

**Hämodynamische und molekulare Effekte
des eNOS-Transkriptionenhancers AVE 9488
bei gesunden Ratten und Ratten mit sekundär biliärer
Leberzirrhose**

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

Vorgelegt von
Alice Young Kang
Boston, Massachusetts

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch

2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.07.2008

Erscheinungsjahr: 2008

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

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Abkürzungsverzeichnis	5
2.	Einleitung	8
2.1	Pathogenese der Leberzirrhose	8
2.2	Hämodynamische Veränderungen bei Leberzirrhose und portale Hypertension	9
2.3	Vasoaktive Substanzen	17
2.3.1	Stickstoffmonoxid als wichtigster Vasodilatator	18
2.3.2	Weitere vasoaktive Substanzen	20
2.4	NO-Synthetasen	21
2.4.1	Endotheliale NO-Synthetase und andere Isoformen	21
2.4.2	Posttranslationale Modifikation von eNOS	22
2.5	Therapie der portalen Hypertonie	24
2.6	Fragestellung	26
2.6.1	Hat der eNOS-Transkriptionenhancer AVE 9488 auf die portale Hämodynamik einen Effekt?	26
2.6.2	Steigt die eNOS-Verfügbarkeit durch AVE 9488?	27
2.6.3	An welchen Organsystem wirkt AVE 9488?	27
3.	Material und Methoden	27
3.1	Tiermodell	27

3.2	AVE 9488	28
3.3	Hämodynamische Messung mit Microsphären	29
3.4	RT-PCR	32
3.5	Immunoblot-Analyse	38
3.6	In-vitro-Leberperfusion	41
3.7	Statistische Analyse	44
4.	Ergebnisse	44
4.1	Hämodynamische Microsphären-Untersuchung	44
4.2	Quantitative PCR	51
4.3	Immunoblot	53
4.4	In-vitro-Leberperfusion	56
5.	Diskussion	59
6.	Zusammenfassung	65
7.	Bibliographie	66
8.	Danksagung	79
9.	Curriculum vitae	80

1. Abkürzungsverzeichnis

ACh(-R)	Acetylcholin(rezeptor)
ADH	Antidiuretisches Hormon
Akt/PKB	Proteinkinase B
AT-1	Angiotensin-Typ 1
BDL	Bile duct ligation
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovine serum albumin
CB 1	Cannabinoid
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DAG	Diacylglycerol
DDT	15-20 Basenpaare-lange Oligoprimer
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, Copy-Desoxyribonukleinsäure
EDRF	Endothelial-derived relaxing factor
ET-1	Endothelin-1
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
HRS	Hepatorenales Syndrom
HVPG	Hepato-venous pressure gradient
5-HT	Serotonin
HZV	Herzzeitvolumen
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISMN	Isosorbid-5-Mononitrat
KBF	Kollateraler Blutfluss
KOH	Kaliumhydroxid

L-NAME	N ^G -nitro L-arginine methyl ester
MAD	Mittlerer arterieller Druck
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
NANC	Nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NF-κB	Nekrosefaktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
NOS-1/nNOS	Neuronale NO-Synthetase
NOS-2/iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
NOS-3/eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
NTP, dNTP	Nukleosidtriphosphat, Desoxynukleosidtriphosphat
PBF	Portaler Blutfluss
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGI ₂	Prostazyklin
PI	Phosphoinositol
PIP ₂	Phosphoinositolbiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PP	Portal pressure
PSS	Porto-systemischer Shunt
PVI	Portal-venöser Einstrom
PVL	Portal vene ligation
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Ser	Serin
sGC	Lösliche (soluble) Guanylylcyclase

SVR	Systemic vascular resistance
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

2. Einleitung

2.1 Pathogenese der Leberzirrhose

Die Leberzirrhose als histopathologisch definiertes Krankheitsbild ist mit einer Reihe von klinischen Manifestationen verbunden. Als chronische Erkrankung ist die Leberzirrhose Spätfolge verschiedener Lebererkrankungen [28]. Die Inzidenz in Europa und USA beträgt ca. 250/ 100 000/ Jahr [63].

Das Krankheitsbild ist durch einen Umbau der Leberarchitektur gekennzeichnet. Zerstörung der Läppchen- und der Gefäßstruktur der Leber mit entzündlicher Fibrose und Distorsion der Gefäße, Ausbildung bindegewebiger Septen zwischen benachbarten Portalfeldern oder zwischen Portalfeldern und Zentralvenen sowie die Ausbildung von Regeneratknoten charakterisieren das Krankheitsbild [28].

Hepatische Sternzellen umgeben die Endothelzellen im Perisinusoidalraum. Die zahlreichen zytoplasmatischen Ausläufer der hepatischen Sternzellen reichen bis in den intersinusoidalen, perisinusoidalen oder subendothelialen Raum und kleiden den sinusoidalen Umfang aus [117]. Aufgrund ihrer Morphe, Lokalisation und Reagibilität gegenüber Endothelin-1 wurde den hepatischen Sternzellen die Funktion als Perizyten zugeschrieben, die in der sinusoidalen Flussregulation eine Rolle spielen [108].

Es findet ein portal-venöses Remodelling statt, das mit einem inflammatorischen Prozess beginnt. Aktivierte hepatische Sternzellen wandeln sich in Myofibroblasten um, die zu einer perisinusoidalen Kollagenose führen [13]. Das portalvenöse Remodelling bewirkt eine intrahepatische Widerstandserhöhung, die den Portaldruck erhöht.

Ab welchem Zeitpunkt die Fibrosierung der Leber irreversibel wird, ist nicht bekannt. Die Leberzirrhose ist als gemeinsame Endstufe verschiedener chronischer Leberschäden zu betrachten. Die klinischen Manifestationen sind eher vom Schweregrad der Leberschädigung als von der Ätiologie der Krankheit abhängig. Der Verlust des Leberparenchyms kann zu Ikterus, Aszites und Ödemen, Gerinnungsstörungen und metabolischen Störungen führen. Fibrose und Veränderung der Gefäßarchitektur führen zum Pfortaderhochdruck mit seinen Folgen wie Ösophagusvarizen und Splenomegalie. Aszites und die hepatische Enzephalopathie, die auch als

porto-systemische Enzephalopathie bezeichnet wird, können sowohl Ausdruck der Leberinsuffizienz als auch des Pfortaderhochdruckes sein [28].

Die Klassifikation der Zirrhose erfolgt unter Berücksichtigung der Ätiologie und Morphologie in (1) alkoholisch, (2) kryptogen und posthepatitisch, (3) biliär, (4) kardial und (5) metabolisch, genetisch und toxisch/medikamentös [28].

2.2 Häodynamische Veränderungen bei Leberzirrhose und portale Hypertension

Bei fortgeschrittener Leberzirrhose wird der klinische Verlauf von Patienten von verschiedenen Komplikationen bestimmt. Dazu gehören der Pfortaderhochdruck, Aszites, auf deren Boden eine spontan bakterielle Peritonitis entstehen kann, die Splenomegalie, das hepatorenale Syndrom, die hepatische Enzephalopathie und das hepatozelluläre Karzinom [28]. Die Leberzirrhose ist in westlichen Ländern die häufigste Ursache für einen klinisch relevanten Pfortaderhochdruck (in 60% der Fälle) [28]. In diesem Kapitel werden häodynamische Veränderungen behandelt, die zu einem Pfortaderhochdruck führen. Diverse häodynamische Komplikationen, die mit der portalen Hypertension verbunden sind, werden ebenfalls in den Blick genommen.

Die Leber ist ein gut durchblutetes Organ, das zu zwei Drittel vom venösen Blut der Pfortader und zu einem Drittel vom sauerstoffreichen Blut der Arteria hepatica gespeist wird [63]. Der normale Druck im Pfortadersystem liegt bei 3 bis 6mmHg, da der Gefäßwiderstand in den Sinusoiden niedrig ist. Ein Pfortaderdruck >10mmHg ist meist durch einen erhöhten Widerstand im portalen Stromgebiet bedingt. Da Venenklappen fehlen, kann jeder Anstieg des Widerstandes vom rechten Herzen bis zum Splanchnikus zu einer retrograden Druckerhöhung führen [49].

Der porto-systemische Druckgradient (hepato venous pressure gradient, HVPG) ist der Druckunterschied zwischen dem Pfortaderdruck und dem Druck in der Vena hepatica bzw. der Vena cava inferior und repräsentiert den Perfusionsdruck. Der Portaldruckgradient ergibt sich aus dem portalen Blutfluss und dem Gefäßwiderstand in der Leber. Diese Beziehung ist mit dem Ohmschen Gesetz festgelegt [22]:

$$U = I \times R \quad \text{bzw.} \quad \Delta P = Q \times R$$

ΔP ist der portale Druckgradient. Q stellt den Blutfluss im gesamten portalen Gefäßsystem dar, der im Falle der portalen Hypertension die porto-systemischen Kollateralen einbezieht. R ist der gesamte intrahepatische Widerstand. Das Ohmsche Gesetz unter Berücksichtigung der Hagen-

Poiseuilleschen Beziehung gibt den hämodynamischen Zusammenhang in Gefäßen wieder [56]. Der Viskositätskoeffizient ist η , r ist der Radius des Gefäßes und L gibt die Länge an. Während sich die Viskosität des Blutes und die Länge des Gefäßes kaum ändern, beeinflusst der Radius erheblich den Widerstand. Die vierte Potenz des Radius, wie sie in der Formel nach Hagen-Poiseuille eingesetzt wird, verdeutlicht, dass geringe Änderungen des Radius große Auswirkungen auf den Druckgradienten haben:

$$\Delta P = Qx \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

Zur Regulation des Blutflusses tragen portale Venolen, hepatische Arteriolen, zentrale Venulen und Sinusoide mit ihrem Einlass- und Auslasssphincter und sinusoidale Zellen wie hepatische Sternzellen und sinusoidale Endothelzellen durch ihre kontraktile Eigenschaft bei. Es ist anzumerken, dass nicht die Leber den portalen Fluss kontrolliert, sondern die Widerstandsgefäße der splanchnischen Organe [54].

Portale Hypertension ist eine hämodynamische Folge des zirrhotischen Umbaus der Leber, der zu einem erhöhten intrahepatischen Widerstand führt. Zusätzlich zum erhöhten intrahepatischen Widerstand kommt eine Steigerung des intrahepatischen vaskulären Tonus hinzu, die den HVPG zwischen Vena portae und Vena cava erhöht [49]. Kontraktile Strukturen, wie glatte Muskelzellen oder Myofibroblasten tragen zu der aktiven Vasokonstriktion bei. Die Hypothese, dass der Pfortaderhochdruck durch eine Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes verursacht wird, wird auch als „Backward flow“-Theorie bezeichnet [22,56]. Die Beobachtung einer Gefäßerweiterung im Splanchnikus haben Blendis und Wong [16] in der frühen Phase der kompensierten Zirrhose als passive Relaxation beschrieben, die mit einer passiven Akkomodation eines expandierten Blutvolumens und einer supprimierten Plasma-Renin-Aktivität assoziiert ist. Die Volumenexpansion im Splanchnikus führt zu einer Erhöhung des portalen Hypertonus und zu einer Zunahme der Scherkräfte, die unter anderem die Freisetzung von Vasodilatoren fördern. Vasodilatation ist als Erweiterung bereits vorhandener Gefäße oder als Öffnen präexistenter arterio-venöser Kanäle definiert [16]. Die Formation portosystemischer Shunts ermöglicht eine Umgehung der Leber, wodurch der Pfortaderdruck jedoch nicht gesenkt wird. In einem Parallelkreislauf ist der Druckgradient über jedem Teilwiderstand gleich; der Strom hingegen teilt sich in Teilströme auf. Die Beziehung der Widerstände ist reziprok:

$$\Delta P = \Delta P_1 = \Delta P_2 \qquad Q = Q_1 + Q_2 \qquad 1/R = 1/R_1 + 1/R_2$$

Daher nimmt es nicht Wunder, dass der Pfortaderdruck durch die Kollateralenbildung nicht vermindert wird. Der Fluss durch die Leber wird jedoch durch die Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes verringert, was das Flussvolumen in den Kollateralen erhöht.

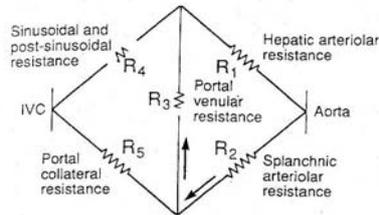


Abb. 1 In der splanchnischen Zirkulation stehen die Gefäßwiderstände entweder in einem seriellen oder parallelen Verhältnis zueinander [56]. Trotz der Kollateralenbildung wird der Portaldruck nicht gesenkt, lediglich der Fluss wird in den Kollateralen erhöht, wie es bei einem Parallelkreislauf der Fall ist.

Das Verhältnis der Widerstände in der A. hepatica (R_1), in den splanchnischen Arteriolen (R_2), im portalen Gefäßbett (R_3), die sinusoidalen und postsinusoidalen intrahepatischen Widerstände (R_4) und der Widerstand der Kollateralkreisläufe (R_5) ändert sich bei portaler Hypertension. Das meiste Blutvolumen nimmt durch die erhebliche Widerstandssenkung und Vasodilatation den Weg durch R_2 und R_5 [56]. Gleichzeitig nimmt der Portaldruck, der sich aus dem Produkt aus Fluss und Widerstand ergibt, zu, was zu einem Circulus vitiosus im Sinne einer sukzessiven Erhöhung der portalen Hypertension führt.

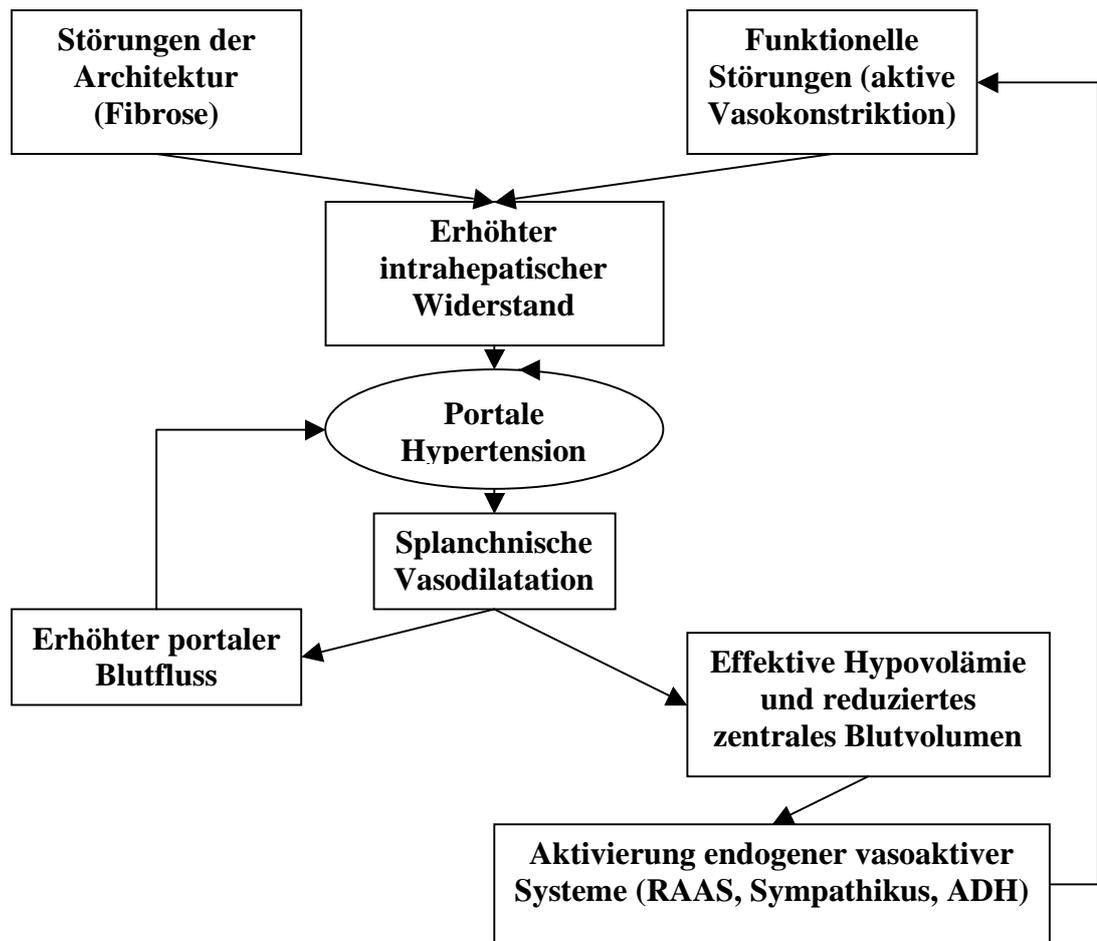


Abb. 2 Bei der „Backward Flow“-Theorie ist die intrahepatische Widerstandserhöhung Ursache der portalen Hypertension [22]. Es entsteht ein Circulus vitiosus durch die Aktivierung endogener vasoaktiver Systeme und durch den erhöhten portalen Blutfluss, was zu einer Zunahme des Portaldruckes führt.

Neben der „Backward Flow“-Theorie, die durch den erhöhten intrahepatischen Widerstand verursacht wird, existiert eine andere Theorie, die die Entstehung eines portalen Hypertonus erklärt. Eine präkapilläre splanchnische Erniedrigung des Widerstandes, die zu einer Zunahme des Flussvolumens im splanchnischen Gefäßbett führt, wird als „Forward Flow“-Theorie [22,56] bei chronischer portaler Hypertension bezeichnet. Die splanchnische hyperdynamische Zirkulation führt zu einer systemischen hyperdynamischen Zirkulation, die durch ein hohes Herzzeitvolumen (HZV) und einen niedrigen splanchnischen arteriellen Widerstand gekennzeichnet ist. Diese Hypothese betrachtet die Entstehung von Aszites als Ergebnis einer arteriellen Dilatation im splanchnischen Stromgebiet, die zu zwei Ereignissen führt. Es wird Bezug auf die Zunahme in der splanchnischen Mikrozirkulation genommen, die den Kapillardruck und die Permeabilität wie auch die Lymphformation erhöht. Das andere Ereignis

hängt mit der arteriellen Drucksenkung zusammen. Die arterielle Druckabnahme im Splanchnikus führt zu einer arteriellen Hypotension, die ein Trigger für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) der Niere ist. Eine Aktivierung des RAAS und des Sympathikus als antinatriuretische Systeme und des Antidiuretischen Hormons (ADH) mit Wasserretention sind gegenregulatorische Mechanismen bei arterieller Hypotension. Angiotensin bewirkt eine Vasokonstriktion in der Niere und in den nicht-splanchnischen Gebieten, die nicht von der hyperdynamischen Zirkulation betroffen sind. Bei einer Vasokonstriktion im renalen Kreislauf werden Natrium und Wasser retiniert, was eine Zunahme des zirkulierenden Volumens zur Folge hat. Durch die enorme Volumenzunahme vor allem im Splanchnikus tritt freies Wasser aus dem Gefäßsystem in den Bauchraum, was die Entstehung von Aszites zur Folge hat.

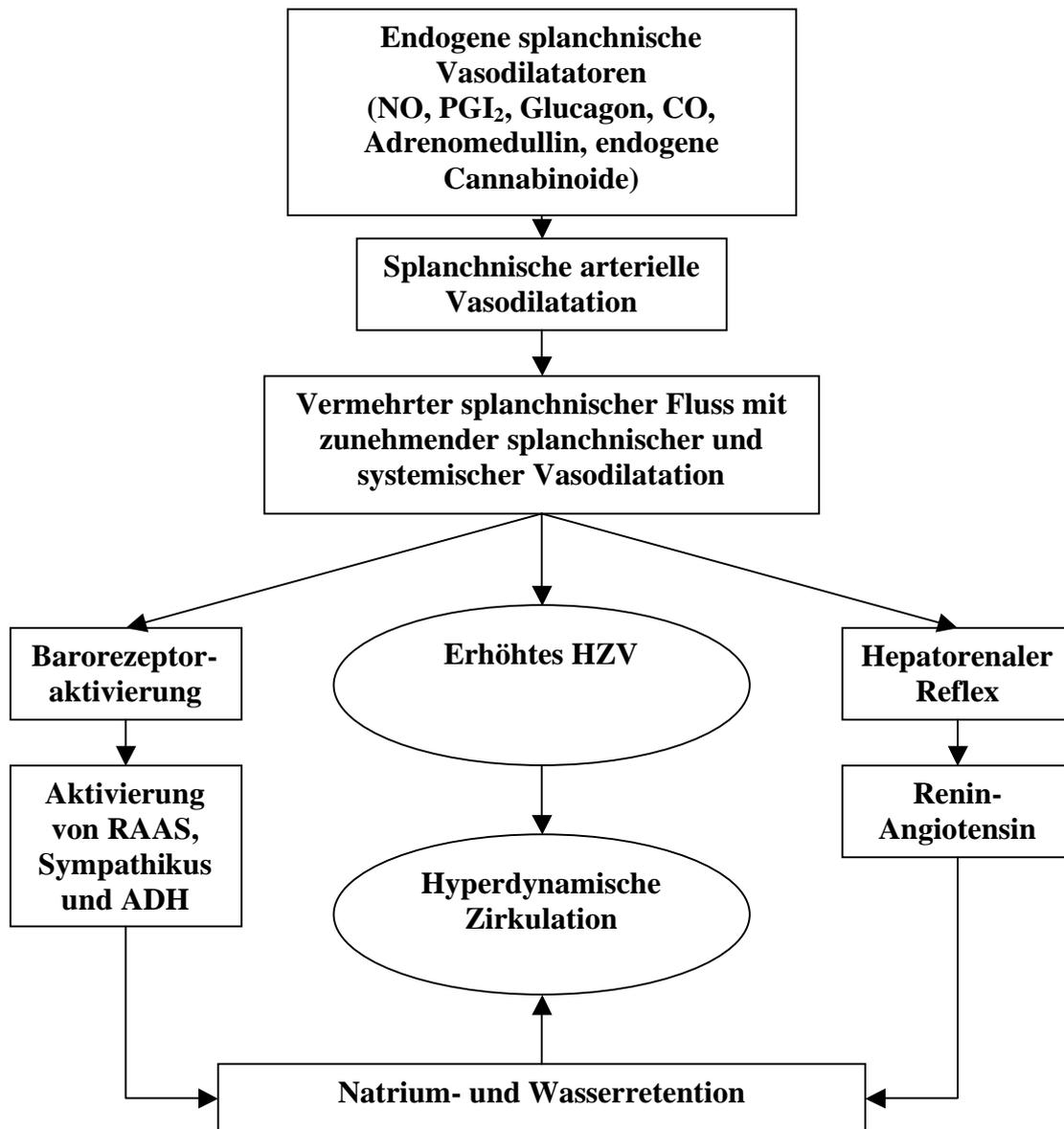


Abb. 3 Bei der „Forward-Flow“-Theorie ist eine splanchnische arterielle Dilatation Auslöser für den portalen Hypertonus [22]. Die arterielle Druckabnahme im Splanchnikus führt zu einer arteriellen Hypotension, was eine renale Gegenregulation durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zur Folge hat. Die Natrium- und Wasserretention führten zu einer Zunahme der hyperdynamischen Zirkulation.

Aszites

Aszites ist als freie Flüssigkeit in der Peritonealhöhle definiert. Eine splanchnische Sequestration von Flüssigkeit infolge des Pfortaderhochdruckes kann zur Reduktion des effektiven Blutvolumens („underfilling“) führen. Zusätzlich kann eine periphere arterielle Vasodilatation mit Erhöhung des HZV und einer Senkung des mittleren arteriellen Druckes (MAD) einen

Barorezeptorenreflex mit Aktivierung des RAAS, des Sympathikus und des ADH-Systems auslösen [28]. Hydrostatische Druckerhöhung im Splanchnikus durch Volumenzunahme, mangelnde Rückresorption der interstitiellen Flüssigkeit durch Abnahme des kolloidosmotischen Druckes wie auch Austritt von Leberlymphe können zur Aszitesbildung führen. Bei Patienten mit Leberzirrhose ohne ausgeprägten Pfortaderhochdruck und Hypoalbuminämie bildet sich selten Aszites.

Hämodynamische Veränderungen und Kreislaufdysregulation bei portaler Hypertension

Die portale Hypertension ist anfänglich durch einen vermehrten portalen Zufluss bei erhöhtem Widerstand gekennzeichnet. Diese portal-venöse Flusszunahme ist mit einer splanchnischen arteriellen Dilatation gekoppelt, die sich auf die systemische arterielle Zirkulation auswirkt. Unter einer solchen hyperdynamischen Zirkulation sind eine Erhöhung des HZV und eine Erniedrigung des MAD und des SVR zu verstehen. Die Zunahme der arteriellen Hypotension wird durch kompensatorische Mechanismen wie das RAAS und den Sympathikus gegenreguliert.

Im normalen Zustand gleicht der hepatische Fluss dem Fluss im Splanchnikus. Bei portaler Hypertension hingegen wird das meiste Blut (60-80%) durch die Kollateralkreisläufe umgeleitet. Die Öffnung präexistenter arterio-venöser Kanäle und die Bildung von Shunts sind Ausdruck der Umgehung des Widerstandes der Leber.

Auch andere Organe, wie die Lunge und das Gehirn, sind von der hyperdynamischen Zirkulation betroffen [68]. Von der generalisierten Vasodilatation ist aber die Niere ausgenommen, da sie auf die relative Hyponatriämie mit einer Vasokonstriktion und Natrium- und Wasserretention reagiert, was zur Ausbildung eines hepatorenenalen Syndroms (HRS) führt.

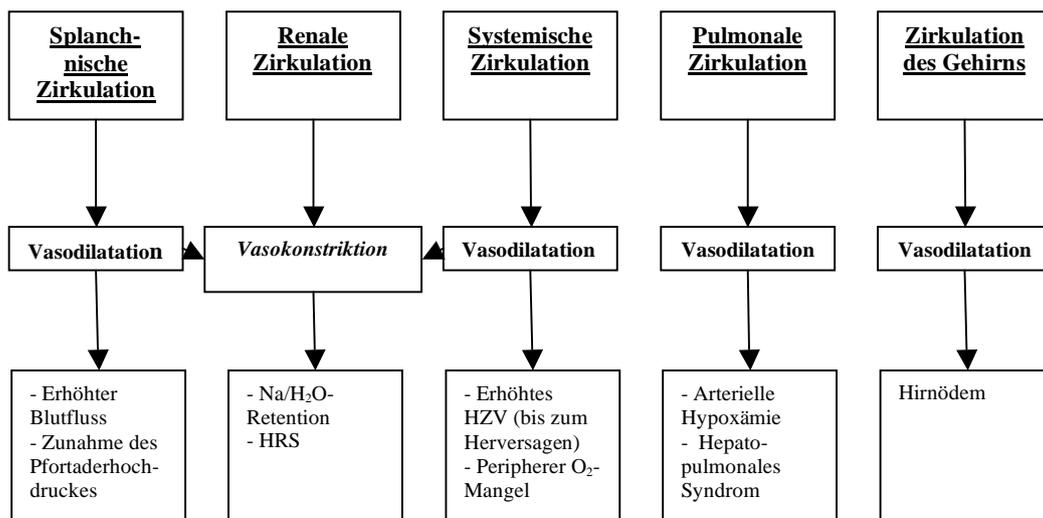


Abb. 4 *Hämodynamische Veränderungen bei portaler Hypertension sind in den einzelnen Organgebieten zu beobachten [68]. Mit Ausnahme der Vasokonstriktion im renalen Stromgebiet findet als gegenregulatorische Reaktion auf die Hypotension durch eine erhöhte splanchnische Dilatation eine generalisierte Vasodilatation in den anderen Organgebieten statt.*

Die hyperdynamische Zirkulation im Splanchnikus und in den oben genannten Organen wird vor allem durch vasodilatatorische Mediatoren vermittelt. Es wird vermutet, dass vasodilatatorische Substanzen, die im Bereich des Splanchnikus gebildet durch den reduzierten intrahepatischen Fluss nicht oder vermindert in der Leber metabolisiert werden, im systemischen Kreislauf akkumulieren. Untersuchungen an parakrinen Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin haben ergeben, dass diese Substanzen eine wichtige Rolle in der hyperdynamischen Zirkulation bei portal-hypertensiven Ratten spielen. Biecker et al. [12] haben jedoch gezeigt, dass NOS-3-Knock out-Mäuse auch einen portalen Hypertonus entwickeln. Es zeigen sich erhöhte NOS-1-mRNA- und NOS-1-Protein-Level bei NOS-3-Knock out-Mäusen, was dafür spricht, dass NOS-1 auch eine wichtige Rolle bei der portalen Hypertension spielt.

NO spielt eine Schlüsselrolle in der splanchnischen Vasodilatation. Die Gabe von NO-Antagonisten hat eine Vasokonstriktion im splanchnischen und systemischen Kreislauf gezeigt. Der vasokonstriktive Effekt ist signifikant größer bei portal-hypertensiven Ratten als bei normalen Kontrolltieren, was ein Hinweis auf eine exzessive NO-Produktion bei portaler Hypertension ist. Diese Annahme erklärt auch die Hyporeagibilität gegenüber Vasokonstriktoren bei portaler Hypertension [110].

Die spätere Phase bei dekompensierter Zirrhose zeichnet sich durch eine Vasodilatation und eine relative Hypotension trotz erhöhter Vasokonstriktorenlevel aus, die Folge der hyperdynamischen Zirkulation ist. Diese Vasodilatation ist in erster Linie auf die venösen Gefäße als Kapazitätsgefäße bezogen, da es 60-80% des gesamten Blutvolumens [16] unter anderem durch die Shunts fassen kann. Bei dekompensierter Leberzirrhose ist eine verminderte vaskuläre Reaktivität wie auch eine autonome Neuropathie zu beobachten [16].

2.3 Vasoaktive Substanzen

Blutfluss und vaskulärer Widerstand werden durch Stickstoffmonoxid [86], Kohlenstoffmonoxid (CO) [49,142], Endothelin-1 (ET-1) [161] und Prostanoiden (Prostazyklin) [138] und eine Reihe weiterer Substanzen reguliert [69]. Die vasoaktiven Substanzen interagieren mit nicht-parenchymalen Zellen wie sinusoidalen Endothelzellen, hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen [64,140,119].

Das Gefäßendothel setzt funktionelle Antagonisten frei, die den Tonus der Gefäßmuskulatur beeinträchtigen. NO senkt den Gefäßtonus und inhibiert die Glatte-Muskel-Zell-Proliferation, ET-1 dagegen steigert den vaskulären Tonus und die Proliferation glatter Muskelzellen [133]. Die elektrophysiologischen Mechanismen, die der Tonusregulation unterliegen, schließen K⁺- und spannungsabhängige Calcium-Kanäle wie auch den Anstieg von Second Messengern wie z.B. cGMP ein. Ein zunehmender Anstieg des Blutvolumens vermehrt die NO-Produktion und inhibiert gleichzeitig die ET-1-Produktion [119].

Vasokonstriktoren	Vasodilatoren
Endothelin	Stickstoffmonoxid (NO)
Angiotensin II	Kohlenstoffmonoxid (CO)
Noradrenalin	Glucagon
Thromboxan A ₂	PGI ₂
Substanz P	Bradykinin
Serotonin (5-HT)	Neuropeptide (CGRP, VIP)
Thrombin	Adrenomedullin
	TNF- α
	Endocannabinoide

Tabelle 1 Vasoaktive Substanzen wirken konstriktorisch oder dilatatorisch auf die Gefäßmuskulatur.

2.3.1 Stickstoffmonoxid als wichtigster Vasodilatator

Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) ist ein Gas, das bei der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht. Der endothelial-derived relaxing factor (EDRF) wurde 1987 von Palmer et al. als Stickstoffmonoxid identifiziert. NO ist ein Gas mit einer kurzen Halbwertszeit, das in die glatte Gefäßmuskulatur diffundiert.

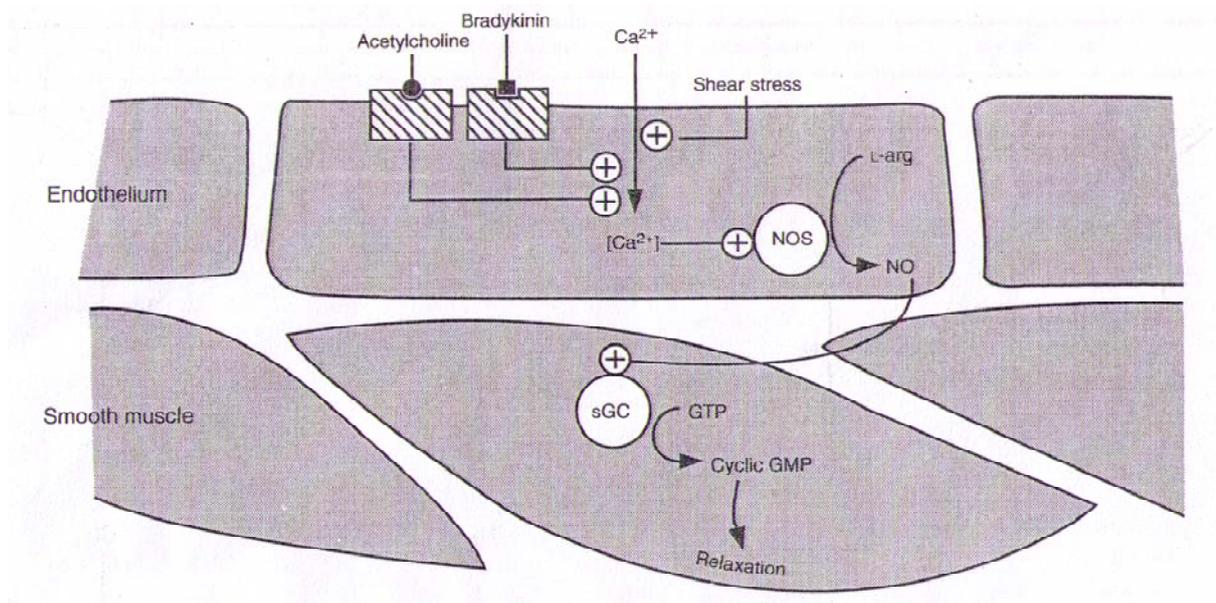


Abb. 5 Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) vermittelt die Relaxation der glatten Muskelzelle unter physiologischen Bedingungen [91]. Die NO-Synthetase reagiert auf Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels. Bei der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht NO, das die Guanylylcyclase und damit das zyklische Guanosin-Monophosphat (cGMP) aktiviert und zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führt.

Die Guanylyl-Cyclase katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP. cGMP ist der sekundäre Botenstoff, der eine Tonussenkung induziert [76]. Von den NOS-Isoformen sind nNOS (NOS-1) [24], iNOS (NOS-2) [160] und eNOS (NOS-3) [130] bekannt. Die im Endothel vorkommende NOS-3 ist in allen endothelialen Zellen vorhanden. Sie ist durch eine Calcium-Abhängigkeit gekennzeichnet und wird durch verschiedene Faktoren wie flussbedingte Scherkräfte aktiviert. Die Produktion von iNOS ist nicht Calcium-abhängig und wird durch Endotoxine und Zytokine in Gang gesetzt [4]. Die neuronale NO-Synthetase kommt in neuronalen Zellen und in peripheren Nerven vor [98].

Das funktionale Spektrum von NO ist sehr weit und reicht von einer Vasodilatation über zytoprotektive, antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften bis hin zu einer Thrombozyteninhibition [36].

Bereits unter Ruhebedingungen kommt es zu einer kontinuierlichen basalen NO-Freisetzung aus dem Endothel. Damit kommt es zur Abschwächung der sympathisch-adrenerg vermittelten Konstriktion [126]. Verschiedene, ständig auf das Endothel einwirkende physikalische Einflüsse verstärken die basale NO-Freisetzung. Hierzu zählen die durch das strömende Blut an der luminalen Endothelzelloberfläche erzeugte Wandschubspannung (viscous drag), die durch die Herzaktion induzierten pulsatorischen Dehnungs- und Entdehnungszyklen, die mechanische Deformation der Gefäße in der kontrahierenden Skelettmuskulatur sowie die Absenkung des arteriellen O_2 -Partialdruckes [55,75,111].

Die größte hämodynamische Relevanz bei der portalen Hypertension hat NO in seiner Eigenschaft als peripherer Vasodilator bei der Leberzirrhose. Zahlreiche Studien belegen eine erhöhte NO-Synthese bei zirrhotischen Tiermodellen. Sowohl bei CCl_4 (Tetracarbonchlorid)-Ratten [27], als auch bei BDL(Bile duct-ligated)- [83] und PVL(Portal vein-ligated)-Ratten [37] sind die NO-Plasmaspiegel erhöht. Besonders bei Ratten mit Aszites ist die NO-Synthese gesteigert [102]. Tsai et al. verdeutlichten, dass NO eine Hyporeaktivität bei Zirrhose gegenüber Methoxamin zeigt [147], was für eine Überproduktion von NO spricht. NO ist in der A. mesenterica sup. bei Zirrhose erhöht [147]. Auslöser für die NO-Produktion kann eine anfängliche Vasokonstriktion als Ausdruck der akuten Anpassung an einen Pfortaderhochdruck sein. Zu dieser Annahme führten Experimente an PVL-Ratten und Ratten mit einer Ligatur der A. renalis, wo eine mesenterische Vasokonstriktion und eine vermehrte NO-Produktion in der oberen Mesenterialarterie zu verzeichnen waren [147]. Die „Forward Flow“-Theorie bezieht sich in der Annahme einer arteriellen splanchnischen Vasodilatation auf ein chronisches Geschehen, während die zuvor erwähnte Vasokonstriktion bei akuten Zuständen beobachtet wurde.

Die vasodilatatorische Wirkung von NO beruht auf einer Aktivierung der cGMP-Kaskade [91]. NO wirkt auf die lösliche Guanylylcyclase der glatten Muskelzellen, die die Umwandlung von GTP in cGMP katalysiert. Die Bindung von NO an das zweiwertige Eisen der Häm-haltigen Untereinheit der löslichen Guanylylcyclase führt zu einer Konformationsänderung des benachbarten katalytischen Zentrums und damit zur gesteigerten Konversion von GTP zu cGMP. Der Anstieg des intrazellulären cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G, die den intrazellulären Calciumspiegel erniedrigt und eine Vasodilatation hervorruft [126].

Gupta et al. haben festgestellt, dass 46 % der maximalen Relaxation des Gesamtgefäßbettes in der zirrhotischen Leber NO-vermittelt ist. Die gestörte endotheliale Funktion bei Zirrhose führt zu einer NO-Überproduktion im splanchnischen Stromgebiet und zu einer herabgesetzten NO-Synthese in der intrahepatischen Mikrozirkulation [58].

2.3.2 Weitere vasoaktive Substanzen

Endothelin-1 löst in hepatischen Sternzellen eine Kontraktion aus. Die Antagonisierung des ET-Rezeptors mit Bosentan bewirkt eine Reduktion des Pfortaderdrucks bei portal-hypertensiven Ratten [120].

Hyperaktivität des Sympathikus, RAAS und ADH sind die reflektorische Barorezeptorantworten auf eine arterielle Hypotension [22].

Acetylcholin wirkt auf endotheliale m-Rezeptoren dilatierend. Bei einer Schädigung des Endothels wirkt ACh auf muskarine Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur paradoxerweise konstriktorisch [58].

Serotonin (5-HT). Mesenterische Arteriolen bedingen eine Konstriktion und potenzieren die Wirkung anderer Agonisten [133].

Scherkraft oder Schubspannung. Durch Scherkräfte aktivierte G-Proteine sind Membran-assoziiert, die über einen G-Protein-vermittelten Signalweg die NO-Freisetzung aus Endothelzellen fördern [57].

Prostazyklin (PGI₂) diffundiert in die glatte Muskelzellschicht, wo es durch Aktivierung der Adenylatcyclase ATP in cAMP umsetzt. Ein weiterer PGI₂-Pfad wirkt über K-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur. Bei portaler Hypertension wird eine Überproduktion von PGI₂ beobachtet, was zur Verstärkung des hyperkinetischen Syndroms führt [104].

Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) werden von nichtadrenergen Nerven freigesetzt. Über cAMP, cGMP bewirken sie eine direkte Aktivierung der K⁺-Kanäle und induzieren eine Vasodilatation [76].

Kohlenstoffmonoxid (CO). Die Inhibition der pulmonalen Hämooxygenase führt zu einer Normalisierung des CO-Spiegels und zu einer Reduzierung der CO-induzierten Vasodilatation [164].

Endocannabinoide. Eine verstärkte Expression des CB1-Rezeptors in den mesenterischen Gefäßen scheint zur Entwicklung der splanchnischen Vasodilatation und zur portalen Hypertension beizutragen [8].

TNF- α . Durch Antagonisierung mit Antikörpern von TNF- α wurde beobachtet, dass die splanchnische hyperdynamische Zirkulation reduziert wird [80]. Es wurde gezeigt, dass TNF- α die Expression von BH₄ verstärkt und somit die eNOS-Produktion gesteigert wird [122].

Adrenomedullin erhöht die cGMP-Produktion und führt somit zu einer NO-vermittelten Vasodilatation [103].

Glucagon wirkt stimulierend auf die cAMP-Synthese [94]. Eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Konstriktoren wird bei Hyperglucagonämie beobachtet.

Eine durch Minderperfusion der Leber bedingte **Gewebehypoxie** führt zu einer Akkumulation von Adenosin und zur Azidierung des Gewebes, die zur Vasodilatation führt.

Urotensin II gilt als potenter Vasokonstriktor der Aorta bei Ratten. Im Splanchnikus und in Widerstandsgefäßen entfaltet Urotensin II möglicherweise durch die Freisetzung von NO vasodilatatorische Eigenschaften [61].

2.4 NO-Synthetasen

Die Freisetzung von NO wird durch die NO-Synthetase vermittelt. Bei der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin wird Stickstoffmonoxid freigesetzt. Als Protein unterliegt die NO-Synthetase mannigfaltigen posttranslationalen Faktoren, die die NO-Synthese beeinflussen.

2.4.1 Endotheliale NO-Synthetase und andere Isoformen

Von der NO-Synthetase (NOS) sind drei Isoformen bekannt. Die NO-Produktion durch die neuronale NOS (NOS-1) zeigt ihre Hauptwirkung in der gastrointestinalen Motilität. Die nNOS bewirkt eine inhibitorische nicht-adrenerge nicht-cholinerge (NANC) Relaxation der glatten Muskulatur über den Signalweg der löslichen Guanylylcyclase [134]. Aus Nervenendigungen des Gastrointestinal(GI)-Traktes wird nNOS exprimiert, das vor allem im Bereich des Pylorussphincters anzutreffen ist. Die induzierbare NO-Synthetase (NOS-2) spielt besonders bei Entzündungen und der Karzinogenese im GI-System eine wichtige Rolle. Die iNOS-Transkription hängt unter anderem von Nekrosefaktor(NF)- κ B ab. Auf posttranslationaler Ebene

beeinflussen der Calciumspiegel und die hohe Affinität zu Calmodulin die enzymatische Aktivität. Die iNOS-abhängige NO-Synthese erfolgt in anderen Größenordnungen als die der anderen Isoformen. Die NO-Produktion ist weitaus größer und effektiver, jedoch nicht konstitutiv [133,134]. Die endotheliale NO-Synthetase (NOS-3) hat eine Schlüsselfunktion in der Gefäßtonusregulation im gesamten GI-System. ENOS ist in den Widerstandsgefäßen, den Gefäßen des venösen Systems und den mikrozirkulatorischen Gefäßen des Darmes, der Leber und des Pankreas zu finden, auch das Gallengangsepithel zeigt eine eNOS-Expression. Eine Reihe hormonaler, parakriner und mechanischer Faktoren stimulieren den Anstieg der eNOS-abhängigen NO-Produktion [133,134]. Die konstitutiven Isoformen eNOS und nNOS sind Calmodulin-abhängig und reagieren daher auf Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels. Sinusoidale Endothelzellen sind eine wichtige eNOS-Quelle der Leber. ENOS wird im Normalzustand in sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten exprimiert [119]. Im Gefäßsystem ist ebenso eine basale eNOS-Aktivität vorhanden.

Bei Leberschäden stellt sich die Situation anders dar. Die eNOS-abhängige NO-Produktion ist gestört [117]. NO ist bei Zirrhose in den sinusoidalen Endothelzellen erniedrigt. Zusätzlich wird Endothelin bei Leberschäden überproduziert, so dass ein erhöhter Gefäßtonus den intrahepatischen Widerstand vergrößert. In den Gefäßen dagegen werden unter anderem durch die hyperdynamische Zirkulation die Scherkräfte vermehrt, so dass die eNOS-abhängige NO-Produktion gesteigert wird.

Eine Vermehrung der eNOS-mRNA-Transkription, die zu einer erhöhten eNOS-Translation und verstärkten Proteinsynthese der endothelialen NO-Synthetase mit einer folglich höheren NO-Verfügbarkeit führt, ist ein möglicher Therapieansatz für eine antihypertensive Therapie. Vorteilhaft wäre eine spezifische Wirkung in der Leber zur Behandlung der portalen Hypertension. AVE 9488 soll daher als eNOS-Transkriptionenhancer untersucht werden.

2.4.2 Posttranslationale Modifikation und Regulation von eNOS

In ruhenden Zellen wird eNOS durch Myristylierung und Palmytoylierung an die Plasmamembran gebunden [79]. Bei zellulärer Aktivität wird eNOS transloziert und damit aktiviert. Der an die Plasmamembran gebundene eNOS/Caveolin-Komplex wird bei erhöhtem Calciumspiegel durch Calmodulin vermittelt gelöst [135]. Akt, auch als Proteinkinase B bekannt, Akt/PKB phosphoryliert eNOS direkt an Ser 1177 und ermöglicht die NO-Synthese [69]. NO entsteht bei

der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin durch die enzymatische Aktivität der NO-Synthetase [91,99]. Dabei wirken Caveolin und Calmodulin als Gegenspieler. Das Coat-Protein Caveolin-1, ist bei Leberzirrhose, die mit einem erhöhten intrahepatischen Cholesterinspiegel assoziiert ist, als Cholesterin-bindendes Protein vermehrt vorhanden [135]. Caveolin-1 wirkt inhibitorisch; Calmodulin hingegen fördert die NO-Produktion.

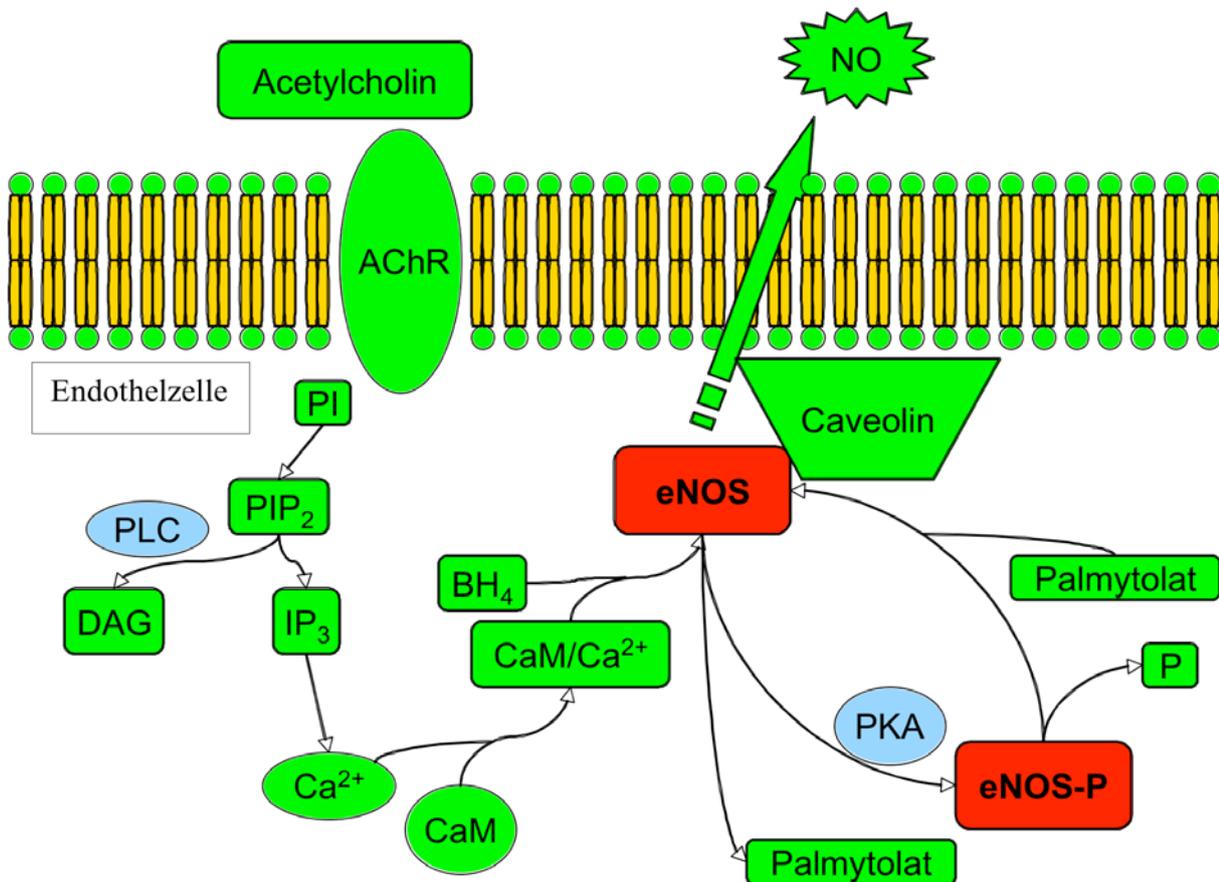


Abb. 6 Ein erhöhter Calciumspiegel in der Endothelzelle bewirkt eine Lösung des endotheliale NO-Synthetase (eNOS)/Caveolin-Komplexes und damit eine Aktivierung der eNOS mit Freisetzung von NO [45,91] (AChR: Acetylcholinrezeptor, PI: Phosphatidylinositol, PIP₂: Phosphatidylinositolbiphosphat, PLC: Phospholipase C, IP₃: Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerol, CaM: Calmodulin, BH₄: Tetrahydrobiopterin, PKA: Proteinkinase A).

Im Rahmen der Calcium-/Calmodulin-Abhängigkeit von eNOS werden Cofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH₄) zur Aktivierung benötigt [84]. In Abwesenheit von BH₄ kann NOS die L-Arginin-Oxidation nicht katalysieren [73,113]. Verschiedene Studien belegen, dass es bei BH₄-Mangel eine Verschiebung der NO-Produktion zugunsten von Superoxid (O₂⁻) gibt, was als „eNOS-Entkoppelung“ bezeichnet wird [73,113,53]. Die Leber gilt als eine der Hauptsyntheseorte für BH₄ [84]. Bei zirrhotischen Ratten löst eine erhöhte Endotoxinkonzentration die Aktivierung der Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase I aus, die eine BH₄-Produktion in der Mesenterialarterie generiert [159]. Dieser Anstieg von BH₄ ist mit einer Erhöhung der eNOS-Aktivität und der eNOS-abhängigen NO-Überproduktion in den mesenterialen Arteriolen assoziiert.

Weitere Protein-Protein-Interaktionen sind für die eNOS-Aktivität von Bedeutung. Das Hitze-Schock-Protein 90 [44] wie auch Serin-/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B [69] sind Auslöser der NO-Katalyse durch eNOS in der splanchnischen arteriellen Zirkulation portal-hypertensiver Ratten [152]. Die Scherkraft ist der potenteste Regulator von eNOS. Sie wirkt über eine Akt/PKB-Aktivierung, die eNOS direkt phosphoryliert und bewirkt über den cGMP-Signalweg eine NO-vermittelte Vasodilatation [17].

2.5 Therapie der portalen Hypertonie

Senkung des erhöhten intrahepatischen Widerstandes

Ziel der therapeutischen Bemühungen ist eine Verminderung des portalen Druckgradienten. Konventionelle therapeutische Ansätze bestehen darin, entweder den intrahepatischen Widerstand zu senken oder den Zufluss in das portale Gefäßbett zu verringern. Es gibt Medikamente, die die NO-Verfügbarkeit erhöhen wie Nitrate, und andere, die die adrenerge Wirkung blockieren wie β-Blocker oder Angiotensinrezeptor-Antagonisten. Untersuchungen an isolierten perfundierten Rattenlebern haben ergeben, dass die größte Widerstandssenkung bis zu 30% bei Nitroprussid-Gabe, einem NO-Donor, beobachtet wurde [11]. Der Nachteil der Nitrate besteht darin, dass die Tonussenkung nicht nur auf das hepatische Gefäßbett beschränkt bleibt, sondern sich auch auf die systemische Zirkulation erstreckt. Eine arterielle Hypotension wird renal gegenreguliert, führt jedoch im splanchnischen Gefäßbett zur sukzessiven hyperdynamischen Zirkulation, da Natrium und Wasser retiniert werden. So werden Nitrate in

Kombination mit β -Blockern hauptsächlich zur Sekundärprophylaxe bei Varizenblutungen eingesetzt [154]. Eine Blockade des Renin-Angiotensin-Systems ist ein weiterer therapeutischer Ansatz. Niedrig-dosiertes Losartan als Angiotensin-Rezeptor-Typ1(AT-1)-Antagonist senkt den Pfortaderdruck ohne dabei wesentliche arterielle Druckänderungen auszuüben [60,62].

Verminderung der splanchnischen hyperdynamischen Zirkulation

Der therapeutische Nutzen von β -Blockern, Vasopressin oder Somatostatin besteht in einer splanchnischen Vasokonstriktion. Während Vasopressin und Somatostatin nur intravenös verabreicht werden können, eignen sich β -Blocker für eine Langzeittherapie der portalen Hypertension. β -Blocker üben zweierlei Wirkung auf das kardiovaskuläre System aus. Einerseits bewirkt die β_1 -Blockade am Herzen eine negative Ino-, Dromo- und Chronotropie, die die Herzauswurfleistung verringern; andererseits führt die β_2 -Blockade zu einer splanchnischen Vasokonstriktion. Eine Studie von Lebec et al. [77] belegt, dass eine kontinuierliche orale Propanolol-Gabe die Inzidenz von Rezidivblutungen senkt.

Vasopressin gilt als stärkster splanchnischer Vasokonstriktor [22]. Die Konstriktion führt zu einem verminderten Fluss in den splanchnischen Organen und damit zu einer Reduktion des portalen Hochdruckes. Wie Vasopressin verringert das Analogon Terlipressin nicht nur den Pfortaderdruck, sondern auch den Kollateralfluss und den Druck in den Varizen [20]. Die Nebenwirkungen von Vasopressin sind auf seine starke konstriktorische Wirkung zurückzuführen, die zu splanchnischen Ischämien und zu systemischen Ischämien wie einem Myokardinfarkt führen können [30]. Terlipressin zeichnet sich durch eine längere biologische Aktivität und ein geringeres Nebenwirkungsspektrum als Vasopressin aus [22].

Somatostatin und Analoga wie Octreotid und Lanreotid lösen ebenfalls eine splanchnische Vasokonstriktion aus [21,74]. Nach einer Bolusinjektion und anschließender kontinuierlicher Infusion von Somatostatin wird eine milde Pfortaderdrucksenkung beobachtet [34].

Beeinflussung der intrahepatischen Zirkulation

Erhöhung der intrahepatischen NO-Verfügbarkeit:

<i>(Derzeitige Möglichkeiten)</i>	Nitrovasodilatoren: Nitroglycerin, Isosorbid-5-Mononitrat (ISMN) und -Dinitrat
<i>(Zukünftige Möglichkeiten)</i>	Verstärkung der Expression der NO-Synthetase gezielte NO-Freisetzung

Blockade des RAAS:

Losartan (AT₁-Rezeptor-Antagonist)

Spirolacton

Pharmaka zur Senkung des splanchnischen Blutflusses

Nicht-selektive β -Blocker:	Propranolol, Nadolol, Timolol
Vasopressin und Analoga:	Vasopressin, Terlipressin
Somatostatin und Analoga:	Octreotid, Lanreotid

Manipulation des splanchnischen Blutvolumens:

Spirolacton

Tabelle 2 Es bestehen Therapieansätze, die die intrahepatische Zirkulation beeinflussen und den splanchnischen Blutfluss senken [modifiziert nach 22].

2.6 Fragestellung

2.6.1 Hat der eNOS-Transkriptionenhancer AVE 9488 auf die portale Hämodynamik einen Effekt?

Die erwünschte Wirkung des eNOS-Transkriptionenhancers ist eine Steigerung der NO-Verfügbarkeit, die letztlich auf die Hämodynamik Einfluss nimmt. Dabei ist wichtig, ob sich der Pfortaderdruck (PP) und der mittlere arterielle Druck (MAD) verändern. Weiter sollte auf die splanchnische Durchblutung, den Shuntfluss, den systemischen Widerstand (SVR), das Herzzeitvolumen (HZV) und den intrahepatischen Widerstand geachtet werden.

2.6.2 Steigt die eNOS-Verfügbarkeit durch AVE 9488?

Nach Prüfung der hämodynamischen Wirkung von AVE 9488 sollte auf molekularbiologischer Ebene, primär auf mRNA-Ebene die Effektivität der Substanz als Transkriptionenhancer für eNOS geprüft werden. Eine erwartete Steigerung der eNOS-mRNA-Transkription bildet den Baustein für die Betrachtung auf Proteinebene. Mittels der Immunoblot-Analyse können vermehrte eNOS-Protein-Niveaus nachgewiesen werden.

2.6.3 An welchen Organsystemen wirkt AVE 9488?

Die Transkriptionsverstärkung von eNOS soll die NO-Verfügbarkeit erhöhen. Somit ist AVE 9488 als NO-Donor zu betrachten. Interessant ist, ob die Substanz eine leberspezifische Wirkung hat.

Darüberhinaus profiliert sich eine Leberspezifität in Abgrenzung zu anderen Organsystemen, in denen eNOS vorkommt. Systemische Gefäße wie die Aorta und die Arteria mesenterica superior als Gefäße des splanchnisch-arteriellen Systems werden bei unseren Untersuchungen in den Blick genommen.

3. Material und Methoden

3.1 Tiermodell

Versuchstiere

180 männliche Sprague-Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus*) werden als Versuchstiere verwendet. Davon wird bei 130 Ratten der Gallengang ligiert, um eine sekundär biliäre Zirrhose herbeizuführen. Die restlichen Ratten dienen als gesunde Kontrolltiere. Geliefert werden die

Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 180-200g. Bei den Sprague-Dawley-Ratten handelt es sich um outbred Albino-Ratten, deren Einsatz zu Forschungszwecken weit verbreitet ist. Sie stammen aus der Tierzucht Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland).

Gallengangsligatur

Die Induktion der sekundär biliären Zirrhose wird durch eine Gallengangsligatur (bile duct ligation, BDL) und Exzision des Gallenganges herbeigeführt. Nach Anästhesie mit Ketamin (100mg/kg KG i.m., 25mg/ml Esketamin Hydrochlorid, Parke-Davis GmbH, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wird durch eine mediane Laparotomie unter sterilen Bedingungen der Ductus choledochus durch doppelte Ligatur mit resorbierbarem Faden (5-0, Ethicon Monocryl, Johnson+Johnson Brüssel, Belgien, Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die proximale Ligatur des Gallenganges wird möglichst nah am Leberhilus platziert. Der Gallengang wird zwischen den beiden Ligaturen exzidiert. Anschließend werden Muskelschicht und Fell separat zugenäht (Suturamid Schwarz 3/0, Johnson+Johnson).

Nach etwa 4 Wochen bildet sich eine sekundär biliäre Zirrhose mit portaler Hypertension, hyperdynamischer Zirkulation, Ikterus, Splenomegalie, porto-cavalen, umbilicalen und diaphragmalen Shunts und Aszites aus. Als Operationsfolgen werden auch diffuse Verwachsungen, Fistelbildungen und Zysten im Bereich des proximalen Gallenganges beobachtet.

Die Tierexperimente sind von dem lokalen Komitee für Tierstudien der Bezirksregierung Köln genehmigt (23.203Bn 22,7/99).

3.2 AVE 9488

AVE 9488 ist ein Präparat der Fa. Sanofi-Aventis. Es ist in der Testung als Transkriptionenhancer der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase, um das lokale NO-Angebot zu erhöhen und damit den portalen Hypertonus zu mindern. Die Substanz wird im Rahmen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) angewendet, zeigt jedoch keine wesentlichen klinischen Effekte.

In unserer Untersuchung wird den Tieren die Substanz mit einer Schlundsonde oral verabreicht in einer Dosierung von 1mg/kg KG/d. Das Therapeutikum wird den Tieren drei Tage in Folge jeweils 28 Tage nach der Gallengangsligatur oder bei den gesunden Kontrolltieren 4 Wochen nach Lieferung wegen der Vergleichbarkeit des Alters und Körpergewichts verabreicht. Am vierten Tag der Therapie erfolgt die Untersuchung bzw. Gewebeentnahme.

Die Substanz wird in Abständen frisch angesetzt mit 0,5% Hydroxyethylcellulose (250mg HEC), 50mg Lecithin (1:2 in Ethanol gelöst, davon 100µl), 50mg AVE 9488 in 50ml Aqua dest. (Konzentration 1mg/ml). Die Substanz wird mit 20 Glaskügelchen mind. 12h auf einem Magnetrührer homogenisiert und kühl gelagert (4°C). Vor jeder Applikation wird die Suspension erneut ca. 15min homogenisiert.

3.3 Hämodynamische Messung mit Microsphären

Die hämodynamischen Studien werden unter Ketaminnarkose (100mg/kg KG intramuskulär) vorgenommen. Das Wirkprofil von Ketamin ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit bezüglich der Herzauswurfleistung und der regionalen Durchblutung der Ratte bei vollem Bewusstsein.

Messung von Blut- und Pfortaderdruck [146]

Nachdem die Ratte mit Ketamin narkotisiert und in Rückenlage fixiert ist, wird das Fell über der linken Leiste in longitudinaler Schnittführung aufpräpariert. Nach Präparation der A. und V. femoralis aus der Gefäß-Nerven-Scheide werden diese mit einem PE-50-Katheter (PE 0,28 x 0,61, Everhardts, Meckenheim, Deutschland) kanüliert.

Anschließend wird eine mediane Laparotomie durchgeführt und der Darm ausgelagert. Ein weiterer PE-50-Katheter wird in eine ileocoecale Vene hineingelegt, bis in die Vena portae vorgeschoben und fixiert. Schließlich wird der Darm in die Bauchhöhle reponiert und die Bauchwand wie auch Fettgewebe und Fell mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (Suturamid Schwarz 3/0, Johnson+Johnson). Eine Stabilisierung der Hämodynamik der Ratte stellt sich nach ca. 15min ein.

Die Katheter in Femoralarterie und Pfortader werden über Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) an den Druckmesser (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen,

wobei der Nullpunkt 1cm oberhalb des Operationstisches in Herzhöhe geeicht wird. Die Drücke werden dann kontinuierlich über einen Zeitraum von 30min aufgenommen.

Messung der Durchblutung mit kolorierten Microsphären [146]

Herzindex und regionale Durchblutung werden durch die Technik der Farbmicrosphären gemessen [59]. Diese Methode ist durch die häufiger angewandte Technik der radioaktiven Microsphären validiert [59]. Der entscheidende Vorteil besteht hierbei darin, dass kein radioaktives Material zur Anwendung kommt.

Ein weiterer Katheter wird im linken Ventrikel platziert. Zunächst wird das Fell durch einen longitudinalen Schnitt am rechten lateralen Halsdreieck geöffnet. Die Schilddrüse wird nach medial kranial geschlagen, der M. sternocleidomastoideus nach lateral und der Venter medialis des M. omohyoideus nach medial verschoben. Die rechte A. carotis communis wird in der Vagina carotica freigelegt und von den Nachbarstrukturen getrennt. Die A. carotis communis wird mit einem PE-50-Katheter kanüliert und unter Monitorkontrolle bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die intraventrikuläre Lage des Katheters wird im Versuch an der Pulscurve bestätigt und stets post mortem geprüft.

Die von jedem Tier benötigte Referenzblutprobe wird aus der A. femoralis entnommen (0,65ml/min über eine Minute). Zu diesem Zweck kommt eine spezielle Pumpe zum Einsatz (Model ,22', Syringe Pump, Harvard Apparatus, Hugo Sachs Elektronik).

Zehn Sekunden nach Beginn der Referenzblutprobenentnahme werden über einen Zeitraum von zwanzig Sekunden 300 000 rote Microsphären (15µm Durchmesser, Triton Technology, San Diego, USA; suspendiert in 300µl physiologischer Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) über den Katheter in den linken Ventrikel injiziert. Die Verteilung dieser roten Microsphären entspricht der Durchblutung der einzelnen Organe.

Danach erfolgt die Injektion von 150 000 blauen Microsphären (15µm Durchmesser in 300µl physiologischer Kochsalzlösung mit 0,05% Tween 80) durch den Katheter in der Mesenterialvene in die Pfortader innerhalb von 30 Sekunden. Diese Microsphären werden zur Bestimmung des porto-systemischen Shunts verwendet.

Nachdem die Injektion der Microsphären erfolgt ist, wird das Tier getötet und Lunge, Leber, Nieren, Magen und Darm, Milz und Pankreas entnommen. Die Organe werden gewogen und in einer Konzentration von 14ml/g Gewebe mit 4M Kaliumhydroxid (KOH) (Sigma-Aldrich) mit

2% Tween 80 (Polyoxyethylene-sorbitan-mono-oleate, Sigma-Aldrich) versetzt. Die Referenzblutprobe wird in 3,8ml 5,3M KOH und 0,5ml Tween 80 gelöst. Sämtliche Proben werden 1h bei 60°C inkubiert. Die mazerierten Proben werden in eine homogene Suspension versetzt und durch spezielle Filter (Nucleopore Polycarbonate, Whatman International Limited, Madison, UK) filtriert. Restliche Gewebeteilchen an der Reagenzglaswand und im Deckel der Probe werden durch Nachspülen mit 2% Tween 80-Lösung entfernt.

Die Filter mit den Microsphären werden dann in jeweils 200µl Dimethylformamid (N,N-Dimethylformamid, Merck KG.A, Darmstadt, Deutschland) überführt und geschüttelt, wobei sich die Farbe aus den Microsphärenkapseln in Dimethylformamid löst. Die Proben werden 5 min bei 3000g zentrifugiert. Von den Überständen werden Absorptionsspektren (300-800nm, Photometer HP 8453 x UV-Visible System) aufgenommen. Die Daten werden durch das Software-Programm Triton 5 von Triton Technology (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) ausgewertet. Die Anzahl der entsprechenden Microsphären in den jeweiligen Organen, die Organdurchblutung, der kardiale Output und der porto-systemische Shunt werden errechnet.

Hämodynamische Berechnungen [78]:

Der kardiale Output wird folgendermaßen errechnet:

$$CO = \frac{(\text{Anzahl der injizierten Microsphären}) \times (\text{Fluss der femoralen Referenzblutprobe})}{\text{Femorale Referenzblutprobe}}$$

Der kardiale Index wird pro 100g Körpergewicht ausgedrückt.

Der systemische Widerstand wird wie folgt errechnet:

$$SVR = \frac{MAD}{CO}$$

Der Blutfluss in den einzelnen Organen wird anhand des arteriellen Flusses errechnet.

$$Q_{\text{Organ}} = \frac{(\text{Anzahl der Microsphären im Organ}) \times Q_{\text{Referenzblut}}}{(\text{Anzahl der Microsphären im Referenzblut})}$$

Der portal-venöse Einstrom (PVI) ist die Summe der arteriellen Durchblutungen in Magen, Milz, Darm, Pankreas und Mesenterien. Der PVI steht für den totalen arteriellen splanchnischen Zufluss, der in das portale System einfließt.

Der porto-systemische Shunt (PSS) ist der portale Flussanteil, der die Leber umgeht und wird wie folgt errechnet:

$$PSS = \frac{(\text{Anzahl der Microsphären in der Lunge}) \times 100}{(\text{Anzahl der Microsphären in Lunge und Leber})}$$

Der kollaterale Blutfluss (KBF) wird in ml/min ausgedrückt und anhand der Formel $PVI \times PSS/100$ errechnet.

Der geschätzte portale Blutfluss (PBF) ist der Betrag des portalen-venösen Flusses, der die Leber passiert und wird folgendermaßen errechnet:

$$PBF \text{ (ml/min)} = PVI - (PVI \times PSS (\%)/ 100).$$

Der totale hepatische Blutfluss ist die Summe aus $Q_{A. \text{hepatica}}$ und PBF.

Den Gefäßwiderstand berechnet man allgemein:

$$\text{Resistance (mmHg/ml} \times \text{min)} = P \text{ (mmHg)} / Q \text{ (ml/min) oder}$$

$$\text{Resistance (dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5}) = P \text{ (mmHg)} / Q \text{ (ml/min)} \times 80 \times 10^3$$

Der Gefäßwiderstand der einzelnen Organsysteme wird als Quotient aus dem mittleren arteriellen Druck und kardialen Index,

$$\text{Resistance (dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5}) = MAD \text{ (mmHg)} / Q \text{ (ml/min)} \times 80 \times 10^3$$

der portalvenöse Widerstand als Quotient aus Pfortaderdruck und portalvenösem Einfluss errechnet:

$$\text{Portal-venöser Widerstand} = PP / PVI.$$

Der arterielle Widerstand von Magen, Intestinum und Milz berechnet sich aus der Differenz zwischen MAD und PP ($P_1 - P_2$) und dem arteriellen Fluss des betreffenden Organs:

$$\text{Resistance (dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5}) = (P_1 - P_2 \text{ (mmHg)}) / Q \text{ (ml/min)} \times 80 \times 10^3.$$

Der totale splanchnische Widerstand ist die Summe der parallelen Widerstände von Magen, Intestinum und Milz:

$$1/R_{\text{Splanchnikus}} = 1/R_{\text{Magen}} + 1/R_{\text{Intestinum}} + 1/R_{\text{Milz}}.$$

3.4 RT-PCR

RNA-Isolation und Aufreinigung

31 Gewebeproben (ca. 30mg/Probe) von der Leber (12 mit AVE 9488 behandelte BDL-Lebern (BDL+); 8 Kontroll-BDL-Lebern (BDL-); 3 Sham+ und 8 Sham-), 20 von der Aorta (6 BDL+, 6

BDL-, 4 Sham+ und 4 Sham-) und 11 von der A. mes. sup. (7 BDL+, 4 BDL-), die nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden, dienen als Ausgangsmaterial.

Die messenger Ribonucleinsäure (mRNA) wird bei der Transkription gebildet. Bei einer möglichen Transkriptionsverstärkung durch AVE 9488, sollte besonders eine Vermehrung der mRNA untersucht werden.

Das Gewebe wird anästhesierten Ratten entnommen. Nach einer Laparotomie werden Leberproben entnommen, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Aorta wird von kaudal nach kranial präpariert und dabei die Arteria mesenterica superior aufgesucht. Beide Gefäße werden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

In einem hoch-denaturierenden Guanidinthiocyanat-Puffer (600µl/Probe) (s. RNeasy Mini Handbook, Quiagen, Hilden, Deutschland), der sofort RNAsen inaktiviert und so die Isolierung intakter RNA garantiert, werden die Proben in einem Rotor-Stator-Glas-Glas-Homogenisator Potter S (Sartorius, Göttingen, Deutschland) lysiert und homogenisiert. Das weitere Procedere orientiert sich am RNeasy Mini Kit-Protokoll (Quiagen). Mit dem RNeasy Protect Mini Kit (Quiagen) wird die gesamte RNA des Ausgangsmaterials isoliert. Prinzip der RNeasy-Prozedur ist zum einen die selektive Bindungseigenschaft einer Silica-Gel-Membran und zum anderen die Geschwindigkeit der Microspinttechnologie. Ein spezielles Salzpuffersystem ermöglicht eine Bindung von bis zu 100µg RNA (>200 Basen) an die Silica-Gel-Membran (Quiagen). Ethanol wird hinzugefügt, um günstige Bindungsbedingungen für die RNA zu schaffen. Anschließend werden die Proben in ein RNeasy spin column überführt, in der die RNA an die Membran bindet. Nach dreimaligem Waschen wird die aufgereinigte RNA in 30µl Wasser gelöst.

Diese Methode der RNA-Isolierung ermöglicht eine Anreicherung der mRNA, da RNAs mit weniger als 200 Nucleotiden (5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNAs, die etwa 15-20% der Gesamt-RNA ausmachen) selektiv ausgeschlossen werden.

DNA-Verdau und Reverstranskription

Da bei der RNA-Isolierung auch DNA-Reste vorhanden sein können, die an die Membran gebunden sind, wird die Verdauung durch DNAsen vorgeschaltet. Die Proben werden mit RQ1

RNase-freier DNase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) inkubiert, die die DNA verdauen. 14µl RNA-Volumen pro Probe, mit einer geschätzten RNA-Menge von 1ng, werden verwendet. Zu jeder Probe werden 4µl 5 x „First strand“-Puffer (Promega) und 2µl RQ1 DNase (1U/µg RNA) (Promega) hinzugegeben. Die Proben werden bei 37°C für 30min inkubiert. Danach werden die Proben jeweils mit 1µl RQ1 DNase Stop Solution versetzt, für 10min bei 65°C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Die isolierte RNA kann noch nicht direkt als Template für die PCR verwendet werden, da die Herstellung eines komplementären DNA-Stranges vorausgehen muss (reverse Transkription).

Zunächst wird ein Random Hexamer-Mix hergestellt, in dem Oligonucleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung zu der DNase-behandelten RNA hinzugefügt werden. Zu jeder RQ1 DNase-behandelten Probe kommen 2,5µl RNase freies Wasser und 0,5µl eines 10 x Hexanucleotid-Gemisches als Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hinzu, so dass ein Endvolumen von 24µl von jeder Probe vorhanden ist. Die Proben werden für 10min bei 70°C inkubiert, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt kommen 1µl der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV Reverse Transkriptase, Invitrogen life technologies), 2µl Oligo-Primer, 1µl eines 10mM NTP-Mixes und 2µl 5 x „First strand“-Puffer zu jeder Probe hinzu. 15-20 bp-lange Oligo-Primer (DDT) hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA und schreiben so alle mRNA-Moleküle (2-4% der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA um. Ein dNTP-Mix ist eine Mischung aller vier Desoxyribonucleosidtriphosphate. Bei einem Endvolumen von 30µl werden die Proben für 10min zunächst bei 25°C, dann für 60min bei 37°C und schließlich für 15min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss werden die Proben kurz zentrifugiert, kurz auf Eis gestellt und direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Quantitative Real-Time PCR

Bei der traditionellen PCR erhält man nur Aufschluss über die Endphase der Reaktion. Die quantitative Real-Time-PCR misst in der Exponentialphase, in der Unterschiede in den Konzentrationen deutlicher zu erkennen sind als in der Plateauphase, womit die Quantifizierung der PCR-Produkte wesentlich präziser und akkurater ist. Die Zunahme des Reportersignals ist direkt proportional zur Anzahl der generierten Amplikons, Die Detektionsspannweite ist größer und selbst ein Zyklusunterschied kann mit der RT-PCR ermittelt werden.

5' Nuclease-Assay

Bei der Real-Time PCR-Amplifikation macht man sich die 5' Exo-Nuclease-Aktivität der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase und den FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zunutze. Die 5' Exo-Nuclease-Aktivität der Taq-Polymerase bewirkt, dass sie auf der DNA-Oberfläche entgegengesetzt dem wachsenden Amplikon die Hindernisse beseitigt. Die Polymerase fügt dem wachsenden DNA-Abschnitt Basen hinzu und beseitigt die Basen in Syntheserichtung. FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) beruht auf dem Prinzip, dass ein Partikel mit hoher Energie in der Nähe eines Partikels mit niedriger Energie seine Energie auf das Partikel überträgt. Im 5' Nuclease-Assay wird dem PCR-Reagenz (TaqMan® Universal PCR Master Mix, PE Biosystems, Roche) ein Oligonucleotid (TaqMan® Probe) hinzugefügt. Das Oligonucleotid (TaqMan® Probe) heftet sich an eine bestimmte Sequenz des Stranges zwischen dem Forward Primer und dem Reverse Primer. Die TaqMan® Probe ist am 5'-Ende mit einem Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher ausgestattet. Sobald die Polymerase sich dem 5'-Ende der an den Strang gehefteten Probe nähert, trennt sie den Reporter vom Quencher durch ihre 5' Nuclease-Aktivität ab. Der Abstand zwischen Reporter und Quencher ist bei der TaqMan® Probe so gering, dass der Reporter, der mit der höheren Energie beladen ist, beständig Energie auf den Quencher überträgt, so dass er nicht stark fluoresziert. Wird jedoch durch die 5' Nuclease-Aktivität der Polymerase der Reporter abgetrennt, kann dieser frei fluoreszieren.

Die Zunahme des Reportersignals wird durch das Sequenz-Detektions-Instrument (ABI 7700 Sequence detector, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) registriert und durch die Software angezeigt. Die Zunahme des Reportersignals ist proportional zu der wachsenden Produktmenge einer Probe.

Die 5' Nuclease-Aktivität der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase und der FRET ermöglicht das 5' Nuclease-Assay und Real-Time-Datenerhebung. Sobald das Reportersignal einen **Schwellenwert** überschreitet, kann es einerseits detektiert werden und andererseits als **Cycle-Threshold (Ct)** registriert werden. Die Schwellenlinie gibt an, ab welchem Zeitpunkt die Fluoreszenzintensität so stark ist, dass sie sich vom Hintergrund abhebt. Der Cycle-Threshold (Ct)-Wert zeigt den Zyklus an, ab dem diese Schwelle erreicht ist.

Vorteilhaft für die Real-Time PCR ist die Datenerhebung in der exponentiellen Wachstumsphase, während bei der traditionellen PCR der Endpunkt gemessen wird. Die direkt proportionale

Beziehung des Reportersignals zur generierten Zahl der Amplikons wie auch bereits der Unterschied von einem Zyklus, der ermittelt werden kann, stellen Vorteile der RT-PCR dar.

Als „Hauskeeping“-Gen wird 18S RNA (TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent, Applied Biosystems) verwendet: VIC Probe human 18S RNA (40µM; Lot No. 0406043), human 18S RNA Endogenous Concentration Forward Primer (10µM; 43 044 86 06022) und human 18S RNA Endogenous Concentration Reverse Primer (10µM; 43 044 86 06020; Lot No. 0406030). NOS-3 wird in 5µM Konzentration verwendet, der Forward Primer in 10µM und der Reverse Primer ebenfalls in 10µM Konzentration.

		Sequenz
NOS-3	Probe	CGC CCA GCA GCG TGG AGT GTT T
	Forward Primer (20er Primer)	5'-CTA CCG GGA CGA GGT ACT GG-3'
	Reverse Primer (20er Primer)	5'-GGA AAA GGC GGT GAG GAC TT-3'

Tabelle 3 Primer und Probe der NO-Synthetase-3 (NOS-3) haben bestimmte Basensequenzen. Die Probe ist ein Oligonucleotid, das als Sonde mit einem Reporter am 5'-Ende und mit einem Quencher am 3'-Ende ausgestattet ist. Die Probe lagert sich an eine bestimmte Stelle des wachsenden NOS-3-DNA-Stranges an.

Die Thermal cycling-Bedingungen bestehen aus den Schritten der AmpliTaq Gold-Aktivierung von je 25µl Probenvolumen (Temp 95°C für 10min) und der PCR (25 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15sec und dem „Annealing“ bei 60°C für 1min).

Primer- und Probe-Optimierung und Validierung

Für den Entwurf der Primer und Sonden für NOS-3 wird die Primer Express Software (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Die Basensequenz von NOS-3 kann unter www.pubmed.com unter Nucleotide ermittelt werden.

Um die optimalen Konzentrationen für die Primer und Probes zu ermitteln, werden verschiedene Konzentrationen ausgetestet.

Zuerst werden die Primerkonzentrationen optimiert. Verschiedene Verdünnungen des Forward Primers und des Reverse Primers werden kombiniert, um die minimalen Primerkonzentrationen bei maximaler Intensität des Reportersignals zu ermitteln.

	Forward Primer [nM]		
Reverse Primer [nM]	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Tabelle 4 Zur Ermittlung der Mindestkonzentrationen, bei denen eine maximale Intensität des Reportersignals zu erwarten ist, werden verschiedene Kombinationen von Primerkonzentrationen getestet.

Die Reaktionskomponenten werden in folgendem Verhältnis eingesetzt:

Reagenzien	Volumen [μ l/Probe]	Endkonzentration
TaqMan® Universal Master Mix (2x)	12,5	1x
Forward Primer	2,5	50-900nM
Reverse Primer	2,5	50-900nM
TaqMan Probe (2,5 μ M)	2,5	50-900nM
RNA-Volumen	3,0	1ng/ μ l
Wasser	2,0	-
Gesamtvolumen	25,0	-

Tabelle 5 Die Optimierung der Primer- und Probe-Konzentrationen wird durch eine bestimmte Relation der PCR-Reagenzien erreicht.

Auf die Optimierung der Primer und Sonden folgt die Validierung. Zu diesem Zweck wird eine Verdünnungsreihe von den Proben und der endogenen Kontrolle (18S RNA) erstellt und eine PCR durchgeführt. Die durchschnittlichen Δ CT-Werte werden errechnet. Es wird jeweils der Logarithmus der RNA-Menge gegen den Δ CT-Wert in einem Diagramm aufgetragen. Die absolute Steigung der Kurve sollte nicht mehr als 0,1 betragen. Beträgt die Steigung $<0,1$ kann man die errechneten $\Delta\Delta$ CT-Werte ($\Delta\Delta$ CT= Δ CT_{Probe} - Δ CT_{Kalibrator}) für die relative Quantifizierung verwenden. Ist die Steigung $>0,1$, muss ein neues Validierungsexperiment über 5 oder 6 Größenordnungen gestartet werden oder die Primer müssen neu entworfen und synthetisiert werden. Für die $\Delta\Delta$ CT-Errechnung muss die Effizienz der Proben-Amplifikation und der Amplifikation der Referenz annähernd gleich sein. Mit dem $\Delta\Delta$ CT-Wert ermittelt man den Unterschied der Gen-Expressions-Level.

3.5 Immunoblot-Analyse

Probenvorbereitung

Die verwendeten Homogenate werden aus schockgefrorenem Lebergewebe, schockgefrorener Aorta und A. mes. sup. gewonnen (ca. 80µg). Die Wahl der Proben erfolgt unter Berücksichtigung der Fragestellung nach eNOS in intrahepatischer, splanchnischer und systemischer Lokalisation.

Als Homogenisationspuffer wird ein Tris/HCl-Puffer mit 5mM Ethylenediamine tetra-acetic acid und Proteinaseinhibitoren verwendet (700µl). 10µM Phenylmethansulfonyl-Fluorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 1mM Benzamidine (Sigma-Aldrich) und 10µg/ml Leupeptin (Sigma-Aldrich) kommen zum Einsatz. Nach Homogenisierung der Proben auf Eis in einem Rotor-Stator-Glas-Glas-Homogenisator (Potter S) werden die Proben zentrifugiert und aliquotiert. Die Proteinbestimmung wird anhand des DC-Assay Kit (BIO-RAD, München, Deutschland) durchgeführt. Eine Standardkurve mit den Konzentrationen nach den Angaben des Herstellers wird mit dem BIO-RAD Protein Assay Standard I (Bovine Serum Albumin 100% -> 1,32mg/ml) erstellt. Die BSA-Konzentrationen betragen 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2µg/µl. Der Test verläuft in einem linearen Bereich von 0,189mg/ml-1,32mg/ml der BSA-Proteinkonzentration. Das Protein-Messverfahren beruht auf dem Lowry-Verfahren [81,127,106]. Die Probenkonzentrationen werden diesem Bereich durch Verdünnung angepasst. Photometrische Messungen werden mit dem Plattenphotometer MRX der Fa. DYNATECH LABORATORIES nach ca. 15min bei 700nm abgelesen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

Die Proben werden mit Laemmli-Puffer 2:1 (BIO-RAD) bei Leberproben und mit einem 4-fach-Probenpuffer 1:4 (BIO-RAD) bei Gefäßhomogenisaten bei 95°C 5min inkubiert.

Die Probenvolumina werden einer konstanten Proteinmenge (10; 20; 40µg) angepasst und auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen.

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgt durch diskontinuierliche Sodium dodecyl sulfat (SDS)-Gelelektrophorese. Die Trennung von Molekülen geschieht aufgrund ihres Molekulargewichtes.

Die Polypeptide werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Puffer hitzedenaturiert. Durch den Zusatz eines anionischen Detergenzes wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass Mizellen mit gleicher Nettoladung und unterschiedlichem Gewicht entstehen. Niedermolekulare Thiole wie β -Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirken eine verstärkte Auflösung der Disulfidbrücken.

Diese Elektrophorese eignet sich zur Trennung von Proteinen nach der Masse. Mithilfe von Markerproteinen können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden.

Im diskontinuierlichen System passiert die Probe zuerst ein Sammelgel, mit großer Acrylamid-Porenweite. Das Sammelgel enthält Chloridionen, die eine hohe elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit besitzen, Glycinionen dagegen haben eine niedrige Wanderungsgeschwindigkeit. Die Proteine ordnen sich im elektrischen Feld entsprechend ihrer Geschwindigkeit. Auf diese Weise wird eine Vortrennung und Aufkonzentrierung erreicht, die eine scharfe Bande produziert. Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert verglichen mit dem Sammelgel. Aufgrund der geringeren Porenweite werden die größeren Proteine zurückgehalten, während die kleineren eine höhere Mobilität besitzen. Im Trenngel werden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt.

Die Trenngele haben bei unseren Untersuchungen verschiedene Konzentrationen von Bisacrylamid. Für die eNOS-Blots werden 8%-ige Gele und für die VASP- und pVASP-Blots werden 10%-ige Gele verwendet entsprechend der Dichte des Polyacrylamid-Netztes und der Passage der unterschiedlichen molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine. ENOS hat ein Molekulargewicht von 132kD, während die Molekularmasse von VASP 46kD und von pVASP 50kD beträgt. Bei einem höheren Acrylamid-Anteil ist das Netz dichter, so dass kleinere Proteine schlecht passieren können und daher gut darstellbar sind.

Die Elektrophoresekammer wird mit Laufpuffer aufgefüllt und eine Spannung von 200V für 90min angelegt. Als Positivkontrollen dienen bei eNOS humane Endothelzellen, bei VASP humane Thrombozytenkonzentrate in der Verdünnung 1:50 und bei pVASP humane SNP-stimulierte Thrombozyten (1:10).

Proteinblotting

Beim Proteinblotting werden die Proteine vom Gel auf eine proteinbindende Membran übertragen (Gel-Blot). Dieser Schritt ist insofern sinnvoll, da sich die Membran als Trägermatrix aufgrund ihrer besseren Handhabbarkeit bei weiteren Reaktionen mit verschiedenen Reagenzien gut eignet.

In unseren Untersuchungen wird das Semi-Dry-Verfahren angewandt. Protran® Nitrocellulose Membran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) wird als Trägermatrix beim Blotting verwendet. Die Blotbedingungen sind mit 60min bei 15V festgelegt. Die Membranen werden mit 0,1%-iger PBST-Milchpulverlösung über Nacht bei 4°C blockiert. PBST (Phosphate-Buffered Saline) ist ein Puffer bestehend aus Natriumchlorid (80g), Dinatriumhydrogenphosphat (11,5g), Kaliumhydrogenphosphat (2g) und Kaliumchlorid (2g) mit Tris-Puffer, womit der pH-Wert bei 4°C bei 7,7-7,8 liegt.

Proteinnachweis

Die Immunreaktion des spezifischen Antikörpers mit dem Protein ist der entscheidende Schritt im Laufe des Experimentes. Mit dem ersten Antikörper wird bei den eNOS-Blots (eNOS/NOS Type III 610296, Isotyp Mouse IgG₁, Clone 3, Mol. Weight 140, Pos. Control Human Endothelial, BD Transduction Laboratories) in der Konzentration 1:1000 2h und der zweite Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific, Peroxidase Conjugate - HRP, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) 1:3000 1h inkubiert. Als Inkubationspuffer für den eNOS-Antikörper wird ein Tris-HCl-Puffer mit 1% Tween verwendet. Bei allen anderen Antikörpern dient eine 0,1%ige PBST-Milch-Lösung als Inkubationspuffer. Bei den VASP-Blots dient Anti-VASP (Affinity purified rabbit antibody Ig 731; ImmunoGlobe; Antikörpertechnik GmbH) als erster Antikörper in der Verdünnung 1:2500 und als zweiter Antikörper Anti-Rabbit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) in der Konzentration 1:5000. Der pVASP-Antikörper (Anti-VASP, Phosphospecific, Calbiochem) wird in der Verdünnung 1:1000 und Anti-Mouse in der Verdünnung 1:5000 aufgetragen. Bei VASP und pVASP wird 1h mit dem ersten Antikörper und 20min mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

Detektion

Nach der Bindung des Erst-Antikörpers an die transferierten Proteine ist die Bindung des zweiten Antikörpers notwendig, um die Bindung zu visualisieren. Der Zweit-Antikörper stammt aus einer anderen Spezies, der an den Erst-Antikörper nicht nur einfach sondern mehrfach bindet, was zu einer Signalverstärkung führt.

Die Detektion erfolgt durch verstärkte Chemilumineszenz nach dem Kit Enhanced Chemilumineszenz-Lösung Plus Western-Blotting Detection System (ECL, Amersham, UK). Die Röntgenfilme werden in der Dunkelkammer belichtet. Densitometrische Messungen werden mit den Softwareprogrammen BASReader (Control Software for Fuji-Film BAS and FLA scanners, Version 3.14, February 5, 2002, Serial # 21451; raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) und AIDA (Advanced Image Data Analyzer, 2D Densitometrie, Version 3.27.001, January 27, 2003; Serial # 9837; raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) mithilfe des Phosphoimagers FLA-3000 Fujifilm durchgeführt.

3.6 In-vitro-Leberperfusion

Vorbereitung der Perfusionslösung

Die Perfusionslösung soll während der Untersuchung die Homöostase auf einem physiologischen Niveau gewährleisten, was in vivo durch die Elektrolytzusammensetzung und das Puffersystem des Blutes bewerkstelligt wird. Diese Eigenschaften des Blutes sollen durch Krebs-Henseleit-Puffer imitiert werden.

Ein Liter Perfusionslösung setzt sich zusammen aus 9,55g Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma-Aldrich), 2,1g NaHCO₃, 0,373g CaCl₂ x H₂O und 2000IU Heparin in 1 Liter Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird auf ein physiologisches Niveau von 7,4 eingestellt und durch Titration mit HCl und Natriumbikarbonat konstant gehalten. Die Lösung wird auf 38°C erwärmt und 20min mit Carbongen-Gas (Fa. Linde, Siegburg, Deutschland) mit einer Zusammensetzung von 95% O₂ zu 5% CO₂ präoxygeniert. Elektrolyte, Oxygenierungsgrad, pH-Wert und Temperatur der Perfusionslösung werden in jedem Experiment durch Blutgasanalyse mit RADIOMETER ABL 700 SERIE (Drott Medizintechnik, Wiener Neudorf, Österreich) kontrolliert.

Vasoaktive Substanzen

Zur Ermittlung der dosisabhängigen Antwort vasoaktiver Substanzen werden der unspezifische NO-Synthase-Inhibitor *N^G-nitro L-arginine methyl-ester* (L-NAME) und der α_1 -Adrenorezeptor-Agonist Methoxamin verwendet.

L-NAME wird in einer systemisch wirksamen Dosis von 1mM verwendet, um den Effekt der NOS-Blockade zu untersuchen. Mit Methoxamin wird in drei verschiedenen Dosen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M Methoxamin) perfundiert, damit die dosisabhängige Antwort dargestellt werden kann.

Mit L-NAME in einer systemisch wirksamen Dosis wird nach ca. 20-minütiger Stabilisierung der In-situ-Leberperfusion perfundiert. Die Konzentration beträgt mit 0,04g L-NAME/150ml des zirkulierenden Volumens 1mM. Etwa 10min nach L-NAME-Gabe entsteht ein Steady State der Dosis-Antwort-Kurve, worauf mit 1 μ M Methoxamin perfundiert wird. Nach erneutem Abwarten eines Steady State erfolgt die Perfusion mit 10 μ M und 100 μ M Methoxamin.

Geräteaufbau und –vorbereitung

Ein flusskontrolliertes Perfusionssystem findet in der Untersuchung Anwendung. Es handelt sich um ein Zirkulationssystem, das durch die kontinuierliche Rotation einer Peristaltikpumpe (Peri Star, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit 40U/min aufrechterhalten wird. Das Erreichen eines konstanten Temperaturniveaus wird durch ein Wasserbad (M3/B Lauda, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) gewährleistet (Temp. 38°C). Im Zirkulationssystem ist ein Blasenfänger integriert, um eine Luftembolie der perfundierten Leber zu vermeiden. Ein Auffanggefäß mit einer Markierung ermöglicht das Ablesen eines konstanten Zirkulationsvolumens von 150ml. Carbongen wird sowohl in eine Gaswaschflasche gegeben als auch in die im Wasserbad erwärmte Reserveperfusionslösung geleitet, die nicht in das System einbezogen ist. Das in der Gaswaschflasche befindliche Carbongen geht den Diffusionsweg durch einen porösen Siliconschlauch und löst sich in der Perfusionsflüssigkeit.

Um die Druckmessung mit der Software (AcqKnowledge, MP 150 Manager, Version 3.7.3, BIOPAC System, Inc.) durchzuführen, werden die Druckkanäle des Druckmessers (TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) auf 0mmHg und 30mmHg geeicht, wobei die Nullpunkte des Eingangs- und Ausgangsdruckes gegeneinander

verschoben werden. Die Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik) werden mit 0mmHg auf Herzebene und auf Ebene der Pfortader geeicht.

Die Stabilität des Systems wird nach Aufbau und Einstellung der Rollerpumpe auf eine Flussgeschwindigkeit von 30ml/min dreimal im Abstand von jeweils 10min überprüft.

Präparation

Das Versuchstier (männliche Sprague-Dawley Ratte) wird mit Ketaminhydrochlorid (100mg/kg KG i.m., 25mg/ml Esketamin Hydrochlorid, Parke-Davis GmbH, Pfizer GmbH) durch intramuskuläre Injektion anästhesiert. Das Fell wird im Abdomenbereich abgetragen, um mögliche Embolisationen bei der Katheterplatzierung in die Pfortader durch Fellpartikel zu vermeiden. Anschließend wird eine Laparotomie entlang der gefäßarmen Linea alba und eine Erweiterung in lateraler Richtung durchgeführt. Man lagert den Darm auf die linke Seite der Ratte aus. Die Vena cava inferior wird suprarenal präpariert, und um sie wird eine lose Ligatur platziert. Die Vena portae wird proximal präpariert und die Vena lienalis ligiert. Zwei lose Ligaturen werden an die Vena portae angelegt. Im Anschluss werden 500IU Heparin in die Vena cava inferior injiziert.

Vor dem Anschluss an das zirkulierende System wird die distale Ligatur der Vena portae zugezogen. Durch eine feine Inzision der proximalen Pfortader wird die Öffnung für die Katheterisierung der Pfortader geschaffen. Der Perfusionskreislauf wird unterbrochen, um den 14-Gauge-Teflon-Katheter an die Pfortader anzuschließen. Die proximale Ligatur wird zum Fixieren des Katheters zugezogen. Kaudal der losen Ligatur der Vena cava inferior werden die Gefäße durchtrennt, um den Abfluß der Perfusionsflüssigkeit und des restlichen Blutes zu ermöglichen und einen rapiden intrahepatischen Druckanstieg zu vermeiden. Artifizuell wird ein Pneumothorax herbeigeführt, was mit dem Weiterleben der Ratte unvereinbar ist. Die Vena cava superior wird aufgesucht und der Ausflusskatheter angeschlossen. Die suprarenale Vena cava inferior wird ligiert und die Leber exsanguiniert. Nach Exsanguinierung wird der Perfusionskreislauf mit einem Zirkulationsvolumen von 150ml Krebs-Henseleit-Lösung wiederhergestellt und die Messung des Pfortaderdruckes und des Druckes in der Vena cava gestartet.

Druckmessung und Dosis-Antwort-Kurven

Die Druckmessung in der Pfortader wird im Verlauf dargestellt. Der Druck in der Vena cava, der ≤ 0 mmHg betragen sollte, dient als Kontrollparameter dafür, dass kein Rückstau entsteht, sondern ein leichter Sog vorhanden ist.

Nach 20-minütiger Stabilisierung des Leberperfusionskreislaufs wird mit L-NAME zur NO-Hemmung in einer systemisch wirksamen Dosis perfundiert. Etwa 10 min nach L-NAME-Zugabe entsteht ein Steady State der Dosis-Antwort-Kurve, worauf $1 \mu\text{M}$ Methoxamin hinzugegeben wird. Nach erneutem Abwarten eines Steady State erfolgt die Gabe von $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Methoxamin. Danach wird die Messung beendet.

3.7 Statistische Analyse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch den arithmetischen Mittelwert \pm Standardabweichung. Der Vergleich der Gruppen wird anhand des Mann-Whitney-U-Testes durchgeführt (StatView 5.0, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Als statistisch signifikant wird $p < 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Hämodynamische Microsphären-Untersuchung

Gallengangsligierte Ratten weisen vier Wochen nach der Operation gegenüber den Sham-Ratten einen signifikant erhöhten Pfortaderdruck auf (BDL (n=6): $19,5 \pm 2,6$ mmHg; Sham (n=3): $6,8 \pm 1,8$ mmHg). Der mittlere arterielle Druck (MAD) bei BDL-Ratten ist im Vergleich zu den Sham-Ratten niedriger (BDL: 105 ± 21 mmHg; Sham: $146 \pm 1,7$ mmHg). 28 Tage post operationem werden BDL-Ratten drei Tage in Folge mit $1 \text{ mg/ml/kg KG AVE 9488}$ behandelt. Der MAD unterscheidet sich nicht signifikant bei den behandelten und den unbehandelten BDL-Ratten (s. Abb. 7). Der kardiale Index ist bei den mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten signifikant niedriger als bei den BDL-Ratten (s. Abb. 8).

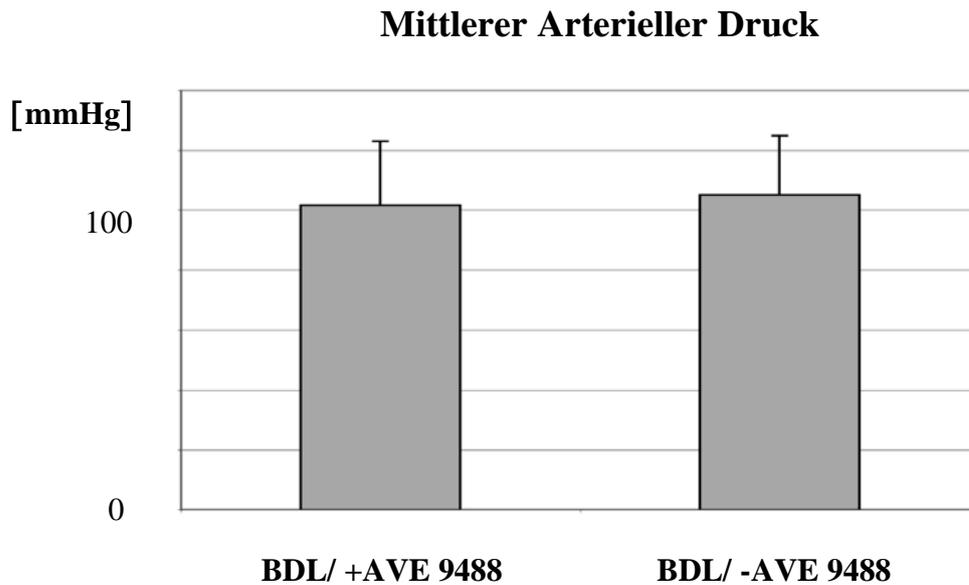


Abb. 7 Beim mittleren arteriellen Druck sind zwischen mit AVE 9488 behandelten und nicht behandelten Gallengangsligatur (bile-duct-ligated, BDL)-Ratten keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Es ist keine systemische Auswirkung des Medikamentes zu beobachten.

Die Anzahl der BDL-Kontrolltiere beträgt $n=6$ und die der mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten $n=9$.

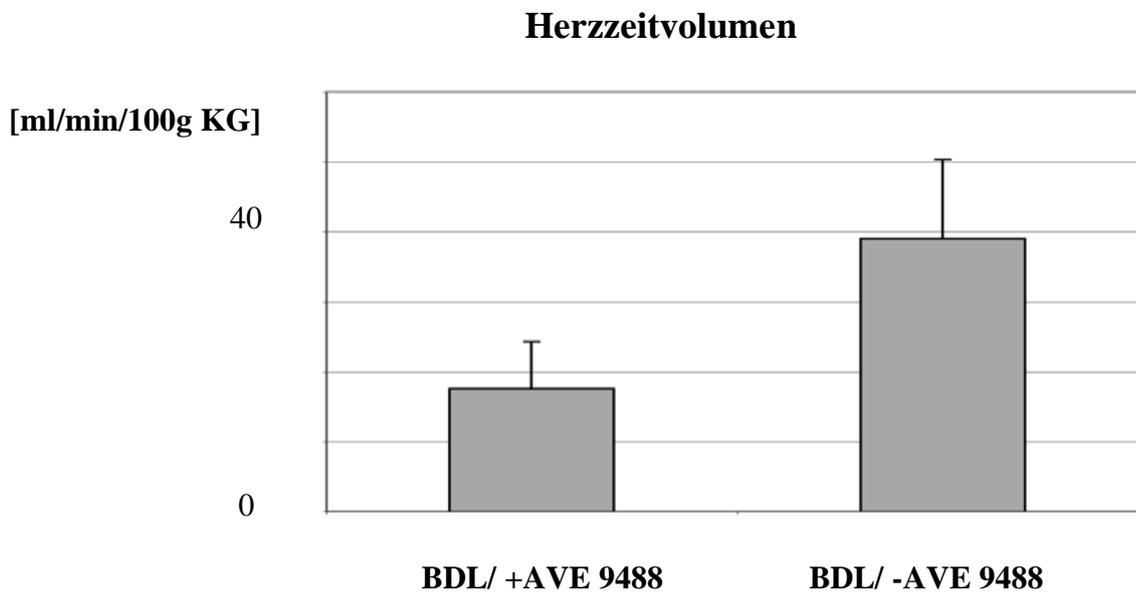


Abb. 8 Das Herzzeitvolumen von mit AVE 9488 therapierten BDL-Ratten ist im Vergleich zu den nicht therapierten BDL-Kontrolltieren signifikant erniedrigt ($p < 0,001$). Die Erniedrigung des Herzzeitvolumens (HZV) durch AVE 9488 spricht für eine Kreislaufentlastung bei hyperdynamischer Zirkulation bei portaler Hypertension und vermehrtem zirkulierendem Blutvolumen.

Der Portaldruck war um 25% signifikant niedriger in der mit AVE 9488 behandelten BDL-Gruppe als in der BDL-Kontrollgruppe. Eine Vermehrung des splanchnischen Flusses bei behandelten Ratten ist zu beobachten. Bei hyperdynamischer Zirkulation ist der portalvenöse Zufluss aus den splanchnischen Organen Magen, Darm, Mesenterium, Milz und Pankreas erhöht.

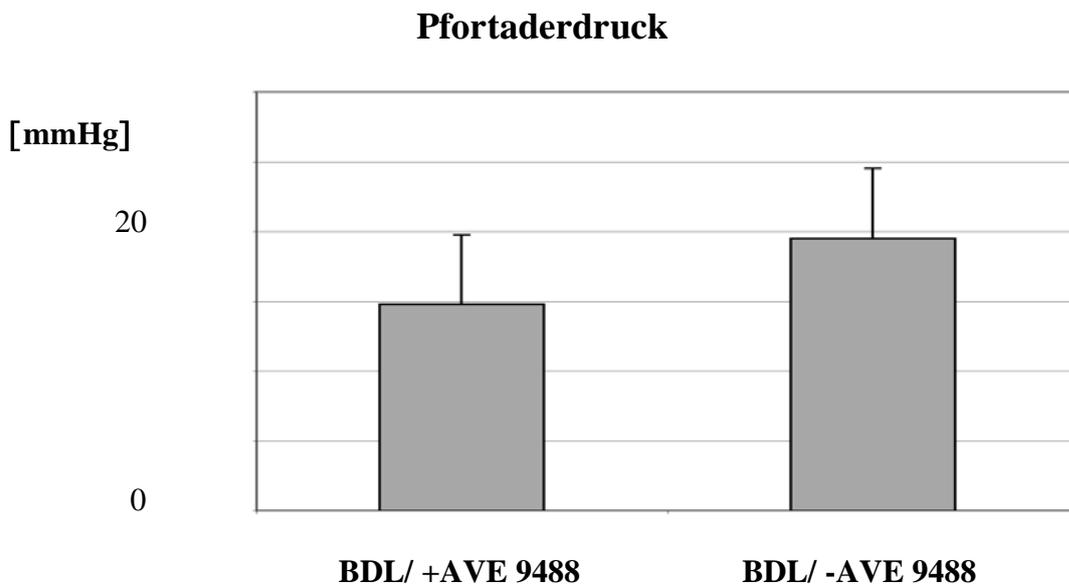


Abb. 9 Der Pfortaderdruck wird durch AVE 9488-Behandlung bei BDL-Ratten um 25% gesenkt ($p < 0,01$). Eine signifikante spezifische Drucksenkung im portalen Stromgebiet kann beobachtet werden.

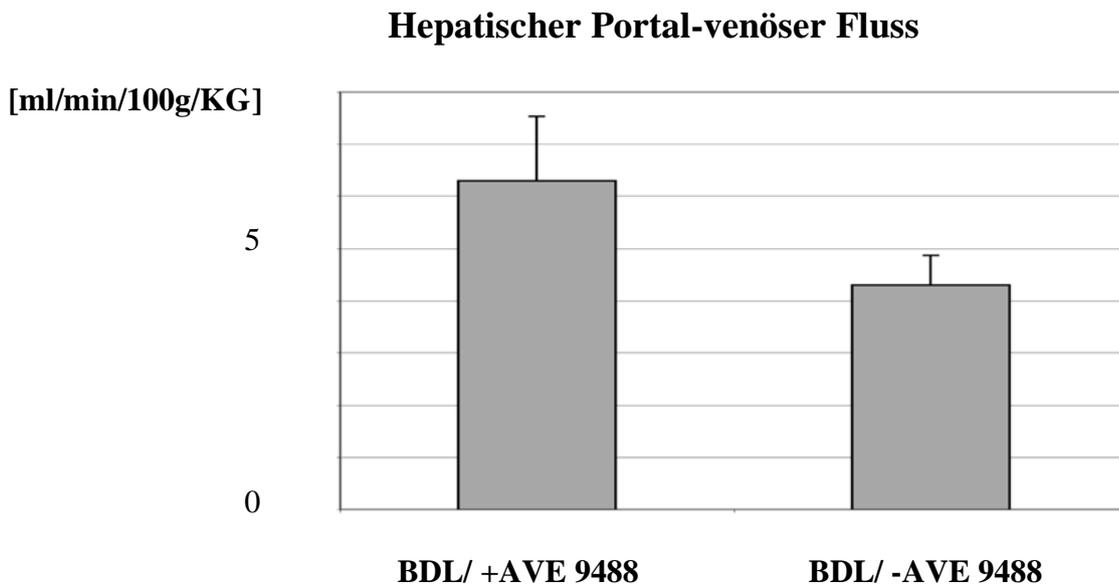


Abb. 10 Der hepatische portal-venöse Fluss von mit AVE 9488 therapierten BDL-Ratten ist im Vergleich zu nicht behandelten BDL-Ratten vermehrt ($p < 0,01$). Die vermehrte Durchblutung im Splanchnikus bei behandelten Ratten führt zu einem vermehrten portalvenösen Fluss.

Bei den arteriellen Flüssen der Leber- und der Nierenarterie ist kein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten BDL-Ratten zu erkennen.

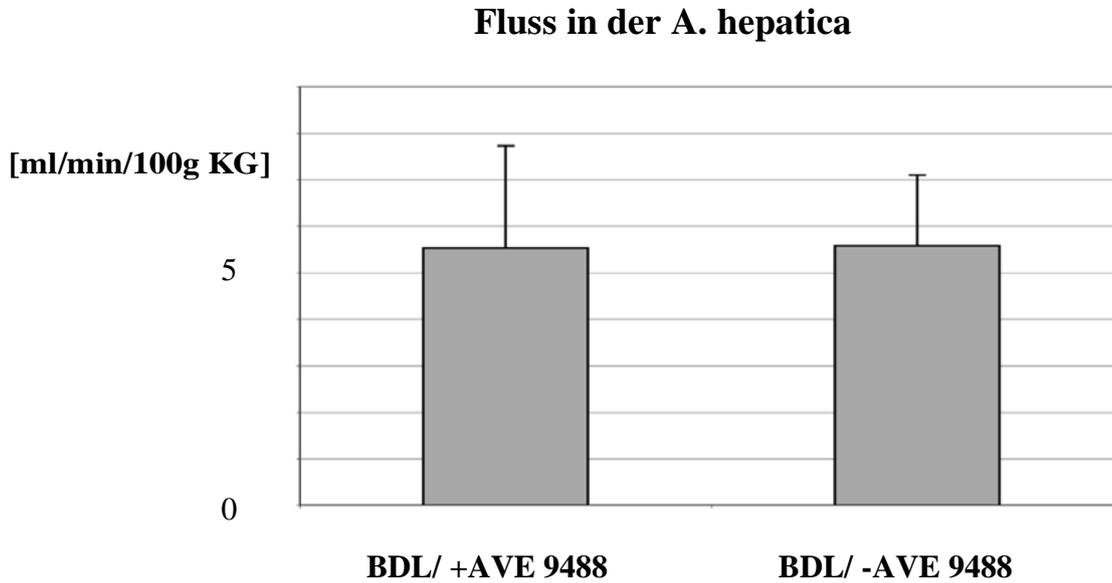


Abb.11 Der Fluss in der A. hepatica bleibt anders als im Splanchnikus nach AVE 9488-Applikation unverändert (kein signifikanter Unterschied).

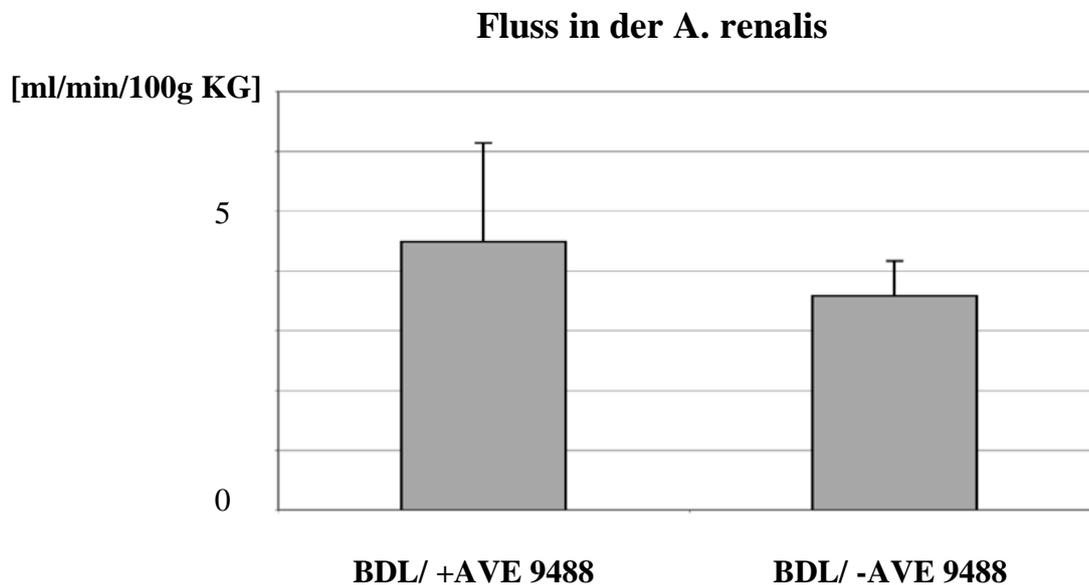


Abb. 12 Der Fluss in der A. renalis ändert sich im Gegensatz zum Splanchnikusgebiet nach AVE 9488-Gabe ebenfalls nicht wesentlich (kein signifikanter Unterschied).

Der hepatische Gefäßwiderstand und der splanchnische Gefäßwiderstand sind in der mit AVE 9488 behandelten BDL-Gruppe signifikant niedriger als in der nicht behandelten zirrhotischen Kontrollgruppe.

Hepatischer Gefäßwiderstand

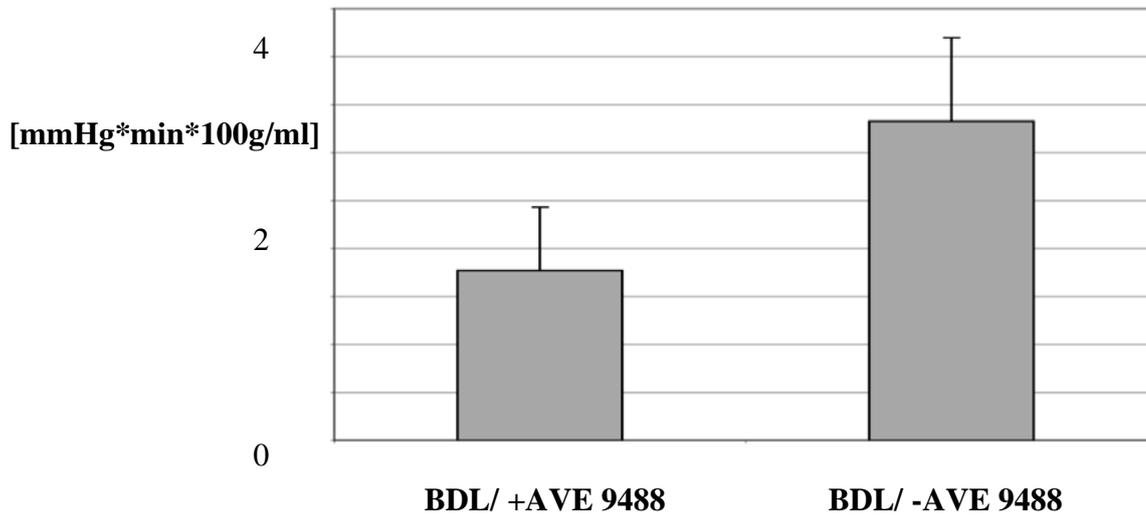


Abb. 13 Der hepatische Portalgefäßwiderstand wird durch AVE 9488 um mehr als 40% gesenkt ($p < 0,01$). Ein erhöhter portalvenöser Fluss und ein erniedrigter intrahepatischer Widerstand können bei der Senkung des hepatischen Portalgefäßwiderstandes beobachtet werden.

Splanchnischer Gefäßwiderstand

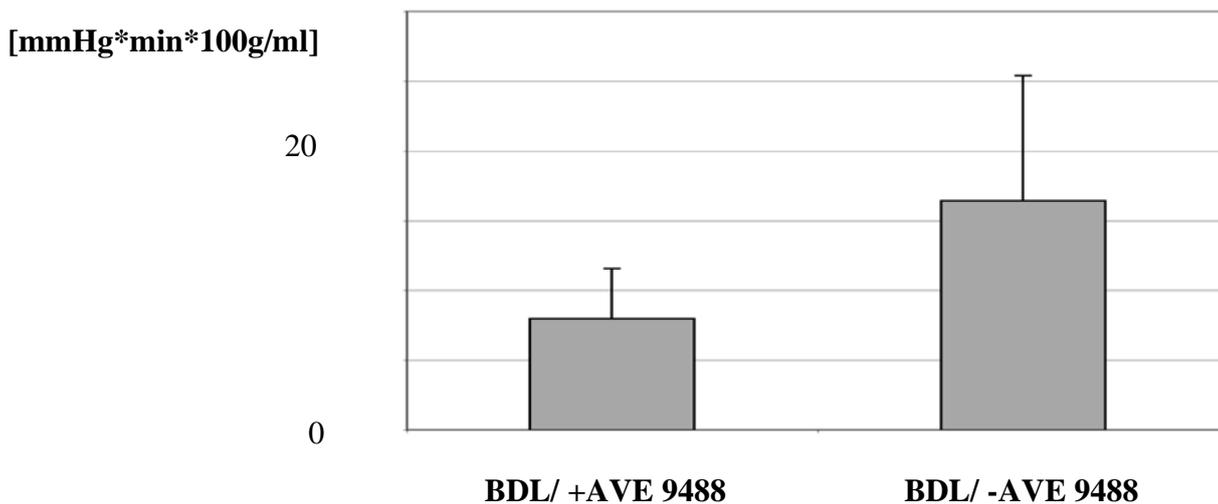


Abb. 14 Der splanchnische Gefäßwiderstand ist bei den mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten im Vergleich zu den unbehandelten BDL-Ratten um 50% reduziert ($p < 0,05$). Sowohl eine vermehrte Splanchnikusdurchblutung als auch eine Portaldrucksenkung erklären die Widerstanderniedrigung in den splanchnischen Gefäßen.

Der portal-sinusoidale Widerstand ist bei den behandelten BDL-Ratten signifikant niedriger als bei den nicht behandelten BDL-Ratten.

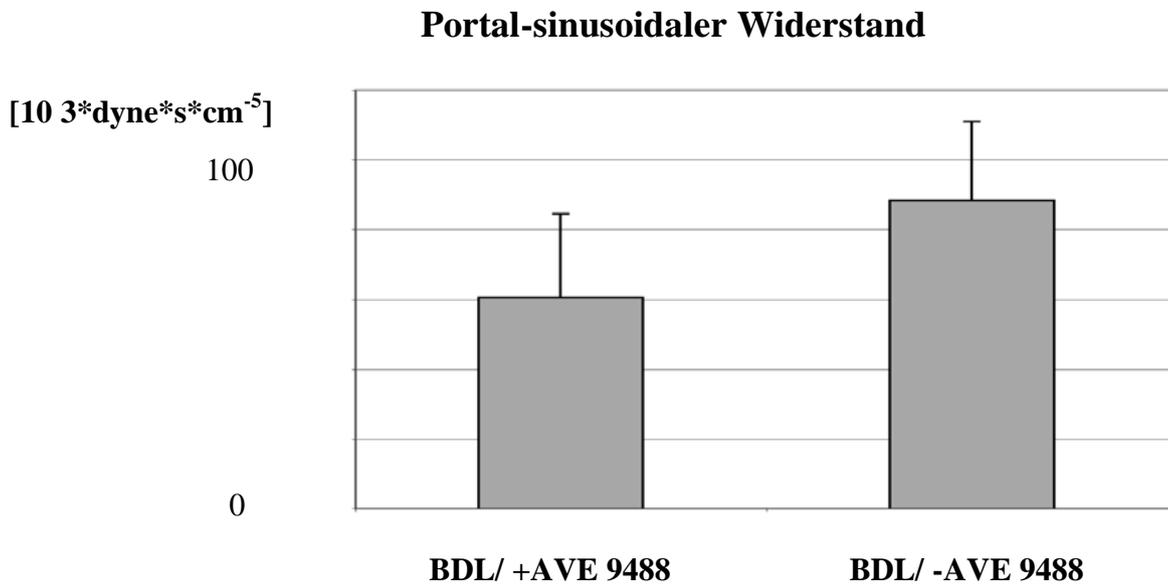


Abb. 15 Der portal-sinusoidale Widerstand wird durch AVE 9488-Behandlung um 30% gesenkt ($p < 0,05$). Eine intrahepatische Erniedrigung des Widerstandes wird durch AVE 9488 erreicht.

Die Übersicht der hämodynamischen Parameter von mit AVE 9488 behandelten und unbehandelten Tieren weist auf eine Drucksenkung im portalen und intrahepatischen Stromgebiet hin, während die Medikamentenwirkung nicht für eine systemische Belastung im Sinne einer systemischen arteriellen Hypotonie spricht.

	MAD [mmHg]	Cardiac Output [ml/min/100g KG]	SVR [mmHg/ml/min/100g KG]	Fluss der A. renalis [ml/min/100g KG]	Fluss der A. hepatica [ml/min/100g KG]
BDL/ + AVE 9488 (1mg/kg KG) Anzahl = 9	102 +/- 20	17,6 +/- 6,7	8,25 +/- 4,5	4,48 +/- 1,66	5,5 +/- 2,1
BDL/ - AVE 9488 Anzahl = 6	105 +/- 21	39,0 +/- 11,4	2,90 +/- 1,5	3,59 +/- 0,58	5,5 +/- 1,5
p	0,73	0,0005	0,016	0,23	0,9

Tabelle 6 Bei den arteriellen hämodynamischen Parametern bei BDL-Ratten mit und ohne AVE 9488-Applikation sind signifikante Unterschiede im Herzzeitvolumen (HZV) und im systemischen Gefäßwiderstand (SVR) zu beobachten.

	PP [mmHg]	Portal tributary bloodflow [ml/min/100g KG]	Shunt volume [ml/min/100g KG]	Hepatic portal-vascular resistance [mmHg*min*100g/ml]	Portal sinusoidal resistance 10^3 *dyne*s*cm ⁵	Splanchnic vascular resistance [mmHg*min*100g/ml]
BDL/ + AVE 9488 (1mg/kg KG) Anzahl = 9	14,8 +/- 2,9	6,3 +/- 1,2	5,2 +/- 6,4	1,91 +/- 0,7	60 +/- 23	7,9 +/- 3,5
BDL/ - AVE 9488 Anzahl = 6	19,5 +/- 2,6	4,3 +/- 0,6	1,1 +/- 1,4	3,3 +/- 0,8	88 +/- 23	16,4 +/- 8,9
p	0,007	0,007	0,15	0,005	0,048	0,023

Tabelle 7 Außer beim Shunt-Volumen sind durch die AVE 9488-Gabe Veränderungen im venösen System zu beobachten.

4.2 Quantitative PCR

In der Leber zeigt sich eine signifikante Erhöhung des eNOS-mRNA-Steady-State-Level ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 1,8; 3,6-fache Zunahme) bei den pharmakologisch behandelten Ratten im Vergleich zu den BDL-Kontrolltieren.

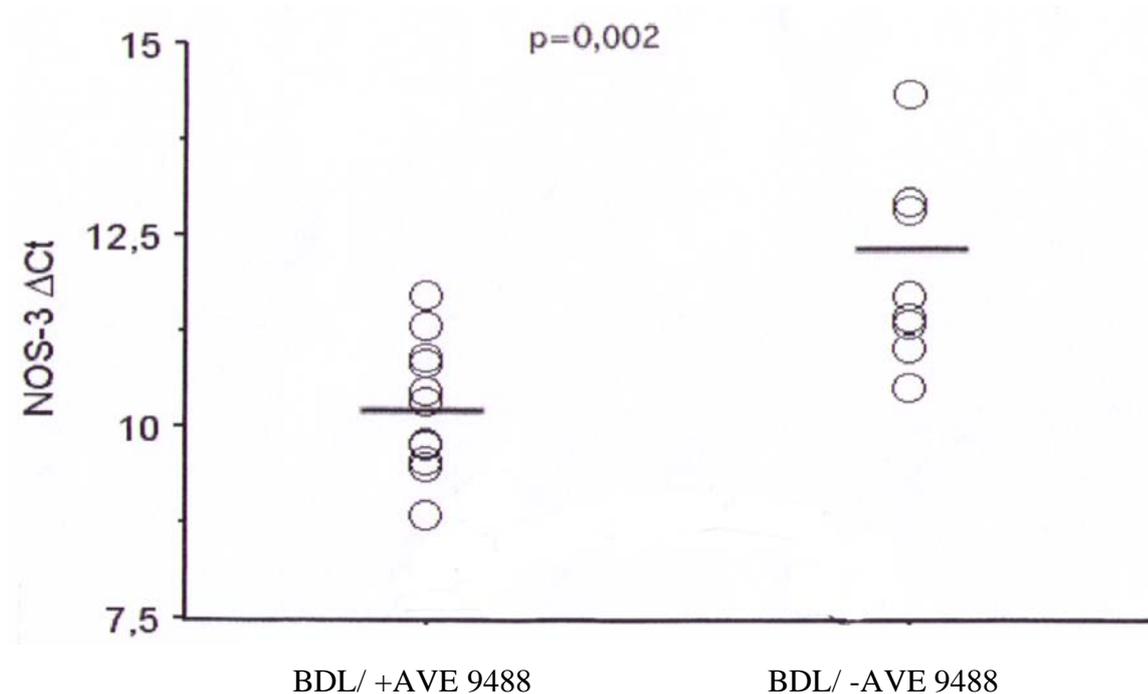


Abb. 16 Je niedriger der ΔCt -Wert ist, desto schneller wird eine bestimmte mRNA-Konzentration erreicht. Das eNOS-mRNA-Steady-State-Level ist bei mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten in der Leber gegenüber den nicht behandelten BDL-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,005$). AVE 9488 bewirkt eine Erhöhung des eNOS-mRNA-Level.

Eine systemische Wirkung ist nicht festzustellen, da bei den behandelten Ratten keine signifikante Erhöhung in den Steady State-Level in der Aorta nachzuweisen ist ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 0,98).

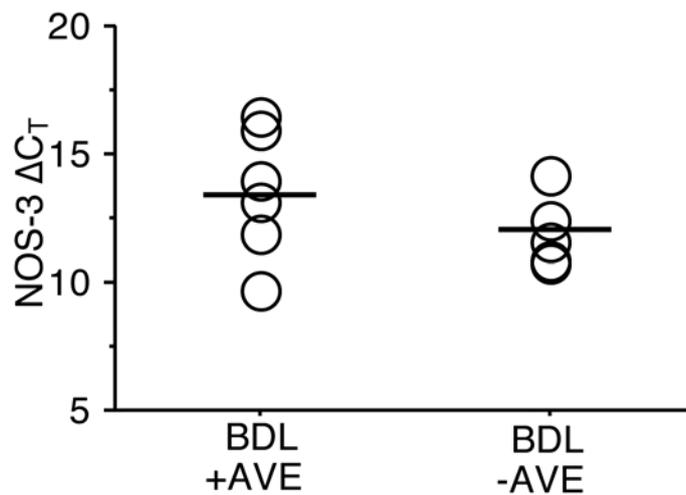


Abb. 17 In der Aorta zeichnet sich keine signifikante eNOS-mRNA-Erhöhung durch AVE 9488-Behandlung bei BDL-Ratten ab. AVE 9488 zeigt keine systemische eNOS-mRNA-Erhöhung.

In der A. mes. sup. ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Steady State-Level zu verzeichnen ($\Delta\Delta C_t$ 0,03). Die Ergebnisse der PCR von Aorta und A. mes. sup. zeigen keine systemische Wirkung von AVE 9488.

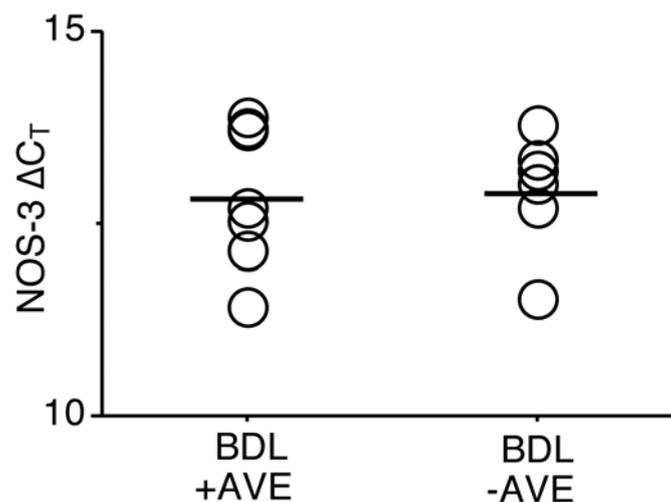


Abb. 18 Es gibt keinen signifikanten Unterschied in den eNOS-mRNA-Steady State-Level in der A. mes. sup. zwischen mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten und nicht behandelten BDL-Ratten. AVE 9488 zeigt keine eNOS-mRNA-Erhöhung der A. mes. sup.

	Organe von BDL-Ratten/ + AVE 9488	Organe von BDL-Ratten/ - AVE 9488	p
Leber	MW Δ Ct 10,21 +/- 0,86	MW Δ Ct 12,03 +/- 1,25	< 0,005
Aorta	MW Δ Ct 13,71 +/- 2,38	MW Δ Ct 14,69 +/- 1,79	nicht signifikant
A. mes. sup.	MW Δ Ct 12,88 +/- 0,94	MW Δ Ct 12,91 +/- 0,98	nicht signifikant

Tabelle 8 Es zeichnet sich eine spezifische eNOS-Erhöhung in der Leber durch AVE 9488 in der Polymerasekettenreaktion (PCR) bei BDL-Ratten ab.

4.3 Immunoblot

Nachdem für die Leber auf mRNA-Ebene eine Zunahme an NOS-3-RNA gezeigt ist, wird als nächstes die Proteinexpression von NOS-3 untersucht.

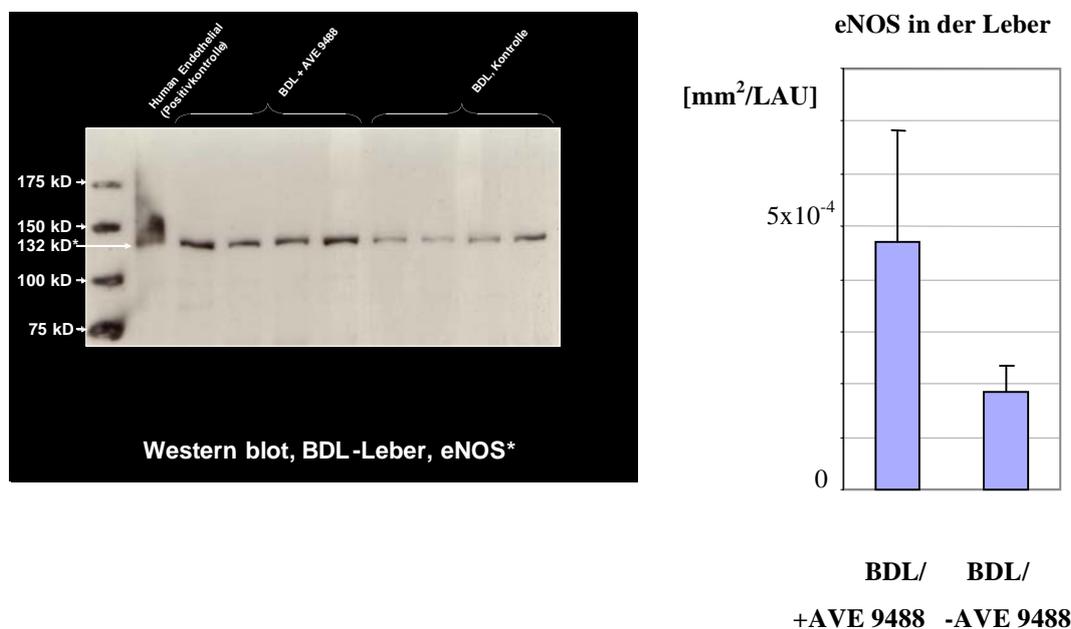


Abb. 19 Eine vermehrte Proteinexpression von eNOS in der Leber mit Nachweis von eNOS ($p < 0,05$) ist im Western blot bei mit AVE 9488 behandelten im Vergleich zu den unbehandelten BDL-Rattenlebern zu erkennen. (Die densitometrischen Daten sind im Diagramm veranschaulicht. Der Unterschied ist signifikant.).

Bei den eNOS-Immunoblots von der Aorta und der Arteria mesenterica superior sind keine signifikanten Unterschiede in der Proteinsynthese zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

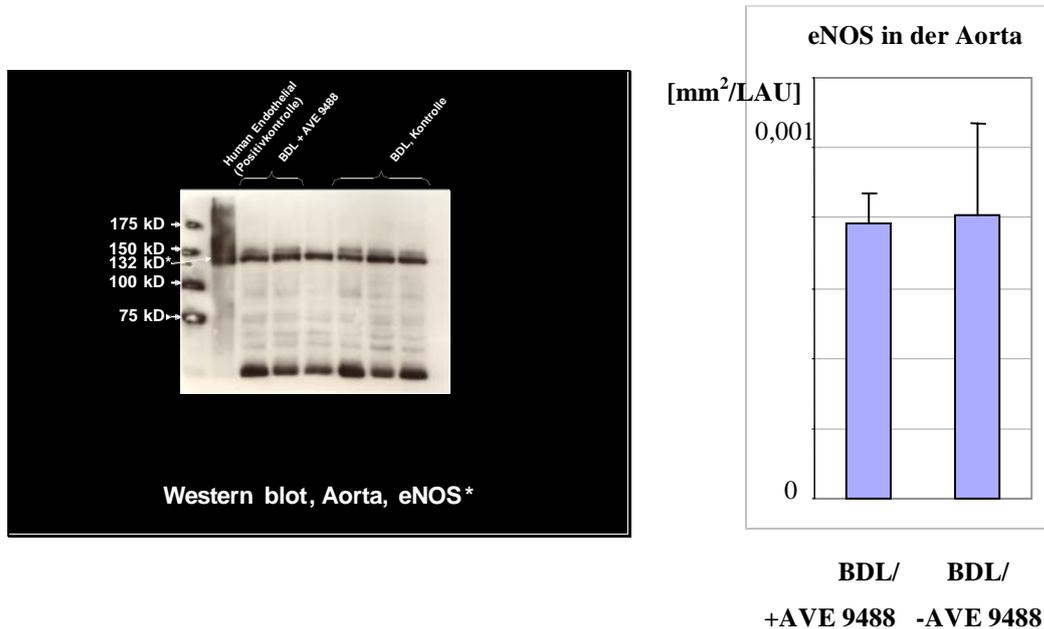


Abb. 20 AVE 9488 zeigt in der Proteinexpression von eNOS in der Aorta im Western blot bei mit AVE 9488 behandelten und unbehandelten Ratten keinen signifikanten Unterschied.

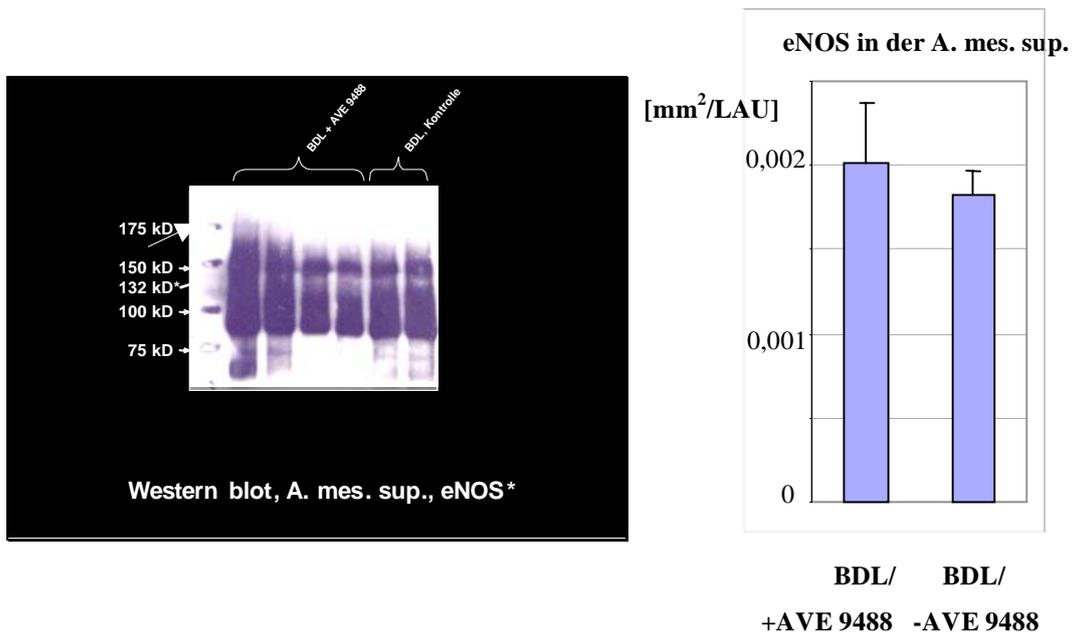


Abb. 21 Es ist kein signifikanter Unterschied durch AVE 9488 bezüglich der Proteinexpression von eNOS in der A. mes. sup. im Western blot erkennbar.

VASP (Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein)- und pVASP-Immunoblots, die einen Hinweis auf die Aktivität von eNOS liefern, zeigen eine erhöhte Aktivität von pVASP in der Leber (bei 50 kD) bei den mit dem eNOS-Transkriptionenhancer behandelten Ratten. Die Phosphorylierung des Proteinkinase G(PKG)-Substrates VASP an Ser-239 ist ein biochemischer Marker für die PKG-Aktivität [64,124]. Die cGMP-abhängige PKG löst eine Vasodilatation aus.

Die Blots mit Gesamt-VASP weisen keinen signifikanten Unterschied in der VASP-Expression auf.

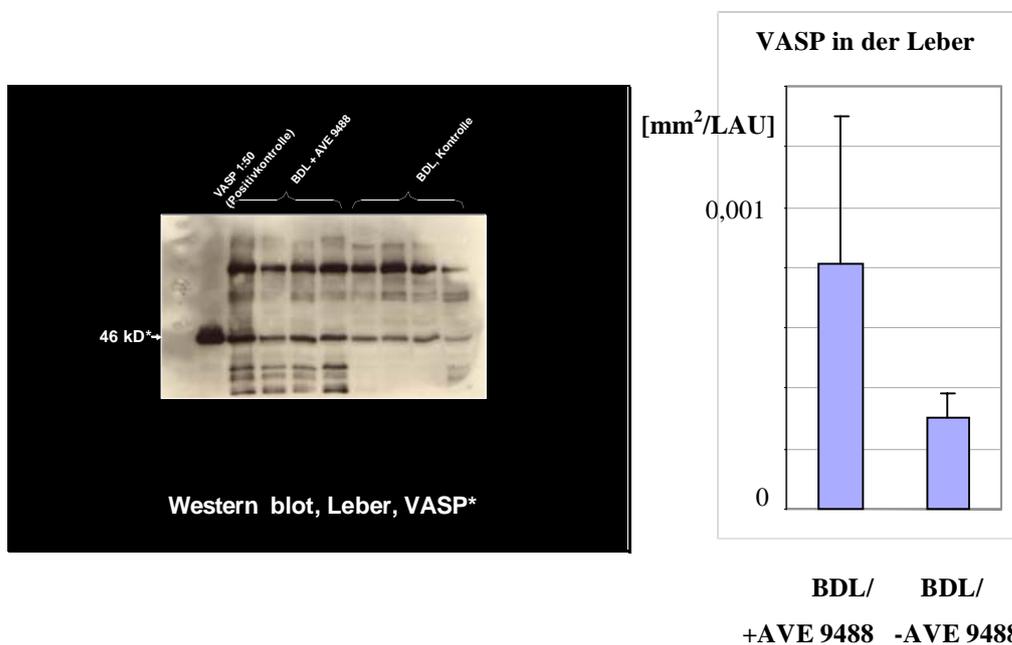


Abb. 22 *Im Western blot von mit AVE 9488 behandelten und unbehandelten zirrhotischen Leberproben mit Nachweis von VASP ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die VASP-Konzentrationen in der Leber sind gleichwertig, so dass die pVASP-Konzentrationen verglichen werden können.*

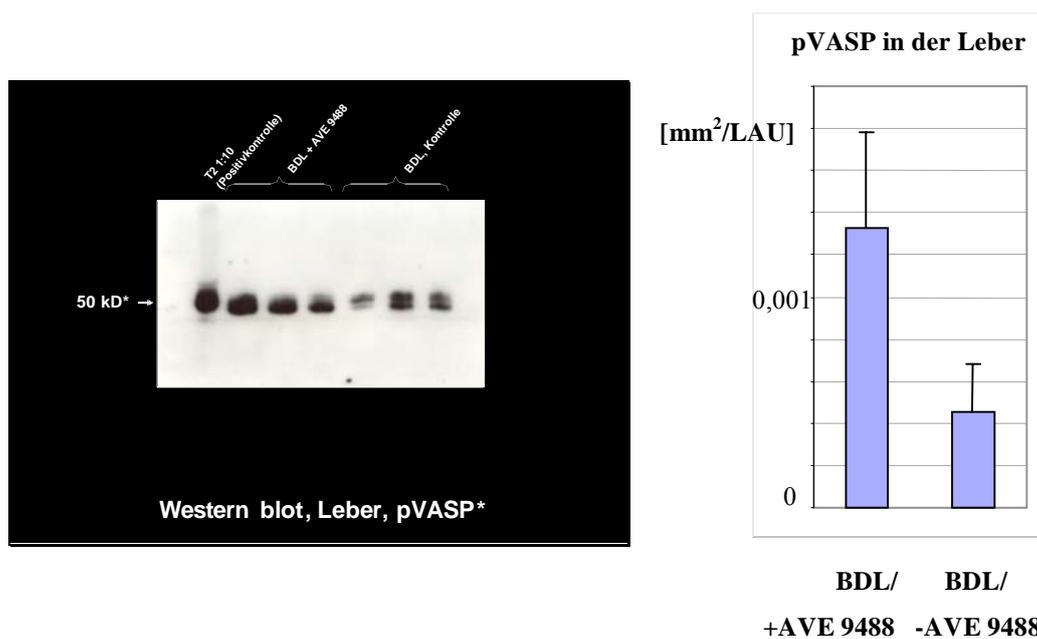


Abb. 23 Eine erhöhte pVASP-Konzentration durch AVE 9488 in der Leber kann im Western blot festgestellt werden ($p < 0,05$).

4.4 In-vitro-Leberperfusion

Eine signifikante Senkung des basalen Perfusionsdruckes liegt bei den pharmakologisch behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten BDL-Ratten von $10,42 \pm 5,5$ mmHg auf $5,95 \pm 1,9$ mmHg vor. Nach Perfusion mit 1 mM L-NAME ist ein Druckanstieg von $12,64 \pm 7,42$ mmHg bei den zirrhotischen Tieren und $9,85 \pm 3,2$ mmHg bei den behandelten BDL-Ratten zu verzeichnen. Das entspricht einem Druckanstieg bei den behandelten Ratten von 39,6% und bei den Kontroll-BDL-Ratten von 17,6%. Durch L-NAME läßt sich der AVE 9488-Effekt aufheben.

Die Perfusion mit $1 \mu\text{M}$ Methoxamin verursacht bei behandelten Tieren einen Druckanstieg von 42,3% und 36,8% bei den Kontrolltieren. Nach $10 \mu\text{M}$ Methoxamingabe steigt der Druck um 22,1%, nach $100 \mu\text{M}$ Methoxamingabe um 16,5% bei den mit AVE 9488 behandelten BDL-Ratten. Der dosisabhängige Druckanstieg zeigt sich bei den zirrhotischen Kontrolltieren mit 17,3% nach $10 \mu\text{M}$ Methoxamingabe und mit 17,1% nach $100 \mu\text{M}$ Methoxamingabe.

	PP (initial) [mmHg]	PP (+L- NAME) [mmHg]	PP (+1μM Methoxamin) [mmHg]	PP (+10μM Methoxamin) [mmHg]	PP (+100μM Methoxamin) [mmHg]
BDL/ + AVE 9488 (MW +/- SD; n=9)	5,9 +/- 1,9	9,8 +/- 3,2	17,1 +/- 5,0	21,9 +/- 6,7	26,3 +/- 6,0
		P<0,01	P<0,001		
BDL/ + AVE 9488 (MW +/- SD; n=9)	10,4 +/- 5,5	12,6 +/- 7,4	20,0 +/- 11,6	24,2 +/- 12,6	29,5 +/- 12,3
p	<0,01				

Tabelle 9 AVE 9488 senkt den Pfortaderdruck signifikant. Die NOS-Erhöhung durch AVE 9488 wird durch L-NAME, einem NOS-Hemmer, aufgehoben. Die dosisabhängige Wirkung des Alpha1-Agonisten Methoxamin ist dargestellt. Eine effektive Vasokonstriktion durch die Alpha1-Stimulation über die NOS-Blockade hinaus durch L-NAME ist zu beobachten.

Basaldruck

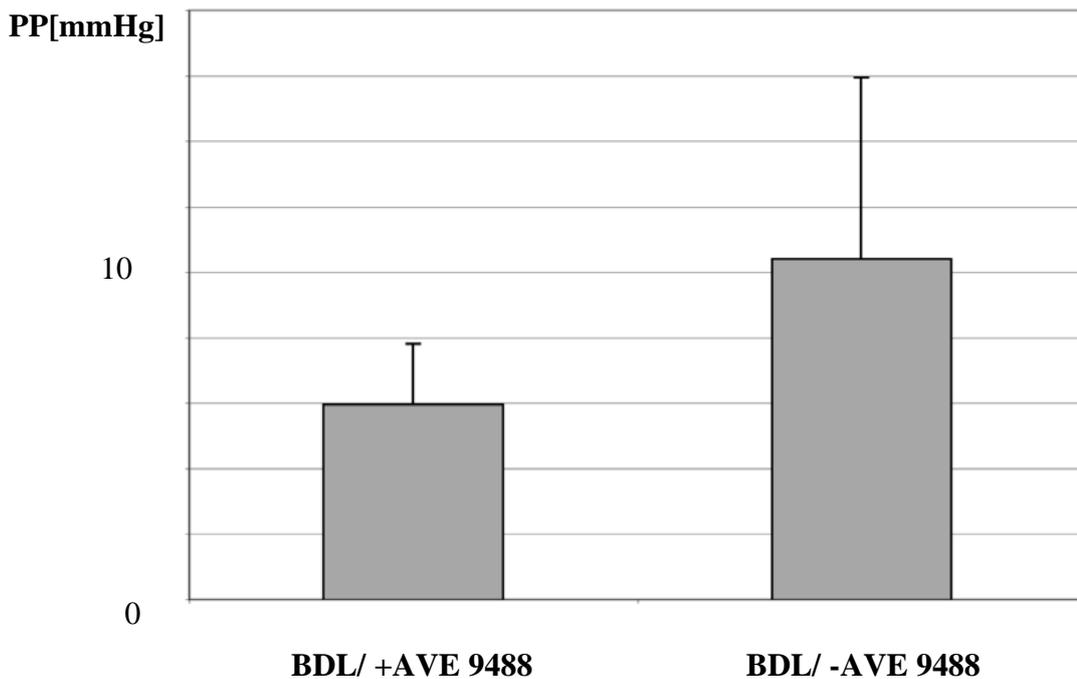


Abb. 24 AVE 9488 senkt den basalen Pfortaderdruck bei BDL-Ratten in der In-vitro-Leberperfusion ($p < 0,01$).

In-vitro-Leberperfusion an BDL-Ratten mit L-NAME und Methoxamin

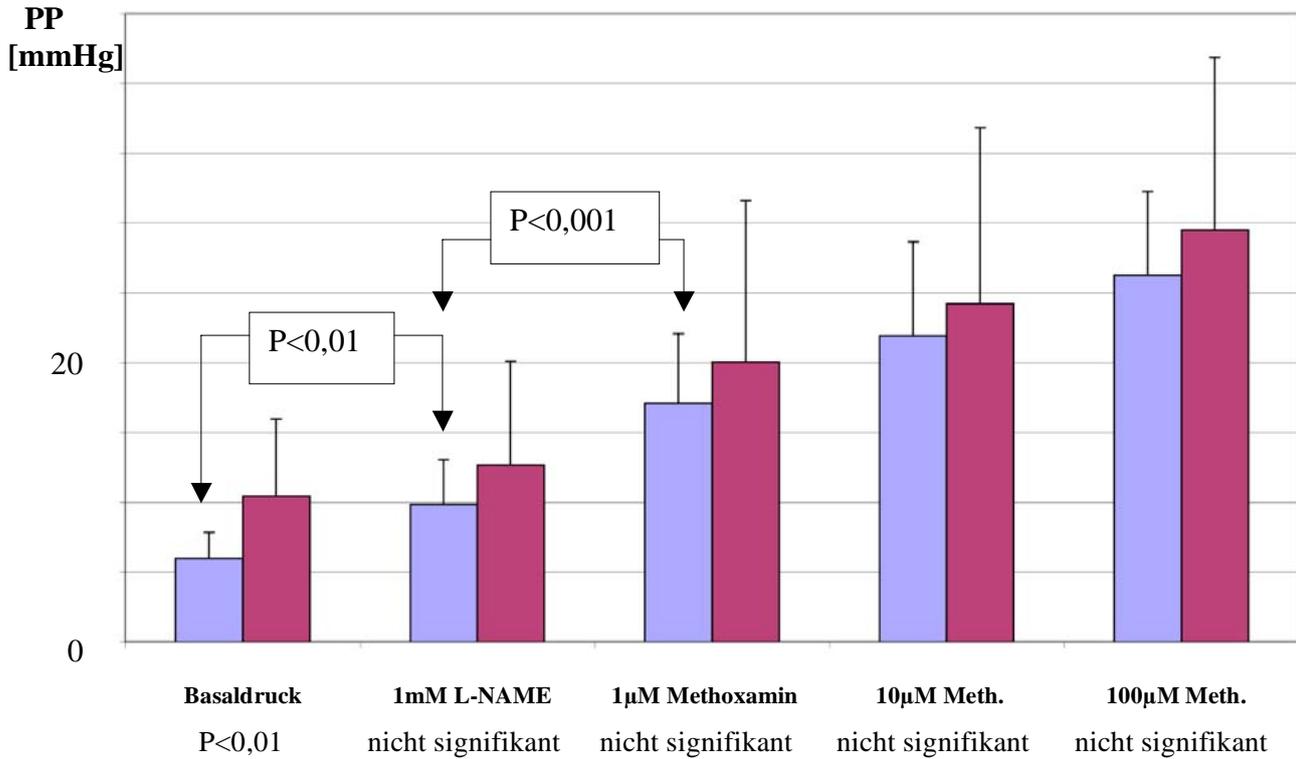


Abb. 25 Die Druckverhältnisse bei Gabe von L-NAME und Methoxamin ändern sich bei verschiedenen Dosierungen. Die Blockade der NO-Synthetase durch L-NAME zeigt einen signifikanten Unterschied bei mit AVE 9488 behandelten Ratten.

- BDL/ +AVE 9488
- BDL/ -AVE 9488

5. Diskussion

Der eNOS-Transkriptionenhancer AVE 9488 hat Auswirkungen auf die portale Hämodynamik. Bei unverändertem MAD senkt die Substanz den Pfortaderdruck signifikant. Der intrahepatische und splanchnische Widerstand werden ebenfalls durch AVE 9488 verringert. Eine Reduzierung des HZV ist durch AVE 9488 zu beobachten. Die Senkung des Pfortaderhochdruckes von AVE 9488 scheint mit einem erhöhten eNOS-Steady-State-Level auf mRNA-Ebene in der Leber zusammenzuhängen. Auch auf Proteinebene ist eine vermehrte eNOS-Proteinexpression in der Leber in Abgrenzung zu anderen Organsystemen zu beobachten. Der Substanzeffekt zeigt sich auch durch die Inhibition der NO-Synthetase mit L-NAME, die einen signifikanten Anstieg des Pfortaderdruckes bewirkt.

Da die Datenlage bei AVE 9488 auf eine selektive intrahepatische NO-Zunahme schließen lässt, ist ein Vergleich mit anderen NO-Donoren angebracht. Zu den konventionellen NO-Donoren zählen Nitrate. Nitrate werden in der Sekundärprophylaxe von Varizenblutungen eingesetzt [150]. Portal-hypotensive Effekte werden den Nitraten zugeschrieben, was durch zahlreiche Studien belegt ist [70,93,121]. Als aktivierte metabolisierte Form von Isosorbiddinitrat [2] besitzt Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) potente venöse und milde arterielle dilatatorische Eigenschaften [141]. ISMN wird oral verabreicht komplett resorbiert, es weist keinen First-Pass-Effekt, eine verlängerte Halbwertszeit und eine Dosis-lineare Kinetik auf [2,3,141,143]. Navasa et al. haben eine signifikante dosisabhängige Reduktion des Portaldruckes durch ISMN (Senkung um 10% bei 20mg und um 18% bei 40mg) bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose festgestellt [100]. Bei ISMN wird neben einer Pfortaderdrucksenkung durch eine Dilatation der portokollateralen und intrahepatischen Gefäße [15,50] eine reflektorische Konstriktion durch die systemische Vasodilatation und den Barorezeptorreflex [153] beobachtet. Eine splanchnische Vasokonstriktion mit folglich vermindertem hepatischen Zustrom ist die Folge. Eine Reduktion des hepato-venösen Druckgradienten (HVPG) bei Patienten, die mit ISMN therapiert werden, erfolgt ohne signifikante Änderungen des hepatischen Blutflusses wie auch des portalen Blutflusses, was auf eine Widerstandssenkung im hepatischen Gefäßbett schließen lässt [48]. Diese Widerstandssenkung deutet auf eine intrahepatische dilatatorische Funktion von Nitraten hin. Die Reduktion des HVPG geht mit einer signifikanten Erniedrigung des Herzzeitvolumens aufgrund der erniedrigten Vorlast einher [35]. Der Fluss in der V. azygos ist in dieser Studie dadurch signifikant erniedrigt. Eine andere Studie an Patienten [148] hat gezeigt, dass ISMN

nicht den HVPG vermindert, jedoch eine arterielle systemische Hypotonie verursacht. Bei niedrigen Dosen wird das gleiche Phänomen der arteriellen systemischen Drucksenkung ohne Erniedrigung des HVPG bei Glyceroltrinitrat beobachtet [150]. Glyceroltrinitrat ist mehr als Venodilatator als ein arterieller Dilatator bekannt. Bei höheren Dosen werden sowohl eine arterielle Hypotension wie auch eine Abnahme des Pfortaderdruckes beobachtet. Die systemische Hypotonie mit einer signifikanten Reduktion des MAD tritt bei allen Nitraten auf [90,100,150].

Molsidomin als ein weiterer NO-Donor [32,123,155] wird an Patienten zur Behandlung der portalen Hypertension erprobt. Vorteilhaft gegenüber Glyceroltrinitrat ist der geringere arterielle hypotensive Effekt; jedoch wird hauptsächlich eine splanchnische Vasodilatation provoziert [72,123]. Selbst die intravenöse Applikation des aktiven Metaboliten von Molsidomin vermehrt den portalen Zufluss im Gegensatz zu allen anderen NO-Donoren, die den portalen Zufluss mindern [70,63]. Da ein vermehrter portaler Zufluss die portale Hypertension verstärkt, ist der Vorteil von Molsidomin gegenüber den anderen NO-Donoren eher gering.

Ein Hauptproblem bei der Langzeittherapie mit Nitraten stellt die Toleranzentwicklung dar [1,137]. Eine Toleranzentwicklung durch Nitrate bei Patienten mit kardialen Ischämien ist belegt [137,85]. Diese Studien zeigen eine Frequenz- und Dosisabhängigkeit von ISMN; während bei der kontinuierlichen Verabreichung von 50mg ISMN eine fast komplette Toleranzentwicklung beobachtet werden kann, ist der Effekt bei einer Dosis von 20mg ISMN deutlich geringer. Um die Toleranzentwicklung zu testen, ist der Nitroglycerin-cross-Toleranztest zum Einsatz gekommen [29,144]. Der Test basiert auf der Tatsache, dass Nitroglycerin und ISMN auf gleicher zellulärer Ebene die glatte Gefäßmuskulatur relaxieren [66,101]. Daher kann die Toleranzentwicklung gegenüber ISMN, die durch die Nitroglycerin-Antwort verschleiert wird, quantifiziert werden. Ergebnis dieser Untersuchung ist eine partielle Toleranzentwicklung gegenüber ISMN nach 3-monatiger kontinuierlicher Applikation. Jedoch kann bei der Langzeittherapie mit ISMN eine signifikante Pfortaderdrucksenkung auch nach drei Monaten kontinuierlicher ISMN-Gabe beobachtet werden [48]. Eine weitere Erklärung kann in der kompensatorischen neurohumoralen und hämodynamischen Anpassung liegen, die das Ansprechen auf Nitrate verschleiert [139]. Möglicherweise löst die systemische Hypotension die Aktivierung endogener vasoaktiver Mechanismen mit folglich Konstriktion aus, so dass teilweise die vasodilatatorischen Effekte maskiert werden [127,153].

Trotz der portalen Drucksenkung durch Nitrate entfällt die Option der Monotherapie mit Nitraten aufgrund ihrer systemischen hypotensiven Wirkung und der Toleranzentwicklung. AVE 9488

zeigt gegenüber Nitraten in den entscheidenden Merkmalen erhebliche Vorteile. Eine signifikante Pfortaderdrucksenkung geht mit normotonischen Systemdrücken einher. Die Langzeitwirkung von AVE 9488 wurde nicht untersucht, so dass keine Aussagen zur Toleranzentwicklung gemacht werden können. Ein erniedrigter HVPG, wie er bei der Behandlung mit ISMN gemessen wird, bei gleichzeitig unverändertem portalen Zufluss und unverändertem hepatischen Blutfluss, wird bei AVE 9488 nicht beobachtet. Im Gegensatz zu den Nitraten, die einen verminderten portalen Zufluss herbeiführen, zeigt die Datenlage bei AVE 9488 eher eine Vermehrung des portalen Zuflusses. Ein Grund für die Abnahme des portalen Zuflusses bei Nitraten kann einerseits darin liegen, dass die systemische Hypotonie durch die gleichmäßige Verteilung der erhöhten NO-Verfügbarkeit im gesamten vaskulären System eine reflektorische Konstriktion und Barorezeptoraktivierung bewirkt. Andererseits können die Shuntverbindungen, die bei portaler Hypertension entstehen, die Abnahme des Portalflusses erklären. Bei der portalen Hypertension bedingen der erhöhte intrahepatische Widerstand und der verminderte intrahepatische Fluss [134] eine vorwiegend hyperdynamische splanchnische Zirkulation. Aufgrund der Volumenzunahme im Splanchnikus ist von einer ausgeprägten reflektorischen Konstriktion auszugehen [153], womit die Verminderung des portalen Zuflusses bei Nitratgabe zu erklären wäre [15,100].

Anders verhält es sich mit AVE 9488, das sich nicht homogen im gesamten vaskulären System verteilt, sondern vor allem an den Orten mit erhöhter eNOS-Verfügbarkeit wie der Leber vorhanden ist. eNOS, die zunächst in Endothelzellen nachgewiesen worden ist, ist auch in mesangialen, glialen, neuronalen Zellen und im respiratorischen Epithel vorhanden [159]. In der zirrhotischen Leber kommt eNOS durch die verstärkte Gefäßproliferation in sinusoidalen Endothelzellen [159], die die Mikrozirkulation aufrechterhalten, in portalen und septalen Endothelzellen und in den Gallengängen vermehrt vor. Nur in den Hepatozyten ist keine eNOS zu finden [88]. Wie die Daten unserer Untersuchungen belegen, wird nur in der Leber, nicht jedoch in den systemischen und splanchnischen Gefäßen eine signifikant erhöhte eNOS-Verfügbarkeit durch die Behandlung mit AVE 9488 nachgewiesen. Die Perfusionsdaten zeigen, dass L-NAME, das die NOS blockiert, eine signifikante portale Druckänderung bei mit AVE 9488-behandelten Ratten bewirkt. Die hämodynamischen Ergebnisse zeigen ebenfalls eine portale Drucksenkung durch die Substanz. Die substanzbedingte ausgeprägte portale Drucksenkung kann Auslöser für die Flusszunahme im Splanchnikusgebiet um mehr als 30% zusätzlich zur bestehenden hyperdynamischen splanchnischen Zirkulation sein. Da bei den Nitraten im Gegensatz zu AVE 9488 sowohl die Leberspezifität als auch das Ausmaß der

portalen Drucksenkung fehlen, ist nicht mit einer Zunahme des splanchnischen und portalen Flusses zu rechnen. Die Aufrechterhaltung normotoner Systemdrücke ist möglicherweise durch die selektive Wirkung von AVE 9488 in der Leber zu erklären.

Die Idee eines leberspezifischen NO-Donors ist verschiedentlich aufgegriffen und untersucht worden. Ein Ansatz ist der Gentransfer für die neuronale NO-Synthetase [162]. Die Transfektion von nNOS mit einem rekombinanten Adenovirus als Träger ist bei sinusoidalen Endothelzellen, hepatischen Sternzellen und Hepatozyten vorgenommen worden [162]. Eine signifikante Erniedrigung des intrahepatischen Widerstandes und eine Pfortaderdrucksenkung sind zu verzeichnen. Die neuronale NO-Synthetase hat gegenüber der endothelialen Isoform den Vorteil, dass sie weniger posttranslationalen Modifikationen unterliegt und insofern stabiler ist [162]. Durch einen In-vivo-Gen-Transfer der endothelialen NO-Synthetase [151] wird eine bemerkenswerte Pfortaderdrucksenkung ohne systemischen Effekt erzielt. Das bestätigt die wichtige hämodynamische Rolle von intrahepatischer eNOS in der Pathogenese der portalen Hypertension.

Hepato-selektive Eigenschaften werden dem NO-Donor V-PYRRO/NO [114] zugesprochen. Diese Substanz wird zur Verbesserung der Reperfusion nach Ischämie an transplantierten Schweinelebern erprobt. Eine signifikante Senkung des Pfortaderdruckes wie auch eine Reduktion des hepatischen Gefäßwiderstandes wird durch V-PYRRO/NO erzielt. Für einen möglichen Einsatz der Substanz in der Transplantationsmedizin müssen noch weitere Untersuchungen bezüglich Dosierung und Zeitspanne der Therapie vorgeschaltet werden.

Besonderes Augenmerk fiel in der letzten Zeit auf 2-(Acetyloxy) benzoic acid 3-(nitrooxymethyl) phenyl ester (NCX-1000) [40,41,81], einem selektiven NO-Donor für die Leber, der an Ursodeoxycholsäure (UDCA) gebunden ist. UDCA wird in den Hepatozyten metabolisiert. In präklinischen Studien haben Kurz- und Langzeitapplikationen von NCX-1000 bei Nagern mit chronischen Leberschäden gezeigt, dass es vor einer portalen Hypertonie schützt und die intrahepatische Hyperreaktivität gegenüber α_1 -Adrenozeptoragonisten reduziert [41]. Im Gegensatz zu Nitraten hat NCX-1000 keinen Einfluss auf den MAD, was gegen eine systemische Hypotonie spricht. Als weiterer Vorteil gegenüber Nitraten besitzt es eine Selektivität für die Leber, da UDCA ausschließlich in der Leber metabolisiert wird [40]. In weiteren Studien mit NCX-1000 wurde bei unterschiedlichen Tiermodellen mit CCl_4 [81] und BDL [21,40] die gleiche Dosierung nach vollständiger Zirrhoseentwicklung appliziert. Beide Studien belegen erhöhte cGMP-Werte in Leberhomogenisaten von Ratten, die mit NCX-1000 behandelt wurden [40,81].

Ein wesentlicher Unterschied besteht in der portalen Drucksenkung. Bei den BDL-Ratten konnte eine signifikante Senkung des basalen Pfortaderdruckes nach NCX-1000-Gabe festgestellt werden. Beim CCl₄-Modell blieb der basale Pfortaderdruck nach NCX-1000-Behandlung unverändert. Lediglich ein verminderter portaler Blutfluss wurde registriert [81]. Die Studien zu NCX-1000 zeigen zwar eine Leberselektivität, aber keine eindeutige Senkung des portalen Hypertonus im Sinne einer reversiblen Drucksenkung bei bestehender Zirrhose. Diese Tatsache dämmt den möglichen Einsatz von NCX-1000 als Monotherapeutikum bei Leberzirrhose und portaler Hypertension ein, da die Pfortaderdrucksenkung ausschlaggebendes Kriterium ist. Weitere Studien zu NCX-1000 sind notwendig, in denen unterschiedliche Dosierungen, Zeitpunkte der Applikation und Testung an Patienten mit portaler Hypertension in Betracht gezogen werden müssen [19].

Verglichen mit NCX-1000 hat AVE 9488 zum Teil ähnliche Vorzüge. Gemeinsamkeiten in der Wirkung sind die erwähnte Selektivität für die Leber wie auch die teilweise gleiche Wirkung der Pfortaderdrucksenkung. Der fehlende Einfluss auf den MAD ist ebenfalls ein gemeinsamer Vorteil gegenüber den Nitraten. Eine kritische Auseinandersetzung mit der vermehrten Splanchnikusdurchblutung bei AVE 9488 sollte im Hinblick auf die Nachteile gegenüber den Nitraten vorgenommen werden. Das Herzzeitvolumen steigt nach AVE 9488-Behandlung nicht an. Jedoch ist eine splanchnische Flusszunahme bei unverändertem MAD zu beobachten. Dieses Phänomen der lokalen Flusserhöhung im Splanchnikus scheint keine unmittelbare Wirkung der Substanz zu sein. Das belegt die unveränderte eNOS-Expression auf mRNA- und Proteinebene in den systemischen und splanchnisch-arteriellen Gefäßen bei mit AVE 9488-therapierten Ratten gegenüber zirrhosischen Kontrolltieren. Die splanchnische Flusszunahme muss daher anderweitig verursacht sein. Eine venöse Affinität des eNOS-Transkriptionenhancers gegenüber einer arteriellen kann die Dilatation des venösen splanchnischen Gebietes und der Shuntverbindungen mit anschließender Flusszunahme erklären. Da ein Teil des Blutes durch die Kollateralen die Leber und den hepatischen Metabolismus umgeht und nach wie vor ein erhöhter Pfortaderdruck mit erhöhtem intrahepatischem Widerstand persistiert, kann es zur prähepatischen Anreicherung kommen, die zur splanchnischen Dilatation führt. Die fehlende Zunahme der eNOS-Expression in den systemisch- und splanchnisch-arteriellen Gefäßen kann auch durch den First-Pass-Effekt der Leber erklärt werden. Durch die orale Gabe der Substanz wird das Blut im venösen System zur Leber drainiert, ohne das arterielle System zu passieren. Wird ein Großteil in der Leber metabolisiert, so wird die Gesamtwirkung nach der ersten Leberpassage vermindert.

Die Suche nach einem Monotherapeutikum zur Behandlung der portalen Hypertension ist noch nicht abgeschlossen. Da Nitrate aufgrund ihrer systemischen Nebenwirkungen nicht als Monotherapeutika in Betracht kommen, werden neue Therapiemöglichkeiten wie der Gentransfer der NO-Synthetase und der selektive NO-Donor NCX-1000 entwickelt. In unseren Untersuchungen sind wir einem neuartigen Therapieansatz nachgegangen. Die Verstärkung der eNOS-Transkription mit AVE 9488 ist ein vielversprechender Ansatz, der eine leberspezifische Erhöhung der NO-Verfügbarkeit bewirkt, den portalen Hypertonus senkt und keine systemischen Auswirkungen hat. Daher sollte AVE 9488 als selektivem NO-Donor für die Leber besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

6. Zusammenfassung

NO spielt eine Schlüsselrolle als Vasodilatator bei portaler Hypertension [159]. Konventionelle Therapeutika wirken entweder der erhöhten splanchnischen Durchblutung entgegen oder steigern die NO-Freisetzung in der Leber. Eine systemische Hypotonie durch NO-Donoren ist eine unerwünschte Nebenwirkung. Zur Senkung des portalen Hypertonus haben sich Monotherapien mit nicht-selektiven β -Blockern wie auch die Kombinationstherapie von β -Blocker und Nitrat bewährt [49]. Als neue experimentelle Therapiealternativen werden NOS-Gentransfer-Experimente [132,162], Statine [163] oder der selektive NO-Donor NCX-1000 [40,81] in Erwägung gezogen.

Durch den eNOS-Transkriptionenhancer AVE 9488 zeigen sich in der Real Time PCR auf molekularer Ebene erhöhte eNOS mRNA-Steady-State-Level in der Leber (3,6-fache Zunahme, $p=0,002$). Im Unterschied dazu sind keine Veränderungen in den eNOS mRNA-Steady-State-Level im splanchnischen und systemischen Gefäßsystem festzustellen. Die Immunoblotanalyse zeigt ebenfalls eine vermehrte eNOS-Synthese in der Leber bei nicht erhöhtem eNOS-Protein in den Gefäßen des Splanchnikus und des Systemkreislaufs. Die intrahepatische Phosphorylierung von VASP als indirektem Marker der NOS-Aktivität wird durch AVE 9488 erhöht. Die In-situ-Leberperfusion zeigt eine signifikante Pfortaderdrucksteigerung bei NOS-Blockade durch L-NAME (60% vs. 100%, $p<0,01$). Eine Senkung des Pfortaderdruckes (14,8 +/- 2,9 vs. 19,5 +/- 2,6mmHg, $p<0,01$) bei systemischer Normotonie (102 +/- 20 vs. 105 +/- 21mmHg) und eine intrahepatische Widerstandssenkung (1,91 +/- 0,7 vs. 3,3 +/- 0,8mmHg*min*100g/ml, $p<0,01$) bei der Microsphären-Untersuchung sind hämodynamische Wirkungen von AVE 9488.

Die orale Behandlung von BDL-Ratten mit AVE 9488 bewirkt eine signifikante Erhöhung der NOS-3-mRNA und des Proteins in der Leber. Die effektive Pfortaderdrucksenkung und die Erniedrigung des intrahepatischen und splanchnischen Widerstandes durch eine vermehrte NO-Verfügbarkeit ohne Einfluss auf den systemischen Blutdruck sind erwünschte Therapieziele, die durch den eNOS-Transkriptionenhancer AVE 9488 erreicht werden.

7. Bibliographie

1. Abrams J. *Tolerance to organic nitrates*. *Circulation* 1986; **74**: 1181-1185
2. Abshagen U, Betzien G, Ende R, Kaufmann B. *Pharmacokinetics of intravenous and oral isosorbide - 5 - mononitrate*. *Eur J Clin Pharmacol* 1981; **20**: 269-275
3. Akpan W, Endel R, Neugebauer G, Steudel H. *Pharmacokinetics of Is-5-Mn after oral and intravenous administration in patients with hepatic failure*. In: R.R. Cohn JR, Hrsg. *Mononitrates*. Berlin – Heidelberg: Springer, 1985: 86-91
4. Appleton I, Tomlinson A, Willoughby DA. *Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation*. *Adv Pharmacol* 1996; **35**: 27-78
5. Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth*. *AJP – Cell Physiology* 1994; **267**: C1381-C1388
6. Arroyo V, Jimenez W. *Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem*. *J Hepatol* 2000; **32**: 157-170
7. Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE. *Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured endothelial cells*. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1449-1454
8. 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 CB 1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis*. *Nat Med* 2001; **7**: 827-832
9. Berman RS, Martin PE, Evans WH, Griffith TM. *Relative contributions of NO and gap junctional communication to endothelium-dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary with vessel size*. *Microvasc Res* 2002; **63**: 115-128
10. Berthiaume N, Claing A, Yano M, D'Orleans-Juste P. *Characterization of receptors for endothelins in the guinea pig mesenteric vasculature*. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26**: S317-S319
11. Bhathal PS, Grossman HJ. *Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators*. *J Hepatol* 1985; **1**: 325-337
12. Biecker E, Neef M, Sägeser H, Shaw S, Koshy A, Reichen J. *Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis*. *Liver Int* 2004; **24**: 345-353
13. Bissell MD, Maher JJ. *Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*. In: Boyer TD, Zakim D, Hrsg. *Hepatology*. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2003: 396-409

14. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. *Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol.* Proc Natl Acad Sci U S A 1997; **94**: 10693-10698
15. Blei AT, Gottstein J. *Isosorbide dinitrate in experimental portal hypertension: a study of factors that modulate the hemodynamic response.* Hepatology 1986; **6**: 107-111
16. Blendis L, Wong F. *The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview.* Pharmacol Ther 2001; **89**: 221-231
17. Boo YC, Jo H. *Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases.* Am J Physiol Cell Physiol 2003; **285**: C499-C508
18. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. *Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization.* Free Radic Biol Med 2006; **41**: 144-153
19. Bosch J. *Decreasing hepatic vascular tone by liver-specific NO donors: wishful thinking or a promising reality?* J Hepatol 2003; **39**: 1072-1075
20. Bosch J, Bordas JM, Mastai R, Kravetz D, Navasa M, Chesta J, Pizcueta MP, García-Pagán JC, Rodes J. *Effects of vasopressin on the intravariceal pressure in patients with cirrhosis: comparison with the effects on portal pressure.* Hepatology 1988; **8**: 861-865
21. Bosch J, Enriquez R, Groszmann RJ, Storer EH. *Chronic bile duct ligation in the dog: hemodynamic characterization of a portal hypertensive model.* Hepatology 1983; **3**: 1002-1007
22. Bosch J, García-Pagán JC. *Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension.* J Hepatol 2000; **32**: 141-156
23. Bosch J, Kravetz D, Rodes J. *Effects of somatostatin on hepatic and systemic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver: comparison with vasopressin.* Gastroenterology 1981; **80**: 518-525
24. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.* Nature 1991; **351**: 714-718
25. Buonamico P, Sabba C, García-Tsao G, Berardi E, Antonica C, Ferraioli G, Jensen JE, Lerner E, Taylor KJ, Albano O et al. *Octreotide blunts postprandial splanchnic hyperemia in cirrhotic patients: a double-blind randomized echo-Doppler study.* Hepatology 1995; **21**: 134-139
26. Chojkier M, Groszmann RJ. *Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres.* Am J Physiol 1981; **240**: G371-G375

27. Chu CJ, Lee FY, Wang SS, Chang FJ, Tsai YT, Lin HC, Hou MJ, Wu SL, Tai CC, Lee SD. *Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats: role of substance P and its relationship to nitric oxide*. Scand J Gastroenterol 1997; **32**: 841-846
28. Chung RT, Podolsky DK. *Leberzirrhose und ihre Komplikationen*. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin – Leiben: McGraw Hill/ABW Wissenschaftsverlag, 2003: (2) 2000-2011
29. Dalal JJ, Parker JO. *Nitrate cross-tolerance: effect of sublingual isosorbide dinitrate and nitroglycerin during sustained nitrate therapy*. Am J Cardiol 1984; **54**: 286-288
30. D'Amico GL, Pagliaro L, Bosch J. *The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review*. Hepatology 1995; **22**: 332-354
31. De las Heras D, Fernandez J, Gines P, Cardenas A, Ortega R, Navasa M, Barbera JA, Calahorra B, Guevara M, Bataller R, Jiménez W, Arroyo V, Rodes J. *Increased carbon monoxide production in patients with cirrhosis with and without spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology 2003; **38**: 452-459
32. Desmorat H, Vinel JP, Lahlou O, Pipy B, Badia P, Cales P, Combis JM, Souqual MC, Pascal JP. *Systemic and splanchnic hemodynamic effects of molsidomine in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. Hepatology 1991; **13**: 1181-1184
33. D'Orleans-Juste P, Claing A, Warner TD, Yano M, Telemaque S. *Characterization of receptors for endothelins in the perfused arterial and venous mesenteric vasculatures of the rat*. Br J Pharmacol 1993; **110**: 687-692
34. Escorsell A, Bandi JC, Andreu V, Moitinho E, García-Pagán JC, Bosch J, Rodes J. *Desensitization to the effects of intravenous octreotide in cirrhotic patients with portal hypertension*. Gastroenterology 2001; **120**: 161-169
35. Escorsell A, Feu F, Bordas JM, García-Pagán JC, Luca A, Bosch J, Rodes J. *Effects of isosorbide-5-mononitrate on variceal pressure and systemic and splanchnic haemodynamics in patients with cirrhosis*. J Hepatol 1996; **24**: 423-429
36. Farzaneh-Far R, Moore K. *Nitric oxide and the liver*. Liver 2001; **21**: 161-174
37. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. *N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat*. Hepatology 1998; **28**: 689-694
38. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. *Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells*. J Biol Chem 1996; **271**: 22810-22814
39. Feron O, Michel JB, Sase K, Michel T. *Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions*. Biochemistry 1998; **37**: 193-200

40. Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. *NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver.* J Hepatol 2003; **39**: 932-939
41. Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. *Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status.* Cardiovasc Drug Rev 2004; **22**: 135-146
42. Friedman SL. *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies.* N Engl J Med 1993; **328**: 1828-1835
43. Friedman SL, Bansal MB. *Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy?* Hepatology 2006; **43**: S82-S88
44. García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp 90.* Nature 1998; **392**: 821-824
45. García-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzler JE, Sessa WC. *Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A 1996; **93**: 6448-6453
46. García-Pagán JC, Escorsell A, Feu F, Bandi JC, Moitinho E, Casado M, Bosch J, Rodes J. *Propranolol plus molsidomine vs propranolol alone in the treatment of portal hypertension in patients with cirrhosis.* J Hepatol 1996; **24**: 430-435
47. García-Pagán JC, Feu F, Bosch J, Rodes J. *Propranolol compared with propranolol plus isosorbide-5-mononitrate for portal hypertension in cirrhosis. A randomized controlled study.* Ann Intern Med 1991; **114**: 869-873
48. García-Pagán JC, Feu F, Navasa M, Bru C, Ruiz del Arbol L, Bosch J, Rodes. *Long-term haemodynamic effects of isosorbide 5-mononitrate in patients with cirrhosis and portal hypertension.* J Hepatol 1990; **11**: 189-195
49. García-Tsao G. *Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis.* Gastroenterology 2001; **120**: 726-748
50. García-Tsao G, Groszmann RJ. *Portal hemodynamics during nitroglycerin administration in cirrhotic patients.* Hepatology 1987; **7**: 805-809
51. Genesca J, Gonzales A, Catalan R, Segura R, Martinez M, Esteban R, Groszmann RJ, Guardia J. *Adrenomedullin, a vasodilator peptide implicated in hemodynamic alterations of liver cirrhosis: relationship to nitric oxide.* Dig Dis Sci 1999; **44**: 372-376

52. González-Abraldes J, García-Pagán JC, Bosch J. *Nitric oxide and Portal Hypertension*. *Metab Brain Dis* 2002; **17**: 311-324
53. Gorren AC, Mayer B. *Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis: a novel biological role for pteridines*. *Curr Drug Metab* 2002; **3**: 133-157
54. Greenway CV, Stark RD. *Hepatic vascular bed*. *Physiol Rev* 1971; **51**: 23-65
55. Griffith T. *Endothelium-derived relaxing factor and the control of flow in conduit and resistance arteries*. In: Bevan JA, Rubanyi GM, Hrsg. *Flow-dependant regulation of vascular function*. Oxford: American Physiological Society, 1995: 178-213
56. Groszmann RJ, Blei AT, Atterbury CE. *Portal hypertension*. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, Hrsg. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press Ltd., 1988: 1147-1159
57. Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. *Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4597-4600
58. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. *Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats*. *Hepatology* 1998; **28**: 926-931
59. Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. *Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat*. *Cardiovasc Res* 1995; **29**: 74-79
60. Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. *Increased Urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension*. *J Hepatol* 2002; **37**: 767-772
61. Heller J, Shiozawa T, Trebicka J, Hennenberg M, Schepke M, Neef M, Sauerbruch T. *Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats*. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 1006-1012
62. Heller J, Trebicka J, Shiozawa T, Schepke M, Neef M, Hennenberg M, Sauerbruch T. *Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis*. *Liver Int* 2005; **25**: 657-666
63. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold, 2004
64. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. *Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin I*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 9266-9270
65. Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO, Mameghani A, Schmidt HH. *Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling*. *Mol Pharmacol* 2002; **61**: 312-319

66. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.* J Pharmacol Exp Ther 1981; **218**: 739-749
67. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. *Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; **15**: 1255-1261
68. Iwakiri Y, Groszmann RJ. *The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule.* Hepatology 2006; **43**: S121-S131
69. Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, Sessa WC. *Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; **282**: H2084-H2090
70. Jones AL, Hayes PC. *Organic nitrates in portal hypertension.* Am J Gastroenterol 1994; **89**: 7-14
71. Kilbourn RG, Belloni P. *Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin.* J Natl Cancer Inst 1990; **82**: 772-776
72. Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. *Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part II.* Clin Pharmacokinet 1998; **35**: 9-36
73. Knowles RG, Moncada H. *Nitric oxide synthases in mammals.* Biochem J 1994; **298**: 249-258
74. Kravetz D, Bosch J, Arderiu MT, Pizcueta MP, Casamitjana R, Rivera F, Rodes J. *Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats.* Am J Physiol 1988; **254**: G322-G328
75. Lamontagne D, Pohl U, Busse R. *Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed.* Circ Res 1992; **70**: 123-130
76. Lebrec D, Moreau R. *Pathogenesis of portal hypertension.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; **13**: 309-311
77. Lebrec D, Poynard T, Hillon P, Benhamou JP. *Propranolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a controlled study.* N Engl J Med 1981; **305**: 1371-1374
78. Lee SS, Girod C, Baillon A, Hadengue A, Lebrec D. *Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium.* Am J Physiol 1986; **251**: G176-G180

79. Liu J, García-Cardena G, Sessa WC. *Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization.* Biochemistry 1996; **35**: 13277-13281
80. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. *Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats.* Gastroenterology 1995; **108**: 761-767
81. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. *A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats.* J Hepatol 2003; **39**: 940-946
82. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem 1951; **193**: 265-275
83. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, Moore K. *Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis.* Hepatology 1999; **29**: 1358-1363
84. Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J, García-Pagán JC. *The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis.* Hepatology 2006; **44**: 44-52
85. May DC, Popma JJ, Black WH, Schäfer S, Lee HR, Levine BD, Hillis LD. *In vivo induction and reversal of nitroglycerin tolerance in human coronary arteries.* N Engl J Med 1987; **317**: 805-809
86. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. *Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver.* Am J Physiol 1994; **267**: G416-G422
87. Miyazaki H, Van Eyken P, Roskams T, De Vos R, Desmet VJ. *Transient expression of tenascin in experimentally induced cholestatic fibrosis in rat liver: an immunohistochemical study.* J Hepatol 1993; **19**: 353-366
88. Mohammed NA, Abd El-Aleem S, Appleton I, Maklouf MM, Said M, McMahon RF. *Expression of nitric oxide synthase isoforms in human liver cirrhosis.* J Pathol 2003; **200**: 647-655
89. Moller S, Gulberg V, Henriksen JH, Gerbes AL. *Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics.* J Hepatol 1995; **23**: 135-144
90. Mols P, Halleman R, Melot C, Lejeune P, Naeije R. *Systemic and regional hemodynamic effects of isosorbide dinitrate in patients with liver cirrhosis and portal hypertension.* J Hepatol 1989; **8**: 316-324
91. Moncada S, Higgs A. *The L-arginine-nitric oxide pathway.* N Engl J Med 1993; **329**: 2002-2012

92. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín, P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jiménez W. *Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats*. *Gastroenterology* 2003; **125**: 522-531
93. Moreau R, Lebrec D. *Nitrovasodilators and portal hypertension*. *J Hepatol* 1990; **10**: 263-267
94. Moreau R, Lebrec D. *Endogenous factors involved in the control of arterial tone in cirrhosis*. *J Hepatol* 1995; **22**: 370-376
95. Morita T, Kourembanas S. *Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide*. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2676-2682
96. Mosca P, Lee FY, Kaumann AJ, Groszmann RJ. *Pharmacology of portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of endothelium*. *Am J Physiol* 1992; **263**: G544-G550
97. Musso O, Rehn M, Saarela J, Theret N, Lietard J, Hintikka, Lotrian D, Campion JP, Pihlajaniemi T, Clement B. *Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver*. *Hepatology* 1998; **28**: 98-107
98. Nathan C, Xie QW. *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. *Cell* 1994; **78**: 915-918
99. Nathan CF, Hibbs JB jr. *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. *Curr Opin Immunol* 1991; **3**: 65-70
100. Navasa M., Chesta J, Bosch J, Rodes J. *Reduction of portal pressure by isosorbide-5-mononitrate in patients with cirrhosis. Effects on splanchnic and systemic hemodynamics and liver function*. *Gastroenterology* 1989; **96**: 1110-1118
101. Needlmann P, Corr PB, Johnson EM jr. *Drugs used for the treatment of angina: organic nitrates, calcium Channel blockers and beta adrenergic antagonists*. In: G.L. Goodman A, Rall TW, Murad F, Hrsg. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: MacMillan Publishing Company, 1985: 806-826
102. Niederberger M, Gines P, Tsai P, Martin PY, Morris K, Weigert A, McMurtry I, Schrier RW. *Increased aortic cyclic guanosine monophosphate concentration in experimental cirrhosis in rats: evidence for a role of nitric oxide in the pathogenesis of arterial vasodilation in cirrhosis*. *Hepatology* 1995; **21**: 1625-1631
103. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y. *Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta*. *Circ Res* 2001; **89**: 63-70

104. Oberti F, Sogni P, Cailmail S, Moreau R, Pipy B, Lebrec D. *Role of prostacyclin in hemodynamic alterations in conscious rats with extrahepatic or intrahepatic portal hypertension*. Hepatology 1993; **18**: 621-627
105. Pagliaro L, D'Amico G, Pasta L, Politi F, Vizzini G, Traina M et al. *Portal hypertension in cirrhosis: natural history*. In: Bosch J, Groszmann RJ, Hrsg. *Portal hypertension. Pathophysiology and treatment*. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. 72-92
106. Pateron D, Tazi KA, Sogni P, Heller J, Chagneau C, Poirel O, Philippe M, Moreau R, Lebrec D. *Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension*. Gastroenterology 2000; **119**: 196-200
107. Peterson GL. *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*. Anal Biochem 1979; **100**: 201-220
108. Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. *Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients*. J Clin Invest 1992; **90**: 642-646
109. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. *Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells*. Gastroenterology 1996; **110**: 534-548
110. Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M, Bosch J, Rodes J, Whittle BJ, Moncada S. *Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition*. Gastroenterology 1992; **103**: 1909-1915
111. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. *Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo*. Hypertension 1986; **8**: 37-44
112. Pohl U, Lamontagne D, Bassenge E, Busse R. *Attenuation of coronary autoregulation in the isolated rabbit heart by endothelium derived nitric oxide*. Cardiovasc Res 1994; **28**: 414-419
113. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. *Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase*. J Biol Chem 1992; **267**: 24173-24176
114. Ricciardi R, Foley DP, Quarfort SH, Saavedra JE, Keefer LK, Wheeler SM, Donohue SE, Callery MP, Meyers WC. *V-PYRRO/NO: an hepato-selective nitric oxide donor improves porcine liver hemodynamics and function after ischemia reperfusion*. Transplantation 2001; **71**: 193-198
115. Robinson LJ, Busconi L, Michel T. *Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase*. J Biol Chem 1995; **270**: 995-998
116. Rockey DC. *The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide*. Hepatology 1997; **25**: 2-5

117. Rockey DC. *Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver*. Semin Liver Dis 2001; **21**: 337-349
118. Rockey DC, Bissell DM. *Noninvasive measures of liver fibrosis*. Hepatology 2006; **43**: S113-S120
119. Rockey DC, Chung JJ. *Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension*. Gastroenterology 1998; **114**: 344-351
120. Rockey DC, Weisiger RA. *Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance*. Hepatology 1996; **24**: 233-240
121. Rodriguez-Perez F, Groszmann RJ. *Pharmacologic treatment of portal hypertension*. Gastroenterol Clin North Am 1992; **21**: 15-40
122. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS. *Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity*. J Clin Invest 1994; **93**: 2236-2243
123. Ruiz del Arbol L, García-Pagán JC, Feu F, Pizcueta MP, Bosch J, Rodes J. *Effects of molsidomine, a long acting venous dilator, on portal hypertension. A hemodynamic study in patients with cirrhosis*. J Hepatol 1991; **13**: 179-186
124. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. *Molecular characterization of endothelin receptors*. Trends Pharmacol Sci 1992; **13**: 103-108
125. Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, Smolenski A. *Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta*. Biochem Pharmacol 2003; **65**: 397-405
126. Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000
127. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. *Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis*. Hepatology 1988; **8**: 1151-1157
128. Schwartz JE, Durham BC. *Evaluation of three methods of protein analysis for serum and heart homogenates*. Ann Clin Lab Sci 1979; **9**: 139-143
129. Sessa WC. *The nitric oxide synthase family of proteins*. J Vasc Res 1994; **31**: 131-143

130. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase*. J Biol Chem 1992; **267**: 15274-15276
131. Shah V. *Cellular and molecular basis of portal hypertension*. Clin Liver Dis 2001; **5**: 629-644
132. Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. *Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; **280**: G1209-G1216
133. Shah V, García-Cardena G, Sessa WC, Groszmann RJ. *The hepatic circulation in health and disease: report of a single-topic symposium*. Hepatology 1998; **27**: 279-288
134. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. *Nitric oxide in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology 2004; **126**: 903-913
135. Shah V, Tourner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. *Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat*. Gastroenterology 1999; **117**: 1222-1228
136. Sikuler E, Groszmann RJ. *Interaction of flow and resistance in maintenance of portal hypertension in a rat model*. Am J Physiol 1986; **250**: G205-G212
137. Silber S. *Clinical relevance of nitrate tolerance*. In: R.R. Cohn JR, Hrsg. *Mononitrates*. Berlin: Springer, 1985: 130-146
138. Sitzmann JV, Campbell K, Wu Y, St Clair C. *Prostacyclin production in acute, chronic, and long-term experimental portal hypertension*. Surgery 1994; **115**: 290-294
139. Sponer G, Mierzwa E, Strein K, Müller-Beckmann B. *Activation of counter-regulatory mechanisms on administration of equipotent doses of different types of vasodilators to conscious dogs*. In: R.R. Cohn JR, Hrsg. *Mononitrates*. Berlin: Springer, 1985: 39-44
140. Stephenson K, Harvey SA, Mustafa SB, Eakes AT, Olson MS. *Endothelin association with the cultured rat Kupffer cell: characterization and regulation*. Hepatology 1995; **22**: 896-905
141. Strein K, Voss E., Sponer G, Müller-Beckmann H, Roesch F. *Effects of isosorbide-5-mononitrate on hemodynamic parameters and on regional myocardial ischemia in conscious dogs*. In: R.R. Cohn JR. Hrsg. *Mononitrates*. Berlin - Heidelberg: Springer, 1985: 23-33
142. Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. *Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver*. J Clin Invest 1995; **96**: 2431-2437

143. Taylor T, Chasseaud LF, Major R, Doyle E, Darragh A. *Isosorbide 5-mononitrate pharmacokinetics in humans*. Biopharm Drug Dispos 1981; **2**: 255-263
144. Thadani U, Manyari D, Parker JO, Fung HL. *Tolerance to the circulatory effects of oral isosorbide dinitrate. Rate of development and cross-tolerance to glyceryl trinitrate*. Circulation 1980; **61**: 526-535
145. Theodorakis NG, Wang YN, Skill NJ, Metz MA, Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. *The role of nitric oxide synthase isoforms in extrahepatic portal hypertension: studies in gene-knockout mice*. Gastroenterology 2003; **124**: 1500-1508
146. Trebicka J. *Hämodynamische und renale Wirkung der Angiotensin II Typ 1 Rezeptorblockade bei Ratten mit sekundärer biliärer Zirrhose*. Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn 2005: 32-35
147. Tsai YT, Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. *Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats*. Gastroenterology 2003; **125**: 1452-1461
148. Tsai YT, Lee FY, Lin HC, Chang TT, Lay CS, Wang SS, Kong CW, Lee SD, Lo KJ. *Lack of effects of isosorbide-5-mononitrate on hepatic hemodynamics in HBsAg-positive cirrhosis*. Hepatology 1989; **10**: 283-287
149. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. *Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress*. Am J Physiol 1995; **269**: C1371-C1378
150. Van de Casteele M, Hosli M, Sägesser H, Reichen J. *Intraportal administration of glyceryl trinitrate or nitroprusside exerts more systemic than intrahepatic effects in anaesthetised cirrhotic rats*. J Hepatol 1999; **31**: 300-305
151. Van de Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. *In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats*. Gut 2002; **51**: 440-445
152. Van de Casteele M, Sägesser H, Zimmermann H, Reichen J. *Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow*. Pharmacol Ther 2001; **90**: 35-43
153. Vatner SF, Pagani M, Rutherford JD, Millard RW, Manders WT. *Effects of nitroglycerin on cardiac function and regional blood flow distribution in conscious dogs*. Am J Physiol 1978; **234**: H244-H252
154. Villanueva C, Balanzo J, Novella MT, Soriano G, Sainz S, Torras X, Cusso X, Guarner C, Vilardell F. *Nadolol plus isosorbide mononitrate compared with sclerotherapy for the prevention of variceal rebleeding*. N Engl J Med 1996; **334**: 1624-1629

155. Vinel JP, Monnin JL, Combis JM, Cales P, Desmorat H, Pascal JP. *Hemodynamic evaluation of molsidomine: a vasodilator with antianginal properties in patients with alcoholic cirrhosis*. Hepatology 1990; **11**: 239-242
156. Vorobioff J, Picabea E, Gamen M, Villavicencio R, Bordato R, Bessone F, Tanno H, Palazzi J, Sarano H, Pozzoli L et al. *Propranolol compared with propranolol plus isosorbide dinitrate in portal-hypertensive patients: long-term hemodynamic and renal effects*. Hepatology 1993; **18**: 477-484
157. Wang P, Ba ZF, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. *The pivotal role of adrenomedullin in producing hyperdynamic circulation during the early stage of sepsis*. Arch Surg 1998; **133**: 1298-1304
158. Waterborg JH, Matthews HR. *The Lowry method for protein quantitation*. Methods Mol Biol 1994; **32**: 1-4
159. Wiest R, Cadelina G, Mistien S, McCuskey RS, García-Tsao, Groszmann RJ. *Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats*. Hepatology 2003; **38**: 1508-1515
160. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages*. Science 1992; **256**: 225-228
161. Yanagisawa M. *The endothelin system. A new target for therapeutic intervention*. Circulation 1994; **89**: 1320-1322
162. Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. *Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension*. J Clin Invest 2000; **105**: 741-748
163. Zafra C, Abrales JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, García-Pagán JC, Rodes J, Bosch J. *Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis*. Gastroenterology 2004; **126**: 749-755
164. Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. *Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome*. Gastroenterology 2003; **125**: 1441-1451
165. Zimmermann H, Kurzen P, Klossner W, Renner EL, Marti U. *Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat*. J Hepatol 1996; **25**: 567-573

8. Danksagung

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe portale Hämodynamik bedanken. Die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten hat mir geholfen, die Arbeit gerne zu Ende zu bringen. Auch menschlich habe ich viel dazugelernt und blicke dankbar auf die Zeit meiner Promotion zurück, die eine Zeit der Bereicherung war.

Meinem Betreuer Dr. Dr. Erwin Biecker gilt mein besonderer Dank. Seine fachliche Betreuung und Anleitung wie auch seine Arbeitsdisziplin und Verlässlichkeit waren für mich vorbildhaft. Seine Bereitschaft, Wissen und Kenntnis weiterzugeben, hat mich motiviert und die Begeisterung für die Wissenschaft genährt.

Für die kollegiale Unterstützung von Dr. Jörg Heller, Dr. Jonel Trebicka und Martin Hennenberg danke ich, besonders danke ich Dr. Jonel Trebicka für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Experimenten. Auch ein Wort des Dankes gilt Frau Bammer und Frau Hack für ihre Hilfe.

Von Herzen spreche ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Sauerbruch meinen Dank aus. Er hat mir diese Promotionsarbeit und das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht und die nötigen Mittel großzügig zur Verfügung gestellt. Seine Erfahrung, sein Weitblick, seine Intuition für das Wesentliche und seine Menschlichkeit haben mich fasziniert und sind für mich Vorbild. Vor allem die Begeisterung für die Wissenschaft als Dienst am Menschen habe ich ihm zu verdanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mir die Arbeit ermöglicht und großzügig mitgetragen hat.

Promotionsarbeit

Thema: „Hämodynamische und molekulare Effekte des eNOS Transcriptionsenhancers AVE 9488 bei gesunden Ratten und Ratten mit sekundär biliärer Leberzirrhose“ bei Prof. Dr. T. Sauerbruch an der Uniklinik Bonn

Publikationen

Biecker E, Trebicka J, Kang A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Heller J. *Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension*. Liver Int 2008; **28**: 331-338

Weitere Aktivitäten

Betreuung des Medizinischen Ethikarbeitskreises im Internationalen Studentinnenheim Müngersdorf

Betreuung des Jugendclubs Müngersdorf, ehrenamtliche Bildungsarbeit mit Mädchen - Träger ist der Deutsch-Internationale Kulturverein

2. Preis des Landeswettbewerbes „Schüler experimentieren/Jugend forscht“ im Fachbereich Physik (1994),

12-monatiger Sprach- und Kulturaustausch in Kanada

Sprachen

Deutsch als Muttersprache

Englisch in Schrift und Sprache sehr gut

Spanisch in Schrift und Sprache gut

Grundkenntnisse in Koreanisch und Französisch