

Die Rolle der β_3 -Adrenozeptoren in der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus

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

Andrea Schulze Pröbsting
aus Steinfurt

2011

Die Rolle der β_3 -Adrenozeptoren in der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus

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

Andrea Schulze Pröbsting
aus Steinfurt

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Kurt Racké

Tag der Mündlichen Prüfung: 13. April 2011

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 LEBERZIRRHOSE.....	9
1.1.1 <i>Epidemiologie, Ätiologie und Morphologie der Leberzirrhose</i>	9
1.1.2 <i>Rolle der Sternzellen in der Pathogenese der Leberzirrhose</i>	10
1.1.3 <i>Komplikationen der Leberzirrhose</i>	10
1.2 PATHOGENESE DES PORTALEN HYPERTONUS IN DER LEBERZIRRHOSE	11
1.2.1 <i>Signalwege in vaskulären glatten Muskelzellen</i>	12
1.2.2 <i>Forward-Flow-Theorie</i>	13
1.2.3 <i>Backward-Flow-Theorie</i>	16
1.3 THERAPIE DES PORTALEN HYPERTONUS UND SEINER KOMPLIKATIONEN	19
1.3.1 <i>Senkung des portalen Zustroms</i>	19
1.3.2 <i>Senkung des intrahepatischen Widerstands</i>	21
1.3.3 <i>Klinisch etablierte Strategien zur Senkung des portalen Hypertonus</i>	22
1.4 DAS ADRENERGE SYSTEM UND DIE BEDEUTUNG VON β_3 -ADRENOZEPTOREN.....	24
1.4.1 <i>Das adrenerge System</i>	24
1.4.2 <i>Charakterisierung und Expression des β_3-Adrenozeptors</i>	25
1.4.3 <i>Agonisten des β_3-Adrenozeptors</i>	26
1.4.4 <i>Antagonisten des β_3-Adrenozeptors</i>	27
1.4.5 <i>Physiologie und Signaltransduktion des β_3-Adrenozeptors</i>	27
1.5 FRAGESTELLUNG.....	29
1.5.1 <i>Sind β_3-Adrenozeptoren in den für den portalen Hypertonus relevanten Gefäßsystemen exprimiert?</i>	29
1.5.2 <i>Welche Rolle spielen β_3-Adrenozeptoren in Bezug auf die Regulation des intrahepatischen und des splanchnischen Gefäßwiderstands?</i>	29
1.5.3 <i>Über welche Signaltransduktionswege vermitteln β_3-Adrenozeptoren ihre Wirkung in den untersuchten Gefäßsystemen?</i>	30

2	MATERIAL UND METHODEN	31
2.1	PATIENTEN	31
2.2	TIERMODELLE	31
2.2.1	<i>Gallengangsligatur</i>	<i>31</i>
2.2.2	<i>Inhalation von Tetrachlorkohlenstoff.....</i>	<i>32</i>
2.3	β_3 -ADRENOZEPTOR-WIRKSAME SUBSTANZEN	32
2.4	GEWEBEPROBEN	33
2.5	ZELLISOLATION UND -KULTUR: PRIMÄRE HEPATISCHE STERNZELLEN UND HEPATOZYTEN	33
2.6	WESTERN-BLOT-ANALYSEN	34
2.7	QUANTITATIVE REVERSE-TRANSKRIPTASE-POLYMERASEKETTENREAKTION	36
2.8	STERNZELLKONTRAKTION	36
2.9	CAMP-SPIEGEL NACH β_3 -ADRENOZEPTOR-STIMULATION	37
2.10	IN SITU LEBERPERFUSION.....	38
2.11	HÄMODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN IN VIVO	39
2.11.1	<i>Gruppeneinteilung und medikamentöse Behandlung.....</i>	<i>40</i>
2.11.2	<i>Messung des mittleren arteriellen Drucks und des Pfortaderdrucks.....</i>	<i>40</i>
2.11.3	<i>Messung der Organperfusion mittels Farbmikrosphären.....</i>	<i>41</i>
2.12	STATISTISCHE ANALYSE	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	ALLGEMEINE CHARAKTERISTIKA DER VERSUCHSTIERE.....	45
3.2	PROTEIN- UND mRNA-EXPRESSION DER β_3 -ADRENOZEPTOREN IN DER LEBER.....	45
3.3	EXPRESSION DER β_3 -ADRENOZEPTOREN IN SPLANCHNISCHEN GEFÄßEN	46
3.4	RHO-KINASE- UND PKG-AKTIVITÄT IN LEBER UND SPLANCHNIKUSGEBIET	48
3.5	PROTEINEXPRESSION VON $G\alpha_s$ UND $G\alpha_i$ IN DER LEBER	50
3.6	KONTRAKTILITÄT DER HEPATISCHEN STERNZELLEN.....	50
3.7	CAMP-SPIEGEL IN AKTIVIERTEN HSC NACH β_3 -ADRENOZEPTOR-STIMULATION	50
3.8	INTRAHEPATISCHER GEFÄßWIDERSTAND	51
3.9	HÄMODYNAMISCHER EFFEKT β_3 -ADRENOZEPTOR-WIRKSAMER SUBSTANZEN	53
3.10	HÄMODYNAMISCHER EFFEKT β_3 -ADRENOZEPTOR-WIRKSAMER SUBSTANZEN NACH VORBEHANDLUNG MIT PROPRANOLOL.....	56

4	DISKUSSION	58
4.1	EXPRESSION DER β_3 -ADRENOZEPTOREN IN DEN FÜR DEN PORTALEN HYPERTONUS RELEVANTEN GEFÄßSYSTEMEN	58
4.2	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER β_3 -ADRENOZEPTOREN IN DER ZIRRHOTISCHEN LEBER	59
4.3	DIE ROLLE β_3 -ADRENOZEPTOR-WIRKSAMER SUBSTANZEN IN VIVO.....	60
4.4	SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DER β_3 -ADRENOZEPTOREN	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
	LITERATURVERZEICHNIS	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Akt	Proteinkinase B
AR	Adrenozeptor
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin ₁ -Rezeptor
AT-II	Angiotensin-II
BDL	Bile duct ligated/gallengangsligiert
BRL	BRL 37344; (±)-(R*,R*)-[4-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-Hydroxyethyl]Amino]-Propyl]Phenoxy]Azetat
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGP	CGP 12177A; 4-[3-[(1,1-Dimethylethyl)Amino]-2-Hydroxypropoxy]-1,3-Dihydro-2H-Benzimidazol-2-on
C _T	Anzahl der Zyklen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
FCS	Fetal calf serum/fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
HSC	Hepatic stellate cells/hepatische Sternzellen
HVPG	Hepatic venous pressure gradient/portosystemischer Druckgradient
i.v.	Intravenös
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin

IP ₃	Inositoltriphosphat
ISMN	Isosorbitmononitrat
K ⁺	Kalium-Ionen
KG	Körpergewicht
KOH	Kaliumhydroxid
M.	Musculus
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MLC	Myosin light chain/leichte Kette des Myosins
MLCK	Myosin light chain kinase/Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase/Myosin-Leichtketten-Phosphatase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Kochsalzlösung
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
p-MLC	Phosphorylierte leichte Kette des Myosins
p-Moesin	Phosphoryliertes Moesin
p-VASP	Phosphoryliertes Vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction/Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SEM	Standard error of the mean/Standardabweichung des Mittelwerts

SR	SR 59230A; 3-(2-Ethylphenoxy)-1-[(1S)-1,2,3,4-Tetrahydronaphth-1-ylamino]- (2S)-2-Propanoloxalat
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TNF α	Tumornekrosefaktor α
V.	Vena
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein/Vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein
VSMC	Vascular smooth muscle cells/vaskuläre glatte Muskelzellen
β -Blocker	β -Adrenozeptor-Antagonisten

1 Einleitung

1.1 Leberzirrhose

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Morphologie der Leberzirrhose

Die Leberzirrhose stellt den histopathologischen Endpunkt aller chronischen Schädigungen der Leber dar. Diese Schädigungen sind in Europa und Nordamerika am häufigsten auf Alkoholmissbrauch oder eine chronische Hepatitis-C-Infektion zurück zu führen (Rabe et al., 2001; Schuppan und Afdhal, 2008). Weitere Ätiologien der Leberzirrhose sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Toxisch	Alkoholabusus Medikamente (Methotrexat, Isoniazid, Amiodaron) Chemikalien (Tetrachlorkohlenstoff, Arsen)
Erregerbedingt	Viral (Hepatitis B, Hepatitis C) Parasitär (Schistosomiasis)
Autoimmunhepatitis	
NASH (nicht-alkoholische Steatosis hepatis)	
Biliär	Primär biliäre Zirrhose Primär sklerosierende Cholangitis
Metabolisch	Hämochromatose Morbus Wilson Zystische Fibrose α_1 -Antitrypsinmangel
Kardial	Chronische Rechtsherzinsuffizienz Perikarditis constrictiva
Kryptogen	

Tab. 1: Einteilung der Ätiologien der Leberzirrhose und Beispiele (modifiziert nach Bacon, 2008)

Die Leberzirrhose unterscheidet sich von ihrer Vorstufe, der durch massive Bindegewebsvermehrung gekennzeichneten Fibrose, durch die Bildung von Regeneratknotten, welche durch Bindegewebssepten voneinander getrennt sind (Friedman, 2008; Guyot et al., 2006). Die dadurch bedingte irreversible Störung der normalen Läppchenarchitektur der Leber hat zum einen metabolische Folgen. Der Rückgang funktioneller Lebermasse bewirkt eine Abnahme der Synthese- und Entgiftungsleistungen der Leber. Die starke, vor allem perisinusoidal lokalisierte Vermehrung der extrazellulären Matrix und eine Änderung ihrer Zusammensetzung führen zum Verlust der Endothelfenestration der Lebersinusoiden und somit zur Kapillarisation und Einschränkung der Diffusion (Schuppan und Afdhal, 2008). Zum anderen hat der Umbau der Leber hämodynamische

Folgen. Die zunehmende Widerstandserhöhung im portalvenösen Strombett trägt entscheidend zur Entwicklung eines Pfortaderhochdrucks, dem portalen Hypertonus, bei. Im weiteren Verlauf kommt es zur Beeinflussung der systemischen Hämodynamik und der Funktion anderer Organe (Blendis und Wong, 2001).

Aufgrund vieler unerkannter, klinisch kompensierter Fälle ist die Inzidenz der Leberzirrhose nur schwer zu ermitteln. Es wird davon ausgegangen, dass in westlichen Ländern bis zu 1 % der Bevölkerung histologische Zeichen einer Leberzirrhose aufweisen; in Autopsien wurde sogar bei bis zu 10 % der Fälle eine Leberzirrhose nachgewiesen (Schubert et al., 1982; Schuppan und Afdhal, 2008).

1.1.2 Rolle der Sternzellen in der Pathogenese der Leberzirrhose

Jede chronische Schädigung der Leber führt zu einer Transdifferenzierung und Vermehrung hepatischer Sternzellen (HSC) (Friedman, 2008). Die HSC bilden 5–8 % der gesamten Leberzellen und befinden sich im subendothelialen Dissé-Raum. Hier besteht, auch aufgrund zahlreicher zytoplasmatischer Ausläufer der HSC, eine enge Nachbarschaft zu den Hepatozyten und den Endothelzellen der Lebersinusoiden, aber auch zu Zellen des autonomen Nervensystems. Dies ermöglicht die Beeinflussung der HSC durch eine Vielzahl parakriner Mediatoren. Als Reaktion auf Leberzelluntergang und Entzündung kommt es zu einer Aktivierung der Sternzellen; sie proliferieren, setzen die gespeicherten Retinoide frei und verändern ihren Phänotyp hin zu kontraktilen, myofibroblastenähnlichen Zellen. Auch perivaskuläre Fibroblasten wandeln sich in Myofibroblasten um (Knittel et al., 1999). Die Myofibroblasten beginnen mit der exzessiven Produktion von Extrazellulärmatrix sowie von Enzymen und Mediatoren, die den Matrixabbau hemmen (Li und Friedman, 1999). Aktivierte HSC, die den größten Anteil an kontraktilen und kollagenproduzierenden Zellen der zirrhotischen Leber bilden, führen durch zwei Mechanismen zur Entstehung eines Pfortaderhochdrucks in der Leberzirrhose: A) durch die vermehrte Synthese von Extrazellulärmatrix und b) durch ihre erhöhte Kontraktilität (Reynaert et al., 2002; Rockey, 1997). Ferner dienen sie als Leitstrukturen für die bei der Leberzirrhose vermehrte Angiogenese (Novo et al., 2007; Parola et al., 2008).

1.1.3 Komplikationen der Leberzirrhose

Die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Leber in der Zirrhose bewirken eine Vielzahl von Komplikationen, die zum Krankheitsbild der dekompensierten Leberzirrhose füh-

ren. Die für die Prognose des Patienten wichtigste Komplikation ist der Pfortaderhochdruck, welcher bei mehr als 60 % der Zirrhosepatienten vorliegt (Bacon, 2008). Dieser führt wiederum über die Ausbildung von vaskulären Kollateralkreisläufen zu Ösophagus- und Magenvarizen mit der möglichen Folge massiver oberer gastrointestinaler Blutungen. Ebenfalls hämodynamisch bedingt sind der Aszites und die spontane bakterielle Peritonitis, das hepatorenale Syndrom und die portopulmonale Hypertonie. Weitere Komplikationen der Zirrhose sind Gerinnungsstörungen, hepatische Enzephalopathie, hepatopulmonales Syndrom sowie die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. Der fortschreitende Funktionsverlust der Hepatozyten führt letztendlich zum Endstadium der dekompensierten Leberzirrhose, dem chronischen Leberversagen mit einer Mortalität von 85 % in 5 Jahren (Grünhage et al., 2008; Heidelbaugh und Sherbondy, 2006; Schuppan und Afdhal, 2008).

1.2 Pathogenese des portalen Hypertonus in der Leberzirrhose

Der portale Hypertonus ist definiert als ein Druck über 7 mmHg im portalen Gefäßsystem, welches sich aus der Pfortader und ihren Ästen zusammensetzt. Die direkte, invasive Messung des portalen Drucks gelingt vorwiegend im Rahmen einer therapeutischen Shuntanlage. Im klinischen Alltag stärker verbreitet ist die Wegdedruckmessung, in der der portosystemische Druckgradient (HVPG), also die Differenz zwischen Druck in der Vena (V.) portae und in der V. cava inferior, bestimmt wird. Dieser beträgt in der Regel bis 5 mmHg (de Franchis, 2000; Myers und Taylor, 1956). Ab einem HVPG von 10 mmHg kommt es zur Ausbildung von Varizen, welche ab einem Druck von 12 mmHg ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko haben (Garcia-Tsao et al., 1985; Nagula et al., 2006). Bei 75 % der Patienten liegt dem Pfortaderhochdruck ätiologisch eine Leberzirrhose zu Grunde; sie führt zu einem intrahepatischen, sinusoidalen portalen Hypertonus (Laleman et al., 2005). Andere Ätiologien rufen einen prä- oder posthepatischen portalen Hypertonus hervor (Bacon, 2008) (Tabelle 2).

Die Gesamtdurchblutung der Leber beträgt etwa 1500 ml/min und stammt zu 2/3 aus der V. portae und zu 1/3 aus der Arteria (A.) hepatica. Aufgrund der Definition des Druckgradienten ΔP als Produkt aus Fluss Q und Widerstand R ($\Delta P = Q \times R$) nach dem Ohmschem Gesetz kann sowohl ein erhöhter Fluss im präportalvenösen splanchnischen Gefäßbett (Forward-Flow-Theorie) als auch eine Widerstandserhöhung im portalvenösen Ausflussgebiet (Backward-Flow-Theorie) zu einem erhöhten Pfortaderdruck führen (Bosch und Garcia-Pagan, 2000).

Prähepatisch	Pfortaderthrombose (Thromboseneigung, septisch, Kompression, traumatisch, idiopathisch) Milzvenenthrombose
Intrahepatisch	
Präsinusoidal	Schistosomiasis, angeborene Leberfibrose, myeloproliferative Erkrankungen
Sinusoidal	Leberzirrhose (75% aller Fälle)
Postsinusoidal	Venoocclusive Disease
Posthepatisch	Budd-Chiari-Syndrom Kardiale Ursachen

Tab. 2: Einteilung und Beispiele für die Ätiologie des portalen Hypertonus (modifiziert nach Bacon, 2008)

1.2.1 Signalwege in vaskulären glatten Muskelzellen

Der Tonus der Gefäße des Splanchnikusgebiets wird durch vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) reguliert. Das Gleichgewicht kontraktiler und relaxierender Signalwege beeinflusst ihren Kontraktionszustand (Abbildung 1). Entscheidend für eine Kontraktion ist die Phosphorylierung der leichten Myosinkette (MLC) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK). Die Dephosphorylierung der MLC durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) hat eine Relaxation der VSMC zur Folge. In VSMC sind zwei voneinander unabhängige kontraktile Signaltransduktionswege bekannt, die vor allem α_1 -Adrenozeptor(AR)-vermittelt sind. Neben einem schnellen Kalzium-Ionen (Ca^{2+})-abhängigen Mechanismus über Phospholipase C (PLC) und Inositoltriphosphat (IP_3) erhöhen die monomere Guanosintriphosphatase RhoA und deren Effektor Rho-Kinase Ca^{2+} -unabhängig die Kontraktionskraft der VSMC, indem sie über die Phosphorylierung der MLCP die Dephosphorylierung von Myosin hemmt (Hennenberg et al., 2008; Pfitzer, 2001). Eine Relaxation der VMSC erfolgt einerseits über eine Aktivierung von β_2 - und β_3 -AR und eine nachfolgende durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und dessen Effektor Proteinkinase A (PKA) vermittelte Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel. Andererseits führt der Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) über eine durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und dessen Effektor Proteinkinase G (PKG) vermittelte Aktivierung der MLCP zu einer Relaxation (Hennenberg et al., 2008). NO wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) freigesetzt, welche über die Phosphorylierung durch Proteinkinase B (Akt) aktiviert wird.

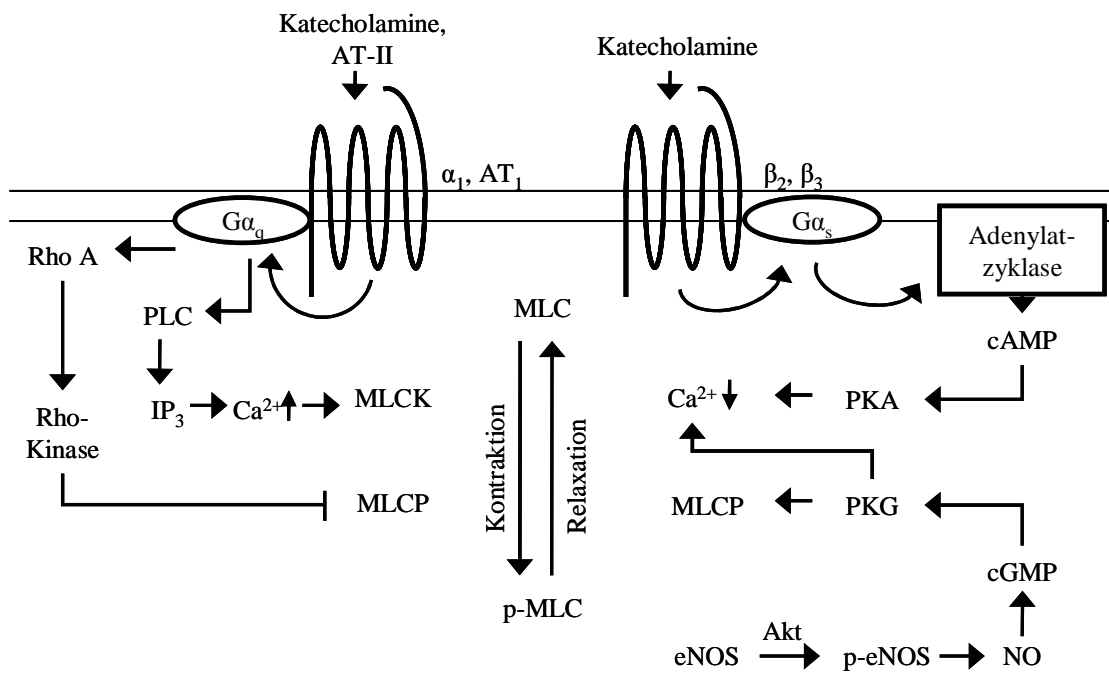


Abb. 1: Signaltransduktion in VSMC (modifiziert nach Hennenberg et al., 2008). Die Phosphorylierung der MLC durch die MLCK führt zur Kontraktion. Eine Dephosphorylierung der phosphorylierten leichten Kette des Myosins (p-MLC) durch die MLCP bewirkt eine Relaxation. Die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren oder Angiotensin $_1$ (AT $_1$)-Rezeptoren führt über Guaninnukleotidbindendes Protein α_q (G_{α_q} -Protein) zur Aktivierung unterschiedlicher kontraktiler Signalwege: Die PLC führt über IP_3 zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und damit zur Aktivierung der MLCK. RhoA führt über den Effektor Rho-Kinase zu einer Hemmung der MLCP und ebenfalls zur verstärkten Kontraktion. β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren aktivieren relaxierende Signalwege. Via G_{α_s} -Protein wird die Adenylatzyklase aktiviert, es kommt zur vermehrten Produktion von cAMP. Der cAMP-Effektor PKA führt zu einer Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel. Ein zweiter relaxierender Signalwege führt via NO und Bildung von cGMP zur Aktivierung des Effektors PKG, welche die MLCP aktiviert und die Ca^{2+} -Spiegel senkt. NO wird durch die eNOS freigesetzt, welche über die Phosphorylierung durch Akt aktiviert wird.

1.2.2 Forward-Flow-Theorie

Entsprechend der Forward-Flow-Theorie bewirkt eine Dilatation der Gefäße des Splanchnikusgebiets in der Leberzirrhose einen gesteigerten Pfortaderzufluss und damit einen erhöhten Druck im portalen Gefäßsystem. Die massive splanchnische Vasodilatation führt mit dem gleichzeitigen Abfall des systemischen Gefäßwiderstands und des mittleren arteriellen Drucks (MAD) sowie über die Erhöhung des Herzzeitvolumens zu einem als hyperdynamie Zirkulationsstörung bezeichneten Bild. Im Zuge dieser effektiven systemischen Hypovolämie tritt eine Aktivierung vasoaktiver Systeme über Barorezeptoren auf. Es kommt zur Wasser- und Natriumretention durch die Niere, Expansion des Plasmavolumens und Aszitesbildung. Eine renale Vasokonstriktion führt zur Entstehung des hepatorenalen Syndroms mit progressiver Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (Blendis und Wong, 2001). Wie in Abbildung 2 dargestellt, bewirken die

reaktiv erhöhten Spiegel von Katecholaminen und Angiotensin II (AT-II) zusätzlich eine vermehrte intrahepatische Vasokonstriktion, welche den portalen Hypertonus unterhält (Bosch und Garcia-Pagan, 2000; Heller et al., 2005). Neben der Dilatation extrahepatischer Gefäße wird auch eine mesenteriale Gefäßneubildung als Ursache für den erhöhten Pfortaderzufluss diskutiert (Colle et al., 2008; Geerts et al., 2006).

Der splanchnischen Vasodilatation liegen zwei wesentliche Mechanismen zugrunde. Zum einen ist in der Zirrhose die endotheliale Produktion von NO im Splanchnikusgebiet deutlich gesteigert. Zum anderen ist das Ansprechen des mesenterialen Gefäßbetts auf endogene Vasokonstriktoren wie Noradrenalin oder AT-II vermindert. Diesen Zustand bezeichnet man als vaskuläre Hypokontraktilität (Hennenberg et al., 2008; MacGilchrist et al., 1991; Schepke et al., 2001; Sogni et al., 1996).

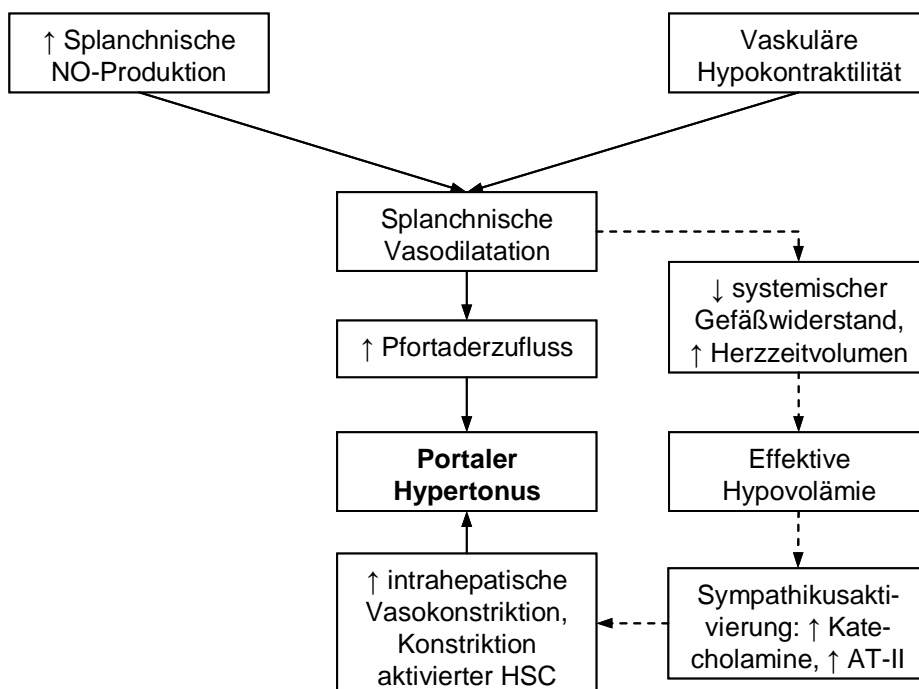


Abb. 2: Forward-Flow-Theorie zur Pathogenese des portalen Hypertonus und der hyperdynamen Zirkulation in der Leberzirrhose (modifiziert nach Bosch und Garcia-Pagan, 2000). Durch eine gesteigerte Produktion von NO und eine Hypokontraktilität der splanchnischen Gefäße in der Leberzirrhose kommt es zu einer massiven splanchnischen Vasodilatation, welche über einen erhöhten Pfortaderzufluss zum portalen Hypertonus führt. Gleichzeitig entsteht eine effektive Hypovolämie, die gekennzeichnet ist durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen, einen verminderten systemischen Gefäßwiderstand und eine konsekutive Aktivierung des Sympathikus. Diese bedingt eine intrahepatische Vasokonstriktion und verstärkt den portalen Hypertonus zusätzlich.

Die splanchnische NO-Überproduktion in der Zirrhose ist einerseits auf eine gesteigerte Expression der konstitutiven eNOS zurück zu führen. Die Expression der eNOS wird durch – aufgrund der vermehrten Durchblutung erhöhte – Scherkräfte und im Rahmen der bakteriellen Translokation freigesetzte Endotoxine, sowie durch den Tumornekrosefaktor α (TNF α) getriggert (Hori et al., 1998; Lopez-Talavera et al., 1995; Wiest et al., 1999). Andererseits kommt es über eine vermehrte Aktivierung der eNOS durch Akt-vermittelte Phosphorylierung des Enzyms (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Morales-Ruiz et al., 2003) oder durch eine erhöhte Produktion von stimulierenden Kofaktoren (Tetrahydrobiopterin und Hitzeschockprotein 90) (Ai et al., 2003; Schmidt und Alp, 2007; Shah et al., 1999b) zur gesteigerten NO-Freisetzung. Daneben sind in der Leberzirrhose auch zirkulierende Hormone, die zur eNOS-Aktivierung führen (z. B. Endocannabinoide und Adrenomedullin), in erhöhter Konzentration zu finden (Batkai et al., 2001; Domenicali et al., 2005; Genesca et al., 1999).

Neben NO spielen weitere Mediatoren wie Kohlenmonoxid, Prostazyklin, Glucagon, Gallensäuren oder Neuropeptide eine Rolle in der splanchnischen Vasodilatation der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus (Bosch und Garcia-Pagan, 2000).

Die im Splanchnikusgebiet der Leberzirrhose vorliegende vaskuläre Hypokontraktilität wurde auch in isolierten Gefäßen, das heißt ohne den Einfluss zirkulierender Vasodilatoren, und in endothelfreien Präparaten sowie nach Hemmung der eNOS und in eNOS knock-out Mäusen nachgewiesen (Heinemann et al., 1997; Heller et al., 1999; Iwakiri et al., 2002; Schepke et al., 2001). Hieraus begründet sich die Hypothese, dass in der portalen Hypertonie bei Leberzirrhose Defekte im Bereich der für die Gefäßkontraktion verantwortlichen Signalwege der extrahepatischen VSMC vorliegen. In der Zirrhose führen eine verminderte Aktivierung von RhoA und eine posttranskriptionelle Downregulation der Rho-Kinase zu einer erniedrigten Ca²⁺-Sensitivität und einem reduzierten Ruhetonus der splanchnischen VSMC (Trebicka et al., 2008). Ebenfalls zeigt sich in der Zirrhose eine reduzierte PLC-Aktivität, die zur Einschränkung der Ca²⁺-abhängigen Kontraktion führt (Hennenberg et al., 2008).

Insuffiziente kontraktile Signalwege und eine Überexpression relaxierender Signalwege in splanchnischen VSMC bei Leberzirrhose bewirken somit eine persistierende splanchnische Vasodilatation und die Entstehung eines portalen Hypertonus (Abbildung 3).

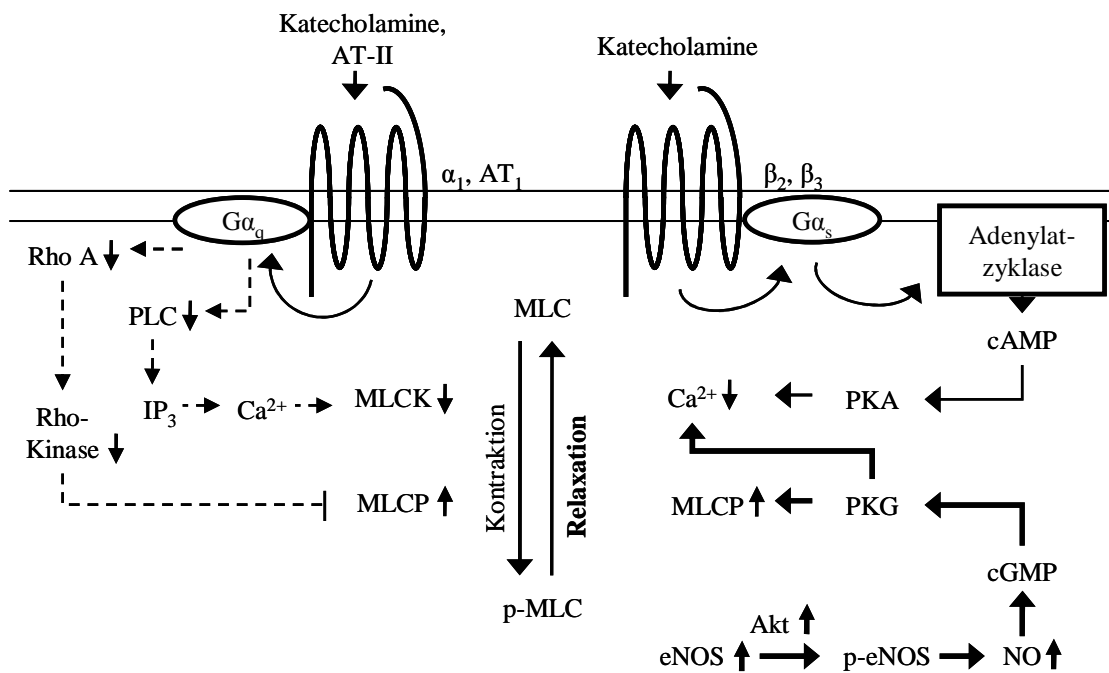


Abb. 3: Veränderung der Signaltransduktion in splanchnischen VSMC bei Leberzirrhose (modifiziert nach Hennenberg et al., 2008; Trebicka et al., 2008). Eine reduzierte Aktivität der PLC führt zu verminderten Spiegeln von IP_3 und intrazellulärem Ca^{2+} . Somit nimmt die Aktivierung der MLCK und die für die Kontraktion wichtige Phosphorylierung der MLC ab. Die Herabregulation von RhoA und Rho-Kinase bewirkt eine verminderte Hemmung der MLCP. Durch die vermehrte Dephosphorylierung der MLC wird die Relaxation verstärkt. Die vermehrte Expression der eNOS und die gesteigerte Aktivität der Akt führen zu erhöhten Spiegeln des Vasodilatators NO. NO führt so zu einer erhöhten Produktion von cGMP und zur verstärkten Aktivierung des Effektors PKG. Durch die folgende gesteigerte Aktivierung der MLCP und die vermehrte Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kommt es zu einer verstärkten Relaxation. Der relaxierende Signalweg über die Aktivierung der Adenylatzyklase durch $G\alpha_s$ -Protein und die nachfolgende Produktion von cAMP und Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch den cAMP-Effektor PKA bleibt in der Leberzirrhose unbeeinflusst.

1.2.3 Backward-Flow-Theorie

Nach der Backward-Flow-Theorie wird eine intrahepatische Widerstandserhöhung als initialer Pathomechanismus des portalen Hypertonus in der Leberzirrhose angesehen. Sekundär folgt – über eine Aktivierung vasoaktiver Systeme – eine Widerstandserniedrigung in der Splanchnikusregion. Morphologisch gesehen werden die Sinusoidalgefäße der zirrhotischen Leber wesentlich durch Parenchymveränderungen wie die zunehmende perivaskuläre Fibrose, Kollagenablagerungen im Dissé-Raum und Ausbildung von Regeneratknoten mechanisch eingengt (Shibayama und Nakata, 1985). Seit Bhatnagar und Grossman (1985) bewiesen, dass Vasodilatoren den intrahepatischen Perfusionswiderstand deutlich senken können, hat sich zudem die Annahme einer dynamischen Komponente der intrahepatischen Widerstandserhöhung etabliert, welche über kontraktile Elemente – insbesondere den aktivierten HSC – vermittelt wird und pharmakologisch beein-

flussbar ist. Überaktivierte kontraktile und insuffiziente relaxierende Signalwege in den aktivierten HSC der zirrhotischen Leber spielen hier eine bedeutende Rolle (Abbildung 4, Abbildung 5).

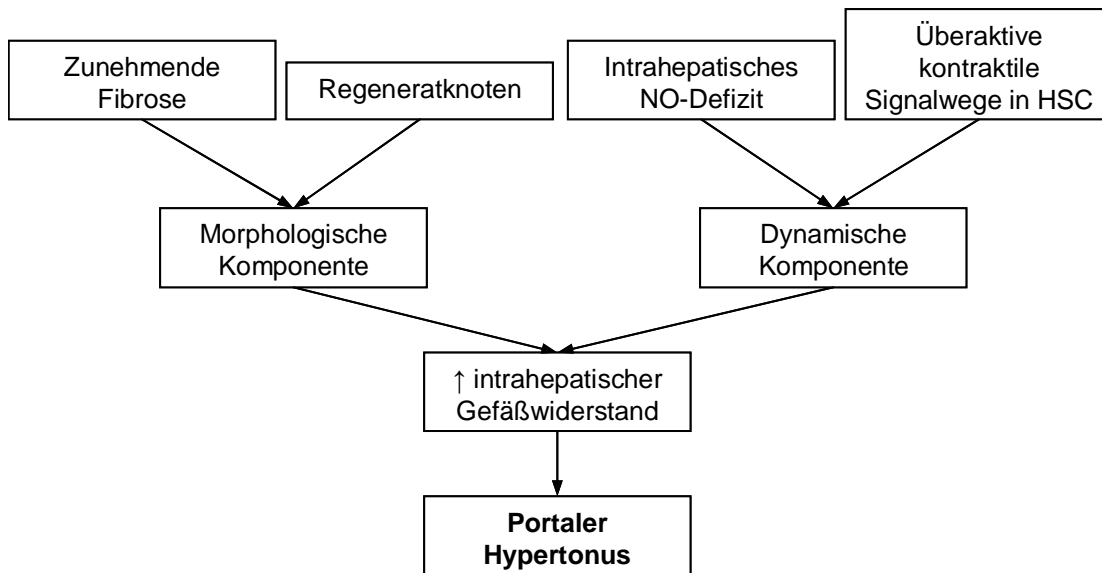


Abb. 4: Backward-Flow-Theorie zur Pathogenese des portalen Hypertonus in der Leberzirrhose (modifiziert nach Bosch und Garcia-Pagan, 2000; Trebicka et al., 2007). Morphologisch gesehen tragen die zunehmende Fibrose und die Bildung von Regeneratknoten zur Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstands bei. Die dynamische Komponente der Gefäßwiderstandserhöhung in der zirrhotischen Leber besteht aus einem intrahepatischen Defizit an vasodilatatorischem NO und überexprimierten kontraktile Signalwegen in aktivierten HSC.

Die aktivierten Sternzellen der Leber sind in der Lage, den Gefäßtonus der Sinusoide über ihre Zellausläufer perizytenähnlich zu regulieren (Pinzani, 1995; Reynaert et al., 2008; Zhang et al., 1994). Sie sind die für die Regulation des intrahepatischen Widerstands wichtigsten Zellen (Reynaert et al., 2008). Aktivierte HSC reagieren auf eine Vielzahl vasoaktiver Stimuli, so auch auf die gegenregulatorisch zur effektiven Hypovolämie vermehrt ausgeschütteten Substanzen Noradrenalin, AT-II und Endothelin-1 (Bataller et al., 1997; Kawada und Inoue, 1994; Kawada et al., 1992; Nicholls et al., 1985). Analog zu VSMC ist die Kontraktion der HSC vor allem α_1 -AR-vermittelt und kommt über eine Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins zustande (Kolodney et al., 1999; Sancho-Bru et al., 2006). In den HSC überwiegen dabei Ca^{2+} -unabhängige Mechanismen wie der RhoA/Rho-Kinase-Weg (Kolodney et al., 1999; Laleman et al., 2007a; Sancho-Bru et al., 2006).

In der portalen Hypertonie ist das Ansprechen der Leber und insbesondere der HSC auf zirkulierende Vasokonstriktoren wie Katecholamine erhöht – im Gegensatz zu den Gefäßen des Splanchn-

nikus (Ballet et al., 1988; Graupera et al., 2003). Dies ist einerseits über die Aktivierung und Proliferation der HSC in der Zirrhose zu erklären, wodurch das kontraktile Potential der Leber vergrößert wird. Eine vermehrte Expression von α_1 -AR in aktivierten HSC trägt darüber hinaus zur erhöhten Kontraktilität bei (Sancho-Bru et al., 2006). Andererseits findet sich eine Überaktivierung des RhoA/Rho-Kinase-Signalwegs in aktivierten HSC (Trebicka et al., 2007; Zhou et al., 2006). Dadurch wird die MLCP vermehrt gehemmt, was zu einer verstärkten Kontraktion und somit zur Erhöhung des intrahepatischen Widerstands führt (Abbildung 5).

Des Weiteren herrscht innerhalb der Mikrozirkulation der zirrhotischen Leber ein relatives Defizit an endogenem NO (Gupta et al., 1998), welches am wahrscheinlichsten auf eine verminderte Aktivität der konstitutiv exprimierten eNOS zurück zu führen ist. Da die Expression dieses Enzyms in der Leberzirrhose jedoch unverändert ist, werden Störungen in der posttranslationalen Regulation vermutet (Shah et al., 1999a; Zafra et al., 2004). So wurde gezeigt, dass die Expression des eNOS-Inhibitors Caveolin-1 in der Zirrhose erhöht (Shah et al., 1999a) und die Aktivität der eNOS-aktivierenden Akt vermindert ist (Morales-Ruiz et al., 2003). Die vermehrte Aktivität von RhoA in zirrhotischen Lebern führt zur Instabilität der eNOS Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) und somit zur Abnahme der eNOS-Aktivität (Laufs und Liao, 1998; Trebicka et al., 2007). Eine in der Zirrhose verminderte Aktivität der Superoxiddismutase bewirkt über den mangelnden Abbau reaktiver Sauerstoffspezies eine geringere Bioverfügbarkeit von NO. Oxidativer Stress, wie er bei Zellschädigungen im Rahmen der Leberzirrhose vorliegt, verstärkt diesen Mechanismus (Van De Casteele et al., 2003). Eine verminderte Verfügbarkeit von NO hat eine reduzierte Aktivität des Effektors PKG zur Folge, wodurch die MLCP-vermittelte Relaxation gehemmt und die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel weniger stark gesenkt werden (Abbildung 5). Nachgewiesene Effekte von NO-Donatoren auf die Kontraktilität von HSC lassen eine Lokalisation oben aufgeführter Defekte der vasodilatatorischen Signalwege in aktivierten HSC vermuten (Fiorucci et al., 2001; Yu et al., 2000).

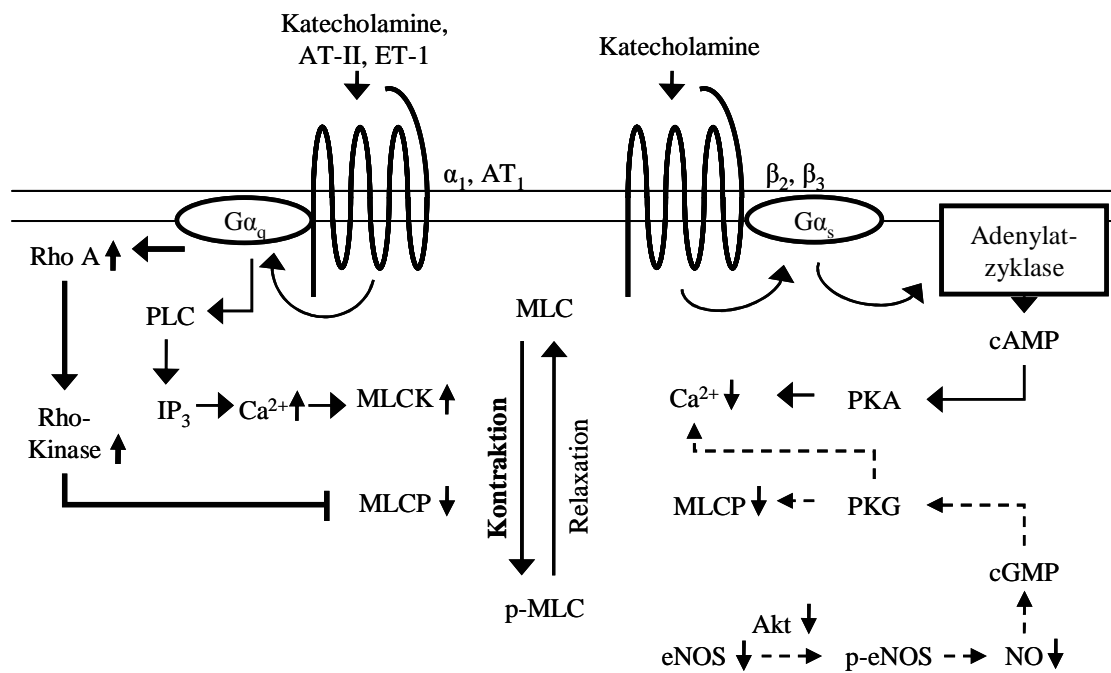


Abb. 5: Veränderungen der Signaltransduktionswege in aktivierten hepatischen Sternzellen bei Leberzirrhose (modifiziert nach Trebicka, 2007). Die vermehrte Expression von RhoA und die gesteigerte Rho-Kinase-Aktivität bewirken eine vermehrte Hemmung der MLCP. Durch die verminderte Dephosphorylierung der MLC wird die Kontraktion verstärkt. Die reduzierte Expression der eNOS und die verminderte Aktivität der Akt führen zu stark erniedrigten Spiegeln des Vasodilatators NO. Es kommt zu einer reduzierten Produktion von cGMP und zur verminderten Aktivierung des Effektors PKG. Durch die folgende reduzierte Aktivierung der MLCP und die verminderte Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kommt es zu einer verstärkten Kontraktion. Der relaxierende Signalweg über die Aktivierung der Adenylatzyklase durch $G\alpha_s$ -Protein und die nachfolgende Produktion von cAMP und Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch den cAMP-Effektor PKA bleibt in aktivierten Sternzellen unbeeinflusst, ebenso wie der zur Kontraktion führende Signalweg über die PLC, IP_3 und intrazellulärem Ca^{2+} .

1.3 Therapie des portalen Hypertonus und seiner Komplikationen

Aus den oben beschriebenen Pathomechanismen ergeben sich verschiedene Optionen für die Therapie des portalen Hypertonus in der Leberzirrhose und die Prävention und Behandlung von Komplikationen wie der akuten oberen gastrointestinalen Blutung oder des Aszites.

1.3.1 Senkung des portalen Zustroms

Die massive splanchnische Vasodilatation spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose. Eine Vielzahl von Medikamenten führt über eine splanchnische Vasokonstriktion zur Senkung des portalen Zustroms und somit des Pfortaderdrucks. Unselektive β -Adrenozeptor-Antagonisten (β -Blocker) wie Propranolol, Nadolol und Timolol bewirken über die Blockade kardialer β_1 -AR eine Reduktion der Herzauswurfleistung

und über die Blockade vasodilatatorisch wirkender β_2 -AR eine splanchnische Vasokonstriktion. So führen sie über eine Senkung des splanchnischen Blutflusses zu einer deutlichen Abnahme des portalen Hypertonus und des Drucks insbesondere in ösophagealen Varizen (Feu et al., 1993; Mastai et al., 1987). Sie spielen seit mehr als 20 Jahren die Hauptrolle in der medikamentösen Behandlung des Pfortaderhochdrucks und der Primär- und Sekundärprophylaxe einer Varizenblutung.

Vasopressin gilt als potentester splanchnischer Vasokonstriktor, ist jedoch bei einer begleitenden starken systemischen Vasokonstriktion mit Komplikationen wie myokardialen oder zerebralen Ischämien behaftet (Bosch et al., 1988; D'Amico et al., 1995). Aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils und der einfacheren Applikation wird heute bevorzugt das synthetische Vasopressin-Analogon Terlipressin verwendet. Somatostatin und seine Analoga Octreotid und Lanreotid senken den portalen Druck infolge einer selektiven splanchnischen Vasokonstriktion und somit ohne unerwünschte Effekte auf den systemischen Gefäßwiderstand und den MAD (Kravetz et al., 1988). Sowohl Terlipressin als auch Somatostatin-Analoga werden in der Therapie der akuten Varizenblutung und des hepatorenalen Syndroms angewandt (D'Amico et al., 1995; Grunhage et al., 2008). Aufgrund ihrer hohen Kosten und fehlender oraler Applikationsmöglichkeit sind sie jedoch für eine langfristige medikamentöse Therapie des portalen Hypertonus ungünstig.

Des Weiteren existiert eine Vielzahl erfolgsversprechender experimenteller Strategien zur Beeinflussung der extrahepatischen Hämodynamik und Senkung des portalen Zustroms. So führt die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch den AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan bei Patienten mit portalem Hypertonus zu einem deutlichen Abfall des HVPG bei jedoch begleitender systemischer Hypotension (Schneider et al., 1999). Im Tierversuch zeigte sich, dass Losartan in niedriger Dosierung den portalen Druck über eine Erhöhung des splanchnischen Gefäßwiderstands senkt, möglicherweise vermittelt durch ein gesteigertes Ansprechens auf α_1 -AR-Agonisten wie Methoxamin. Außerdem zeigte sich eine Verbesserung der Nierenfunktion (Heller et al., 2003; Heller et al., 2005). Der Urotensin-II-Rezeptorantagonist Palosuran senkt den portalen Druck über eine Steigerung der Expression von RhoA und Rho-Kinase in mesenterialen Gefäßen von gallengangligierten (BDL) Ratten (Trebicka et al., 2008). Auch die Rolle von Gallensalzen als endogene vasorelaxierende Substanzen und ihre Beeinflussung durch Ursodesoxycholsäure werden untersucht (Baruch et al., 1999; Schiedermaier et al., 2000). Da das Vollbild der

hyperdynamen Zirkulationsstörung durch splanchnische und systemische Vasodilatation bei gleichzeitiger Expansion des Plasmavolumens gekennzeichnet ist, spielen auch eine salzarme Diät und Diuretika wie Spironolacton eine Rolle in der Therapie des portalen Hypertonus (Garcia-Pagan et al., 1994). Weitere, klinisch bislang jedoch nicht erfolgreiche Ansätze beinhalten antibiotische und antiinflammatorische Maßnahmen wie die Gabe von Norfloxacin, des TNF α -Inhibitors Thalidomid oder Zyklooxygenase-2-Hemmern (Austin et al., 2004; Hennenberg et al., 2009; Laleman et al., 2007b; Lopez-Talavera et al., 1996; Rasaratnam et al., 2003).

1.3.2 Senkung des intrahepatischen Widerstands

Der erhöhte intrahepatische Widerstand in der Leberzirrhose trägt entscheidend zur Entstehung und Aufrechterhaltung des portalen Hypertonus bei. Die Antagonisierung des übermäßigen intrahepatischen Vasokonstriktoreinflusses konnte bisher allerdings wenig klinische Erfolge zeigen. So führt der α_1 -AR-Antagonist Prazosin zu einer Senkung des Pfortaderdrucks, jedoch nicht ohne unerwünschte systemische Nebenwirkungen wie dem Abfall des MAD und des Herzzeitvolumens und der reflektorischen Aktivierung endogener vasoaktiver Systeme (Albillos et al., 1995). Carvedilol vereint unspezifische β -AR-antagonistische und α_1 -AR-antagonistische Eigenschaften und führt zu einer stärkeren Senkung des HVPG als Propranolol, allerdings ebenfalls begleitet von einer deutlichen systemischen Hypotension (Banares et al., 1999). Clonidin, ein zentraler α_2 -AR-Antagonist, sorgt für eine starke Senkung des HVPG bei deutlichem Abfall des MAD (Albillos et al., 1992).

Eine weitere, bisher jedoch ebenfalls wenig erfolgreiche Strategie zur Senkung des Widerstands im Lebergefäßbett besteht in der Steigerung der intrahepatischen NO-Verfügbarkeit, zum Beispiel mittels NO-Donatoren wie Nitroglycerin oder Isosorbitmono- (ISMN) und -dinitrat. ISMN führt zu einer Senkung des portalen Drucks, allerdings mit erheblichen systemischen Nebenwirkungen. Die Kombination mit Propranolol mildert diese Nebenwirkungen bei gleichzeitig stärkerem pfortaderdrucksenkenden Effekt (Garcia-Pagan et al., 2003; Gournay et al., 2000). Leberspezifische NO-Donatoren sind trotz viel versprechender Strategien wie an Ursodesoxycholsäure gekoppeltes NO, Gentransfer oder Transkriptionenhancer bisher klinisch gescheitert (Biecker et al., 2008; Fiorucci et al., 2001; Van de Casteele et al., 2002; Yu et al., 2000).

Eine Behandlung mit Statinen scheint sowohl die überaktivierten vasokonstriktorischen Signalwege als auch die verminderten NO-Spiegel in der zirrhotischen Leber zu beeinflussen und bildet damit ein neues, erfolversprechendes Therapiekonzept. Atorvastatin steigert in zirrhotischen

Lebern von BDL-Ratten die Aktivierung der eNOS über eine Hemmung des RhoA/Rho-Kinase-Signalwegs und eine Phosphorylierung von Akt. Somit senkt es den intrahepatischen Widerstand ohne die systemische Hämodynamik zu verändern. Damit geht eine Abnahme der Kontraktionsfähigkeit der aktivierten Sternzellen einher (Trebicka et al., 2007). Klinische Studien zeigen ähnliche Ergebnisse. So führt Simvastatin bei Patienten mit Leberzirrhose über eine eNOS-Aktivierung zur erhöhten NO-Freisetzung und Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands (Zafra et al., 2004). Die beobachtete Senkung des HVPG ist dabei additiv zur Wirkung von unselektiven β -Blockern (Abralles et al., 2009).

Schließlich gelingt auch mittels invasiver und operativer Methoden eine Senkung des intrahepatischen Widerstands, z.B. durch einen transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunt (TIPS) oder durch operative Shuntverbindungen. Da die TIPS-Anlage heute sicher und komplikationsarm durchgeführt werden kann und gute Erfolge zeigt, hat sie die Bedeutung operativer Shunts zurück gedrängt. Die wichtigsten Komplikationen sind Stentverschlüsse sowie eine Verschlechterung der Leberfunktion und der hepatischen Enzephalopathie nach Shuntanlage. Eine TIPS-Anlage ist zurzeit in der Behandlung von therapierefraktärem Aszites, in der akuten Therapie einer Varizenblutung und bei rezidivierenden Blutungen trotz medikamentöser oder Bandligatur-Prophylaxe indiziert (Bosch und Garcia-Pagan, 2003; Heller und Sauerbruch, 2007).

1.3.3 Klinisch etablierte Strategien zur Senkung des portalen Hypertonus

Der klinische Erfolg oben aufgeführter Strategien wird in der von ihnen bewirkten relativen Abnahme des portalen Drucks bemessen. Der Zusammenhang zwischen einer erfolgreichen Senkung des Pfortaderhochdrucks und einer Abnahme der Häufigkeit von Komplikationen wie der lebensbedrohlichen Varizenblutung gilt als erwiesen (Garcia-Tsao et al., 1985). In der Primär- und Sekundärprophylaxe einer Varizenblutung besteht daher das Therapieziel in einer Senkung des HVPG auf unter 12 mmHg (Garcia-Tsao et al., 1985; Groszmann et al., 1990) oder um mindestens 20 % des Ausgangswerts (Feu et al., 1995). Nach neueren Untersuchungen scheint eine unmittelbare Senkung des HVPG nach Therapiebeginn um mindestens 10% des Ausgangswerts den besten Voraussagewert für die Verhinderung einer ersten Varizenblutung darzustellen (Villanueva et al., 2009).

Unspezifische β -Blocker stellen zurzeit die einzige medikamentöse, klinisch erfolgreiche Möglichkeit dar, den portalen Druck langfristig zu senken. Die Senkung des intrahepatischen Widerstands durch Nitrate wie ISMN gelingt ohne systemische Nebenwirkungen ebenfalls nur in Kom-

bination mit β -Blockern. Unspezifische β -Blocker reduzieren die Bildung von Ösophagusvarizen nicht (Groszmann et al., 2005), senken aber das Risiko einer akuten ersten Blutung von 40 % auf 20 % (Pascal und Cales, 1987) und das Risiko einer Zweitblutung von 63 % auf 42 % (Lebrec et al., 1981). Sie wirken sich zudem positiv auf die Mortalität aus (Poynard et al., 1991). Aufgrund von Kontraindikationen, Nebenwirkungen oder Nichtansprechen wird jedoch nur bei 50 % der mit β -Blockern behandelten Leberzirrhosepatienten das oben genannte Therapieziel erreicht (Feu et al., 1993; Garcia-Pagan et al., 1992; Poynard et al., 1991).

Ein Grund für das Nichtansprechen auf eine Medikation mit β -Blockern könnte deren Dosierung ausschließlich anhand ihrer Wirkung auf Herzfrequenz oder MAD und nicht anhand der klinischen Toleranz sein. Auch der Schweregrad der Leberzirrhose und das Ausmaß an Kollateralen- bzw. Varizenbildung wirken sich auf den klinischen Effekt der β -Blockade aus. Daneben sind Polymorphismen der Rezeptorgene für das interindividuell unterschiedliche Ansprechen verantwortlich. So wurden für den β_2 -AR vier Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) nachgewiesen. Ein Drittel aller Kaukasier sind homozygot für Gly16-Glu/Gln27 und weisen ein erhöhtes Ansprechen auf Vasodilatoren auf. Dadurch kommt es in dieser Patientengruppe bei der Behandlung mit Propranolol zu einem ausgeprägteren Abfall der Herzfrequenz, der Herzauswurfleistung und des hepatischen Blutflusses und zu einem stärkeren Anstieg des systemischen und intrahepatischen Gefäßwiderstands als in compound heterozygoten Menschen (Turnes et al., 2006). Eine besondere Bedeutung kommt außerdem der Downregulation und Desensibilisierung der β_1 - und β_2 -AR bei vermehrter Sympathikusaktivität zu. In der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus führen erhöhte Spiegel zirkulierender Katecholamine zur Desensibilisierung vor allem der β_2 -AR im Splanchnikusgebiet und damit zu einem verminderten Ansprechen dieser Rezeptoren auf unspezifische β -Blocker. Bislang ist außerdem unklar, wie sich die Beeinflussung anderer Adrenozeptoren – vor allem die der β_3 -AR – durch unspezifische β -Blocker auf die Hämodynamik bei portalem Hypertonus auswirkt.

Therapeutisch gleichwertig mit unspezifischen β -Blockern in der Primär- und Sekundärprävention der Varizenblutung ist bisher nur die invasive endoskopische Bandligatur, die jedoch mit geringgradig erhöhten Raten an intrainterventionellen Komplikationen verbunden ist (Schepke et al., 2004). Die Rolle des TIPS in der langfristigen Prophylaxe einer Rezidivblutung wird derzeit evaluiert. Zusammenfassend wird deutlich, dass außer interventionellen bzw. operativen Verfahren mit ihren erhöhten Komplikationsraten nur die Behandlung mit unspezifischen β -Blockern zu

einer langfristigen Senkung des portalen Hypertonus führt; hier wird allerdings nur in einer unbefriedigenden Anzahl behandelter Patienten das Therapieziel erreicht. Diese Daten zeigen, dass weitere medikamentöse Optionen zur Senkung des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose dringend nötig sind.

1.4 Das adrenerge System und die Bedeutung von β_3 -Adrenozeptoren

1.4.1 Das adrenerge System

Der Begriff adrenerges System bezeichnet die körpereigenen Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in ihrer Funktion als Neurotransmitter und endokrine Hormone. Katecholamine vermitteln ihre zelluläre Wirkung über die Bindung an 7-Transmembranrezeptoren, den sogenannten Adrenozeptoren. Die Bezeichnung Adrenozeptor wurde von Ahlquist (1948) eingeführt, der zwei verschiedene Subtypen dieses Rezeptors aufgrund des gegensätzlichen Ansprechens glatter Muskelzellen auf Katecholaminderivate differenzierte: α - und β -AR. Entsprechend ihrer spezifischen intrazellulären Signaltransduktion, vermittelt über heterotrimere G-Proteine, teilt man die AR heute in drei Gruppen ein (Bylund et al., 1994): α_1 -, α_2 - und β -AR.

α_1 -AR werden in drei Subtypen unterteilt (α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR) und finden sich vor allem in VSMC und in der Urethra (Guimaraes und Moura, 2001; Hein und Kobilka, 1997). Wie bereits dargestellt, sind sie G_{α_q} -Protein gekoppelt (Abbildung 1) und führen via IP_3 und Ca^{2+} zur Aktivierung der MLCK sowie über RhoA und Rho-Kinase zur Hemmung der MLCP und somit zur Kontraktion (Bylund et al., 1994; Hennenberg et al., 2008; Pfitzer, 2001).

α_2 -AR werden in $\alpha_{2A/D}$ -, α_{2B} - und α_{2C} -AR unterteilt und finden sich im zentralen Nervensystem. Dort reduzieren sie die allgemeine Sympathikusaktivität und führen zur systemischen Hypotension. Präsynaptische α_2 -AR senken die Freisetzung von Noradrenalin (Guimaraes und Moura, 2001; Hein und Kobilka, 1997). α_2 -AR hemmen über das inhibitorische G_{α_i} -Protein die Adenylatzyklase und reduzieren die Bildung von intrazellulärem cAMP (Bylund et al., 1994). Gleichzeitig werden über G_{α_0} -Protein spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geschlossen, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt.

Die Gruppe der β -AR wird unterteilt in β_1 -, β_2 - und β_3 -AR (Lands et al., 1967), welche jeweils über eine G_{α_s} -Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase das intrazelluläre cAMP erhöhen. cAMP aktiviert die PKA, die abhängig von der jeweiligen Zielzelle unterschiedliche Effektorproteine phosphoryliert (Guimaraes und Moura, 2001). In einigen Zellen und unter

bestimmten Bedingungen können β -AR auch an $G\alpha_i$ -Proteine koppeln (Gauthier et al., 1996; Johnson, 1998). β_1 -AR befinden sich vor allem in Herzmuskelzellen und wirken dort über die Öffnung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen positiv chronotrop, dromotrop und inotrop (Brodde, 1993). Außerdem erhöhen sie in der Niere die basale Reninfreisetzung und können in bestimmten Gefäßen wie den zerebralen und den Koronararterien vasodilatatorisch wirken (Bylund et al., 1994; Guimaraes und Moura, 2001; Rozec und Gauthier, 2006). Wie in Abbildung 1 gezeigt, senken β_2 -AR cAMP-/PKA-vermittelt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration – über eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms über die Zytoplasmamembran, eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und eine Steigerung der Ca^{2+} -Sequestration. Dabei werden sie durch Adrenalin bis zu 100fach stärker aktiviert als durch Noradrenalin. β_2 -AR wirken vaso- und bronchodilatatorisch und entspannen die Muskulatur von Uterus, Ductus deferens und Gastrointestinaltrakt (Bylund et al., 1994; Johnson, 1998). Sie sind die für die splanchnische Vasodilatation bedeutsamsten Rezeptoren (Guimaraes und Moura, 2001).

1.4.2 Charakterisierung und Expression des β_3 -Adrenozeptors

Ende der 1980er Jahre wurde durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass neben den bis dahin bekannten β_1 - und β_2 -AR ein weiterer β -Adrenozeptortyp mit anderen pharmakologischen Eigenschaften existiert, welcher zunächst als atypischer β -AR bezeichnet wurde (Bond und Clarke, 1988). Dieser Rezeptortyp wird durch Noradrenalin aktiviert und besitzt eine höhere Resistenz gegenüber einer Blockade durch α - und unspezifische β -AR-Antagonisten (z.B. Propranolol) als die bis dahin bekannten β -AR. 1989 schließlich gelang es Emorine et al., den humanen β_3 -AR zu klonieren (Emorine et al., 1989); es folgte der Nachweis in Ratten (Granneman et al., 1991) und anderen Spezies. Zwischen den verschiedenen Spezies weisen β_3 -AR eine hohe Homologität von 80–90 % auf (Walston et al., 1997), zwischen Mensch und Ratte sind es 79 % (Rozec und Gauthier, 2006). Im Gegensatz zu β_1 - und β_2 -AR verfügt das β_3 -AR-Gen über Introns. Somit entstehen durch alternatives Splicing verschiedene Rezeptorisoformen, die sich in ihrer Expression unterscheiden und über diverse pharmakologische Eigenschaften und Signaltransduktionswege verfügen (Evans et al., 1999; Hutchinson et al., 2002).

Da der β_3 -AR nicht über eine Phosphorylierungsstelle für die PKA und die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 verfügt, ist er gegenüber einer Agonisten-induzierten Desensibilisierung und auch einer langfristigen Downregulation resistenter als β_1 - und β_2 -AR (Lafontan, 1994; Rozec und Gauthier, 2006). Dies führt dazu, dass die β_3 -AR-Antwort bei gesteigerter bzw. dauerhafter

Aktivierung des Sympathikus, z.B. in der Herzinsuffizienz oder der Leberzirrhose, erhalten bleibt, während die β_1 - und β_2 -AR-Antwort abnimmt (Gauthier et al., 2007).

Die Expression der β_3 -AR wird auf mRNA-Ebene reguliert und hängt von Spezies und jeweiligem Zelltyp ab (Nantel et al., 1994). Beim Menschen wurde β_3 -AR-mRNA bislang vor allem in braunem und weißem Fettgewebe nachgewiesen (Berkowitz et al., 1995; Krief et al., 1993), aber auch in ventrikulären Kardiomyozyten (Gauthier et al., 1996), der A. thoracica interna (Rozec et al., 2005), den Koronararterien (Dessy et al., 2004), dem GIT (Berkowitz et al., 1995; Krief et al., 1993; Roberts et al., 1997), der Prostata (Berkowitz et al., 1995) und in gesunden sowie obstruierten Harnblasen (Nomiya und Yamaguchi, 2003). Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen ein Epitop des nativen β_3 -AR beim Menschen zeigten ferner eine Expression des Rezeptorproteins in atrialen (Chamberlain et al., 1999) und ventrikulären (Moniotte et al., 2001) Kardiomyozyten, der A. thoracica interna (Rozec et al., 2005), den Koronararterien (Dessy et al., 2004), gastrointestinalen Arterien (Anthony et al., 1998), dem Corpus Cavernosum (Cirino et al., 2003), der Gallenblase (Chamberlain et al., 1999; Guillaume et al., 1994), dem enterischen Nervensystem (Cellek et al., 2007), sowie in Kolon, Prostata, Skelettmuskel und Fettgewebe (Chamberlain et al., 1999).

Bei Ratten wurden β_3 -AR bisher in Fettgewebe, Kolon, Ileum (Evans et al., 1996; Granneman et al., 1991) aortalen Endothelzellen (Rautureau et al., 2002), portalvenösen Myozyten (Viard et al., 2000) und der Harnblase (Seguchi et al., 1998) nachgewiesen.

1.4.3 Agonisten des β_3 -Adrenozeptors

Die Pharmakologie der β_3 -AR ist komplex und noch nicht in allen Details bekannt. Zudem wird ihre Erforschung dadurch erschwert, dass es in Bezug auf Expression, Funktion und Pharmakologie eine hohe Variabilität sowohl zwischen den verschiedenen Spezies und Geweben als auch zwischen den Rezeptorisoformen gibt (Rozec und Gauthier, 2006).

Körpereigene Katecholamine aktivieren β_3 -AR erst in höheren Konzentrationen als β_1 - und β_2 -AR (Lafontan, 1994; Strosberg und Pietri-Rouxel, 1996), wobei Noradrenalin eine 30-fach höhere Affinität zum β_3 -AR aufweist als Adrenalin (Hoffmann et al., 2004). Isoprenalin wirkt gleichermaßen an β_1 -, β_2 - und β_3 -AR (Hoffmann et al., 2004). Daneben gibt es zwei Klassen selektiver Agonisten des β_3 -AR mit jeweils hoher Affinität und Potenz: Phenylethanolamine und Aryloxypropanolamine. Zur ersten Klasse gehören BRL 37344 (BRL), SR 58611A und CL 316 243;

zur zweiten Klasse CGP 12177A (CGP) und Cyanopindolol (Gauthier et al., 2007). BRL gilt als funktionell selektiver β_3 -AR-Agonist (Hoffmann et al., 2004). Die Effektivität und Potenz von CGP als Agonist am β_3 -AR variiert je nach Expressionsgrad der β_3 -AR stark, wie es auch bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihren Agonisten beobachtet wird (Rozec und Gauthier, 2006; Vrydag und Michel, 2007).

1.4.4 Antagonisten des β_3 -Adrenozeptors

Die zur Senkung des portalen Hypertonus verwendeten unselektiven β -Blocker Propranolol und Nadolol zeigen nur eine geringe Affinität zum β_3 -AR und hemmen ihn erst in hohen Dosen (Rozec und Gauthier, 2006), vergleichbar mit dem neueren unspezifischen β - und α_1 -AR-Antagonisten Carvedilol (Hoffmann et al., 2004). Bupranolol hemmt β_1 -, β_2 - und β_3 -AR in gleichem Maße (Hoffmann et al., 2004). Spezifische β_3 -AR-Antagonisten sind SR 59230A (SR), L 748,328 und L 748,337 (Gauthier et al., 2007). SR stellt dabei einen bei Nagern selektiven β_3 -AR-Antagonisten dar (Viard et al., 2000).

1.4.5 Physiologie und Signaltransduktion des β_3 -Adrenozeptors

Durch pharmakologische Studien konnten den β_3 -AR vielfältige Funktionen zugeschrieben werden. Sie tragen zu Lipolyse und Thermogenese in Adipozyten bei (Arch und Kaumann, 1993; Strosberg und Pietri-Rouxel, 1996), hemmen die Kontraktilität von Kolon und Ileum (Cellek et al., 2007) sowie des Herzmuskels (Gauthier et al., 1996), wirken bronchodilatatorisch (Martin und Advenier, 1995) und tokolytisch (Rozec und Gauthier, 2006) und relaxieren die glatte Muskulatur im Corpus cavernosum (Cirino et al., 2003).

In Gefäßen führt die Aktivierung von β_3 -AR zu einer Vasodilatation; im Vergleich zu β_1 - und β_2 -AR jedoch mit einer langsameren Kinetik und starken Variabilität zwischen den Spezies und den jeweiligen Gefäßbetten (Rautureau et al., 2002). Shen et al. (1996) zeigten, dass BRL und CL 316 243 in Ratten und Hunden eine periphere Vasodilatation vor allem in Haut und Fettgewebe bewirken, begleitet von einer systemischen Hypotension mit Reflextachykardie. Diese in-vivo-Effekte auf Gefäßtonus und MAD konnten mit Mikrosphären-Untersuchungen in anästhesierten Ratten (Rozec und Gauthier, 2006) und bei Primaten (Shen et al., 1996) jedoch nicht bestätigt werden. Auch beim Menschen hatte eine 28-tägige Behandlung mit dem β_3 -AR-Agonisten L 796,568 keine Auswirkungen auf den systemischen Blutdruck oder die Herzfrequenz (Larsen et al., 2002). Eine in vitro Vasodilatation durch β_3 -AR-Agonisten wurde bislang in der

isolierten thorakalen Aorta und der A. carotis von Ratten, der A. pulmonalis von Hunden, den koronaren Mikroarterien von Mäusen und Menschen sowie den humanen plazentaren Arterien und der A. thoracia interna nachgewiesen (Rozec und Gauthier, 2006).

Wie alle β -AR koppeln auch β_3 -AR an $G\alpha_s$ -Protein und aktivieren die Adenylatzyklase, was zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel führt (Abbildung 1). Die bisher untersuchten Signalwege der β_3 -AR unterscheiden sich jedoch stark zwischen den verschiedenen Spezies und Geweben. Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen Splicevarianten des β_3 -AR an diverse Signaltransduktionswege koppeln (Hutchinson et al., 2002). In Adipozyten sind β_3 -AR $G\alpha_s$ -Protein-gekoppelt und bewirken eine cAMP-abhängige Phosphorylierung von Zielproteinen durch die PKA (Hollenga et al., 1991). In ventrikulären Myozyten, in denen β_3 -AR-Agonisten über eine negative inotrope Wirkung verfügen, sind sie $G\alpha_{i/0}$ -gekoppelt und führen über NO und cGMP zu einer Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, vermittelt durch die cGMP-abhängige PKG (Brixius et al., 2006; Gauthier et al., 1996; Zhang et al., 2005). Da jedoch die β_3 -AR-vermittelte negative Inotropie auch nach eNOS-Inhibition nachgewiesen wurde, werden zusätzliche Signalwege wie die $G\alpha_{i/0}$ -vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase oder die Aktivierung von Wachstums- bzw. metabolischen Signalwegen, zum Beispiel über mitogenaktivierte Proteinkinasen, diskutiert (Gauthier et al., 2007; Gerhardt et al., 1999). Des Weiteren wurden von Kohout et al. (2001) eine Kopplung überexprimierter β_3 -AR in den Herzen transgener Mäusen an $G\alpha_s$ -Protein und eine Aktivierung der Adenylatzyklase nachgewiesen. Es ist bekannt, dass β_3 -AR in verschiedenen Zelltypen sowohl an $G\alpha_s$ als auch an $G\alpha_i$ koppeln (Strosberg, 1997). In diesen Modellen führt eine β_3 -AR-Aktivierung trotz inhibitorischer $G\alpha_i$ -vermittelter Effekte zu einer vermehrten Adenylatzyklase-Aktivität und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel (Kohout et al., 2001). Im humanen Corpus cavernosum erfolgt die β_3 -AR-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur über eine Endothel- und NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylzyklase und Erhöhung der intrazellulären Spiegel von cGMP bei gleichzeitiger Inhibition des RhoA/Rho-Kinase-Signaltransduktionswegs (Cirino et al., 2003).

Verschiedene Autoren haben ähnlich vielfältige Signalwege in der Vasorelaxation durch β_3 -AR nachgewiesen. Bei der Ratte ist die Relaxation der thorakalen Aorta über endotheliale β_3 -AR und über eine $G\alpha_{i/0}$ -unabhängige, eNOS/cGMP-vermittelte Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen vermittelt (Rautureau et al., 2002; Trochu et al., 1999). Auch in der menschl-

chen A. thoracica interna und in den Koronararterien ist die β_3 -AR-vermittelte Vasorelaxation Endothel- und NO-abhängig und führt zur Öffnung von (zum Teil Ca^{2+} -abhängigen) K^+ -Kanälen (Dessy et al., 2004; Rozec et al., 2005). In der A. pulmonalis von Hunden und in menschlichen placentaren Arterien ist die Vasorelaxation durch β_3 -AR-Agonisten endothelunabhängig und begleitet von einer intrazellulären cAMP-Erhöhung (Rouget et al., 2006; Tamaoki et al., 1998). In den Myozyten der Pfortader werden $\text{G}\alpha_s$ -abhängig über eine cAMP/PKA-vermittelte Phosphorylierung L-Typ Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, die über lokale Ca^{2+} -Spitzen zur Öffnung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle führen. Durch die nachfolgende Hyperpolarisation werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geschlossen, wodurch es zur Relaxation kommt (Viard et al., 2000).

1.5 Fragestellung

1.5.1 Sind β_3 -Adrenozeptoren in den für den portalen Hypertonus relevanten Gefäßsystemen exprimiert?

Für den portalen Hypertonus sind eine Widerstandserhöhung im intrahepatischen Gefäßsystem und eine massive splanchnische Vasodilatation verantwortlich. Aufgrund der stark erhöhten zirkulierenden Katecholaminspiegel kommt den Adrenozeptoren (v.a. α_1 - und β_2 -AR) in der Zirrhose eine besondere Bedeutung für die Regulation des Gefäßtonus zu. Dass β_3 -AR vasodilatatorische Wirkungen vermitteln, ist bekannt. Die Expression von β_3 -AR in Leber und Splanchnikusgebiet bei Leberzirrhose wurde bislang jedoch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwiefern β_3 -AR in diesen Gefäßbetten bei gesunden Patienten bzw. Kontrolltieren sowie in der Leberzirrhose beim Mensch und im Tiermodell exprimiert sind. Da den aktivierten HSC eine tragende Rolle in der Regulation des intrahepatischen Widerstands in der Leberzirrhose zukommt, soll außerdem die Expression der β_3 -AR in primären Leberzellen und in aktivierten HSC untersucht werden.

1.5.2 Welche Rolle spielen β_3 -Adrenozeptoren in Bezug auf die Regulation des intrahepatischen und des splanchnischen Gefäßwiderstands?

Die zur Therapie des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose verwendeten unspezifischen β -Blocker hemmen in hohen Konzentrationen auch β_3 -AR. Da sie bei einem großen Teil der behandelten Patienten aufgrund von Kontraindikationen, Nebenwirkungen oder Nichtansprechen nicht zu den definierten Therapiezielen führen, sind neue medikamentöse Strategien zur Senkung des portalen Drucks dringend erforderlich. In vitro und in situ sollen die Effekte β_3 -AR-wirksamer

Substanzen auf die Kontraktion aktivierter HSC und auf den intrahepatischen Widerstand bestimmt werden. Hämodynamische Versuche sollen die Wirkung auf den Pfortaderdruck und die splanchnische und hepatische Durchblutung in vivo klären.

1.5.3 Über welche Signaltransduktionswege vermitteln β_3 -Adrenozeptoren ihre Wirkung in den untersuchten Gefäßsystemen?

In der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus kommt defekten bzw. überaktivierten intrazellulären Signalwegen sowohl in HSC als auch in splanchnischen VSMC eine besondere pathophysiologische Bedeutung zu. Bisher ist nur unzureichend bekannt, über welche intrazellulären Signalsysteme β_3 -AR ihre vasodilatatorische Wirkung entfalten. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Signaltransduktionswege in aktivierten HSC und in splanchnischen VSMC durch β_3 -AR-Agonisten aktiviert werden und inwiefern sich diese in der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Rahmen orthotoper Lebertransplantationen wurden bei sechs Patienten mit alkoholisch bedingter Leberzirrhose Gewebeproben aus Leber und A. hepatica entnommen. Als Kontrollen dienten Proben aus der A. hepatica der nichtzirrhotischen Spender ($n = 6$) sowie Proben nichtzirrhotischer Lebern, die bei Leberresektionen ($n = 6$) gewonnen wurden. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme schockgefroren. Keiner der Patienten hatte zuvor Katecholamine, Angiotensin-converting-enzyme-Inhibitoren oder AT₁-Rezeptorantagonisten eingenommen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Ethikkommission der Universität Bonn 202/01).

2.2 Tiermodelle

Für die unten beschriebenen Versuche wurden insgesamt 154 männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Um modellabhängige Unterschiede in Bezug auf Lebergewicht, hepatischen Gefäßwiderstand und splanchnische Durchblutung auszugleichen, wurden zwei verschiedene Modelle des sinusoidalen portalen Hypertonus bei Leberzirrhose eingesetzt. Durch das Modell der Gallengangsligatur wird eine sekundäre biliäre Zirrhose erzeugt, durch die Tetrachlorkohlenstoff(CCl₄)-Inhalation eine chronisch-toxische Zirrhose (Wiest, 2007). Bei den BDL-Ratten ähnelt die extrahepatische Gefäßsituation der einer Leberzirrhose, bei den CCl₄-Ratten ist das intrahepatische Gefäßsystem dem einer Zirrhose am ähnlichsten (Abralde et al., 2006). Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV NRW, 9.93.2.10.35.07.035).

2.2.1 Gallengangsligatur

62 Tiere mit einem Körpergewicht von 180–220 g zum Zeitpunkt der Versuche wurden der Gallengangsligatur unterzogen (Heller et al., 2003; Trebicka et al., 2008). Hierfür wurde unter intramuskulärer Ketamin/Xylazin-Narkose (60 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland und 10 mg/kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) bei sterilen Bedingungen der Ductus hepaticus communis nach medianer Laparotomie mit einem resorbierbaren Faden (Monocryl 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) möglichst weit proximal zweifach ligiert und anschließend zwischen

den Ligaturen reseziert. Die abdominale Muskelschicht sowie das Fell wurden danach separat mit fortlaufenden Nähten (Monocryl 5-0 bzw. Mersilene 0, Ethicon GmbH) verschlossen. Fünf Wochen nach der Ligatur war bei allen Tieren eine Leberzirrhose mit Aszites ausgebildet, so dass die Versuche durchgeführt werden konnten.

Als Kontrolle dienten 12 gleichaltrige Tiere, welche einer Sham-Operation unterzogen wurden. Hierbei wurde unter Ketamin-Narkose (60 mg/kg KG Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH und 10 mg/kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) das Abdomen operativ eröffnet, der Gallengang freigelegt, jedoch weder ligiert noch reseziert. Nach 10 Minuten wurde die Wunde verschlossen wie oben beschrieben.

2.2.2 Inhalation von Tetrachlorkohlenstoff

Für dieses Modell wurden 38 Tiere mit einem Körpergewicht von 100–120 g jeweils zweimal wöchentlich einer CCl₄-Begasung (2 l/min; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit zunehmender Expositionszeit ausgesetzt (Sieber et al., 1993). Um in diesem Modell die Entwicklung einer Zirrhose zu beschleunigen, wurde ab einer Woche vor Beginn der Inhalationen dem Trinkwasser der Ratten Phenobarbital (0,35 g/l Luminal-Injektionslösung, Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland) zugefügt. Dieses bewirkt über eine Enzyminduktion eine Steigerung der CCl₄-Toxizität. Nach 14 bis 16 Wochen entwickeln die Tiere eine mikronoduläre Zirrhose mit Pfortaderhochdruck. Sobald durch klinische Untersuchung ein Aszites festgestellt wurde, wurden die Ratten isoliert und erhielten für eine weitere Woche bis Versuchsbeginn keine weiteren Inhalationen sowie zusatzfreies Trinkwasser (Wiest und Groszmann, 2002).

Zur Kontrolle wurden hier 24 gesunde, unbehandelte Ratten gleichen Alters verwendet.

2.3 β_3 -Adrenozeptor-wirksame Substanzen

Für die physiologischen Versuche wurden verschiedene β_3 -AR-wirksame Substanzen verwendet (Hoffmann et al., 2004). CGP (CGP 12177A: 4-[3-[(1,1-Dimethylethyl)Amino]-2-Hydroxypropoxy]-1,3-Dihydro-2H-Benzimidazol-2-on) als unkonventioneller β -AR-Partialagonist mit β_3 -AR-agonistischen sowie β_1 -, β_2 - und in hohen Konzentrationen auch α_1 -AR-antagonistischen Eigenschaften, BRL (BRL 37344: (RS)-N-[(2S)-7-Ethoxycarbonylmethoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-naphth-2-yl]-(2S)-2-(3-Chlorophenyl)-2-Hydroethanamid-Hydrochlorid) als funktionell selektiver β_3 -AR-Agonist mit zusätzlicher α_1 -AR-antagonistischer Wirkung und SR (SR 59230A: (\pm)-(R*,R*)-[4-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-Hydroxyethyl]Amino]Propyl]Phenoxy] Azetat) als bei

Nagern selektiver β_3 -AR-Antagonist (alle genannten Substanzen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Die Substanzen wurden jeweils in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst. In einem Teil der Versuche wurden die Tiere mit dem unspezifischen β -Blocker Propranolol (Dociton-Injektionslösung, mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland) vorbehandelt, um so eine ausschließliche Wirkung der oben aufgeführten Medikamente auf β_3 -AR sicher zu stellen. Für eine α_1 -AR-unabhängige Wirkung von BRL wurde dieses ferner mit dem selektiven α_1 -AR-Antagonisten Prazosin (Prazosin-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) koinkubiert.

2.4 Gewebeproben

In jeder Gruppe (BDL-, Sham-operierte, CCl₄- und Kontrollratten) wurden sechs unbehandelte Tiere für die Entnahme von Gewebeproben verwendet. Es wurden jeweils die A. mesenterica superior und Leberproben entnommen und schockgefroren.

Um die Aktivität von Rho-Kinase und PKG nach β_3 -AR-Stimulation zu bestimmen, wurde fünf BDL-Ratten jeweils 0,5 mg CGP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in die Schwanzvene injiziert. Eine Stunde nach Applikation des β_3 -AR-Agonisten wurden den Tieren Leber und A. mesenterica superior entnommen und schockgefroren. Die Gefäße und Lebern von fünf BDL-Ratten, die nur NaCl 0,9 % (B. Braun Melsungen AG) als Lösungsmittel erhalten hatten, dienten als Kontrollen.

2.5 Zellisolation und -kultur: Primäre hepatische Sternzellen und Hepatozyten

Die Isolation von HSC und Hepatozyten aus den Lebern gesunder, männlicher Sprague-Dawley Ratten (n = 18) erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Laleman et al., 2007b; Trebicka et al., 2007). Die Ratten wurden hierfür mit Ketamin/Xylazin (60 mg/kg KG Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH und 10 mg/kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) anästhesiert und verstarben unter der Narkose.

Zur HSC-Gewinnung wurden nach in situ Perfusion der Leber mit Kollagenase Typ IV (Sigma, St. Louis, USA) und Pronase E (Merck, Darmstadt, Deutschland) die dispergierten Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Optiprep, Nycomed, Schweden) fraktioniert (Cassiman et al., 2001). Wie von Alpini et al. (1994) beschrieben, wird sich hierbei die im Vergleich zu anderen

Leberzellen geringe Dichte der HSC, entstehend durch ihren hohen Retinoidgehalt, zunutze gemacht. Die HSC bildeten bei einer Dichte von $< 1,053$ (9 % Optiprep, Axis-Shield, Oslo, Norway) die oberste Schicht der Zelldispersion, welche vorsichtig abpipettiert wurde. Die gewonnenen Zellen wurden auf unbeschichteten Plastik Kulturschalen ausgesät. Als Nährmedium diente William's-E-Medium, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 0,6 IU/ml Insulin, 2 mM Glutamin und 1 % antibiotisch-antimykotischer Lösung (Invitrogen, Merelbeke, Belgien). Das Medium wurde alle 48–72 Stunden gewechselt. Durch die Kultivierung der isolierten und angereicherten HSC auf unbeschichteten Plastikoberflächen werden diese *in vitro* aktiviert und transdifferenzieren zu Myofibroblasten, entsprechend der *in vivo* Aktivierung bei einer Leberschädigung. Die Existenz von myofibroblastenähnlichen Kulturen wurde durch Färbung mit Anti- α Smooth Muscle Aktin, Anti-Desmin und Synaptophysin gezeigt (Cassiman et al., 2001; Cassiman et al., 2002). Diese Kulturen wiesen stets eine Reinheit von über 95 % auf. Durch Trypanblaufärbung wurde eine Vitalität der HSC von über 95 % nachgewiesen. Die unten beschriebenen Versuche wurden zwischen der ersten und der dritten Passagierung (Splitverhältnis 1:3) durchgeführt, wobei stets drei voneinander unabhängige Zelllinien verwendet wurden.

Die Isolation der Hepatozyten erfolgte wie von Seglen (1976) beschrieben, mit leichten Abwandlungen des Protokolls. Die Leber wurde hierbei *in situ* mit Hanks' Balanced Salt Solution ohne Magnesium-Ionen oder Ca^{2+} (Invitrogen, Merelbeke, Belgien) perfundiert. Danach erfolgte die Reperfusion mit Kollagenase Typ IV (Sigma, Bornem, Belgien) bis zur Auflösung des Gewebes. Die Zellen wurden zentrifugiert, in William's-E-Medium (Invitrogen) resuspendiert und anschließend gefiltert. Danach wurden die gewonnenen Hepatozyten in mit 10 %igem FCS, 0,6 IU/ml Insulin, 2 mM Glutamin und 1 %iger antibiotisch-antimykotischer Lösung versetztem William's-E-Medium kultiviert (Invitrogen). Das Medium wurde alle 48–72 Stunden erneuert. Die Vitalität der Hepatozyten wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt und war größer 85 %. Die Reinheit der Zellen wurde im Phasenkontrastmikroskop (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) untersucht und war regelmäßig über 90 %.

2.6 Western-Blot-Analysen

Durch Western-Blot-Analysen wurde die Expression des β_3 -AR in Lebern und A. hepatica gesunder und zirrhotischer Patienten sowie in Lebern, primären Leberzellen, HSC und A. mesenterica superior gesunder, Sham-operierter, BDL- und CCl_4 -Ratten bestimmt.

Ebenfalls mit Hilfe der Western-Blot-Untersuchungen wurden die Signaltransduktionswege, die bei der Stimulation von β_3 -AR in Lebern und mesenterialen Gefäßen eine Rolle spielen, weitergehend untersucht. So wurde die Expression der $G\alpha_s$ - und $G\alpha_i$ -Untereinheiten der an den β_3 -AR-gekoppelten G-Proteine in den Lebern von gesunden, BDL- und CCl_4 -Ratten bestimmt. Nach Behandlung von BDL-Ratten mit dem β_3 -AR-Agonisten CGP bzw. nach Gabe von Lösungsmittel wurde die Aktivität der Rho-Kinase über die Phosphorylierung des endogenen Rho-Kinase-Substrats Moesin an der Stelle Thr558 bestimmt. Analog wurde die Aktivität des NO-Effektors PKG über die Phosphorylierung des endogenen PKG-Substrats vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein (VASP) an der Stelle Ser239 gemessen (Trebicka et al., 2007; Trebicka et al., 2008). Dazu wurden spezifische primäre Antikörper verwendet.

Alle entnommenen Gewebeproben wurden mit einem Tris/HCl-Puffer (25 mM Tris/HCl, 5 mM Ethylendiamin-Tetraacetatessig, 10 μ M Phenylmethansulfonyl-Flourid, 1 mM Benzamidin und 10 μ g/ml Leupeptin, alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH) homogenisiert. Mit Hilfe eines DC-Proteinbestimmungs-Kits (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad, München, Deutschland) erfolgte dann die Proteinbestimmung im Homogenat. Die Proteine wurden dafür mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (10 % Gele, 20 μ g Protein/Spalte) und anschließend auf Nitrocellulose-Membranen aufgebracht. Eine gleichmäßige Proteinverteilung wurde mit Hilfe der Ponceau-S-Färbung gezeigt. Die Membranen wurden blockiert und zuerst mit den jeweiligen primären Antikörpern für das entsprechende Protein, dann mit den korrespondierenden, Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Calbiochem, Merck KGaA) inkubiert. Die bei der Umsetzung der Substrate durch die Peroxidase entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines ECL-Detektionssystems (Amersham, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, England) aufgezeichnet. Die Intensitäten der resultierenden Banden auf jedem Blot wurden mit einem FLA-3000 Phosphoimager (Fuji-Film, Düsseldorf, Deutschland) densitometrisch verglichen (Trebicka et al., 2007; Trebicka et al., 2008).

Es wurden verschiedene primäre Antikörper für den Nachweis des β_3 -AR verwendet: B3AR12-A für den menschlichen β_3 -AR und B3AR13-A für den β_3 -AR von Ratten (beide ADI, San Antonio, USA) sowie sc-1472 (C-20) für den menschlichen β_3 -AR und sc-50436 (M-50) für den β_3 -AR von Ratten (beide Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Für den Nachweis von $G\alpha_i$ wurde anti- $G\alpha_i$ sc-7276 (T-19), für den Nachweis von phosphoryliertem Moesin (p-Moesin) anti-p-Moesin (Thr558) sc-12895 verwendet (alle Santa Cruz Biotechnology). Um VASP und $G\alpha_s$

nachzuweisen, wurden anti-VASP (pSer239) 16C2 und anti-G α_s -subunit, C-terminal (385-394) als primäre Antikörper benutzt (Calbiochem, Merck KGaA).

2.7 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden die mRNA-Spiegel der β_3 -AR in den Lebern aller Tiermodelle sowie in primären Leberzellen und HSC bestimmt. Die RNA wurde mit Hilfe eines RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den entnommenen Leberproben und Zelllösungen entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers isoliert. Bei jeder RT-PCR wurden 0,5 μ g RNA benutzt, wobei die RNA-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt wurden.

Vor der reversen Transkription wurden die Proben mit RQ1 RNase-freier DNase (Promega, Madison, USA) inkubiert, um enthaltene Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu entfernen. Für die reverse Transkription wurde MMLV-reverse-Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Primer und Sonden für die RT-PCR entstammten gebrauchsfertigen Paketen; für den β_3 -AR wurde ABI4331348 beta3ar-begi GeneX AbD verwendet (Applied Biosystems, Foster City, USA). Als endogene Kontrolle diente 18SrRNA (Applied Biosystems). Zur Durchführung der RT-PCR wurde ein ABI 7300 Sequenzdetektor verwendet (Applied Biosystems). Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 25 μ l, welches 12,5 μ l 2xTaqMan-PCR Master Mix (Applied Biosystems) und 2 μ l cDNA enthielt (Trebicka et al., 2007; Trebicka et al., 2008).

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurde die ΔC_T -Methode angewandt. Die Differenz zwischen der Anzahl der Zyklen (C_T) der Zielgene und der endogenen Kontrolle wurde als negatives ΔC_T angegeben, d.h. ein höheres $-\Delta C_T$ zeigt höhere mRNA-Spiegel an. Für jedes der Gene wurde ein Validierungsexperiment durchgeführt. Die Effizienzen der RT-PCR für das Zielgen und die endogene Kontrolle 18SrRNA waren dabei annähernd gleich (Trebicka et al., 2007; Trebicka et al., 2008).

2.8 Sternzellkontraktion

Die Fähigkeit der Sternzellen, eine dreidimensionale Kollagenmatrix zu kontrahieren, wurde mit Hilfe eines leicht modifizierten Protokolls von van Bockxmeer et al. (1984) untersucht (Laleman et al., 2007b; Trebicka et al., 2007). Diese Versuche wurden in Kooperation mit W. Laleman und F. Nevens von der Universität Leuven, Belgien durchgeführt. Aus Kollagen Typ I aus Rattenschwanzsehnen (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA) wurden hydratisierte Kolla-

gengelle vorbereitet, welche mit 1 N Natriumhydroxid und 10fach Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 4 °C auf physiologische Werte für Spannung und pH eingestellt wurden. Die Kollagenlösung wurde mit einer HSC-Suspension vermischt, so dass die Lösung letztendlich über eine Kollagenkonzentration von 1,5 mg/ml und 250.000 Zellen/ml verfügte. Ein Aliquot von 500 µl der Kollagenlösung wurde in jede einzelne Vertiefung einer 24 well-Gewebekulturplatte (Falcon, Meylan, Frankreich) eingebracht. Diese wurde nach einer Stunde mit Kulturmedium (10 % FCS, 1 ml/Vertiefung) bedeckt, um eine adäquate Gelierung sicher zu stellen. Die polymerisierte Kollagenmatrix mit den HSC blieb für 24 Stunden an die Kulturschale gebunden, wodurch eine mechanische Vorkontraktion erreicht wurde. Nach 24 Stunden wurden die stabilisierten Gitter zweimal mit einfachem PBS-Puffer gewaschen und danach mit 1 ml/Vertiefung serumfreiem Kulturmedium versetzt, welches 1 µCi $^3\text{H}_2\text{O}$ (Amersham Biosciences, Roosendaal, Niederlande) enthielt. Danach wurden die β_3 -AR-Agonisten CGP oder BRL bzw. CGP zusammen mit dem β_3 -AR-Antagonisten SR (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-5} M) zugefügt. Für die Versuche mit BRL erfolgte außerdem eine Koinkubation mit dem α_1 -AR-Antagonisten Prazosin (10^{-8} M), um eine zusätzliche α_1 -AR-antagonistische Wirkung von BRL auszuschließen.

Um eine Matrixkontraktion auszulösen, wurden die mechanisch vorgespannten Matrizen durch sanfte Entfernung des Gitters mit Hilfe einer Mikropipettenspitze gelöst (Relaxation). Die zellvermittelte Kontraktion wurde gemessen, indem nach 24 Stunden Kontraktion die relative Verteilung von $^3\text{H}_2\text{O}$ auf die Gelphase bzw. das umgebene Medium bestimmt wurde. So konnte das Volumen der Gelphase geschätzt werden. Dafür wurde die $^3\text{H}_2\text{O}$ -Aktivität von Medium und Gelphase in 10 ml Oszillationsflüssigkeit (Perkin Elmer, Waltham, USA) mit einem Beckman Flüssigkeitsszintillations Spektrometer (Beckman Instruments, Sydney, Australia) gemessen. Das Volumen vor Kontraktion und die relativen Veränderungen des Volumens (% Kontraktion) wurden mit Hilfe zellfreier Kontrollgele gemessen. In allen Experimenten wurden mindestens drei Sätze mit jeweils drei Kollagengittern mit HSC aus drei verschiedenen Sternzellisolationen benutzt.

2.9 cAMP-Spiegel nach β_3 -Adrenozeptor-Stimulation

Um die Signaltransduktionswege bei der Stimulation von β_3 -AR weitergehend zu untersuchen, wurden 250.000 HSC mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) in einer Dosis von 5×10^{-4} M und mit CGP (10^{-6} M) bzw. BRL (10^{-6} M) für jeweils eine Stunde

koinkubiert. 250.000 weitere HSC wurden als Kontrollen ausschließlich mit IBMX inkubiert. IBMX verhindert in diesem Versuchsaufbau den Abbau von cAMP. Anschließend wurde der cAMP-Spiegel mit Hilfe eines Enzym-Immunoassay-Kits (CA-201, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Für alle Versuche wurden mindestens drei Sätze verschiedener kulturaktiverter HSC verwendet.

2.10 In situ Leberperfusion

Um den unmittelbaren Einfluss des β_3 -AR-Agonisten CGP auf den hepatischen Gefäßwiderstand untersuchen zu können, wurde die Methode der in situ Leberperfusion angewandt (Trebicka et al., 2007; Wiest und Groszmann, 2002; Zhou et al., 2006). Hierfür wurden 12 CCl₄-Ratten mit klinisch etablierter Zirrhose, 12 gesunde Tiere und 15 BDL-Ratten verwendet. Alle Tiere waren seit dem Vorabend nüchtern, bei jedoch freiem Zugang zu Trinkwasser. Unter Ketamin/Xylazin-Narkose (60 mg/kg KG Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH und 10 mg/kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurden die Ratten in Rückenlage fixiert. Nach medianer Längslaparotomie unter sterilen Bedingungen wurde der Ductus choledochus frei präpariert und mit einem Polyethylen(PE)-10 Katheter (Everhardts, Meckenheim, Deutschland) kanüliert, um den Gallenfluss zu messen.

Anschließend wurden lockere Ligaturen (Seide schwarz, 3/0, Resorba, Nürnberg, Deutschland) um V. portae, A. hepatica communis, V. lienalis und den suprarenalen Teil der V. cava inferior gelegt. In die V. portae wurden 500 I.E. Heparin (Liquemin N 25000, 5000 I.E./ml, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) injiziert; sie wurde danach mit einem 14-G Teflonkatheter (Everhardts) kanüliert. Durch die Infusion von 37 °C warmer, oxygenierter (95 % O₂ und 5 % CO₂) und mit 2 IU Heparin versetzter Krebs-Henseleit-Lösung wurde die Ausblutung der Leber erreicht. Gleichzeitig wurden V. cava inferior (distal der losen Ligatur) und Aorta abdominalis eröffnet, um den Abfluss der Perfusats zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Thorakotomie durchgeführt und über das eröffnete rechte Atrium ein PE-Katheter (Everhardts) in den suprahepatischen Teil der V. cava inferior bis zur Mündung der V. hepatica eingeführt. Danach wurden alle Ligaturen angezogen und die Katheter in ein rezirkulierendes System eingebracht sobald das ausströmende Perfusat klar war. Mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 30 ml/min wurde nun die Leber mit der oben beschriebenen Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich über zwei an die Katheter angeschlossene Druckumwandler (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

abgenommen, an den Druckmesser (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) weitergeleitet und aufgezeichnet. Der hepatische Gefäßwiderstand ist dabei dem Ohmschen Gesetz folgend definiert als aufgezeichneter Druckgradient geteilt durch gemessenen Fluss.

Nach der Präparation folgte eine 20-minütige Ruhephase zur Stabilisierung der Perfusionsverhältnisse. Die Vitalität der perfundierten Leber und die Stabilität der Präparation wurden während dieser Periode stetig überwacht. Die Vitalität wurde anhand der äußeren Erscheinung der Leber, eines stabilen Perfusionsdrucks (Ausgangswert ± 1 mmHg), einer Gallenproduktion von mehr als $0,4 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{g})$ (außer bei BDL-Ratten) und eines konstanten Puffer-pH-Wertes von $7,4 \pm 0,1$ geprüft. Der Versuch wurde beendet, sobald eines dieser Kriterien nicht erfüllt war.

Nach der Stabilisierungsphase wurden dem Perfusat $0,1 \text{ mM}$ des α_1 -AR-Agonisten Methoxamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugefügt, um einen Anstieg des intrahepatischen Gefäßwiderstands zu erreichen. Nachdem der Perfusionsdruck ein Plateau erreichte, wurden dem Perfusat alle fünf Minuten der β_3 -AR-Agonist CGP in steigender Dosierung ($2,5\text{--}10 \text{ mg/l}$) bzw. Lösungsmittel zugegeben. Der Perfusionsdruck wurde weiterhin kontinuierlich aufgezeichnet und es wurde die relative Senkung des hepatischen Widerstands in Bezug auf die Dosierung des Agonisten bestimmt. Um die Rolle von NO bei der β_3 -AR-Stimulation zu untersuchen, wurde bei fünf BDL-Ratten zehn Minuten vor dem Methoxamin der unspezifische NOS-Inhibitor N ω -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) in einer Dosis von 1 nM dem Perfusat zugefügt (Trebicka et al., 2007), bevor auch diese Tiere mit CGP behandelt wurden.

2.11 Hämodynamische Untersuchungen in vivo

Alle unten beschriebenen Versuche wurden in Ketamin/Xylazin-Narkose (60 mg/kg KG Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH und 10 mg/kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) durchgeführt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Herzauswurfleistung und die regionalen Perfusionsverhältnisse den Werten von Ratten bei vollem Bewusstsein am besten entsprechen (Seyde und Longnecker, 1984). Es handelt sich hierbei um eine häufig verwendete Narkosemethode für hämodynamische Messungen beim Tiermodell des portalen Hypertonus (Heller et al., 2003; Van de Casteele et al., 2001). Die Ratten blieben ab dem Vorabend der Versuche nüchtern, bei freiem Zugang zu Trinkwasser.

2.11.1 Gruppeneinteilung und medikamentöse Behandlung

Für die hämodynamischen Versuche wurden die Tiere in sechs Gruppen eingeteilt (Tabelle 3). Sie wurden jeweils entweder mit dem β_3 -AR-Agonisten CGP oder mit dem β_3 -AR-Antagonisten SR intravenös (i.v.) behandelt. Einem Teil der Tiere wurde zudem über zwei Tage vor Versuchsbeginn oral Propranolol gegeben, ein unspezifischer β -Blocker, durch den alle drei Subtypen des β -AR besetzt werden, β_3 -AR jedoch wesentlich schwächer als β_1 - und β_2 -AR (Rozec und Gauthier, 2006). Die Medikamente wurden i.v. über einen Katheter in der V. femoralis oder oral über eine Magensonde verabreicht. Die untersuchten hämodynamischen Werte wurden jeweils vor und nach Gabe der β_3 -AR-wirksamen Substanzen gemessen.

Die sechs BDL-Ratten in Gruppe 1 wurden akut i.v. mit 0,5 mg/kg KG CGP behandelt. In Gruppe 2 wurden sieben BDL-Ratten akut mit 0,5 mg/kg KG SR i.v. behandelt. Analog wurden in Gruppe 3 bzw. 4 neun bzw. elf CCl₄-Ratten mit 0,5 mg/kg KG CGP bzw. 0,5 mg/kg KG SR behandelt. In Gruppe 5 bzw. 6 erhielten sieben bzw. fünf BDL-Ratten über 2 Tage vor Versuchsbeginn jeweils 1 mg/kg KG/Tag Propranolol. Ihnen wurden dann ebenfalls 0,5 mg/kg KG CGP bzw. 0,5 mg/kg KG SR akut i.v. verabreicht. Als Kontrollen dienten jeweils sechs unbehandelte Sham-operierte (Gruppen 1 und 2) bzw. gesunde (Gruppen 3 und 4) Tiere gleichen Alters sowie sechs ausschließlich mit Propranolol behandelte Tiere (Gruppen 5 und 6).

Gruppe	Behandlung
1 (BDL, n = 6)	0,5 mg/kg KG CGP 12177 i.v.
2 (BDL, n = 7)	0,5 mg/kg KG SR 59230A i.v.
3 (CCl ₄ , n = 9)	0,5 mg/kg KG CGP 12177 i.v.
4 (CCl ₄ , n = 11)	0,5 mg/kg KG SR 59230A i.v.
5 (BDL, n = 7)	2x1 mg/kg KG Propranolol oral plus 0,5 mg/kg KG CGP 12177 i.v.
6 (BDL, n = 5)	2x1 mg/kg KG Propranolol oral plus 0,5 mg/kg KG SR 59230A i.v.

Tab. 3: Gruppeneinteilung und Medikamentendosierungen bei den hämodynamischen Versuchen. Als Kontrollen dienten jeweils Sham-operierte (Gruppen 1 und 2) bzw. gesunde (Gruppen 3 und 4) Tiere gleichen Alters sowie ausschließlich mit Propranolol behandelte Tiere (Gruppen 5 und 6).

2.11.2 Messung des mittleren arteriellen Drucks und des Pfortaderdrucks

Nach Einsetzen der Ketamin/Xylazin-Narkose wurden die Ratten in Rückenlage fixiert. Über einen transversalen Schnitt wurde die linke Leiste freigelegt, um A. und V. femoralis aus der Ge-

fäß-Nerven-Scheide heraus zu präparieren. Die Gefäße wurden jeweils mit PE-50 Kathetern (0,28 x 0,61 mm, Everhardts) kanüliert, welche anschließend sorgfältig fixiert wurden.

Über eine mediane Längslaparotomie wurde die Peritonealhöhle unter sterilen Bedingungen eröffnet und die Dünndarmschlingen wurden herausgelagert. Mit einem angespitzten PE-50 Katheter (0,28 x 0,61 mm, Everhardts) wurde eine geeignete ileozökale Vene kanüliert, der Katheter bis zur V. portae vorgeschoben und dann sorgfältig am Eingang in das Gefäßbett fixiert (Seide schwarz 3/0, Resorba). Anschließend wurden die Darmschlingen in die Bauchhöhle zurückverlagert, Peritoneum und Muskelschicht gemeinsam mit einer fortlaufenden Naht verschlossen und das Fell genäht (Monocryl 5-0 bzw. Mersilene 0, Ethicon GmbH).

Danach wurden der arterielle Femoralkatheter und der Pfortaderkatheter über je einen Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) an das Druckmessgerät (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Der Nullpunkt wurde stets 1 cm oberhalb des Operationstischs geeicht. Der MAD und der Pfortaderdruck wurden kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum aufgezeichnet, wobei die Hämodynamik der Ratten sich spätestens 15 Minuten nach der Präparation stabilisierte.

2.11.3 Messung der Organperfusion mittels Farbmikrosphären

Die unmittelbare Wirkung der β_3 -AR-wirksamen Substanzen auf die Hämodynamik der Ratten wurde mit Hilfe der Mikrosphärentechnik bestimmt (Trebicka et al., 2008). Durch intraventrikuläre Injektion verschieden kolorierter Mikrosphären vor und nach der akuten Medikamentengabe können der Herzindex und die jeweiligen regionalen Blutflüsse bestimmt und verglichen werden. Diese Methode ist durch die Methode der radioaktiven Mikrosphären validiert, welche häufiger verwendet wird, aber die Nachteile radioaktiven Materials mit sich bringt (Hakkinen et al., 1995; Heller et al., 2003).

Zur Platzierung des intraventrikulären Katheters wurde über einen Kocher-Schnitt das rechte laterale Halsdreieck eröffnet und die Schilddrüse freipräpariert. Diese wurde nach oben geschlagen und der Musculus (M.) sternocleidomastoideus nach lateral verlagert. Der M. omohyoideus wurde gespalten, um so die Karotisscheide frei zu legen. Unter Schonung des Nervus vagus wurde die rechte A. carotis communis vorsichtig aus der Gefäß-Nerven-Scheide heraus präpariert und mit einem PE-50 (0,28 x 0,61 mm, Everhardts) Katheter kanüliert. Dieser wurde unter Mo-

nitorkontrolle des Pulses bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die intraventrikuläre Lage des Katheters wurde stets anhand der arteriellen Pulskurve und post mortem geprüft.

Zur Bestimmung der Herzauswurfleistung wurde zeitgleich zur Mikrosphären-Injektion eine Referenzblutprobe aus der A. femoralis als fiktives Organ entnommen. Der arterielle Femoral-katheter wurde dazu an eine Pumpe (Modell ,22', Syringe Pump, Harvard Apparatus, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen.

Nun wurden zur Messung der basalen Hämodynamik 300.000 gelbe Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton Technology, San Diego, USA; suspendiert in 300 µl 0,9 % NaCl mit 0,05 % Tween 80; Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Sigma Saint Louis, Missouri, USA) aufgezogen und die Pumpe für die Referenzblutprobe gestartet. Zehn Sekunden nach Beginn der Referenzblutentnahme wurden die Mikrosphären über einen Zeitraum von 30 Sekunden intraventrikulär injiziert. Die Entnahme der Referenzblutprobe wurde nach weiteren 20 Sekunden beendet, so dass insgesamt über eine Minute Referenzblut mit einer Flussrate von 0,65 ml/min entnommen wurde. Das Referenzblut wurde in 3,8 ml einer 5,26 M Kaliumhydroxid(KOH)-Lösung mit 0,5 ml Tween 80 (Sigma Saint Louis) gelöst und in Probenröhrchen asserviert. Die in der Spritze verbliebenen Mikrosphären wurden mit 0,9 % NaCl ausgespült und ebenfalls in Probenröhrchen überführt.

Nach Injektion der Mikrosphären stabilisierte sich die Hämodynamik der Ratten innerhalb von fünf Minuten, so dass mit der Medikamentengabe je nach Versuchsprotokoll begonnen werden konnte. Dreißig Minuten nach Gabe der jeweiligen Medikamentendosis wurden mit Hilfe violetter Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton Technology; 300.000 suspendiert in 300 µl NaCl mit 0,05 % Tween 80, Sigma Saint Louis) erneut die regionale Perfusion und der Herzindex wie oben beschrieben bestimmt. Zuletzt wurden 150.000 blaue Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton Technology; suspendiert in 200 µl NaCl mit 0,05 % Tween 80, Sigma Saint Louis) über 30 Sekunden in die Pfortader injiziert, um so den portosystemischen Shunt bestimmen zu können (Geraghty et al., 1989).

Nach weiteren 15 Minuten wurde die Ratte durch Injektion von 1 ml Ketamin (Ketanest S, Parke-Davis/Pfizer GmbH) intrakardial getötet. Milz, Nieren, Lungen, Gastrointestinaltrakt und Leber wurden entnommen, gewogen und jeweils mit 4 M KOH-Lösung mit 2 % Tween 80 (Sigma Saint Louis) in einer Konzentration von 14 ml/g Gewebe versetzt und in Probenröhrchen überführt. Alle Organproben sowie die Referenzblutproben wurden für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Die

mazarierten Proben wurden nach Vortexen durch Mikrofilter (Nucleopore Polycarbonate, Whatman International Limited, Madison, UK) filtriert, wobei sowohl das Probenröhrchen als auch die Filterapparatur stets sorgfältig mit 2 % Tween 80 Lösung (Sigma Saint Louis) nachgespült wurden und somit nur die Farbmikrosphären im Filter verblieben.

Die Filter wurden anschließend in Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von je 200 µl Dimethylformamid (N,N-Dimethylformamid, KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland) und Vortexen wurde die Farbe aus den Mikrosphären gelöst. Nach Zentrifugation der Proben bei 3000 g für fünf Minuten wurden die Absorptionsspektren der Überstände mit einem Photometer (HP 8453 X UV-Visible System, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) gemessen. Mit Hilfe der Software Triton 5 von Triton Technology (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) wurden anhand der Absorptionsdaten die Verteilung der jeweiligen Mikrosphären in den Organen, die Herzauswurfleistung und der portosystemische Shunt bestimmt.

Die Herzauswurfleistung berechnet sich dabei folgendermaßen:

$$HZV = \frac{Abs_M}{Abs_{RP}} \times 0,65;$$

wobei HZV das Herzzeitvolumen (ml/min) ist, Abs_M die Absorption der injizierten Mikrosphären und Abs_{RP} die Absorption der Referenzprobe. Der kardiale Index KI wird als Herzzeitvolumen pro 100 g KG angegeben. Der porto-systemische Shunt (PSS) wurde über folgende Formel errechnet:

$$PSS = \frac{Mikro_{Lu}}{Mikro_{LuLe}} \times 100;$$

wobei $Mikro_{Lu}$ die Anzahl der Mikrosphären in der Lunge und $Mikro_{LuLe}$ die Anzahl der Mikrosphären in Lunge und Leber ist.

Der splanchnische Perfusionsdruck ΔP_{Spl} wurde als MAD minus Pfortaderdruck definiert. Demnach ist der splanchnische Gefäßwiderstand R_{Spl} :

$$R_{Spl} = \frac{\Delta P_{Spl}}{Q_{Spl}};$$

wobei Q_{Spl} dem splanchnischen Blutfluss entspricht. Der hepatische Gefäßwiderstand R_{Hep} ist wie folgt definiert:

$$R_{Hep} = \frac{PP}{Perf_{GI} + Perf_{Milz} - PSS};$$

wobei PP der Pfortaderdruck, Perf_{GI} die gastrointestinale und Perf_{Milz} die Milzperfusion ist. Der systemische Gefäßwiderstand wurde als Verhältnis von MAD zur Herzauswurfleistung berechnet (Trebicka et al., 2008).

2.12 Statistische Analyse

Alle Daten sind in der Form Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Zum Gruppenvergleich wurden die Varianzanalyse (ANOVA) und der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde hierbei als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere

Das mittlere Körpergewicht der BDL-Ratten war im Vergleich zu Sham-operierten und CCl₄-Ratten deutlich niedriger. Das mittlere Körpergewicht der CCl₄-Ratten war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollratten. Das Lebergewicht der BDL-Ratten war gegenüber allen anderen Gruppen deutlich erhöht, das der CCl₄-Ratten jedoch gleich dem der Kontrollratten. In Bezug auf das Milzgewicht unterschieden sich beide Modelle signifikant von den Kontrollgruppen; bei den BDL-Ratten war das Milzgewicht auch im Vergleich zu den CCl₄-Ratten signifikant erhöht (Tabelle 4). Die Mortalität lag in beiden Gruppen zirrhotischer Tiere unter 15 %.

	Körpergewicht (g)	Leber (g)	Milz (g)
Sham und Kontrollen (n = 54)	387 ± 8	16,0 ± 0,5	0,70 ± 0,04
CCl₄ (n = 38)	443 ± 16 *	15,9 ± 0,9	1,60 ± 0,16 *
BDL (n = 62)	359 ± 8 * †	24,2 ± 1,4 * †	2,10 ± 0,08 * †

Tab. 4: Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM.

* p < 0,05 vs. Sham und Kontrollen

† p < 0,05 vs. CCl₄

3.2 Protein- und mRNA-Expression der β_3 -Adrenozeptoren in der Leber

In den Western-Blot-Analysen zeigte sich bei Verwendung zweier verschiedener Antikörper eine signifikant erhöhte Proteinexpression von β_3 -AR in zirrhotischen im Vergleich zu gesunden menschlichen Lebern (Abbildung 6A). Die hepatische Proteinexpression der β_3 -AR war auch in beiden tierischen Zirrhosemodellen (BDL und CCl₄) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen signifikant erhöht (Abbildung 6B,C). Zusätzlich war die Proteinexpression der β_3 -AR in HSC 14 Tage nach Aktivierung, also zum Zeitpunkt der vollständigen Transdifferenzierung, signifikant erhöht im Vergleich zu Hepatozyten bzw. HSC sieben Tage nach Aktivierung (Abbildung 6F).

Mit Hilfe der RT-PCR-Untersuchungen war in den Lebern von Sham-operierten und gesunden Ratten keine β_3 -AR-mRNA nachzuweisen. In den Lebern zirrhotischer Tiere (sowohl BDL als auch CCl₄) waren die β_3 -AR-mRNA-Spiegel erhöht (Abbildung 6D). Bei der Untersuchung der primären Leberzellen zeigte sich die niedrigste Konzentration an β_3 -AR-mRNA in den Hepato-

zyten. In kulturaktivierten HSC wurden mit zunehmender Aktivierung und Transdifferenzierung deutlich steigende Spiegel von β_3 -AR-mRNA nachgewiesen. Diese waren 14 Tage nach Beginn der Isolation und Aktivierung im Vergleich zu Tag 7 noch einmal um etwa das 16fache gesteigert (Abbildung 6E).

3.3 Expression der β_3 -Adrenozeptoren in splanchnischen Gefäßen

Auch in der A. hepatica als Teil des splanchnischen Gefäßbetts war bei Patienten mit Leberzirrhose die β_3 -AR-Expression im Vergleich zu Gefäßen gesunder Probanden signifikant erhöht (Abbildung 7A). Bei Ratten unterschied sich die Proteinexpression der β_3 -AR zwischen den beiden Tiermodellen. In der A. mesenterica superior von CCl₄-Ratten zeigte die Western-Blot-Untersuchung im Vergleich zu den Gefäßen der Kontrolltiere keinen signifikanten Unterschied in der Expression des β_3 -AR. Allerdings ließ sich eine Tendenz in Richtung erhöhter Proteinexpression nachweisen (Abbildung 7C). Dagegen war die Proteinexpression der β_3 -AR in den Mesenterialarterien der BDL-Ratten im Vergleich zu den Gefäßen Sham-operierter Tiere signifikant gesteigert (Abbildung 7B).

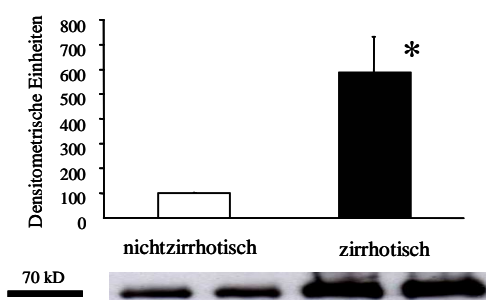
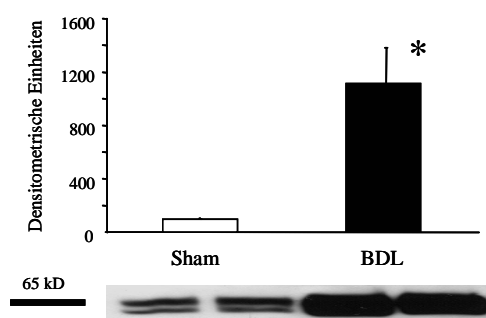
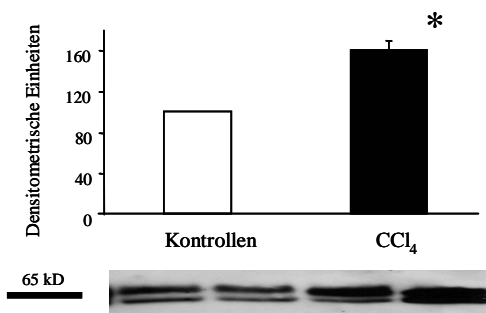
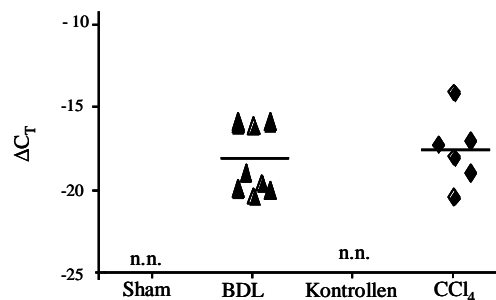
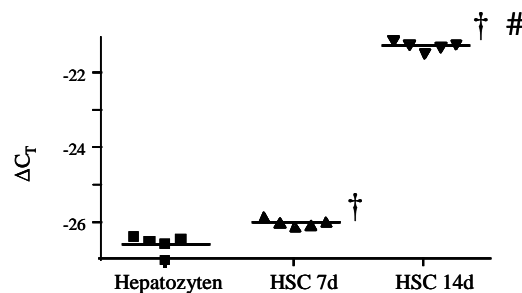
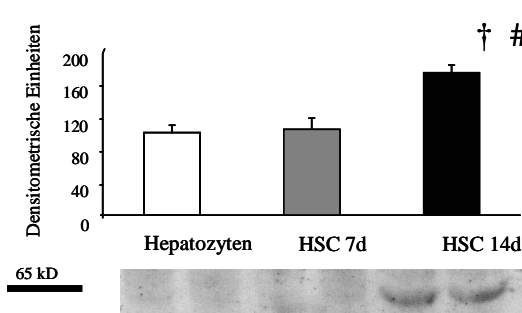
A Hepatische β_3 -AR Proteinexpression, Mensch**B** Hepatische β_3 -AR Proteinexpression, Ratte**C** Hepatische β_3 -AR Proteinexpression, Ratte**D** Hepatische β_3 -AR mRNA-Spiegel**E** Zelluläre β_3 -AR mRNA-Spiegel**F** Zelluläre β_3 -AR Proteinexpression

Abb. 6: Hepatische Proteinexpression der β_3 -AR bei Zirrhosepatienten (A) und in zirrhosischen BDL-(B) und CCl₄-(C) Ratten im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen, bestimmt durch Western-Blot-Analysen. β_3 -AR-mRNA-Spiegel in Leberproben zirrhosischer BDL- und CCl₄-Ratten im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen (D) sowie in primären Hepatozyten und HSC 7 bzw. 14 Tage nach Aktivierung (E), bestimmt durch quantitative RT-PCR und korrigiert anhand der endogenen Kontrolle 18SrRNA. β_3 -AR-Proteinexpression in primären Hepatozyten und HSC 7 bzw. 14 Tage nach Aktivierung (F), bestimmt durch Western-Blot-Analysen. Für die Leberproben wurde ein Minimum von n = 6 Tieren pro Gruppe verwendet, für die Zellen n = 5 pro Gruppe. In den Western Blots wird jeweils die relative densitometrische Quantifizierung der Experimente dargestellt (Mittelwerte \pm SEM), wobei die Werte der Kontrollen auf 100 densitometrische Einheiten gesetzt wurden. Außerdem werden repräsentative Western Blots gezeigt.

* p < 0,01 vs. nichtzirrhosischer Kontrollen/Sham/Kontrollen

† p < 0,03 vs. Hepatozyten

p < 0,001 vs. HSC 7d

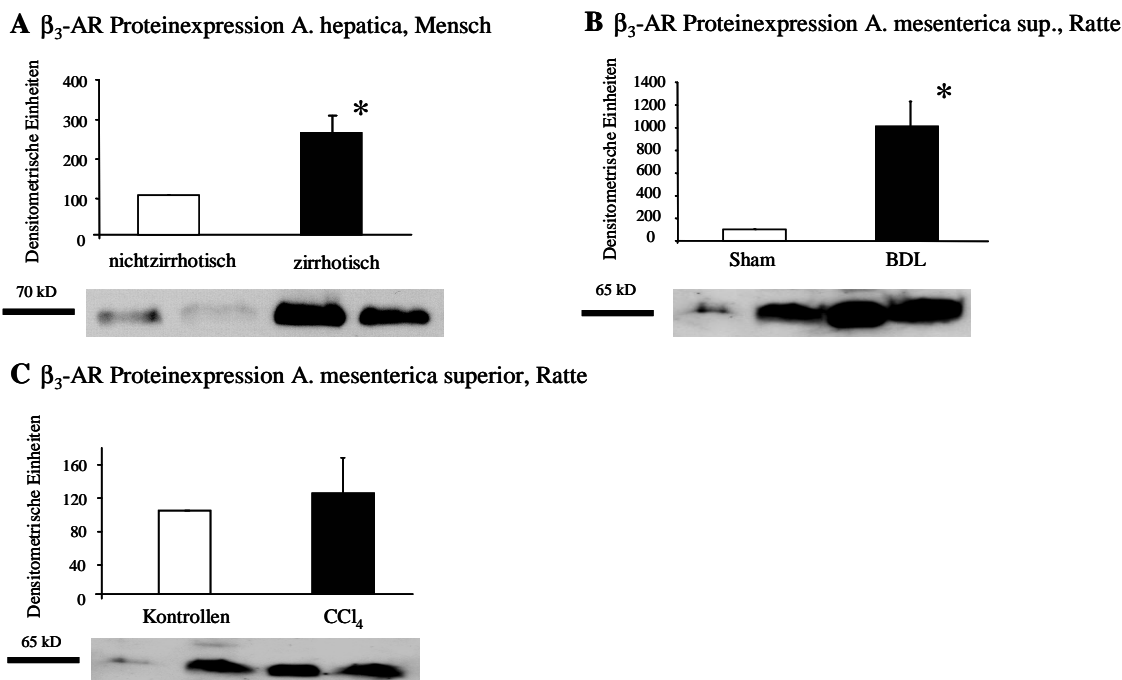


Abb. 7: Proteinexpression der β_3 -AR in der menschlichen A. hepatica (A) und in der A. mesenterica superior von zirrhosischen BDL- (B) und CCl₄-(C) Ratten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen, bestimmt durch Western-Blot-Analysen. Pro Gruppe wurden mindestens n = 6 Proben verwendet. Es werden die relativen densitometrischen Quantifizierungen der Experimente dargestellt (Mittelwerte \pm SEM), wobei die Werte der Kontrollen auf 100 densitometrische Einheiten gesetzt wurden. Außerdem werden repräsentative Western Blots gezeigt.

* p < 0,01 vs. nichtzirrhosische Kontrollen/Sham

3.4 Rho-Kinase- und PKG-Aktivität in Leber und Splanchnikusgebiet

Die Aktivität der Rho-Kinase, welche eine wichtige Rolle in der Erhöhung des intrahepatischen und der Erniedrigung des splanchnischen Widerstands in der Leberzirrhose spielt, wurde über die Phosphorylierung ihres endogenen Substrats Moesin an der Stelle Thr558 bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentration von p-Moesin in den Lebern von BDL-Ratten nach Injektion des β_3 -AR-Agonisten CGP um den Faktor 4 sinkt (Abbildung 8A). Analog wurde die Aktivität der PKG, die für den vasodilatatorischen Effekt von NO verantwortlich ist, über die Phosphorylierung des endogenen PKG-Substrats, dem VASP, an der Stelle Ser239 gemessen. Die Konzentration von phosphoryliertem VASP (p-VASP) blieb in den Lebern von BDL-Ratten nach Stimulation des β_3 -AR durch CGP unverändert (Abbildung 8B).

In der A. mesenterica superior von BDL-Ratten zeigte die Injektion des β_3 -AR-Agonisten CGP weder einen Einfluss auf die Konzentration von p-Moesin, noch auf die Konzentration von p-VASP (Abbildung 8C,D).

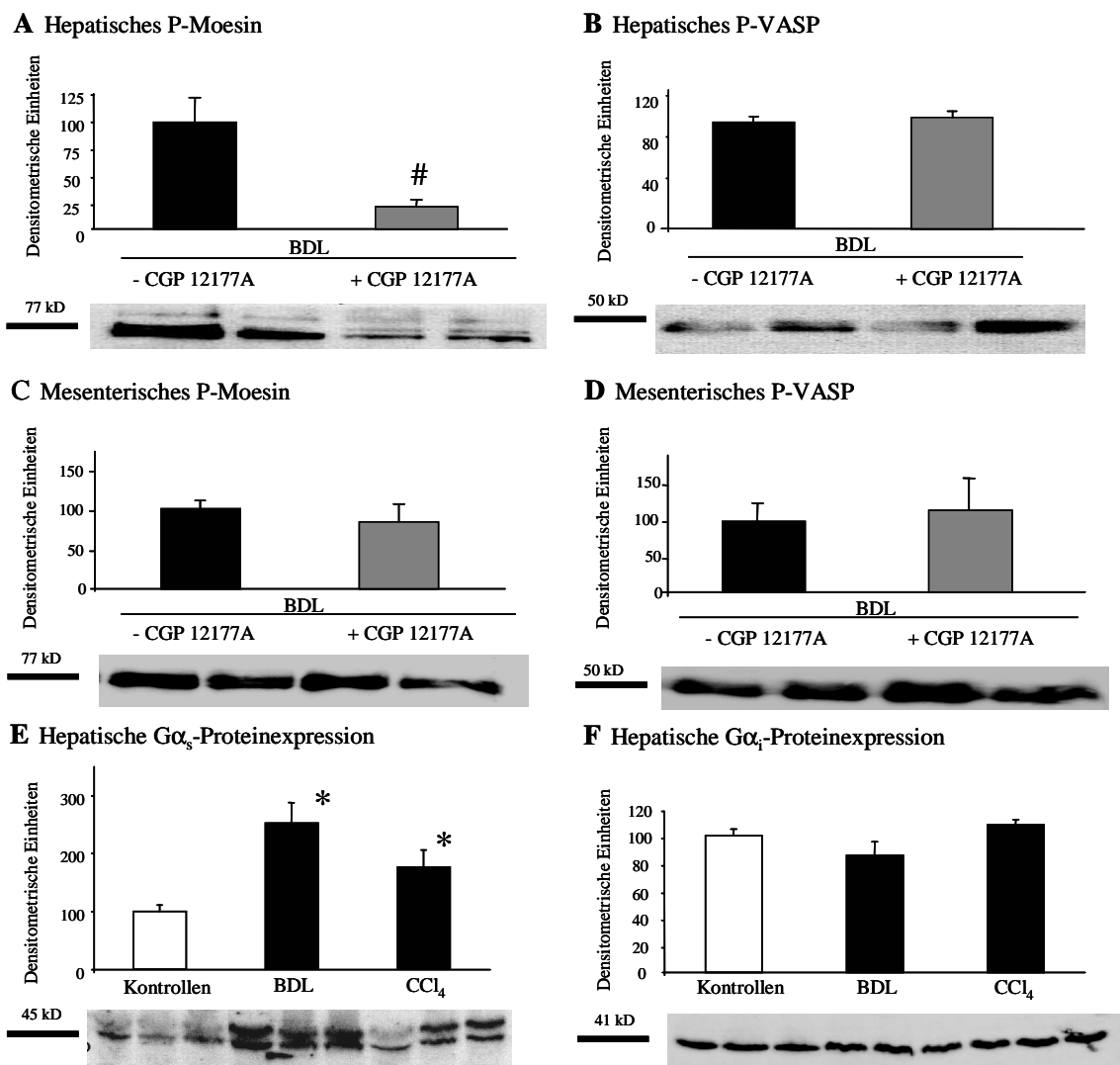


Abb. 8: In vivo Effekte des β_3 -AR-Agonisten CGP 12177A (0,5 mg/kg i.v.) bzw. des Lösungsmittels in zirrhatischen BDL-Ratten (A-D). Die Proteinexpression von p-Moesin und p-VASP in den Lebern (A,B) und in der A. mesenterica superior (C,D) dieser Ratten wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen bestimmt, wobei spezifische Antikörper verwendet wurden. Die hepatische Proteinexpression von G α_s (E) sowie G α_i (F) zirrhatischer BDL- und CCl₄-Ratten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen wurde ebenfalls durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Pro Gruppe wurde ein Minimum von n = 5 Proben verwendet. Es werden die jeweiligen relativen densitometrischen Quantifizierungen der Experimente dargestellt (Mittelwerte \pm SEM), wobei die Werte der Kontrollen auf 100 densitometrische Einheiten gesetzt wurden. Außerdem werden repräsentative Western Blots gezeigt.

p < 0,01 vs. Kontrolle ohne CGP 12177A

* p < 0,01 vs. Kontrollen

3.5 Proteinexpression von $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ in der Leber

Um die intrazellulären Signalwege des β_3 -AR weitergehend zu untersuchen, wurde die Expression der G-Protein-Untereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ in den Lebern gesunder und zirrhotischer Ratten bestimmt. In Western-Blot-Analysen zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression von $G\alpha_s$ in den Lebern sowohl von BDL- als auch CCl_4 -Ratten im Vergleich zu den Lebern gesunder Tiere (Abbildung 8E). Die Expression von $G\alpha_i$ blieb jedoch in beiden Zirrhosemodellen im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert (Abbildung 8F).

3.6 Kontraktilität der hepatischen Sternzellen

Im Kollagenmatrixmodell konnte gezeigt werden, dass es nach Inkubation mit dem β_3 -AR-Agonisten CGP zu einer dosisabhängigen Relaxation der vorkontrahierten HSC kommt. Jede gegebene Konzentration von CGP (10^{-8} M bis 10^{-5} M) führte zu einem signifikanten relaxierenden Effekt gegenüber der Kontrolle in der HSC-Matrix. Die höchste Konzentration erreichte hierbei den größten relaxierenden Effekt (Abbildung 9A). Um die Selektivität von CGP in Bezug auf den β_3 -AR zu untersuchen, haben wir die Wirkung des β_3 -AR-Antagonisten SR auf die CGP-vermittelte HSC-Relaxation untersucht. Es zeigte sich eine Hemmung der CGP-vermittelten Relaxation durch SR (Abbildung 9C).

Auch der β_3 -AR-Agonist BRL löste einen signifikanten relaxierenden Effekt auf die isolierten und vorkontrahierten HSC aus. Durch Koinkubation von BRL mit dem α_1 -AR-Antagonisten Prazosin konnte eine maximale Relaxation der HSC erreicht werden, die größer war als die bei alleiniger Inkubation mit Prazosin (Abbildung 9B).

3.7 cAMP-Spiegel in aktivierten HSC nach β_3 -Adrenozeptor-Stimulation

In der Zellkultur aktivierter HSC zeigte sich nach Inkubation mit den β_3 -AR-Agonisten CGP und BRL im Vergleich zur Inkubation mit dem Lösungsmittel jeweils eine signifikante Erhöhung der cAMP-Spiegel (Abbildung 9D).

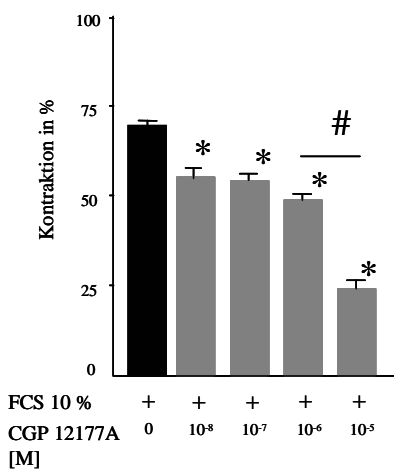
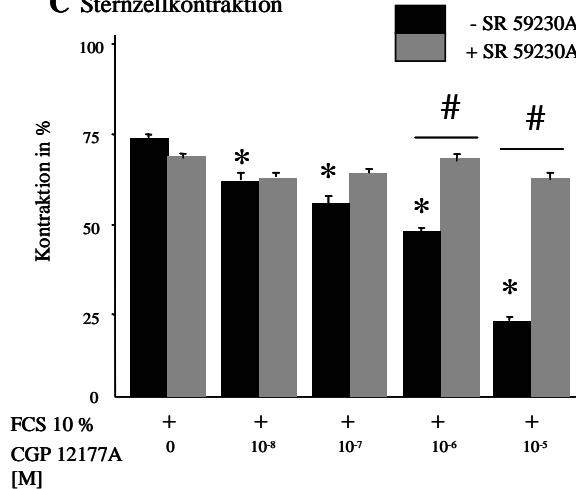
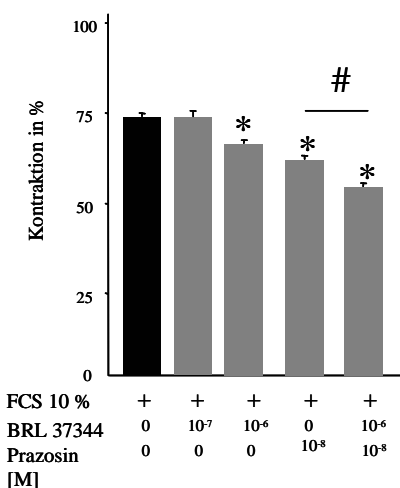
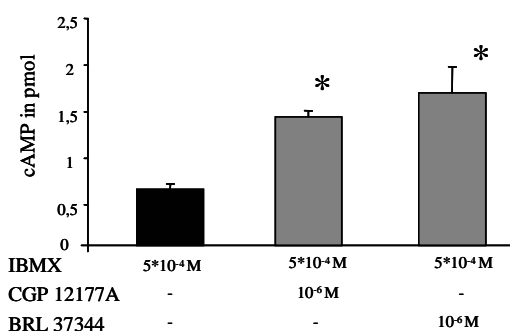
A Sternzellkontraktion**C Sternzellkontraktion****B Sternzellkontraktion****D cAMP-Spiegel nach β_3 -AR-Stimulation in aktivierten HSC**

Abb. 9: Effekte von CGP 12177A (A), BRL 34377 ohne und in Gegenwart von Prazosin (B) sowie CGP 12177A ohne und in Gegenwart von SR 59230A (C) auf die FCS-induzierte HSC-Kontraktion in einem dreidimensionalen Kollagenmatrixmodell. cAMP-Akkumulation in aktivierten HSC nach Inkubation mit IBMX allein oder IBMX in Kombination mit den β_3 -AR-Agonisten CGP 12177A und BRL 34377, den Herstellerangaben folgend bestimmt mit Hilfe eines Enzym-Immunoassay-Kits. Alle Daten stammen aus Experimenten, in denen mindestens drei verschiedene Sätze dreier Kollagengitter verwendet wurden, jeweils mit kulturaktivierten HSC aus drei verschiedenen Isolationen aus gesunden Ratten. Die verschiedenen Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test verglichen.

* $p < 0,02$ vs. positive Kontrollen mit FCS bzw. IBMX

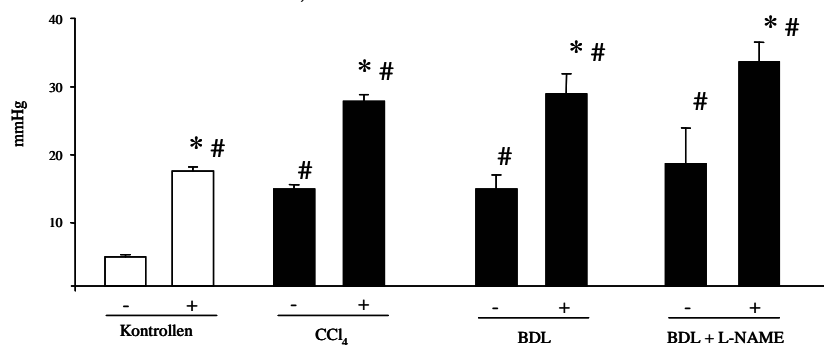
$p < 0,005$ vs. positive Kontrollen mit FCS

3.8 Intrahepatischer Gefäßwiderstand

Der basale Perfusionsdruck war bei den zirrhotischen BDL- und CCl₄-Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht (Abbildung 10A). Um die Auswirkung der β_3 -AR-Stimulation

auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand in zirrhotischen Ratten zu untersuchen, bestimmten wir den dosisabhängigen Effekt des β_3 -AR-Agonisten CGP auf den intrahepatischen Widerstand nach Vorkontraktion mit dem α_1 -AR-Agonisten Methoxamin. Nach Zugabe von Methoxamin zum Perfusat kam es zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdrucks sowohl in gesunden als auch in zirrhotischen Tieren, vermittelt über eine Erhöhung des Lebergefäßwiderstands (Abbildung 10A). CGP senkte in beiden Zirrhosemodellen den intrahepatischen Gefäßwiderstand dosisabhängig und signifikant stärker als das Lösungsmittel. In gesunden Ratten konnte CGP im Vergleich zum Lösungsmittel keinen signifikanten Effekt auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand zeigen (Abbildung 10B).

A Perfusionsdruck +/- Methoxamin 0,1mM



B Hepatischer Gefäßwiderstand

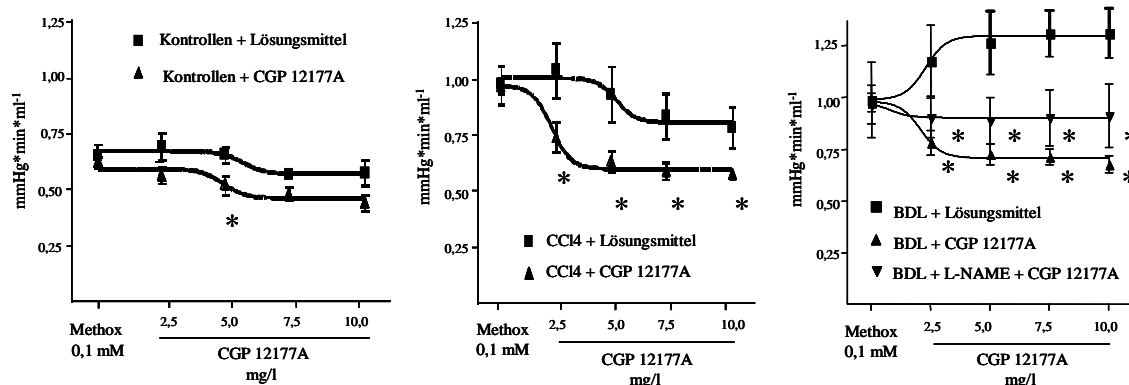


Abb. 10: Basaler Perfusionsdruck und sein Anstieg nach Vorkontraktion mit Methoxamin in Kontrollratten sowie zirrhotischen CCl₄- und BDL-Ratten (A). Der dosisabhängige Effekt von CGP 12177A auf den intrahepatischen Widerstand in der in situ Leberperfusion nach Vorkontraktion mit Methoxamin in Kontrollen sowie in zirrhotischen CCl₄- und BDL-Ratten ohne und in Gegenwart von L-NAME. Zum Gruppenvergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, das Minimum der verwendeten Tiere pro Gruppe betrug n = 5.

Methox: Methoxamin

* p < 0,05 vs. Lösungsmittel

p < 0,05 vs. Kontrollen mit Lösungsmittel

Um die Rolle der eNOS in der β_3 -AR-vermittelten intrahepatischen Widerstandssenkung zu bestimmen, wurde dem Perfusat vor Vorkontraktion mit Methoxamin der NOS-Inhibitor L-NAME zugefügt. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung des Effekts von CGP auf den intrahepatischen Widerstand (Abbildung 10B).

3.9 Hämodynamischer Effekt β_3 -Adrenozeptor-wirksamer Substanzen

Vier Wochen nach Gallengangsligatur bzw. 12–15 Wochen nach Beginn der Tetrachlorkohlenstoff-Inhalationen wiesen sowohl BDL- als auch CCl₄-Ratten erwartungsgemäß einen deutlich erhöhten Pfortaderdruck im Vergleich zu Sham-operierten bzw. gesunden Tieren auf (Abbildung 11A,B). Dabei zeigten die zirrhotischen Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen einen erniedrigten splanchnischen Gefäßwiderstand sowie einen erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstand (Abbildung 11C-F). Die akute Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP führte sowohl bei BDL- als auch bei CCl₄-Ratten zu einer signifikanten Senkung des Pfortaderhochdrucks im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen und in Bezug auf den initial erhöhten Druck (Abbildung 11A,B). Dabei blieb der erniedrigte splanchnische Gefäßwiderstand in beiden Modellen unverändert niedrig (Abbildung 11C,D). Stattdessen führte CGP sowohl bei BDL- als auch bei CCl₄-Ratten zu einem signifikanten Abfall des initial erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstands (Abbildung 11E,F).

Die Gabe des β_3 -AR-Antagonisten SR konnte in keinem der beiden Zirrhosemodelle eine signifikante Änderung des portalen Drucks im Vergleich zum erhöhten Ausgangswert herbeiführen (Abbildung 11A,B). Nach SR-Gabe zeigte sich weder ein Effekt auf den erniedrigten splanchnischen, noch auf den erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstand (Abbildung 11C-F).

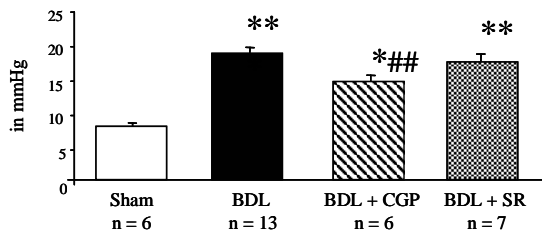
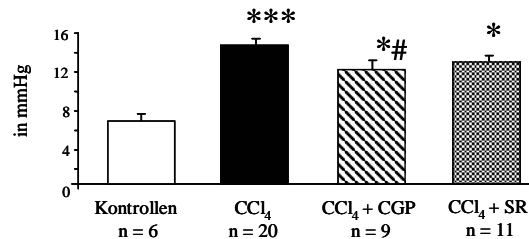
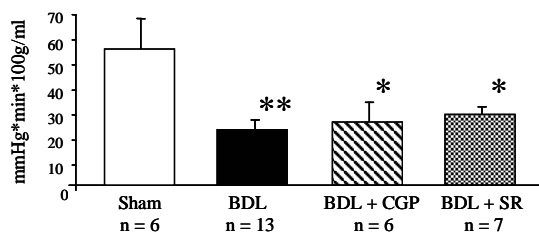
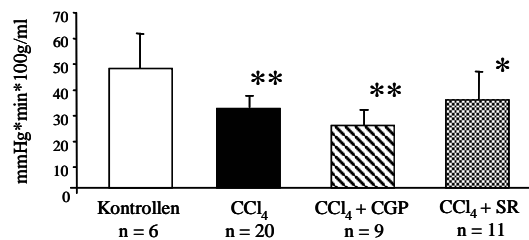
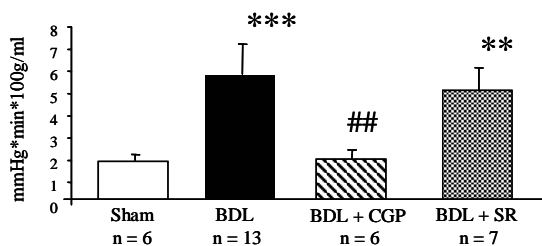
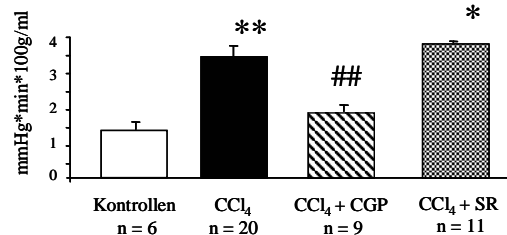
A Pfortaderdruck BDL**B** Pfortaderdruck CCl₄**C** Splanchnischer Gefäßwiderstand BDL**D** Splanchnischer Gefäßwiderstand CCl₄**E** Hepatischer Gefäßwiderstand BDL**F** Hepatischer Gefäßwiderstand CCl₄

Abb. 11: Pfortaderdruck (A), splanchnischer Gefäßwiderstand (C) und hepatischer Gefäßwiderstand (E) in Sham-operierten und zirrhotischen BDL-Ratten vor und nach Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP 12177A und des β_3 -AR-Antagonisten SR 59230A. Pfortaderdruck (B), splanchnischer Gefäßwiderstand (D) und hepatischer Gefäßwiderstand (F) in Kontrolltieren und zirrhotischen CCl₄-Ratten vor und nach Gabe von CGP 12177A und SR 59230A. Zum Gruppenvergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen.

* $p < 0,05$ vs. Sham bzw. Kontrollen

** $p < 0,01$ vs. Sham bzw. Kontrollen

*** $p < 0,001$ vs. Sham bzw. Kontrollen

$p < 0,05$ vs. BDL bzw. CCl₄

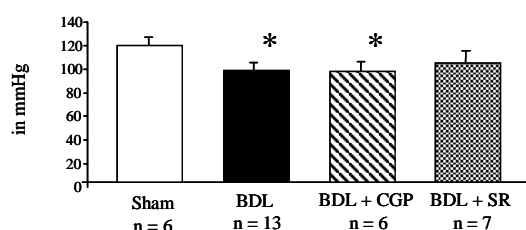
$p < 0,01$ vs. BDL bzw. CCl₄

$p < 0,001$ vs. BDL bzw. CCl₄

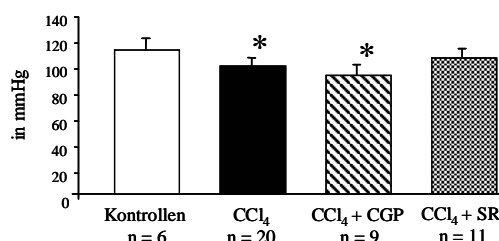
Wie erwartet, zeigten die zirrhotischen Tiere beider Gruppen eine voll ausgebildete hyperdynamische Zirkulationsstörung mit arterieller Hypotension, erniedrigtem systemischen Gefäßwiderstand und erhöhtem Herzzeitvolumen (Abbildung 12A-E). In vivo führte die akute Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP sowohl bei BDL- als auch bei CCl₄-Ratten zu keiner Änderung der systemischen Hämodynamik; MAD und systemischer Gefäßwiderstand blieben in der Zirrhose im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt, das Herzzeitvolumen erhöht (Abbildung 12A-E). Nach Gabe des

β_3 -AR-Antagonisten SR stieg der systemische Gefäßwiderstand in beiden Tiermodellen im Vergleich zum Ausgangswert signifikant an (Abbildung 12E,F). Das Herzzeitvolumen wurde jedoch nur bei BDL-Ratten signifikant gesenkt, bei CCl_4 -Ratten zeigte sich lediglich eine Tendenz hin zu einem niedrigeren Herzzeitvolumen (Abbildung 12C,D). Der MAD wurde durch SR nicht signifikant beeinflusst, es zeigte sich allerdings im Vergleich zu den basalen Werten eine leicht steigende Tendenz bei den Ratten beider Modelle (Abbildung 12A,B).

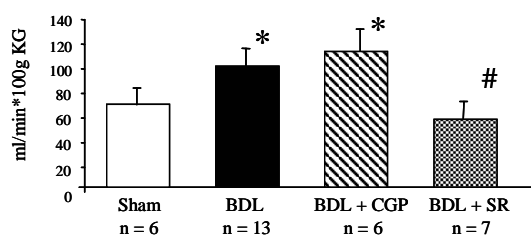
A Mittlerer arterieller Druck BDL



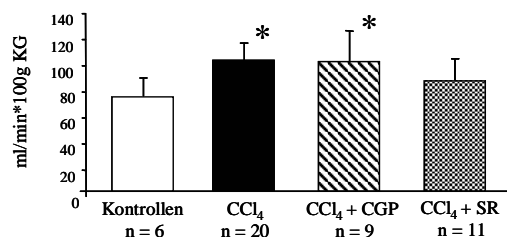
B Mittlerer arterieller Druck CCl_4



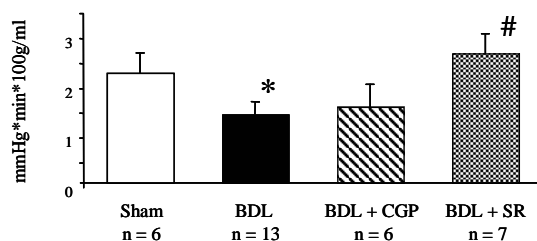
C Kardialer Index BDL



D Kardialer Index CCl_4



E Systemischer Gefäßwiderstand BDL



F Systemischer Gefäßwiderstand CCl_4

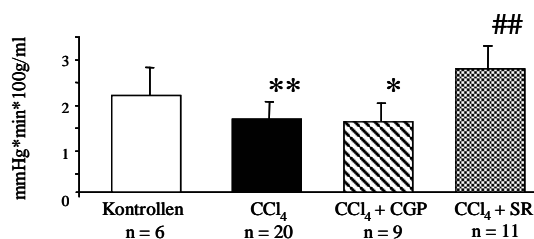


Abb. 12: Mittlerer arterieller Druck (A), Herzzeitvolumen (C) und systemischer Gefäßwiderstand (E) in Sham-operierten und zirrhotischen BDL-Ratten vor und nach Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP 12177A und des β_3 -AR-Antagonisten SR 59230A. Mittlerer arterieller Druck (B), Herzzeitvolumen (D) und systemischer Gefäßwiderstand (F) in Kontrolltieren und zirrhotischen CCl_4 -Ratten vor und nach Gabe von CGP 12177A und SR 59230A. Zum Gruppenvergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

* $p < 0,05$ vs. Sham bzw. Kontrollen

** $p < 0,01$ vs. Sham bzw. Kontrollen

$p < 0,05$ vs. BDL bzw. CCl_4

$p < 0,01$ vs. BDL bzw. CCl_4

3.10 Hämodynamischer Effekt β_3 -Adrenozeptor-wirksamer Substanzen nach Vorbehandlung mit Propranolol

Nach oraler Gabe von Propranolol über zwei Tage vor Versuchsbeginn wiesen die BDL-Ratten im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine signifikant niedrigere Herzfrequenz auf (Abbildung 13A). Außerdem führte die Behandlung mit Propranolol zu einem deutlichen Abfall des Herzzeitvolumens der zirrhotischen Ratten (Abbildung 13C). Der Pfortaderdruck der mit Propranolol behandelten BDL-Ratten war signifikant erniedrigt im Vergleich zu unbehandelten Tieren, bei signifikant erhöhtem splanchnischen, aber nahezu unverändertem intrahepatischen Gefäßwiderstand (Abbildung 13E-G). Der MAD und der systemische Gefäßwiderstand blieben unbeeinflusst durch Propranolol (Abbildung 13B,D).

Die intravenöse Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP an die mit Propranolol behandelten BDL-Ratten konnte den portalen Druck im Vergleich zum basalen Wert nach Propranololgabe signifikant stärker senken (Abbildung 13E). Dabei kam es zu einer signifikanten Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands im Vergleich zum Wert nach Propranolol-Gabe und zum Ausgangswert der zirrhotischen Tiere (Abbildung 13G). Begleitet wurde dies von einer Abnahme des zuvor durch Propranolol erhöhten splanchnischen Gefäßwiderstands (Abbildung 13F). Die Gabe des β_3 -AR-Antagonisten SR zeigte im Vergleich zur Vorbehandlung mit Propranolol keinen Effekt auf Pfortaderdruck und splanchnischen oder intrahepatischen Gefäßwiderstand der BDL-Ratten (Abbildung 13E-G).

Die systemische Hämodynamik (Herzfrequenz, MAD, Herzzeitvolumen und systemischer Gefäßwiderstand) blieb bei den mit Propranolol vorbehandelten BDL-Ratten durch die CGP-Gabe unbeeinflusst (Abbildung 13A-D). Der β_3 -AR-Antagonist SR führte zu einem isolierten, signifikanten Anstieg des systemischen Gefäßwiderstands, nicht aber zu einem zusätzlichen Abfall des Herzzeitvolumens, welches bereits durch Propranolol gesenkt worden war (Abbildung 13C,D). Herzfrequenz und MAD blieben auch von SR unbeeinflusst (Abbildung 13A,B).

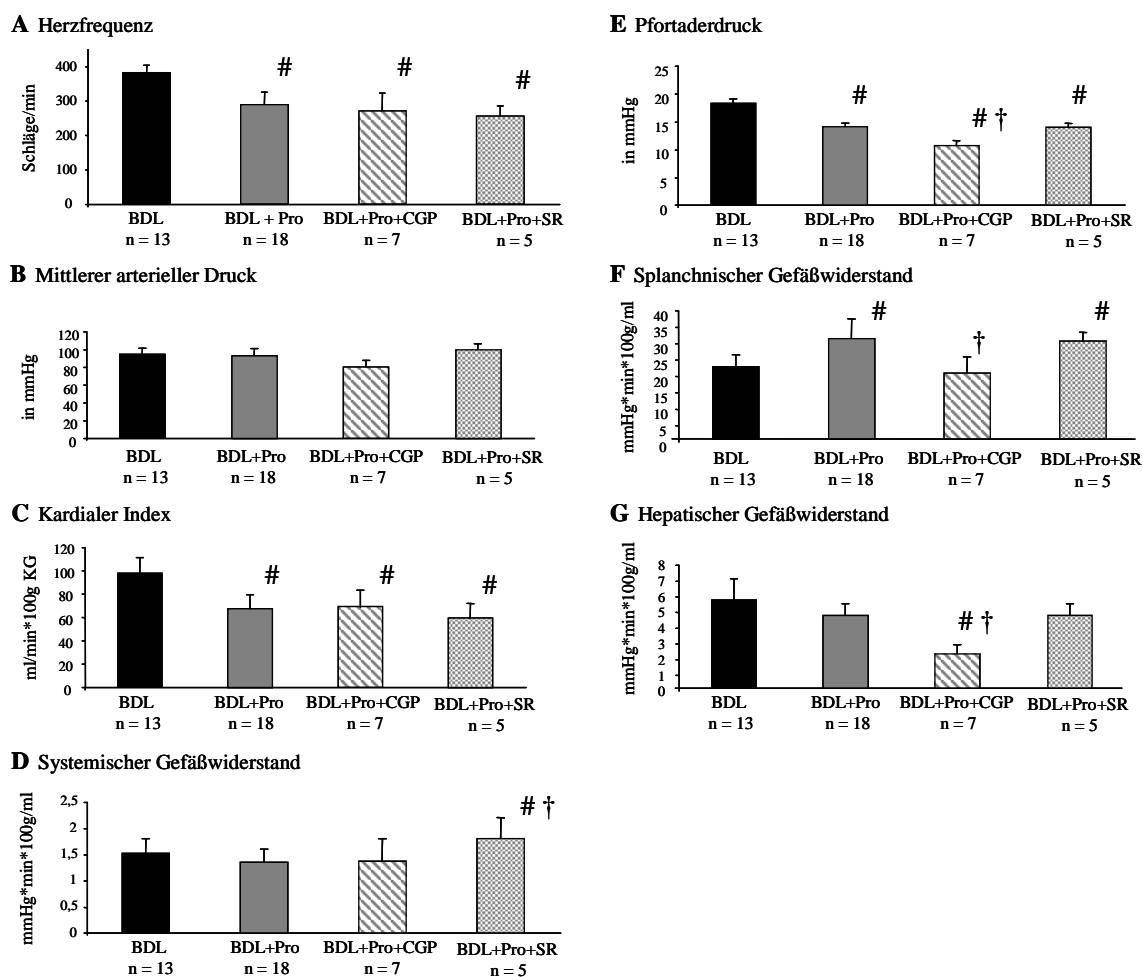


Abb. 13: Herzfrequenz (A), mittlerer arterieller Druck (B), Herzauswurfleistung (C), systemischer Gefäßwiderstand (D), Pfortaderdruck (E), splanchnischer Gefäßwiderstand (F) und hepatischer Gefäßwiderstand (G) in unbehandelten und mit Propranolol vorbehandelten zirrhotischen BDL-Ratten vor und nach Gabe des β_3 -AR-Agonisten CGP 12177A oder des β_3 -AR-Antagonisten SR59230A. Zum Gruppenvergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen.

Pro: Propranolol

$p < 0,05$ vs. BDL

† $p < 0,05$ vs. BDL+Pro

4 Diskussion

4.1 Expression der β_3 -Adrenozeptoren in den für den portalen Hypertonus relevanten Gefäßsystemen

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurde zum ersten Mal gezeigt, dass β_3 -AR sowohl bei Menschen als auch bei Ratten in der gesunden und in der zirrhotischen Leber exprimiert werden. Dabei ist das β_3 -AR-Protein in zirrhotischen im Vergleich zu gesunden Lebern deutlich hoch reguliert. Die ebenfalls erhöhten β_3 -AR-mRNA-Spiegel weisen auf eine transkriptionelle Regulation der β_3 -AR-Expression hin, welche von Nantel et al. bereits für andere Gewebearten gezeigt werden konnte (1994). Die vermehrte Expression der β_3 -AR in der zirrhotischen Leber beruht u.a. auf einer erhöhten Rezeptorexpression in aktivierten HSC. In den isolierten HSC nimmt der Grad der β_3 -AR-Expression (Protein und mRNA) mit der Dauer der Aktivierung und somit dem Transdifferenzierungsgrad der Zellen zu. Der Nachweis und der Anstieg von β_3 -AR-Protein und -mRNA in den Zellkulturen zeigen außerdem, dass es sich bei den nachgewiesenen erhöhten Spiegeln im Lebergewebe nicht um eine Kontamination mit weißem oder braunem Fettgewebe handelt.

Wie in den voran gegangenen Kapiteln dargestellt, spielen HSC eine essentielle Rolle in der Pathogenese des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose. Ihnen kommt von allen Zellen die größte Rolle in der Regulation des sinusoidalen Blutflusses zu (Reynaert et al., 2008). Im aktivierten Zustand im Rahmen der Leberzirrhose tragen sie durch ihre vermehrte Matrixproduktion und durch ihre erhöhte Kontraktilität entscheidend zur intrahepatischen Widerstandserhöhung und somit zur Entstehung des Pfortaderhochdrucks bei (Friedman, 2008; Reynaert et al., 2002). Dabei ist ihr Ansprechen auf zirkulierende Vasokonstriktoren wie Katecholamine und AT-II aufgrund vermehrt aktivierter vasokonstriktorischer (Trebicka et al., 2007; Zhou et al., 2006) sowie defekter relaxierender Signalwege (Fiorucci et al., 2001; Perri et al., 2006; Trebicka et al., 2007; Yu et al., 2000) erhöht. In der hyperdynamen Zirkulation der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus finden sich erhöhte Spiegel zirkulierender Vasokonstriktoren, vor allem der Katecholamine (Blendis und Wong, 2001; Lebrec und Moreau, 2001). Diese führen zu einer Konstriktion über α_1 -AR, welche ebenfalls auf aktivierten HSC vermehrt exprimiert sind (Sancho-Bru et al., 2006).

Die gesteigerte Sympathikusaktivität führt außerdem zu einer Downregulation und Desensibilisierung von β_1 - und β_2 -AR, wodurch deren relaxierender intrahepatischer Effekt abnimmt (Hein und Kobilka, 1997). β_3 -AR werden erst durch hohe Katecholaminkonzentrationen aktiviert und führen dann zu einer Vasorelaxation mit langsamer Kinetik, die resistent gegenüber einer Desensibilisierung der Rezeptoren ist (Lafontan, 1994; Rozec und Gauthier, 2006; Strosberg und Pietri-Rouxel, 1996). Die nun erstmals nachgewiesene vermehrte Expression von β_3 -AR in aktivierten HSC könnte einen Reparaturmechanismus darstellen, welcher den erhöhten Vasokonstriktoreinfluss und die Hyperreagibilität der HSC bei nachlassender β_1 - und β_2 -AR-Sensitivität kompensiert. Die Resistenz von β_3 -AR gegenüber Desensibilisierung und Downregulation bewirkt demnach den Erhalt des vasodilatatorischen Potenzials im Lebergefäßsystem trotz verminderter β_1 - und β_2 -AR-Aktivierung. Eine ähnliche Rolle der β_3 -AR wurde von Gauthier et al. (2007) bei der chronischen Herzinsuffizienz und bei der arteriellen Hypertonie diskutiert, wo bei zunehmender Aktivität der endogenen vasokonstriktorisches Systeme ebenfalls eine Hochregulation der β_3 -AR als Kompensationsmechanismus für die Desensibilisierung und Downregulation anderer β -AR angesehen wird.

In den mesenterialen Gefäßen von Patienten und BDL-Ratten mit Leberzirrhose sind β_3 -AR ebenfalls verstärkt exprimiert. Da sie resistent gegenüber einer Desensibilisierung sind, könnte ihre gesteigerte Expression einen Beitrag zu der bekannten persistierenden splanchnischen Widerstandserniedrigung beim Pfortaderhochdruck der Leberzirrhose leisten. Da die β_3 -AR unverändert auf die hohen Katecholaminspiegel ansprechen, können sie so die massive Vasodilatation mit unterhalten. Dass bei CCl_4 -Ratten im Gegensatz zu den BDL-Ratten keine gesteigerte splanchnische β_3 -AR-Expression zu beobachten ist, lässt sich dadurch erklären, dass dieses Modell mehr die intrahepatische Gefäßsituation spiegelt, weniger die extrahepatische (Abralde et al., 2006).

4.2 Funktionelle Bedeutung der β_3 -Adrenozeptoren in der zirrhotischen Leber

Es ist bekannt, dass β_3 -AR zu einer Relaxation von VSMC und damit einer Vasodilatation führen (Rautureau et al., 2002). Ihre funktionelle Bedeutung bei HSC wurde bislang nicht untersucht. In der Kollagenmatrix-Kontraktion führen die β_3 -AR-Agonisten CGP und BRL bereits in niedrigen Dosen zu einer Relaxation der kulturaktivierten HSC. Beide Substanzen verfügen über α_1 -antagonistische Eigenschaften – CGP jedoch erst in hohen Konzentrationen (Brahmadevara et al., 2004). Die Relaxation der HSC auch bei niedrigsten Konzentrationen von CGP spricht daher für

einen β_3 -AR-vermittelten Effekt. Die Selektivität von CGP für den β_3 -AR wurde außerdem durch Koinkubation mit dem β_3 -AR-Antagonisten SR gezeigt: SR bewirkt eine Hemmung der CGP-vermittelten Relaxation. Auch β_1 - und β_2 -AR-antagonistische Fähigkeiten von CGP können ausgeschlossen werden, da diese eine potentielle Relaxation hemmen würden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Relaxation aktivierter HSC durch CGP β_3 -AR-vermittelt ist. BRL gilt als funktionell selektiver β_3 -AR-Agonist mit zusätzlicher α_1 -AR-antagonistischer Wirkung (Hoffmann et al., 2004; Vrydag und Michel, 2007). Bei der Koinkubation von BRL mit dem α_1 -AR-Antagonisten Prazosin entfaltete Prazosin in Kombination mit BRL einen stärkeren relaxierenden Effekt als eine alleinige Prazosingabe. Dies zeigt die α_1 -AR-unabhängige, ebenfalls β_3 -AR-vermittelte HSC-Relaxation durch BRL. Die im Vergleich zu BRL frühere und stärkere Relaxation durch CGP kann durch eine höhere Potenz von CGP am β_3 -AR erklärt werden (Hoffmann et al., 2004).

In der in situ Leberperfusion bewirkt die Stimulation des β_3 -AR eine Erniedrigung des intrahepatischen Gefäßwiderstands. Der β_3 -AR-Agonist CGP senkt in vorkontrahierten intrahepatischen Gefäßen zirrhotischer Tiere dosisabhängig den Widerstand. Diese Senkung tritt bereits bei geringen Konzentrationen an CGP auf, was auf die erhöhte Gesamtexpression der β_3 -AR in der zirrhotischen Leber zurück zu führen ist. In gesunden Lebern mit niedriger β_3 -AR-Expression zeigt sich nur ein geringer Effekt von CGP. Zusätzlich spricht die bereits bei geringen Konzentrationen auftretende Wirkung von CGP für einen β_3 -AR- und gegen einen α_1 -AR-vermittelten Effekt.

Zusammengefasst veranschaulichen diese Ergebnisse in vitro und in situ, dass β_3 -AR-Agonisten den intrahepatischen Gefäßwiderstand durch eine Relaxation der HSC senken. Dies liefert ein weiteres Argument für die Kompensation der Wirkung der erhöhten zirkulierenden Katecholaminspiegel und der Hyperreagibilität der HSC in der Leberzirrhose durch vermehrt exprimierte β_3 -AR in aktivierten HSC. Eine Stimulation der hoch regulierten β_3 -AR durch Katecholamine wie Noradrenalin senkt über eine Relaxation der HSC den intrahepatischen Widerstand und beeinflusst so den Pfortaderdruck.

4.3 Die Rolle β_3 -Adrenozeptor-wirksamer Substanzen in vivo

Die Bedeutung der β_3 -AR in Bezug auf die Regulation des intrahepatischen Widerstands und des Pfortaderhochdrucks bei Leberzirrhose konnte auch durch hämodynamische in vivo Untersuchungen bestätigt werden. Dem portalen Hypertonus sowohl der BDL- als auch der CCl₄-Ratten

liegen entsprechend der allgemein akzeptierten Pathomechanismen ein stark erniedrigter splanchnischer und ein deutlich erhöhter intrahepatischer Gefäßwiderstand zu Grunde. Der β_3 -AR-Agonist CGP bewirkt in beiden Tiermodellen in vivo über eine Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands eine deutliche Pfortaderdrucksenkung. Angesichts des initial bereits stark erniedrigten Widerstands in beiden Zirrhosemodellen entfaltet CGP keinen zusätzlichen senkenden Effekt auf den splanchnischen Gefäßwiderstand. Auch die typische hyperdynamie Zirkulationsstörung der portalen Hypertension bei Leberzirrhose – der erniedrigte systemische Gefäßwiderstand und MAD sowie das erhöhte Herzzeitvolumen – bleibt unbeeinflusst durch CGP. Somit führt die Stimulation der β_3 -AR durch CGP über eine intrahepatische Gefäßwiderstandserniedrigung zu einer Senkung des portalen Drucks bei fehlender Beeinflussung der systemischen Hämodynamik. Wie die vorangegangenen Daten zeigen, beruht die Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands auf einer Relaxation der aktivierten HSC.

CGP besitzt zusätzliche β_1 - und β_2 -AR-antagonistische Eigenschaften (Hoffmann et al., 2004). Um die Spezifität und die therapeutische Bedeutung von CGP als β_3 -AR-Partialagonist zu untersuchen, wurde den Ratten in einem zweiten Versuch 24 Stunden vor Beginn der hämodynamischen Messungen der unspezifische β -Blocker Propranolol in therapeutischen Dosen gefüttert. Dieser besetzt β_1 - und β_2 -AR, β_3 -AR jedoch erst in deutlich höheren Dosen (Rozec und Gauthier, 2006). Der Abfall der Herzfrequenz und des Herzzeitvolumens nach Propranololgabe beweist die effektive Blockade der β_1 -, der erhöhte splanchnische Gefäßwiderstand die der β_2 -AR (Bylund et al., 1994). Somit konnte ein antagonistischer Effekt von CGP an β_1 - und β_2 -AR eliminiert werden. CGP senkt in Kombination mit Propranolol den portalen Druck in vivo stärker als Propranolol allein. Im Gegensatz zur Absenkung des Herzzeitvolumens und zur Erhöhung des splanchnischen Gefäßwiderstands durch Propranolol senkt CGP den Pfortaderdruck durch eine intrahepatische Gefäßwiderstandserniedrigung. Da eine alleinige Propranololgabe keinen Effekt auf die intrahepatische Hämodynamik zeigt, kommt dieser additive Effekt auf das Lebergefäßbett durch eine Stimulation von β_3 -AR durch CGP zustande.

Die simultane Senkung des durch Propranolol erhöhten splanchnischen Gefäßwiderstands auf das Ausgangsniveau unbehandelter BDL-Ratten beweist die β_3 -AR-vermittelte vasodilatatorische Wirkung von CGP auch in mesenterialen Gefäßen. Trotz der bei der Leberzirrhose erhöhten Expression von β_3 -AR in diesem Gefäßbett bleibt der Effekt bei alleiniger CGP-Gabe aufgrund der vorherrschenden massiven Vasodilatation verborgen. Die essentielle Bedeutung der β_3 -AR-Ago-

nisierung beschränkt sich auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand, da trotz gleichzeitig zunehmender splanchnischer Vasodilatation der Pfortaderdruck durch CGP in Kombination mit Propranolol signifikant gesenkt wird. Die Senkung des splanchnischen Gefäßwiderstands durch CGP nach vorheriger Propranolol-Gabe zeigt außerdem, dass Propranolol – als Standardtherapeutikum in der portalen Hypertonie – in der gegebenen Dosis keine wesentliche β_3 -AR-vermittelte Wirkung entfaltet.

Überraschenderweise zeigt der β_3 -AR-Antagonist SR weder nach alleiniger Gabe noch nach Vorbehandlung mit Propranolol Effekte auf den portalen Druck oder die intrahepatische und splanchnische Hämodynamik. Ein Anstieg des systemischen Gefäßwiderstands in beiden Versuchsaufbauten spricht jedoch für einen vasokonstriktorischen Effekt von SR, am ehesten β_3 -AR-vermittelt aufgrund der selektiven β_3 -AR-Wirksamkeit von SR bei Nagern (Viard et al., 2000). Der geringe Effekt des β_3 -AR-Antagonisten auf den splanchnischen Gefäßwiderstand lässt sich möglicherweise durch die defekten vasokonstriktorischen Signalwege im massiv dilatierten Splanchnikusgefäßbett erklären (Hennenberg et al., 2008; Trebicka et al., 2008). Die leicht steigende Tendenz des intrahepatischen Gefäßwiderstands nach SR-Gabe lässt vermuten, dass die Antagonisierung der β_3 -AR auch in diesem Gefäßbett eine Rolle spielt, wobei der zusätzliche konstriktorische Effekt aufgrund der vorherrschenden starken Widerstandserhöhung gering ist.

Zusammengefasst führt der β_3 -AR-Agonist CGP in vivo in Kombination mit Propranolol zu einem deutlichen Absinken des portalen Hypertonus. Durch die β_3 -AR-vermittelte intrahepatische Vasodilatation kommt es zu einem additiven Effekt zur Senkung des Herzzeitvolumens und Erhöhung des splanchnischen Gefäßwiderstands durch Propranolol. Die kombinierte Gabe von β_3 -AR-Agonist CGP und dem unspezifischen β -Blocker Propranolol führt zu einer stärkeren Drucksenkung als eine alleinige Propranololgabe und könnte eine neue Option in der Therapie des portalen Hypertonus darstellen. Aufgrund der fehlenden Wirkung von CGP auf die systemische Hämodynamik ist zu vermuten, dass die Substanz gut verträglich ist.

4.4 Signaltransduktionswege der β_3 -Adrenozeptoren

Vaskuläre β_3 -AR koppeln an diverse intrazelluläre Signalwege. In der β_3 -AR-vermittelten Relaxation von VSMC spielen – analog zu anderen β -AR – $G\alpha_s$ -Protein und der cAMP/PKA-Weg eine bedeutende Rolle (Rouget et al., 2006; Tamaoki et al., 1998; Viard et al., 2000). Außerdem

tragen der RhoA/Rho-Kinase-Weg (Cirino et al., 2003) sowie die NO/cGMP-vermittelte Aktivierung der PKG zur Relaxation bei (Rautureau et al., 2002; Trochu et al., 1999).

Die nach Applikation von CGP verminderte Konzentration des endogenen Rho-Kinase-Substrats p-Moesin zeigt, dass eine β_3 -AR-Stimulation zu einer verminderten Aktivität der Rho-Kinase in Lebern zirrhotischer Ratten führt. NO-vermittelte Signalwege bleiben dabei unbeeinflusst, wie die unveränderte Aktivität (gemessen über die Konzentration des endogenen Substrats p-VASP) des NO-Effektors PKG und die NO-unabhängige Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands durch β_3 -AR-Agonisten in der in situ Leberperfusion zeigen. Die Expression von $G\alpha_s$ ist in zirrhotischen Lebern erhöht, die von $G\alpha_i$ unverändert. In aktivierten HSC kommt es nach Stimulation der β_3 -AR mit den Agonisten CGP und BRL außerdem zu einer Akkumulation von intrazellulärem cAMP. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass die β_3 -AR-vermittelte Relaxation der aktivierten HSC durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase via $G\alpha_s$ mit nachfolgender cAMP-Bildung und durch eine parallele Inhibition von Rho-Kinase zustande kommt (Abbildung 14). cAMP führt über eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zur Relaxation der HSC (Hoiting et al., 1996; Kimura et al., 1982; Orlov et al., 1996; Reynaert et al., 2008). Eine verminderte Aktivität von Rho-Kinase bedingt eine gesteigerte Aktivität der MLCP (Trebicka et al., 2008) und damit ebenfalls eine Relaxation der HSC. Der Mechanismus der Rho-Kinase-Inhibition durch β_3 -AR-Agonisten wurde in diesem Zusammenhang nicht weiter evaluiert. Andere Autoren wiesen jedoch eine cAMP/PKA-vermittelte Hemmung der Rho-Kinase nach (Qiao et al., 2003), welche auch in aktivierten HSC von Bedeutung sein könnte. Da die Überexpression und die erhöhte Aktivität von RhoA und Rho-Kinase in der zirrhotischen Leber mit für den erhöhten intrahepatischen Widerstand verantwortlich gemacht werden (Trebicka et al., 2007; Zhou et al., 2006), könnte die Hemmung der Rho-Kinase durch vermehrte β_3 -AR-Aktivierung einen weiteren Mechanismus zur Gegenregulation des erhöhten intrahepatischen Widerstands darstellen.

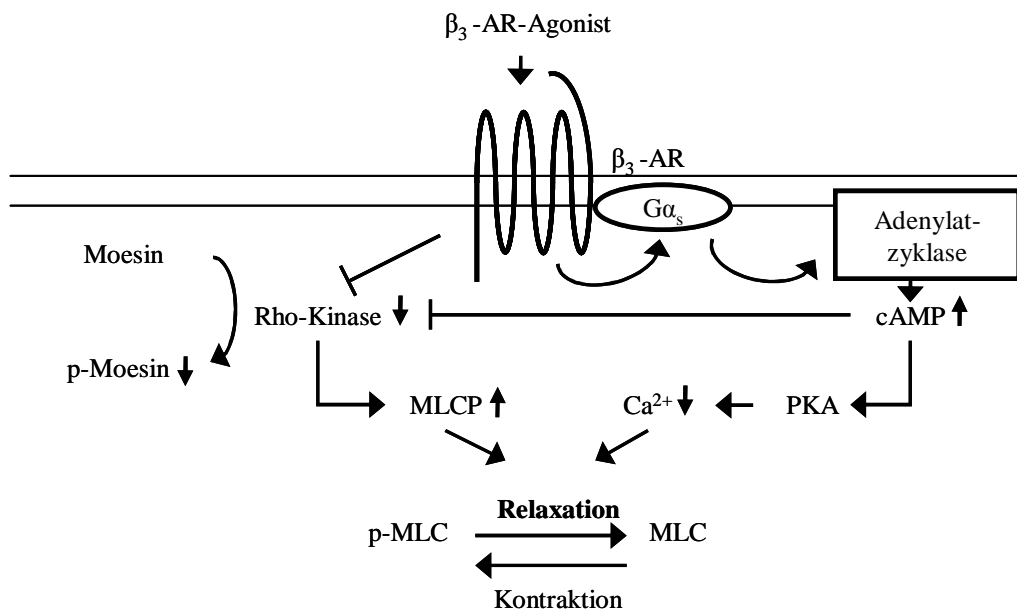


Abb. 14: Relaxierende Signalwege bei β_3 -AR-Stimulation in aktivierten HSC. Nach Stimulation des β_3 -AR durch β_3 -AR-Agonisten wie CGP kommt es zur Aktivierung von $G\alpha_s$ -Protein und der Adenylatzyklase. Die nachfolgend erhöhten cAMP-Spiegel aktivieren die PKA, die das intrazelluläre Ca^{2+} senkt und so eine Relaxation bewirkt. Außerdem führt die Stimulation des β_3 -AR zur Herabsetzung der Rho-Kinase-Aktivität, wie die verminderte Umwandlung des Substrats Moesin in p-Moesin zeigt. Die reduzierte Aktivität der Rho-Kinase führt über den Entfall der Hemmung zu einer erhöhten Aktivität der MLCP und somit ebenfalls zur Relaxation.

In mesenterialen Gefäßen tragen eine verminderte Rho-Kinase-Aktivität und eine erhöhte PKG-Aktivität deutlich zur Vasodilatation in der Leberzirrhose bei (Hennenberg et al., 2006). Die Stimulation des β_3 -AR mit dem β_3 -AR-Agonisten CGP zeigt hier keinen zusätzlichen senkenden Effekt auf die Rho-Kinase-Aktivität. Dies ist zu erklären durch die in beiden Zirrhosemodellen bereits im Vorfeld stark verminderte Aktivität von Rho-Kinase. Die Aktivität der PKG blieb auch im splanchnischen Gefäßbett unbeeinflusst durch die β_3 -AR, so dass sowohl in der Leber als auch im Splanchnikusgebiet eine Rolle von NO in der β_3 -AR-vermittelten Vasodilatation ausgeschlossen werden kann.

5 Zusammenfassung

In den aktivierten hepatischen Sternzellen der zirrhotischen Leber sind β_3 -Adrenozeptoren überexprimiert. Agonisten des β_3 -Adrenozeptors führen über eine Relaxation der aktivierten Sternzellen zur Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstands. In vivo bewirkt diese intrahepatische Widerstandssenkung eine deutliche Reduktion des Pfortaderdrucks. Die Aktivierung des β_3 -Adrenozeptors durch Agonisten wie CGP 12177A und BRL 37344 führt dabei zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) über das guaninnukleotidbindende Protein α_s ($G\alpha_s$ -Protein) und zur Inhibition der Rho-Kinase. Beide Mechanismen bewirken eine Relaxation der aktivierten hepatischen Sternzellen und damit eine Erniedrigung des intrahepatischen Widerstands und des portalen Drucks. Die durch β_3 -Adrenozeptoren vermittelten Effekte auf das intrahepatische Gefäßsystem konnten sowohl in vitro als auch in situ und in vivo nachgewiesen werden. Die erhöhte intrahepatische Expression der β_3 -Adrenozeptoren und die Inhibition der Rho-Kinase nach ihrer Agonisierung stellen möglicherweise Kompensationsmechanismen in Bezug auf die erhöhten Katecholaminspiegel und die überaktivierten kontraktiven Signalwege der hepatischen Sternzellen in der Leberzirrhose dar.

Auch im Gefäßbett des Splanchnikus sind β_3 -Adrenozeptoren bei Leberzirrhose überexprimiert. Hier führt ihre Aktivierung jedoch aufgrund der vorherrschenden massiven Vasodilatation zu keinem weiteren widerstandssenkenden Effekt. Dies wirkt sich positiv auf den Gesamteffekt der β_3 -Adrenozeptor-Agonisten auf den portalen Hypertonus aus.

Da es in der Leberzirrhose mit portalem Hypertonus nur wenige klinisch erprobte medikamentöse Therapieoptionen zur Senkung des portalen Drucks gibt, ist die Erforschung neuer Therapiekonzepte essentiell. Die etablierte pharmakologische Senkung des portalen Drucks durch unspezifische β -Blocker hat aufgrund von Nebenwirkungen und hohen Nichtansprechraten eine geringe klinische Erfolgsrate (Bosch und Garcia-Pagan, 2000; Feu et al., 1993; Garcia-Pagan et al., 1992). Wir konnten erstmals zeigen, dass β_3 -Adrenozeptor-Agonisten in vivo in zwei verschiedenen experimentellen Zirrhosemodellen einen signifikant senkenden Effekt auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand und den portalen Hypertonus haben, der in Kombination mit Propranolol besonders ausgeprägt ist. Die fehlende Wirkung auf den systemischen Gefäßwiderstand und den mittleren arteriellen Druck spricht für eine gute Verträglichkeit. Daher stellen β_3 -Adrenozeptoren ein potentielles Angriffsziel in der Therapie des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose dar.

Literaturverzeichnis

- Abraldes JG, Albillos A, Banares R, Turnes J, Gonzalez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2009; 136: 1651-1658
- Abraldes JG, Pasarin M, Garcia-Pagan JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6577-6584
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153: 586-600
- Ai JH, Yang Z, Qiu FZ, Zhu T. Heat shock protein 90 is responsible for hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2544-2547
- 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
- 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
- Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 1994; 20: 494-514
- Anthony A, Schepelmann S, Guillaume JL, Strosberg AD, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. Localization of the beta(beta)3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: an immunohistochemical study. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 519-525
- Arch JR, Kaumann AJ. Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors. *Med Res Rev* 1993; 13: 663-729
- Austin AS, Mahida YR, Clarke D, Ryder SD, Freeman JG. A pilot study to investigate the use of oxpentifylline (pentoxifylline) and thalidomide in portal hypertension secondary to alcoholic cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 79-88
- Bacon BR. Cirrhosis and Its Complications. In: Fauci AS, ed. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17 ed. New York: McGraw-Hill, 2008: 1971-1980
- Ballet F, Chretien Y, Rey C, Poupon R. Differential response of normal and cirrhotic liver to vasoactive agents. A study in the isolated perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 283-289
- 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
- Baruch Y, Assy N, Weisbruch F, Reisner SA, Rinkevich D, Enat R, Blendis LM, Bomzon A. A pilot study on the hemodynamic effect of short-term ursodeoxycholic acid therapy in patients with stable liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3000-3004
- Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves Gorbis M, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 615-624

- Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N, Jr., Sanyal AJ, Kunos G. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001; 7: 827-832
- Berkowitz DE, Nardone NA, Smiley RM, Price DT, Kreutter DK, Fremeau RT, Schwinn DA. Distribution of beta 3-adrenoceptor mRNA in human tissues. *Eur J Pharmacol* 1995; 289: 223-228
- Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985; 1: 325-337
- Biecker E, Trebicka J, Kang A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Heller J. Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension. *Liver Int* 2008; 28: 331-338
- Blendis L, Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 221-231
- Bond RA, Clarke DE. Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *British journal of pharmacology* 1988; 95: 723-734
- 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
- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32: 141-156
- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Prevention of variceal rebleeding. *Lancet* 2003; 361: 952-954
- Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A. ALpha1-adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other beta-adrenoceptor ligands: evidence against beta(3)- or atypical beta-adrenoceptors in rat aorta. *British journal of pharmacology* 2004; 142: 781-787
- Brixius K, Bloch W, Ziskoven C, Bolck B, Napp A, Pott C, Steinritz D, Jiminez M, Addicks K, Giacobino JP, Schwinger RH. Beta3-adrenergic eNOS stimulation in left ventricular murine myocardium. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 1051-1060
- Brodde OE. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 405-430
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 121-136
- Cassiman D, Deneff C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneff C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002; 36: 200-209
- Cellek S, Thangiah R, Bassil AK, Campbell CA, Gray KM, Stretton JL, Lalude O, Vivekanandan S, Wheeldon A, Winchester WJ, Sanger GJ, Schemann M, Lee K. Demonstration of functional neuronal beta3-adrenoceptors within the enteric nervous system. *Gastroenterology* 2007; 133: 175-183

- Chamberlain PD, Jennings KH, Paul F, Cordell J, Berry A, Holmes SD, Park J, Chambers J, Sennitt MV, Stock MJ, Cawthorne MA, Young PW, Murphy GJ. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 1057-1065
- Cirino G, Sorrentino R, di Villa Bianca R, Popolo A, Palmieri A, Imbimbo C, Fusco F, Longo N, Tajana G, Ignarro LJ, Mirone V. Involvement of beta 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5531-5536
- Colle I, Geerts AM, Van Steenkiste C, Van Vlierberghe H. Hemodynamic changes in splanchnic blood vessels in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 699-713
- D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review. *Hepatology* 1995; 22: 332-354
- de Franchis R. Updating consensus in portal hypertension: report of the Baveno III Consensus Workshop on definitions, methodology and therapeutic strategies in portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 33: 846-852
- Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation* 2004; 110: 948-954
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605
- Domenicali M, Ros J, Fernandez-Varo G, Cejudo-Martin P, Crespo M, Morales-Ruiz M, Briones AM, Campistol JM, Arroyo V, Vila E, Rodes J, Jimenez W. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut* 2005; 54: 522-527
- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989; 245: 1118-1121
- Evans BA, Papaioannou M, Bonazzi VR, Summers RJ. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. *British journal of pharmacology* 1996; 117: 210-216
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S, Summers RJ. Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *British journal of pharmacology* 1999; 127: 1525-1531
- Feu F, Bordas JM, Luca A, Garcia-Pagan JC, Escorsell A, Bosch J, Rodes J. Reduction of variceal pressure by propranolol: comparison of the effects on portal pressure and azygos blood flow in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 1082-1089
- Feu F, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Luca A, Teres J, Escorsell A, Rodes J. Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346: 1056-1059
- Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively

delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8897-8902

Friedman SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399: 597-601

Garcia-Pagan JC, Morillas R, Banares R, Albillos A, Villanueva C, Vila C, Genesca J, Jimenez M, Rodriguez M, Calleja JL, Balanzo J, Garcia-Duran F, Planas R, Bosch J. Propranolol plus placebo versus propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the prevention of a first variceal bleed: a double-blind RCT. *Hepatology* 2003; 37: 1260-1266

Garcia-Pagan JC, Navasa M, Rivera F, Bosch J, Rodes J. Lymphocyte beta 2-adrenoceptors and plasma catecholamines in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 2015-2023

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

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

Gauthier C, Seze-Goismier C, Rozec B. Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 37: 193-204

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996; 98: 556-562

Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, Demetter P, Lameire N, De Vos M, Colle I. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006; 26: 889-898

Genesca J, Gonzalez A, Catalan R, Segura R, Martinez M, Esteban R, Groszmann RJ, Guardia J. Adrenomedullin, a vasodilator peptide implicated in hemodynamic alterations of liver cirrhosis: relationship to nitric oxide. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 372-376

Geraghty JG, Angerson WJ, Carter DC. Portal venous pressure and portasystemic shunting in experimental portal hypertension. *Am J Physiol* 1989; 257: G52-57

Gerhardt CC, Gros J, Strosberg AD, Issad T. Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 255-262

Gournay J, Masliah C, Martin T, Perrin D, Galmiche JP. Isosorbide mononitrate and propranolol compared with propranolol alone for the prevention of variceal rebleeding. *Hepatology* 2000; 31: 1239-1245

Granneman JG, Lahners KN, Chaudhry A. Molecular cloning and expression of the rat beta 3-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 895-899

- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, Bosch J, Rodes J. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003; 37: 172-181
- Groszmann RJ, Bosch J, Grace ND, Conn HO, Garcia-Tsao G, Navasa M, Alberts J, Rodes J, Fischer R, Bermann M, et al. Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1990; 99: 1401-1407
- Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Gao H, Makuch R. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2254-2261
- Grunhage F, Heller J, Appenrodt B, Schmitz V, Sauerbruch T. [Complications of liver cirrhosis, medical management]. *Med Klin (Munich)* 2008; 103: 482-490
- Guillaume JL, Petitjean F, Haasemann M, Bianchi C, Eshdat Y, Strosberg AD. Antibodies for the immunochemistry of the human beta 3-adrenergic receptor. *Eur J Biochem* 1994; 224: 761-770
- Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 319-356
- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28: 926-931
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 135-151
- 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
- Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician* 2006; 74: 767-776
- Hein L, Kobilka BK. Adrenergic receptors. From Molecular Structure to in vivo Function. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 137-145
- Heinemann A, Wachter CH, Holzer P, Fickert P, Stauber RE. Nitric oxide-dependent and -independent vascular hyporeactivity in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *British journal of pharmacology* 1997; 121: 1031-1037
- Heller J, Sauerbruch T. Prevention of recurrent haemorrhage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 43-53
- 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* 1999; 116: 387-393
- 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
- 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

- 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
- Hennenberg M, Trebicka J, Buecher D, Heller J, Sauerbruch T. Lack of effect of norfloxacin on hyperdynamic circulation in bile duct-ligated rats despite reduction of endothelial nitric oxide synthase function: result of unchanged vascular Rho-kinase? *Liver Int* 2009; 29: 933-941
- Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 2008; 57: 1300-1314
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 151-159
- Hoiting BH, Meurs H, Schuiling M, Kuipers R, Elzinga CR, Zaagsma J. Modulation of agonist-induced phosphoinositide metabolism, Ca²⁺ signalling and contraction of airway smooth muscle by cyclic AMP-dependent mechanisms. *British journal of pharmacology* 1996; 117: 419-426
- Hollenga C, Brouwer F, Zaagsma J. Differences in functional cyclic AMP compartments mediating lipolysis by isoprenaline and BRL 37344 in four adipocyte types. *Eur J Pharmacol* 1991; 200: 325-330
- Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 28: 1467-1473
- Hutchinson DS, Bengtsson T, Evans BA, Summers RJ. Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *British journal of pharmacology* 2002; 135: 1903-1914
- Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *American journal of physiology* 2002; 283: G1074-1081
- Johnson M. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S146-153
- Kawada N, Inoue M. Effect of adrenomedullin on hepatic pericytes (stellate cells) of the rat. *FEBS Lett* 1994; 356: 109-113
- Kawada N, Klein H, Decker K. Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 1992; 285 (Pt 2): 367-371
- Kimura M, Kimura I, Kobayashi S. Relationship between cyclic AMP-dependent protein kinase activation and Ca uptake increase of sarcoplasmic reticulum fraction of hog biliary muscles relaxed by cholecystokinin-C-terminal peptides. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3077-3083
- Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117: 1205-1221
- Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* 2001; 104: 2485-2491

- Kolodney MS, Thimman MS, Honda HM, Tsai G, Yee HF, Jr. Ca²⁺-independent myosin II phosphorylation and contraction in chicken embryo fibroblasts. *J Physiol* 1999; 515 (Pt 1): 87-92
- Kravetz D, Bosch J, Arderiu MT, Pizcueta MP, Casamitjana R, Rivera F, Rodes J. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1988; 254: G322-328
- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 1993; 91: 344-349
- Lafontan M. Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell beta-1, beta-2 and beta-3 adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines. *Cell Signal* 1994; 6: 363-392
- Laleman W, Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int* 2005; 25: 1079-1090
- Laleman W, Van Landeghem L, Severi T, Vander Elst I, Zeegers M, Bisschops R, Van Pelt J, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, Nevens F. Both Ca²⁺ -dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *American journal of physiology* 2007a; 292: G556-564
- Laleman W, Van Landeghem L, Van der Elst I, Zeegers M, Fevery J, Nevens F. Nitroflurbiprofen, a nitric oxide-releasing cyclooxygenase inhibitor, improves cirrhotic portal hypertension in rats. *Gastroenterology* 2007b; 132: 709-719
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG, Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967; 214: 597-598
- Larsen TM, Toubro S, van Baak MA, Gottesdiener KM, Larson P, Saris WH, Astrup A. Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 780-788
- Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-24271
- Lebrec D, Moreau R. Pathogenesis of portal hypertension. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 309-311
- Lebrec D, Poynard T, Hillon P, Benhamou JP. Propranolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a controlled study. *N Engl J Med* 1981; 305: 1371-1374
- Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-633
- Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996; 23: 1616-1621
- Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 761-767

- MacGilchrist AJ, Sumner D, Reid JL. Impaired pressor reactivity in cirrhosis: evidence for a peripheral vascular defect. *Hepatology* 1991; 13: 689-694
- Martin CA, Advenier C. Beta 3-adrenoceptors and airways. *Fundam Clin Pharmacol* 1995; 9: 114-118
- 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
- Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; 103: 1649-1655
- Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 522-531
- Myers JD, Taylor WJ. Occlusive hepatic venous catheterization in the study of the normal liver, cirrhosis of the liver and noncirrhotic portal hypertension. *Circulation* 1956; 13: 368-380
- Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis-a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2006; 44: 111-117
- Nantel F, Marullo S, Krief S, Strosberg AD, Bouvier M. Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 13148-13155
- Nicholls KM, Shapiro MD, Van Putten VJ, Kluge R, Chung HM, Bichet DG, Schrier RW. Elevated plasma norepinephrine concentrations in decompensated cirrhosis. Association with increased secretion rates, normal clearance rates, and suppressibility by central blood volume expansion. *Circ Res* 1985; 56: 457-461
- Nomiya M, Yamaguchi O. A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *J Urol* 2003; 170: 649-653
- Novo E, Cannito S, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Caligiuri A, Cravanzola C, Compagnone A, Colombatto S, Marra F, Pinzani M, Parola M. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007; 170: 1942-1953
- Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1996; 27: 774-780
- Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 58-66
- Pascal JP, Cales P. Propranolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. *N Engl J Med* 1987; 317: 856-861
- Perri RE, Langer DA, Chatterjee S, Gibbons SJ, Gadgil J, Cao S, Farrugia G, Shah VH. Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *American journal of physiology* 2006; 290: G535-542
- Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91: 497-503

- Pinzani M. Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 1995; 22: 700-706
- Poynard T, Cales P, Pasta L, Ideo G, Pascal JP, Pagliaro L, Lebre C. Beta-adrenergic-antagonist drugs in the prevention of gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis and esophageal varices. An analysis of data and prognostic factors in 589 patients from four randomized clinical trials. Franco-Italian Multicenter Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324: 1532-1538
- Qiao J, Huang F, Lum H. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L972-980
- Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann WH. Liver cirrhosis--1: Pathogenesis and diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 975-977
- Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting J. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2003; 139: 186-193
- Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *British journal of pharmacology* 2002; 137: 153-161
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- Reynaert H, Urbain D, Geerts A. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 693-698
- Roberts SJ, Papaioannou M, Evans BA, Summers RJ. Functional and molecular evidence for beta 1-, beta 2- and beta 3- adrenoceptors in human colon. *British journal of pharmacology* 1997; 120: 1527-1535
- Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2-5
- Rouget C, Barthez O, Goirand F, Leroy MJ, Breuiller-Fouche M, Rakotoniaina Z, Guerard P, Morcillo EJ, Advenier C, Sagot P, Cabrol D, Dumas M, Bardou M. Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biol Reprod* 2006; 74: 209-216
- Rozec B, Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 652-673
- Rozec B, Serpillon S, Toumaniantz G, Seze C, Rautureau Y, Baron O, Noireaud J, Gauthier C. Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 351-359
- Sancho-Bru P, Bataller R, Colmenero J, Gasull X, Moreno M, Arroyo V, Brenner DA, Gines P. Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *American journal of physiology* 2006; 291: G877-884
- Schepke M, Heller J, Paschke S, Thomas J, Wolff M, Neef M, Malago M, Molderings GJ, Spengler U, Sauerbruch T. Contractile hyporesponsiveness of hepatic arteries in humans with cirrhosis: evidence for a receptor-specific mechanism. *Hepatology* 2001; 34: 884-888

- Schepke M, Kleber G, Nurnberg D, Willert J, Koch L, Veltzke-Schlieker W, Hellerbrand C, Kuth J, Schanz S, Kahl S, Fleig WE, Sauerbruch T. Ligation versus propranolol for the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 2004; 40: 65-72
- Schiedermaier P, Hansen S, Asdonk D, Brensing K, Sauerbruch T. Effects of ursodeoxycholic acid on splanchnic and systemic hemodynamics. A double-blind, cross-over, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Digestion* 2000; 61: 107-112
- Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113: 47-63
- Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 334-339
- Schubert GE, Bethke-Bedurftig BA, Bujnoch AW, Diem A. [Liver cirrhosis in autopsy material within 48 years. I. Changes of prevalence, regional differences (author's transl)]. *Z Gastroenterol* 1982; 20: 213-220
- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371: 838-851
- Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. In: Prescott DM, ed. *Methods of Cellular Biology*. New York: Academic Press, 1976: 29-83
- Seguchi H, Nishimura J, Zhou Y, Niuro N, Kumazawa J, Kanaide H. Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urol* 1998; 159: 2197-2201
- Seyde WC, Longnecker DE. Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology* 1984; 61: 686-698
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999a; 117: 1222-1228
- Shah V, Wiest R, Garcia-Cardena G, Cadelina G, Groszmann RJ, Sessa WC. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol* 1999b; 277: G463-468
- Shen YT, Cervoni P, Claus T, Vatner SF. Differences in beta 3-adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 1435-1443
- Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* 1985; 5: 643-648
- Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 1750-1754
- 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
- Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 421-450
- Strosberg AD, Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 373-381

- Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, Nagai A. Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 722-727
- Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
- 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
- Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *British journal of pharmacology* 1999; 128: 69-76
- Turnes J, Hernandez-Guerra M, Abalde JG, Bellot P, Oliva R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Influence of beta-2 adrenergic receptor gene polymorphism on the hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 34-41
- van Bockxmeer FM, Martin CE, Constable IJ. Effect of cyclic AMP on cellular contractility and DNA synthesis in chorioretinal fibroblasts maintained in collagen matrices. *Exp Cell Res* 1984; 155: 413-421
- Van de Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002; 51: 440-445
- 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
- Van De Casteele M, Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003; 2: 2
- Viard P, Macrez N, Coussin F, Morel JL, Mironneau J. Beta-3 adrenergic stimulation of L-type Ca(2+) channels in rat portal vein myocytes. *British journal of pharmacology* 2000; 129: 1497-1505
- Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Hernandez-Gea V, Lopez-Balaguer JM, Alvarez-Urturi C, Torras X, Balanzo J, Guarner C. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology* 2009; 137: 119-128
- Vrydag W, Michel MC. Tools to study beta3-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 374: 385-398
- Walston J, Lowe A, Silver K, Yang Y, Bodkin NL, Hansen BC, Shuldiner AR. The beta3-adrenergic receptor in the obesity and diabetes prone rhesus monkey is very similar to human and contains arginine at codon 64. *Gene* 1997; 188: 207-213
- Wiest R. Splanchnic and systemic vasodilation: the experimental models. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 3: S272-287

Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999; 104: 1223-1233

Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491

Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105: 741-748

Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, Garca-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 749-755

Zhang JX, Pegoli W, Jr., Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994; 266: G624-632

Zhang ZS, Cheng HJ, Onishi K, Ohte N, Wannenburg T, Cheng CP. Enhanced inhibition of L-type Ca²⁺ current by beta₃-adrenergic stimulation in failing rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1203-1211

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