

**Vaskuläre und hämodynamische Effekte
von Urotensin II bei Ratten
mit sekundärer biliärer Leberzirrhose**

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

Vorgelegt von
Nicolas Fischer
aus Schiedam (NL)

2009

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Jörg Heller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Hirner

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.02.2009

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

aus der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Tilmann Sauerbruch

Meinen Eltern,
meinem Bruder,
meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite:
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Definition der portalen Hypertension	9
1.2 Ätiologie	9
1.3 Pathogenese und Pathophysiologie	10
1.4 Folgen der portalen Hypertension	11
1.4.1 Portosystemische Kollateralen und Hypersplenismus	11
1.4.2 Aszites und hepato-renales Syndrom	13
1.5 Hämodynamische Veränderungen bei portaler Hypertension	16
1.6 Verminderte Kontraktilität bei portaler Hypertension	18
1.7 Aktivierung von endogenen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren bei portaler Hypertension	19
1.7.1 Vasoaktive Substanzen	19
1.7.2 Vasokonstriktoren	20
1.7.3 Stickstoffmonoxid als wichtigster Vasodilatator	21
1.8 Therapie der portalen Hypertension und gastrointestinalen Blutung	22
1.8.1 Therapeutische Strategien	22
1.8.2 Manipulation der intrahepatischen Zirkulation	24
1.8.3 Senkung des splanchnischen Blutflusses	25
1.9 Urotensin II	27
1.9.1 Vaskuläre Effekte von Urotensin II	30
1.9.1.1 Bei Ratten	30
1.9.1.2 Bei anderen Säugern	32
1.9.2 Der UT II-Rezeptor	33
1.9.3 Urotensin II-Spiegel bei portaler Hypertension	34
2. Ziel der Arbeit	34

3. Methoden	35
3.1 Häodynamischer Versuch	35
3.2 Tiermodell der Gallengangligierten Ratte	35
3.3 Häodynamische Messungen	36
3.3.1 Messung von Blut- und Pfortaderdruck	36
3.3.2 Messung der Durchblutung mit kolorierten Mikrosphären	37
3.4 In vitro-Kontraktilitätsversuche mit isolierten Aorten-Ringen	39
3.5 Statistische Auswertung	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Häodynamische Messungen	43
4.2 In vitro-Kontraktilitätsversuche mit isolierten Aorten-Ringen	50
5. Diskussion	52
5.1 Zusammenfassung	57
6. Anhang	59
- Literaturverzeichnis	59
- Danksagung	70
- Lebenslauf	71

- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ADH	Anti-diuretisches Hormon
cGMP	Zyklisches Guanylatmonophosphat
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Halbmaximale Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _{max}	Maximale Kontraktion
ET-1	Endothelin-1
g	Gramm
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunden
Hkt.	Hämatokrit
HRS	Hepatorenales Syndrom
5-HT	5-Hydroxytryptamin
hUll	Humanes Urotensin II
i.U.	Im Urin
i.v.	Intravenös
KBF	Kardialer Blutfluß
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
L-NNA	N-Nitro-L-Arginin
M	Mol
M.	Musculus
MAP	Mittlerer arterieller Druck
meq	Milliequivalente
min.	Minuten

ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Mitochondrionale Ribodesoxynukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Nano
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
p	Piko
PSS	Portosystemischer Shunt
PVI	Portalvenöser Einstrom
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SEM	Standardabweichung
SENR	Sensory epithelium neuropeptide-like receptors
SNS	Systemisches Neurophysiologisches System
Ull	Urotensin II
V.	Vena
Vv.	Venae

1. Einleitung

1.1 Definition der portalen Hypertension

Die Blutversorgung der Leber wird von drei Hauptgefäßen gewährleistet: Der zuführenden V. portae hepatis, der A. hepatica propria und den abführenden Vv. hepaticae.

Die V. portae hepatis liefert den Hauptanteil des zugeführten Blutes an die Leber. Sie erhält venöses Blut aus der V. lienalis und der Vv. mesentericae inferior und superior. Die A. hepatica propria, das Vas privatum der Leber, versorgt diese mit Sauerstoff. Sie zweigt sich von der A. hepatica communis ab. Vene und Arterie laufen intrahepatisch parallel und bilden mit den Gallengängen die Glisson-Trias. Das Blut fließt schließlich in den Sinusoiden zusammen. Von dort gelangt es über Vv. centrales und sublobuläre Venen in die Vv. hepaticae, die schließlich in die V. cava inferior mündet.

Beträgt beim Gesunden der Druck in der Pfortader 3-6 mmHg, so ist der Pfortaderhochdruck als anhaltende Erhöhung des Druckes in der V. portae von ≥ 7 mmHg oder einem ebenso anhaltenden transhepatischen Druckgradienten von ≥ 5 mmHg (physiologisch: ≤ 4 mmHg) definiert (Sauerbruch und Hirner, 1999).

1.2 Ätiologie

Groszmann und Altmann (Altmann, 1975; Groszmann und Atterbury, 1982) teilen die Ursachen für einen portalen Hochdruck in drei Kategorien auf:

1. Portovenöse Zuflussstörung- Prähepatischer Block

Angeboren: Missbildungen, Entwicklungsvarianten und Regressionsstörungen der Vv. vitellinae und des D. venosus Arantii

Erworben: Pfortaderthrombosen unterschiedlicher Ätiologie, Tumorkompression

2. Intrahepatische Durchflussstörungen - Intrahepatischer Block:

Angeboren: Konnatale Leberfibrose, Alpha-1-Antitrypsinmangel, Glykogenose Typ IV, Morbus Wilson, Mukoviszidose, extrahepatische Gallengangsatresie, intrahepatische Hypoplasieformen

Erworben: Virushepatitis, Schistosomiasis, Budd-Chiari-Syndrom, Peliosis hepatis, Alkoholhepatitis, Amyloidose, noduläre Hyperplasie, Toxisch

3. Hepatovenöse Abflussstörungen- posthepatischer Block:

Angeboren: Anomalien der Lebervenen und der V. cava thoracica

Erworben: Fibroblastische Endothelproliferation, Concretio pericardii, Budd-Chiari-Syndrom

1.3 Pathogenese und Pathophysiologie

Der Pfortaderhochdruck bei der Leberzirrhose wird einerseits durch einen erhöhten intrahepatischen Widerstand für den Pfortaderfluss und andererseits durch eine Vasodilatation splanchnischer Gefäße mit einem vermehrten portovenösen Zustrom verursacht.

Der Pathomechanismus des portalen Hochdrucks lässt sich, vereinfacht dargestellt, mit dem Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz erklären: $P = F \cdot 8 \eta L / \pi r^4$. (P = Druck, F = portaler Fluss, L = Länge des Gefäßes, η = Viskosität des Blutes [Hkt]). Eine Einengung des Gefäßradius' bewirkt demnach eine Erhöhung des Druckes zur vierten Potenz. Texturveränderungen der Leber, wie sie bei einer Zirrhose vorkommen, sind demzufolge ursächlich für eine Druckveränderung.

Der portalen Hypertension liegt primär ein erhöhter intrahepatischer Gefäßwiderstand zugrunde. Später ist dann auch eine Zunahme des Blutflusses am Hochdruck beteiligt (Carale und Mukherjee, 2004). Der intrahepatische Widerstand wird einerseits statisch, z.B. durch die Verengung der sinusoidalen Strombahn, andererseits aber auch aktiv z.B. durch einen erhöhten Tonus der perisinusoidalen Myofibroblasten (Sternzellen) und präsinusoidalen portalen Venolen verursacht.

Der Gefäßwiderstand der Leber ändert sich unter physiologischen Bedingungen passiv (infolge von Druckveränderungen) oder aktiv durch vasomotorische Nerven oder Hormone. Pathologische Widerstandsänderungen basieren auf Gefäßeinengungen, -verlegungen oder -sklerosierungen, die in jedem Ort des Portalvenensystems vorkommen können. Diese Gefäßeinengungen sind die Folge der Gerinnungsstörungen, Venenerkrankungen, fibrotischen Umbaus, Traumen, Tumore oder Anomalien (Bessa und Helmy, 1985; Terada et al., 1991).

Dazu kommt ein vermehrtes Ansprechen der intrahepatischen Widerstandsgefäße auf Vasokonstriktoren und eine verminderte Ausschüttung von intrahepatischen Vasodilatoren (z.B. NO)(Zhou et al., 2006).

1.4 Folgen der portalen Hypertension

1.4.1 Portosystemische Kollateralen und Hypersplenismus

Bedeutende Folgen des portalen Hypertonus sind die Ausbildung von portosystemischen Kollateralen und die Splenomegalie. Das am Durchfluss behinderte Blut staut sich zunächst in der Milz. Eine Hypersplenie und Hyperplasie des retikuloendothelialen Systems stellt sich ein. Eine splenomegale Markhemmung mit Hämolyse und Antikörperbildung sind die Folge. Am gefährlichsten sind jedoch die portokavalen Kurzschlüsse und Kollateralkreisläufe (Abb.1).

Der wichtigste Kollateralkreislauf ist eine Verbindung über die kurzen Magenvenen, die Venen des Fundus und der Vv. gastricae sinistrae über die Ösophagusvenen zu den Vv. azygos und hemiazygos.

Sobald die Varizen (-systeme) die Schleimhäute (insbesondere am Kardiasphinkter) erreicht haben, sind diese besonders vulnerabel und neigen leicht zur Ruptur. Die Varizenbildung, und am häufigsten die der ösophagealen Venen, stellt die tödlichste Komplikation der portalen Hypertonie dar.

Das Risiko einer Varizenblutung liegt bei 25-35% im ersten Jahr nach Diagnosestellung (The North Italian Endoscopic Club for the Study and Treatment of Esophageal Varices, 1988). Die recht hohe Mortalität bei Erstmanifestation von 30-50% (Kleber et al., 1991; Ready und Rector, 1989) konnte in den letzten Jahren durch neue Interventionsverfahren auf unter 20% gesenkt werden (Abralles et al., 2004; Bosch und Abralles, 2004). Ösophagusvarizen entstehen ab einem portosystemischen Druckgradienten von etwa 10 mmHg. Eine Blutungsgefahr besteht ab einem Gradienten von etwa 12 mmHg. Wichtigstes Ziel einer jeden Therapie ist es also diesen portosystemischen Druckgradienten auf unter 12 mmHg zu senken.

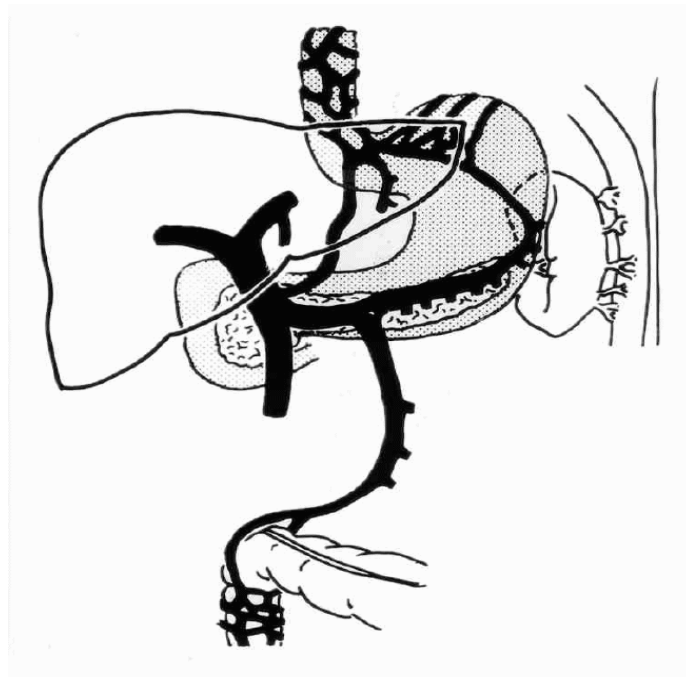


Abb. 1 Enterohepatische Umgehungskreisläufe (nach Prof. Dr. med. Reichen) (Reichen, 2005)

1.4.2 Aszites und hepatorenales Syndrom

Der erhöhte Pfortaderdruck und die daraus resultierende hyperdynamische Zirkulation ziehen auch pathologische Veränderungen auf renaler Ebene nach sich. Hierzu gehört die exzessive Retention von Natrium und Wasser, welche dann die Bildung von Aszites nach sich zieht.

Die hyperdynamische Zirkulation wird durch ein stark erhöhtes Blutvolumen unterhalten, welches jedoch sehr ungleich verteilt ist: Im splanchnischen und im venösen Gefäßbett ist das Blutvolumen gepoolt, während aber das effektive arterielle Blutvolumen deutlich verringert ist. Beide Phänomene sind voneinander abhängig: Auf der einen Seite führt eine gesteigerte Natrium- und Wasserresorption zu einer Erhöhung des Blutvolumens mit daraufhin gesteigertem Herzminutenvolumen und splanchnischer Hyperperfusion, auf der anderen Seite verursacht die primär arterielle Vasodilatation mit Abfall des mittleren arteriellen Drucks eine Zunahme des effektiven Blutvolumens durch die sekundäre Aktivierung vasokonstriktorischer Feedback-Mechanismen (RAAS, Sympathikus, Vasopressin) (Arroyo et al., 1996; Henriksen, 1995).

Die arterielle Vasodilatation im Splanchnikusgebiet hat zwei Folgen, die zur Aszitesbildung führen: Auf der einen Seite führt die splanchnische Hyperperfusion zu einem erhöhten kapillären Druck und daraufhin zu einer erhöhten Permeabilität, die dann in eine erhöhte Lymphbildung mündet. Auf der anderen Seite führt die splanchnische Vasodilatation zur Erniedrigung des effektiven arteriellen Blutvolumens („underfilling“). Dies führt zur Aktivierung von Barorezeptoren und damit zur kompensatorischen Natrium- und Wasserretention durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, des Sympathikus und des antidiuretischen Hormons (ADH) (Arroyo und Jimenez, 2000) (s. Abb. 2).

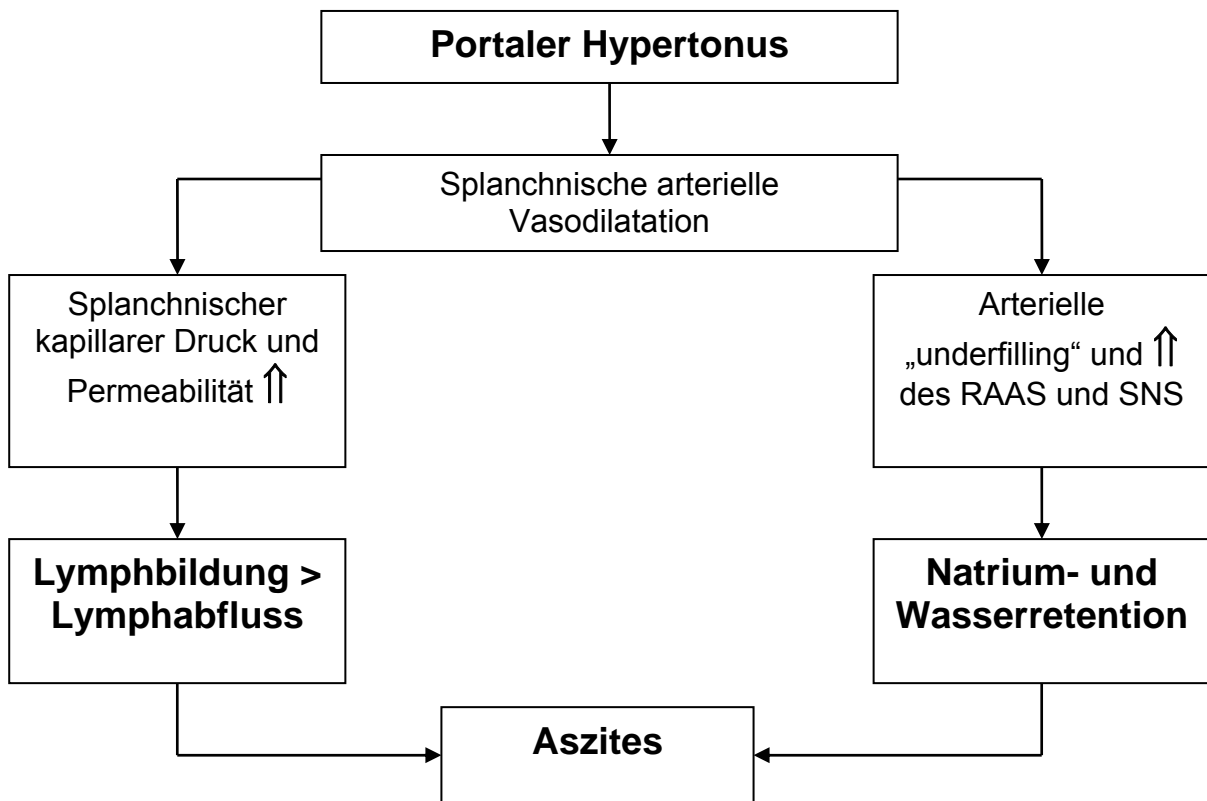


Abb. 2: Die Aszitesbildung bei portaler Hypertension (Schrier et al., 1988)

Eine wichtige, mit der Aszitesbildung verbundene Komplikation ist die spontane bakterielle Peritonitis (Conn, 1964; Kerr et al., 1963). Die Infektion ist keineswegs exogen oder iatrogen, sondern endogen durch bakterielle Translokation bedingt (Runyon et al., 1994). Die sich daraus entwickelnde Sepsis kann für den Patienten hochgradig gefährlich werden, 30-50% der Gesamtmortalität bei Leberzirrhose ist auf Infektionen zurückzuführen (Wong et al., 2005).

Auch hieraus ergibt sich die Notwendigkeit für ein besseres pathophysiologisches Verständnis als Grundlage zur Erschließung (primär-) prophylaktischer Maßnahmen in der Behandlung der portalen Hypertension.

Das hepatorenale Syndrom (HRS) bildet die Endstufe in der zirrhotisch bedingten systemischen Kreislaufdysfunktion. Hierbei liegt, unter Ausschluss anderer Ursachen (Schock, Infektion, Sepsis, nephrotoxische Medikamente), ein funktionelles Nierenversagen vor, mit einer stark erniedrigten glomerulären Filtrationsrate (Kreatinin $>1,5$ mg/dl, Kreatininclearance über 24h <40 ml/min.), Oligurie (Urinvolumen <500 ml/d und Urinosmolarität $>$ Plasmaosmolarität) und massiver Natriumretention (Natrium i. U. <10 meq/l) (Cardenas, 2005). Klinisch werden zwei Subtypen unterschieden, das rapid-progressive HRS Typ 1 mit sehr schlechter Prognose (Lebenserwartung: 14 Tage (Gines und Arroyo, 1999)) und das HRS Typ 2, bei welchem sich das funktionelle Nierenversagen nicht so schnell entwickelt (Arroyo et al., 1996).

Im Circulus vitiosus der hyperdynamen Entgleisung führt die effektive arterielle Hypovolämie und die daraus resultierende Aktivierung der gegenläufigen Systeme (RAAS, SNS, ADH) auf renaler Ebene so weit, dass die Vasokonstriktion nicht mehr kompensiert werden kann. Lokal überwiegen die endogen gebildeten Vasokonstriktoren (Angiotensin II, Adenosin, Norepinephrin, Thromboxan A2, Endothelin-1) gegenüber den endogen gebildeten Vasodilatoren (NO, Prostaglandine, natriuretische Peptide) und leiten damit das Nierenversagen ein (Cardenas, 2005).

1.5 Hämodynamische Veränderungen bei portaler Hypertension

Bei der Leberzirrhose besteht eine so genannte hyperdynamische Kreislaufzirkulationsstörung. Diese ist durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen (mit einer erhöhten Herzfrequenz und einem erhöhten Schlagvolumen) und einem verringerten systemischen Widerstand verursacht, der bei Patienten und auch bei Versuchstieren (Lebrec, 1991) mit intra- und extrahepatischen portalen Hypertension auftritt. Weiterhin kann man eine Senkung des mittleren arteriellen Drucks feststellen. Patienten mit extrahepatischen portalen Hypertensionen weisen ein niedrigeres Herzzeitvolumen auf, als solche mit Zirrhose, Leberinsuffizienz oder Aszites (Lebrec et al., 1983; Lebrec, 1994). Diese intrahepatischen Veränderungen korrelieren auch mit einem vermehrten Plasmavolumen. In den zentralen Gefäßprovinzen (Herz, Lungen, usw.) ist das so genannte effektive Plasmavolumen vermindert. Dies ist bedingt durch eine Umverteilung des Blutes in die dilatierten splanchnischen Gefäße.

Im Magen ist insbesondere der Gefäßwiderstand durch kapillare Ektasien und arteriovenöse-Anastomosen gesenkt und dessen Durchblutung um 50% erhöht (Lebrec, 1994).

Die Fließgeschwindigkeit beim Gesunden liegt im Bereich von 15-21 cm/s, was einer Fluss-Stärke von 0,65 bis 1 l/min. gleicht. Demzufolge stellt der portale Anteil 50-60% des hepatischen Blutflusses dar. Bei Zirrhotikern liegt ein portaler Blutfluss von 0,33 bis 1,20 l/min. vor. Bei Ratten sind die Werte unterschiedlicher und liegen im Schnitt bei wachen, nüchternen Tieren bei 75%, der bei Futtergabe auf 90% steigen kann (Lebrec und Girod, 1986).

Bei Zirrhosepatienten liegt das durch Isotopendilutionsmethode ermittelte portosystemische Shuntvolumen zwischen 0 und 100%. Beim Gesunden findet man keine Shunts (Groszmann et al., 1972). Die Isotopenkonzentration wurde dabei in der V. hepatica, nach Injektion in die A. lienalis oder mesenterica superior, gemessen. Mit einer Doppler-Ultraschallsonde wurde der Varizenblutfluss ermittelt. Dabei kam heraus, dass die Stromstärke mit der Atmung schwankt und Flüsse in beide Richtungen möglich sind. Bei Ratten mit einer Leberzirrhose liegen die Shuntfraktionen viel tiefer: Der Shuntanteil

aus der Milz liegt bei 95% und der aus dem Mesenterialbett bei 0-50% (Lebrec et al., 1980).

Der portale Druck hat einen Normbereich zwischen 7 und 12 mmHg. Man misst dabei auch den hepatovenösen Druckgradienten, d.h. den Gradienten zwischen dem venösen Druck in der Leber und dem in der V. cava inferior.

Eine portale Hypertension liegt per definitionem dann vor, wenn portal ein Druck über 12 mmHg und / oder ein hepatovenöser Gradient von über 4 mmHg gemessen wird. Hier zeigte sich bei zirrhotischen Tieren eine Tendenz höhere Werte zu erreichen als bei Tieren, die an extrahepatischer portaler Hypertension litten. Einen ähnlichen Unterschied konnte man bei Patienten mit einem intra- und extrahepatischen Leiden feststellen: Patienten mit einer intrahepatischen Erkrankung wiesen einen hepatovenösen Gradienten von 5 bis 15 mmHg auf, bei Zirrhotikern sogar zwischen 10 und 30 mmHg, wogegen die Werte der „extrahepatischen“ Patienten im Normbereich liegen. Bei alkoholischer Zirrhose und bei Hepatitis- B- bedingter Zirrhose entspricht der Venenverschlussdruck dem portalen. Bei Patienten ohne Zirrhose kann der gemessene Lebervenenverschlussdruck niedriger als der portale Druck sein. Der Druckgradient korreliert bei Zirrhosen mit dem Schweregrad der Lebererkrankung.

Den Varizendruck kann man sowohl direkt mit einer feinen Nadel als auch indirekt mittels eines Ballonmanometers, die über das Endoskop eingeführt wird, messen. Man spricht dann von intra- bzw. extravarikösem Druck. Beide Messmethoden ergeben annähernd dieselben Ergebnisse. Die Varizendrucke korrelieren nicht mit den portalen (Brensing et al., 1998).

1.6 Verminderte Kontraktilität bei portaler Hypertension

Die oben beschriebene Vasodilatation bei der Leberzirrhose ist bedingt durch ein vermindertes vaskuläres Ansprechen auf Vasokonstriktoren.

Als mögliche Ursache der vaskulären Hypokontraktilität werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Neben der vermehrten Produktion zirkulierender Vasodilatoren wie Glukagon (Benoit et al., 1986) ist anscheinend die Bildung endothelialer Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) (Pateron et al., 2000; Wiest und Groszmann, 1999), Prostazyklin (Sitzmann et al., 1989) und endothelium-derived hyperpolarising factor (Barriere et al., 2000) für die Vasodilatation mit verantwortlich.

Wie in der Arbeit von Sogni et al. (Sogni et al., 1996) dargestellt, wurde eine verminderte Ansprechbarkeit mesenterialer Arterien gegenüber Vasokonstriktoren vor allem durch NO vermittelt. In dieser Studie wurden kleine Mesenterialarterien, so genannte Widerstandsgefäße, mit Kaliumchlorid kontrahiert und dabei die NO-Synthase durch N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) gehemmt. L-NNA verbesserte deutlich die vaskuläre Kontraktilität bei zirrhotischen Tieren, nicht jedoch bei gesunden Tieren.

Diese Faktoren erklären die vaskuläre Hypokontraktilität bei der Leberzirrhose jedoch nur partiell. So ist die Hypokontraktilität nach α_1 -Adrenozeptorstimulation an isolierten Gefäßen, d.h. unter Ausschluss zirkulierender Vasodilatoren, und auch in endothelfreien Gefäßpräparaten, d.h. unter Ausschluss endothelialer Faktoren zu beobachten (Heller et al., 1999b; Islam et al., 2000; Michielsen et al., 1995). Dies weist auf Defekte in der glatten Gefäßmuskelzelle selbst hin. Es ist sogar gezeigt worden, dass entgegen einer ursprünglichen Hypothese (Vallance und Moncada, 1991) eine vermehrte induzierbare NO-Synthaseaktivität in Gefäßen zirrhotischer Tiere und Menschen nicht nachweisbar ist (Heller et al., 1999a; Heller et al., 1999b). Auch scheint kein Defekt der kontraktilen Elemente in der Gefäßmuskelzelle zirrhotischer Spezies selbst vorzuliegen, wie Untersuchungen an Gefäßen zirrhotischer Ratten mit dem Ca^{2+} -Kanalöffner Bay K 8644 zeigten (Hartleb et al., 1995). Vielmehr scheint eine verminderte Rezeptorfunktion oder ein Defekt in der Postrezeptorkaskade für die Hypokontraktilität verantwortlich zu sein.

Insgesamt ist die vaskuläre Hypokontraktilität in der portalen Hypertonie noch nicht ausreichend ergründet.

1.7 Aktivierung von endogenen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren bei portaler Hypertension

1.7.1 Vasoaktive Substanzen

Die Regulation des Gefäßtonus erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel von Vasokonstriktoren und –dilatoren. Es handelt sich dabei um endokrine (hormonelle), parakrine oder neuronale Signalketten und Botenstoffe, welche die Aktivierung von Postrezeptor Signalketten auslösen, und so entweder eine Kontraktion oder Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirken.

In Tabelle 1 sind vasoaktive Substanzen aufgeführt, die für die Aktivierung bei der portalen Hypertension beschrieben wurden (Castro et al., 1993; Hartleb et al., 1994; Moncada und Higgs, 1991; Pinzani et al., 1992; Rieder et al., 1990).

Tabelle 1: Vasoaktive Substanzen

Vasokonstriktoren	Vasodilatoren
Angiotensin II	Stickstoffmonoxid (NO)
Endothelin	Endotoxine
Eicosanoide	Glukagon
Adrenalin/Noradrenalin	Prostazyklin
Adenosin (renalen A1-Rezeptor)	Vasoaktive intestinale Peptide
Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)	Adenosin (A2-Rezeptor)
	Kohlenmonoxid (CO)

1.7.2 Vasokonstriktoren

Die bedeutendsten Vasokonstriktoren sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, sowie das Peptidhormon Angiotensin II. Im glatten Gefäßmuskel können diese an dem entsprechenden, G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden und durch eine Aktivierung bestimmter Signalketten eine Kontraktion des Gefäßes auslösen.

Adrenalin und Noradrenalin sind sowohl Hormone des Nebennierenmarks als auch Neurotransmitter des vegetativen Nervensystems. Aus der Beobachtung heraus, dass Noradrenalin fast ausschließlich vasokonstriktorisch und Adrenalin sowohl

vasokonstriktorisches als auch vasodilatatorisches wirkt, wird die Existenz unterschiedlicher Rezeptoren deutlich. Die zwei Haupttypen sind α - und β -Adrenozeptoren, die sich in weitere Subtypen unterteilen lassen. Die Stimulation des α 1-Adrenozeptors löst eine Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur aus.

Angiotensin II bindet an AT1 und AT2 Rezeptoren und übernimmt wichtige Funktionen in der Hämodynamik, der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes und der Zellproliferation (Busse, 1997). Die Aktivierung vaskulärer AT1 Rezeptoren kann eine Vasokonstriktion auslösen.

1.7.3 Stickstoffmonoxid als wichtigster Vasodilatator

Bei der Leberzirrhose besteht eine Vasodilatation trotz Aktivierung von Vasokonstriktoren. Stickstoffmonoxid (NO) spielt hierbei eine wichtige Rolle für die persistierende Vasodilatation. NO führt über die Aktivierung Guanylatzyklase nach Bildung von zyklischen Guanylatmonophosphat (cGMP) zur Vasodilatation (Niederberger et al., 1995).

Das Stickstoffmonoxid wird bekanntlich durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) freigesetzt. Es existieren unterschiedliche Isoformen dieses Enzyms, die NO in unterschiedliche Gewebearten und durch unterschiedliche Reize produzieren. Die konstitutive NOS, befindet sich in den meisten Zellen des menschlichen Körpers. NO wird unter anderem im Endothel, glatten Muskulatur, Makrophagen, polymorphkernigen Blutzellen und Kupfferschen Sternzellen gebildet (Moncada und Higgs, 1991).

Die Endotheleigene, konstitutive NOS (eNOS oder NOS-3) spielt in der Pathophysiologie der Leberzirrhose eine entscheidende Rolle. Sie kann unter anderem durch Scherkräfte, Acetylcholin und Angiotensin II stimuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass vaskuläres NO hauptsächlich durch die eNOS gebildet wird. Hier ist die NO-Synthese Calcium und Calmodulin abhängig (Fernandez et al., 1995; Niederberger et al., 1996; Rockey und Chung, 1997; Sogni et al., 1997; Weigert et al., 1995).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS-2), die als Reaktion auf spezifische Stimuli wie Endotoxine und Zytokine im Endothel und der Gefäßmuskulatur der Zielorgane exprimiert wird, ist eine weitere Isoform, die eine Rolle in der Leberzirrhose

nachgesagt wird (Guarner et al., 1993). Die Nitrit/Nitrat-Spiegel (NO_x als Maß für die endogene NO-Metabolisierung) steigen mit dem Fortschreiten der Leberfunktionsstörung an und zeigt eine positive Korrelation mit den Endotoxinspiegeln und folglich der induzierbaren NOS Aktivität.

Eine vaskuläre Induktion der iNOS konnte bei der Leberzirrhose allerdings bislang nicht nachgewiesen werden (Heller, 2003; Sogni et al., 1997).

1.8 Therapie der portalen Hypertension und gastrointestinale Blutung

1.8.1 Therapeutische Strategien

Die heute angewandten therapeutischen Strategien zur Behandlung des portalen Hypertonus und ihrer Komplikationen lassen sich jeweils über ihre pathophysiologischen Ansatzpunkte begründen und differenzieren. Diese Strategien beinhalten sowohl die pharmakologischen als auch die operativen bzw. die endoskopischen Methoden.

Die pharmakologischen Methoden sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Pharmakologische Therapie der portalen Hypertonie

A	<i>Manipulation der intrahepatischen Zirkulation</i>
1	Erhöhung der intrahepatischen NO-Produktion: . Nitrovasodilatoren: Nitroglycerin, Isosorbid-5-mononitrat und -dinitrat bzw. lokale Freisetzung von an Ursodeoxychol Säure gekoppelten NO-Moleküle
2	Adrenerge Antagonisierung: Prazosin (Adrenozeptor-Antagonist), Clonidin . (Zentraler α -2-Agonist), Carvedilol (nicht-selektive Betablocker und α -1-Antagonist)
3	Blockade des RAAS: Losartan (Angiotensin-II-Typ-I-Antagonist), Spironolacton (Aldosteronantagonist)
B	<i>Substanzen, die den splanchnischen Blutfluß senken.</i>
1	Nicht-selektive Betablocker: Propranolol, Nadolol, Timolol, Carvedilol .
2	Vasopressin und seine Analoga (Terlipressin) .
3	Somatostatin und seine Analoga (Ocreotid) .
C	<i>Andere pharmakologische Möglichkeiten:</i>
1	Medikamente mit tonuserhöhendem Effekt auf dem unteren Ösophagusphinkter: Metoclopramid, Domperidon .
2	Medikamentenkombinationen: Betablocker und Nitrate, Betablocker und Prazosin, Betablocker und Spironolacton .

1.8.2 Manipulation der intrahepatischen Zirkulation

Im intrahepatischen vaskulären System existiert ein relatives Defizit an Stickstoffmonoxid und eine überschießende Antwort auf endogene Vasokonstriktoren (Adrenalin, Endothelin, Angiotensin II). Beide Faktoren unterhalten die intrahepatische Widerstandserhöhung (Heller et al., 2003).

Eine Therapiemöglichkeit besteht darin, die intrahepatische NO-Produktion zu erhöhen, was durch die NO-Donoren wie Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat oder Isosorbid-5-mononitrat erreicht werden kann. Diese Substanzen und v.a. Isosorbid-5-mononitrat haben die Fähigkeit den intrahepatischen Widerstand und dadurch auch den Pfortaderdruck zu senken ohne den hepatischen Blutfluss zu vermindern (Garcia-Pagan et al., 1990). Die Wirkung dieser Vasodilatoren ist pharmakologisch gut abgrenzbar. In den klinischen Studien machen die individuellen Faktoren und auch die häufigen systemischen Wirkungen dieser Medikamente (arterielle Hypotonie, reflektorische splanchnische Vasokonstriktion mit nachfolgend erniedrigtem portalem Blutfluss) die Beurteilung schwieriger. Normalerweise senken solche Vasodilatoren durch ein venöses Pooling den Preload und das Herzzeitvolumen, was wiederum den portalen Blutfluss senkt. Außerdem reduzieren diese Vasodilatoren den Widerstand im portosystemischen Kollateralkreislauf und dadurch auch geringfügig den Pfortaderdruck, was aber mit Komplikationen verbunden ist. Bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose sind diese Medikamente sogar gefährlich, weil sie eine Verstärkung der schon existierenden splanchnischen Vasodilatation, einen arteriellen Blutdruckabfall und Aktivierung der endogenen vasoaktiven Systemen verursachen, und dadurch eine Wasser- und Natriumretention und ein Nierenversagen hervorrufen (Salmeron et al., 1993).

Antagonisten des adrenergen Systems stellen eine weitere Möglichkeit zur Therapie des erhöhten intrahepatischen Widerstandes dar. Prazosin, ein α -1-Adrenorezeptor-Antagonist, senkt deutlich den hepatovenösen Druckgradienten, der mit einem Anstieg des portalvenösen Blutflusses verbunden ist. Die Nebenwirkungen ähneln denen der NO-Donatoren (Albillos et al., 1994; Albillos et al., 1995). Clonidin, ein zentral wirkender α -2-Adrenorezeptor-Agonist, führt durch einen Abfall der adrenergen peripheren Aktivität zur Senkung der Herzfrequenz, des kardialen Index, des arteriellen Blutdrucks, des

intrahepatischen Widerstandes, des Pfortaderdrucks und des splanchnischen Blutflusses, wobei die Nierenfunktion nicht beeinträchtigt wird (Albillos et al., 1992; Moreau et al., 1987; Roulot et al., 1992; Willett et al., 1986). Ein weiterer Antagonist des adrenergen Systems ist Carvedilol, ein nicht selektiver Betablocker mit intrinsischer α -1-Rezeptor Aktivität. Dieser Substanz wird eine deutlich größere Senkung des hepatovenösen Druckgradienten bei ähnlicher Senkung des splanchnischen Blutflusses als durch Propranolol zugeschrieben (Banares et al., 1999).

Die RAAS-Aktivierung ist ein sehr häufiger Befund bei Zirrhosepatienten, vor allem im fortgeschrittenen Stadium. Dies bietet eine weitere Behandlungsmöglichkeit. Bei Patienten-Studien mit Losartan, einem Angiotensin II Rezeptors Typ1-Antagonist, wurde von einer Gruppe eine dramatische Pfortaderdrucksenkung ohne signifikante Änderungen des arteriellen Blutdrucks beobachtet (Schneider et al., 1999). Diese Untersuchung konnte von anderen Arbeitsgruppen nur teilweise bestätigt werden (Heller et al., 2005). Zusätzlich könnte diese Substanzengruppe die Leberfibrosierung inhibieren (Croquet et al., 2002).

1.8.3 Senkung des splanchnischen Blutflusses

Die meisten Versuche, den portalen Hypertonus zu behandeln, zielten auf eine Senkung des erhöhten Pfortaderblutflusses durch splanchnische Vasokonstriktion ab. Einige dieser Medikamente, wie z.B. nicht selektive Betablocker, können oral verabreicht werden und sind für eine Langzeitbehandlung geeignet, während andere, wie Vasopressinanaloga, nur für eine kurzzeitige parenterale Behandlung, wie bei der Therapie der akuten Varizenblutung, verwendet werden können.

Die nicht selektiven Betablocker, wie Propranolol, Nadolol und Timolol, senken den portalen Druck durch eine Senkung des portalvenösen Blutflusses als Folge einer Reduzierung des Herzminutenvolumens (Blockade der kardialen β 1-Adrenozeptoren) und der splanchnischen Vasokonstriktion (Blockade der vasodilatierenden splanchnischen β 2-Adrenozeptoren und Überwiegen der α -adrenergen Wirkung) (Escorsell et al., 1997; Mastai et al., 1987).

Ein möglicher klinischer Nutzen von Vasopressin wird kontrovers diskutiert. In therapeutischen Dosen senkt es die Durchblutung aller splanchnischer Organe, dadurch den Pfortaderblutfluss und Pfortaderdruck, sowie den Kollateralblutfluss und den Varizendruck (Bosch et al., 1988). Unerwünschte systemische Wirkungen von Vasopressin sind eine systemische Vasokonstriktion mit erhöhtem peripheren Widerstand und erniedrigtem kardialen Ausfluss, eine Reduktion von Herzfrequenz und koronarem Blutfluss. Diese Nebenwirkungen können ernste Komplikationen hervorrufen, wie kardiale Ischämie oder Herzinfarkt, Arrhythmien, mesenteriale und zerebrale Ischämien. Diese führen in 25% der Fälle zum Absetzen der Therapie (D'Amico et al., 1995). Die Kombinationstherapie mit Nitroglyzerin hat eine positive Entwicklung in Bezug auf diese Nebenwirkungen gebracht (Groszmann et al., 1982).

Terlipressin ist ein synthetisches Vasopressin-Analogon, das nach i.v.-Gabe langsam enzymatisch in Vasopressin umgewandelt wird. Im Gegensatz zu Vasopressin fördert es nicht die Fibrinolyse und besitzt eine längere biologische Aktivität, was eine kontinuierliche i.v.-Gabe unnötig macht (Blei, 1986). Dieses Medikament ist Standard in der Therapie der akuten Varizenblutung.

Ein weiterer pharmakologischer Therapieansatz geht von der Überlegung aus, dass die Expansion des Blutvolumens für die Unterhaltung des erhöhten Herzindexes und damit die Verschlechterung des Pfortaderdrucks verantwortlich ist. Dieser Gedankengang begründet sich in der Tatsache, dass die splanchnische Vasodilatation eng mit dem reduzierten arteriellen Druck und Herzindex und dadurch mit der Aktivierung der endogenen Systemen verbunden ist, die zu einer Natriumretention und Plasmavolumenzunahme führt (Bosch et al., 1992; Zimmon und Kessler, 1974). Es wurde gezeigt, dass eine natriumarme Diät und Spironolacton eine Pfortaderdrucksenkung bei Zirrhosepatienten bewirken (Garcia-Pagan et al., 1994; Okumura et al., 1991). Es gibt Hinweise auf eine direkte vaskuläre Wirkung von Spironolacton, die nicht mit der Aldosteronantagonisierung einhergeht (Dacquet et al., 1987).

Die Therapie des portalen Hypertonus beinhaltet auch die Therapie ihrer Komplikationen. Eine häufige Komplikation ist die Varizenblutung. Viele Studien haben gezeigt, dass um Varizen zu entwickeln der hepatovenöse Druckgradient über 10-12 mm Hg (Garcia-Tsao et al., 1985) liegen muss. Patienten mit Varizen, bei denen der

Druck unter 12 mm Hg durch eine Therapie gesenkt wurde zeigen eine deutliche Größenregredienz der Varizen und auch der Gefahr der akuten Blutung (Casado et al., 1998).

Die Mortalität der Varizenblutung liegt bei 32% (D'Amico et al., 1995). Aus diesem Grund sollte die Therapie unter intensivmedizinischer Betreuung fortgeführt werden. Bei der akuten Blutung sollte endoskopisch vorgegangen werden, um die Blutungsquelle zu stillen. Gleichzeitig hat die pharmakologische Therapie eine vorbeugende Funktion.

1.9 Urotensin II

Urotensin II wurde ursprünglich im Rückenmark des Teleostfisches entdeckt (Bern et al., 1985). Es ist ein vasoaktives zyklisches Polypeptid bestehend aus 11 Aminosäuren beim Menschen (Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val) mit einer zyklischen Region, die für die biologische Wirkung verantwortlich ist (Conlon et al., 1997). Es hat strukturelle Ähnlichkeiten zu Somatostatin.

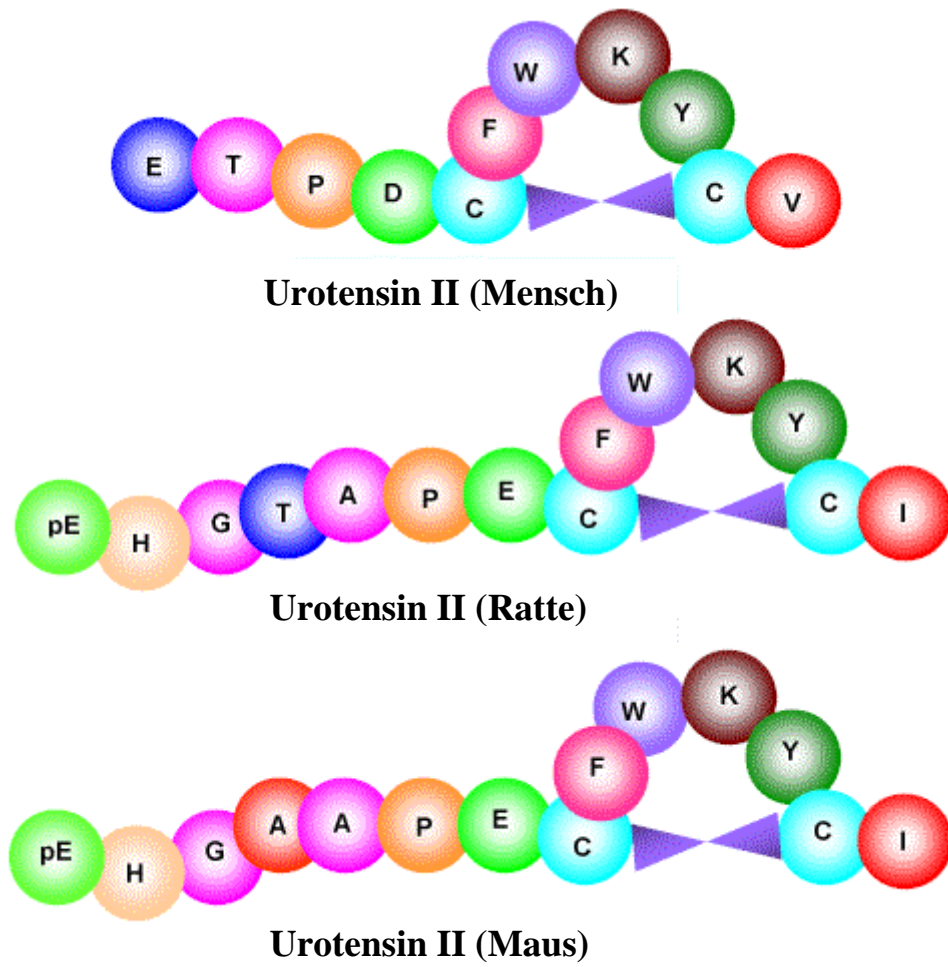


Abb. 3: Aminosäuresequenz und Struktur von Urotensin II (Ames, 1999)

Sequenz h-Ull: Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val (The IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, 2006)

Ull ist Ligand für den UT II- Rezeptor, welcher zu der Somatostatin- / Opioid-Rezeptorfamilie gehört und unter anderem von Endothelzellen des Blutgefäßsystems exprimiert wird (Ames et al., 1999; Affolter und Webb, 2001).

In Vitro-Versuche konnten an isolierten Blutgefäßen eine vielfach stärkere „Somatostatin-ähnliche“ vasokonstriktorische Potenz wie bereits beschriebene vasoaktive Substanzen wie Endothelin - 1, Serotonin, Noradrenalin oder Angiotensin - II nachweisen.

Urotensin II zeigt jedoch in seiner vaskulären Wirkung Unterschiede in Abhängigkeit von der Spezies und der Gefäßprovinz (Douglas et al., 2000a).

So ist Urotensin II über die Aktivierung des Phospholipase C / Inositoltriphosphat oder des Rho-A / Rho-Kinase Signalwegs ein Vasokonstriktor der Rattenaorta. Demgegenüber führt Urotensin II über die Aktivierung des endothelium derived hyperpolarizing factor bei der Ratte zur splanchnischen Vasodilatation und möglicherweise über die vermehrte vaskuläre Bildung von Stickstoffmonoxid zur Vasodilatation menschlicher Widerstandsgefäße (Ames et al., 1999; Douglas et al., 2000b; Douglas et al., 2000a; Gardinier et al., 2001).

Da Urotensin II strukturelle Ähnlichkeiten zu Somatostatin hat, wurde kürzlich postuliert, dass dieses Peptid möglicherweise zur Therapie des portalen Hypertonus eingesetzt werden könnte (Newby und Jalan, 2000).

1.9.1 Vaskuläre Effekte von Urotensin II

1.9.1.1 Bei Ratten

In ersten Versuchen an Ratten bewirkten die Gaben von Fisch-Urotensin II in vivo eine Blutdrucksenkung (Gibson et al., 1986). In vitro zeigten sich unterschiedliche Antworten auf die Gabe von Urotensin II in verschiedenen arteriellen Betten: Die Kontraktionsstärke der Rattenaorta nimmt nach caudal immer weiter ab. So sind sogar Unterschiede innerhalb des thorakalen Teils festzustellen. Am stärksten reagiert die Aorta thoracica und die Carotiden, schwächer die Aorta abdominalis und die Arteria mesenterica, gar nicht die Arteria femoralis. Untersuchungen mit verschiedenen Rezeptorantagonisten, Kanalblockern und Enzyminhibitoren ergaben, dass die Wirkung von Urotensin II nicht durch direkte oder indirekte Aktivierung von adrenergen-, muscarinischen-, 5-Hydroxytryptamin (5-HT)- oder Histamin-Rezeptoren noch Tetrodotoxin-sensitiven Natrium-Kanälen, oder Arachidonsäurederivaten erfolgt. Vielmehr wurde gezeigt, dass Urotensin II sowohl eine endothel-unabhängige Vasokonstriktion als auch eine endothel-abhängige Vasodilatation verursacht (Gibson et al., 1986; Itoh et al., 1987). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Rezeptordichte und die Stärke der Antwort positiv korrelieren (Itoh et al., 1988).

Am isolierten Rattenherz bewirkte humanes U-II eine Erhöhung des vaskulären Perfusionsdruckes bis zu einer maximalen Dosis von 100 nM, gefolgt von einem Abfall bei höheren Konzentrationen. Diese Druckerhöhung konnte durch cyclo-oxygenase-Hemmern und NO-Synthetase-Inhibitoren antagonisiert werden. Trotz der hohen Potenz ($EC_{50} \approx 2.5$ nM) war die Druckzunahme weniger als ein fünftel der von Endothelin-1 (ET-1) (Gray et al., 2001; Katano et al., 2000). Vergleichbare Untersuchungen ergaben weiter, dass Mesenterial- und Basilararterien nur Endothel abhängig reagierten (Bottrill et al., 2000). Humanes U-II kontrahiert nur pulmonale Arterien größeren Durchmessers mit einer ET-1 vierfach größeren Potenz ($EC_{50} \approx 3$ nM), obwohl die maximale Kontraktionskraft unter 50% der vom ET-1 liegt. Man konnte auch die Wirkung von hU-II durch zusätzliche Gabe von niedrigen Dosen ET-1 potenzieren (MacLean et al., 2000). Gardiner et al. entgegneten dem scheinbaren Widerspruch,

dass (Teleost-) Fisch U-II in vivo bei Ratten drucksenkend und in vitro vasokonstringierend wirkt mit einem Versuch mit hU-II an wachen Ratten. Das Urotensin II (300-3000 pmol /kg KG i.v.) wirkte sofort mit einer Vasodilatation im Mesentriumbett und in den Hinterläufen. Beobachtet wurde dabei eine Dosis-abhängige Tachykardie und einen signifikant hohen Blutdruckabfall. Mit 3000 pmol /kg KG verringerte sich der renale Blutfluss ohne Einfluss auf die renale Funktion (Gardiner et al., 2001). Es konnte bei der Ratte kein Wirkunterschied zwischen Ratten U-II und hU-II festgestellt werden. Urotensin bewirkt also eine Vasodilatation in vivo, was nicht unbedingt mit der in vitro beobachteten Vasokonstriktion großer Gefäße widersprüchlich sein muss, da diese nicht maßgeblich an der Blutdruckregulation beteiligt sind.

1.9.1.2 Bei anderen Säugern

Eine Studie erweiterte die Versuche mit hU-II auf andere Tiere (Douglas et al., 2000b): Die erzielten Ergebnisse bei der Ratte waren mit denen mit Fisch U-II vergleichbar. Bei der Maus allerdings zeigte die Aorta keine Reaktion, beim Hund nur die Coronarien. Beim Schwein konnte keine Antwort in den Coronar-, Nieren-, Mamma- und Halsarterien und Venae saphenae festgestellt werden. Ein leichtes Ansprechen konnte in anderen Gefäßbetten erzielt werden, welches jedoch nicht beständig war. Versuche an Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) lieferten vergleichbare Daten. Bei Hasen konnte eine Kontraktion an der Aorta thoracica und den Coronarien gemessen werden, bei Lungen- und Ohrarterien jedoch nichts (Saetrum Opgaard et al., 2000). Regelmäßige Ergebnisse konnten nur bei den untersuchten Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) erreicht werden: hU-II führte bei Coronar-, Lungen-, Nieren-, Femoral-, Mesenterial-, -mammaria interna, und Basilararterien und an der gesamten (thorakal und abdominal) Aorta zu einer Kontraktion ($EC_{50} \approx 0,1-1,1$ nM). Auch in den Lungenarterien und glatter Muskulatur der Trachea konnte ein Effekt verzeichnet werden, der zwar regelmäßig potent war ($EC_{50} \approx 0,6-2,5$), jedoch von proximal nach distal an Kraft verlor und große Unterschiede zwischen den Tieren aufwies (Hay et al., 2000). Wie bei allen anderen Spezies auch, konnte keine Wirkung in untersuchten Venen beobachtet werden, abgesehen von einer leichten Kontraktion in den Pulmonalvenen in Herznähe.

Die aufgeführten Versuche konnten hU-II als potenten ($EC_{50} \approx$ im Bereich von 0,1-3 nM) Vasokonstriktor bei Säugern, besonders im arteriellen Bereich aufdecken. Eine Erklärung für die Schwankungen von Gattung zu Gattung wäre eine unterschiedliche Höhe der Expression und Verteilung der Rezeptoren in den untersuchten Gefäßbetten. Weitere Versuche ergaben eine geringe vasokonstriktive Antwort von hU-II auf Rattenarterien in vitro, dafür einen zehnfach stärkeren Effekt als ET-1 in Affenarterien und dem Mangel an Rezeptor-mRNA in Venen entsprechend, dort keine Wirkung. In vivo Versuche an Affen zeigten eine Dosis- abhängige (30-300pmol/ kg KG i.v.) Reaktion: Der totale periphere Widerstand und der linksventrikuläre enddiastolische Druck werden erhöht, das Schlagvolumen, die Ejektionsfraktion und die myokardiale Kontraktilität erniedrigt. Der Puls und der arterielle Druck zeigten im Vergleich zu anderen Vasokonstriktoren (ET-1 und Angiotensin-II) eine leichte Senkung, auch bei

maximaler Dosis. Ein hU-II Bolus von 3 nmol/ kg KG i.v. ist letal. Diese Ergebnisse zeigten, dass zumindest für die untersuchten Spezies hU-II der potenteste Vasokonstriktor ist (Maguire und Davenport, 2002).

1.9.2 Der UT II- Rezeptor

Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden so genannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) entdeckt. Sequenzen eines dieser GPCRs zeigte einige Ähnlichkeiten mit dem Somatostatin SST₄- und δ -opioid Rezeptoren der Ratte und einem Galanin-Rezeptor des Menschen. Die Proben stammten vorwiegend aus sensorischem und neuralem Gewebe, wodurch der Rezeptor den Namen „sensory epithelium neuropeptide-like receptor“, kurz SENR bekam (Tal et al., 1995). Unabhängig davon führte eine Untersuchung einer Ratten DNA Datenbank zu einem Gen, das einen Ratten GPCR kodierte, welches identisch mit SENR war (Marchese et al., 1995). Beide Gruppen berichteten von einem Gen, welches einen Rezeptor mit 386 Aminosäuren kodiert.

Ames et al. konnten anhand von Ratten UT II-Rezeptoren beim Menschen einen GPCR von 389 Aminosäuren Länge isolieren. Entsprechende mRNA konnten sie dann reichlich im Herzen und Pankreas finden. Diese wurde auch im Gehirn, in den Vorhöfen, in den Ventrikeln, in der Aorta und in den Endothelien nachgewiesen (Ames et al., 1999). Es wurden dann hunderte von verschiedenen potentiellen Liganden für den Ratten- und Menschen- UT II-Rezeptor untersucht, wobei nur das Goby U-II eine brauchbare Bindung einging. Auch den genetischen Abschnitt für das menschliche UII (hU-II) und das Protein konnten zusammen identifiziert werden. Es war identisch mit einem elf Aminosäuren langen Protein, das schon vorher von Coulouarn et al. beschrieben worden ist (Coulouarn et al., 1998). Dieses Peptid wurde, im Gegensatz zur weiten Verbreitung der Rezeptor mRNA, nur im Rückenmark und der Medulla oblongata nachgewiesen (Ames et al., 1999). Der Rezeptor wurde dann nach der International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification als UT-II - Rezeptor bezeichnet (The IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature

and Drug Classification, 2005). Das codierende Gen für hU-II befindet sich auf dem Chromosom 17q25.3 (Protopopov et al., 2000).

1.9.3 Urotensinspiegel bei portaler Hypertension

Hinweise für eine Beteiligung von Urotensin II an der portalen Kreislaufregulation beim Menschen konnte in einer Studie nachgewiesen werden (Heller et al., 2002). Dabei kam heraus, dass Patienten mit einer Leberzirrhose im Vergleich mit gesunden Probanden eine signifikante Erhöhung des UII - Plasmaspiegels vorweisen. Patienten mit hepatorenalem Syndrom und solche mit Aszites zeigen besonders hohe Werte.

Allerdings wird keine Korrelation zwischen dem Plasma - UII und dem Kreatinin- Wert nachgewiesen. Dies kann als Erklärung für gesteigerte Plasma-Werte durch eine Erhöhung der UII - Produktion und nicht durch eine erniedrigte renale Clearance dienen. Der gemessene transhepatische UII - Gradient spricht dabei möglicherweise für eine Produktion in der Leber. Die Urotensin - Serumkonzentration korreliert positiv mit dem Ausmaß der portalen Hypertension und negativ mit dem mittleren arteriellen Blutdruck. Urotensin II greift demnach vermutlich mehr in die intrahepatische Resistenz und in die splanchnische Vasodilatation ein. Dadurch fördert Urotensin als vasomotorischer Botenstoff die portale Hypertension und die Bildung von Aszites eher indirekt, als dass es einen direkten Einfluss auf die renale Dysfunktion hat.

2. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es vaskuläre und hämodynamische Effekte von Urotensin II an der isolierten Aorta und der anästhesierten Ratte zu untersuchen.

3. Methoden

3.1 Hämodynamischer Versuch

Bei diesem Teil der Arbeit werden die hämodynamischen Effekte von Urotensin II zwischen Ratten mit einer sekundär biliären Zirrhose und sham-operierten Tiere verglichen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden zusätzlich Daten von Tieren in beiden Gruppen ohne Urotensin II-Gabe miteinbezogen.

Urotensin II wird als 30 nmol / kg KG- Bolus 23 zirrhatischen und 13 sham-operierten Tieren verabreicht.

Die Injektion von Mikrosphären dient der Berechnung von Herzauswurfleistung, der regionalen Organdurchblutung und der Shuntgröße.

3.2 Tiermodell der Gallengangligierten Ratte

Für die Versuche wurden insgesamt 103 männliche Sprague-Dawley-Ratten (ca. 180-220 g) herangezogen. Bei 34 wurde die unten beschriebene Gallengangligatur durchgeführt. Die restlichen 69 Ratten dienten als Kontrollen. Zur Induktion der sekundär biliären Zirrhose wurde unter Ketamin-Narkose (60 mg/kg KG intramuskulär Ketanest S, 25 mg/ml, Esketamin Hydrochlorid, Parke-Davis GmbH, Pfitzer GmbH, Karlsruhe) nach medianer Laparotomie der Ductus choledochus durch eine doppelte Ligatur mit einem resorbierbaren Faden verschlossen und zwischen den beiden Ligaturen reseziert. Muskelschicht und Fell wurden anschließend separat zugenäht (Suturamid Schwarz 3/0, Johnson+Johnson Brüssel, Belgien, Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland). Nach etwa vier Wochen bildet sich eine sekundär biliäre Zirrhose aus. Die Tiere haben dann eine zirrhatisch umgebaute Leber mit hyperdynamischer Zirkulation und Aszitesbildung (Kountouras et al., 1984). Als Kontrollen dienten shamoperierte Ratten. Hier wurde, wie oben beschrieben, unter Ketamin-Narkose der Gallengang freipräpariert, jedoch keine Ligatur gesetzt. Die Tierexperimente wurden von dem lokalen Komitee für Tierstudien der Bezirksregierung

Köln genehmigt (50.203.2-BN 22 2/01).

3.3 Hämodynamische Messungen

Die hämodynamischen Studien wurden unter Ketamin-Narkose (60 mg/Kg KG intramuskulär) vorgenommen. In diesem Zustand ähnelt die Herzauswurfsleistung und die regionalen Durchblutungen der Ratte den Zustand bei vollem Bewusstsein am meisten (Seyde und Longnecker, 1984). Diese Narkosekonstellation wurde oft in Untersuchungen verwendet, in denen Effekte unterschiedlicher Medikamente in Tiermodellen der portalen Hypertonie untersucht wurden (Kojima et al., 2000; Van de Castele et al., 2001).

3.3.1 Messung von Blut- und Pfortaderdruck

Nachdem die Ratte narkotisiert und in der Rückenlage fixiert war, wurde das Fell über die linke Leiste durch einen longitudinalen Schnitt aufpräpariert. Die Femoralarterie und Femoralvene wurden aus der Gefäß-Nerven-Scheide freipräpariert und mit einem PE-50 Katheter (PE 0,28 x 0,61, Everhardts, Meckenheim, Deutschland) kanüliert.

Anschließend wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und die Darmschlingen herausluxiert. Daraufhin wurde ein weiterer PE-50 Katheter in eine kleine ileocoecale Vene hineingelegt. Dieser Katheter wurde anschließend bis in der Vena portae vorgeschoben und dann an seinem Eingang in das mesenteriale Gefäßsystem fixiert. Schließlich wurden die Darmschlingen wieder in die Bauchhöhle platziert und die Bauchwand sowie anschließend auch das Fettgewebe und Fell mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (Suturamid Schwarz 3/0, Johnson+Johnson Brüssel, Belgien, Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland). Die Hämodynamik der Ratte stabilisierte sich dann innerhalb von 15 Minuten (Heller et al., 2005).

Die Katheter in Femoralarterie und Pfortader wurden über Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) an dem

Druckmesser (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen, wobei der Nullpunkt 1 cm oberhalb des Operationstisch geeicht wurde. Die Drücke wurden dann kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 min aufgenommen.

3.3.2 Messung der Durchblutung mit kolorierten Mikrosphären

Der Herzindex und die regionale Durchblutung wurden durch die Technik der Farbmikrosphären gemessen (Hakkinen et al., 1995). Diese Methode ist durch die häufiger angewandte Technik der radioaktiven Mikrosphären validiert (Hakkinen et al., 1995). Der entscheidende Vorteil hierbei ist, dass kein radioaktives Material mehr zum Einsatz kommt.

Dazu wurde ein weiterer Katheter im linken Ventrikel platziert. Um das zu erreichen, wurde zunächst das Fell durch einen longitudinalen Schnitt am rechten lateralen Halsdreieck geöffnet. Die Schilddrüse wurde medial nach oben geschlagen, der M. sternocleidomastoideus nach lateral und der mediale Bauch des M. omohyoideus nach medial verschoben. Die rechte A. carotis communis wurde im Triangulum caroticum freigelegt und von den Nachbarstrukturen getrennt. In die A. carotis communis wurde ein weiterer PE-50 Katheter gelegt und unter Monitorkontrolle bis zum linken Ventrikel vorgeschoben. Die intraventrikuläre Lage des Katheters wurde im Versuch an der Pulskurve bestätigt und stets post mortem geprüft.

Die von jedem Tier benötigte Referenzblutprobe, wurde aus der A. femoralis entnommen (0,65 ml/min über eine Minute). Dies geschah mit Hilfe einer speziellen Pumpe (Model '22', Syringe Pump, Harvard Apparatus, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland).

Zehn Sekunden nach Beginn der Entnahme der Referenzblutprobe wurden über einen Zeitraum von zwanzig Sekunden 300.000 rote Mikrosphären (15µm Durchmesser, Triton Technology, San Diego, USA; suspendiert in 300µl physiologische Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) über den Katheter in den linken Ventrikel injiziert. Die Verteilung dieser roten Mikrosphären entspricht der Durchblutung der einzelnen Organe.

Danach wurden 150.000 blaue Mikrosphären (15 µm Durchmesser in 300µl physiologischer Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) durch den Mesenterialvenenkatheter in die Pfortader innerhalb von 30 Sekunden injiziert. Diese Mikrosphären wurden verwendet, um den porto-systemischen Shunt zu bestimmen.

Nach Injektion der Mikrosphären wurde das Tier getötet und Lungen, Leber, Nieren, Milz, Verdauungstrakt und Pankreas entnommen. Die Organe wurden gewogen und in 14 ml/g Gewebe in 4 M KOH (Sigma Saint Louis, Missouri, USA) mit 2% Tween 80 (Polyoxyethylene-sorbitan-mono-oleate, Sigma Saint Louis, Missouri, USA) eingelegt. Die Referenzblutprobe wurde in 3,8 ml 5,3 M KOH und 0,5 ml Tween80 gelöst. Sämtliche Proben wurden 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Die mazerierten Proben wurden gevortext und durch spezielle Filter (Nucleopore Polycarbonate, Whatman International Limited, Madison, England) filtriert. Restliche Gewebeteilchen wurden durch Nachspülen mit 2% Tween 80 Lösung entfernt.

Die Filter mit den Mikrosphären wurden dann in jeweils 200 µl Dimethylformamid (N,N-Dimethylformamid, Merck KG.A, Darmstadt, Deutschland) überführt und gevortext, wobei sich die Farbe aus den Mikrosphärenkapseln in Dimethylformamid löst. Die Proben wurden anschließend 5 Minuten bei 3000 G zentrifugiert. Von den Überständen wurden Absorptionsspektren (300-800 nm, Photometer HP 8453 X UV-Visible System) aufgenommen. Aus diesen Daten wurde durch das Softwareprogramm Triton 5 von Triton Technology (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) die Anzahl der entsprechenden Mikrosphären in den jeweiligen Organen, die Organdurchblutung, die Herzauswurfleistung und der portosystemische Shunt errechnet. Die Herzauswurfleistung wird pro 100g Körpergewicht ausgedrückt.

Der portosystemische Shunt (PSS) wurde errechnet: $(\text{Anzahl der Mikrosphären in der Lunge}) \times 100 / (\text{Anzahl der Mikrosphären in Lunge und Leber})$.

Der portalvenöse Einstrom (PVI) ist die Summe der Durchblutungen in Magen, Milz, Darm, Pankreas und Mesenterien. Der kollaterale Blutfluss (KBF) wird in $(\text{ml}/\text{min} \times 100 \text{ g})$ ausgedrückt und an Hand der Formel $\text{PVI} \times \text{PSS}/100$ errechnet.

Der Gefäßwiderstand wird als Quotient aus Perfusionsdruck und Blutfluss der entsprechenden Gefäßregion angegeben. Der systemische Gefäßwiderstand wird als Quotient aus mittlerem arteriellem Druck und kardialem Index, der portalvenöse Widerstand als Quotient aus Pfortaderdruck und portalvenösem Einfluss errechnet.

3.4 In vitro-Kontraktilitätsversuche mit isolierten Aorten-Ringen

In diesen Experimenten wurde die Wirkung von Urotensin II bei sham-operierten und zirrhotischen Ratten an isolierten Aortenringen untersucht. Dazu wurde im Organbad myographisch die maximal erreichbare isometrische Kontraktion endothelfreier Aorten-Ringe auf einer Dosis von 120 mval Kaliumchlorid (KCl) hin gemessen und daraus dann entsprechende Konzentrations-Wirkungskurven erstellt.

Es wurde die thorakale Aorta entnommen und in einer Petrischale mit gekühlter (4°C) oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung (in mM: NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,17; KH₂PO₂ 1,18; NaHCO₃ 25,0; EDTA 0,026; Glukose 11,1; Sigma Saint Louis, Missouri, USA) von der Adventitia befreit und in jeweils 2 mm breite Ringe geschnitten.

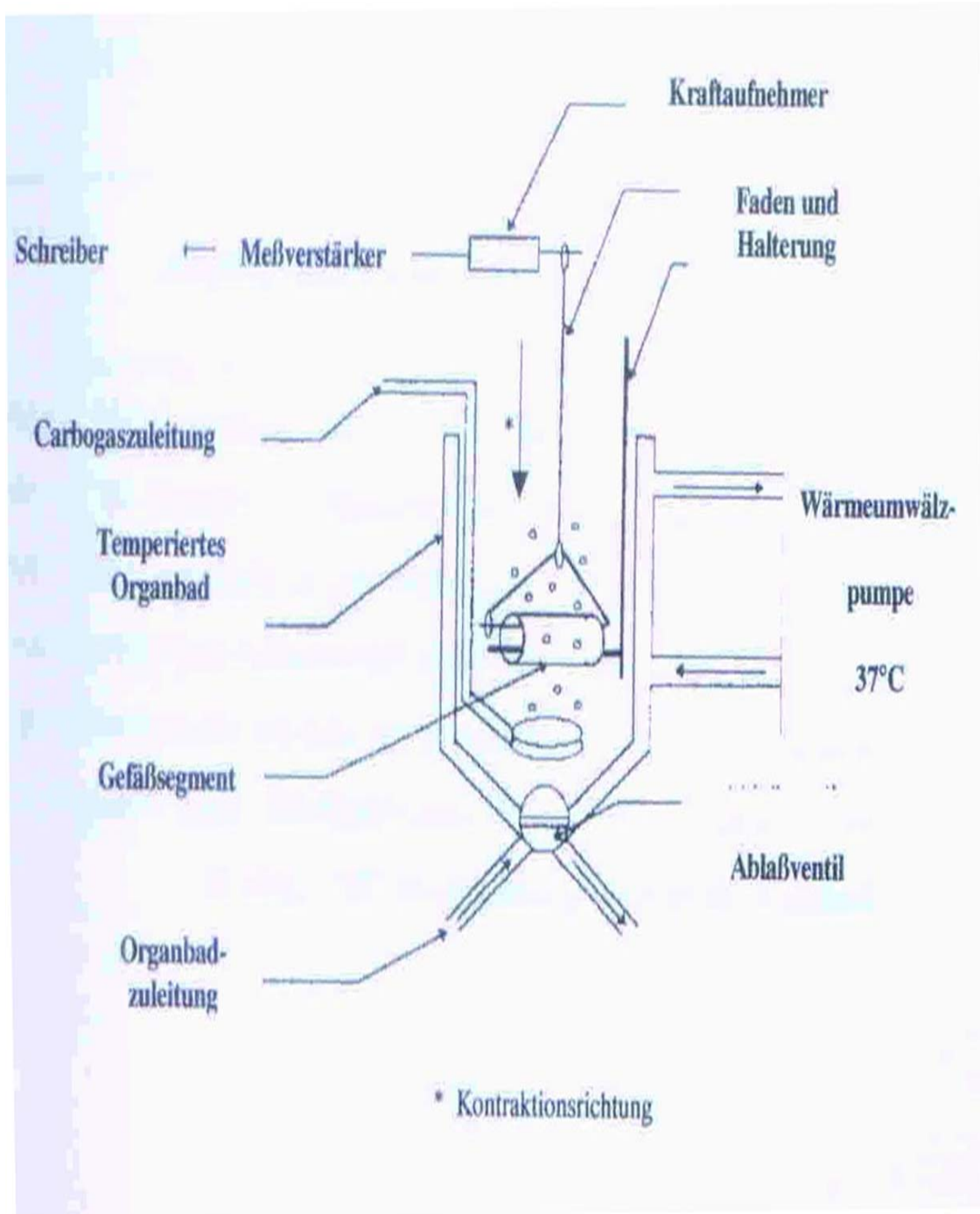


Abb. 4: Das Organbad (Trebicka, 2004)

Durch sanftes Reiben des Inneren des Gefäßsegmentes gegen einen Draht wurde das Endothel mechanisch zerstört. Anschließend wurden die Ringe im Organbad aufgehängt.

Dabei wurden die Ringe über jeweils zwei parallel stehende Drähte in der Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten, mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begasten und bei 37°C gehaltenen Organbad-Kammern (Schuler Organbad, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) aufgespannt (Abb.4). Einer dieser Drähte ist fixiert, der andere mit einem Kraftaufnehmer und einem Schraubmechanismus versehen, mit dem der Abstand der beiden Drähte voneinander geändert werden kann. Dieser Abstand wurde dann vergrößert, bis die aufgezogenen Aorten-Ringe begannen, eine passive Spannung anzunehmen und so eine Kraft auf die Drähte auszuüben. Diese Kraft wurde vom Kraftaufnehmer aufgenommen und durch einen daran angeschlossenen Verstärker (TBM4, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches dann wiederum kontinuierlich von einem Polygraphen (Multichannel Polygraph, Rikandenki R10, Tokyo, Japan) als Kontraktionszustand gegen die Zeit aufgezeichnet wurde. Das System wurde vor dem Aufspannen der Ringe durch Anhängen entsprechender Gewichte an den Kraftaufnahmearm geeicht.

Dem Aufhängen folgte eine 30-minütige Stabilisierungsphase, in der die Gefäße auf eine passive Vorspannung von 4 Gramm gebracht wurden. Anschließend wurde der Erfolg der Endothelentfernung an den im Myographen montierten Ringe überprüft, in dem mit KCl (120 mval) eine Kontraktion ausgelöst und danach der Effekt von Acetylcholin (10^{-4}) beobachtet wurde. Bei intaktem Endothel würde nach der Acetylcholin-Gabe eine Relaxation erfolgen, die bei zerstörtem Endothel jedoch ausbleibt. Aorten-Ringe mit intaktem Endothel wurden verworfen.

Die Gefäßsegmente wurden danach mehrmals mit Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen bis die anfangs eingestellte, passive Vorspannung wieder erreicht war.

Anschließend folgte der eigentliche Versuch, wobei die Kontraktion nach kumulativen Dosen von Urotensin II (10^{-11} - 10^{-6} M) gemessen wurde.

Wenn die Kontraktion eine Plateauphase erreicht hatte, wurde die maximale Kontraktionsfähigkeit mit KCl (120 mval) erneut überprüft, anschließend wurde der Versuch beendet (s. Abb. 5).

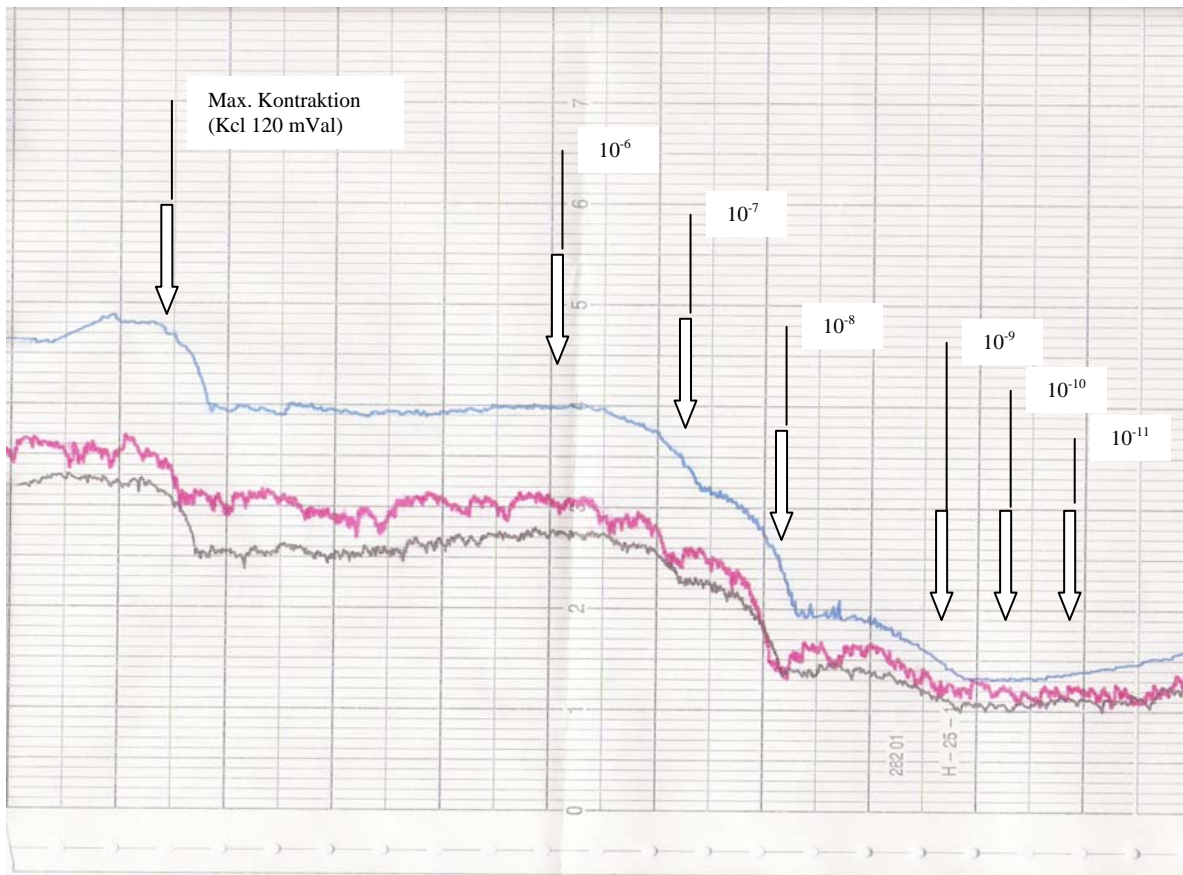


Abb. 5: Myographische Kontraktion von Aortenringen zirrhotischer Ratten bei kumulativer Gabe von Urotensin II (Pfeile 10^{-11} - 10^{-6}) im Organbad.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Ergebnisse wurden mit einer Standard-Abweichung (SEM) dargestellt. ANOVA, der Kruskal Wallis-Test und der Man-Whitney-U Test dienen dem Vergleich der Gruppen (SPSS 14 für Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch relevant gewertet.

Zur Analyse der Kontraktionsexperimente wurden angepasste Konzentrations-Wirkungs-Kurven, auf der Basis der mittleren Kontraktionswerte durch nicht-lineare Regressionen erstellt. Hierfür wurde das Computerprogramm Prism® (Graph Pad Software Inc., San

Diego, USA) verwendet. Die E_{\max} -Werte (maximale Kontraktion) wurden aus diesen angepassten Kurven errechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Hämodynamische Messungen

Die Auswertung der hämodynamischen Messungen ergab bei den zirrhatischen Ratten einen erhöhten Pfortaderdruck (MW: $20,05 \pm \text{SEM: } 0,97$ mmHg). Sham-operierte Tiere wiesen einen normalen portalen Druck auf (MW: $9,54 \pm \text{SEM: } 0,6$ mmHg).

Bei der Gabe eines Urotensin II-Bolus von 30 nmol/kg Körpergewicht konnte man einen sofort einsetzenden signifikanten Anstieg des portalen Druckes bei beiden Gruppen messen, wobei die Wirkung bei den zirrhatischen Tieren ausgeprägter war (E_{\max} : Zirrhose MW: $21,72 \pm \text{SEM: } 0,96$; Sham MW: $10,15 \pm \text{SEM: } 0,68$) (Abb. 6 A). Die maximale Kontraktion (E_{\max}) konnte nach 5 Minuten Kreislaufzeit gemessen werden, danach war eine stetige Abnahme des Druckes zurück auf den Ausgangswert zu beobachten.

Der mittlere arterielle Druck (MAP) war bei sham-operierten Tieren im Schnitt höher (MW: $128,6 \pm \text{SEM: } 5,45$ mmHg) als bei den zirrhatischen Tieren (MW: $110,14 \pm \text{SEM: } 4,63$ mmHg) (Abb. 6 B).

Ein Urotensin II-Bolus führte bei beiden Gruppen innerhalb der ersten Minute zu einem kurzen Anstieg des mittleren arteriellen Druckes (E_{\max} : Zirrhose MW: $113,59 \pm \text{SEM: } 4,46$; Sham MW: $130,58 \pm \text{SEM: } 5,54$ mmHg) um dann nach 5 Minuten Kreislaufzeit einen Tiefpunkt zu erreichen (E_{\min} : Zirrhose MW: $93,4 \pm \text{SEM: } 5,09$; Sham MW: $113,83 \pm \text{SEM: } 4,75$ mmHg). Auch hier zeigte sich eine signifikant stärkere Wirkung von Urotensin II an Tieren mit Zirrhose (Abb. 6 B).

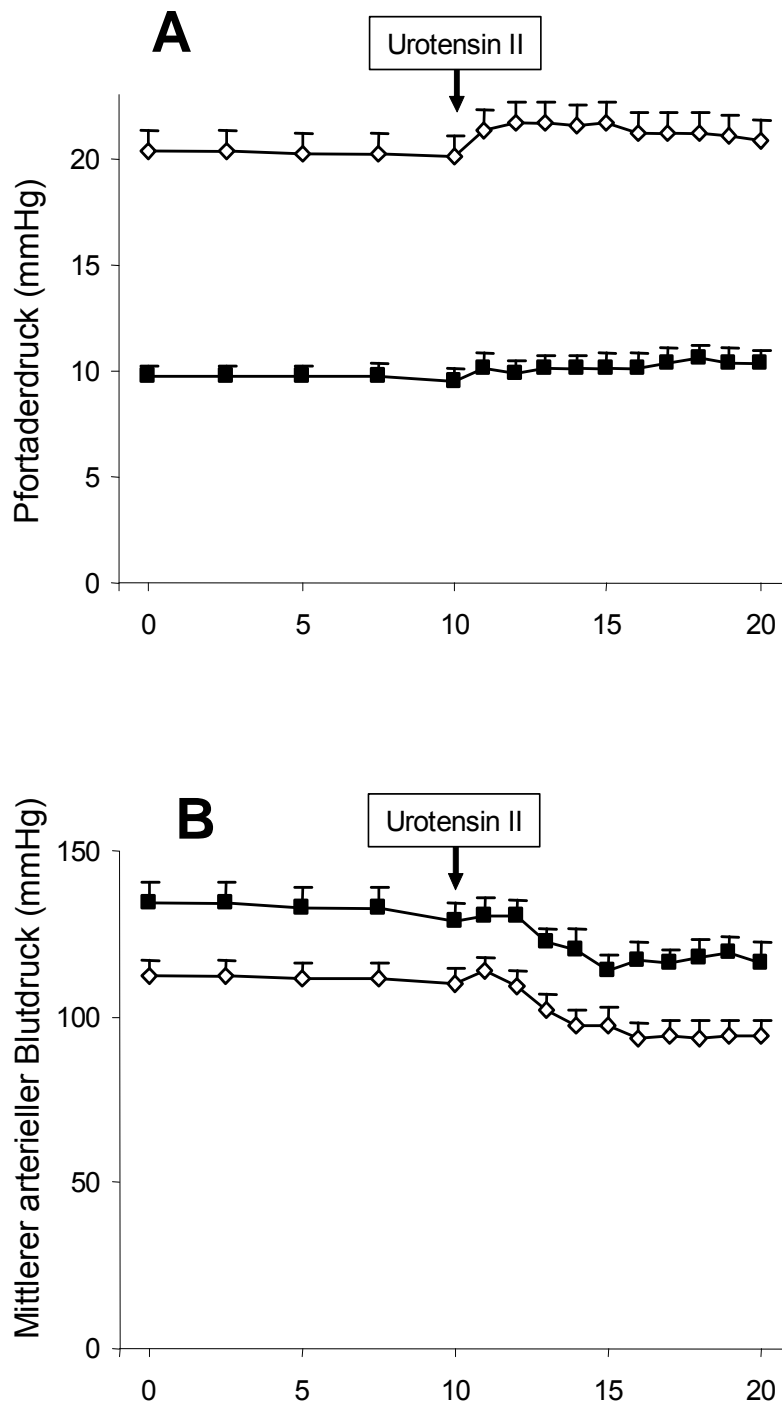


Abbildung 6. Pfortaderdruck (A) und mittlerer arterieller Blutdruck (B) bei Ratten mit einer sekundär biliären Leberzirrhose (weisse Rauten) und shamoperierten Kontrolltieren (schwarze Rechtecke vor und nach der intravenösen Injektion (Pfeil) von 30 nmol Urotensin/kg Körpergewicht. Die Symbole entsprechen Mittelwert und SEM. ($p = 0.01$; ANOVA).

Das Herzzeitvolumen war bei den zirrhötischen Tieren signifikant erhöt, der periphere vaskuläre Widerstand signifikant erniedrigt (Abb. 7).

Nach einer Bolusgabe von 30nmol Urotensin II pro kg Körpergewicht konnte in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des Herzzeitvolumens und einen Abfall des peripheren vaskulären Widerstandes festgestellt werden.

Die arterielle Nierendurchblutung der sham-operierten und der zirrhötischen Tieren zeigte durch die Bolusgabe keine signifikante Veränderung (Abb.7 C).

Sowohl bei dem Pfortaderzustrom als auch bei der arteriellen Leberdurchblutung wurde eine signifikante Erhöhung der Werte der zirrhötischen Tiere festgestellt (Abb. 8 A und C). Der splanchnische Durchblutungswiderstand zeigte in derselben Gruppe signifikant erniedrigte Werte (Abb. 8 B).

Nach der Bolusgabe (30nmol Urotensin II) stellte sich eine signifikante Erhöhung des Pfortaderzustroms als auch der arteriellen Leberdurchblutung in beiden Gruppen ein (Abb. 8 A und C). Der splanchnische Durchblutungswiderstand zeigte nach Urotensin II-Gabe sowohl bei den zirrhötischen als auch bei den shamoperierten Tieren einen signifikanten Abfall der gemessenen Werte (Abb. 8 B).

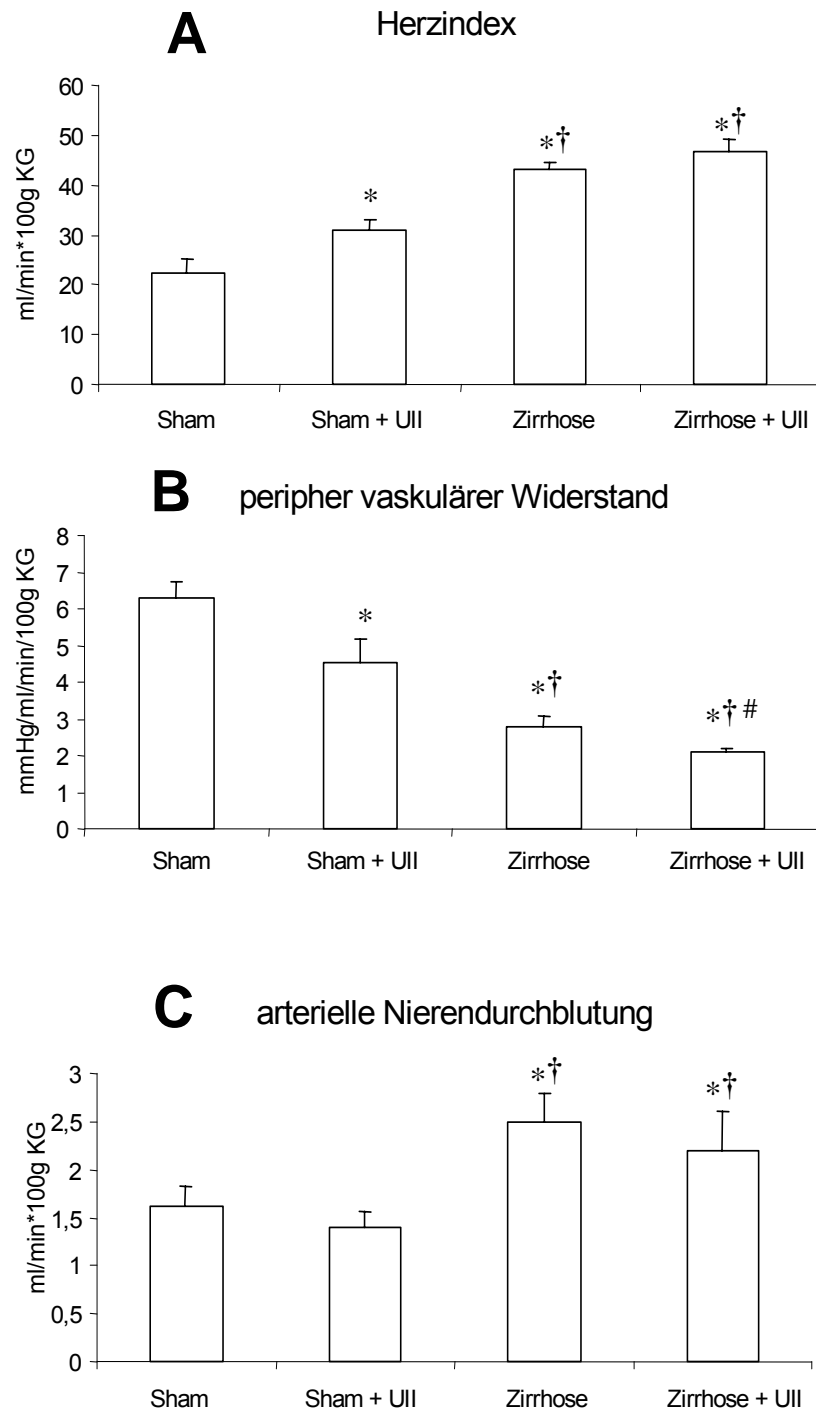


Abbildung 7. Herzindex (A) peripher vaskulärer Widerstand (B) und arterielle Nierendurchblutung (C) bei Ratten mit einer sekundär biliären Leberzirrhose und shamoperierten Kontrolltieren ohne und nach intravenöser Applikation von 30 nmol Urotensin/kg Körpergewicht. Die Balken entsprechen Mittelwert und SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. † $P < 0.05$ vs. Zirrhose. # $P < 0.05$ vs. Zirrhose nach Urotensin. Kruskal Wallis Test.

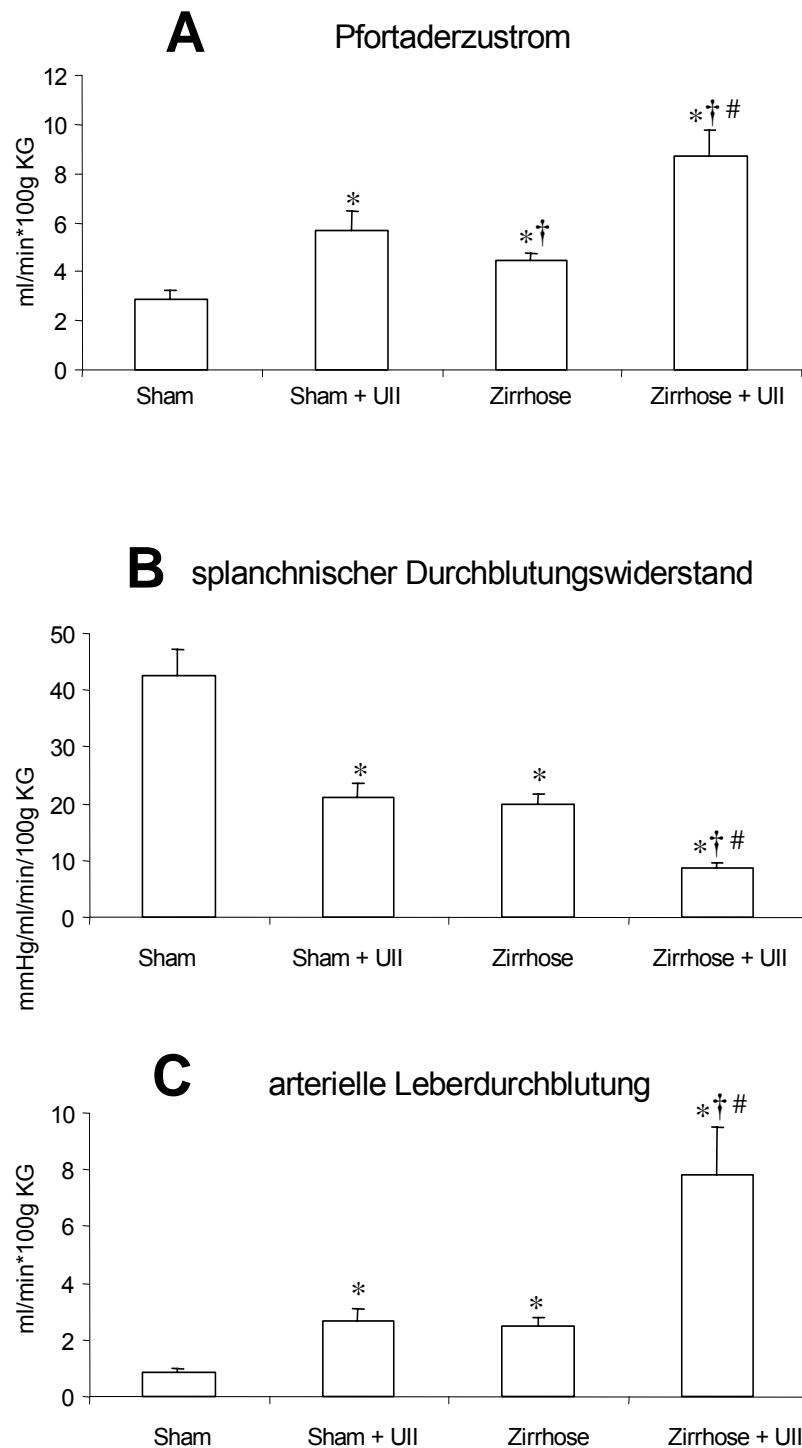


Abbildung 8. Pfortaderzustrom (A) splanchnischer Durchblutungswiderstand (B) und arterielle Leberdurchblutung (C) bei Ratten mit einer sekundär biliären Leberzirrhose und shamoperierten Kontrolltieren ohne und nach intravenöser Applikation von 30 nmol Urotensin/kg Körpergewicht. Die Balken entsprechen Mittelwert und SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. † $P < 0.05$ vs. Zirrhose. # $P < 0.05$ vs. Zirrhose. Kruskal Wallis Test.

Ein portosystemischer Shuntfluss konnte erwartungsgemäß nur bei zirrhatischen Tieren festgestellt werden. Der intravenöse Urotensin II Bolus bewirkte einen signifikanten Anstieg der Shuntflussrate (Abb. 9 A).

Der portalvenöse Leberdurchblutungswiderstand war bei zirrhatischen Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht und konnte durch die Gabe von Urotensin II bei diesen Tieren signifikant gesenkt werden. Bei den sham-operierten Tieren konnte keine Veränderung verzeichnet werden (Abb. 9 B).

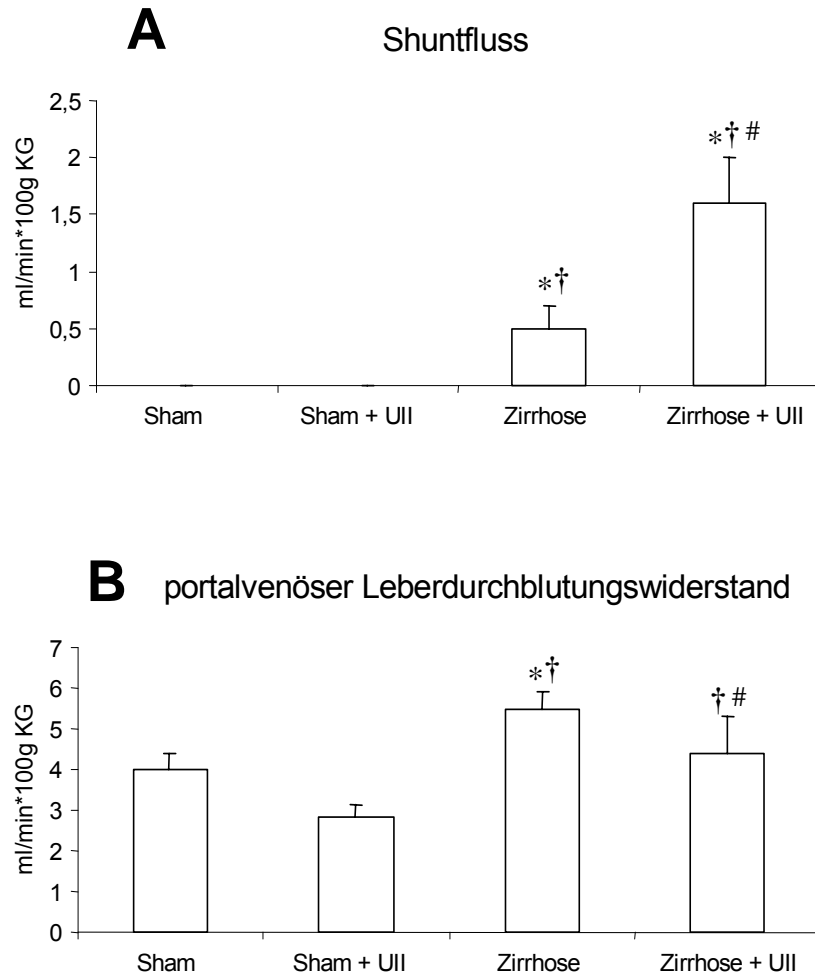


Abbildung 9. Portosystemischer Shuntfluss (A) portalvenöser Leberdurchblutungswiderstand (B) bei Ratten mit einer sekundär biliären Leberzirrhose und shamoperierten Kontrolltieren ohne und nach intravenöser Applikation von 30 nmol Urotensin/kg Körpergewicht. Die Balken entsprechen Mittelwert und SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. † $P < 0.05$ vs. Zirrhose. # $P < 0.05$ vs. Zirrhose. Kruskal Wallis Test.

4.2 In vitro Kontraktilitätsversuche mit isolierten Aorten-Ringen

In diesem Experiment wurden an isolierten, endothelfreien Aorten-Ringen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Kontraktion mit Urotensin II und Kaliumchlorid ermittelt. Es wurden sham-operierte Tiere (n=46) zirrhotischen (n=21) gegenübergestellt.

Die Urotensin II-induzierte aortale Kontraktilität war bei zirrhotischen Ratten gegenüber sham-operierten Tieren signifikant reduziert (Emax: Zirrhose $MW_{0,43} \pm SEM_{0,1}$ g; Sham $MW_{1,5} \pm SEM_{0,42}$ g).

Die maximale Kontraktion endothelfreier Aorten-Ringe durch KCl war bei zirrhotischen Ratten im Vergleich zu sham-operierten ebenfalls signifikant reduziert (Emax: Zirrhose $MW_{1,97} \pm SEM_{0,15}$ g; Sham $2,5 \pm SEM_{0,2}$ g) (Abb.10).

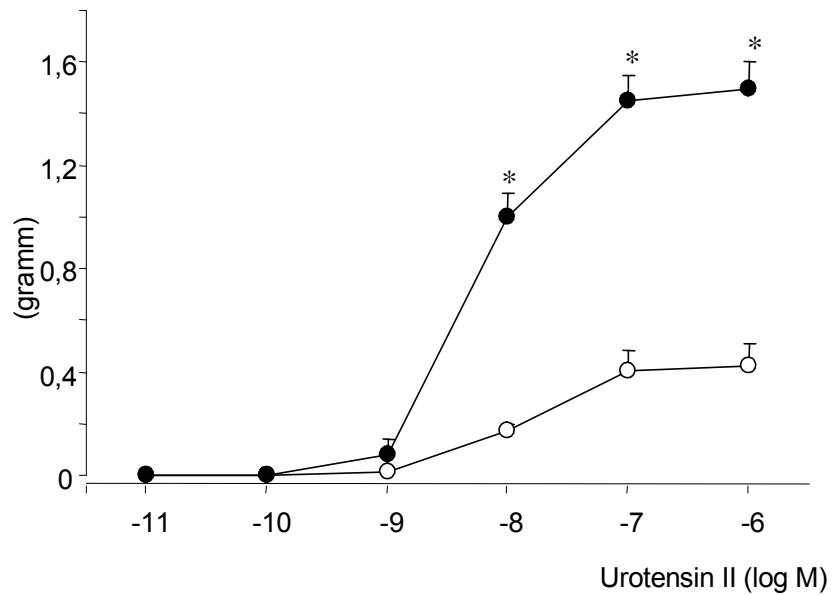


Abbildung 10. Dosiskontraktionskurven isolierter Aortenringe von Ratten mit einer sekundär biliären Leberzirrhose (weis) und shamoperierten (schwarz) Kontrolltieren nach Kumulativer Stimulation mit Urotensin II. Die Symbole entsprechen Mittelwert und SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham (ANOVA).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Rolle von Urotensin II für die hämodynamischen Veränderungen bei der Leberzirrhose und portaler Hypertension untersucht. Bei Tieren mit einer Leberzirrhose besteht eine periphere und systemische Vasodilatation. Die Folgen sind eine arterielle Hypotonie. Weiterhin führt die Vasodilatation im splanchnischen Gefäßbett über den vermehrten portalvenösen Zustrom zum portalen Hypertonus. Vielen Mediatoren (z.B. Stickstoffmonoxid, Glukagon, Endotoxine) wurde eine mögliche Rolle in der Entstehung der Vasodilatation und Unterhaltung des portalen Hypertonus zugesprochen. Der Pathomechanismus der portalen Hypertension ist letztendlich nicht komplett geklärt. Dies erscheint jedoch aufgrund der Vielzahl der Komplikationen und bislang nicht genügender Therapiemöglichkeiten notwendig.

Urotensin II wurde erstmalig in der Urophyse des Teleost Fisches entdeckt und beschrieben (Bern et al., 1985). Erst seit kurzer Zeit konnte Urotensin II oder Prepro-Urotensin II in menschlichen und tierischen Geweben wie etwa Leber, Herz, Gefäßen, Gehirn, Nieren, Milz, Dünndarm und Nebenniere nachgewiesen werden (Douglas et al., 2000a; Gardiner et al., 2001). Urotensin II ist eine vasoaktive Substanz. So führt Urotensin II in hoher Dosierung bei Primaten zu einem dramatischen Anstieg des peripher vaskulären Widerstands (Douglas et al., 2000b). Andererseits führt Urotensin II über die Aktivierung des sogenannten endothelium derived relaxing factors zur splanchnischen Vasodilatation (Bottrill et al., 2000). Da sowohl beim Menschen mit einer Leberzirrhose (Heller et al., 2002) als auch bei der Ratte mit sekundärer biliärer Leberzirrhose die Urotensin II- Plasmaspiegel erhöht sind und zusätzlich beim Menschen eine Korrelation zwischen der Höhe des Urotensin II- Spiegels und der portalen Hypertension besteht, war das Ziel der Arbeit vor allem die hämodynamischen Effekte von Urotensin II zu untersuchen.

Wir konnten durch eine Urotensin II Bolusgabe von 30 nmol/ Kg KG einen Anstieg des portalen Drucks in beiden Gruppen nachweisen. Der mittlere arterielle Druck, zunächst höher in der Gruppe mit gesunden Tieren, steigt nach Bolusgabe signifikant stärker in der zirrhotischen Gruppe an. Eine Erhöhung des Herzzeitvolumens und der Leberperfusion sowie eine Erniedrigung des periphervenösen Widerstands und des

splanchnischen Durchblutungswiderstandes zeigen sich nur in der zirrhotischen Gruppe. Durch die Bolusgabe von Urotensin II wird dieser hämodynamische Zustand bei den zirrhotischen Tieren verstärkt, bei den gesunden Tieren führt es zu einem gleichgerichteten, jedoch schwächeren Effekt. Die renale Perfusion ist in beiden Gruppen, auch nach Bolusgabe nicht verändert. Das portosystemische Shuntvolumen wird durch Urotensin II gesteigert, der portalvenöse Widerstand erniedrigt.

Im Einzelnen erklären sich die hämodynamischen Veränderungen bei gesunden Ratten und Ratten mit einer Leberzirrhose und portaler Hypertension durch die Gabe von Urotensin II in ihrem komplexen Zusammenhang.

Urotensin II führte zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks und des peripheren vaskulären Widerstands trotz gegenregulatorischem Anstieg des Herzzeitvolumens (s. Abb. 6,7). Der Abfall des Gefäßwiderstandes war insbesondere bedingt durch einen Abfall des splanchnischen Gefäßwiderstandes mit konsekutivem Anstieg des portalvenösen Zustroms (s. Abb. 8). Die Vasodilatation im splanchnischen Gebiet sei zumindest teilweise durch eine NO - Überproduktion des mesenterialen Endothels vermittelt. Dies wurde in einer weiteren Arbeit durch die Gabe des Urotensin II - Antagonisten Palosuran, der eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes dieser Region induzierte nachgewiesen (Trebicka et al., 2008).

Die Vasodilatation splanchnischer Gefäße durch Urotensin II wurde bereits in vitro nachgewiesen und wird vermutlich durch eine Aktivierung des sogenannten endothelium derived relaxing factors vermittelt (Bottrill et al., 2000; Stirrat et al., 2001).

Weiterhin kam es zu einer Zunahme der arteriellen Leberdurchblutung. Der zu erwartende Anstieg des portalen Druckes bei erhöhtem portalvenösem Zustrom war dagegen eher gering ausgeprägt (s. Abb. 6). Eine mögliche Erklärung für den nur geringen Pfortaderdruckanstieg liegt in der Abnahme des Leberdurchblutungswiderstandes und zusätzlich (bei zirrhotischen Ratten) in der Zunahme des portosystemischen Shuntvolumens (s. Abb. 9). Unbekannt waren bislang die hämodynamischen Effekte von Urotensin II auf den Leberdurchblutungswiderstand. Die Untersuchung der Urotensin II – Rezeptoren der zu- und abführenden Gefäßen der Leber zeigte einen deutlichen Anstieg deren Expression der intrahepatischen Gefäße sowie der Portalvenen bei zirrhotischen Tieren, jedoch keinen Unterschied in deren

Verteilungsmuster zu gesunden Tieren (Trebicka et al., 2008).

Im Gegensatz zum Gefäßwiderstand in den splanchnischen Gefäßprovinzen blieb die Nierendurchblutung dagegen konstant. Dass es unter portaler Hypertension zu einer renalen Funktionseinschränkung kommt ist bekannt. Dabei werden die glomeruläre Filtrationsrate, die Urinmenge und die Natriurese negativ beeinflusst (Song et al., 2006). Es konnte anhand des Urotensin II-Rezeptor-Antagonisten Palosuran gezeigt werden, dass diese Funktionsminderung zum Teil Urotensin II- vermittelt sein muss (Clozel et al., 2006; Trebicka et al., 2008). Durch die Gabe von Palosuran konnten die o.g. Funktionseinschränkungen teilweise rückgängig gemacht werden. Obwohl der genaue Wirkmechanismus von Urotensin II in der Niere nicht genau bekannt ist, vermutet man einen direkten Effekt des Moleküls auf die Glomeruli und Tubuli.

In einer klinischen Studie konnte eine positive Korrelation zwischen erhöhten Urotensin II- Plasmaspiegeln und der renalen Funktionseinschränkung bei zirrhotischen Patienten festgestellt werden (Heller et al., 2002; Kemp et al., 2007). Auch die positiven Auswirkungen des Palosurans auf die Nierenfunktion sprechen für die hohe regionäre Spezifität des Urotensins.

Auffallend war, dass es bei den zirrhotischen und den gesunden Ratten Urotensin II - anders als beim gesunden Primaten (Douglas et al., 2000b) - zu einem Abfall des peripheren Widerstands kommt. Offensichtlich bestehen in der Wirkung von Urotensin II deutliche Speziesunterschiede. Es sei darauf hingewiesen, dass in dieser Untersuchung Ratten-Urotensin II verwendet wurde, welches eine geringfügig andere Proteinstruktur als menschliches Urotensin II aufweist. Möglicherweise sind auch dadurch die unterschiedlichen hämodynamischen Effekte zwischen Ratte und Menschenaffen zu erklären.

Der kürzlich entwickelte spezifische Urotensin II Rezeptorantagonist Palosuran antagonisiert viele der hier beobachteten hämodynamischen Veränderungen (Clozel et al., 2004). Erste Versuche mit Palosuran an Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose und portaler Hypertension bewirkten eine dosisabhängige Senkung des portalen Druckes und des mittleren arteriellen Druckes (Trebicka et al., 2008). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen dieser Arbeit. In der Arbeit von Trebicka et al. wird die Expression der Urotensin II-Rezeptoren gemessen. Es stellte sich heraus, dass bei

zirrhatischen Tieren eine deutlich erhöhte Expression von Urotensin II und eine Hochregulation des Rezeptors im Endothel der Leberarterien, der zentralen Venen, der Gallengängen und der Kupffer-Zellen erfolgt (Trebicka et al., 2008). Somit könnten diese Zellen den Ort der vermehrten Urotensin II- Produktion darstellen. Es konnte in diesem Zusammenhang auch die Regional-spezifische Wirkung von Urotensin II durch die orale Gabe von Palosuran nachgewiesen werden. Womit es auch eine mögliche Erklärung für die geringe Wirkung von Urotensin II auf den systemischen Widerstand der untersuchten Ratten liefert.

Untersuchungen über den möglichen Signalweg des Peptids zeigten, dass es nicht nur zu einer sehr regional begrenzten Wirkung kommt, sondern auch die Therapie mit dem Urotensin II - Rezeptor- Antagonisten Palosuran spezifisch auf die betroffenen Regionen anspricht (Trebicka et al., 2008). Der Pathomechanismus der portalen Hypertension scheint durch eine Verschiebung des molekularen Gleichgewichts zwischen dem RhoA / Rho-Kinase- und dem eNOS / NO / Protein-Kinase G- Signalweg zu entstehen. Dabei wird ein Defekt in der Expression der RhoA / Rho-Kinase vermutet, kombiniert mit einer Urotensin II induzierten NO-Vasodilatation über die Aktivierung der eNOS.

Des Weiteren beobachteten wir bei den Kontraktilitätsversuchen im Organbad eine Hypokontraktilität sowie ein vermindertes Ansprechen von Aorten zirrhatischer Tiere auf kumulative Gaben von Urotensin II in vitro (s. Abb. 10). Dies scheint eine Erklärung für auch beim Menschen beobachtete erhöhte Urotensin II Serumkonzentration zu sein (Heller et al., 2002) und bestätigt die Beobachtungen vorangehender Arbeiten zu diesem Thema. Diese vaskuläre Hypokontraktilität der splanchnischen Gefäße könnte eventuell eine Erklärung für den geringen Effekt von Urotensin II auf dem systemischen Widerstand der zirrhatischen Ratte sein. Die Kontraktion der Gefäße ruht auf eine Myosin-leichte-Ketten-Phosphorylierung der Muskeln in der Lamina muscularis. Diese wird auf molekularer Ebene über zwei Systeme gesteuert: RhoA / Rho-Kinase- und dem eNOS / NO / Protein-Kinase G- Signalweg. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte ein Pathomechanismus der Hypokontraktilität ergründet werden (Hennenberg et al., 2006). Dabei wurde ein Defekt des Rho A / Rho- Kinase- Signalwegs, der über eine Reduktion der Expression der Rho-Kinase entsteht nachgewiesen. Inwiefern Urotensin II bei der Entstehung des Defekts beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt. Fest steht, dass

Urotensin II selbst bei intaktem Gefäß die Wirkung dieses Defektes nicht gänzlich aufheben kann (s. Abb. 10).

Insgesamt sprechen die in dieser Arbeit vorgelegten Daten für eine bedeutende Rolle von Urotensin II als Mediator der hämodynamischen Veränderungen bei Leberzirrhose.

5.1 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es die hämodynamischen Veränderungen durch Urotensin II bei zirrhotischen, bzw. portal hypertensiven Ratten zu untersuchen. Bisher war die genaue Wirkung des Urotensin II, bzw. dessen Rolle in der Entstehung einer portalen Hypertonie unbekannt. Wir konnten nachweisen, dass Urotensin II bei der Ratte zu einer deutlichen splanchnischen Vasodilatation und zu einem Abfall des intrahepatischen Widerstands und folglich zu einem (gering ausgeprägten) Anstieg des portalen Druckes führt. Weiterhin bewirkt die Gabe von Urotensin II eine Zunahme der arteriellen Leberdurchblutung und einen Abfall des arteriellen Blutdrucks.

Überraschend war die Tatsache, dass die renale Perfusion durch Urotensin II nicht verändert wurde, obwohl eine renale Funktionminderung bei zirrhotischen Patienten schon lange bekannt ist und die Höhe von Urotensin II – Plasmaspiegel positiv mit der Nierenfunktionseinschränkung korreliert. Die Tatsache, dass der Urotensin II -Rezeptor – Antagonist Palosuran zu einer Verbesserung der Nierenfunktion bei Zirrhotikern führt, unterstützt ebenfalls die Vermutung, Urotensin II eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Nierenfunktionseinschränkung spiele.

Ferner ist es uns gelungen eine Hypokontraktilität der splanchnischen Gefäße bei zirrhotischen Tieren nachzuweisen. Dies könnte die erhöhten Urotensin II – Plasmaspiegel bei portal hypertensiven Menschen erklären.

Insgesamt scheint dieser potenteste aller bisher bekannten Vasokonstriktoren die pathologischen Veränderungen einer portalen Hypertension zu generieren, bzw. aufrechtzuerhalten.

Die Wirkungen und Signalwege dieses Peptids konnten anhand von Folgeuntersuchungen, insbesondere durch die weitere Erforschung der Signaltransduktionswege der Gefäßmuskulatur und dem Einsatz des Urotensin-Rezeptor- Antagonisten Palosuran aufgeklärt werden. Die Erforschung der Beteiligung von Urotensin II an der Entstehung und Aufrechterhaltung einer portalen Hypertension scheint somit ein wichtiger Grundpfeiler zum Verständnis des Pathomechanismus dieses Erkrankungsbildes zu sein.

Urotensin II ist somit ein wichtiger Mediator der hämodynamischen Veränderungen bei der Leberzirrhose und portalen Hypertension.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil in der Zeitschrift Hepatology als Originalarbeit 2008 veröffentlicht worden (Trebicka et al., 2008).

6. Anhang

- Literaturverzeichnis

1. Abraldes JG, Dell'Era A, Bosch J. Medical management of variceal bleeding in patients with cirrhosis. *Can J Gastroenterol* 2004; 18: 109-113.
2. Affolter JT, Webb DJ. Urotensin II: A new mediator in cardiopulmonary regulation? *Lancet* 2001; 358: 774-775.
3. Albillos A, Banares R, Barrios C, Clemente G, Rossi I, Escartin P, Bosch J. Oral administration of clonidine in patients with alcoholic cirrhosis. Hemodynamic and liver function effects. *Gastroenterology* 1992; 102: 248-254.
4. Albillos A, Lledo JL, Banares R, Rossi I, Iborra J, Calleja JL, Garrido A, Escartin P, Bosch J. Hemodynamic effects of alpha-adrenergic blockade with prazosin in cirrhotic patients with portal hypertension. *Hepatology* 1994; 20: 611-617.
5. Albillos A, Lledo JL, Rossi I, Perez-Paramo M, Tabuenca MJ, Banares R, Iborra J, Garrido A, Escartin P, Bosch J. Continuous prazosin administration in cirrhotic patients: effects on portal hemodynamics and on liver and renal function. *Gastroenterology* 1995; 109: 1257-1265.
6. Altmann HW. Durchblutungsstörungen des Lebergewebes. Formen und Folgen in morphologischer Sicht. *Z Gastroenterol* 1975, 13: 77-103.
7. American Peptide Company, 2006: hUII.
<http://www.americanpeptide.com/corp/index.htm> (18.02.2007).
8. Ames RS, 1999: Urotensin II (Human) Prohormone.
www.phoenixpeptide.com/Catalog%20Files/Urotensin%20II/UIIY.html (10.12.2004).
9. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-286.
10. Arroyo V, Jimenez W. Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000; 32: 157-170.

11. Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Scholmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 1996; 23: 164-176.
12. Banares R, Moitinho E, Piqueras B, Casado M, Garcia-Pagan JC, de Diego A, Bosch J. Carvedilol, a new nonselective beta-blocker with intrinsic anti-Alpha1-adrenergic activity, has a greater portal hypotensive effect than propranolol in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1999; 30: 79-83.
13. Barriere E, Tazi KA, Rona JP, Pessione F, Heller J, Lebrec D, Moreau R. Evidence for an endothelium-derived hyperpolarizing factor in the superior mesenteric artery from rats with cirrhosis. *Hepatology* 2000; 32: 935-941.
14. Benoit J, Zimmermann B, Premen A. Role of glucagon in splanchnic hyperaemia of mesenteric resistance arteries in portal hypertension. *Am J Physiol* 1986; 251: 674-677.
15. Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* 1985; 41: 533-552.
16. Bessa SM, Helmy I. Injection sclerotherapy for esophageal varices caused by schistosomal hepatic fibrosis. *Surgery* 1985, 97: 164-168.
17. Blei AT. Vasopressin analogs in portal hypertension: different molecules but similar questions. *Hepatology* 1986; 6: 146-147.
18. Bosch J, Abraldes JG. Management of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis of the liver. *Semin Hematol* 2004; 41: 8-12.
19. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 1-14.
20. Bosch J, Bordas JM, Mastai R, Kravetz D, Navasa M, Chesta J, Pizcueta MP, Garcia-Pagan JC, Rodes J. Effects of vasopressin on the intravariceal pressure in patients with cirrhosis: comparison with the effects on portal pressure. *Hepatology* 1988; 8: 861-865.
21. Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1865-1870.
22. Brensing KA, Neubrand M, Textor J, Raab P, Muller-Miny H, Scheurlen C, Gorich J, Schild H, Sauerbruch T. Endoscopic manometry of esophageal varices: evaluation of a balloon technique compared with direct portal pressure measurement. *J Hepatol* 1998; 29: 94-102.

23. Busse R. In: R.Schmidt, G.Thews eds. *Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer-Verlag; 1997. p. 528-533 u. 770f.
24. Carale J, Mukherjee S, 2004: Portal Hypertension. www.emedecine.com/med/topic1889.htm (15.03.2005).
25. Cardenas A. Hepatorenal syndrome: a dreaded complication of end-stage liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 460-467.
26. Casado M, Bosch J, Garcia-Pagan JC, Bru C, Banares R, Bandi JC, Escorsell A, Rodriguez-Laiz JM, Gilabert R, Feu F, Schorlemer C, Echenagusia A, Rodes J. Clinical events after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: correlation with hemodynamic findings. *Gastroenterology* 1998; 114: 1296-1303.
27. Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993; 18: 367-372.
28. Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M. The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1115-1121.
29. Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl) -urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 204-212.
30. Conlon JM, Tostivint H, Vaudry H. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Peptides* 1997; 69: 95-103.
31. Conn HO. Spontaneous Peritonitis and Bacteremia in Laennec's Cirrhosis Caused by Enteric Organisms. A Relatively Common but Rarely Recognized Syndrome. *Ann Intern Med* 1964; 60: 568-580.
32. Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15803-15808.

33. Croquet V, Moal F, Veal N, Wang J, Oberti F, Roux J, Vuillemin E, Gallois Y, Douay O, Chappard D, Cales P. Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 773-780.
34. D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review. *Hepatology* 1995; 22: 332-354.
35. Dacquet C, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J, Pacaud P. Spironolactone inhibition of contraction and calcium channels in rat portal vein. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 535-544.
36. Douglas SA, Ashton D, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR. Human Urotensin-II is a potent vasoactive peptide: Pharmacological characterisation in the rat, mouse, dog and primate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000a; 36 (Suppl.1): 163-S166.
37. Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 2000b; 131: 1262-1274.
38. Escorsell A, Ferayorni L, Bosch J, Garcia-Pagan JC, Garcia-Tsao G, Grace ND, Rodes J, Groszmann RJ. The portal pressure response to beta-blockade is greater in cirrhotic patients without varices than in those with varices. *Gastroenterology* 1997; 112: 2012-2016.
39. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piera C, Whittle BJ, Pique JM, Bosch J, Rodes J. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 1487-1495.
40. Garcia-Pagan JC, Feu F, Navasa M, Bru C, Ruiz del Arbol L, Bosch J, Rodes J. Long-term haemodynamic effects of isosorbide 5-mononitrate in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 1990; 11: 189-195.
41. Garcia-Pagan JC, Salmeron JM, Feu F, Luca A, Gines P, Pizcueta P, Claria J, Piera C, Arroyo V, Bosch J, et al. Effects of low-sodium diet and spironolactone on portal pressure in patients with compensated cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 1095-1099.
42. Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology* 1985; 5: 419-424.
43. Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1625-1629.

44. Gibson A. Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol* 1987; 91: 205-212.
45. Gibson A, Wallace P, Bern HA. Cardiovascular effects of urotensin-II in anesthetized and pithed rats. *Gen Comp Endocrinol*. 1986, 64: 435-439.
46. Gines P, Arroyo V. Hepatorenal syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1833-1839.
47. Gray GA, Jones MR, Sharif I. Human urotensin-II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart. Potentiation by nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase inhibition. *Life Sci*. 2001; 69: 175-180.
48. Groszmann RJ, Atterbury CE. The pathophysiology of portal hypertension. *Semin Liver Dis* 1982; 2: 177-186.
49. Groszmann R, Kotelanski B, Cohn JN, Khatri IM. Quantitation of portasystemic shunting from the splenic and mesenteric beds in alcoholic liver disease. *Am J Med* 1972; 53: 715-722.
50. Groszmann R, Kravetz D, Bosch J, Glickman M, Bruix J, Bredfeldt J, Conn HO, Rodes J, Storer EH. Nitroglycerin improves the hemodynamic response to vasopressin in portal hypertension. *Hepatology* 1982; 2: 757-762.
51. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-1143.
52. Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 74-79.
53. Hartleb M, Moreau R, Gaudin C, Lebrec D. Lack of vascular hyporesponsiveness to the L-type calcium channel activator, Bay K 8644, in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 22: 202-207.
54. Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin 1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1085-1093.
55. Hay DW, Luttmann MA, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent spasmogen of primate airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 10-12.
56. Heller J. Untersuchungen zum Stickstoffmonoxidstoffwechsel bei Leberzirrhose und portaler Hypertension [Habilitationsschrift]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität; 2003.
57. Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 767-772.

58. Heller J, Sogni P, Tazi KA, Chagneau C, Poirel O, Moreau R, Lebrec D. Abnormal regulation of aortic NOS2 and NOS3 activity and expression from portal vein-stenosed rats after lipopolysaccharide administration. *Hepatology* 1999a; 30: 698-704.
59. Heller J, Shiozawa T, Trebicka J, Hennenberg M, Schepke M, Neef M, Sauerbruch T. Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 1006-1012.
60. Heller J, Trebicka J, Shiozawa T, Schepke M, Neef M, Hennenberg M, Sauerbruch T. Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2005; 25: 657-666.
61. Heller J, Schepke M, Gehnen N, Molderings GJ, Muller A, Erhard J, Spengler U, Sauerbruch T. Altered adrenergic responsiveness of endothelium-denuded hepatic arteries and portal veins in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1999b; 116: 387-393.
62. Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006; 130: 838-854.
63. Henriksen JH. Cirrhosis: ascites and hepatorenal syndrome. Recent advances in pathogenesis. *J Hepatol* 1995; 23 Suppl 1: 25-30.
64. Islam MZ, Williams BC, Madhavan KK, Hayes PC, Hadoke PW. Selective alteration of agonist-mediated contraction in hepatic arteries isolated from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 765-771.
65. Itoh H, McMaster D, Lederis K. Functional receptors for fish neuropeptide urotensin-II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol* 1988; 149: 61-66.
66. Itoh H, Itoh Y, River J, Lederis K. Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol* 1987: R361-R366.
67. Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T, Horie T. Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 2000: 402: R5-R7.
68. Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Yandle T, Richards M, Roberts S. Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int* 2007; 27: 1232-1239.
69. Kerr DN, Pearson DT, Read AE. Infection of Ascitic Fluid in Patients with Hepatic Cirrhosis. *Gut* 1963; 41: 394-398.

70. Kleber G, Sauerbruch T, Ansari H, Paumgartner G. Prediction of variceal hemorrhage in cirrhosis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 1991; 100: 1332-1337.
71. Kojima H, Yamao J, Tsujimoto T, Uemura M, Takaya A, Fukui H. Mixed endothelin receptor antagonist, SB209670, decreases portal pressure in biliary cirrhotic rats in vivo by reducing portal venous system resistance. *J Hepatol* 2000; 32: 43-50.
72. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 305-311.
73. Lebrec D. In: Okuda K, Benhamou JP, eds. *Portal Hypertension. Clinical and Physiological Aspects*. Tokyo: Springer; 1991. p. 101-113.
74. Lebrec D. In: Paquet KJ, Schölmerich J, eds. *Pfortaderhochdruck*. Basel: Karger, 1994: p. 40-56.
75. Lebrec D, Girod C. Comparison of the circulation between fed and fasted normal and portal hypertensive rats. *J Pharmacol Methods* 1986; 15: 359-365.
76. Lebrec D, Bataille C, Bercoff E, Valla D. Hemodynamic changes in patients with portal venous obstruction. *Hepatology* 1983; 3: 550-553.
77. Lebrec D, de Fleury P, Rueff B, Nahum H, Benhamou J-P. Portal hypertension, size of esophageal varices, and risk of gastrointestinal bleeding in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1980; 79: 1139-1144.
78. MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Polland K. Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 201-204.
79. Maguire JJ, Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol* 2002; 137: 579-588.
80. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P, et al. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995; 29: 335-344.
81. Mastai R, Bosch J, Navasa M, Kravetz D, Bruix J, Viola C, Rodes J. Effects of alpha-adrenergic stimulation and beta-adrenergic blockade on azygos blood flow and splanchnic haemodynamics in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1987; 4: 71-79.

82. Michielsen PP, Boeckxstaens GE, Sys SU, Herman AG, Pelckmans PA. The role of increased nitric oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal vein ligated rats. *J Hepatol* 1995; 23: 341-347.
83. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.
84. Moreau R, Lee SS, Hadengue A, Braillon A, Lebrec D. Hemodynamic effects of a clonidine-induced decrease in sympathetic tone in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1987; 7: 149-154.
85. Newby DE, Jalan R. Urotensin II: Better than somatostatin for portal hypertension? *Hepatology* 2000; 31: 1201-1202.
88. Niederberger M, Gines P, Martin PY, Tsai P, Morris K, McMurtry I, Schrier RW. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 1996; 24: 947-951.
87. Niederberger M, Gines P, Tsai P, Martin PY, Morris K, Weigert A, McMurtry I, Schrier RW. Increased aortic cyclic guanosine monophosphate concentration in experimental cirrhosis in rats: evidence for a role of nitric oxide in the pathogenesis of arterial vasodilation in cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 1625-1631.
88. Okumura H, Aramaki T, Katsuta Y, Satomura K, Akaike M, Sekiyama T, Terada H, Ohsuga M, Komeichi H, Tsutsui H. Reduction in hepatic venous pressure gradient as a consequence of volume contraction due to chronic administration of spironolactone in patients with cirrhosis and no ascites. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 46-52.
89. Pateron D, Tazi KA, Sogni P, Heller J, Chagneau C, Poirel O, Philippe M, Moreau R, Lebrec D. Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. *Gastroenterology* 2000; 119: 196-200.
90. Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992; 90: 642-646.
91. Protopopov A, Kashuba V, Podowski R, Gizatullin R, Sonnhammer E, Wahlestedt C, Zabarovsky ER. Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 312-313.

92. Ready JB, Rector WG. Morbidity and mortality of portal hypertension. *Drugs* 1989; 37 (Suppl 2): 13-24.
93. Reichen J, 2007: Portale Hypertonie 1.
<http://www.ikp.unibe.ch/lab2/ppnew/pp7/abb07.gif> (08.10.2007).
94. Rieder H, Ramadori G, Allmann KH, Meyer zum Buschenfelde KH. Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J Hepatol* 1990; 11: 359-366.
95. Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide during hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Physiol* 1997; 273: G124-130.
96. Roulot D, Moreau R, Gaudin C, Bacq Y, Braillon A, Hadengue A, Frohly P, Lebrech D. Long-term sympathetic and hemodynamic responses to clonidine in patients with cirrhosis and ascites. *Gastroenterology* 1992; 102: 1309-1318.
97. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994; 21: 792-796.
98. Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN. Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 265-271.
99. Salmeron JM, Ruiz del Arbol L, Gines A, Garcia-Pagan JC, Gines P, Feu F, Claria J, Rivera F, Bosch J, Arroyo V, et al. Renal effects of acute isosorbide-5-mononitrate administration in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17: 800-806.
100. Sauerbruch T, Hirner A. Portale Hypertension. *Verdauungskrankheiten* 1999; I: 99-100.
101. Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 334-339.
102. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 1151-1157.
103. Seyde WC, Longnecker DE. Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology* 1984; 61: 686-698.
104. Sitzmann JV, Bulkley GB, Mitchell MC, Campbell K. Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. *Ann Surg* 1989; 209: 322-327.

105. Sogni P, Smith AP, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam TW. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1120-1127.
106. Sogni P, Sabry S, Moreau R, Gadano A, Lebrec D, Dinh-Xuan AT. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996; 24: 487-490.
107. Song W, Abdel-Razik AE, Lu W, Ao Z, Johns DG, Douglas SA, Balment RJ, Ashton N. Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney Int* 2006; 69: 1360-1368.
108. Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistances arteries. *Am J Physiol* 2001: H925-H928.
109. Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M, Thompson DA. A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 752-759.
110. Terada T, Nakanuma Y, Obata H. HLA-DR expression on the microvasculature of portal tracts in idiopathic portal hypertension. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 993-997.
111. The IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, 2005: GPCR. <http://www.iuphar-db.org/GPCR/> (03.04.2006).
112. The North Italian Endoscopic Club for the Study and Treatment of Esophageal Varices. Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. A prospective multicenter study. *N Engl J Med* 1988; 15: 983-989.
113. Trebicka J. Hämodynamische und renale Wirkung der Angiotensin II Typ1 Rezeptorblockade bei Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose. Bonn: Inaugural-Dissertation der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2004.
114. Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Probsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J. Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 2008; 47: 1264-1276.
115. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-778.
116. Van de Casteele M, Sagesser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther* 2001; 90: 35-43.

117. Weigert AL, Martin PY, Niederberger M, Higa EM, McMurtry IF, Gines P, Schrier RW. Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aortas of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995; 22: 1856-1862.
118. Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 411-426.
119. Willett IR, Esler M, Jennings G, Dudley FJ. Sympathetic tone modulates portal venous pressure in alcoholic cirrhosis. *Lancet* 1986; 2: 939-943.
120. Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, Soriano G, Hoefs J, Navasa M. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005; 54: 718-725.
121. Zhou Q, Hennenberg M, Trebicka J, Jochem K, Leifeld L, Biecker E, Sauerbruch T, Heller J. Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut* 2006; 55: 1296-1305.
122. Zimmon DS, Kessler RE. The portal pressure-blood volume relationship in cirrhosis. *Gut* 1974; 15: 99-101.

- Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler nie zustande gekommen.

An erster Stelle danke ich PD Dr. med. Jörg Heller für seine einzigartige Unterstützung und seine unendliche Geduld (mit mir).

Herrn Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe für portale Hämodynamik.

Dr. med. Jonel Trebicka für seinen stets unermüdlichen und außergewöhnlichen Einsatz. An dieser Stelle Jonel: Respekt!

Marcel Fischer, meinem Bruder und Lektor, der diesen Text ins Deutsche übersetzt hat.

Dagmar Bammer für ihre (manchmal sehr schwierige) Hilfe.

Des Weiteren allen, die hier nicht namentlich erwähnt werden aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

„Coco“.