with cyanotic congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 534-539
- (49) Steinhorn RH, Fineman JR.
The pathophysiology of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *Artif Organs* Nov 1999; 23: 970-974
- (50) Suzuki Y, Aoki T, Takeuchi O, Nishio K, Suzuki K, Miyata A, Oyamada Y, Dakasugi T, Mori M, Fujita H, Yamaguchi K.
Effect of hyperoxia on adhesion molecule expression in human endothelial cells and neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 272: L418-L425
- (51) Tudor RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF.
The pathobiology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 2001; 22:405-418
- (52) Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF.
Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144: 275-285
- (53) Van de Stolpe A, Van der Saag PT.
Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74: 13-33
- (54) Veyssier-Belot C, Cacoub P.
Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 274-282

- (55) Voelkel N, Cool C, Taraceviene-Stewart L, Geraci M, Yeager M, Bull T, Kasper M, Tudor R.
Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2002; 30: S251-S256
- (56) Voelkel NF, Tudor RM.
Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 1997; 10: 231-241
- (57) Voelkel N, Hoepfer M, Maloney J, Tudor RM.
Vascular endothelial growth factor in pulmonary hypertension. *Ann N Y Acad Sci* Oct 1996; 796: 186-193
- (58) Wang Q, Pfeiffer GR, Stevens T, Doerschuk CM.
Lung microvascular and arterial endothelial cells differ in their responses to intercellular adhesion molecule-1 ligation. *Am J Respir Crit Care Med* Sept 2002; 166: 872-877
- (59) Yamaki S, Endo M, Takahashi T.
Different grades of medial hypertrophy and intimal changes in small pulmonary arteries among various types of congenital heart disease with pulmonary hypertension. *Tohoku J Exp Med* 1997; 182: 83-91

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Darstellung der Adhäsionskaskade am Gefäßendothel	19
Abb. 2	Verteilung der Diagnosen im gesamten Patientenkollektiv	26
Abb. 3	Verteilung der Diagnosen im Teilpatientenkollektiv, für welches Daten zur hämodynamische Analyse zur Verfügung standen	26
Abb. 4a	Schematische Darstellung monoklonaler Antikörper	28
Abb. 4b	Schematische Darstellung polyklonaler Antikörper	28
Abb. 4c	Schematische Darstellung der immunenzymatischen Färbung nach der LSAB-Methode (3-Schritt indirekte Methode)	29
Abb. 5	Verwendetes Laborprotokoll zur Darstellung der Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung	32
Abb. 6	ICAM-1 - schwache Anfärbung	38
Abb. 7	ICAM-1 - mittelstarke Anfärbung	38
Abb. 8	ICAM-1 - starke Anfärbung	38
Abb. 9	ICAM-1 – Negativkontrolle	38
Abb. 10	VEGF – schwache Anfärbung	39
Abb. 11	VEGF – mittelstarke Anfärbung	39
Abb. 12	VEGF – starke Anfärbung	39
Abb. 13	VEGF – Negativkontrolle	39
Abb. 14a	Darstellung des Gefäßdurchmessers bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1-Färbung	42
Abb. 14b	Darstellung des Gefäßdurchmessers bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der VEGF-Färbung	42
Abb. 15a	Darstellung des Umfangs des Gefäßlumens bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	43
Abb. 15b	Darstellung der Fläche des Gefäßlumens bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	43
Abb. 16a	Darstellung der Dicke der Gefäßwand bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der ICAM-1-Färbung	44
Abb. 16b	Darstellung der Dicke der Gefäßwand bei den Patienten- und der Kontrollgruppe bei der VEGF-Färbung	44

Abb. 17a	Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug auf die HE-Klasse und die Gefäßgröße bei der ICAM-1-Färbung	46
Abb. 17b	Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug auf die HE-Klasse und die Gefäßgröße bei der VEGF-Färbung	46
Abb. 18a	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die HE-Klassen-Gruppierung bei der ICAM-1-Färbung	47
Abb. 18b	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die HE-Klassen-Gruppierung bei der VEGF-Färbung	47
Abb. 19a	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zur HE-Klasse und der Gefäßgröße bei der ICAM-1-Färbung	49
Abb. 19b	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zur HE-Klasse und der Gefäßgröße bei der VEGF-Färbung	49
Abb. 20	Darstellung des rechtsventrikulären Drucks (RVP) in den Patientengruppen	50
Abb. 21	Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVP) in den Patientengruppen	50
Abb. 22	Darstellung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (PAPm) in den Patientengruppen bezogen auf die HE-Gruppierung	51
Abb. 23	Darstellung des Verhältnisses pulmonalarterieller Druck zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) in Bezug auf die HE-Klassifizierung	51
Abb. 24	Darstellung der Shuntverhältnisse in den Patientengruppen in Abhängigkeit von der HE-Klassifizierung	52
Abb. 25	Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO ₂ ao bzw. SO ₂ pa) in Bezug zur HE-Klassifizierung	53
Abb. 26	Darstellung des Gefäßdurchmessers in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	54
Abb. 27a	Darstellung des Umfangs und des Gefäßlumens in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	55
Abb. 27b	Darstellung der Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	55
Abb. 28	Darstellung der Gefäßwanddicke in Abhängigkeit vom Widerstandsverhältnis (Rp/Rs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	55

Abb. 29	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse (R_p/R_s) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	56
Abb. 30	Darstellung des rechtsventrikulären Drucks (RVP) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	57
Abb. 31	Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVP) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	57
Abb. 32	Darstellung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (PAPm) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	57
Abb. 33	Darstellung des Verhältnisses pulmonalarterieller Druck zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	58
Abb. 34	Darstellung der Shuntverhältnisse in den Patientengruppen in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	59
Abb. 35	Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO_2 ao bzw. SO_2 pa) in Bezug auf die Widerstandsverhältnisse R_p/R_s	60
Abb. 36	Darstellung der Gefäßdurchmesser in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	61
Abb. 37a	Darstellung des Umfangs und des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	62
Abb. 37b	Darstellung der Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	62
Abb. 38	Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	63
Abb. 39	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	63
Abb. 40	Darstellung des Shuntverhältnisses (Q_p/Q_s) in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs)	64
Abb. 41	Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung (SO_2 ao bzw. SO_2 pa) in Bezug zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (PAPs)	65

Abb. 42	Darstellung des Gefäßdurchmessers in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	66
Abb. 43a	Darstellung des Umfangs des Gefäßlumens in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	67
Abb. 43b	Darstellung der Fläche des Gefäßlumens in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	67
Abb. 44	Darstellung der Dicke der Gefäßwand in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	68
Abb. 45	Darstellung der Intensität der Anfärbung in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs) bei der ICAM-1- und VEGF-Färbung	68
Abb. 46a	Darstellung des rechtsventrikulären Drucks (RVP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)	69
Abb. 46b	Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)	69
Abb. 47	Darstellung des Quotienten pulmonal- zu systemarteriellem Druck (PAP/SAP) in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)	70
Abb. 48	Darstellung der system- und pulmonalarteriellen Sauerstoffsättigung in Bezug zum Shuntverhältnis (Qp/Qs)	70

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	WHO-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	16
Tab. 2	Bei präoperativen Herzkatheteruntersuchungen erhobene hämodynamische Parameter	27
Tab. 3	Auflistung der für die immunhistochemischen Färbungen und deren Auswertung verwendeten Materialien	34
Tab. 4	Definition des Signifikanzniveaus für die statistische Auswertung	36
Tab. 5	Hämodynamische und morphometrische Daten geordnet nach Diagnosen	40

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Privatdozent Dr. med. J. Breuer für die Überlassung des interessanten Themas, für seinen Rat und seine fachkundige Begleitung,

Herrn Dr. med. R. Knies, der sich stets Zeit für meine Fragen und Anliegen nahm, für die hilfsbereite und kompetente Betreuung,

Frau Prof. G. Knöpfle, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Bonn, für die freundliche Bereitstellung der Kontrollgruppen-Präparate,

Frau Ehring, Frau Maslack und Frau Schwartz für nützliche Tipps im Laboralltag,

meiner Familie für die Unterstützung während des gesamten Studiums.