

**Hämodynamische und renale Wirkung
des Urotensin II-Rezeptor-Antagonisten Palosuran
bei Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose**

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

Andreas Eckhardt

aus Koblenz

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Heller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.12.2024

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn

Meiner lieben Frau.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	9
1.1	Leberzirrhose	9
1.2	Komplikationen der Leberzirrhose	9
1.3	Portaler Hypertonus	10
1.3.1	Intrahepatische Genese	11
1.3.2	Splanchnische Genese (Vaskuläre Dysfunktion)	11
1.4	Renale Komplikationen	12
1.5	Therapie des portalen Hypertonus	14
1.6	Urotensin II und Urotensin II-Rezeptorantagonist Palosuran	17
1.7	Fragestellung	19
1.7.1	Senkt Palosuran den portalen Hypertonus bei i.v.-Gabe?	19
1.7.2	Wird der portale Hypertonus durch eine mehrtägige p.o.-Gabe von Palosuran reduziert?	19
1.7.3	Welche Auswirkung hat Palosuran auf die renale Funktion?	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Das Tiermodell der gallengangsligierten Ratte	20
2.2	Behandlung der Ratten mit Palosuran	20
2.3	Bestimmung der renalen Funktion	21
2.4	Bestimmung der Urotensin-II-Konzentration	21
2.5	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	21
2.6	Western Blotting	23
2.7	Bestimmung der Stickoxid-Konzentration in der A. mesenterica	24
2.8	Hämodynamische Versuche	24
2.8.1	Messung des mittleren arteriellen und portalen Druckes	24
2.8.2	Messung der Durchblutung mittels kolorierter Mikrosphären	25
2.9	Statistische Analysen	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Allgemeine Charakteristika	28
3.2	Biochemische Parameter	28
3.3	Urotensin-II-Konzentrationen	29

3.4	Die messenger-RNA-Level von RhoA, Rho-Kinase und eNOS	30
3.5	Proteinexpression von RhoA und Rho-Kinase in den Mesenterialarterien	32
3.6	Aktivität der Rho-Kinase	33
3.7	Proteinexpression von eNOS	34
3.8	Proteinexpression von iNOS	35
3.9	Aktivität der Protein Kinase G	36
3.10	Stickoxid-Konzentration in den Mesenterialarterien	37
3.11	Akute hämodynamische Versuche	38
3.12	Hämodynamische Versuche nach Behandlung mit Palosuran per os	42
3.13	Die renale Funktion	47
4.	Diskussion	50
5.	Zusammenfassung	54
6.	Abbildungsverzeichnis	55
7.	Tabellenverzeichnis	58
8.	Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

ADH	antidiuretisches Hormon
BDL	bile duct ligation / gallengangsligierte Ratten
CCl ₄	Tetrachlormethan
CSE	Cholesterinsyntheseenzym
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
GTPase	Enzym zur Hydrolyse von Guanosintriphosphat
HVPG	Hepatovenöser Druckgradient
HRS	Hepatorenales Syndrom
Hsp90	heat shock protein 90
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
i.v.	intravenös
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
mRNA	messenger-RNA
NO	Stickstoffmonoxid
p.o.	per os
p-Moesin	phosphoryliertes Moesin
p-VASP	phosphoryliertes Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
PKG	Protein Kinase G
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ras	Rat sarcoma

RhoA	Ras-homologes Familienmitglied A
Rho-Kinase	Kinase der Ras-homologen Familie
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TIPS	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

1. Einleitung

1.1 Leberzirrhose

Die Leberzirrhose stellt das Endstadium vieler chronischer Lebererkrankungen dar und entsteht über die Vorstufe einer zunehmenden Fibrosierung der Leber im Sinne einer Vermehrung vor allem des perisinusoidalen Bindegewebes über Jahre bis Jahrzehnte. Zusätzlich bilden sich Regeneratknoten, die durch Bindegewebssepten getrennt werden. (Rabe et al., 2001). Durch die Aufhebung der normalen Läppchenarchitektur der Leber kommt es zu einer Verringerung der funktionellen Lebermasse und somit zu einer Abnahme der metabolischen Funktion im Sinne von Synthese und Entgiftung. Die Veränderung der perisinusoidalen extrazellulären Matrix führt zu einem Verlust der Endothelfenestration der Lebersinusoide und somit zu einer Einschränkung des Stoffaustausches (Li und Friedman, 1999). Zum anderen führt der Parenchym- und Gefäßumbau zu einer Widerstandserhöhung im portalvenösen Stromgebiet und damit zur Entwicklung des Pfortaderhochdrucks, was in der Folge auch auf die systemische Hämodynamik und die Funktion anderer Organe Einfluss hat (Bosch und Garcia-Pagan, 2000).

Man unterscheidet eine asymptomatische Phase bzw. kompensierte Leberzirrhose von einer durch das Auftreten klinischer Komplikationen gekennzeichneten symptomatischen Phase im Sinne einer dekompenzierten Leberzirrhose (Gines et al., 2021). Zu den weltweit häufigsten Ursachen der Leberzirrhose zählen der schädliche Alkoholkonsum, die chronische Virushepatitis B und C und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (Huang et al., 2023). Da die Bedeutung und Verfügbarkeit nicht-invasiver Screeningmethoden wie z.B. die Elastographie der Leber im Sinne einer Lebersteifigkeitsmessung mit Einteilung in ein Fibroestadium der fortgeschrittenen Lebererkrankung bzw. advanced chronic liver disease zunehmen, gibt es Hinweise, dass durch eine Intervention mit Lebensstiländerung sowie eine Behandlung der Ätiologie eine Verbesserung der Lebersteifigkeit und damit Fibrose möglich ist (Semmler et al., 2023).

1.2 Komplikationen der Leberzirrhose

Die führenden Komplikationen der Leberzirrhose sind das Auftreten von Aszites und die Entwicklung von Ösophagusvarizen mit der Gefahr von lebensbedrohlichen varikösen Blutungen, die sich beide über die zunehmende portale Hypertension einwickeln. Hier-

über können auch eine spontan bakterielle Peritonitis, eine hepatische Enzephalopathie, ein hepatorenales Syndrom oder ein hepatopulmonales Syndrom entstehen. Außerdem ist die Inzidenz eines hepatozellulären Karzinoms deutlich erhöht. Der zunehmende Funktionsverlust der Leber im Rahmen der dekompenzierten Leberzirrhose endet schließlich im chronischen Leberversagen.

1.3 Portaler Hypertonus

Die Durchblutung der Leber setzt sich zu 1/3 aus der Arteria hepatica propria und zu 2/3 aus der Vena portae zusammen. Bei der Entstehung des portalen Hypertonus unterscheidet man eine prä-, intra- und posthepatische Genese. Die prähepatische (z.B. Schistosomiasis-Infektion) und die posthepatische Entwicklung (z.B. Budd-Chiari-Syndrom als thrombotische Verlegung der Lebervenen) sind unabhängig vom Vorliegen einer Leberzirrhose (Groszmann et al., 1988; Gioia et al., 2020).

Der portale Hypertonus ist definiert als portalvenöse Druckerhöhung größer als 7 mmHg bzw. als erhöhte Druckdifferenz zwischen Pfortader und unterer Hohlvene mehr als 5 mmHg (Bosch und Garcia-Pagan, 2000). Nach dem Ohm'schen Gesetz entspricht die Höhe des Pfortaderdrucks (P) dem Produkt aus Blutfluss (Q) und Gefäßwiderstand (R). Dementsprechend kann sich ein portaler Hypertonus durch eine hyperdynamische Situation im splanchnischen Zuflussgebiet entwickeln (forward flow-Theorie) oder über eine intrahepatische Widerstandserhöhung (backward flow-Theorie) (Benoit et al., 1985; Yoshida et al., 2023).

Im Rahmen der Baveno VII-Konferenz wurden Alternativen zur invasiven Messung des hepatovenösen Druckgradienten (HVPG) zur Ermittlung des portalen Hypertonus diskutiert, die aber weiterhin als Goldstandard gilt. Zur nicht-invasiven Risikoabschätzung einer klinisch relevanten portalen Hypertension werden die Elastographie zur Lebersteifigkeitsmessung, der liver spleen platelet Score aus Lebersteifigkeit, Milzlänge und Thrombozytenanzahl, die Elastographie zur Milzsteifigkeitsmessung und der Quotient aus von-Willebrand-Faktor-Antigen zu Thrombozytenanzahl empfohlen mit entsprechenden Referenzbereichen im Sinne eines Ein- oder Ausschlusses (de Franchis et al., 2022). Die prognostischen Leistungen etablierter nicht-invasiver Tests und des hepatischen Druckgradienten sind vergleichbar (Jachs et al., 2024).

1.3.1 Intrahepatische Genese

Durch den fibrosierenden Leberumbau mit Kollagenablagerungen, Bindegewebssepten und Regeneratknoten kommt es zu einer mechanischen Einengung vor allem der Sinusoide. Neben diesen Umbauvorgängen erhöht sich der intrahepatische Gefäßwiderstand durch Kontraktion zum einen der zuführenden portalen Venolen und zum anderen der perisinusoidalen Myofibroblasten, die sich aus Kupfferschen Sternzellen entwickelt haben (Bauer et al., 1994; Kaneda et al., 1998). Diese intrahepatischen Struktur- und Funktionsstörungen sind die beiden Hauptfaktoren der backward flow-Theorie. Die im nächsten Schritt als Folge von vasoaktiven Substanzen entstehende splanchnische Vasodilatation führt über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems letztlich zu einer weiteren Erhöhung des intrahepatischen vaskulären Widerstandes (Bolognesi et al., 2014).

1.3.2 Splanchnische Genese (Vaskuläre Hypokontraktilität)

Ursächlich wird hier die splanchnische Vasodilatation mit konsekutiv erhöhtem portalem Blutfluss im Sinne einer hyperdynamen Kreislaufsituation angesehen. Neben der gesteigerten NO (Stickstoffmonoxid)-Produktion im Endothel spielt auch vor allem das verminderte Ansprechen auf Vasokonstriktoren eine entscheidende Rolle. Hier konnte eine Störung der postrezeptorischen Kaskade nachgewiesen werden, der zur vaskulären Hypokontraktilität führt (MacGilchrist et al., 1991; Schepke et al., 2001; Sogni et al., 1996; Vallance und Moncada, 1991).

Die gesteigerte Produktion des Vasodilatators NO rührt zum einen von einer Überexpression der konstitutiven endothelialen NO-Synthetase (eNOS), was sich unter anderem über erhöhte Scherkräfte erklärt (Hori et al., 1998; Lopez-Talavera et al., 1995; Wiest et al., 1999). Zum anderen erfolgt durch Phosphorylierung eine vermehrte Aktivierung der eNOS durch zum Beispiel Phosphokinase B (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Morales-Ruiz et al., 2003) oder vermehrte Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin und Hsp90 (Ai et al., 2003; Schmidt und Alp, 2007; Shah et al., 1999). Darüber hinaus finden sich bei Leberzirrhose auch erhöhte Konzentrationen zirkulierender Hormone, die die eNOS aktivieren, wie zum Beispiel Endocannabinoide und Adrenomedullin (Batkai et al., 2001; Domenicali et al., 2005; Genesca et al., 1999). Da auch in isolierten Mesenterialgefäßen, also ohne beeinflussende zirkulierende vasoaktive Substanzen, ohne Endothel sowie bei inhibierter eNOS und in eNOS-knock-out-Mäusen die vaskuläre Hypokontraktilität nach-

gewiesen werden konnte, muss von einem Defekt in der Signalkaskade zur Kontraktion der vaskulären glatten Muskelzelle ausgegangen werden (Heinemann et al., 1997; Heller et al., 1999; Iwakiri et al., 2002; Schepke et al., 2001).

Es sind zwei unabhängige kontraktile Signalwege in den glatten Muskelzellen beschrieben. Einerseits gibt es den Ca^{2+} -abhängigen Weg über die Phospholipase C (PLC) und IP_3 sowie andererseits einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg über die GTPase RhoA und Rho-Kinase, die beide in der Myosin-Phosphorylierung und damit Kontraktion der glatten Muskulatur enden. Sowohl bei zirrhotischen Ratten als auch Menschen wurden zwei Signaltransduktions-Defekte via RhoA/Rho-Kinase gefunden. Eine posttranskriptionelle Downregulation der Rho-Kinase und eine verminderte Aktivierung von RhoA haben eine erniedrigte Kalziumsensitivität und einen reduzierten Ruhetonus der vaskulären glatten Muskelzellen zur Folge (Hennenberg et al., 2006, 2007).

1.4 Renale Komplikationen

Die hyperdynamische Situation im splanchnischen Zuflussgebiet (forward flow-Theorie) wird als Hauptursache für die Aszitesbildung bei portalem Hypertonus und Leberzirrhose angesehen. Trotz erhöhtem Blutfluss im Splanchnikusgebiet liegt systemisch arteriell ein relativ gesehenes erniedrigtes Blutvolumen vor, sodass es kompensatorisch vor allem zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einschließlich vermehrter Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH) (Francoz et al., 2019).

Durch die gesteigerte splanchnische Mikrozirkulation kommt es zur Erhöhung des kapillaren Drucks mit gesteigerter Permeabilität und damit Lymphbildung. Im Rahmen der Aktivierung von RAAS mit Vasokonstriktion sowie verringerter Natriurese und ADH-Ausschüttung mit Rückgang des Harnvolumens tritt eine effektive Flüssigkeits- und Natriumretention durch die Nieren ein. Diese aufgeführten Mechanismen unterhalten eine kontinuierliche Aszitesbildung (Arroyo und Jimenez, 2000; Schrier et al., 1988).

Bei vielen Patienten mit Leberzirrhose und Aszites findet sich unabhängig von der Natriumaufnahme über die Ernährung und der eventuell eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR) eine gesteigerte tubuläre Natriumrückresorption (Jimenez und Arroyo, 1993). Neben der führenden Rückresorption durch Aldosteron im distalen Tubulus (über das RAAS) wird Natrium auch über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems im proximalen Tubulus, in die Henle Schleife und im distalen Sammelrohr wieder aufgenommen. Als Gegenspieler finden sich die natriuretischen Peptide, die die Natriumrück-

resorption in den distalen Sammelrohren hemmen im Sinne einer Natriurese (Arroyo und Jimenez, 2000).

Bei Zirrhose-Patienten mit Aszites konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung von Renin und Aldosteron im Wesentlichen durch eine vermehrte Sekretion und nicht durch einen verminderten Abbau durch die eingeschränkte Leberfunktion im Rahmen der Leberzirrhose zu erklären ist (Gines und Arroyo, 1999). Die erhöhten Katecholamin-Plasmaspiegel bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites werden als Zeichen einer erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems gewertet, da Noradrenalin führend als Neurotransmitter in den sympathischen Nervenendigungen ausgeschüttet wird. Die Differenz der Adrenalin-Plasmakonzentrationen mit Erhöhung in der Nierenvene gegenüber der renalen Arterie weist auf eine Aktivierung des renalen Sympathikus-Anteils hin (Esler et al., 1992).

Trotz erhöhter Plasmakonzentrationen der natriuretischen Peptide bei Zirrhose-Patienten mit Aszites (Gines et al., 1988; La Villa et al., 1992) überwiegt letztlich der Einfluss der unabhängigen Elevation von Renin-, Adrenalin- und Aldosteron. Im Rahmen der kompensierten Leberzirrhose wird nur unter orthostatischer Belastung eine renale Natriumretention beobachtet, was bei normwertigem Renin-Spiegel über eine gesteigerte intrarenale RAAS-Aktivierung zu erklären ist. Erst im Rahmen des Fortschreitens der Leberzirrhose mit zunehmender splanchnischer Vasodilatation und konsekutivem portalen Hypertension kommt es zur kompensatorischen systemischen Aktivierung des RAAS (Girgrah et al., 2000; Wong et al., 2002).

Als hepatorenales Syndrom (HRS) wird die fortschreitende, potentiell reversible Nierenfunktionsstörung im Rahmen der dekompenzierten Leberzirrhose nach Ausschluss anderer Ursachen bezeichnet. Man unterscheidet das akut auftretende HRS Typ 1 vom langsam entstehenden HRS Typ 2 mit sukzessivem Anstieg des Serumkreatinins auf $> 1,5$ mg/dl. Entsprechend der überarbeiteten Definition des international club of ascites handelt es sich um ein hepatorenales Syndrom Typ 1 mit der Notwendigkeit einer Therapieeinleitung mit in erster Linie Terlipressin und Albumin, wenn sich trotz Pausieren von nephrotoxischen Medikamenten, Behandlung einer Infektion und Pausierung von Diuretika sowie anschließender Behandlung mittels Plasmaexpansion mit Albumin (1 g/kgKG) über 48 Stunden keine Verbesserung des Serumkreatinins mit einer maximalen Erhöhung bis zu 0,3 mg/dl gegenüber dem Vorwert einstellt (Angeli et al., 2015). Neben der deutlichen Einschränkung der Lebensqualität weist das hepatorenale Syndrom weiterhin eine sehr

schlechte Prognose auf und die ideale definitive Therapie besteht entweder in einer Leber- oder simultanen Leber- und Nierentransplantation (Pose et al., 2024).

Ursächlich für das hepatorenale Syndrom wird eine weitere Zunahme der Dysbalance zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Stoffen mit Folge einer weiteren Verschlechterung der Nierendurchblutung angenommen. Durch die splanchnische Vasodilatation und schließlich auch systemische arterielle Hypotonie kommt es zur kompensatorischen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einschließlich vermehrter Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH), was die renalen vasodilatatorischen Faktoren in Form von Prostaglandinen, NO und natriuretischen Peptiden überwiegt und damit zu einer renalen Vasokonstriktion mit Minderdurchblutung und deutlicher Abnahme der Nierenfunktion führt (Gines und Arroyo, 1999).

1.5 Therapie des portalen Hypertonus

Ein seit Jahren etablierter medikamentöser Therapieansatz ist die Reduzierung der splanchnischen Vasodilatation mittels unselektiver Betablocker wie z.B. Propranolol und Nadolol. Neben der Wirkung über die Blockade der β_1 -Rezeptoren mit Abfall des Herzzeitvolumens erfolgt außerdem die wichtigere Antagonisierung am β_2 -Rezeptor mit daraus folgender splanchnischer Vasokonstriktion. Dies führt zu einem effektiven Abfall des portalen Hypertonus und auch des intravarikösen Drucks, sodass die Indikation zur Primär- und Sekundärprophylaxe bei Ösophagusvarizen besteht (Feu et al., 1993; Mastai et al., 1987). Aufgrund der stärkeren Reduktion des hepatovenösen Druckgradienten (HVPG) ist mittlerweile der unselektive Betablocker Carvedilol als kompetitiver Antagonist an α_1 -, β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren in niedriger Dosierung Mittel der 1. Wahl (Villanueva et al., 2019). Generell sollte eine Dosissteigerung der unselektiven Betablocker unter Beachtung der Herzfrequenz und des Blutdruckes erfolgen (Banares et al., 2002). Entsprechend der Empfehlung der Baveno VII-Konferenz soll eine unselektive Betablockertherapie in Form von Carvedilol bereits bei Patienten mit kompensierter Leberzirrhose bzw. advanced chronic liver disease und klinisch signifikantem portalen Hypertonus eingesetzt werden, um Dekompensationseignisse zu vermeiden (de Franchis et al., 2022; Villanueva et al., 2019).

Als stärkster splanchnischer Vasokonstriktor gilt Vasopressin, das jedoch durch die generalisierte Vasokonstriktion systemische Ischämien hervorrufen kann, wie zum Beispiel einen Myokardinfarkt oder einen Apoplex (Bosch et al., 1988; D'Amico et al., 1995). Das

synthetische Analogon Terlipressin wird aufgrund des günstigeren systemischen Nebenwirkungsprofils in der Behandlung der akuten Varizenblutung eingesetzt. Somatostatin einschließlich seiner Analoga Octreotid und Lanreotid führt zur einer Senkung des portalen Hypertonus durch eine selektive splanchnische Vasokonstriktion ohne begleitender Wirkung auf den systemischen Widerstand oder den mittleren arteriellen Blutdruck (Kravetz et al., 1988).

Durch die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit einem Angiotensin II-Rezeptor 1-Antagonisten wie zum Beispiel Losartan lässt sich eine Reduzierung des Pfortaderhochdrucks bei konstantem mittlerem arteriellem Druck erreichen (Schneider et al., 1999). Dies konnte im Tierversuch bestätigt werden mit zusätzlicher Verbesserung der Nierenfunktion (Heller et al., 2005). Zur Therapie der renalen Flüssigkeits- und Natriumretention haben Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten wie Spironolacton ihren Stellenwert, da hierdurch auch der portale Hochdruck gesenkt wird (Garcia-Pagan et al., 1994).

Zur Senkung des intrahepatischen Widerstandes wäre die Beseitigung des lokalen NO-Defizites in der zirrhotischen Leber eine Therapieoption. Auf der einen Seite können hierfür allgemeine NO-Donatoren wie Nitroglyzerin, Isosorbidmononitrat (ISMN) oder -dinitrat (ISDN) eingesetzt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ISMN neben der erwünschten Senkung des hepatovenösen Druckgradienten (HVPG) auch zu erheblichen systemischen Nebenwirkungen durch den Abfall des mittleren arteriellen Druckes und des Herzzeitvolumens führt mit kompensatorischer Aktivierung vasokonstriktiver Systeme sowie renaler Flüssigkeits- und Natriumretention mit letztlich Verschlechterung der Nierenfunktion (Bosch und Garcia-Pagan, 2000). Durch die Kombination von ISMN mit Propranolol können die unerwünschten Wirkungen reduziert werden bei gleichzeitig verstärkter Senkung des Pfortaderhochdrucks. Auf der anderen Seite erhofft man sich durch die Gabe leberspezifischer NO-Donatoren wie etwa an Ursodesoxycholsäuregekoppeltes NO eine Reduktion des portalen Hypertonus ohne systemische Wirkungen. Die Behandlung mit einem Cholesterinsyntheseenzym-Hemmer (CSE-Hemmer) wie Atorvastatin führte in Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose zu einer Steigerung des eNOS- /NO-Signalwegs und einer Hemmung des RhoA- /Rho-Kinase-Signalwegs mit daraus resultierender verminderter Kontraktionsfähigkeit der aktivierten Sternzellen (Trebicka et al., 2007). Auch eine Wirkung auf eNOS-regulierende Faktoren und eine Erhöhung der Aktivität der Superoxiddismutase werden diskutiert.

Die Blockade der in der zirrhotischen Leber deutlich überwiegenden intrahepatischen Vasokonstriktoren ist ein vielversprechender theoretischer Ansatz. Der α 1-Adrenozeptor-Antagonist Prazosin führt zwar zu einer Senkung des HVPG allerdings unter Inkaufnahme systemischen Nebenwirkungen (Albillos et al., 1995). Auch hier konnte die Kombination mit einem unselektiven Betablocker unerwünschte systemische Wirkungen wie generelle Vasokonstriktion, renale Plasmaexpansion und Verschlechterung der Nierenfunktion verhindern (Albillos et al., 1998). Der zentrale α 2-Blocker Clonidin führt sowohl zu einer starken Absenkung des HVPG als auch zu einem deutlichen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes; lediglich die Nierenfunktion verbleibt ohne direkten Einfluss (Albillos et al., 1992). Der weiter oben bereits erwähnte unspezifische Betablocker mit zusätzlichem α 1-Antagonismus Carvedilol senkt den HVPG stärker als Propranolol mit allerdings auch begleitendem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (Banares et al., 1999). Am Endothelin-Rezeptor wirksame Substanzen bewirken eine Vasodilatation und verminderte Sternzellkontraktion, wobei sowohl eine ETA-Rezeptor-Blockade als auch eine Aktivierung des ETB-Rezeptors diese Effekte zeigen.

Außerdem besteht die Möglichkeit einer Senkung des intrahepatischen Widerstandes durch Anlage eines Shunts, entweder im Rahmen einer operativen Anlage von Shuntverbindungen oder minimal invasiv im Sinne der Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS). Letztere ist komplikationsärmer und zeigt gute Langzeiterfolge, sodass sie die operative Anlage abgelöst hat. Die wichtigsten Nebenwirkungen des TIPS sind eine Zunahme der hepatischen Enzephalopathie und Verschlüsse des Stents; die Rate der Stentverschlüsse konnte durch die Verwendung gecoverter Stents reduziert werden (Rajesh et al., 2020). Sowohl die akute Varizenblutung als auch der therapierefraktäre Aszites sind etablierte Indikationen zur TIPS-Anlage. Die korrekte Indikationsstellung und Patientenselektion reduziert potentielle Komplikationen des TIPS (Bettinger et al., 2022). Im Hinblick auf die Baveno VII-Konferenz soll aufgrund des signifikanten Überlebensvorteils eine präemptive TIPS-Implantation bei schwerer Varizenblutung in einem Zeitraum von weniger als 72 Stunden erfolgen bei einem Child-Pugh-Stadium B mit 8 oder 9 Punkten und aktiver Varizenblutung während der Endoskopie sowie bei einem Child-Pugh-Stadium C mit 10 bis 13 Punkten (Gralnek et al., 2022; Hernandez-Gea et al., 2019; Nicoara-Farcau et al., 2024). Prognostische Vorhersagemodelle zur Identifizierung der optimalen Patienten für die präemptive TIPS-Anlage werden aktuell entwickelt und validiert (Bettinger et al., 2021; Lv et al., 2024).

In der klinischen Praxis stehen in der medikamentösen Therapie der portalen Hypertension unselektive Betablocker, Vasopressin- und Somatostatin-Analoga, Humanalbumin sowie Diuretika zur Verfügung (de Franchis et al., 2022). Zusammengefasst erklärt am ehesten die pathogene Komplexität der portalen Hypertonie die bisher erfolglose Überführung präklinischer Studienerfolge hin zur Entwicklung neuer wirksamer Therapeutika für Patienten mit Leberzirrhose (Iwakiri und Trebicka, 2021).

1.6 Urotensin II und Urotensin II-Rezeptorantagonist Palosuran

Urotensin II ist ein zyklisches Oligopeptid, das sowohl im Menschen als auch der Ratte vorkommt und als Agonist an den Urotensin II-Rezeptor bindet. Es weist ein vasoaktives Potential auf, hierbei zeigt sich vor allem eine starke Vasokonstriktion (Ames et al., 1999; Douglas et al., 2000a, 2000b). Je nach Zielzelle und Gefäßregion beeinflusst die Aktivierung des Urotensin II-Rezeptors durch Urotensin II unterschiedliche intrazelluläre Signalwege (Gardiner et al., 2001, 2006). So führt die Aktivierung des Urotensin II-Rezeptors im Endothel zu einer NO-vermittelten Dilatation (Bottrill et al., 2000; Zhu et al., 2006), in der vaskulären glatten Muskelzelle über die RhoA/ Rho-Kinase-Aktivierung hingegen zur Kontraktion (Sauzeau et al., 2001; Watanabe et al., 2006). In der Niere beeinflusst die Rezeptor-Aktivierung die Nierenfunktion mit Natrium- und Wasserretention sowie Reduzierung der glomerulären Filtrationsrate (Balment et al., 2005; Matsushita et al., 2003; Song et al., 2006). Die pharmakologische Hemmung oder genetische Ablation des Urotensin-II-Rezeptors linderte Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Nagetieren (Michael et al., 2024)

Bei Patienten mit Leberzirrhose können erhöhte Plasmakonzentrationen von Urotensin II nachgewiesen werden. Diese Erhöhung korreliert mit einem erhöhten Pfortaderdruck und einem erniedrigten mittleren arteriellen Blutdruck (Heller et al., 2002; Kemp et al., 2007). Darüber hinaus waren die Plasmakonzentrationen bei Patienten mit portalem Hyperonus mit Aszites höher als bei Fehlen von Aszites. Ferner korrelieren erhöhte Plasmakonzentrationen von Urotensin II auch mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion (Heller et al., 2002; Kemp et al., 2007). Mittels Immunhistochemie konnten in menschlichen zirrhotischen Lebern keine signifikanten Unterschiede von Urotensin II und Urotensin II-Rezeptor nachgewiesen werden, allerdings bei Patienten mit fulminantem Leberversagen (Leifeld et al., 2010). Die kontinuierliche Infusion von Urotensin II über 4 Wochen führte bei gesunden Ratten zu einem dosisabhängigen Anstieg des portalen Hypertonus und

induzierte eine Leberfibrose (Kemp et al., 2009). Es darf daher vermutet werden, dass Urotensin II bei bestehender Leberzirrhose ein Vermittler für die splanchnische Vasodilatation und damit den portalen Hypertonus sowie für eine Verschlechterung der Nierenfunktion ist (Trebicka et al., 2008). Da bisher keine klinisch wirksamen Modulatoren des Urotensin II-Rezeptors entwickelt worden sind, werden aktuell neue peptische antagonisierende Analoga des menschlichen Urotensin II ex-vivo getestet, deren teilweise nicht-kompetitive Modulation über das Konzept einer lateralen Allosterie eines multimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptormodells erklärt wird (Merlino et al., 2024).

Palosuran ist ein 4-Ureido-Quinoline-Derivat (ACT-058362). Es handelt sich hierbei um einen spezifischen kompetitiven nichtpeptischen Urotensin II-Rezeptorantagonist (Clozel et al., 2004). Bei an Diabetes erkrankten Nagetieren und Patienten führte Palosuran zu einer Verbesserung der Nierenfunktion (Clozel et al., 2006; Sidharta et al., 2006). Demgegenüber zeigte Palosuran in einer doppelverblindeten und Placebo-kontrollierten Studie kombiniert mit einem Blocker des RAAS bei Patienten mit diabetischer Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 2 keinen signifikanten Effekt auf die Albuminurie, den Blutdruck oder die glomeruläre Filtrationsrate (Vogt et al., 2010). Bei Ratten, die zusätzlich zu Cyclosporin A Palosuran erhielten, wurde die Nephrotoxizität abgeschwächt gegenüber unbehandelten Ratten; ob der nephroprotektive Effekt von Palosuran möglicherweise unabhängig von seinem Urotensin-II-Rezeptor-Antagonismus ist, bleibt zu diskutieren (Olukman et al., 2019).

Durch eine vierwöchige Gabe von Palosuran konnte bei Ratten mit CCl₄-induzierter Leberzirrhose ein signifikanter Abfall des portalen Hypertonus nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde einem Rückgang der hepatischen Fibrose und einer verstärkten eNOS-abhängigen Gefäßerweiterung der hepatischen Sternzellen zugeschrieben (Zhang, 2019). Die Wirkung von Palosuran auf den portalen Hypertonus bei Leberzirrhose bei gallengangsligierten Ratten ist bisher noch nicht untersucht worden.

1.7 Fragestellung

1.7.1 Senkt Palosuran den portalen Hypertonus bei i.v.-Gabe?

Es ist bekannt, dass sich bei Patienten mit Leberzirrhose erhöhte Spiegel von Urotensin II finden (Heller et al., 2002). Da die Erhöhung mit einem portalen Hypertonus korreliert, wird vermutet, dass Urotensin II Einfluss auf die splanchnische Vasodilatation und damit den portalen Hypertonus nimmt. Die Wirkung des spezifischen Urotensin II-Rezeptorantagonisten Palosuran auf den portalen Hypertonus wurde bisher nicht untersucht. Es ist daher das Ziel, diese Wirkung am Tiermodell zu untersuchen. Mittels intravenöser Gabe soll eine akute hämodynamische Wirkung evaluiert werden.

1.7.2 Wird der portale Hypertonus durch eine mehrtägige p.o.-Gabe von Palosuran reduziert?

Da es im Rahmen der Entwicklung einer Leberzirrhose mit Pfortaderhochdruck zur kompensatorischen Aktivierung vasoaktiver Systeme wie z.B. dem RAAS kommt, ist durch die erhöhte Plasmakonzentration von Urotensin II zu vermuten, dass auch Urotensin II in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des portalen Hypertonus eine Rolle spielt. Die Wirkung des spezifischen Urotensin II-Rezeptorantagonisten Palosuran auf den portalen Hypertonus wurde bisher nicht untersucht. Nach mehrtägiger oraler Zufuhr soll an gallengangligierten Ratten mit konsekutiver sekundär biliärer Zirrhose eine hämodynamische Wirkung sowie eine Veränderung der zellulären Signalkaskaden im Splanchnikusgebiet untersucht werden.

1.8.3 Welche Auswirkung hat Palosuran auf die renale Funktion?

Begleitend soll außerdem der Effekt des Urotensin II-Rezeptorantagonisten Palosuran auf die Nierenfunktion untersucht werden. Diesbezüglich ist vorbeschrieben, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Urotensin II mit einer Natrium- und Wasserretention sowie Reduzierung der glomerulären Filtrationsrate korrelieren (Heller et al., 2002).

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell der gallengangsligierten Ratte

Für die Experimente wurden insgesamt 88 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Anfangsgewicht von 180-200 g verwendet. Bei 56 wurde wie weiter unten beschrieben eine Gallengangsligatur durchgeführt. Die restlichen 32 Ratten dienten als Sham-operierte Kontrollen.

Zur Induktion einer sekundär biliären Zirrhose wurde unter Ketamin-Narkose (60 mg/kgKG intramuskulär Ketanest S, 25 mg/ml, Esketamin Hydrochlorid, Parke-Davis GmbH, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach medianer Laparotomie der Ductus choledochus durch eine doppelte Ligatur mit einem resorbierbaren Faden (Monocryl 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und zwischen den beiden Ligaturen durchtrennt. Muskelschicht und Fell wurden anschließend separat zugenäht (Monocryl 5-0 bzw. Mersilene 0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Nach vier bis fünf Wochen bildete sich eine sekundär biliäre Zirrhose aus. Die Tiere entwickelten eine zirrhotisch umgebaute Leber mit hyperdynamischer Zirkulation und Aszitesbildung. Die Sham-operierten Ratten stellten die Kontrollgruppe dar. Hier wurde wie bei der eigentlichen Gallengangsligatur unter Ketamin-Narkose der Gallengang freipräpariert, es wurden jedoch keine Ligaturen gesetzt. Die Tierexperimente wurden von dem lokalen Komitee für Tierstudien der Bezirksregierung Köln genehmigt (50.203.2-Bn 22, 18/06).

2.2 Behandlung der Ratten mit Palosuran

Fünf Wochen nach der Gallengangsligatur, wenn sich die sekundär biliäre Zirrhose voll entwickelt hatte, wurde randomisiert eine Gruppe der Ratten (n=18) über eine Dauer von drei Tagen täglich mit Palosuran (30 mg/kg Körpergewicht) über eine Schlucksonde behandelt. Der zweiten Gruppe (n=6) wurde drei Stunden vor ihrem Tod Palosuran (0,6 mg/kg Körpergewicht) in die Leistenvene appliziert. Die übrigen gallengangsligierten Ratten blieben unbehandelt.

2.3 Bestimmung der renalen Funktion

Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden spezielle individuelle metabolische Käfige (Techniplast, Buguggiate, Italien) benutzt. Fünf Wochen nach ihrer Operation wurden die Ratten für vier Tage bei Zugang zum Standardfutter und Wasser ad libitum in diesen Käfigen gehalten.

Es wurden drei Gruppen zu je neun Tieren gebildet. Eine Gruppe gallengangligierten Ratten wurde mit Palosuran behandelt, die andere Gruppe nicht. Die Sham-operierten Ratten dienten als Kontrolle.

Während dieser vier Tage wurde täglich die Ein- und Ausfuhr der Tiere genau protokolliert und Palosuran (30 mg/kg Körpergewicht) oder die entsprechende Menge an Wasser über eine Sonde für drei Tage appliziert. Am letzten Tag wurden die Ratten getötet und jeweils eine Urin- und Serumprobe gewonnen. Neben der Natrium- und Kreatininausscheidung im Urin wurden im Serum die Werte für Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Kreatinin und Natrium nach den klinischen Standardmethoden bestimmt und die Kreatinin-clearance errechnet.

Das Serum wurde intrakardial abgenommen und sofort auf Eis gelagert. Die Proben wurden bei 3500 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände dann bei -80°C gelagert.

2.4 Bestimmung der Urotensin II-Konzentration

Die Höhe des Urotensin II-Plasmaspiegels wurde mit einem Enzym-Immunoassay-Kit (Phoenix Pharmaceutical Inc., St. Joseph, USA) entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers bestimmt. Der Nachweis von Urotensin II beruht dabei auf dem Prinzip eines kompetitiven Enzym-Immunoassay.

2.5 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um die messenger-RNA-Level (mRNA) verschiedener in der Signalkaskade des Gefäßtonus wichtiger Proteine in den Mesenterialgefäßen zu bestimmen, wurde jeweils aus 30 mg Homogenisat der schockgefrorenen Probe der Mesenterialarterie RNA mit Hilfe des RNeasy-mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers isoliert. Bei jeder reversen Transkriptase-Polymerase-

Kettenreaktion (RT-PCR) wurden 0,5 µg RNA als Matrize 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 DNA zu verdauen. Die reverse Transkription wurde mit MMLV reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und zufälligen Primern (1 µg, Promega, Madison, USA) durchgeführt. Die Primer und Sonden für die RT-PCR wurden mittels der Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) entworfen und von Microsynth und Applied Biosystems entsprechend synthetisiert (Tab. 1). Als endogene Kontrolle diente 18SrRNA (Applied Biosystems, Foster City, USA). Zur Durchführung der RT-PCR wurde ein ABI 7300 Sequenzdetektor verwendet (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt und enthielten 12,5 µl 2xTaqMan-PCR Master-Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 2 µl komplementäre DNA.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde die ΔC_T -Methode angewendet. Der Unterschied zwischen der Anzahl der Zyklen (C_T) der Zielgene und der endogenen Kontrolle wurden als negatives ΔC_T ausgedrückt. Ein stark negatives ΔC_T entsprach damit einem hohen mRNA-Level. Für jedes Gen wurde ein Experiment zur Validierung durchgeführt. Die Effizienz der RT-PCR war dabei für das Zielgen und die endogene Kontrolle annähernd gleich.

Tab. 1: Primer und Sonden, die für die quantitative RT-PCR von RhoA, Rho-Kinase und eNOS benutzt wurden

Gen	Primer/Sonden Sequenz 5'-3' (vorwärts/revers/Sonde)	Primer/Sonden Konzentration (nM)
RhoA	GGCAGAGATATGGCAAACAGG,	300
	TCCGTCTTTGGTCTTTGCTGA,	300
	CACTCCATGTACCCAAAAGCGCCAAM	100
Rho-Kinase	CCCGATCATCCCCTAGAACC,	300
	TTGGAGCAAGCTGTCTGACTG,	300
	ACAAAACCAGTCCATTCGGCGGC	200
eNOS	CTACCGGGACGAGGTACTGG,	100
	GGAAAAGGCGGTGAGGACTT,	100
	CGCCCAGCAGCGTGGAGTGTTT	200

2.6 Western Blotting

Die Auswirkungen der Expression des Urotensin II-Rezeptors in den Mesenterialgefäßen wurde mittels Western Blotting bestimmt. Dafür wurden Proben von schockgefrorenen Mesenterialarterien in einem Puffer (25 mM Tris/HCl, 5 mM Ethylendiamin-Tetraacetatessig, 10 µM Phenylmethansulfonyl-Fluorid, 1 mM Benzamidin und 10 µg/ml Leupeptin) homogenisiert und verdünnt. Die Proteinbestimmung der Homogenisate erfolgte mit Hilfe des DC Assay Kit (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Proben (20 µg Protein/Bahn) wurden einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 15% Gele für RhoA, 8% Gele für Rho-Kinase, endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase [eNOS] und induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase [iNOS], 10% Gele für Moesin, p-Moesin, VASP [Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein] und p-VASP) unterzogen und die aufgetrennten Proteine anschließend auf Nitrocellulose-Membranen geblottet.

Eine Färbung mit Ponceau S wurde durchgeführt, um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu sichern. Die Membranen wurden blockiert, anschließend zunächst mit primären Antikörpern (RhoA 119, Rho-Kinase H-85, eNOS [N-20], iNOS, Moesin clone E10, p-Moesin [Thr-558], VASP [Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA], p-VASP [Ser-239] clone 16C2 [Calbiochem, San Diego, USA]) und danach mit den korrespondierenden, Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Calbiochem, San Diego, USA) inkubiert. Die Blots wurden mit einem ECL-Detektionssystem (enhanced chemiluminescence, Amersham, UK) entwickelt, das die bei der Umsetzung der Substrate durch die Peroxidase entstehende Chemolumineszenz aufgezeichnete. Die Intensitäten der resultierenden Banden auf jedem Blot wurden mit Hilfe eines FLA-3000 Phosphoimager (Fuji-Film, Düsseldorf, Deutschland) densitometrisch verglichen.

Die Beurteilung der Aktivitäten der Protein Kinase G (PKG) und Rho-Kinase erfolgte über die Feststellung des Phosphorylierungszustandes ihrer endogenen Substrate. Die Aktivität der PKG wurde hierbei über die Phosphorylierung von VASP an der Stelle Ser-239 bestimmt, da dies als sensitiver Marker für den Aktivitätszustand gilt. Die Rho-Kinase-Aktivität hingegen wurde anhand der Phosphorylierung des endogenen Substrats Moesin an Stelle Thr-558 beurteilt. Diese Unterscheidung gelang durch den Gebrauch von Antikörpern, die sowohl stellenspezifisch als auch spezifisch für den Phosphorylierungszustand waren.

2.7 Bestimmung der Stickoxid-Konzentration in der A. mesenterica

Der Gehalt der Homogenisate von schockgefrorenen Mesenterialarterien an Nitrit und Nitrat (NO_x) wurde über die Griess-Reaktion mit Hilfe des Nitralyzer-II Kits (WPI, Berlin, Deutschland) entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers bestimmt.

2.8 Hämodynamische Versuche

Alle hämodynamischen Untersuchungen wurden unter Ketamin-Narkose (60 mg/KgKG intramuskulär) durchgeführt. Im Hinblick auf die Herzauswurfsleistung und die regionalen Durchblutungsverhältnisse ähnelt dieser Zustand der Ratte am meisten dem bei vollem Bewusstsein. Diese Narkoseart wurde schon ausgiebig angewendet, um in Tiermodellen zur portalen Hypertonie bei hämodynamischen Versuchen pfortaderdrucksenkende Effekte unterschiedlicher Medikamente zu untersuchen.

2.8.1 Messung des mittleren arteriellen und portalen Druckes

Die Versuchstiere wurden nach Einsetzen der Ketamin-Narkose in Rückenlage auf dem Versuchstisch fixiert. Nachdem die linke Leistenregion durch einen longitudinalen Schnitt eröffnet worden war, wurden Arteria femoralis und Vena femoralis vorsichtig aus der Gefäß-Nerven-Scheide freipräpariert und mit einem PE-50 Katheter (PE 0,28 x 0,61, Everhardts, Meckenheim, Deutschland) kanüliert.

Nach der anschließenden medianen Laparotomie wurden die Dünndarmschlingen aus der Bauchhöhle gelagert. Nun wurde ein weiterer, angespitzter PE-50 Katheter in eine kleine ileocoecalvene eingebracht und bis in die Vena portae vorgeschoben. Danach wurden der Katheter sorgfältig an seinem Eingang in das mesenteriale Gefäßsystem fixiert und die Darmschlingen wieder in die Peritonealhöhle zurückverlagert. Peritoneum und Bauchwandmuskulatur wurden in einem ersten Schritt mit einer fortlaufenden Naht (Monocryl 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen sowie anschließend Fettgewebe und Fell.

Nach Anlage aller Katheter wurde bis zur Aufzeichnung der Blutdrücke 30 Minuten abgewartet, damit sich die Hämodynamik der Ratte wieder vollständig stabilisieren konnte. Die Katheter in Arteria femoralis und Vena portae wurden hierfür über einen Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) an einem Druckmesser (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-

Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen. Nachdem der Nullpunkt 1 cm oberhalb des Versuchstisches geeicht worden war, wurden arterieller Blutdruck und portalvenöser Druck kontinuierlich über einen Zeitraum von mindestens 30 min aufgenommen.

2.8.2 Messung der Durchblutung mittels kolorierter Mikrosphären

Die Herzauswurfsleistung in Form des Herzindex und die regionale Durchblutung wurden durch die Technik der kolorierten Mikrosphären bestimmt. Diese Methode wurde durch die häufiger angewandte Technik der radioaktiven Mikrosphären validiert. Der Vorteil der Farbmikrosphärentechnik besteht darin, dass auf radioaktives Material verzichtet werden kann.

Für diese Methode wurde ein weiterer Katheter in den linken Ventrikel eingebracht. Dazu wurde durch einen longitudinalen Kocher-Schnitt das rechte laterale Halsdreieck eröffnet. Die Schilddrüse wurde vorsichtig mobilisiert und nach medial oben geschlagen. Der Musculus sternocleidomastoideus wurde nach lateral verlagert und der Musculus omohyoideus durchtrennt. Anschließend wurde die rechte Arterie carotis communis unter Schonung des Nervus vagus aus der Gefäß-Nerven-Scheide präpariert und mit einem PE-50 Katheter kanüliert, der unter Monitorkontrolle bis in den linken Ventrikel vorgeschoben wurde. Die intraventrikuläre Lage des Katheters wurde mit Hilfe der Pulskurve bestätigt und stets post mortem überprüft.

Die Referenzblutprobe wurde über einen Zeitraum von einer Minute mit einer Flussrate von 0,65 ml/min aus der Arteria femoralis entnommen. Hierfür wurde eine spezielle Pumpe (Model ,22', Syringe Pump, Harvard Apparatus, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verwendet.

Zehn Sekunden nach Beginn der Entnahme der Referenzblutprobe wurden über zwanzig Sekunden 300.000 gelbe Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton Technology, San Diego, USA; suspendiert in 300 µl physiologische Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) über den Katheter in den linken Ventrikel injiziert. Die Verteilung der gelben Mikrosphären spiegelt den Durchblutungszustand der einzelnen Organe zum Untersuchungszeitpunkt wider. Die Mikrosphärenspritze wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Spülflüssigkeit asserviert, um zu bestimmen, wie viele Mikrosphären tatsächlich appliziert worden waren.

Anschließend wurden 150.000 blaue Mikrosphären (15µm Durchmesser, Triton Technology, San Diego, USA; suspendiert in 200µl physiologische Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) über einen Zeitraum von 30 Sekunden über den Mesenterialvenenkatheter in die Pfortader appliziert. Mit Hilfe dieser Mikrosphären konnte das Ausmaß des portosystemischen Shunts bestimmt werden.

Fünfzehn Minuten nach der letzten Mikrosphärengabe wurde das Versuchstier durch die intrakardiale Injektion von 1 ml Ketamin getötet. Lungen, Leber, Nieren, Milz und Gastrointestinaltrakt wurden entnommen, gewogen und bei einer Konzentration von 14 ml/g Gewebe in 4 M KOH (Sigma Saint Louis, Missouri, USA) mit 2% Tween 80 (Polyoxyethylen-sorbitan-mono-oleat, Sigma Saint Louis, Missouri, USA) eingelegt. Die Referenzblutprobe wurde in 3,8 ml 5,3 M KOH und 0,5 ml Tween 80 aufgelöst. Alle Proben wurden eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Die verdauten Proben wurden nach Vortexen durch spezielle Mikrosphärenfilter (Nucleopore Polycarbonate, Whatman International Limited, Madison, UK) filtriert. Sowohl das Probenröhrchen als auch die Filterapparatur wurden sorgfältig mit 2% Tween 80 Lösung gespült.

Die mit Mikrosphären beladenen Filter wurden daraufhin in jeweils 200µl DMF (N, N-Dimethylformamid, KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland) überführt und gevortext, um die Farbe aus den Mikrosphärenkapseln herauszulösen. Die Proben wurden anschließend fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert und von den Überständen die Absorptionsspektren (300-800 nm, Photometer HP 8453 X UV-Visible System) bestimmt. Aus diesen Daten wurden durch das Softwareprogramm Triton 5 von Triton Technology (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) über die Menge der entsprechenden Mikrosphären in den jeweiligen Organen die Organdurchblutung, die Herzauswurfsleistung und der portosystemische Shunt errechnet. Die Ergebnisse wurden pro 100g Körpergewicht angegeben.

Die Herzauswurfsleistung berechnet sich folgendermaßen: Herzauswurfsleistung (ml/min) = Absorption der injizierten Mikrosphären / Absorption der Referenzprobe x 0,65 ml/min. Der kardiale Index wird als Herzzeitvolumen pro 100 g Körpergewicht angegeben.

Der portosystemische Shunt (PSS) wird wie folgt errechnet: Anzahl der Mikrosphären in der Lunge x 100 / Anzahl der Mikrosphären in Lunge und Leber.

Der portalvenöse Einstrom (PVI) ist die Summe der Perfusion von Magen, Milz, Darm und Mesenterien. Der kollaterale Blutfluss (KBF) wird durch die Formel $PVI \times PSS/100$ berechnet und in $ml/min \times 100g$ angegeben.

Allgemein wird der Gefäßwiderstand als Quotient aus Perfusionsdruck und Blutfluss einer Gefäßregion gebildet. Der systemische Gefäßwiderstand wird demnach als Quotient aus mittlerem arteriellem Druck und kardialem Index, der portalvenöse Widerstand als Quotient aus Pfortaderdruck und portalvenösem Zufluss errechnet.

Der Perfusionsdruck im Innervationsgebiet des Nervus splanchnikus ist als Differenz zwischen mittlerem arteriellem Blutdruck und portalvenösem Druck definiert. Demzufolge wird der splanchnische Gefäßwiderstand als Quotient des Perfusionsdruckes und Blutflusses im Splanchnikusgebiet errechnet. Der hepatische Gefäßwiderstand ergibt sich nach folgender Formel: $\text{portalvenöser Druck} / \text{Summe aus Perfusion von Gastrointestinum und Milz} - \text{portosystemischer Shunt}$.

2.9 Statistische Analysen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Auswertung der Varianz mittels U-Tests nach Mann-Whitney diente dem Gruppenvergleich. Ein $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Charakteristika

Das mittlere Körpergewicht der gallengangsligierten Ratten (BDL, bile duct ligation) war verglichen mit der Gruppe der Sham-operierten Versuchstiere signifikant geringer. Außerdem waren sowohl Leber-als auch Milzgewicht der zirrhotischen Ratten deutlich erhöht. Zwischen den mit Palosuran behandelten und den unbehandelten BDL gab es keinen Unterschied in Bezug auf das Körper- und Lebergewicht, allerdings war das Milzgewicht nach Gabe von Palosuran signifikant erniedrigt. Die Mortalität der gallengangsligierten Ratten lag unter 15% und unterschied sich nicht zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe (Tab. 2).

Tab. 2: Allgemeine Charakteristika der verschiedenen Gruppen

Gruppe	Körpergewicht (g)	Lebergewicht (g)	Milzgewicht (g)
Sham-operierte	425 ± 13	13.7 ± 0.6	0.53 ± 0.06
BDL	338 ± 12 *	23.3 ± 2.3 *	2.5 ± 0.2 *
BDL + Palosuran	322 ± 9 *	20.0 ± 1.8 *	1.6 ± 0.2 *, †

(n=9/Gruppe; * p < 0.05 vs. Sham; † p < 0.05 vs. BDL)

3.2 Biochemische Parameter

Es wurde ein deutlicher Anstieg aller bestimmten leberspezifischen Blutparameter in der Gruppe der gallengangsligierten Ratten gegenüber der Sham-operierten Kontrollgruppe beobachtet. Diese Erhöhung veränderte sich nicht signifikant durch eine Behandlung mit Palosuran (Tab. 3).

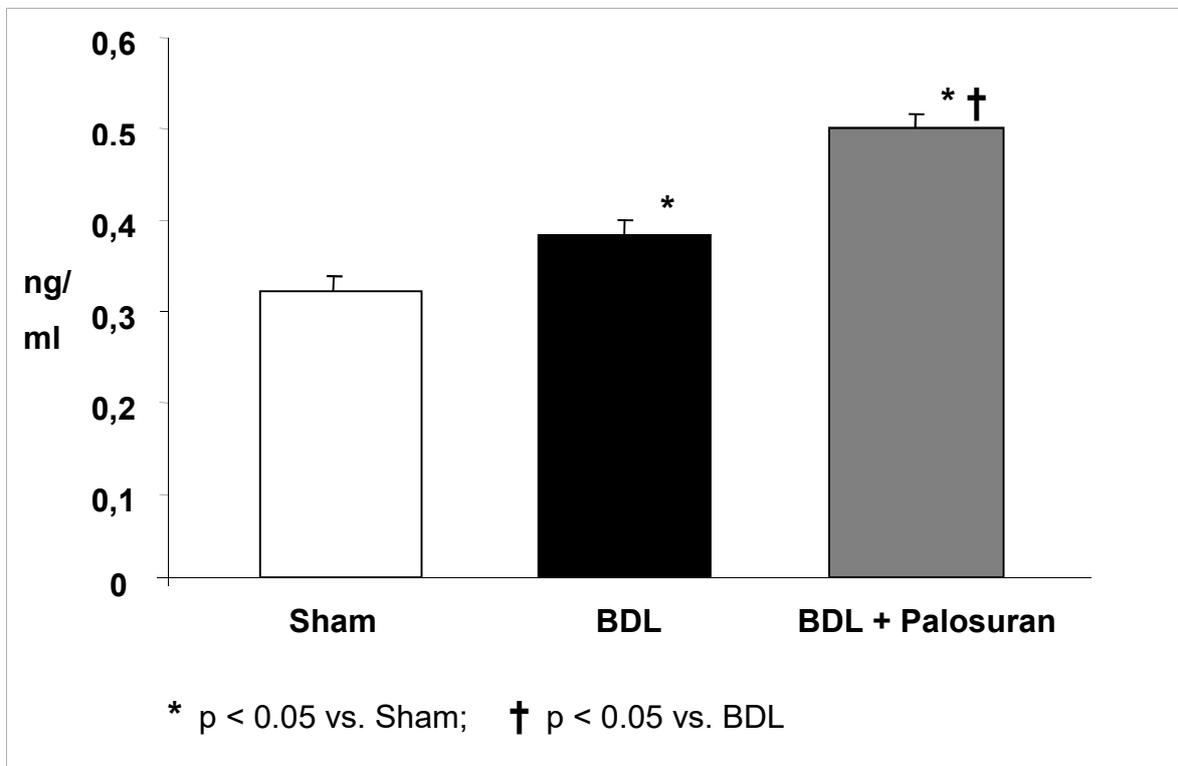
Tab. 3: Biochemische Parameter der verschiedenen Gruppen

Gruppe	□-GT (U)	ALT (U)	AST (U)	AP (U)	Bilirubin (mg/dl)
Sham-operierte	2.8 ± 0.4	43 ± 8	128 ± 18	152 ± 16	0.09 ± 0.01
BDL	33.8 ± 5.6 *	129 ± 13 *	610 ± 45 *	301 ± 40 *	6.5 ± 0.8 *
BDL + Palosuran	34.4 ± 3.2 *	132 ± 14 *	677 ± 65 *	332 ± 23 *	7.9 ± 0.6 *

(n=7/Gruppe; * p < 0.05 vs. Sham)

3.3 Urotensin II-Konzentrationen

Die Konzentrationen von Urotensin II im Plasma von gallengangligierten Ratten waren signifikant höher als bei Sham-operierten, nicht zirrhotischen Versuchstieren. Nach der oralen Gabe von Palosuran bei BDL kam es darüber hinaus zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Urotensin II-Plasmakonzentrationen (Abb. 1).

**Abb. 1:** Urotensin II-Plasmakonzentrationen der verschiedenen Gruppen

3.4 Die messenger-RNA-Level von RhoA, Rho- Kinase und eNOS

Sowohl die mRNA-Konzentration von RhoA als auch die von Rho-Kinase bei BDL wies keine Veränderung gegenüber Sham-operierten Ratten auf. Allerdings kam es in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Ratten, die mit Palosuran behandelt worden waren, zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Level von RhoA und Rho-Kinase (Abb. 2, und Abb. 3). Die Mesenterialgefäße von gallengangligierten Ratten enthielten im Vergleich zu Sham-operierten deutlich erhöhte mRNA-Konzentrationen von eNOS. Eine Behandlung mit Palosuran führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg von eNOS-mRNA in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Versuchstieren (Abb. 4).

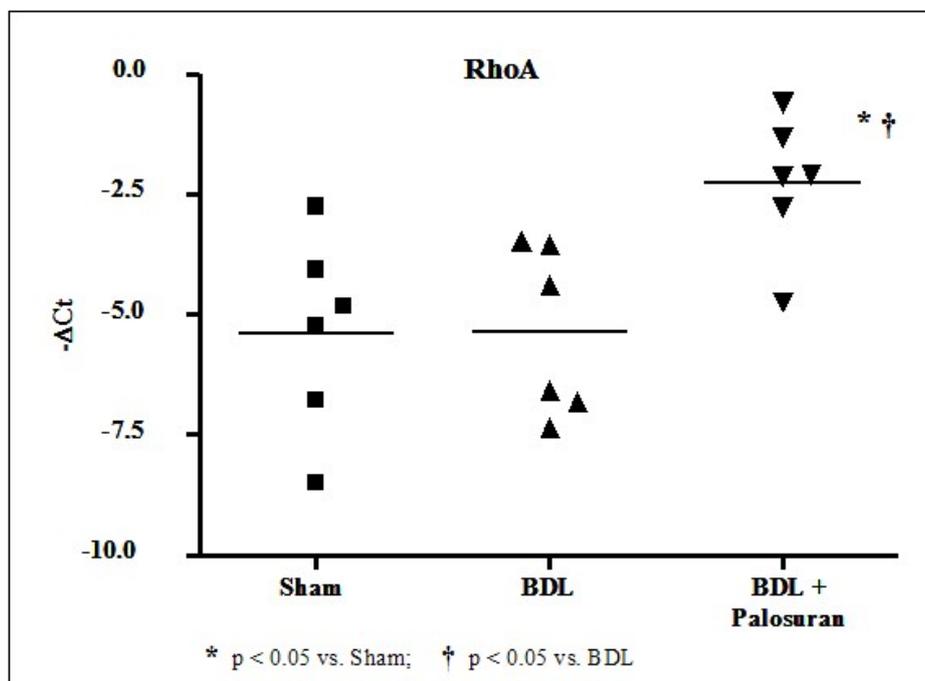


Abb. 2: Messenger-RNA-Expression von RhoA in den Mesenterialarterien, bestimmt durch die quantitative RT-PCR und mittels 18-SrRNA als endogene Kontrolle korrigiert (n=6/Gruppe)

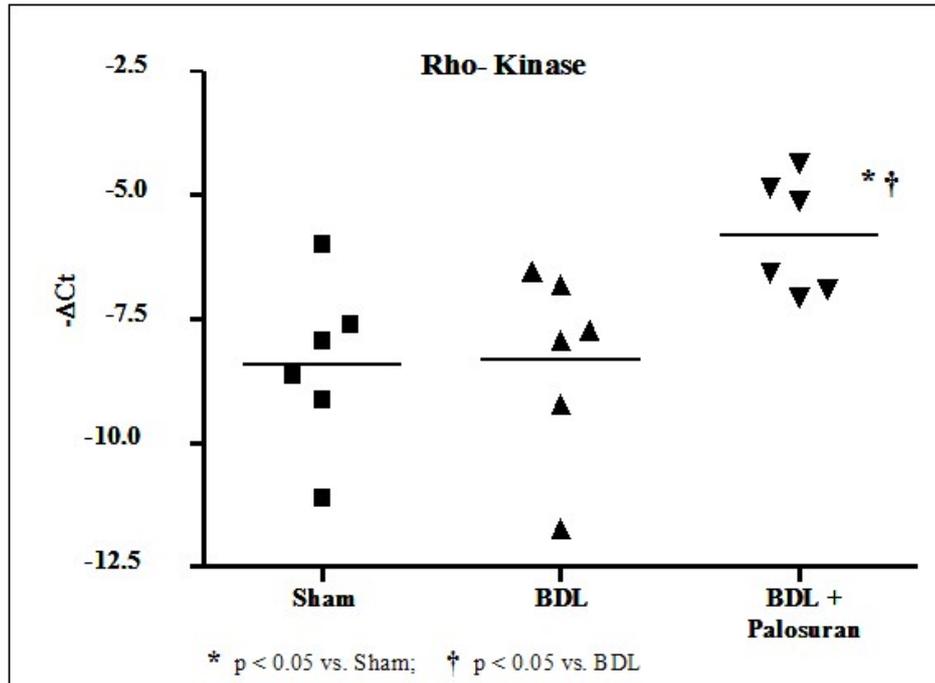


Abb. 3: Messenger-RNA-Expression von Rho-Kinase in den Mesenterialarterien, bestimmt durch die quantitative RT-PCR und mittels 18-SrRNA als endogene Kontrolle korrigiert (n=6/Gruppe)

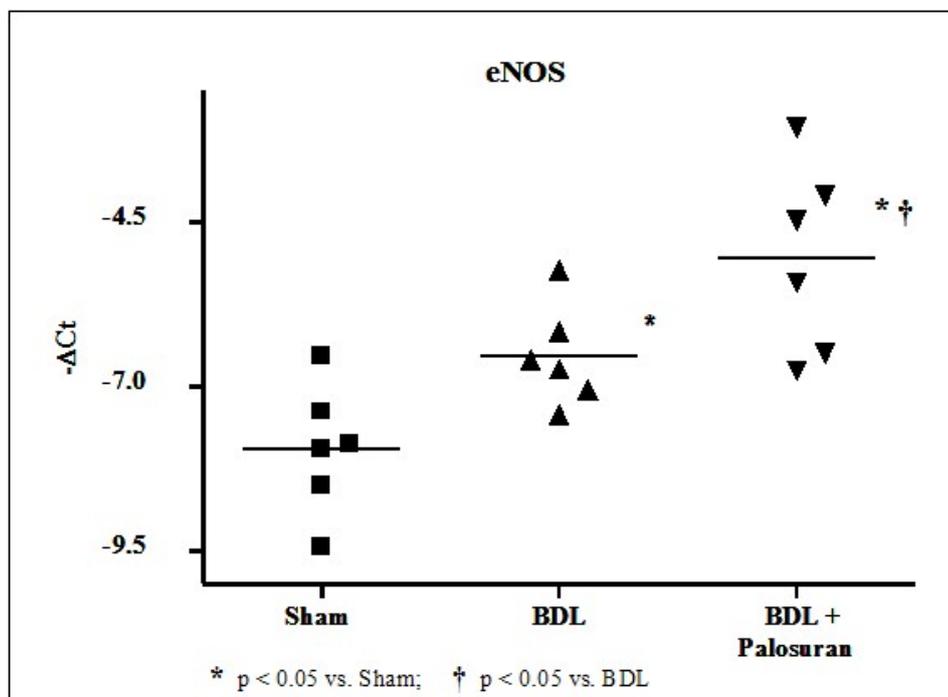


Abb. 4: Messenger-RNA-Expression von eNOS in den Mesenterialarterien, bestimmt durch die quantitative RT-PCR und mittels 18-SrRNA als endogene Kontrolle korrigiert (n=6/Gruppe)

3.5 Proteinexpression von RhoA und Rho-Kinase in den Mesenterialarterien

Die Western Blot Analyse zeigte keinen Unterschied in der mesenterialen Proteinexpression von RhoA zwischen BDL und Sham-operierten Ratten (Abb. 5). Dagegen war die Proteinexpression von Rho-Kinase in den Mesenterialarterien von gallengangsligierten Versuchstieren verglichen mit Sham-operierten reduziert (Abb. 6). Die orale Gabe von Palosuran führte zu einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression von RhoA und Rho-Kinase in den Mesenterialgefäßen von zirrotischen Ratten (Abb. 5 und Abb. 6).

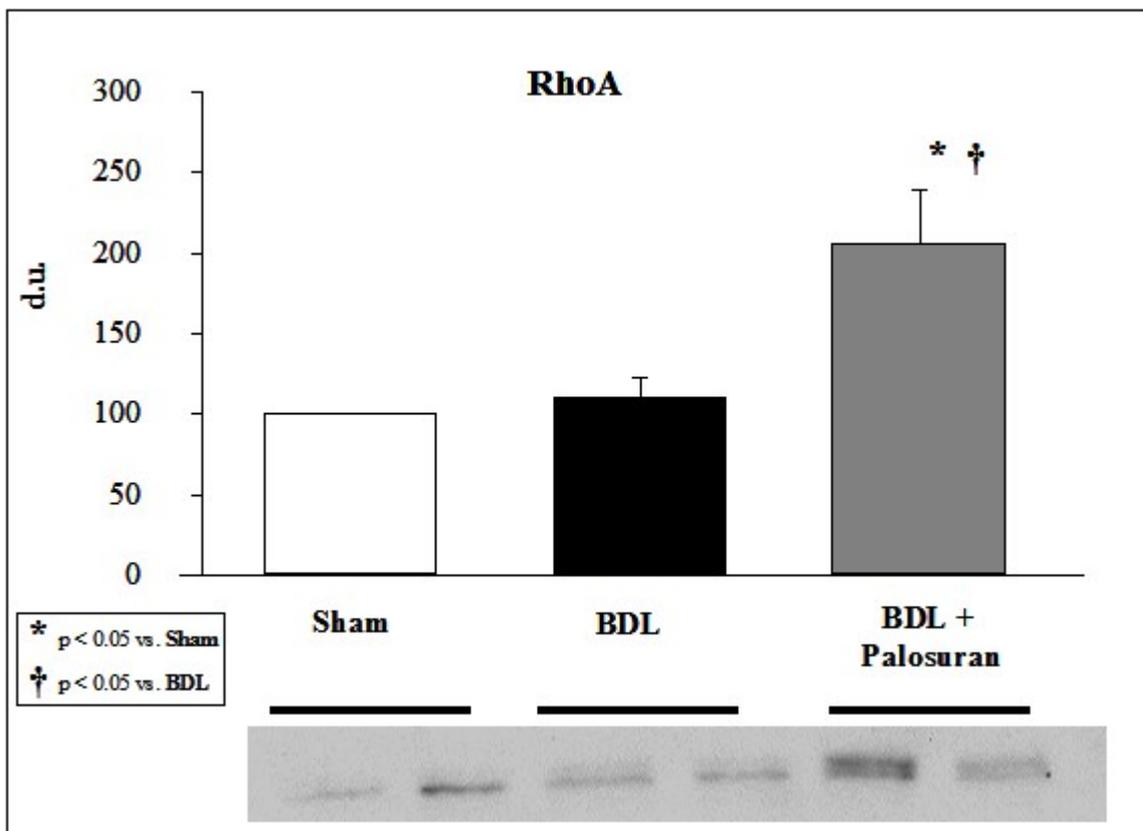


Abb. 5: Proteinexpression von RhoA in den Mesenterialarterien, bestimmt durch Western Blot Analyse (Minimum $n=6$ /Gruppe). Dargestellt sind die relativen densitometrischen Daten aller Experimente bezogen auf die Werte Sham-operierter Ratten als 100 d.u. und repräsentative Western Blots.

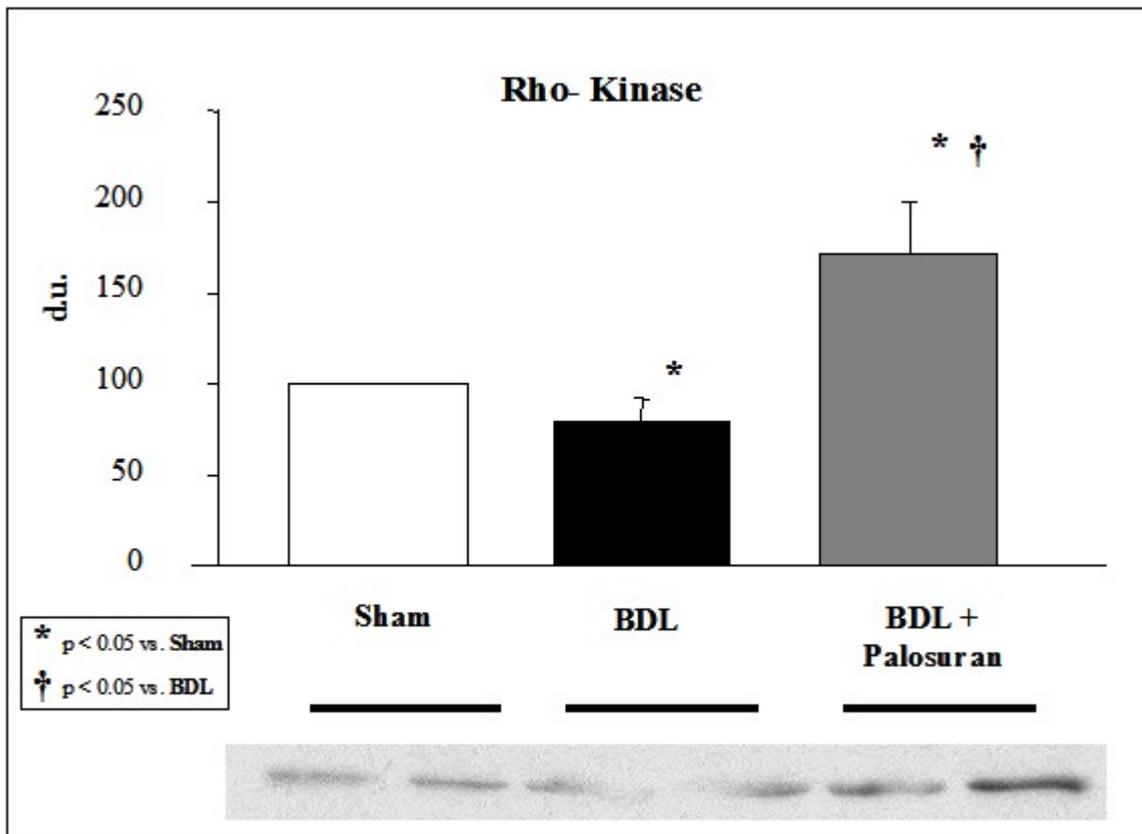


Abb. 6: Proteinexpression von Rho-Kinase in den Mesenterialarterien, bestimmt durch Western Blot Analyse (Minimum $n=6$ /Gruppe). Dargestellt sind die relativen densitometrischen Daten aller Experimente bezogen auf die Werte Sham-operierter Ratten als 100 d.u. und repräsentative Western Blots.

3.6 Aktivität der Rho-Kinase

Als Marker für die Aktivität der Rho-Kinase diente der Phosphorylierungszustand ihres Substrates Moesin. Moesin wird durch Rho-Kinase an der Stelle Thr-558 phosphoryliert. Die Western Blot Analyse wurde daher mit einem Moesin-Antikörper durchgeführt, der sowohl stellenspezifisch als auch spezifisch für den Phosphorylierungszustand war. Es zeigte sich eine verringerte Phosphorylierung von Moesin in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Ratten verglichen mit Sham-operierten. Die orale Gabe von Palosuran erhöhte signifikant die Phosphorylierung von Moesin in den Mesenterialarterien bei BDL (Abb. 7). Folglich führt eine langfristige Blockade des Urotensin II-Rezeptors durch Palosuran zu einer verstärkten Aktivität der Rho-Kinase in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Versuchstieren.

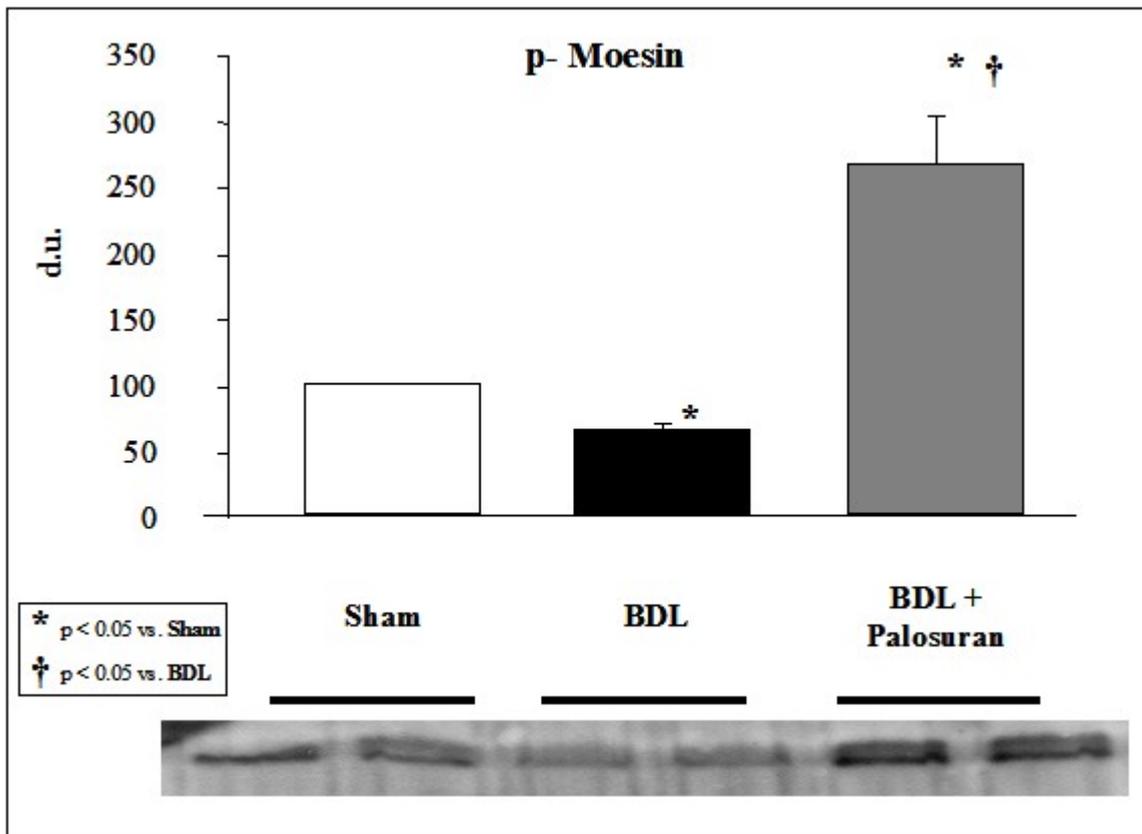


Abb. 7: Konzentration von Phospho-Moesin in den Mesenterialarterien, bestimmt durch Western Blot Analyse mittels eines phospho-spezifischen und stellenspezifischen (Thr 558) Antikörpers (Minimum n=6/Gruppe). Dargestellt sind die relativen densitometrischen Daten aller Experimente bezogen auf die Werte Sham-operierter Ratten als 100 d.u. und repräsentative Western Blots.

3.7 Proteinexpression von eNOS

Die Western Blot Analyse ließ keinen Unterschied der Proteinexpression von eNOS in den Mesenterialarterien zwischen gallengangligierten und Sham-operierten Ratten erkennen. Allerdings führte die Behandlung mit Palosuran zu einem Anstieg der eNOS Proteinexpression in den Mesenterialgefäßen von zirrhotischen Versuchstieren (Abb. 8).

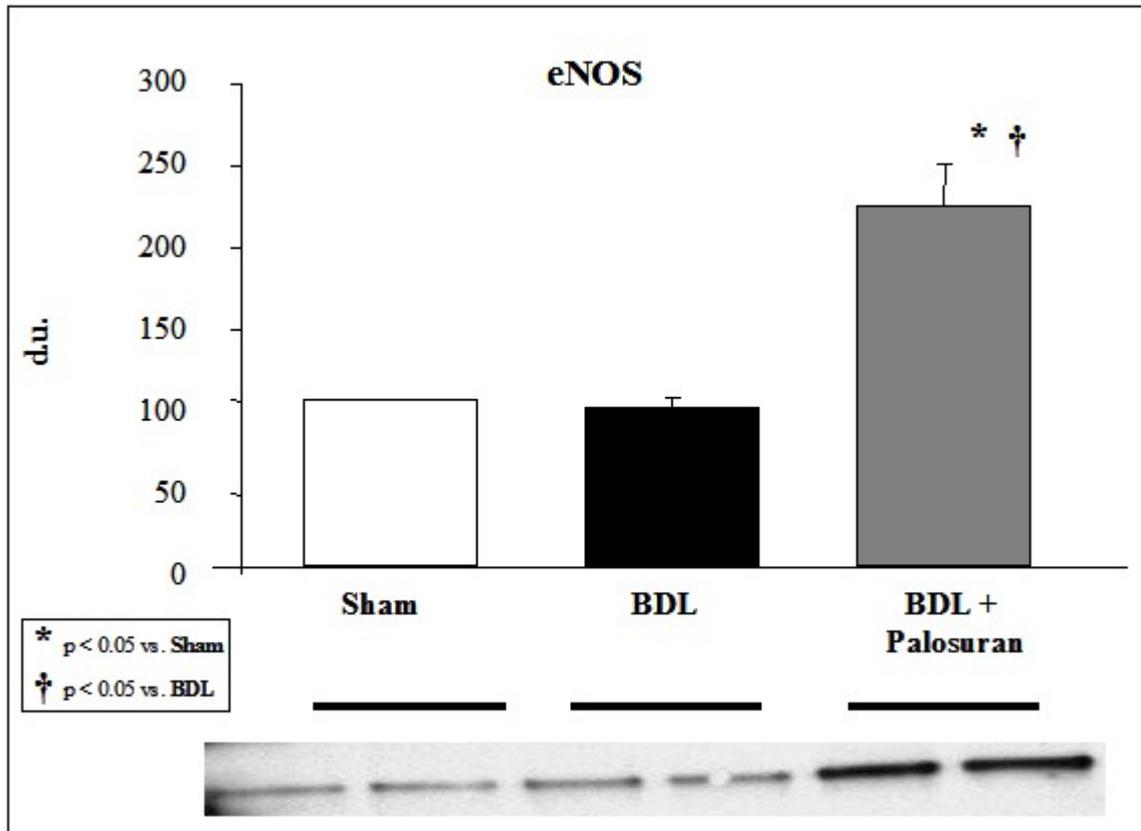


Abb. 8: Proteinexpression von eNOS in den Mesenterialarterien, bestimmt durch Western Blot Analyse (Minimum $n=6$ /Gruppe). Dargestellt sind die relativen densitometrischen Daten aller Experimente bezogen auf die Werte Sham-operierter Ratten als 100 d.u. und repräsentative Western Blots.

3.8 Proteinexpression von iNOS

Eine Proteinexpression von iNOS war in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Ratten kaum nachzuweisen. Bei der Western Blot Analyse zeigte sich kein Unterscheid zwischen mit Palosuran behandelten und unbehandelten zirrhotischen Versuchstieren.

3.9 Aktivität der Protein Kinase G

Als Marker für die Aktivität der Protein Kinase G (PKG) diene der Phosphorylierungszustand ihres Substrates VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein). VASP wird durch PKG an der Stelle Ser-239 phosphoryliert. Die Western Blot Analyse wurde daher mit einem VASP-Antikörper durchgeführt, der sowohl stellenspezifisch als auch spezifisch für den Phosphorylierungszustand war. Es zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von VASP in den Mesenterialarterien von zirrhotischen Ratten verglichen mit Sham-operierten. Die Behandlung mit Palosuran bei BDL hingegen führte zu einer verringerten Phosphorylierung von VASP in den Mesenterialgefäßen (Abb. 9).

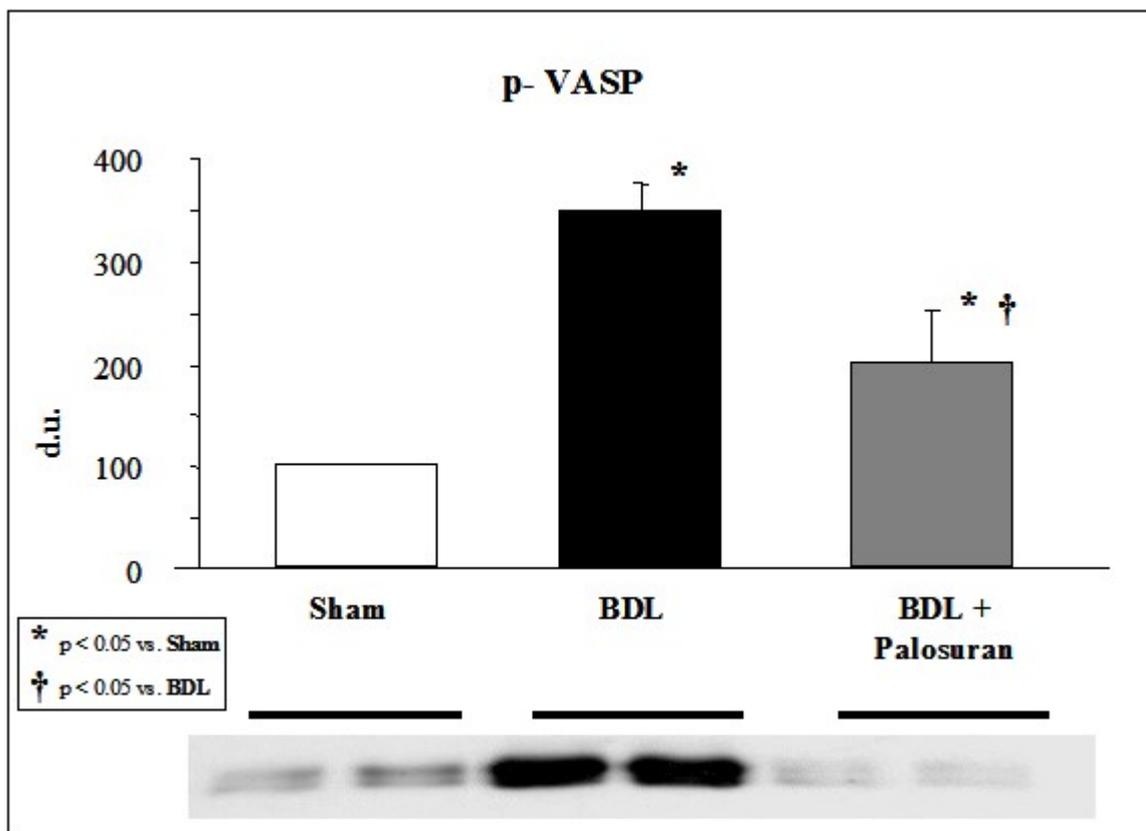


Abb. 9: Konzentration von Phospho-VASP in den Mesenterialarterien, bestimmt durch Western Blot Analyse mittels eines phospho-spezifischen und stellenspezifischen (Ser 239) Antikörpers (Minimum n=6/Gruppe). Dargestellt sind die relativen densitometrischen Daten aller Experimente bezogen auf die Werte Sham-operierter Ratten als 100 d.u. und repräsentative Western Blots.

3.10 Stickoxid-Konzentration in den Mesenterialarterien

Die Bestimmung der Stickoxid-Konzentration zeigte einen signifikanten Anstieg von Nitraten und Nitriten in den Mesenterialarterien von gallengangsligierten Ratten im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren. Durch die Behandlung mit Palosuran kam es zu einem signifikanten Abfall der NO-Konzentration in den Mesenterialgefäßen von zirrhotischen Ratten auf Werte, die ungefähr denen von Sham-operierten entsprachen (Abb. 10).

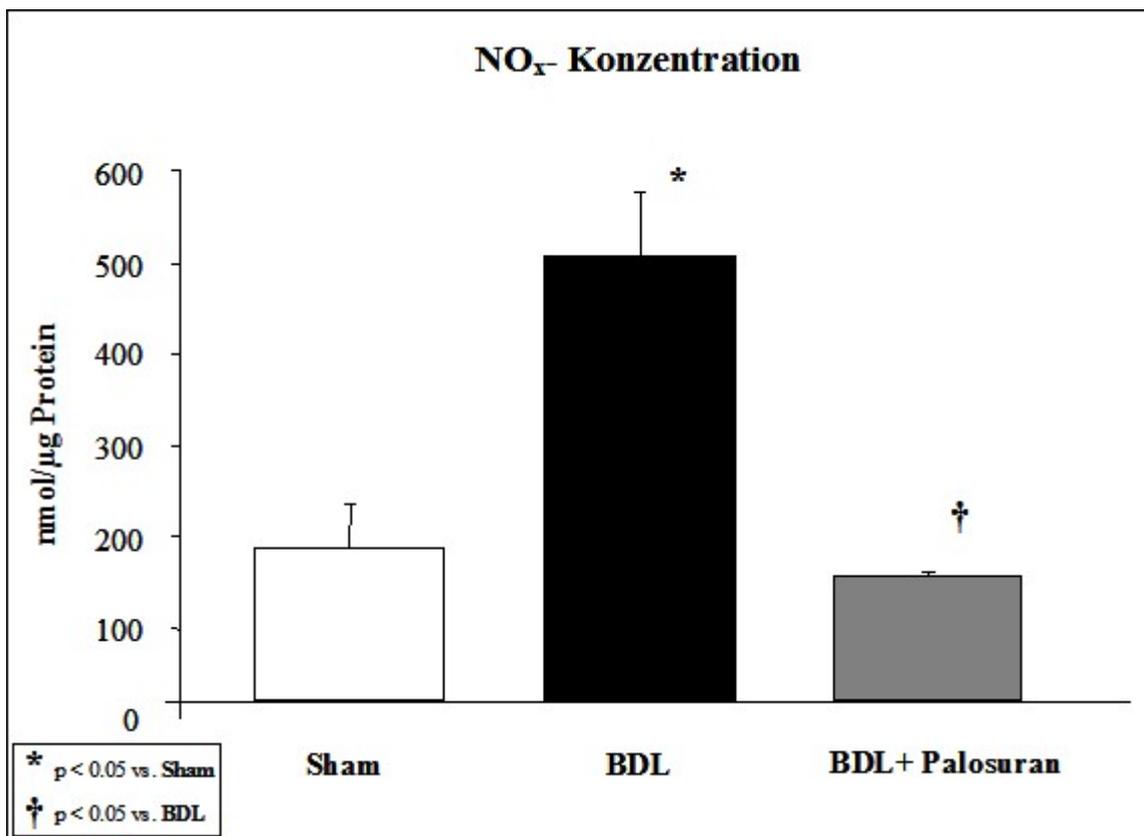


Abb. 10: NO_x-Konzentration in den Homogenisaten der Mesenterialarterien

3.11 Akute hämodynamische Versuche

Wie zu erwarten war der Pfortaderdruck bei gallengangligierten Ratten deutlich erhöht verglichen mit Sham-operierten Versuchstieren (Abb. 11). Die intravenöse Applikation von Palosuran führte zu einem signifikanten Abfall des portalen Druckes bei BDL (Abb. 11). Dies wurde von einem signifikanten Anstieg des splanchnischen Gefäßwiderstandes begleitet, der bei zirrhotischen Ratten deutlich verringert war (Abb. 13). Der bei BDL erhöhte portalvenöse Blutfluss wurde durch die Gabe von Palosuran signifikant gesenkt (Abb. 14).

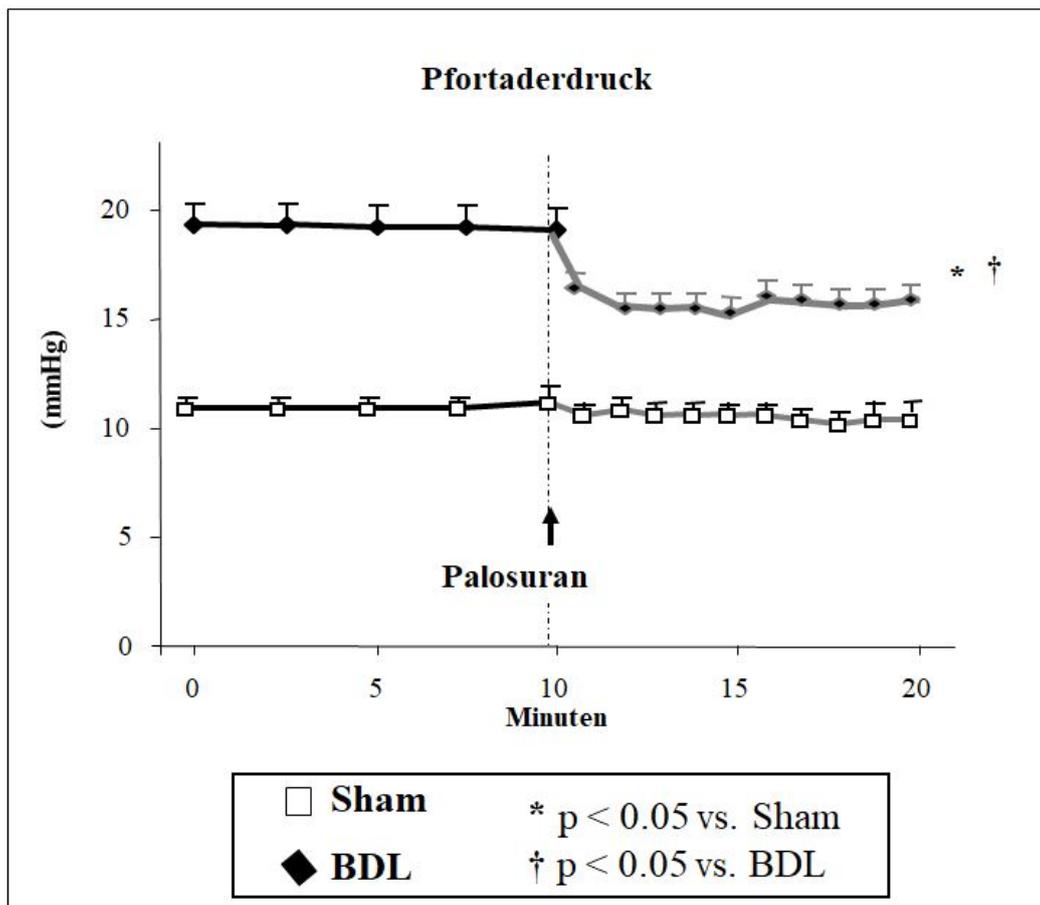


Abb. 11: Auswirkungen der akuten intravenösen Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) auf den Pfortaderdruck bei Sham-operierten und zirrhotischen Ratten (n=7/Gruppe)

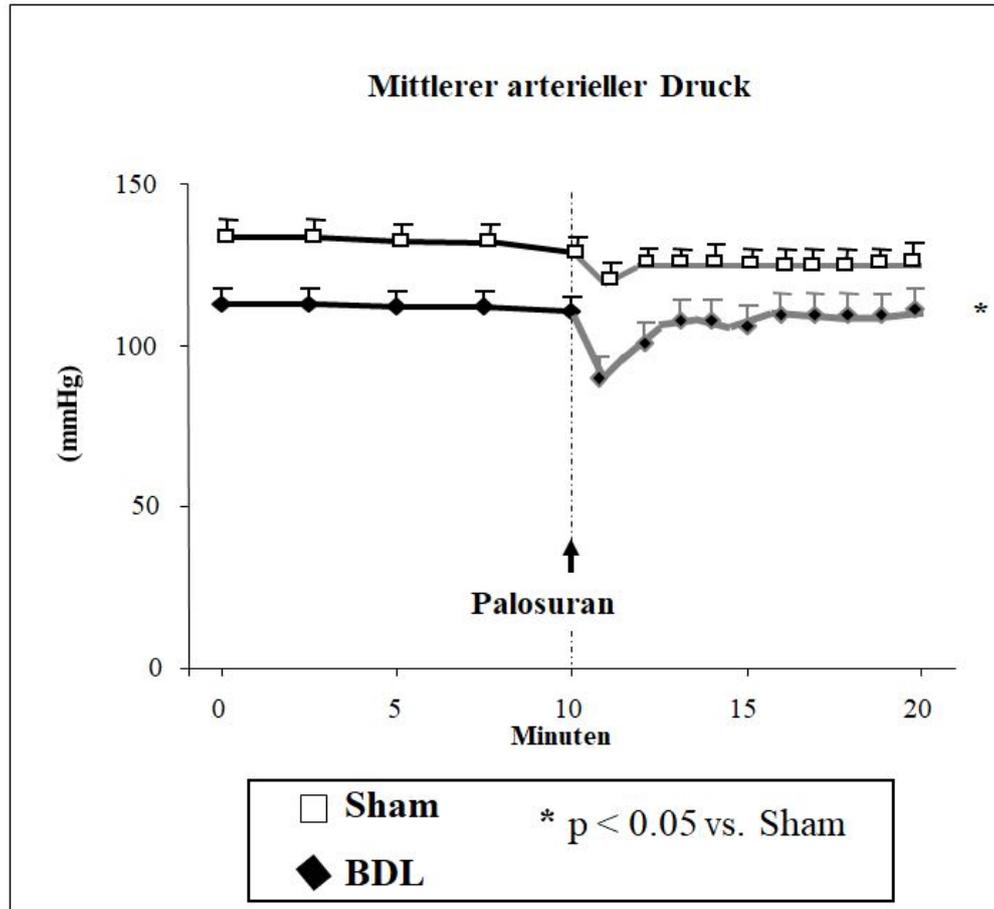


Abb. 12: Auswirkungen der akuten intravenösen Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) auf den mittleren arteriellen Druck bei Sham-operierten und zirrhatischen Ratten (n=7/Gruppe)

Der mittlere arterielle Blutdruck und der systemische Gefäßwiderstand waren bei gallengangsligierten Ratten gegenüber Sham-operierten signifikant verringert (Abb. 12 und Abb. 15). Durch die intravenöse Applikation von Palosuran kam es bei zirrhatischen Ratten zu einem vorübergehenden Abfall des mittleren arteriellen Druckes (Abb. 12). Der systemische Gefäßwiderstand nahm minimal zu (Abb. 15). Die bei BDL erhöhte Herz auswurfsleistung wurde durch die intravenöse Gabe von Palosuran nur leicht verringert (Abb. 16). Diese akuten hämodynamischen Veränderungen wurden mit denen bei Sham-operierten und zirrhatischen Versuchstieren verglichen, denen das reine Lösungsmittel intravenös appliziert wurde.

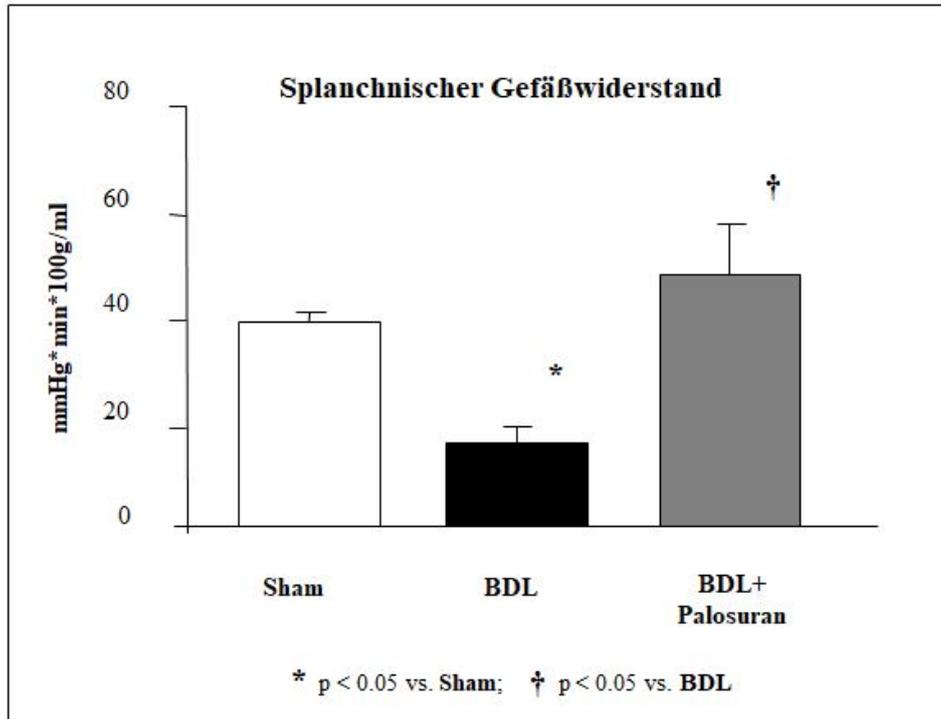


Abb. 13: Splanchnischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) (n=7/Gruppe)

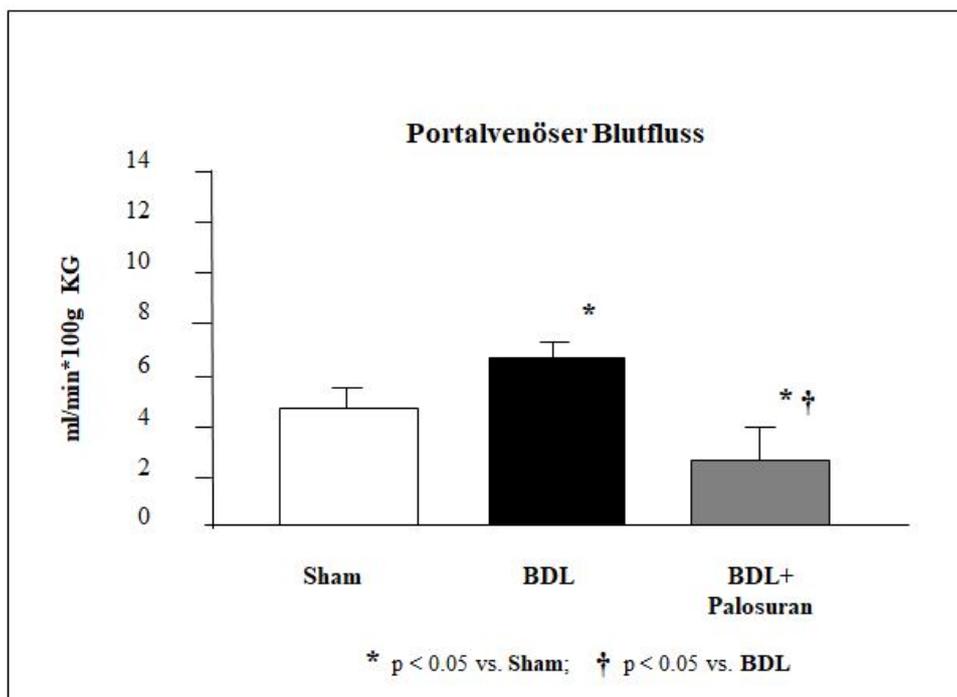


Abb. 14: Portalvenöser Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) (n=7/Gruppe)

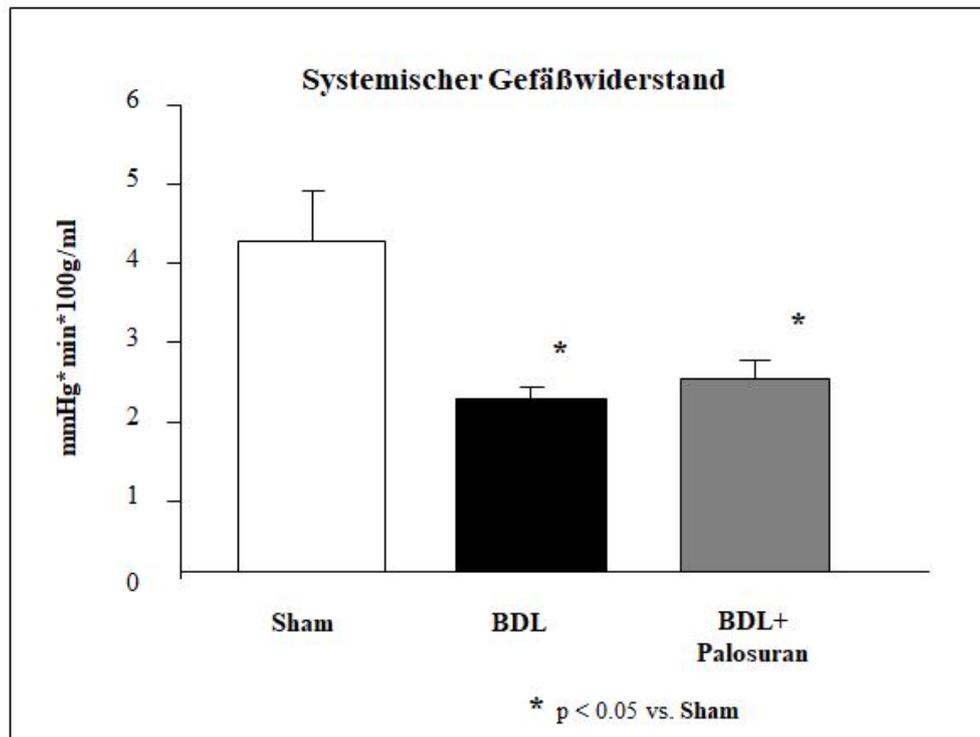


Abb. 15: Systemischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) (n=7/Gruppe)

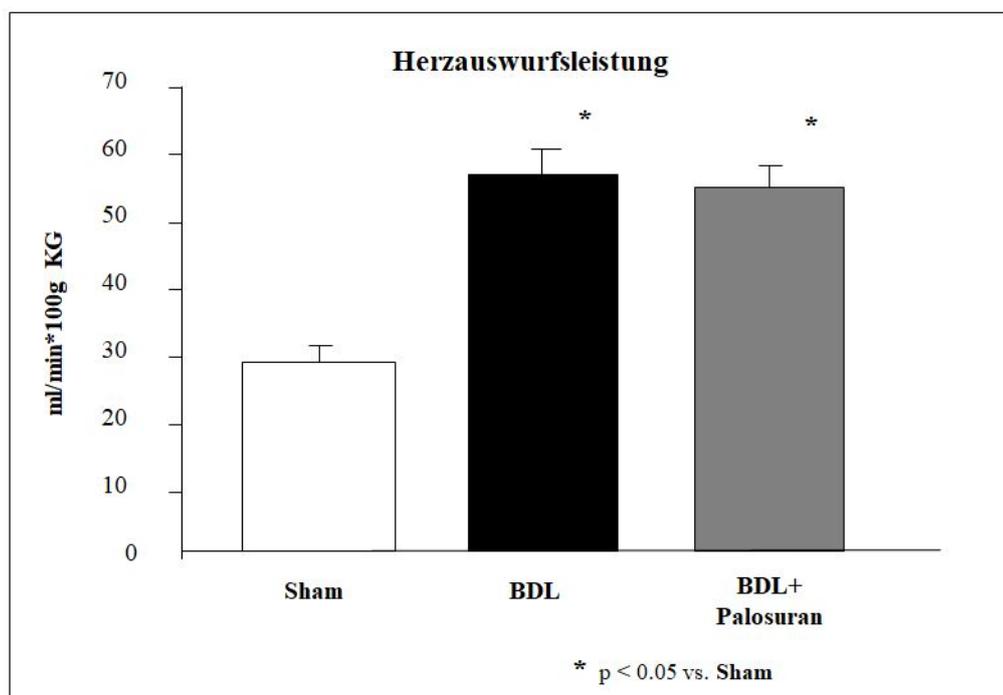


Abb. 16: Herzauswurfsleistung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran (10 mg/kg Körpergewicht) (n=7/Gruppe)

3.12 Hämodynamische Versuche nach Behandlung mit Palosuran per os

Die orale Behandlung von zirrhotischen Ratten mit Palosuran führte zu einem signifikanten Abfall des Pfortaderdrucks (Abb. 17). Diese Beobachtung war auf einen Anstieg des Gefäßwiderstandes im Splanchnikusgebiet und einen Abfall des portalvenösen Blutflusses zurückzuführen (Abb. 19 und Abb. 20). Dagegen blieb der hepatische Gefäßwiderstand durch Palosuran unbeeinflusst (Abb. 18).

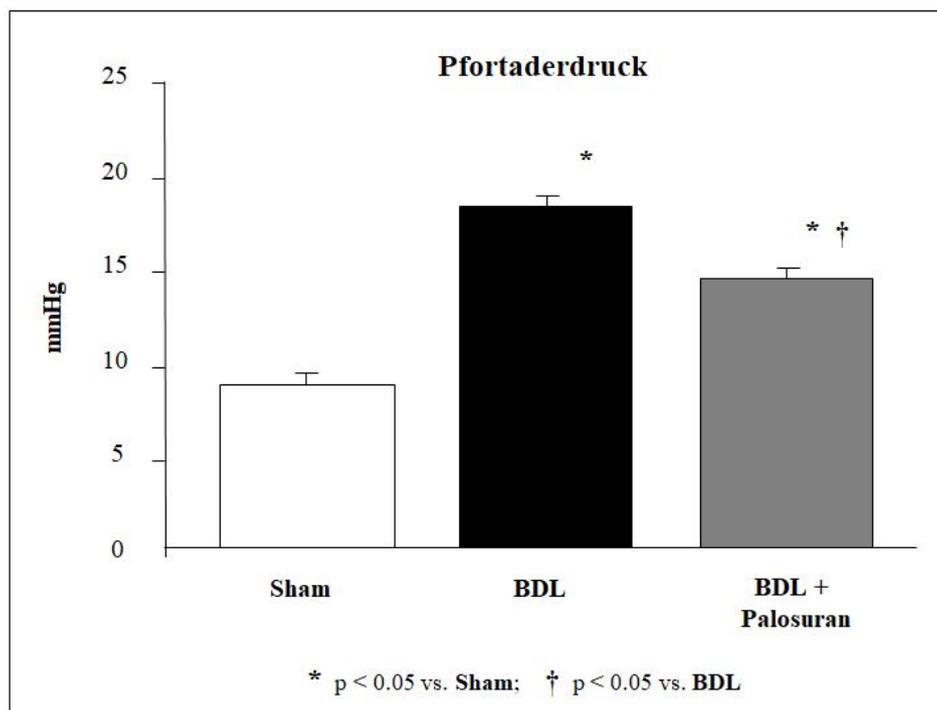


Abb. 17: Pfortaderdruck bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

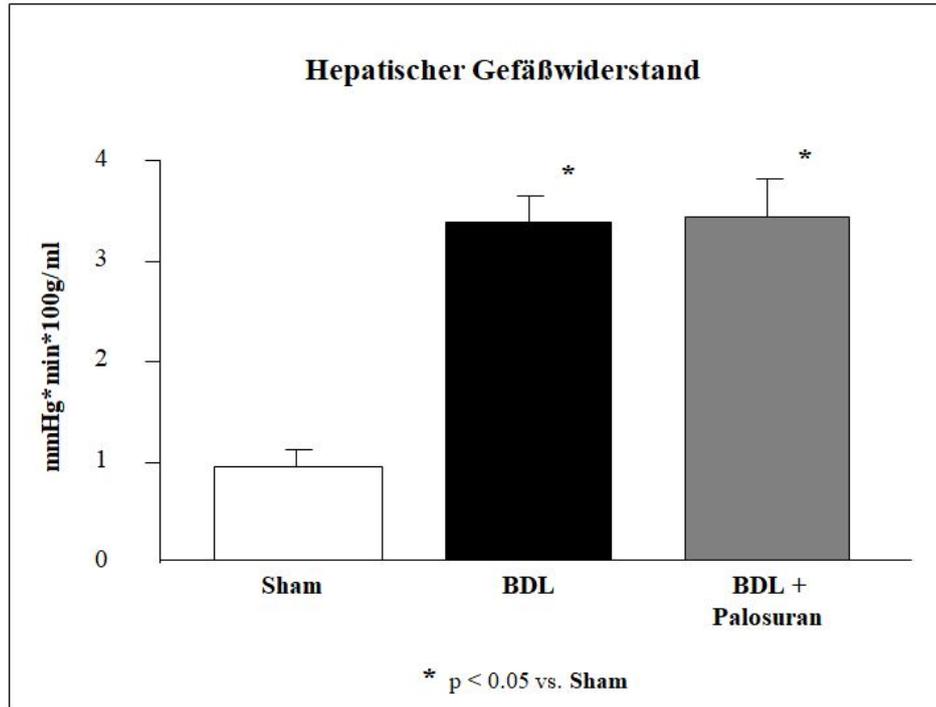


Abb. 18: Hepatischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

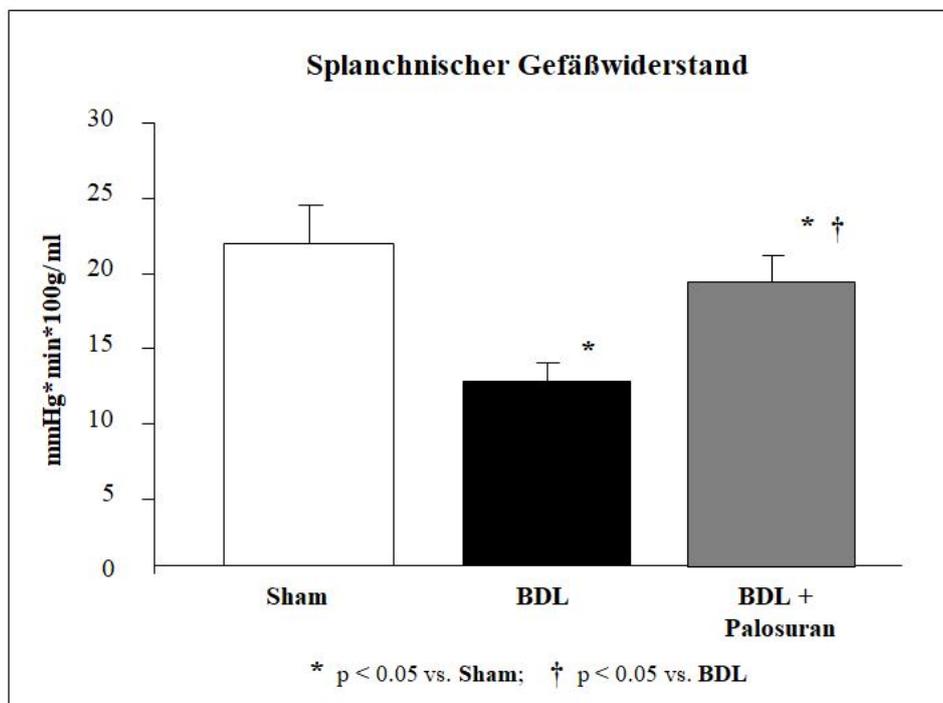


Abb. 19: Splanchnischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

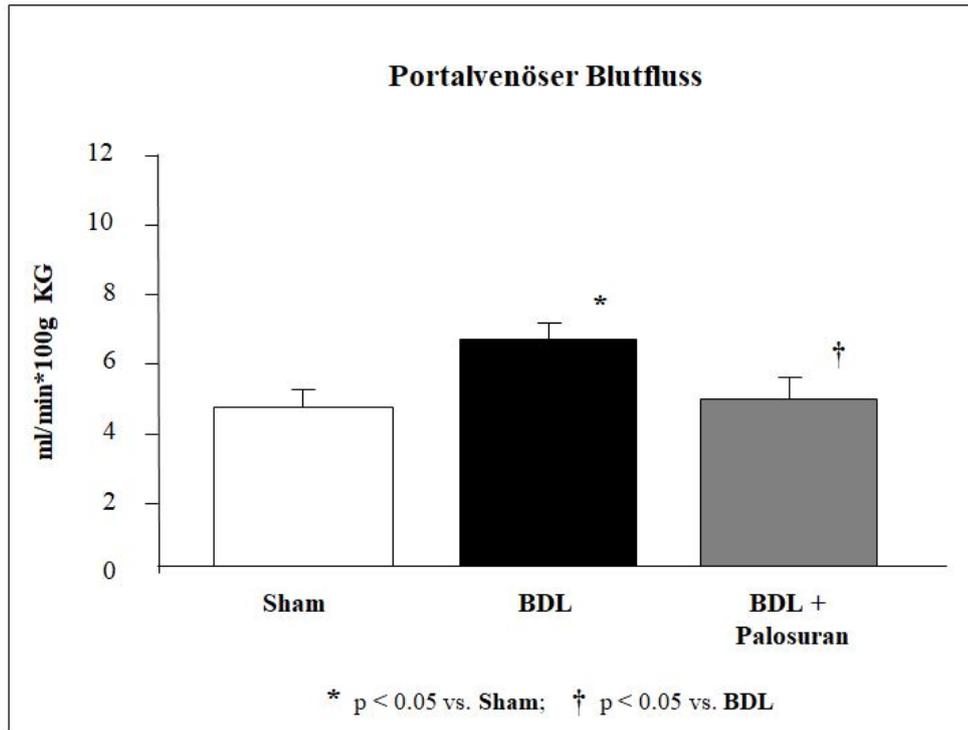


Abb. 20: Portalvenöser Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

Der mittlere arterielle Druck blieb bei gallengangsligierten Ratten nach oraler Gabe von Palosuran unverändert erniedrigt (Abb. 21). Der systemische Gefäßwiderstand war ebenfalls signifikant verringert gegenüber Sham-operierten Versuchstieren und zeigte keine Veränderung durch eine Behandlung mit Palosuran (Abb. 22). Unbeeinflusst blieb auch die Herzauswurfsleistung, die bei zirrhotischen Ratten deutlich erhöht war (Abb. 23). Durch die orale Therapie mit Palosuran wurde das portosystemische Shuntvolumen bei Leberzirrhose nicht signifikant reduziert (Abb. 24).

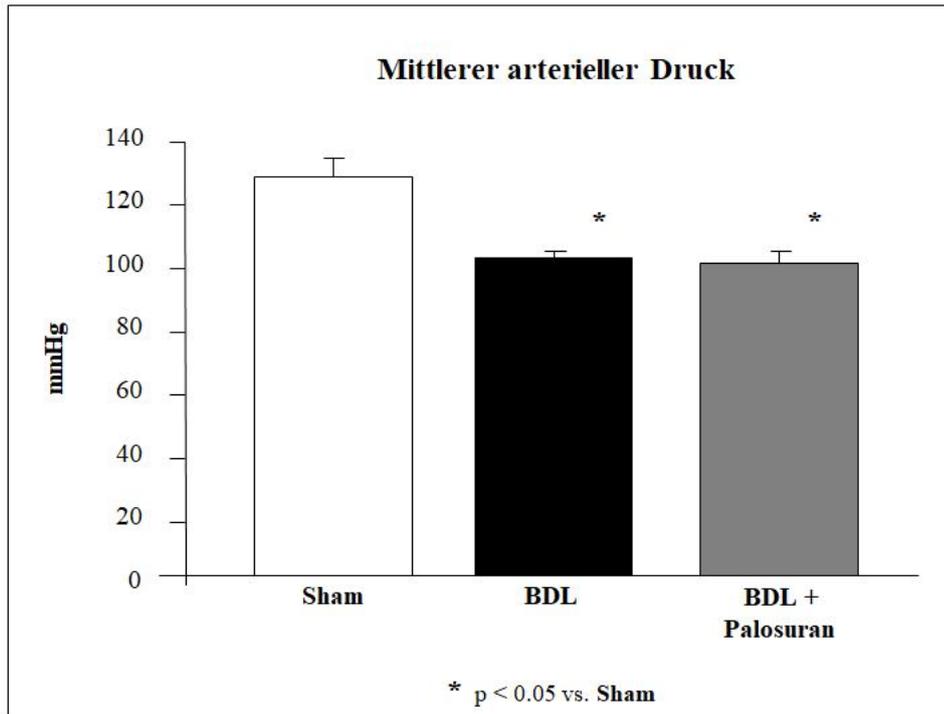


Abb. 21: Mittlerer arterieller Druck bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

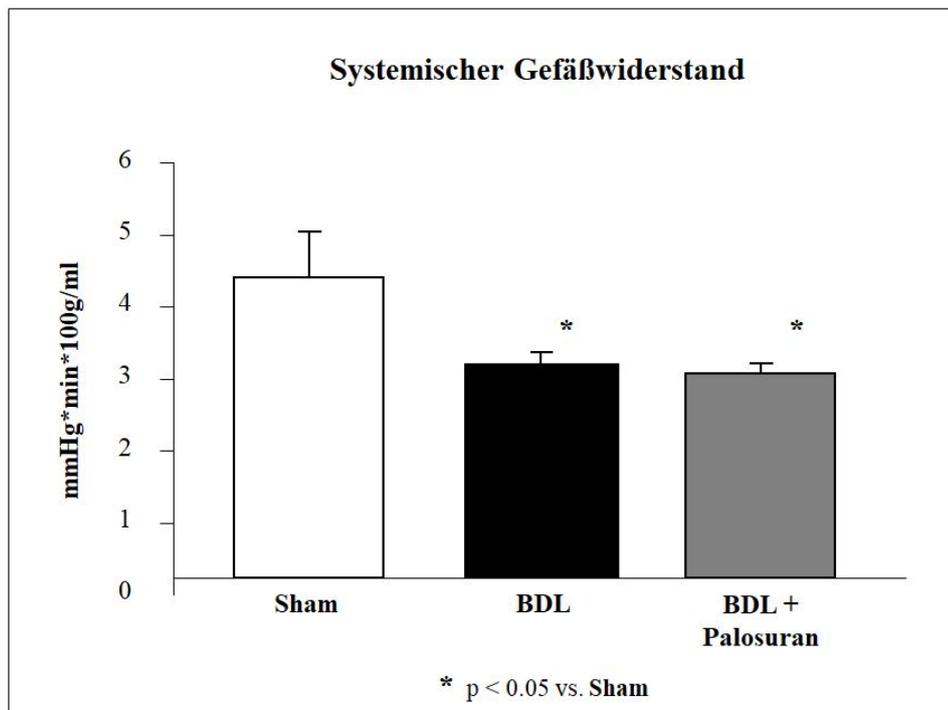


Abb. 22: Systemischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

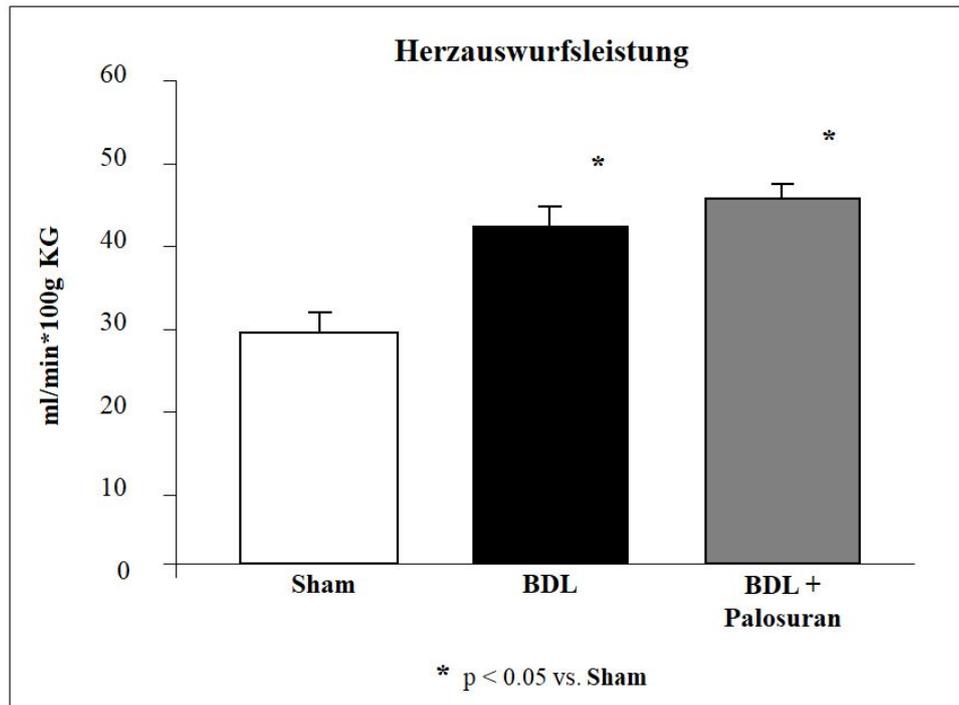


Abb. 23: Herzauswurfsleistung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

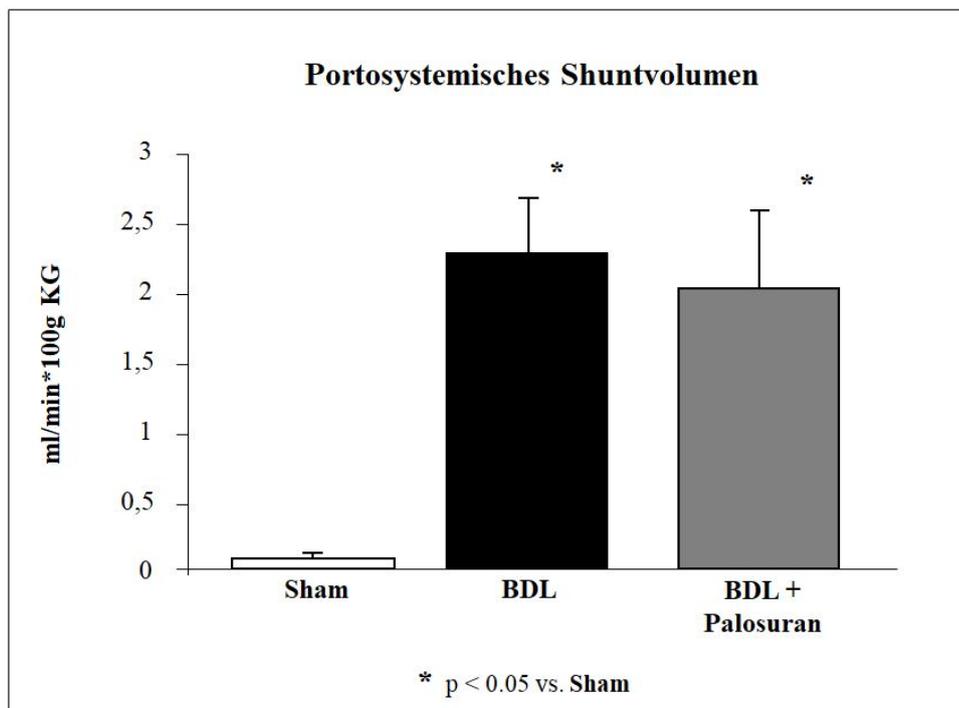


Abb. 24: Portosystemisches Shuntvolumen bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

3.13 Die renale Funktion

Der renale arterielle Blutfluss war bei zirrhotischen Ratten im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren deutlich erhöht. Eine orale Behandlung mit Palosuran führte darüber hinaus zu einem weiteren signifikanten Anstieg der arteriellen Nierendurchblutung (Abb. 25). Bei gallengangsligierten Ratten fanden sich gegenüber Sham-operierten Versuchstieren signifikante Erniedrigungen der Kreatininclearance und der Natriumausscheidung. Durch eine Therapie mit Palosuran stiegen sowohl die Kreatininclearance als auch die Natriumausscheidung auf signifikant höhere Werte an, sie blieben aber deutlich niedriger als bei Sham-operierten Ratten (Abb. 26 und Abb. 27). Diese Effekte von Palosuran auf die Nierenfunktion wurden von einem Anstieg des Urinvolumens begleitet (Abb. 28).

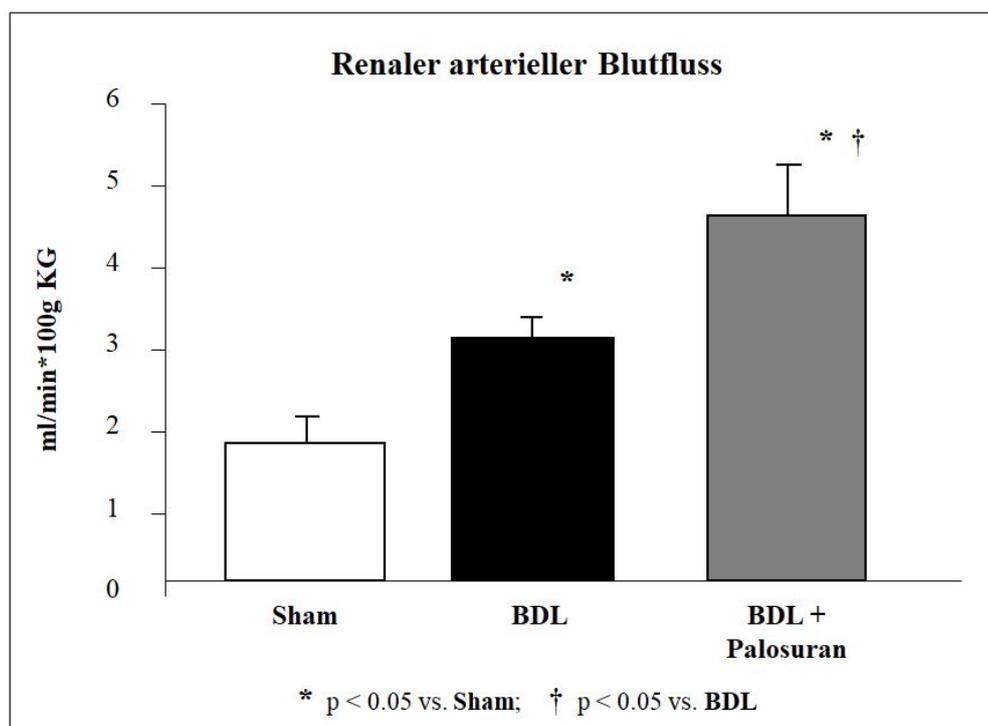


Abb. 25: Renaler arterieller Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

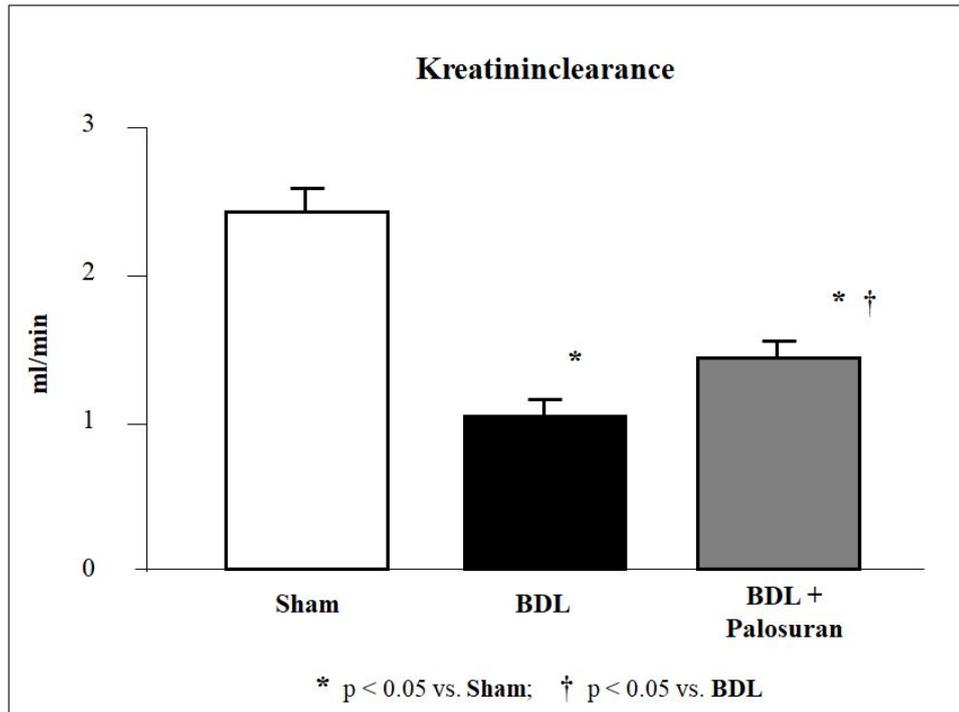


Abb. 26: Kreatininclearance bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

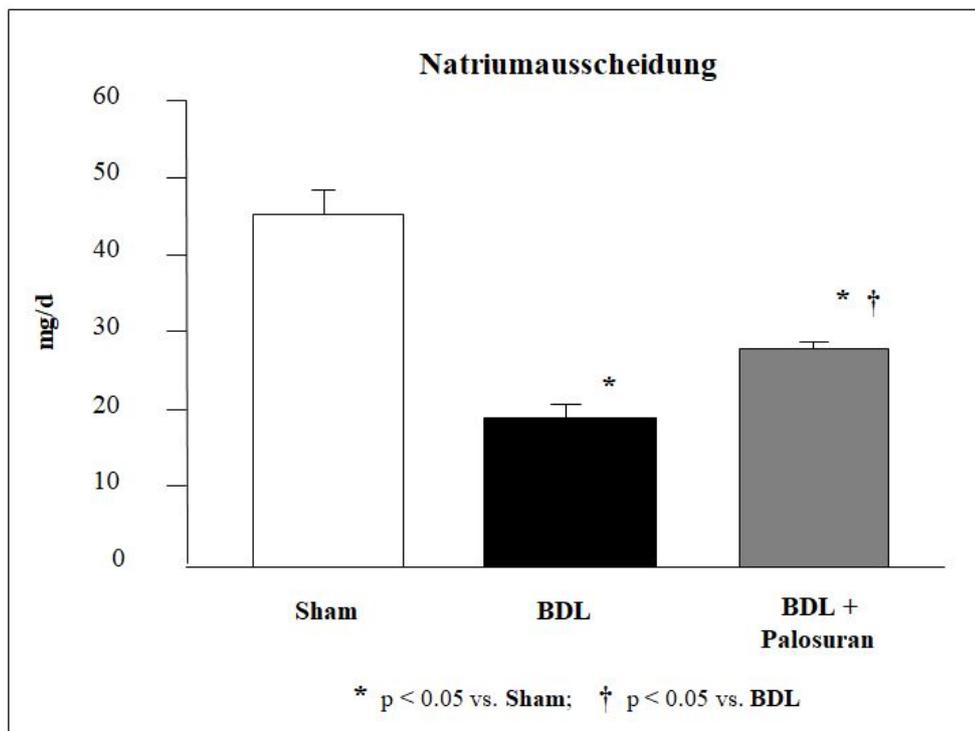


Abb. 27: Natriumausscheidung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

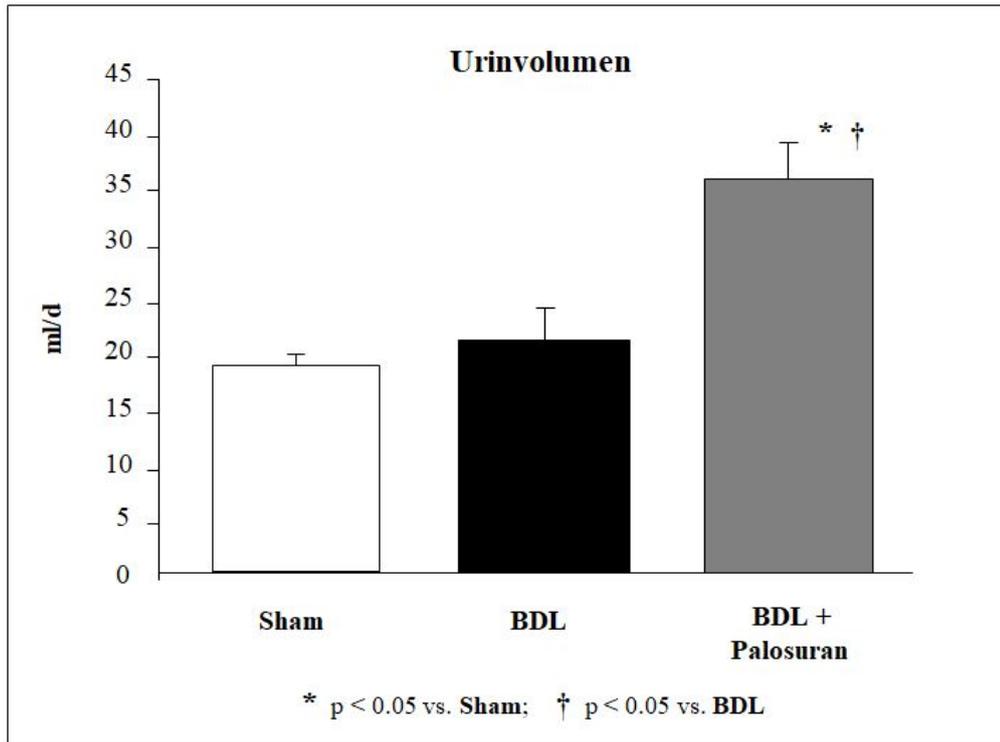


Abb. 28: Urinvolumen bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe)

4. Diskussion

Das vasoaktive Peptid Urotensin II führt je nach Gefäßregion über Aktivierung des Urotensin II-Rezeptors zu unterschiedlichen Effekten. (Gardiner et al., 2001, 2006). In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass Urotensin II zur Vasodilatation der Mesenterialgefäße und damit zur Entstehung des portalen Hypertonus bei Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose nach Gallengangsligation beitragen könnte (Trebicka et al., 2008). Mittels der durchgeführten Versuche konnte bewiesen werden, dass der Urotensin II Rezeptor-Antagonist Palosuran den überhöhten Pfortaderdruck bei zirrhotischen Ratten durch eine Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet senkte (Abb. 17 und Abb. 19). Dies war von einer Aktivierung der Rho-Kinase und einer Hemmung der NO/ cGMP-abhängigen Proteinkinase G in den Mesenterialgefäßen begleitet (Abb. 7 und Abb. 9). Daneben verbesserte Palosuran die Nierenfunktion gallengangsligierter, zirrhotischer Versuchstiere (Abb. 26 und Abb. 27), was entsprechend vorheriger Untersuchungen (Clozel et al., 2006; Sidharta et al., 2006) zu erwarten war und weiter unten diskutiert wird.

Bei Patienten mit Leberzirrhose korrelieren die Plasmakonzentrationen des vasoaktiven Peptids Urotensin II positiv mit dem Ausmaß der portalen Hypertension und renalen Dysfunktion (Heller et al., 2002; Kemp et al., 2007). Durch die kontinuierliche Infusion von Urotensin II über 4 Wochen entwickelte sich bei gesunden Ratten ein dosisabhängiger Anstieg des portalen Hypertonus sowie eine Leberfibrose (Kemp et al., 2009). Auch bei zirrhotischen Ratten mit portalem Hypertonus nach Gallengangsligation wurden bei früheren Untersuchungen erhöhte Urotensin II-Plasmakonzentrationen festgestellt (Trebicka et al., 2008). Als mögliche Ursache wurde eine vermehrte Expression von Urotensin II in den Endothelzellen der hepatischen Gefäße, Kupfferzellen und portalen Venen postuliert. (Leifeld et al., 2010; Trebicka et al., 2008). Außerdem wurde eine hochregulierte Expression des Urotensin II-Rezeptors im intrahepatischen Gefäßbett und den portalen Venen beobachtet. (Trebicka et al., 2008). Vorbeschrieben war grundsätzlich eine Kontraktion der vaskulären glatten Muskelzelle über die RhoA/ Rho-Kinase-Aktivierung (Sauzeau et al., 2001; Watanabe et al., 2006). Bei Ratten mit CCl₄-induzierter Leberzirrhose war durch eine vierwöchige Gabe von Palosuran ein signifikanter Abfall des portalen Hypertonus aufgefallen, was über den Rückgang der hepatischen Fibrose und einer verstärkten eNOS-abhängigen Gefäßerweiterung der hepatischen Sternzellen erklärt

wurde (Zhang, 2019). Bei den aktuellen hämodynamischen Experimenten hatte die Urotensin II-Rezeptorblockade durch Palosuran allerdings keinen Effekt auf den hepatischen Gefäßwiderstand (Abb. 18).

Wie bereits erwähnt, führt Urotensin II bei zirrhotischen Ratten zu einer Vasodilatation im Splanchnikusgebiet und folglich zu einem erhöhten portalvenösen Druck (Trebicka et al., 2008). Entsprechend den Erwartungen kam es durch Palosuran als Urotensin II-Rezeptor-Antagonist zu einer Erhöhung des splanchnischen Gefäßwiderstandes und damit zu einer Senkung des Pfortaderhochdrucks (Abb. 11, Abb. 13, Abb. 14 und Abb. 17). Die Beobachtung, dass die orale Applikation von Palosuran bei zirrhotischen Versuchstieren keinen Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck hatte, untermauert die Regionen-spezifischen Eigenschaften von Urotensin II (Abb. 21 und Abb. 22). Die Versuchsergebnisse festigen damit nachhaltig die Ansicht, dass Urotensin II und sein Rezeptor eine wichtige Rolle bei dem verminderten Tonus der Mesenterialgefäße im Rahmen einer Leberzirrhose mit portaler Hypertension spielen. Mit Palosuran als Urotensin II-Rezeptor-Antagonist steht damit eine Erfolg versprechende Behandlungsoption zur Verfügung.

Die molekularen Wirkmechanismen der Urotensin II-vermittelten Vasodilatation im Splanchnikusgebiet wurden in vorangegangenen Experimenten untersucht (Trebicka et al., 2008). Der Gefäßtonus wird von vielen Faktoren beeinflusst und hängt insbesondere vom Gleichgewicht zwischen den phosphorylierten und nicht-phosphorylierten leichten Myosinketten ab. Die Signalwege über RhoA/ Rho-Kinase und eNOS/ NO/ Proteinkinase G sind wichtige Regulatoren dieses Gleichgewichtes (Hennenberg et al., 2006; Vallance und Moncada, 1991; Wiest et al., 1999). Bei Leberzirrhose ist dieses Gleichgewicht in extrahepatischen Gefäßen zugunsten der Vasodilatation verschoben, da zum einen die Signaltransduktion über RhoA/ Rho-Kinase gestört ist (Hennenberg et al., 2006) und zum anderen die Aktivität von eNOS/ NO/ Proteinkinase G verstärkt wird (Vallance und Moncada, 1991; Wiest et al., 1999). Es zeigte sich in vorangegangenen Experimenten, dass Urotensin II RhoA und seinen Effektor Rho-Kinase aktivierte, was zur Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen führt (Sauzeau et al., 2001). Umgekehrt könnte Urotensin II auch eNOS aktivieren und damit zur NO-abhängigen Vasodilatation führen (Bottrill et al., 2000). Die zusätzliche Gabe von Urotensin II hatte in früheren Tierversuchen bei Ratten mit sekundär biliärer Zirrhose keine Vasokonstriktion zur Folge. (Trebicka et al., 2008). Dabei war die Aktivität der Rho-Kinase trotz erhöhter Urotensin II-Spiegel nur gering,

was zu der vorbeschriebenen vaskulären Hypokontraktilität im mesenterialen Gefäßbett durch einen Defekt im RhoA/ Rho-Kinase-Signalweg passt (Hennenberg et al., 2006).

Der Urotensin II-Rezeptorantagonist Palosuran führt bei gallengangsligierten Ratten mit sekundär biliärer Zirrhose zu einer splanchnischen Vasokonstriktion (Abb. 13 und Abb. 19). Da die mesenteriale NO-Produktion abnimmt (Abb. 10) mit daraus resultierender Hemmung der Proteinkinase G (Abb. 9), was über den Phosphorylierungsgrad des vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass erhöhte Plasmaspiegel von Urotensin II zumindest teilweise zu einer erhöhten mesenterialen NO-Produktion führen. Interessanterweise führte die Gabe von Palosuran zu einer gesteigerten Expression sowohl von RhoA und Rho-Kinase als auch eNOS (Abb. 2, Abb. 3 und Abb. 4), was nicht sicher erklärt werden kann. Aktuelle ex-vivo-Experimente mit neuen Urotensin II-Antagonisten zeigten teilweise eine nicht-kompetitive Modulation, sodass eine laterale Allosterie eines multimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptormodells diskutiert wird (Merlino et al., 2024). Die Expression und Aktivität der Rho-Kinase wurde durch die spezifische Blockade des Urotensin II-Rezeptors durch den nicht peptischen Antagonisten Palosuran erhöht (Abb. 6 und Abb. 7).

Eine erhöhte Aktivität der Rho-Kinase könnte wie vorbeschrieben die eNOS-Aktivität und die daraus resultierende NO-Produktion hemmen (Laufs et al., 1998; Rikitake und Liao, 2005). Erstaunlicherweise führt der Urotensin II-Rezeptorantagonist Palosuran zu einem Anstieg der Rho-Kinase-Aktivität (Abb. 7). Darüber könnte die erniedrigte eNOS-Aktivität und die Vasokonstriktion erklärt werden. Neben dem Ausmaß der Expression sind außerdem Modifikationen nach der Translation wesentliche Regulationsmechanismen für die eNOS-Aktivität (Fleming und Busse, 2003; Fulton et al., 2001; Mookerjee et al., 2007). So ist die intrahepatische eNOS-Aktivität trotz unveränderter Expression verringert (Mookerjee et al., 2007). Die durch Palosuran induzierte Vasokonstriktion könnte durch die erhöhte Scherspannung in den Mesenterialgefäßen zu einer vermehrten Expression der eNOS führen (Fleming und Busse, 2003; Paterson et al., 2000); die eNOS-Aktivität ist wie bereits ausgeführt trotzdem abgeschwächt.

Es wurde bereits gezeigt, dass Urotensin II in Ratten die glomeruläre Filtrationsrate, die Urinmenge sowie die Natriumausscheidung reduziert (Song et al., 2006). Die pharmakologische Hemmung oder genetische Ablation des Urotensin II-Rezeptors linderte Nierenerkrankungen bei Nagetieren (Michael et al., 2024). Der Urotensin II-Rezeptorantagonist Palosuran führte bei an Diabetes erkrankten Ratten zu einer Steige-

rung der glomerulären Filtrationsrate und zu einer Abnahme der Albuminurie (Clozel et al., 2006; Sidharta et al., 2006). Der genaue Wirkmechanismus ist bisher unklar. Im Hinblick auf den nephroprotektiven Effekt von Palosuran bei Ratten, die mit Cyclosporin A behandelt wurden, wurde ein möglicherweise unabhängiger Effekt von seinem Urotensin II-Rezeptor-Antagonismus diskutiert (Olukman et al., 2019). Die Erhöhung von Urotensin II korreliert bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion (Heller et al., 2002; Kemp et al., 2007). Wie zu erwarten, führte Palosuran zu einer Steigerung der Nierendurchblutung, der glomerulären Filtrationsrate, der Natriumausscheidung und der Urinmenge (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27. und Abb. 28). Die Verbesserung der Nierenfunktion bei gallengangsligierten Ratten mit sekundär biliärer Leberzirrhose könnte eine direkte Wirkung der Blockade des Urotensin II-Rezeptors in den Tubuli und Glomeruli sein. Andererseits könnte auch ein indirekter Effekt durch die Absenkung des portalen Hypertonus mit Nierenfunktionsverbesserung vorliegen. Hier wurde in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass ein Abfall des Pfortaderhochdrucks zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führte (Lang et al., 1991).

5. Zusammenfassung

Die führende Rolle in der Entstehung des portalen Hypertonus bei Leberzirrhose nimmt die splanchnische Vasodilatation ein. Trotz der kompensatorischen Aktivierung vasoaktiver Systeme wie zum Beispiel des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es aufgrund einer vaskulären Hypokontraktilität nicht zu einer mesenterialen Vasokonstriktion.

Als möglicher Vermittler der splanchnischen Vasodilatation mit Entwicklung und Aufrechterhaltung des portalen Hypertonus wurde Urotensin II identifiziert, da sich bei Patienten mit Leberzirrhose erhöhte Plasmaspiegel fanden, die mit einem Pfortaderhochdruck korrelierten sowie mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion. Da die intravenöse Applikation des Urotensin II-Rezeptorantagonisten Palosuran zu einem effektiven Abfall des portalen Hypertonus führte bei gleichzeitig nur kurzfristiger Absenkung des mittleren arteriellen Blutdrucks, stände damit ein potentiell neues Medikament in der Notfalltherapie der akuten Varizenblutung zur Verfügung.

Auch nach der oralen Behandlung mit Palosuran zur spezifischen Blockade des Urotensin II-Rezeptors lässt sich im Vergleich zu unbehandelten gallengangsligierten Ratten mit sekundär biliärer Zirrhose ein signifikanter Abfall des portalen Hypertonus über die splanchnische Vasodilatation feststellen. Es darf daher vermutet werden, dass hiermit eine neue Medikamentenklasse zur Therapie des Pfortaderhochdrucks und seiner Komplikationen (Ösophagusvarizen und Aszites) zur Verfügung steht.

Als Begleiteffekt kam es unter der Behandlung mit Palosuran wie vermutet zu einer Verbesserung der Nierenfunktion bei gallengangsligierten Ratten mit sekundär biliärer Zirrhose. Es stellte sich eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und eine Zunahme der Natriumausscheidung ein.

Zusammenfassend sollte Palosuran als Urotensin II-Rezeptorantagonist an Patienten mit Leberzirrhose erprobt werden, um den portalen Hypertonus abzusenken und damit Komplikationen wie Ösophagusvarizen und Aszites zu behandeln.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Urotensin II-Plasmakonzentrationen der verschiedenen Gruppen	29
Abbildung 2: Messenger-RNA-Expression von RhoA in den Mesenterialarterien	30
Abbildung 3: Messenger-RNA-Expression von Rho-Kinase in den Mesenterialarterien	31
Abbildung 4: Messenger-RNA-Expression von eNOS in den Mesenterialarterien	31
Abbildung 5: Proteinexpression von RhoA in den Mesenterialarterien	32
Abbildung 6: Proteinexpression von Rho-Kinase in den Mesenterialarterien	33
Abbildung 7: Konzentration von Phospho-Moesin in den Mesenterialarterien	34
Abbildung 8: Proteinexpression von eNOS in den Mesenterialarterien	35
Abbildung 9: Konzentration von Phospho-VASP in den Mesenterialarterien	36
Abbildung 10: NO _x -Konzentration in den Homogenisaten der Mesenterialarterien	37
Abbildung 11: Auswirkungen der akuten intravenösen Applikation von Palosuran auf den Pfortaderdruck	38
Abbildung 12: Auswirkungen der akuten intravenösen Applikation von Palosuran auf den mittleren arteriellen Druck	39
Abbildung 13: Splanchnischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran	40
Abbildung 14: Portalvenöser Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran	40

- Abbildung 15:** Systemischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran 41
- Abbildung 16:** Herzauswurfsleistung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach intravenöser Applikation von Palosuran 41
- Abbildung 17:** Pfortaderdruck bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 42
- Abbildung 18:** Hepatischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 43
- Abbildung 19:** Splanchnischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 43
- Abbildung 20:** Portalvenöser Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 44
- Abbildung 21:** Mittlerer arterieller Druck bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 45
- Abbildung 22:** Systemischer Gefäßwiderstand bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 45

- Abbildung 23:** Herzauswurfsleistung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 46
- Abbildung 24:** Portosystemisches Shuntvolumen bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 46
- Abbildung 25:** Renaler arterieller Blutfluss bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 47
- Abbildung 26:** Kreatininclearance bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 48
- Abbildung 27:** Natriumausscheidung bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 48
- Abbildung 28:** Urinvolumen bei Sham-operierten, unbehandelten zirrhotischen und zirrhotischen Ratten nach einer Therapie mit Palosuran (30 mg/kg/d) über 3 Tage (n=9/Gruppe) 49

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer und Sonden, die für die quantitative RT-PCR von RhoA, Rho-Kinase und eNOS benutzt wurden	22
Tabelle 2: Allgemeine Charakteristika der verschiedenen Gruppen	28
Tabelle 3: Biochemische Parameter der verschiedenen Gruppen	29

8. Literaturverzeichnis

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(11): 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(1): 248-254

Albillos A, García-Pagan JC, Iborra J, Bandi JC, Cacho G, Perez-Paramo M, Escorsell A, Calleja JL, Escartín P, Bosch J. Propranolol plus prazosin compared with propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the treatment of portal hypertension. *Gastroenterology* 1998; 115(1): 116-123

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(4): 1257-1265

Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401(6750): 282-286

Angeli P, Gines P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, Moreau R, Jalan R, Sarin SK, Piano S, Moore K, Lee SS, Durand F, Salerno F, Caraceni P, Kim WR, Arroyo V, Garcia-Tsao G. Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *Gut*. 2015; 64(4): 531-537

Arroyo V, Jimenez W. Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000; 32(1 Suppl): 157-170.

Balment RJ, Song W, Ashton N. Urotensin II: ancient hormone with new functions in vertebrate body fluid regulation. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1040: 66-73

Banares R, Albillos A, Rincon D, Alonso S, Gonzalez M, Ruiz-del-Arbol L, Salcedo M, Molinero LM. Endoscopic treatment versus endoscopic plus pharmacologic treatment for acute variceal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 2002; 35(3): 609-615

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(1): 79-83

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(7): 827-832

Bauer M., Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol* 1994; 267(1 Pt 1): 143-149

Benoit JN, Womack WA, Hernandez L, Granger DN. "Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in the rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology*. 1985; 89(5): 1092-1096

Bettinger D, Sturm L, Pfaff L, Hahn F, Kloeckner R, Volkwein L, Praktiknjo M, Lv Y, Han G, Huber JP, Boettler T, Reincke M, Klinger C, Caca K, Heinzow H, Seifert LL, Weiss KH, Rupp C, Piecha F, Kluwe J, Zipprich A, Luxenburger H, Neumann-Haefelin C, Schmidt A, Jansen C, Meyer C, Uschner FE, Brol MJ, Trebicka J, Rössle M, Thimme R, Schultheiss M. Refining prediction of survival after TIPS with the novel Freiburg index of post-TIPS survival. *J Hepatol* 2021; 74(6): 1362-1372

Bettinger D, Thimme R, Schultheiß M. Implantation of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): indication and patient selection. *Curr Opin Gastroenterol* 2022; 38(3): 221-229

Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(10): 2555-2563.

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(4): 861-865

Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32(1 Suppl): 141-156

Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130(8): 1865-1870

Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Müller C, Müller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(1): 204-212

Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M. The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(3): 1115-1121

D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review. *Hepatology* 1995; 22(1): 332-354

de Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C. Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol* 2022; 76(4): 959-974

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(6736): 601-615

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(4): 522-527

Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR, Ohlstein EH, Aiyar NV, Willette RN. Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 a; 36(5 Suppl 1): 163-166

Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 2000 b; 131(7): 1262-1274

Esler M, Dudley F, Jennings G, Debinski H, Lambert G, Jones P, Crotty B, Colman J, Willett I. Increased sympathetic nervous activity and the effects of its inhibition with clonidine in alcoholic cirrhosis. *Ann Intern Med* 1992; 116(6): 446-455

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(5): 1082-1089

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(1): 1-12

Francoz C, Durand F, Kahn JA, Genyk YS, Nadim MK. Hepatorenal Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019; 14(5): 774-781

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(6736): 597-601

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(3): 818-824

Garcia-Pagan JC, Salmeron JM, Feu F, Luca A, Gines P, Pizcueta P, Claria J, Piera C, Arroyo V, Bosch J. Effects of low-sodium diet and spironolactone on portal pressure in patients with compensated cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19(5): 1095-1099

Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2001; 132(8): 1625-1629

- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP, Bennett T. Regional heterogeneity in the haemodynamic responses to urotensin II infusion in relation to UT receptor localisation. *Br J Pharmacol* 2006; 147(6): 612-621
- 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(2): 372-376
- Gines P, Arroyo V. Hepatorenal syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(8): 1833-1839.
- Gines P, Jimenez W, Arroyo V, Navasa M, Lopez C, Tito L, Serra A, Bosch J, Sanz G, Rivera F. Atrial natriuretic factor in cirrhosis with ascites: plasma levels, cardiac release and splanchnic extraction. *Hepatology* 1988; 8(3): 636-642
- Gines P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet* 2021; 398(10308): 1359-1376
- Gioia S, Nardelli S, Ridola L, Riggio O. Causes and Management of Non-cirrhotic Portal Hypertension. *Curr Gastroenterol Rep* 2020; 22(12): 56
- Girgrah N, Liu P, Collier J, Blendis L, Wong F. Haemodynamic, renal sodium handling, and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000; 46(1): 114-120
- Gralnek IM, Duboc MC, Garcia-Pagan JC, Fuccio L, Karstensen JG, Hucl T, Jovanovic I, Awadie H, Hernandez-Gea V, Tantau M, Ebigbo A, Ibrahim M, Vlachogiannakos J, Burgmans MC, Rosasco R, Triantafyllou K. Endoscopic diagnosis and management of esophagogastric variceal hemorrhage: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* 2022, 54(11): 1094-1120
- Groszmann R, Blei AT, Atterbury CE. Portal hypertension. In: Arias IE, ed. *The liver: Biology and pathobiology*. New York: Raven Press, 1988: 1147-1159
- Heinemann A, Wachter CH, Holzer P, Fickert P, Stauber RE. Nitric oxide-dependent and -independent vascular hyporeactivity in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121(5): 1031-1037
- Heller J, Schepke M, Gehnen N, Molderings GJ, Müller 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(2): 387-389
- Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37(6): 767-772
- 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(3): 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(3): 838-854

Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J. Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology* 2007; 45(2): 495-506

Hernandez-Gea V, Procopet B, Giraldez A, Amitrano L, Villanueva C, Thabut D, Ibanez-Samaniego L, Silva-Junior G, Martinez J, Genescà J, Bureau C, Trebicka J, Llop E, Laleman W, Palazon JM, Castellote J, Rodrigues S, Glud LL, Ferreira CN, Barcelo R, Cañete N, Rodriguez M, Ferlitsch A, Mundi JL, Gronbaek H, Hernandez-Guerra M, Sassatelli R, Dell'Era A, Senzolo M, Abraldes JG, Romero-Gomez M, Zipprich A, Casas M, Masnou H, Primignani M, Krag A, Nevens F, Calleja JL, Jansen C, Robic MA, Conejo I, Catalina MV, Albillos A, Rudler M, Alvarado E, Guardascione MA, Tantau M, Bosch J, Torres F, Garcia-Pagan JC. Preemptive-TIPS Improves Outcome in High-Risk Variceal Bleeding: An Observational Study. *Hepatology* 2019; 69(1): 282-293

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(6): 1467-1473

Huang DQ, Terrault NA, Tacke F, Glud LL, Arrese M, Bugianesi E, Loomba R. Global epidemiology of cirrhosis - aetiology, trends and predictions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023; 20(6): 388-398

Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283(5): 1074-1081

Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep* 2021; 3(4): 100316

Jachs M, Hartl L, Simbrunner B, Semmler G, Balcar L, Hofer BS, Schwarz M, Bauer D, Stättermayer AF, Pinter M, Trauner M, Reiberger T, Mandorfer M. Prognostic performance of non-invasive tests for portal hypertension is comparable to that of hepatic venous pressure gradient. *J Hepatol* 2024; 80(5): 744-752

Jimenez W, Arroyo V. Pathogenesis of sodium retention in cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18(2): 147-150

Kaneda K, Ekataksin W, Sogawa M, Matsumura A, Cho A, Kawada N. Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction. *Hepatology* 1998; 27(3): 735-747

Kemp W, Kompa A, Phrommintikul A, Herath C, Zhiyuan J, Angus P, McLean C, Roberts S, Krum H. Urotensin II modulates hepatic fibrosis and portal hemodynamic alterations in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297(4): 762-767

Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Yandle T, Richards M, Roberts S. Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int* 2007; 27(9): 1232-1239

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(3): 322-328

La Villa G, Romanelli RG, Casini Raggi V, Tosti-Guerra C, De Feo ML, Marra F, Laffi G, Gentilini P. Plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16(1): 156-161

Lang F, Tschernko E, Schulze E, Ottl I, Ritter M, Völkl H, Hallbrucker C, Häussinger D. Hepatorenal reflex regulating kidney function. *Hepatology* 1991; 14(4): 590-594

Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273(37): 24266-24271

Leifeld L, Clemens C, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T, Spengler U. Expression of urotensin II and its receptor in human liver cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 2010; 55(5): 1458-1464

Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14(7): 618-633

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(3): 761-767

Lv Y, Bai W, Zhu X, Xue H, Zhao J, Zhuge Y, Sun J, Zhang C, Ding P, Jiang Z, Zhu X, Ren W, Li Y, Zhang K, Zhang W, Li K, Wang Z, Luo B, Li X, Yang Z, Guo W, Xia D, Xie H, Pan Y, Yin Z, Fan D, Han G. Development and validation of a prognostic score to identify the optimal candidate for preemptive TIPS in patients with cirrhosis and acute variceal bleeding. *Hepatology* 2024; 79(1): 118-134

MacGilchrist AJ, Sumner D, Reid JL. Impaired pressor reactivity in cirrhosis: evidence for a peripheral vascular defect. *Hepatology* 1991; 13(4): 689-694

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(1): 71-79

Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* 2003; 144(5): 1825-1831

Merlino F, Secondo A, Mitidieri E, Sorrentino R, Bellavita R, Grasso N, Chatenet D, Pannaccione A, Grieco P, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Carotenuto A. Expanding Structure-Activity Relationships of Human Urotensin II Peptide Analogues: A Proposed Key Role of the N-Terminal Region for Novel Urotensin II Receptor Modulators. *J Med Chem* 2024; 67(16): 13879-1389

Michael OS, Kanthakumar P, Soni H, Lenin RR, Jha KA, Gangaraju R, Adebisi A. Urotensin II system in chronic kidney disease. *Curr Res Physiol* 2024; 7: 100126

Mookerjee RP, Wiesenthal A, Icking A, Hodges SJ, Davies NA, Schilling K, Sen S, Williams R, Novelli M, Müller-Esterl W, Jalan R. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2533-2541

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(2): 522-531

Nicoara-Farcau O, Han G, Rudler M, Angrisani D, Monescillo A, Torres F, Casanovas G, Bosch J, Lv Y, Dunne PDJ, Hayes PC, Thabut D, Fan D, Hernandez-Gea V, Garcia-Pagán JC. Pre-emptive TIPS in high-risk acute variceal bleeding. An updated and revised individual patient data meta-analysis. *Hepatology* 2024; 79(3): 624-635

Olukman M, Can C, Coskunsever D, Uyanikgil Y, Cavusoglu T, Sözmen E, Duman S, Celenk FG, Ülker S. Urotensin receptor antagonist palosuran attenuates cyclosporine-a-induced nephrotoxicity in rats. *Adv Clin Exp Med* 2019; 28(10): 1393-1401

Pateron D, Tazi KA, Sogni P, Heller J, Chagneau C, Poirel O, Philippe M, Moreau R, Lebrec D. Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. *Gastroenterology* 2000; 119(1): 196-200

Pose E, Piano S, Juanola A, Gines P. Hepatorenal Syndrome in Cirrhosis. *Gastroenterology* 2024; 166(4): 588-604.

Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann WH. Liver cirrhosis-1: Pathogenesis and diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126(36): 975-977

Rajesh S, George T, Philips CA, Ahamed R, Kumbar S, Mohan N, Mohanan M, Augustine P. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in cirrhosis: An exhaustive critical update. *World J Gastroenterol* 2020; 26(37): 5561-5596

Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005; 97(12): 1232-1235.

Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001; 88(11): 1102-1104

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(5): 884-888

Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113(2): 47-63

Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29(2): 334-339

Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8(5): 1151-1157

Semmler G, Yang Z, Fritz L, Köck F, Hofer BS, Balcar L, Hartl L, Jachs M, Stopfer K, Schedlbauer A, Neumayer D, Maurer J, Müllner-Bucsics T, Simbrunner B, Scheiner B, Trauner M, Mandorfer M, Reiberger T, Bauer DJM. Dynamics in Liver Stiffness Measurements Predict Outcomes in Advanced Chronic Liver Disease. *Gastroenterology* 2023; 165(4): 1041-1052

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* 1999; 277(2): 463-468

Sidharta PN, Wagner FD, Bohnemeier H, Jungnik A, Halabi A, Krähenbühl S, Chadha-Boreham H, Dingemanse J. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(3): 246-256

Song W, Abdel-Razik AES, Lu W, Ao Z, Johns DG, Douglas SA, Balment RJ, Ashton N. Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney Int* 2006; 69(8): 1360-1368

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(4): 487-490

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(1): 242-253

Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Schulze Pröbsting A, 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(4): 1264-1276

Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337(8744): 776-778

Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Garcia-Pagan JC, Calleja JL, Aracil C, Banares R, Morillas RM, Poca M, Penas B, Augustin S, Abraldes JG, Alvarado E, Torres F, Bosch J. β blockers to prevent decompensation of cirrhosis in patients with clinically significant portal hypertension (PREDESCI): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2019; 393(10181): 1597–1608

Vogt L, Chiurchiu C, Chadha-Boreham H, Danaïetash P, Dingemanse J, Hadjadj S, Krum H, Navis G, Neuhart E, Parvanova AI, Ruggenenti P, Woittiez AJ, Zimlichman R, Remuzzi G, de Zeeuw D. Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. *Hypertension* 2010; 55(5): 1206-1209

Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006; 29(6): 375-387

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(9): 1223-1233

Wong, F, Liu P, Blendis L. The mechanism of improved sodium homeostasis of low-dose losartan in preascitic cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35(6): 1449-1458

Yoshida H, Shimizu T, Yoshioka M, Matsushita A, Kawano Y, Ueda J, Kawashima M, Taniai N, Mamada Y. The Role of the Spleen in Portal Hypertension. *J Nippon Med Sch* 2023; 90(1): 20-25

Zhang R, Chen J, Liu D, Wang Y. Urotensin II receptor antagonist reduces hepatic resistance and portal pressure through enhanced eNOS-dependent HSC vasodilatation in CCl4-induced cirrhotic rats. *Front Med* 2019; 13(3): 398-408

Zhu YC, Zhu YZ, Moore PK. The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br J Pharmacol* 2006; 148(7): 884-901