

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

# Bedeutung von Cysteinyl-Leukotrienen und Prostanoiden in der Pathogenese der portalen Hypertension durch aktivierte Kupfferzellen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Mark op den Winkel  
aus  
Basel  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Manfred Bilzer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Sommerhoff

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Max Schnurr

Priv. Doz. Dr. Rolf Schauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

*meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Leberzirrhose: Epidemiologische Daten</b>	1
<b>1.2 Folgen und Komplikationen der Leberzirrhose</b>	1
1.2.1 Gastrointestinale Blutungen: Klinische Bedeutung und Risikofaktoren	2
1.2.2 Prävention und Therapie der Ösophagusvarizenblutung	4
<b>1.3 Pathogenese der portalen Hypertension: Etablierte Konzepte</b>	6
1.3.1 Theorie der hyperdynamen Zirkulation	6
1.3.2 Theorie der hepatischen Widerstandserhöhung	6
<b>1.4 Pathogenese der portalen Hypertension: Neue Konzepte</b>	9
1.4.1 Infektionen als Trigger akuter Varizenblutung	9
1.4.2 Infektabwehr durch Lebermakrophagen	10
1.4.3 Kupffer-Zell-Aktivierung durch bakterielle Zellwandbestandteile	12
1.4.4 Portale Hypertension durch aktivierte Kupffer Zellen	14
1.4.5 Rolle der Leukotriene	15
<b>2. Fragestellung</b>	20
<b>3. Material und Methoden</b>	21
<b>3.1 Rattenleber- Perfusion</b>	21
<b>3.2 Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen</b>	22
<b>3.3 Untersuchung vasokonstriktorischer Mechanismen bei der Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen</b>	24
3.3.1 5-Lipooxygenase und Cysteinyl-Leukotriene	24

3.3.2	Einfluss von Cyclooxygenasen und Thromboxan- Synthase auf die Cys-LT Bildung	25
3.3.3	Portale Drucksenkung durch gleichzeitige Hemmung von COX und 5-LPO Wegen	26
<b>3.4</b>	<b>Hämodynamische Effekte des Thromboxanagonisten U-46619 in der Leber: Bedeutung von Leukotrienen</b>	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation nach Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen <i>in vivo</i></b>	<b>29</b>
3.5.1	Chirurgische Präparation und Versuchsprotokoll	29
3.5.2	Intravitalmikroskopie	31
<b>3.6</b>	<b>Bestimmungen</b>	<b>32</b>
3.6.1	Portaler Druck perfundierter Rattenlebern	32
3.6.2	Sinusoidaler Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Efflux	32
3.6.3	Bestimmung von Galle volumen und Gallefluss	33
3.6.4	Bestimmung von Prostanoiden im Leberperfusat	33
3.6.4.1	Bestimmung von Thromboxan B <sub>2</sub> und Prostaglandin D <sub>2</sub> im Leberperfusat	33
3.6.4.2	Bestimmung von Prostaglandin F <sub>2α</sub> im Leberperfusat	33
3.6.5	Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen im Leberperfusat	33
3.6.6	Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen in der Galle	34
<b>3.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>34</b>
<b>3.8</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
3.8.1	Chemikalien	35
3.8.2	Rezeptoragonisten und Antagonisten	35
3.8.3	Enzym- Inhibitoren	35
3.8.4	Gase	36
3.8.5	RIA und ELISA Kits	36
3.8.6	Pufferlösungen	36

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Perfusion unbehandelter Lebern	37
4.2	Portale Hypertension nach Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen durch Zymosan	37
4.3	Hepatische Cys-LT Bildung nach KS Aktivierung	41
4.4	Funktionelle Bedeutung der hepatischen Cys-LT-Bildung nach KS-Aktivierung	43
4.5	Sinusoidale Konstriktion nach KS-Aktivierung in vivo. Kein Einfluss von MK 886	49
4.6	Portaler Druckanstieg nach KS-Aktivierung durch TXA <sub>2</sub>	51
4.7	Vergleich der separaten und gleichzeitigen Hemmung von COX und 5-LPO Wegen	56
4.8	Beeinflussung der Prostanoid-Bildung durch Hemmung des Cys-LT Weges	58
4.9	Beeinflussung der Cys-LT Bildung durch Hemmung von Prostaglandin/Thromboxan-Wegen	61
4.10	Portale Druckerhöhung durch TXA <sub>2</sub> : Ein durch Cys-LT vermittelter Mechanismus	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Portale Hypertension durch $\beta$ -Glucane	69

Inhaltsverzeichnis.....	IV
<b>5.2 Hepatische Cys-LT Produktion nach KS-Aktivierung</b>	<b>71</b>
<b>5.3 Cys-LT vermitteln den portalen Druckanstieg nach KS-Aktivierung</b>	<b>72</b>
5.3.1 Einfluss durch 5-LPO-Hemmung	72
5.3.2 Cys-LT <sub>1</sub> -Rezeptor medierte portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung	74
<b>5.4 IVM: Keine signifikante Konstriktion der Lebersinusoide durch Cys-LT</b>	<b>76</b>
<b>5.5 Keine zusätzliche portale Drucksenkung durch kombinierte Hemmung von Prostanoid- und Cys-LT-Wegen</b>	<b>78</b>
<b>5.6 Vernetzung von Cys-LT und TXA<sub>2</sub> bei der Vermittlung des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung</b>	<b>79</b>
5.6.1 Cys-LT und TXA <sub>2</sub> -vermittelter portaler Druckanstieg nach KS-Aktivierung: Vernetzung auf Rezeptorebene	81
5.6.2 Sequenz der TXA <sub>2</sub> /Cys-LT Vernetzung bei der Vermittlung des portalen Druckanstieges	83
<b>5.7 Übertragbarkeit auf Zirrhosemodelle</b>	<b>84</b>
<b>5.8 Klinische Relevanz und therapeutische Perspektiven</b>	<b>85</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9. Publierte Ergebnisse und Preise</b>	<b>112</b>

Inhaltsverzeichnis..... V

**10. Danksagung** 114

**11. Lebenslauf** 115



## **1. Einleitung**

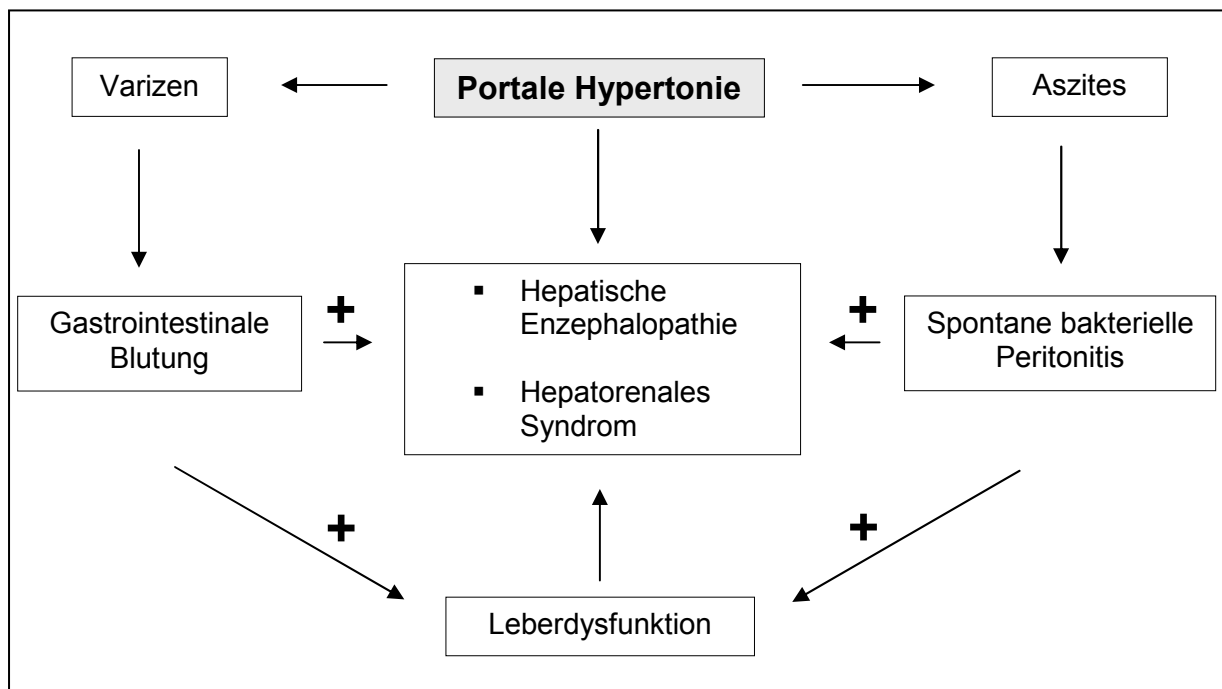
### **1.1 Leberzirrhose: Epidemiologische Daten**

Die Leberzirrhose zeigt in Europa eine Prävalenz von 9,5 %. Sie kommt weltweit vor und findet sich bei allen Rassen, Altersklassen und bei beiden Geschlechtern. In Deutschland leben ca. 400 000 Menschen mit einer Leberzirrhose. Hiervon sterben etwa 25 000 pro Jahr an den Folgen der Erkrankung. Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts ist die Sterblichkeit durch Leberzirrhosen kontinuierlich angestiegen, sodass sie heute an der 9. Stelle der Gesamttodesursachen steht und in einigen Altersgruppen, wie etwa der der 25 - 45jährigen Männer, sogar die führende Todesursache darstellt. Eine weitere Entwicklung lässt sich an der Tatsache ablesen, dass zunehmend jüngere Menschen (25-30 Jahre) betroffen sind und dass, etwa in der Gruppe der 20-40jährigen, die Mortalität der Leberzirrhose die der ischämischen Herzerkrankungen übersteigt. Durch Arbeitsunfähigkeit, Arbeitsausfall und Frühberentung sowie den hohen medizinischen Aufwand für die Behandlung der Leberzirrhose erklären sich die immensen jährlichen Belastungen für die Volkswirtschaft von 4 Milliarden Euro. Die im Rahmen der Zirrhose auftretenden Komplikationen sind es letztendlich, die diesen volkswirtschaftlichen Schaden und vor allem auch die hohe Letalität bedingen.

### **1.2 Folgen und Komplikationen der Leberzirrhose**

Prognoseentscheidend bei der Leberzirrhose sind deren Komplikationen (Abb.1). Hier stehen neben metabolischen Störungen, der Leberinsuffizienz, Infektionen und dem hepatozellulären Karzinom vor allem die begleitende portale Hypertension im Vordergrund. Die portale Hypertension als beinahe unvermeidliche Komplikation der Leberzirrhose ist vor allem für die besonders gefährlichen Komplikationen verantwortlich. Zu diesen gehören unter anderem das hepatorenale Syndrom, die Ausbildung von Aszites sowie die hepatische Enzephalopathie. Eine besonders gefürchtete Komplikation der portalen Hypertension ist die gastrointestinale Blutung, vornehmlich aus Ösophagus- oder Magenfundusvarizen. Als Folge dieser Blutungsereignisse mit Schocksymptomatik kommt es meistens zur Aggravierung weiterer Komplikationen der portalen Hypertension, wie der hepatischen Enzephalopathie und des hepatorenalen Syndroms oder zu einer Verschlechterung

der zugrunde liegenden Leberdysfunktion. Dies zeigt eindrucksvoll die möglichen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komplikationen der portalen Hypertonie (Abb. 1). Da die gastrointestinale Blutung auf so vielfältige Weise die anderen Komplikationen beeinflussen kann, soll sie im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.



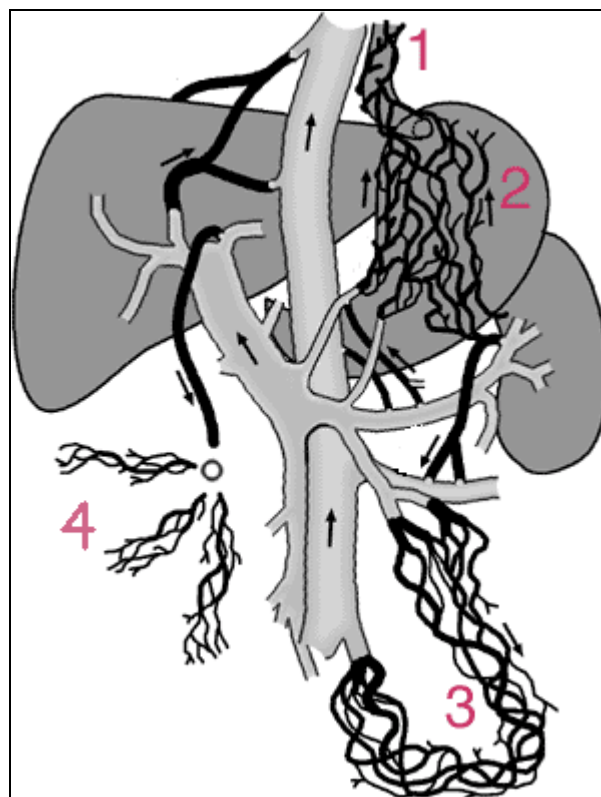
**Abb. 1: Komplikationen der portalen Hypertonie bei Leberzirrhose. Detaillierte Beschreibung im Text.**

### 1.2.1 Gastrointestinale Blutungen: Klinische Bedeutung und Risikofaktoren

Neben den Ösophagus- und Fundusvarizen, den häufigsten Lokalisationen von gastrointestinalen Blutungen im Rahmen einer portalen Hypertonie, sind u.a. auch in der hypertensiven Gastropathie, ektopen Varizen, rektalen Varizen („Hämorrhoiden“) und dem Mallory -Weiss Syndrom potenzielle Blutungsquellen zu sehen (Abb. 2). Da jedoch erstgenannte die häufigsten und oft dramatischsten Blutungen darstellen, soll auf sie im Folgenden näher eingegangen werden.

Ösophagusvarizen entwickeln sich auf dem Boden eines erhöhten Pfortaderdrucks. Mit der Ausbildung von portokavalen Anastomosen zur Umgehung des Lebergefäßbettes bilden sich unter anderem im Ösophagus Varizen aus, die an Größe zunehmen und ab einem bestimmten Durchmesser ein stark erhöhtes Rupturrisiko aufweisen (Dell’era A und Bosch J, 2004). Endoskopisch verraten sich Varizen-

bereiche mit bereits kritisch erhöhter Wandspannung durch das Auftreten sogenannter *red colour signs* (Polio J und Groszmann J, 1986). Reißt die Varizenwand, so hat ein Überschreiten der kritischen Wandspannung stattgefunden („breaking point“). Die Ruptur wird dabei vermutlich durch eine weitere Zunahme des ohnehin bereits erhöhten portalen Drucks getriggert (Ready JB *et al.*, 1991). Die Gründe für den akuten Anstieg des Druckes sollen, so nahm man bislang an, in einer Erhöhung des intraabdominellen oder intrathorakalen Drucks liegen. Dies ist etwa durch Betätigung der Bauchpresse, durch Valsalva-Manöver oder Hustenstöße vorstellbar (De Franchis R *et al.*, 2005).



**Abb. 2: Portosystemische Umgehungskreisläufe.** Infolge der Leberzirrhose kommt es zur Druckerhöhung im Pfortadergebiet. Zur Entlastung werden vorbestehende Kollateralen ausgeweitet; zu den wichtigsten Kollateralkreisläufen gehören die Oesophagus- und Fundusvarizen (1,2) (via V. coronaria und V. lienalis über den Oesophagusplexus in die V. cava superior und V. azygos), rektale Varizen (3) (über V. mesenterica inferior in die V. cava inferior) und das Caput Medusae (4) (Rekanalisation der V. umbilicalis, Drainage über die Vv. epigastricae in V. cava superior und inferior).

Ein diesbezüglich neues Konzept stellt die durch Infektionen getriggerte Pfortaderdruckerhöhung dar (Goulis *et al.*, 1999), auf die an anderer Stelle noch ausführlicher eingegangen wird.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit Leberzirrhose Ösophagus- oder Fundusvarizen entwickelt, liegt bei mindestens 80% (de Franchis R *und* Primignani M, 2001). Kommt es zur Blutung, so beträgt deren Letalität je nach Stadium der zugrundeliegenden Leberzirrhose zwischen 10% und 50 % (De Franchis R *und* Primignani M, 2001). Je ausgeprägter die Verminderung der Gerinnungsfaktoren, die Thrombozytopenie und Thrombozytopathie, desto höher ist die Letalität der Varizenblutung. Wird die Erstblutung überlebt, so kommt es ohne Rezidivprophylaxe in 70% der Fälle zu einer Rezidivblutung, deren Letalität dann 25% bis 50% beträgt.

### 1.2.2 Prävention und Therapie der Ösophagus-Varizenblutung

	<b>Verfahren</b>	<b>Risikoreduktion...</b>	<b>Studie</b>
<b>Primärprophylaxe</b>	Propranolol	...einer Blutung von 25% auf 15%.	D'Amico G <i>et al.</i> , 1995
<b>Sekundärprophylaxe</b>	Propranolol	...einer Rezidivblutung von 63% auf 42%. ...der Mortalität von 27% auf 20%.	D'Amico G <i>et al.</i> , 1999

**Tabelle 1: Medikamentöse Primär- und Sekundärprophylaxe der Ösophagus-Varizenblutung. Detaillierte Beschreibung im Text.**

Bei der Prophylaxe einer Varizenerstblutung (sog. *Primärblutungsprophylaxe*) kann mittels nichtselektiver Betablocker (z.B. Propranolol) eine Reduktion des Blutungsrisikos um 10% erreicht werden (Tab. 1). Dies ergab eine Metaanalyse von zwölf Studien, deren mittleres Follow-up 24 Monate betrug (D'Amico G *et al.*, 1995). Die Verminderung des Blutflusses über die Pfortader wird durch eine Senkung der Herzfrequenz erreicht. Isosorbidmononitrat (ISMN) wird als Alternative nicht mehr empfohlen (De Franchis R *et al.*, 2005). 63% der nach einer Erstblutung unbehandelt gebliebenen Patienten erleiden innerhalb von 1-2 Jahren eine Rezidivblutung. Die

Mortalität beträgt dann 27% (D'Amico G *et al.*, 1997). Diese Daten liefern die Begründung für die Empfehlung, alle Patienten die eine Blutung überlebt haben, zu behandeln. Bezüglich dieser *Rezidivprophylaxe* (Sekundärprophylaxe) sind bisherige Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Die medikamentöse Behandlung mit Propranolol erbrachte laut einer Metaanalyse von D'Amico (D' Amico G *et al.*, 1999) eine Verminderung des Rezidivblutungsrisikos wodurch sich auch die Mortalitätsrate senken ließ (Tab. 1). Der medikamentösen Rezidivblutungsprophylaxe steht die endoskopische mittels Gummibandligatur gegenüber. Während eine Studie bessere Ergebnisse mit der Gummibandligatur ergab (Lo GH *et al.*, 2002), berichteten zwei weitere von jeweils gleichen (Patch D *et al.*, 2002) bzw. schlechteren (Villanueva C *et al.*, 2001) Ergebnissen im Vergleich zu Propranolol. Keine dieser drei Studien konnte einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsarten bezüglich des Überlebens feststellen.

Unmittelbar nach einer akuten Varizenblutung erfolgt ferner eine Sekundärprophylaxe der frühen Rezidivblutung durch eine antibiotische Therapie (z.B. mit Chinolonen oder Cephalosporinen der dritten Generation). Hierdurch kann eine Verbesserung der Überlebenschancen in der akuten Blutungsepisode erreicht werden (Bernard B *et al.*, 1999). Dies ist vermutlich durch die Behandlung der oft begleitend auftretenden bakteriellen Infektionen als wahrscheinliche Auslöser einer frühen Rezidivblutung erklärbar. Als Salvage- Therapie bei Versagen der oben erwähnten Methoden, kommt die Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS) in Frage. Eine weitere Senkung der Rezidivblutungsrate kann aber auch hiermit nicht erreicht werden (Gülberg V *et al.*, 2002). Gleich welche der genannten Methoden sich letztendlich als überlegen erweisen mag, verdeutlichen die immer noch hohen Rezidivblutungsraten von 30%-50% innerhalb von 2 Jahren bei den verschiedenen Methoden (Groszmann RJ *und* Garcia-Tsao G, 2002), dass die optimale Prophylaxe (noch) nicht existiert.

Die zurzeit existierenden Verfahren zur Primär- und Sekundärprophylaxe der Varizenblutung bei bestehender portaler Hypertonie zeigen lediglich bei etwa der Hälfte der Patienten Erfolg. Daraus ergibt sich der dringende Bedarf an neuen Therapieansätzen. Deren Entwicklung erfordert jedoch ein besseres Verständnis der Pathogenese der portalen Hypertonie und der Faktoren, die eine Varizenblutung auslösen.

### **1.3 Pathogenese der portalen Hypertension: Etablierte Konzepte**

#### **1.3.1 Theorie der hyperdynamen Zirkulation**

Im Rahmen einer Leberzirrhose kann es neben der pathogenetisch entscheidenden intrahepatischen Gefäßwiderstandszunahme zusätzlich zu einer Steigerung der splanchnischen Durchblutung kommen. Hierdurch wird über eine Zunahme des portalen Blutflusses der portale Druck weiter erhöht. Hierfür ist bei Leberzirrhose die sogenannte hyperdynamische Zirkulation mit erhöhtem Herzzeitvolumen und einer gleichzeitigen Erniedrigung des systemarteriellen Widerstandes (Blendis L *et al.*, 2001) verantwortlich. Dieser Pathomechanismus liefert die Rationale für den Einsatz von Betablockern. Über eine Senkung der Herzfrequenz kann hierdurch eine Verminderung des portalen Blutflusses erreicht werden. Der hyperdynamische Kreislaufzustand soll zum einen durch eine Sympathikusaktivierung, zum anderen durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Endotoxine, Stickstoffmonoxid und auch Glukagon, mitbedingt sein (Blendis L *et al.*, 2001).

#### **1.3.2 Theorie der hepatischen Widerstandserhöhung**

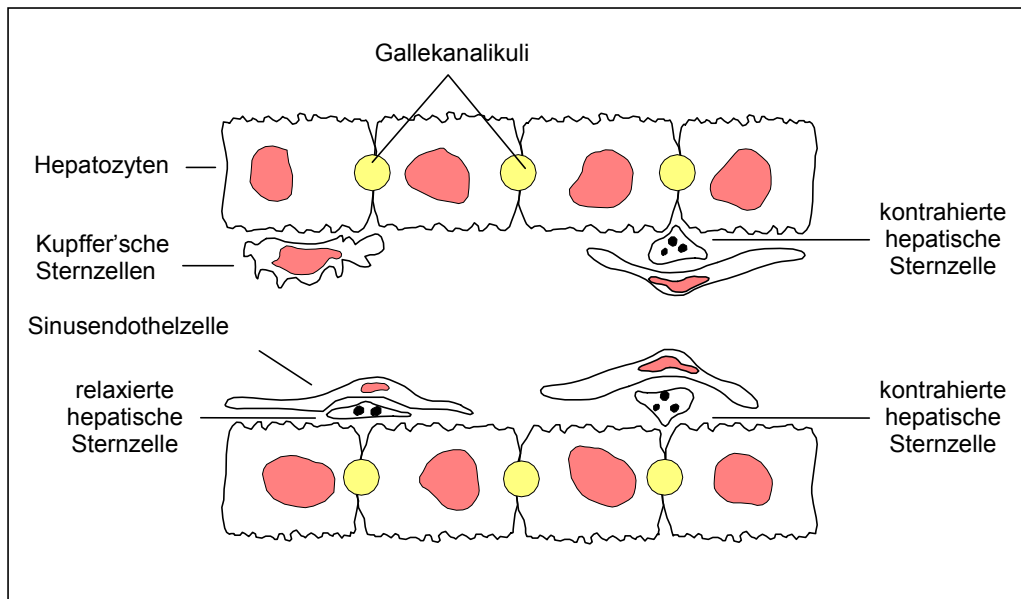
Den wesentlichen pathogenetischen Beitrag zur portalen Hypertonie liefert nach allgemeiner Auffassung die Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes. (Bosch J *et al.*, 2003). Der Druck in der Pfortaderstrombahn beträgt physiologischerweise 3-6 mm Hg. Übersteigt der Druck den oberen Grenzwert liegt definitionsgemäß eine portale Hypertension vor. Der Zusammenhang zwischen Leberdruck ( $dp$ ), portaler Leberdurchblutung ( $Q$ ) und intrahepatischem Gefäßwiderstand  $R$  wird in der Leber wie auch in anderen physikalischen und biologischen Systemen durch das *Ohmsche Gesetz* definiert:

$$dp = Q \times R$$

Der Druckabfall bei der Passage des Blutes durch die Leber ist somit direkt proportional sowohl zur portalen Leberdurchblutung als auch zum Gefäßwiderstand. Der Gefäßwiderstand wiederum hängt nach dem *Hagen-Poiseuilleschen Gesetz* von der Viskosität ( $\eta$ ) des Blutes sowie von der Länge (L) und dem Radius (r) des Gefäßes ab:

$$R = \frac{8 \times \eta \times L}{\pi \times r^4}$$

Der hepatische Gefäßwiderstand in der Leberstrombahn wird also wesentlich vom Radius der zu- und abführenden Lebergefäße bestimmt. Hierzu zählt zunächst die Pfortader, deren partielle oder vollständige Thrombosierung nicht selten für eine Zunahme der portalen Hypertonie bei Patienten mit Leberzirrhose verantwortlich ist. Auf mikrovaskulärer Ebene sind präsinusoidale Venolen, die Sinusoide und postsinusoidale Venolen als mögliche Orte einer Widerstandserhöhung anzusehen. Traditionell hielt man die Widerstandserhöhung bei Leberzirrhose für eine rein mechanische Konsequenz der veränderten mikrovaskulären Strombahn als Folge der Fibrogenese. Neue Konzepte gehen dagegen davon aus, dass vor allem *vasokonstriktorische Mechanismen* in der sinusoidalen Strombahn im Sinne einer dynamischen Komponente entscheidend an der Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes beteiligt sind. Postuliert wurde ein komplexes Netzwerk verschiedener Pathomechanismen mit der Folge einer Imbalance vasodilatatorischer und vasokonstriktorischer Mechanismen zugunsten letzterer (Goulis J *et al.*, 1999; Graupera M *et al.*, 2002). Das Konzept der intrahepatischen Widerstandserhöhung durch konstriktorische Mechanismen in der sinusoidalen Strombahn wurde erst in den letzten Jahren entwickelt. Eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Fähigkeit der Sinusoide zur Kontraktion ist die Erkenntnis, dass neben Hepatozyten auch non-parenchymale Zellen am Aufbau der sinusoidalen Strombahn beteiligt sind (Abb. 3).



**Abb. 3: Anatomie der Lebersinusoide** (modifiziert nach Decker K, 1990).  
 Detaillierte Beschreibung im Text.

Zu den non-parenchymalen Leberzellen zählen Sinusendothelzellen, hepatische Sternzellen (früher Ito-Zellen) und Kupffer'sche Sternzellen (KS), die residenten Makrophagen der Leber. Die hepatischen Sternzellen (HS) besitzen als einzige Zellen der Leber die Fähigkeit zur Kontraktion. Dies liegt einerseits an ihrer Ausstattung mit kontraktile Myosinfilamenten und andererseits an der Expression verschiedener Rezeptoren, deren Aktivierung eine Kontraktion der HS zur Folge hat. Durch die Kontraktion kommt es zu einer kugeligen Verformung der HS mit Vorwölbung der Sinusendothelzellen in den sinusoidalen Raum. Dies bedingt eine Abnahme des sinusoidalen Durchmessers (Reynaert H *et al.*, 2002). Nachgewiesen wurde bislang die Kontraktion der HS durch Eicosanoide (Kawada N *et al.*, 1992) und Endotheline (Kawada N *et al.*, 1993). Relaxierend wirken dagegen Stickstoffmonoxid (NO) (Kawada N *et al.*, 1993) und Kohlenmonoxid (CO) (Suematsu M *et al.*, 1995). Ferner wird zunehmend deutlich, dass praktisch alle Zellen der Leber an der Pathogenese der portalen Hypertonie entweder durch Bildung oder Abbau von Vasokonstriktoren oder Vasodilatoren beteiligt sein können (Lemberg A *et al.*, 1998; Schieferdecker HL *et al.*, 1999; Titos E *et al.*, 2000). Von wesentlicher Bedeutung erscheint letztlich eine Imbalance von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren.



## **1.4 Pathogenese der portalen Hypertension: Neue Konzepte**

### **1.4.1 Infektionen als Trigger akuter Varizenblutungen**

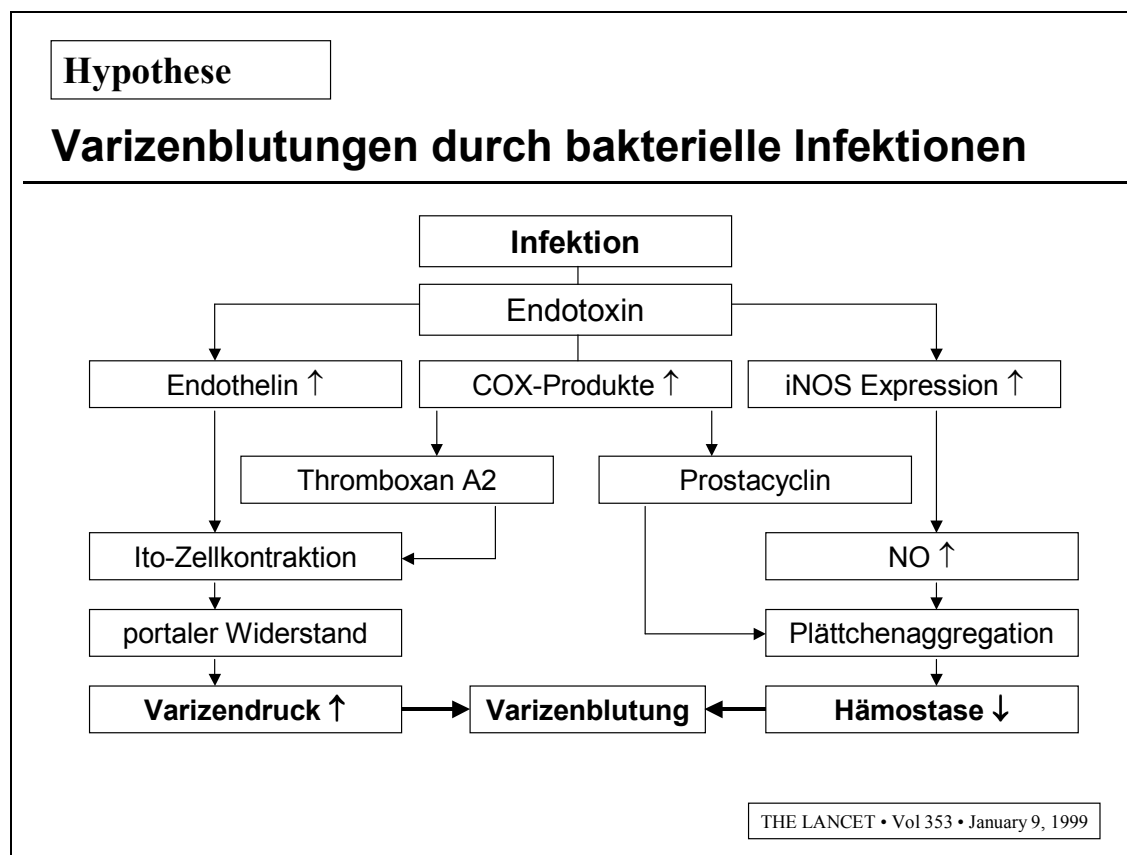
Endotoxin ist die Lipopolysaccharid (LPS) -komponente der äußeren Wand der Gram-negativen Bakterien. Bei Patienten mit Leberzirrhose finden sich häufig erhöhte Endotoxinkonzentrationen in der portalen und auch systemischen Zirkulation (Fukui H *et al.*, 1994). Hierfür verantwortlich ist die portale Hypertonie, durch die der venöse Blutabfluss aus Dünn- und Dickdarm erheblich beeinträchtigt wird. Hierdurch entstehen Permeabilitätsstörungen der Darmschleimhaut sowie Motilitätsstörungen mit der Folge einer vermehrten Einschwemmung von Bakterien und Endotoxinen in die portale Zirkulation (*Translokation*) (Bauer TM *et al.*, 2002; Gunnarsdottir SA *et al.*, 2003). Zusätzlich besteht bei Patienten mit Leberzirrhose eine erheblich verminderte Infektabwehr, für die u.a. eine Störung der Granulozytenfunktion verantwortlich ist (Rajkovic IA *und* Williams R, 1986). Besonders häufig auftretende Infekte, wie z.B. eine spontane bakterielle Peritonitis, können ebenfalls mit einer ausgeprägten Endotoxinämie einhergehen bzw. eine vorbestehende Endotoxinämie verstärken. Interessant ist deshalb, dass bei bis zu 66% der Patienten mit einer akuten Ösophagusvarizenblutung bereits vor der Blutung eine bakterielle Infektion bestand (Soriano G *et al.*, 1992; Bernard B *et al.*, 1995 und 1999).

Ferner erhöhen bakterielle Infektionen das Risiko einer frühen Rezidivblutung (Goulis J *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen lieferten zum einen die rationale Basis für den Einsatz von Antibiotika bei Patienten mit Varizenblutungen. Zum anderen führten sie zu der Hypothese einer durch Endotoxin ausgelösten Drucksteigerung im Pfortadersystem als bisher kaum beachteter Trigger akuter Varizenblutungen (Goulis J *et al.*, 1999) (Abb. 4).

Der Mechanismus der durch Endotoxine vermittelten Erhöhung des Pfortaderdruckes ist noch weitgehend unbekannt. Tierexperimentell wurde eine Zunahme der hyperdynamen Zirkulation bei Ratten mit Leberzirrhose nachgewiesen. Des Weiteren wurde eine Zunahme der Plasmaspiegel verschiedener Vasokonstriktoren wie zum Beispiel Thromboxan A<sub>2</sub> und Endothelin-1 (Goulis J *et al.*, 1999) beschrieben. Nach der Hypothese von Goulis kommt es im Rahmen von Infektionen mit gramnegativen Bakterien bei Zirrhosepatienten zu einem weiteren Anstieg des portalen Druckes aufgrund einer durch Endotoxine stimulierten Produktion von Vasokonstriktoren (Abb. 4). Die hierdurch bewirkte Kontraktion der hepatischen Sternzellen bedingt eine weitere Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes. Zusätzlich könnte eine

durch Endotoxine gesteigerte NO- und Prostacyclin-Bildung die meist gestörte Plättchenaggregation mit Aggravierung einer Blutung erklären.

Da bei Patienten mit Varizenblutungen lediglich 50% aller bakteriellen Infektionen durch gramnegative Bakterien hervorgerufen werden (Bernard B *et al.*, 1999), ist anzunehmen, das neben Endotoxinen weitere Trigger bakteriellen Ursprungs existieren. Die Suche nach einem geeigneten Konzept führte schliesslich zur Untersuchung residenter Lebermakrophagen (Kupffer Zellen) und ihrer Aktivierung durch Endotoxine und andere bakterielle Zellwandbestandteile wie z.B. die in Gram-positiven und Gram-negativen Erregern nachweisbaren  $\beta$ -Glucane.

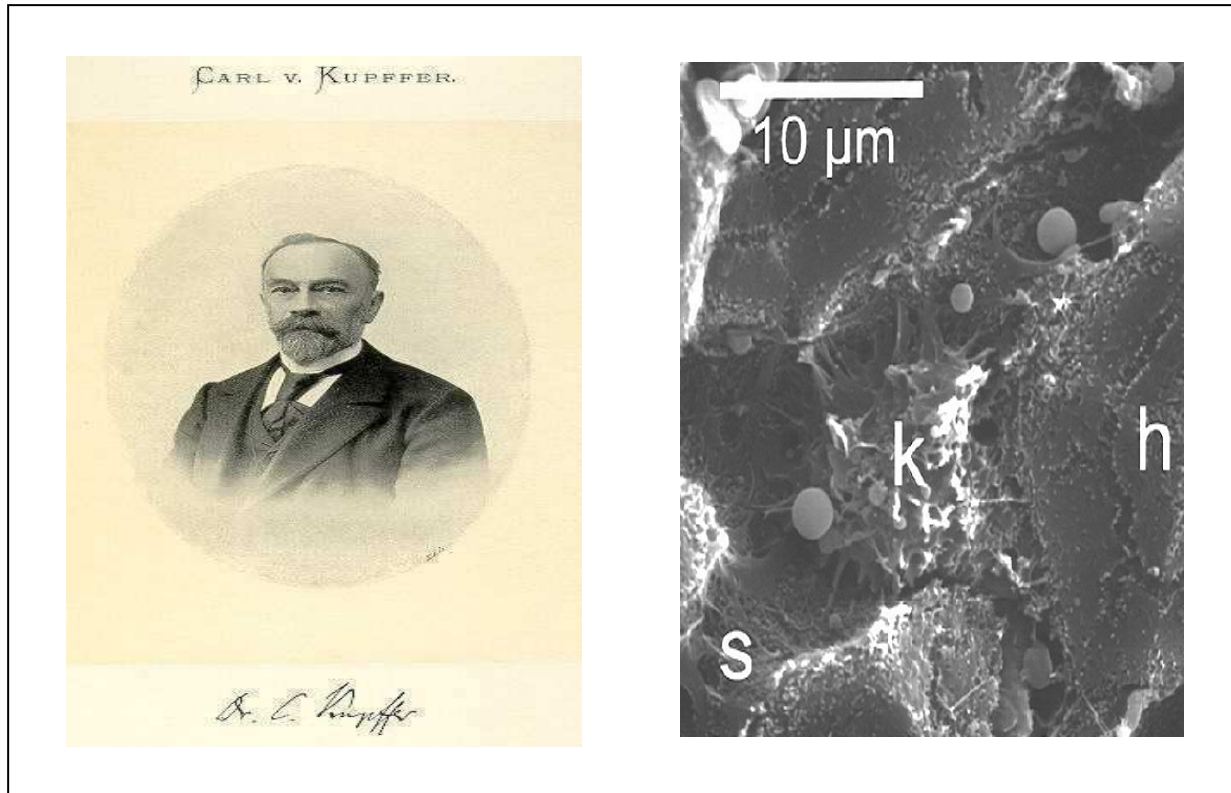


**Abb. 4: Hypothese zur Entstehung von Varizenblutungen durch bakterielle Infektionen** (nach Goulis J, 1999). Detaillierte Beschreibung im Text.

#### 1.4.2 Infektabwehr durch Lebermakrophagen

Ausgangspunkt der Untersuchung der Rolle der Kupffer'sche Sternzellen (synonym Kupffer-Zellen) in der Endotoxin-vermittelten portalen Druckerhöhung war die Beobachtung, dass diese Leberzellen für die Elimination von Endotoxinen

verantwortlich sind (Spolarics Z *et al.*, 1996). KS sind zwischen den Sinusendothelzellen lokalisiert und ragen weiter in das Lumen vor (Abb. 3 und Abb. 5). Durch ihre Fortsätze schaffen sie eine Kommunikation mit den Sinusendothelzellen und den Hepatozyten.



**Abb. 5: Carl von Kupffer und ein elektronenmikroskopisches Bild einer Kupffer Zelle aus einer Rattenleber.** Wegen ihres Aussehens bei Aktivierung (k), hat Carl von Kupffer die Lebermakrophagen Sternzellen genannt. Geläufiger ist seitdem jedoch die Bezeichnung Kupffer Zellen. s, Sinusoid; h, Hepatozyt. Abbildungen aus Clendening History of Medicine Library (<http://clendening.kumc.edu>) und aus Lemasters *et al.*, 1997.

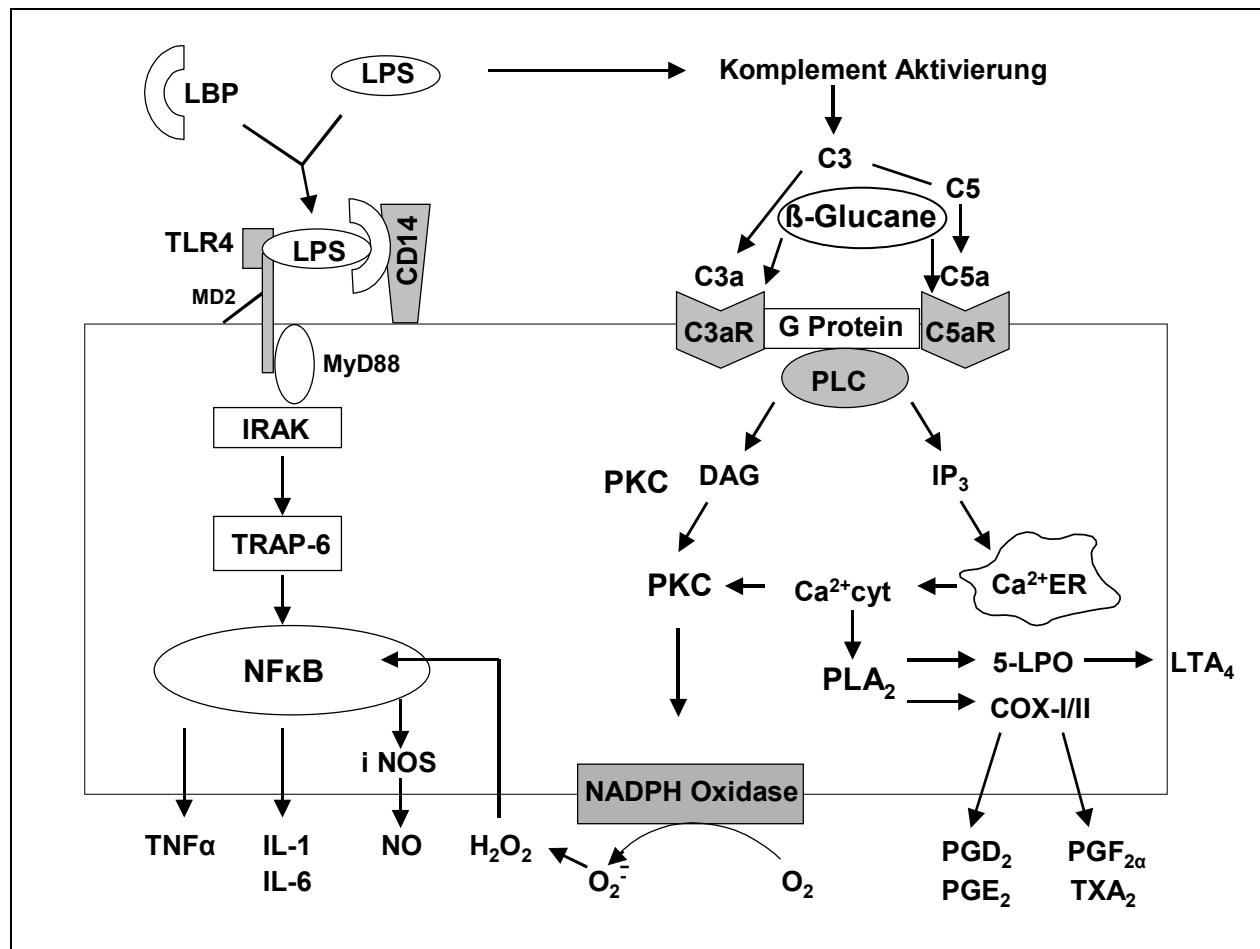
Auf Grund ihrer Morphologie und Funktion gehören die Kupffer'schen Sternzellen zum mononukleären Phagozytosesystem. Dabei machen sie 80-90% der im Körper vorhandenen Makrophagen aus (Klein A *et al.*, 1994). Sie stellen die erste Makrophagenpopulation dar, die mit Bakterien, bakteriellen Endotoxinen und weiteren bakteriellen Bestandteilen aus dem gastrointestinalen Trakt in Kontakt kommt (Fox ES *et al.*, 1987). Die rasche Entfernung der Bakterien (-bestandteile)

wurde lange Zeit den KS alleine zugeschrieben (Klein A *et al.*, 1994). Neue experimentelle Erkenntnisse zeigen jedoch die komplexe Kooperation von KS und Neutrophilen Granulozyten (Suematsu M *et al.*, 2000; Kappas A *et al.*, 2004 ; Ryter SW *et al.*, 2006). Die meisten der in der Leber ankommenden Mikroorganismen adhären in einem ersten Schritt an KS (Ofek I *et al.*, 1988; Shimazu R *et al.*, 1999; Akira S *et al.*, 2001; Gregory SH *et al.*, 2002). Anschliessend vermitteln komplementäre Adhäsionsmoleküle (z.B. CD11b/CD18 und CD 54) die Anheftung der Neutrophilen Granulozyten an KS (Perry A *et al.*, 1984; Van Oosten M *et al.*, 1995). Dann werden die an KS gebundenen Mikroorganismen durch Granulozyten phagozytiert. Im letzten Schritt erfolgt die Terminierung der Entzündung durch Phagozytose der neutrophilen Granulozyten durch KS (Shi J *et al.*, 1996; Brown KE *et al.*, 2001).

### **1.4.3 Kupffer-Zell-Aktivierung durch bakterielle Zellwandbestandteile**

Sowohl phagozytische als auch lösliche Substanzen sind in der Lage KS zu aktivieren. Die wichtigsten KS-Aktivatoren sind die Komplement-Faktoren C3a und C5a (Schieferdecker HL *et al.*, 1999 und 2001),  $\beta$ -Glucane von Bakterien und Pilzen (Thornton BP *et al.*, 1996) sowie die Endotoxine der Gram-negativen Erreger (Decker K *et al.*, 1990; Su GL *et al.*, 2002; Fabrick BO *et al.*, 2005).

Die mit der Adhäsion von Mikroorganismen einhergehende Aktivierung der KS erfolgt durch eine komplexe Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren. Bekannt ist die direkte Aktivierung des Toll-like 4 Rezeptors durch LPS (Su GL *et al.*, 2002), wodurch vor allem die NF $\kappa$ B- abhängige Transkription proinflammatorischer Gene induziert wird (Abb.6). Darüber hinaus ist eine indirekte Aktivierung der KS durch Endotoxin bekannt. Hierbei ist die Aktivierung von Komplement durch Endotoxin mit nachfolgender Bildung der Komplementfaktoren C3a und C5a beteiligt (Jaeschke H *et al.*, 1994). Beide Faktoren sind ausgesprochen starke KS-Aktivatoren, deren Wirkung auf der Stimulation G-Protein-gekoppelter C3a und C5a-Rezeptoren beruht (Ember JA *et al.*, 1997, Schieferdecker HL *et al.*, 1999 und 2001). Die hierdurch aktivierte Phospholipase C führt über die Bildung von Inositol-3-Phosphat zur Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>- Konzentration, wodurch im nächsten Schritt die Phospholipase A<sub>2</sub> stimuliert wird (Decker K *et al.*, 1990). Die dabei gebildete Arachidonsäure steht dann für die Bildung von Eikosanoiden zur Verfügung. Durch die PKC- vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es ferner zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS).



**Abb. 6: Molekulare Mechanismen der Kupfer Zell Aktivierung.** C3 und C5, Komplement Faktoren 3 und 5; C3a und C5a, aktivierte Komplement Faktoren 3 und 5; CD14, CD 14 Rezeptor; DAG, Diacylglycerol; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Wasserstoff Peroxid; iNOS, induzierbare NO- Synthase; IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6; IP<sub>3</sub>, Inositol-3-Phosphat; IRAK, Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; LPB, LPS-Bindungs Protein; LPS, Lipopolysaccharid; NF<sub>κ</sub>B, Nukleärer Faktor<sub>κ</sub>B; PKC, Protein Kinase C; PLA<sub>2</sub>, Phospholipase A<sub>2</sub>; PLC, Phospholipase C; TLR4, Toll-like Rezeptor 4; TNFα, Tumor Nekrose Faktor α; TRAF-6, TNF aktivierter Faktor 6.

Der Komplement-Rezeptor-abhängige Weg der KS Aktivierung kann darüber hinaus durch die β-Glucane der Zellwände von Mikroorganismen aktiviert werden (Thornton BP *et al.*, 1996). Ein klassischer und in Tierexperimenten häufig verwendeter KS-Aktivator ist Zymosan, eine β-Glucan-reiche Zellwandfraktion der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Untersuchungen an kultivierten KS zeigten eine massive Zunahme der Eikosanoid-Bildung durch Zymosan (Decker K *et al.*, 1990). Vermehrt gebildet

werden hierbei sowohl die vasokonstriktorischen Prostaglandine  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGD}_2$  als auch Cysteinyl-Leukotriene (synonym Peptidoleukotriene) (Decker K *et al.*, 1990; Bilzer M *et al.*, 2005). So scheint z.B. Thromboxan  $\text{A}_2$  (Häussinger D *et al.*, 1988) vasokonstriktorische Effekte durch Kontraktion von hepatischen Ito-Zellen (Kawada N *et al.*, 1993) auszulösen. Vasokonstriktorische Effekte durch aktivierte KS erscheinen deshalb prinzipiell möglich. Gleichzeitig bilden aktivierte KS auch die vasorelaxierenden Prostaglandine  $\text{E}_2$  und  $\text{I}_2$  sowie NO (Decker K *et al.*, 1990) (Abb. 6). Hierdurch könnten vasokonstriktorische Effekte teilweise oder vollständig kompensiert bzw. antagonisiert werden.

#### **1.4.4 Portale Hypertension durch aktivierte Kupffer Zellen**

Für die Untersuchung hämodynamischer Effekte durch aktivierte KS sind *in vivo* Modelle eher ungeeignet. Stimuli wie Endotoxin oder Zymosan führen *in vivo* nicht nur zu einer Aktivierung der KS, sondern aktivieren darüber hinaus auch extrahepatische Makrophagen und Granulozyten. Eine sichere Zuordnung der beobachteten Effekte ist deshalb nicht möglich. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe erfolgten deshalb am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (Gores GJ *et al.*, 1986). Durch das Verfahren der isolierten Perfusion mit einem zellfreien Puffer können Effekte aktivierter KS ohne Einflüsse durch extrahepatische Makrophagen und Leukozyten eindeutig identifiziert werden. Zur Aktivierung der KS wurde Zymosan verwendet. Die Infusion von Zymosan führte zu einer Erhöhung des Pfortaderdruckes um annähernd 400%. Dieser enorme Druckanstieg konnte um etwa 50% durch spezifische Hemmung der Cyclooxygenase I, nicht jedoch durch COX-II Hemmung vermindert werden. Eine vergleichbare 50%-ige Hemmung des portalen Druckanstieges wurde durch  $\text{TXA}_2$ -Rezeptorblockade erreicht. Interessanterweise fand sich in fibrotischen Lebern Gallengangs-ligierter Ratten mit portaler Hypertonie ein noch stärkerer portaler Druckanstieg durch Zymosan, der abermals um ca. 50% durch Hemmung des  $\text{TXA}_2$ -Weges reduziert wurde (Steib CJ *et al.*, 2007). Insgesamt führten diese Ergebnisse zu dem Konzept der Aggravierung einer portalen Hypertonie durch Infektionen als Folge einer KS-Aktivierung.  $\beta$ -Glucane als Zellwandbestandteil aller Mikroorganismen aktivieren KS mit der Folge einer vermehrten  $\text{TXA}_2$ -Bildung und  $\text{TXA}_2$ -medierten Vasokonstriktion. Dieses Konzept könnte darüber hinaus portale Druckerhöhungen durch Endotoxine als ebenfalls potente KS Aktivatoren sowie erstmals die bekannte Aggravierung der

portalen Hypertonie durch Gram-positive Erreger erklären. Unklar ist bislang noch der vollständige Mechanismus der portalen Druckerhöhung durch aktivierte KS. Wie bereits aufgeführt, kann eine vermehrte TXA<sub>2</sub>-Bildung nur etwa 50% der portalen Druckerhöhung erklären. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Identifizierung weiterer vasokonstriktorischer Mechanismen.

#### 1.4.5 Rolle der Leukotriene

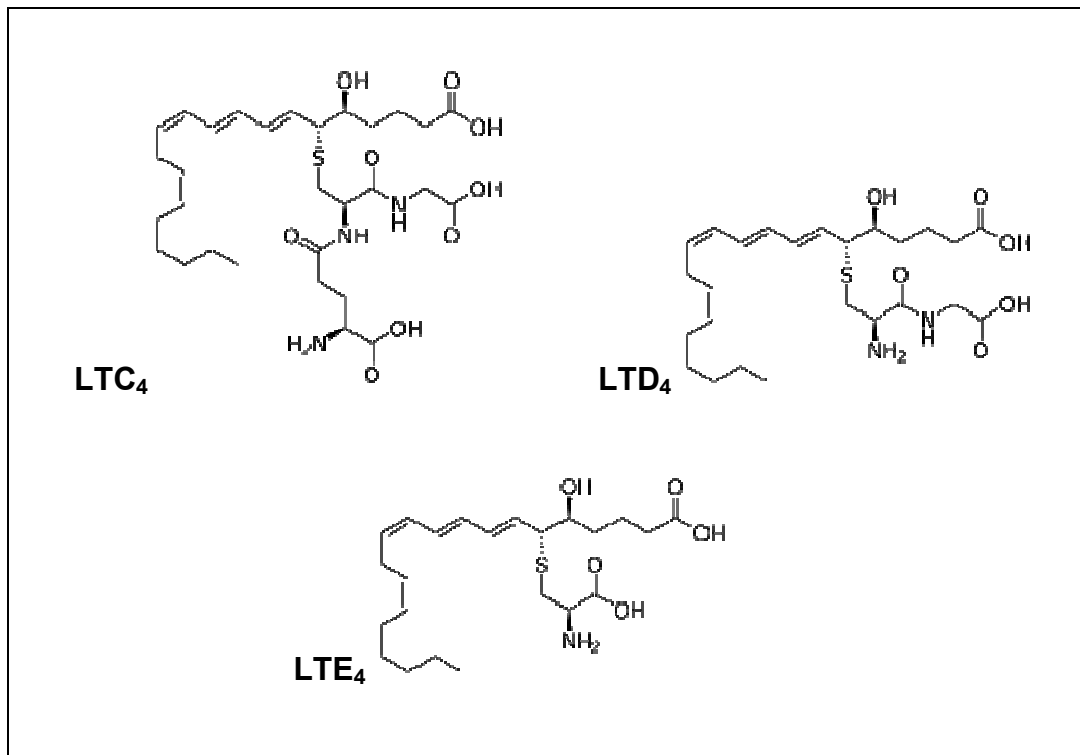
Die Verstoffwechslung von Arachidonsäure über den *Lipoxygenase-Weg* führt zur Bildung der 1979 entdeckten *Leukotriene* (Borgeat P und Samuelsson B, 1979). Der Name der Leukotriene erklärt sich durch die 3 konjugierten Doppelbindungen und ihre damals postulierte Herkunft aus den Leukozyten (Baker RR, 1990; Samuelsson B *et al.*, 1979).



**Abb. 7:** Nobelpreis für Medizin/Physiologie 1982. "For their discoveries concerning prostaglandins and related biologically active substances." Bilder aus Nobelprize.org (<http://nobelprize.org>).

Neben der Aufklärung der Struktur von Prostaglandinen war es die Entdeckung der Leukotriene, für die Samuelsson, Bergström und Vane 1982 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden (Abb. 7).

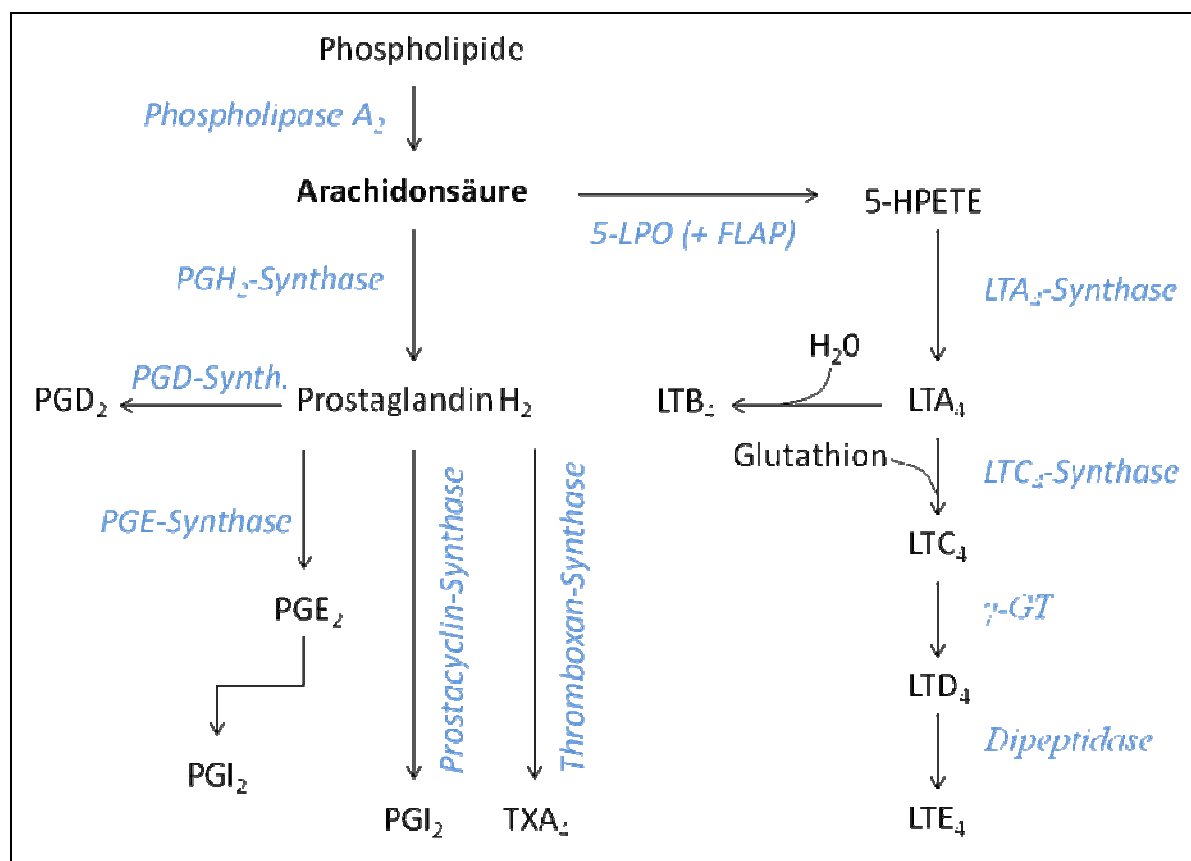
Anders als die Prostanoiden werden die Leukotriene nur von wenigen Zelltypen wie Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen gebildet. Die Synthese der Cysteinyl-LT ( $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$ ,  $\text{LTE}_4$ ) (Abb. 8), einer vormals als „*slow reacting substances of anaphylaxis*“ bekannten Untergruppe der LT, erfordert die sequentielle Wirkung verschiedener Enzyme.



**Abb. 8: Chemische Struktur der Cysteinyl-Leukotriene.**

Nach Bildung der Arachidonsäure (Abb. 9) wird im ersten Schritt durch die 5-LPO-katalysierte stereospezifische Oxidation der Arachidonsäure das labile Intermediat  $\text{LTA}_4$  gebildet. Die 5-LPO muss hierfür mit dem Five-Lipoxygenase-Activating-Proteine (FLAP) verbunden sein.  $\text{LTC}_4$ , die Muttersubstanz der Cysteinyl-LT, entsteht im nächsten Schritt durch die  $\text{LTC}_4$ -Synthase-katalysierte Konjugation von  $\text{LTA}_4$  mit Glutathion.  $\text{LTD}_4$  und  $\text{LTE}_4$  entstehen dann durch die schrittweise Entfernung von Glutamat und Glycin von  $\text{LTC}_4$  durch die Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) bzw. Dipeptidase. Die Regulation der Cys-LT-Produktion erfolgt durch 3 Enzyme: Phospholipase  $\text{A}_2$ , 5-LPO und  $\text{LTC}_4$ -Synthase. Darüber hinaus stimulieren Leukotriene die Phospholipase  $\text{A}_2$  im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus (Feuerstein N *et al.*, 1981; Cramer EB *et al.*, 1983; Clark MA *et al.*, 1986).





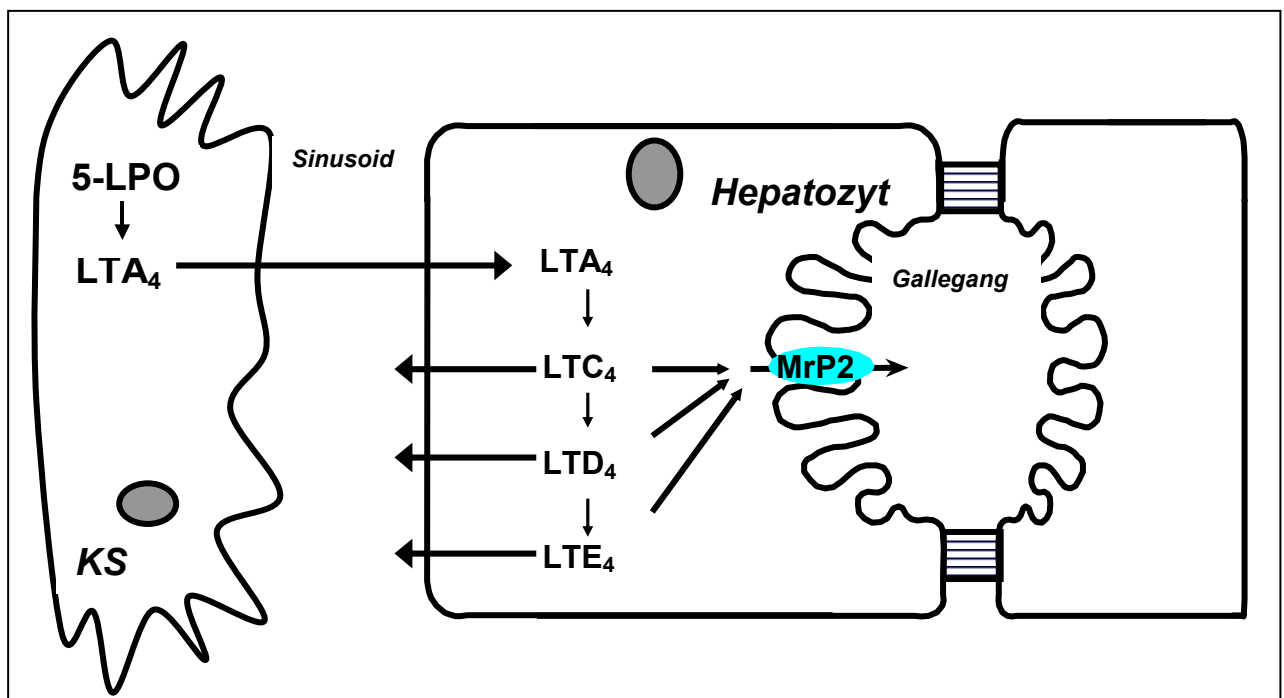
**Abb. 9: Synthese wesentlicher Arachidonsäuremetaboliten.** Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane werden auch als Prostanoiden bezeichnet. Detaillierte Beschreibung im Text.

Die Leukotriene sind vornehmlich für ihre proinflammatorische Wirkung bekannt (Peters-Golden M und Henderson WR, 2007). Darüber hinaus ist speziell für die Cys-LT nachgewiesen, dass sie neben der für die Pathogenese des Asthmas mitentscheidenden Konstriktion der Bronchialmuskulatur auch an der glatten Muskulatur von Gefäßen konstriktorisch wirken. Vor allem für die beiden Cys-LT LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> wurden auch in der Leber ausgeprägte vasokonstriktorische Eigenschaften nachgewiesen (Bilzer M und Lauterburg BH, 1993). Die biologische Aktivität des ebenfalls zur Gruppe der Cys-LT gehörenden LTE<sub>4</sub> dagegen, ist in den meisten untersuchten Organsystemen gering. Der Nachweis von LTE<sub>4</sub> ist dennoch als wichtig anzusehen, da es als Metabolit die vorherige Anwesenheit der kurzlebigen LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> im untersuchten Gewebe anzeigt (Westcott JY et al., 1990).

Interessanterweise konnte Shimada zeigen, dass die Expression der 5-LPO-mRNA in KS und auch die LTC<sub>4</sub>-Synthase in Hepatozyten durch LPS (bakterielle

Endotoxine) gesteigert wurde (Shimada *et al.*, 1998). Diese Beobachtung lässt die Beteiligung der Cys-LT an der portalen Hypertension durch aktivierte KS denkbar erscheinen.

In der zirrhotischen Rattenleber ist die durch LTD<sub>4</sub> induzierte Vasokonstriktion beträchtlich gesteigert (Graupera M *et al.*, 2002). Darüber hinaus besteht in der zirrhotischen Leber eine Induktion der 5-LPO in Kupffer-Zellen mit vermehrter Bildung von Cys-LT durch Hepatozyten (Titos E *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass Cys-LT in der Leber über einen transzellulären Mechanismus synthetisiert werden (Abb. 10).



**Abb. 10: Transzelluläre Synthese der Cysteinyl-Leukotriene, Ausscheidung in Sinusoide und Galle. MrP2, multidrug resistance protein 2. Detaillierte Beschreibung im Text.**

Das von KS gebildete labile Intermediat LTA<sub>4</sub> wird dabei von Hepatozyten aufgenommen und mittels LTC<sub>4</sub>-Synthase zu LTC<sub>4</sub> verstoffwechselt (Fukai F *et al.*, 1993 und 1996). Die Cys-LT werden dann über das biliäre Transportprotein in die Galle ausgeschieden (Huber M *et al.*, 1990) oder induzieren nach Freisetzung in die Sinusoide vasokonstriktorische Effekte (Titos E *et al.*, 2000).

Ursächlich für die Vasokonstriktion in der Leber scheint eine Konstriktion hepatischer Sternzellen zu sein (Kawada N *et al.*, 1992). Die zu den nonparenchymalen Leberzellen gehörenden HS sind wohlbekannte Regulatoren des sinusoidalen Blutflusses (Abb. 3). Die vasokonstriktorisches Effekte durch LTD<sub>4</sub> auf sinusoidaler Ebene konnten durch spezifische LTD<sub>4</sub>-Rezeptor Blockade aufgehoben werden (Titos E *et al.*, 2000).

In den Jahren 1999 und 2000 gelang die Klonierung der Cys-LT<sub>1</sub>- und Cys-LT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Lynch KR *et al.*, 1999; Heise CE *et al.*, 2000), deren Existenz bereits seit längerem aufgrund von Antagonisierungsstudien postuliert worden war. Die Erforschung weiterer Cys-LT Rezeptor (Cys-LTR) -Subklassen ist im Gange (Rovati GE und Capra V, 2007). Bezüglich der Affinität der verschiedenen Cys-LT zu den einzelnen Rezeptoren bestehen erhebliche Unterschiede. Der Cys-LT<sub>1</sub>R wird vor allem durch LTD<sub>4</sub> stimuliert, weshalb für diesen Rezeptor das Synonym LTD<sub>4</sub>-Rezeptor gebräuchlich war (Jonsson EW, 1998). Dagegen scheint der Cys-LT<sub>2</sub>R vornehmlich LTC<sub>4</sub> zu binden; auch hier wird nach neuerer Nomenklatur der zuvor gebräuchliche Begriff LTC<sub>4</sub>-Rezeptor nicht mehr verwendet (Coleman *et al.*, 1995). Cys-LTR initiieren nach Bindung von Cys-LT die Signaltransduktion über sieben transmembranäre G-Proteine (Lynch KR *et al.*, 1999; Heise CE *et al.*, 2000). Die Rezeptoren scheinen hierbei an G<sub>q</sub> gekoppelt zu sein (Coleman *et al.*, 1995), eine Untergruppe der G-Proteine die mit einer nachfolgenden Phospholipase C Aktivierung assoziiert ist (Jonsson EW, 1998). Unter Vermittlung durch IP<sub>3</sub> (Inositol-3-Phosphat) wird letztlich die Vasokonstriktion durch einen raschen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration ausgelöst (Titos E *et al.*, 2000). So reagierten hepatische Sternzellen auf LTD<sub>4</sub> mit einem deutlichen Anstieg der Kalzium-Konzentration und anschließender Zellkontraktion. Diese Effekte waren stärker ausgeprägt als durch sämtliche andere getestete Vasokonstriktoren (z.B. Vasopressin) (Bataller R *et al.*, 1997; Titos E *et al.*, 2000; ) und scheinen durch Cys-LT<sub>1</sub>R vermittelt zu sein. Im Falle einer Beteiligung der Cys-LT an der durch bakterielle Infektionen aggravierten portalen Hypertonie könnten die für andere Indikationen bereits zugelassenen Leukotrien-Inhibitoren (z.B. die als Asthmamedikamente verwendete Cys-LT<sub>1</sub>R-Antagonisten oder 5-Lipoxygenase Inhibitoren) die bisherige Primär- und Rezidivblutungsprophylaxe sinnvoll ergänzen (Hernandez-Guerra M *et al.*, 2005).

## 2. Fragestellung

Auf Grund der enormen Erhöhung des Pfortaderdruckes durch aktivierte KS, sind KS-Aktivatoren als potentielle Trigger einer Ösophagusvarizenblutung anzusehen. An der portalen Druckerhöhung durch aktivierte KS sind Cyclooxygenasen, Thromboxansynthase und Thromboxan A<sub>2</sub> beteiligt. Allerdings ist der portale Druckanstieg nach KS-Aktivierung durch COX bzw TXA<sub>2</sub>-Inhibitoren/Antagonisten nur zu etwa 50% hemmbar, was die Existenz weiterer vasokonstriktorischer Mechanismen nahe legt. Mit den Cys-LT liegen weitere Arachidonsäuremetaboliten mit vasokonstriktorischem Potential vor, deren Rolle in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht wurde.

Ziel der Arbeit war deshalb die Beantwortung folgender Fragen:

1. Kommt es nach selektiver KS-Aktivierung zu einer gesteigerten Bildung von Cys-LT?
2. Sind letztere an der portalen Druckerhöhung beteiligt?
3. Sind die durch TXA<sub>2</sub> und Cys-LT vermittelten vasokonstriktorisches Effekte in der Leber als voneinander unabhängige Mechanismen anzusehen oder besteht eine Interaktion innerhalb eines gemeinsamen Netzwerkes?

Untersucht werden sollte insbesondere

- a) der Einfluss der alleinigen und kombinierten Gabe von Prostanoid/Cys-LT-Antagonisten/Inhibitoren auf den portalen Druckanstieg nach KS-Aktivierung
  - b) der Effekt von Thromboxan-Antagonisten/Inhibitoren auf die Cys-LT-Synthese bzw. der Einfluss von Cys-LT-Inhibitoren/Antagonisten auf die Prostanoid-Synthese nach KS-Aktivierung
  - c) der Einfluss von Cys-LT-Antagonisten/Inhibitoren auf vasokonstriktorisches Effekte des TXA<sub>2</sub> Agonisten U-46619
4. Sind Cys-LT an der sinusoidalen Konstriktion nach KS-Aktivierung beteiligt?

Die Identifizierung der beteiligten Mechanismen könnte die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung der portalen Hypertension ermöglichen.

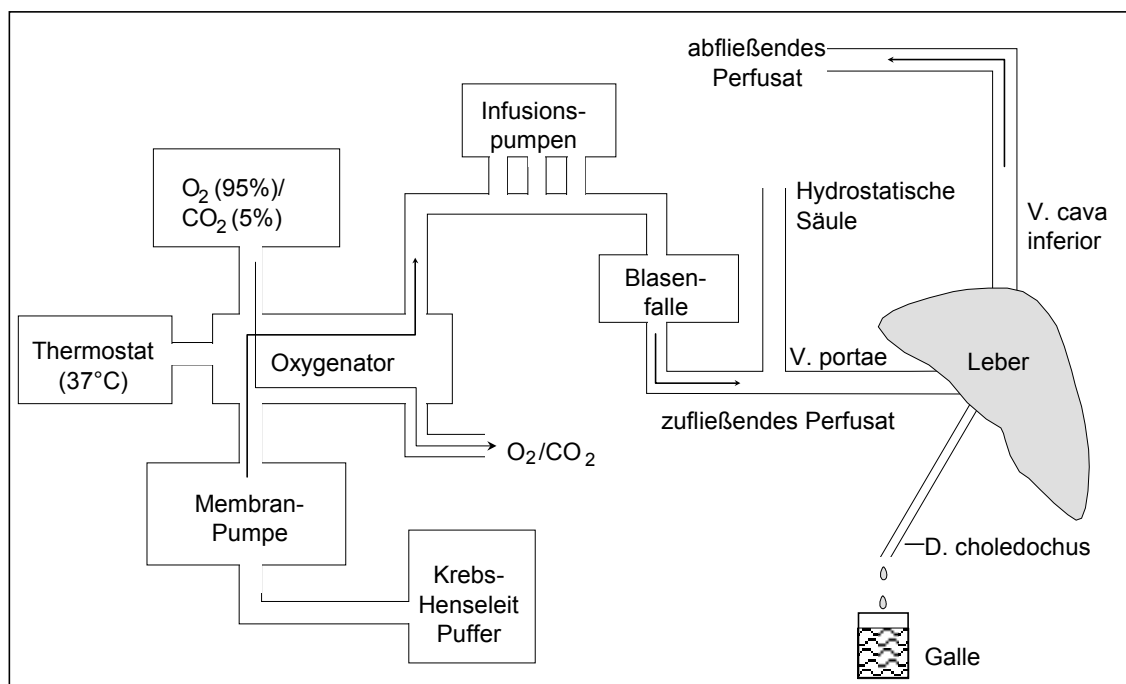
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Rattenleber- Perfusion

Die Versuchstiere, männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 200-250 g, wurden bei einem 12 Stunden hell-dunkel Zyklus in einem klimatisierten Raum gehalten. Über den gesamten Zeitraum ihrer Haltung erhielten die Versuchstiere uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Standardfutter (Altromin, Lage). Die Rattenleber- Perfusion stellt eine Organentnahme dar. Der Anzeigepflichtigkeit bei der Regierung von Oberbayern wurde nachgekommen. Vor Operationsbeginn wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (50 mg Narcoren/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Rattenleber- Perfusion wurde nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt (Bilzer M *et al.*, 1999). Zu Beginn erfolgte hierbei die Injektion von 250 IU Heparin in die V. femoralis. Die nachfolgende Laparotomie gewährleistete die Darstellung der V. cava und der Leberpforte. Zur Perfusion der Leber wurde bei erhaltenem Kreislauf ein Polyethylen- Tubus der Größe 16 Gauche in die Pfortader eingeführt und über diesen sofort Krebs-Henseleit-Puffer zugeführt (3.0 – 3.5 ml/min x g Leber). Eine Inzision der Aorta abdominalis sicherte den Perfusatabfluss. Im nächsten Operationsschritt wurde der Thorax eröffnet und anschließend die V. cava inferior über den rechten Herzvorhof kanüliert. Durch Ligatur der V. cava inferior unterhalb der Lebervenen und oberhalb der Nierenvenen war die Gewinnung des gesamten venösen Leberperfusates über die zuvor in der V. cava inferior platzierte Kanüle möglich. Zur Gallegewinnung wurde ein Polyethylen-Katheter (Länge 5 cm, Innendurchmesser 0,4 mm, totales Innenvolumen 6 µl) in den Ductus Choledochus eingebracht.

Zur volumenkonstanten Leberperfusion fand ein Hämoglobin- und Albumin- freier Krebs-Henseleit Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37°C Verwendung. Der Puffer wurde durch einen thermostatisierten Schlauchoxygenator geleitet und dabei mit 95% O<sub>2</sub> und 95% CO<sub>2</sub> (Carbogen) begast (Sies H, 1978; Akerboom TPM *et al.*, 1982a und 1982b). Die Bestandteile des Schlauchoxygenators bildeten ein 15 m langer Silikonschlauch (Wandstärke 0,2 mm, Innendurchmesser 2 mm), ein thermostatisierter Aluminiumblock, um den der Silikonschlauch gewickelt war, sowie eine gasundurchlässige Plexiglaskammer, die die Einheit umschloss. Der Innenraum dieser Kammer wurde mit Carbogen begast. Sofern Substanzzugaben

erfolgten, geschah dies über Mikro-Infusionspumpen, die die jeweiligen Substanzen dem zufließenden Perfusat mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  zuführten. Zur Verhinderung von Luftembolien befand sich eine Blasenfalle mit einem Volumen von 10 ml, ca. 20 cm vor der Pfortaderkanüle. Dieser Aufbau ermöglichte ferner eine homogene Lösung der zugeführten Stammlösungen. Der schematische Aufbau der Perfusionsanlage ist Abbildung 11 zu entnehmen. Die gewonnenen Galle und Perfusatproben wurden in Eppendorf-Cups bis zur anschließenden Analyse im Eisbad aufbewahrt. Nach Versuchsende erfolgte die Bestimmung des Feuchtgewichts der Leber.



**Abb. 11: Schematische Darstellung des Modells der perfundierten Rattenleber.**  
 Detaillierte Beschreibung im Text.

### 3.2 Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen

Kupffer'sche Sternzellen wurden selektiv durch Zymosan,  $\beta$ -Glycan-reiche Zellwandpartikel von *Saccharomyces cerevisiae*, aktiviert. Hierzu wurden Lebern von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader mit Zymosan (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) perfundiert, das in Krebs-Henseleit-Puffer suspendiert wurde. Zuvor wurden die Zymosan-Suspensionen zur Destruktion der endogenen Phospholipase  $\text{A}_2$ -Aktivität

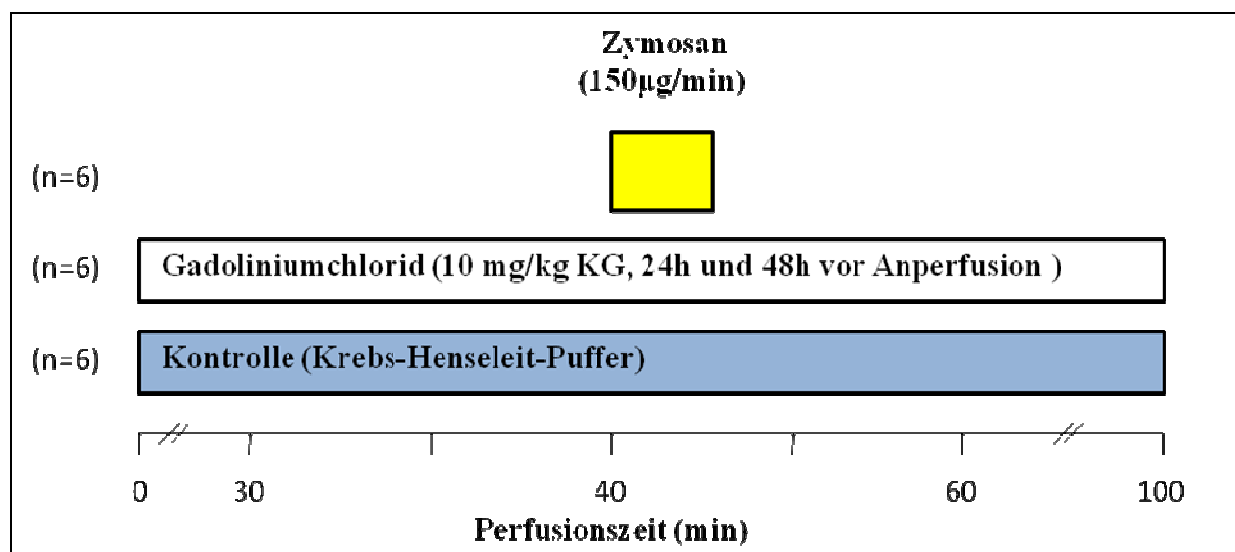
30 Minuten bei 95°C inkubiert (Dieter P *et al.*, 1987). Folgende Gruppen wurden untersucht:

**Kontrollen:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer über 100 Minuten (n=6).

**Zymosan:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

**Zymosan, 180 min Perfusionsdauer:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=5). Ausdehnung der Perfusionsdauer von 100 auf 180 min (nicht abgebildet).

**GdCl<sub>3</sub> und Zymosan:** Den Tieren wurde zur Untersuchung KS-spezifischer Effekte 48 h und 24 h vor der Leberperfusion intraperitoneal Gadoliniumchlorid (GdCl<sub>3</sub>, 10 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Dies führt in der verwendeten Dosis zu einer partiellen Elimination und Blockade der Kupfer-Zellen (Bilzer M *et al.*, 2002). Zymosan (150 µg/ml) wurde von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader verabreicht (n=6).



**Abb. 12: Versuchsprotokoll zur Aktivierung Kupfer'scher Sternzellen in der Leber. Detaillierte Beschreibung im Text.**

### **3.3 Untersuchung vasokonstriktorischer Mechanismen bei der Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen**

#### **3.3.1 5-Lipoxygenase und Cysteinyl-Leukotriene**

Die Bedeutung von 5-LPO und Cys-LT bei der portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung wurde durch 5-LPO Inhibitoren und Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten untersucht. Gleichzeitig sollten durch diese Experimente mögliche Einflüsse der LT-Bildung auf die bereits bekannte PG-Bildung nach KS-Aktivierung charakterisiert werden.

**Zymosan:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

**DMSO:** DMSO, das Lösungsmittel für unten aufgeführte Inhibitoren und Antagonisten, wurde von der 30.-60. Minute über eine Infusionspumpe mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt (Endkonzentration im Perfusat 22 mM), Zymosan (150 µg/ml) wurde von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

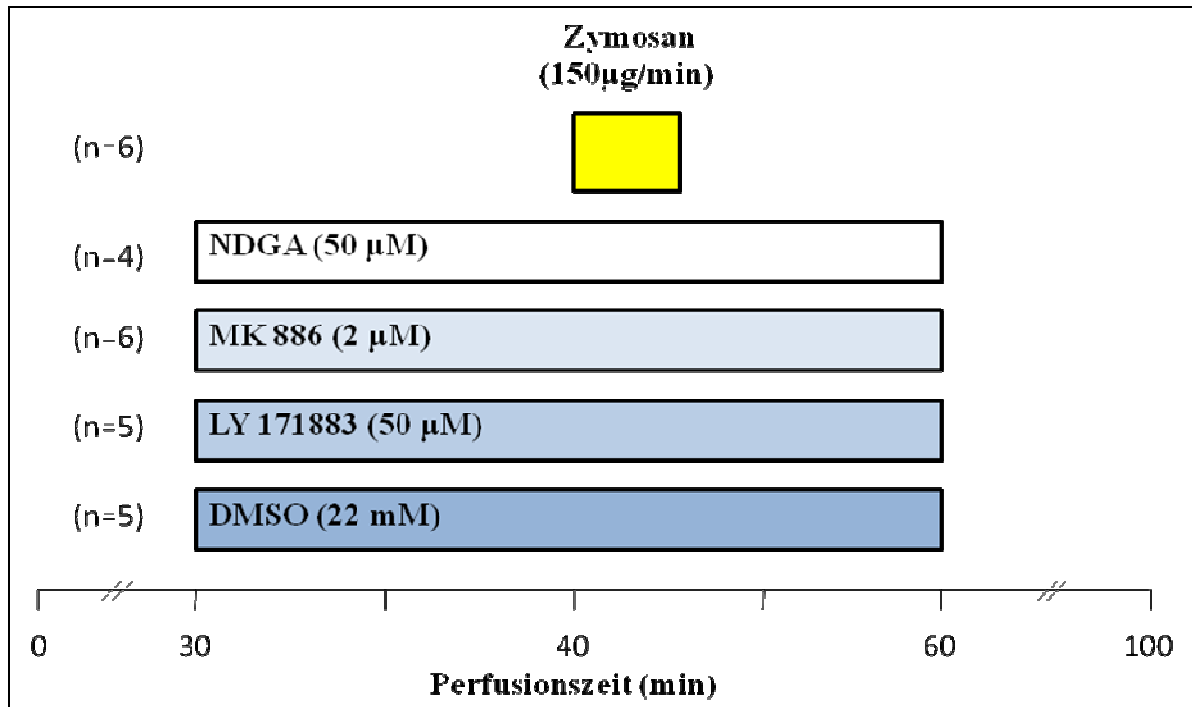
**Zymosan + NDGA:** NDGA (50 µM), ein klassischer 5-LPO Inhibitor, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute verabreicht (n=4).

**Zymosan + MK 886:** MK 886 (2 µM), ein neuer 5-LPO Inhibitor mit grösserer Spezifität als NDGA, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute verabreicht (n=6).

**Zymosan + LY 171883:** LY 171883 (20 µM), ein CysLT<sub>1</sub> -Rezeptor Antagonist (Synonym Leukotrien D<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonist), wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

Die oben aufgeführten Inhibitoren und Rezeptorantagonisten wurden in DMSO gelöst und durch Infusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt.





**Abb. 13: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des 5-Lipoxygenase-Weges.**  
 Detaillierte Beschreibung im Text.

### 3.3.2 Einfluss von Cyclooxygenasen und Thromboxan- Synthase auf die Cys-LT Bildung

Der Einfluss vasokonstriktorischer Cyclooxygenase- Produkte auf die Cys-LT Bildung wurde durch Anwendung von Inhibitoren der Cyclooxygenase, TXA<sub>2</sub>-Synthase sowie durch einen TXA<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten untersucht.

**Zymosan:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

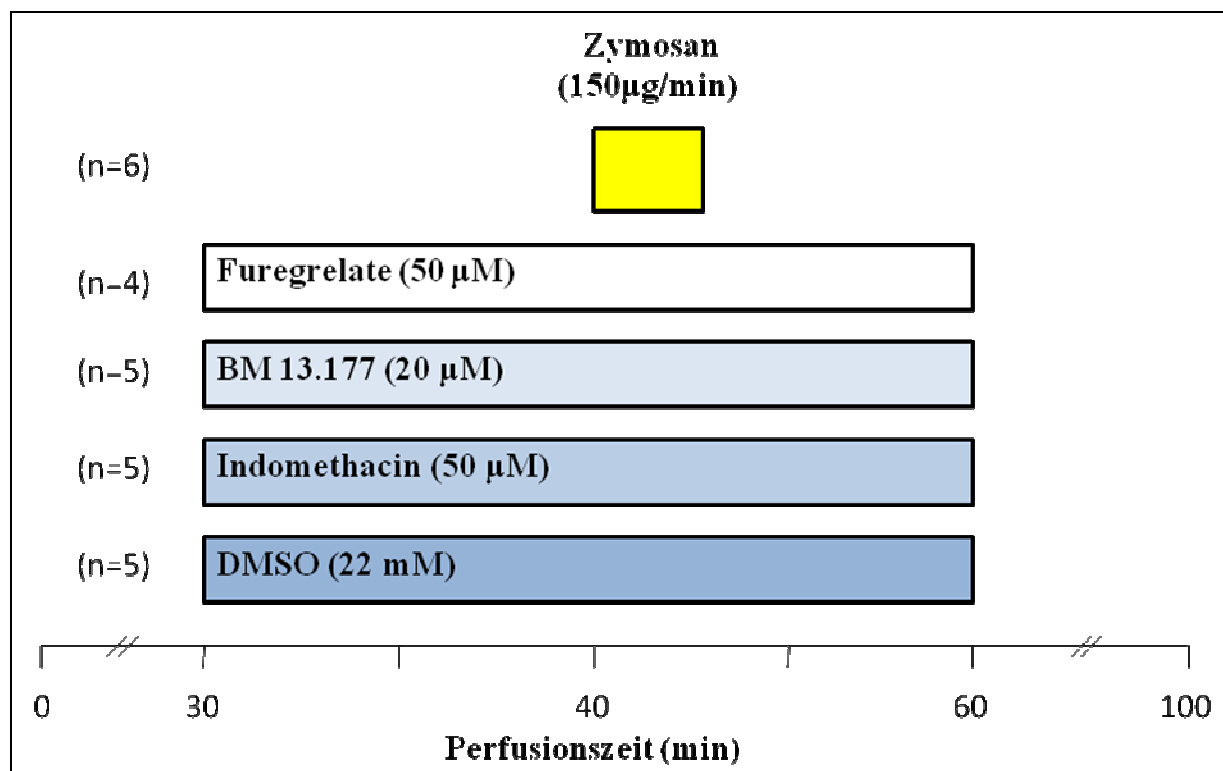
**Zymosan + DMSO:** DMSO, das Lösungsmittel für die unten aufgeführten Inhibitoren und Antagonisten, wurde von der 30.-60. Minute mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt (Endkonzentration im Perfusat 22mM), Zymosan (150 µg/ml) wurde von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

**Zymosan + Indomethacin:** Indomethacin (50 µM), ein nichtselektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute zugeführt (n=5).

**Zymosan + BM 13.177:** BM 13.177 (20  $\mu\text{M}$ ), ein selektiver Thromboxan  $\text{A}_2$ -Rezeptor-Antagonist, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150  $\mu\text{g/ml}$ ) von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

**Zymosan + Furegrelate:** Furegrelate (50  $\mu\text{M}$ ), ein Thromboxan- Synthasehemmer, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150  $\mu\text{g/ml}$ ) von der 40.-46. Minute verabreicht (n=4).

Alle Inhibitoren und Rezeptorantagonisten wurden in DMSO gelöst und durch Infusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{l/min}$  zugeführt.



**Abb. 14: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Cyclooxygenase-Weges. Detaillierte Beschreibung im Text.**

### 3.3.3 Portale Drucksenkung durch gleichzeitige Hemmung von COX und 5-LPO Wegen

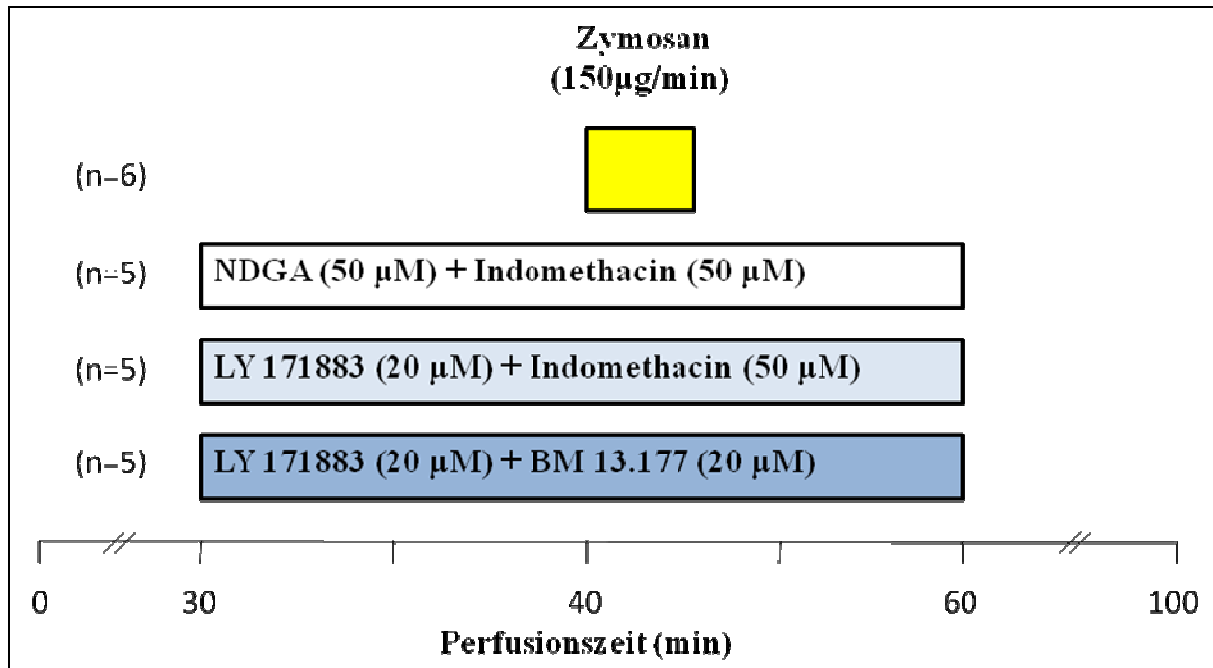
Der Anteil der zuvor untersuchten Cyclooxygenase und Lipooxygenase Wege an der portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung wurde durch gleichzeitige Hemmung/Antagonisierung beider Wege weiter charakterisiert. Hierdurch sollte auch eine mögliche Vernetzung beider Wege erfasst werden:

**Zymosan:** Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

**Zymosan + NDGA und Indomethacin:** NDGA (50 µM), ein 5-LPO Inhibitor wurde von der 30. – 60. Minute, Indomethacin (50 µM), ein nichtselektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

**Zymosan + LY 171883 und Indomethacin:** LY 171883 (20 µM), ein CysLT<sub>1</sub> Rezeptor Antagonist (Synonym Leukotrien D<sub>4</sub> Rezeptor Antagonist), wurde von der 30. – 60. Minute, Indomethacin (50 µM), ein nichtselektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen ebenfalls von der 30.-60. Minute und Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).

**Zymosan + LY 171883 und BM 13.177:** LY 171883 (20 µM), ein CysLT<sub>1</sub> Rezeptor Antagonist (Synonym Leukotrien D<sub>4</sub> Rezeptor Antagonist), wurde von der 30. – 60. Minute, BM 13.177 (20 µM), ein selektiver Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist, wurde von der 30.-60. Minute, Zymosan (150 µg/ml) von der 40.-46. Minute infundiert (n=5).



**Abb. 15: Versuchsprotokoll zur Kombination von 5-LPO- und COX-Inhibitoren.**  
Detaillierte Beschreibung im Text.

### 3.4 Hämodynamische Effekte des Thromboxanagonisten U-46619 in der Leber: Bedeutung von Leukotrienen

Zur Klärung einer möglichen Beteiligung von Cys-LT an der portalen Druckerhöhung durch TXA<sub>2</sub> wurde in weiteren Experimenten der portale Druckanstieg durch den Thromboxanagonisten U-46619 hinsichtlich seiner Beeinflussbarkeit durch Thromboxan A<sub>2</sub>- und Leukotrien D<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten sowie durch einen 5-LPO Synthesehemmer untersucht.

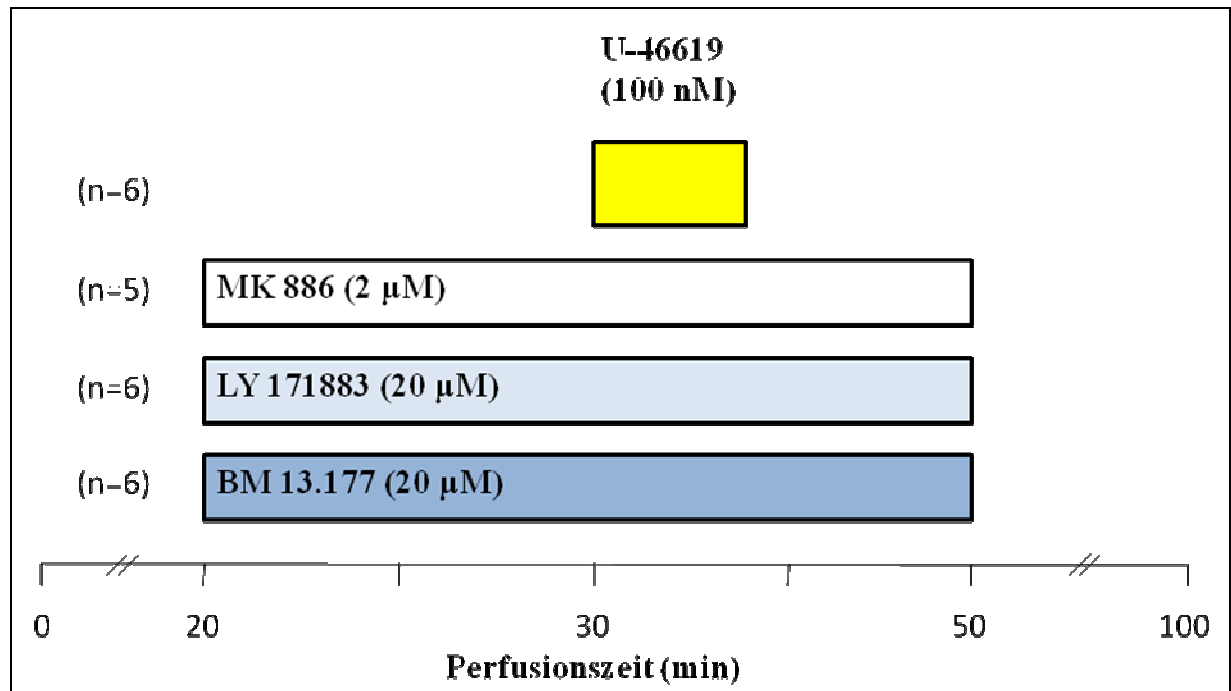
**U-46619:** U-46619 (100 nM), ein Thromboxanagonist, wurde von der 30.-38. Minute (n=6) zugeführt.

**U-46619 und BM 13.177:** BM 13.177 (20 µM), ein selektiver Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist, wurde von der 20.-50. Minute, U-46619 (100 nM) von der 30.-38. Minute (n=6) zugeführt.

**U-46619 und LY 171883:** LY 17883 (20 µM), ein CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor Antagonist, wurde von der 20.-50. Minute, U-46619 (100 nM) von der 30.-38. Minute (n=6) zugeführt.

**U-46619 und MK 886:** MK 886 (2  $\mu\text{M}$ ), ein spezifischer 5-LPO Inhibitor, wurde von der 20.-50. Minute, U-46619 (100 nM) von der 30.-38. Minute (n=5) zugeführt.

Die oben aufgeführten Inhibitoren und Rezeptoragonisten und -antagonisten wurden in DMSO gelöst und durch Infusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  zugeführt.



**Abb. 16: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der portalen Druckerhöhung durch den Thromboxan Agonisten U-46619. Detaillierte Beschreibung im Text.**

### 3.5 Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation nach Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen *in vivo*

#### 3.5.1 Chirurgische Präparation und Versuchsprotokoll

Die Narkotisierung von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (360-400 g) mit Äther erfolgte nach einer 12-15-stündigen Nahrungskarenz mit freiem Zugang zu Wasser. Die Operation wurde unter sauberen, jedoch nicht sterilen Bedingungen sowie unter Verwendung eines Operationsmikroskops (M650; Fa. Wild; Heerbrugg; Schweiz) durchgeführt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer speziell entwickelten Operationsplatte mit integriertem Heizeil (Fa. Effenberger; München) gelagert. Zur kontinuierlichen Messung der Körperkerntemperatur wurde rektal eine Thermosonde

eingeführt, die an das Wärmeaggregat der Heizplatte angeschlossen war. Durch diesen Regelkreis konnte so während der Operation eine konstante Körperkerntemperatur zwischen 36,5°C und 37,5°C gewährleistet werden. Die Narkoseführung erfolgte im offenen System unter Verwendung einer Atemmaske, die mit einer äthergetränkten Kompresse bestückt war.

Zur Applikation von Elektrolytlösungen wurde ein Katheter aus Polyethylen (PE 50; Außen/Innendurchmesser: 0.96/0.58 mm; Portex; Hythe; England) in die linke V. jugularis externa gelegt. Auf diese Weise wurden laparotomiebedingte Flüssigkeitsverluste substituiert. Ein zweiter Polyethylenkatheter (PE 50; Außen/Innendurchmesser: 0.96/0.58 mm; Portex; Hythe; England), der in die linke A. carotis communis inseriert wurde, ermöglichte eine kontinuierliche Messung des arteriellen Mitteldruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HR).

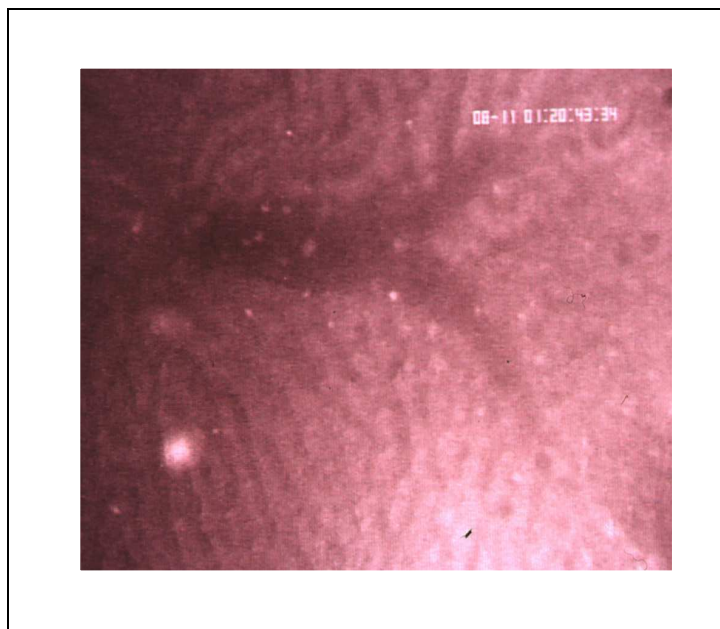
Es folgte eine transversale Laparotomie zur Darstellung der Leberpforte und Präparation der V. lienalis. Unmittelbar vor der Pfortader wurde die V. gastrica sinistra mit einem Polyethylenkatheter kanüliert, über den mittels einer Mikroinfusionspumpe Zymosan verabreicht wurde. Die Zufuhr von Zymosan erfolgte 40 Minuten nach Beginn der Laparotomie über einen Zeitraum von 7 Minuten. MK 886 wurde von der 30.-60. Minute über den gleichen Zugangsweg mittels einer Mikroinfusionspumpe verabreicht. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die übrigen abdominalen Organe einschließlich der rechten Lebersegmente mit Cuprophanfolie abgedeckt. Ungeschützte Organflächen wurden regelmäßig mit geringen Mengen körperwarmer, isotoner Vollelektrolytlösung benetzt.

Folgende Gruppen wurden untersucht:

1. **Zymosan:** Infusion von 30 µg/min x g Leber über insgesamt 7 Minuten ab der 40. Minute (n=5).
2. **Zymosan plus MK 886:** Zufuhr von MK 886 (6 nmol/min x g Leber) von der 30.-60. Minute und Infusion von Zymosan (30 µg/min x g Leber) von der 40.-47. Minute (n=5).

### 3.5.2 Intravitalmikroskopie

Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM) (Abb. 17) wurde der linke Leberlappen auf einer speziell dafür konstruierten Haltevorrichtung ausgelagert und mit einem Deckglas (24x32 mm) abgedeckt. Die Haltevorrichtung selbst besaß eine 4x5 cm große, rechteckige und schaufelartige Grundplatte, der eine 0.5-1 cm dicke Schicht Modelliermasse aufgelagert war. Durch diese Modelliermasse konnte die individuelle Anatomie des ausgelagerten linken Leberlappens nachgeahmt und eine mechanische Obstruktion der afferenten und efferenten Gefäße verhindert werden. Die geschilderte Präparation und Vorbereitung ermöglichten die Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation mittels der IVM in vivo (Menger MD *et al.*, 1991).



**Abb. 17: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM).** Intravitalmikroskopische Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation.

Die IVM wurde nach standardisierten Versuchsprotokollen zwischen der 35. und 40. Minute vor der Zymosan- Infusion (Baselinedaten) sowie zwischen der 45. und 47. Minute während der Zymosan- Infusion durchgeführt. Die Mikroskopie der Unterseite des ausgelagerten linken Leberlappens erfolgte mit einem Leitz-Orthoplan-Fluoreszenzmikroskop (Leitz; Wetzlar) mittels Epi-Illuminationstechnik. Nach Einblendung eines Videozeitgenerators (VTG 33; For. A Company Ltd.; Tokio; Japan) wurden die intravitalmikroskopisch gewonnen Bilder mittels einer CCD-Kamera (charge coupled device camera; FK 6990; Prospective Measurements Inc.;

San Diego; CA; USA) auf Videoband (S-VHS Panasonic AG 7330; Matsushita Electric Ind.; Tokio; Japan) aufgezeichnet. Pro Leber wurden insgesamt 8 zufällig ausgewählte Azini sowie 10 Sinusoide pro Azinus ausgewertet. Die Bestimmung der sinusoidalen Weite erfolgte offline mit Hilfe der Videobandaufzeichnung. Die sinusoidale Weite wurde entsprechend der zonalen Gliederung des Leberazinus jeweils periportal, midzonal und perizentral ausgewertet.

Die *in vivo* Untersuchungen und Auswertungen intravitalmikroskopischer Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Thomas Prüfer im Institut für chirurgische Forschung durchgeführt.

### **3.6 Bestimmungen**

#### **3.6.1 Portaler Druck perfundierter Rattenlebern**

Der portale Druck wurde mit Hilfe eines kalibrierten Glasrohres bestimmt, welches über einen Dreiwegehahn mit der in der V. Portae platzierten Kanüle verbunden war (Abb. 11). Während der Rattenleberperfusion wurden die Druckwerte (cm H<sub>2</sub>O) in Abständen von 1-5 Minuten abgelesen.

#### **3.6.2 Sinusoidaler Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Efflux**

Die sinusoidale LDH-Freisetzung ist ein empfindlicher Indikator des Zellschadens perfundierter Rattenlebern (Bilzer M *et al.*, 1999). Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Leberperfusat bei 25°C erfolgte unter Verwendung des folgenden Testansatzes:

500 µl	Phosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.5)
10 µl	Pyruvat (60 mM)
10 µl	NADH (10mg/ml)
500 µl	Leberperfusat

Die Extinktionsabnahme wurde kontinuierlich bei 365 nm registriert. Die Enzymaktivität wurde mittels des Extinktionskoeffizienten  $e_{365}=3.34 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  berechnet.



### 3.6.3 Bestimmung von Galle volumen und Gallefluß

Galle wurde in 5-minütigen Intervallen in Eppendorf Cups gesammelt. Das gewonnene Galle volumen wurde gravimetrisch bestimmt und der Gallefluss pro Minute und g Leber berechnet.

### 3.6.4 Bestimmung von Prostanoiden im Leberperfusat

#### 3.6.4.1 Bestimmung von Thromboxan B<sub>2</sub> und Prostaglandin D<sub>2</sub> im Leberperfusat

Thromboxan B<sub>2</sub> und Prostaglandin D<sub>2</sub> wurden mit Hilfe standardisierter Radioimmunoassays (RIA)-Kits der Firma Amersham Pharmacia Biotech bestimmt. Für den *Prostaglandin D<sub>2</sub>-Test* werden vom Hersteller folgende Kreuzreaktivitäten angegeben: Prostaglandin D<sub>2</sub> 100%, Prostaglandin J<sub>2</sub> 7%, Prostaglandin F<sub>2α</sub> 0.04%, Prostaglandin E<sub>2</sub> 0.002%. Alle anderen Kreuzreaktionen lagen unter 0.004%.

Für *Thromboxan B<sub>2</sub>* werden folgende Kreuzreaktivitäten angegeben: Thromboxan B<sub>2</sub> 100%, Prostaglandin F<sub>1α</sub> <1.0%, Prostaglandin F<sub>2α</sub> 0.4%, Prostaglandin E<sub>1</sub> <0.03%; alle anderen Kreuzreaktivitäten lagen unter 0.03%.

#### 3.6.4.2 Bestimmung von Prostaglandin F<sub>2α</sub> im Leberperfusat

*Prostaglandin F<sub>2α</sub>* wurde mit dem standardisierten EIA der Firma Assay Designs, Inc gemessen. Folgende Kreuzreaktivitäten werden vom Hersteller angegeben: Prostaglandin F<sub>2α</sub> 100%, Prostaglandin F<sub>1α</sub> 11.82%, Prostaglandin D<sub>2</sub> 3.62%, 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> 1.38%, Prostaglandin I<sub>2</sub> 1.25%, Prostaglandin E<sub>2</sub> 0.77%, Thromboxan B<sub>2</sub> 0.77%; alle anderen Kreuzreaktivitäten lagen unter 0.77%.

### 3.6.5 Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen im Leberperfusat

Die Cysteinyl-Leukotriene wurden mit dem standardisierten EIA der Firma Cayman-Chemical gemessen. Folgende Kreuzreaktivitäten wurden vom Hersteller angegeben: LTC<sub>4</sub> 100%, LTD<sub>4</sub> 100%, LTE<sub>4</sub> 67%, LTD<sub>5</sub> 61%, LTC<sub>5</sub> 54 %, LTE<sub>5</sub> 41%, N-acetyl LTE<sub>4</sub> 10.5 %; alle anderen Kreuzreaktivitäten lagen unter 0.01%.

Die Perfusatproben wurden in Methanol gesammelt (Mischungsverhältnis Perfusat: Methanol 1:3) und bei -80°C gelagert. Vor der Messung erfolgte eine Lyophilisierung. Das hierdurch gewonnene Lyophilisat wurde im nächsten Schritt in

250 µl EIA-Puffer der Firma Cayman aufgenommen. 50 µl dieser Lösung wurden letztlich für die Durchführung des EIA verwendet.

Die Berechnung der Prostaglandin- und Leukotrien-Konzentrationen erfolgte mittels Standardkurven. Die Perfusatproben wurden in verschiedenen Verdünnungsschritten bestimmt. Hierdurch wurden von jeder Probe Messwerte innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurven gewonnen (Graupera M *et al.*, 2002).

### **3.6.6 Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen in der Galle**

Die Galle wurde in 5-minütigen Intervallen in Eppendorf Cups gesammelt, in die 50 µl Methanol vorgegeben worden war. Die Galleproben wurden bis zur Cys-LT Messung bei -80°C gelagert. Die Messung erfolgte in 120 µl gepoolter Galle, wobei jeweils 40 µl aus drei Gallecups zusammengegeben wurden. Im Einzelnen wurde die Galle folgender 15-Minuten Perfusionsintervalle gepoolt: 1: 25.-40. Minute, 2: 40.-55. Minute, 3: 55.-70. Minute, 4: 70.-85. Minute und 5: 85.-100. Minute. Im nächsten Schritt wurde die gepoolte Galle lyophilisiert und das Lyophilisat in 100 µl EIA-Puffer der Firma Cayman aufgenommen. 50 µl dieser Lösung wurden letztlich für die Durchführung des EIA verwendet.

Die Bestimmung der Cysteinyl-Leukotriene in der Galle erfolgte mit dem unter 3.6.5 für die Messung der Cys-LT im Perfusat angegebenen EIA der Firma Cayman-Chemical.

### **3.7 Statistik**

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD). Das Signifikanzniveau wurde mit dem Programm Graph Pad Prism Version für Windows berechnet. Mittelwerte zwischen 2 Gruppen wurden mit dem Student's-t-Test verglichen. Wurden mehr als 2 Gruppen verglichen, so fand die „one-way-ANOVA“ – Varianzanalyse Anwendung. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $< 0.05$  angenommen.

### 3.8 Material

#### 3.8.1 Chemikalien

Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetracetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Gadolinium (III) Chlorid Hexahydrat	Sigma, St. Louis
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Boehringer, Mannheim
Natriumchlorid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, reinst	Merck, Darmstadt
Narcoren (Natriumpentobarbital)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Hannover
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert (NADH)	Boehringer, Mannheim
Zymosan A	Sigma, St. Louis

#### 3.8.2 Rezeptoragonisten und Antagonisten

9,11-Dideoxy-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -methanoepoxy- prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> (U-46619)	Calbiochem, Bad Soden
BM 13.177 (Solutroban)	Roche, Mannheim
1-[2-hydroxy-3-propyl-4-[4-(1H-tetrazol- 5-yl) butoxy] phenyl]-ethanone (LY 171883)	Calbiochem, Bad Soden

#### 3.8.3 Enzym- Inhibitoren

5-(3-Pyrimidinylmethyl)-benzofurancarboxylic acid (Furegrelate)	Sigma, St. Louis
1-( <i>p</i> -Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H- indole-3-acetic acid (Indomethacin)	Sigma, St. Louis

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	Calbiochem, Bad Soden
3-[1-(p-Chlorobenzyl)-5-(isopropyl)-3-t-butylthioindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid (MK 886)	Cayman Chemical, Ann Arbor

### 3.8.4 Gase

Carbogen (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde, Unterschleißheim
---	-------------------------

### 3.8.5 RIA und ELISA Kits

Prostaglandin D <sub>2</sub> - [ <sup>3</sup> H] Biotrak Assay	Amersham, Freiburg
Thromboxan B <sub>2</sub> – [ <sup>125</sup> I] Biotrak Assay	Amersham, Freiburg
Prostaglandin F <sub>2α</sub> Enzyme Immuno Assay Kit	Assay Design, Ann Arbor
Cysteinyl Leukotrien Enzyme Immuno Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor

### 3.8.6 Pufferlösungen

Krebs-Henseleit:	NaCl	118 mM
	KCl	4.8 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1.2 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Perfusion un behandelter Lebern

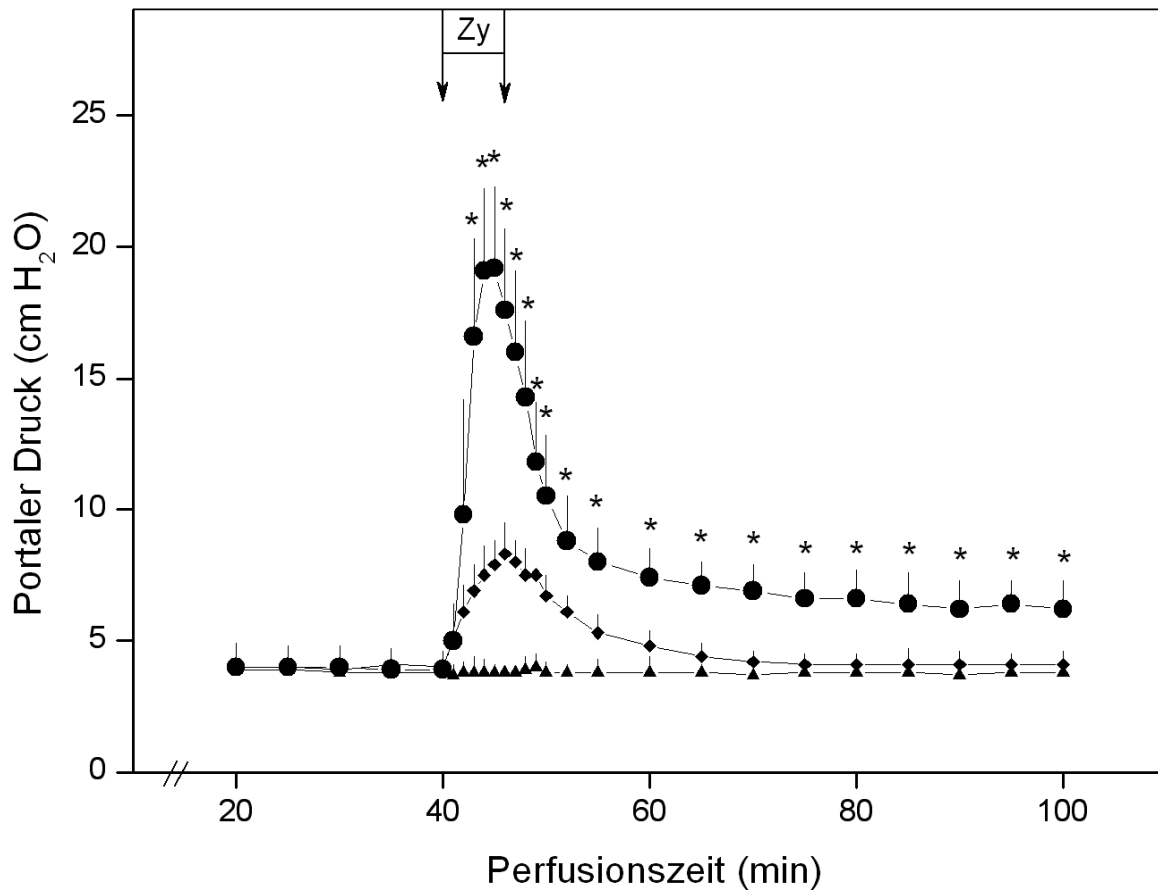
Zur Charakterisierung des Modells der perfundierten Rattenleber wurden Lebern in situ 100 Minuten lang mit Carbogen-begastem Krebs-Henseleit Puffer perfundiert (n=6). 20 Minuten nach Beginn der Perfusion betrug der portale Druck  $4.2 \pm 0.6$  cm H<sub>2</sub>O und blieb bis zum Ende des Experiments unverändert ( $4.2 \pm 0.6$  cm H<sub>2</sub>O).

Als Parameter der Zellintegrität wurde die sinusoidale LDH-Freisetzung bestimmt. Die sinusoidale LDH- Freisetzung stieg von initial  $4.6 \pm 1.8$  auf  $10.4 \pm 5.4$  mU/min x g Leber am Ende der Perfusion an. Der nicht-signifikante Anstieg dieser niedrigen Effluxraten zeigt eine mit früheren Arbeiten (Bilzer M *et al.*, 1999) vergleichbare Zellintegrität während des Perfusionszeitraumes von 100 Minuten. Der Gallefluss (als Parameter der Leberfunktion) nahm im Laufe des Experimentes von initial  $1.14 \pm 0.14$  µl/min/g Leber nach 20 Minuten auf  $0.69 \pm 0.16$  µl/min/g Leber nach 100 Minuten ab.

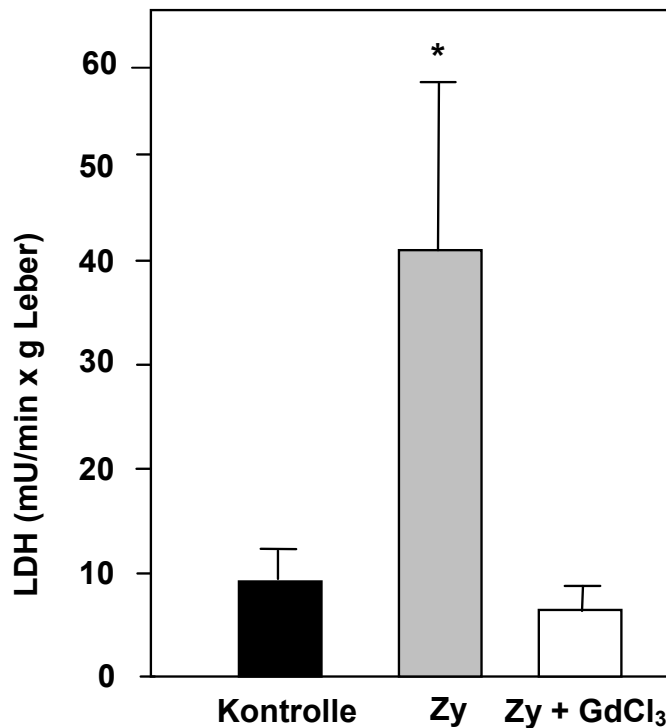
### 4.2. Portale Hypertension nach Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen durch Zymosan

Die Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen (KS) in perfundierten Rattenlebern erfolgte durch eine 6-minütige Infusion von Zymosan (150 µg/ml). Während der Zymosan-Infusion kam es zu einem raschen Anstieg des portalen Druckes von initial  $4.0 \pm 0.6$  cm H<sub>2</sub>O auf einen Maximalwert von  $19.2 \pm 3.1$  cm H<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). Nach Beendigung der Zymosan- Infusion fiel der portale Druck wieder ab, blieb dann aber bis zum Ende der Perfusion um etwa 2.5 cm H<sub>2</sub>O über dem Ausgangswert signifikant erhöht (Abb. 18 A). Diese Erhöhung blieb auch über einen verlängerten Perfusionszeitraum von über 2 Stunden nach Zymosanzufuhr (180 min Gesamtperfusionsdauer) bestehen (n=5, nicht abgebildet). Vereinbar mit früheren Ergebnissen führte die Infusion von Zymosan somit zu einem massiven, nur wenige Minuten anhaltenden Anstieg des portalen Druckes um annähernd 400%, dem eine lang anhaltende Druckerhöhung von ca. 60% folgte. Während der Zymosan- Infusion kam es zu einer Steigerung der LDH- Freisetzung auf  $40 \pm 26$  mU/min x g Leber ( $p < 0.05$ ) als Ausdruck einer geringen Zellschädigung (Abb. 18 B). Zugleich kam es zu einer Abnahme des Galleflusses um ca. 50% von initial  $1.2 \pm 0.1$  µl/min/g Leber in der 20. Minute auf

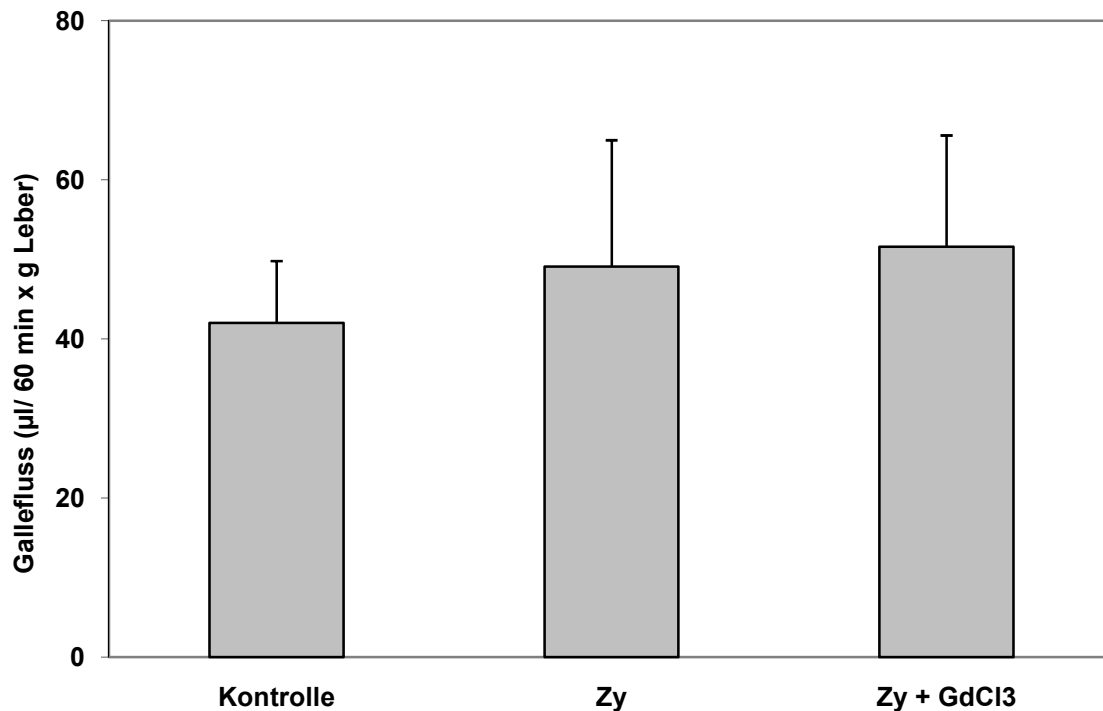
0.6±0.2 µl/min/g Leber in der 100. Minute. Der kumulative Gallefluss unterschied sich nicht signifikant zwischen den Kontroll- und Zy mosangruppen (Abb. 18 C).



**Abb. 18 A: Portaler Druckerhöhung nach Aktivierung Kupfer'scher Sternzellen.** Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40.-46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (●, n=6). Im Vergleich zu Kontrollperfusionsen (▲, n=6) kam es zu einem signifikanten Anstieg des portalen Druckes mit einem initialen Peak sowie einer lang anhaltenden Erhöhung bis zum Ende der Perfusion. In einer weiteren Gruppe (n=6) wurde den Tieren jeweils 48 h und 24 h vor den Versuchen Gadoliniumchlorid (◆, 10 mg/kg KG) zur Blockade der Kupfer'schen Sternzellen intraperitoneal injiziert. Der Anstieg des portalen Druckes wurde durch GdCl<sub>3</sub>-Behandlung signifikant vermindert.  $\bar{x} \pm SD$ ; \*p<0.05 vs. Kontrollperfusion und Zymosan plus GdCl<sub>3</sub>.



**Abb. 18 B: Sinusoidale LDH-Freisetzung nach KS-Aktivierung.** Dargestellt sind die maximalen LDH-Werte zur 100. Minute der Perfusion. Im Vergleich zur Kontrollperfusion ( $n=6$ ) kam es während der Perfusion mit Zymosan (Zy,  $n=6$ ) zu einem signifikanten Anstieg der LDH Freisetzung als Zeichen der Zellschädigung. Durch Vorbehandlung mit GdCl<sub>3</sub> ( $n=6$ ) konnte der Zymosan induzierte LDH Anstieg verhindert werden.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrollperfusion und Zymosan plus GdCl<sub>3</sub>.



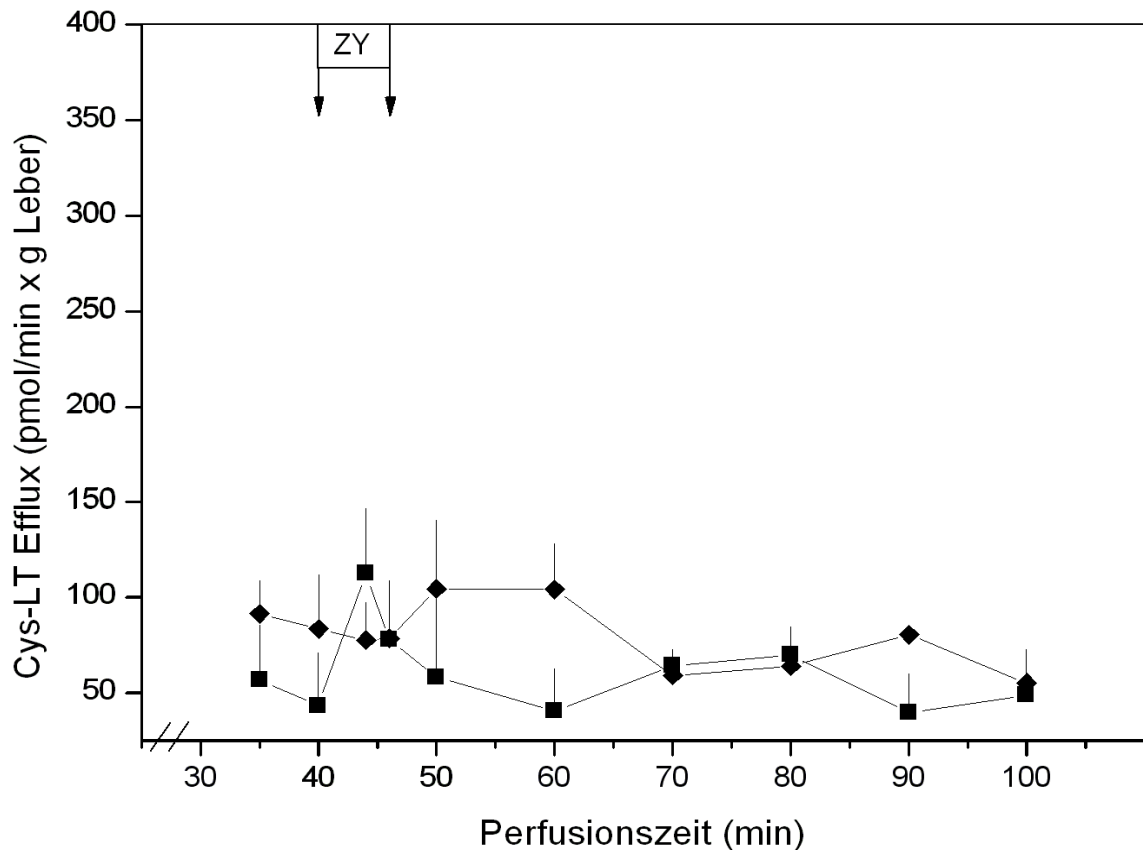
**Abb 18 C: Kein Einfluss der KS-Aktivierung auf den Gallefluss.** Dargestellt sind die kumulativen Galleflüsse (40.-100. Minute nach Beginn der Perfusion) der in Abb. 18 A gezeigten Experimente. Es zeigten sich vergleichbare Galleflüsse bei den Kontrollperfusionsen (n=6), bei Perfusionsen mit Zymosan allein (Zy, 150 µg/ml, n=6) und bei Perfusionsen mit Zymosan nach Vorbehandlung mit GdCl<sub>3</sub> (n=6).

Um zu überprüfen, ob der durch Zymosan induzierte portale Druckanstieg tatsächlich durch eine Aktivierung der KS vermittelt wird, wurden Ratten 48 h und 24 h vor den Experimenten intraperitoneal mit Gadoliniumchlorid (10 mg/kg Körpergewicht i.p.) behandelt. Die hierdurch bedingte funktionelle Inaktivierung der KS führte zu einer signifikanten Reduktion des portalen Druckanstieges durch Zymosan von initial  $4.0 \pm 0.6$  (40. Minute) auf maximal  $8.3 \pm 1.2$  cm H<sub>2</sub>O (46. Minute). Der portale Druck kehrte im weiteren Verlauf auf Ausgangswerte zurück (Abb. 18 A). Die Messung der LDH zeigte einen mit den Kontrollperfusionsen vergleichbaren LDH-Wert von  $5.6 \pm 3.0$  U/l zur 100. Minute (Abb.1B). Der Gallefluss wies keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 18 C). Die portale Druckerhöhung durch Zymosan muss somit überwiegend auf eine Aktivierung der KS zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf die Identifizierung der beteiligten vasokonstriktorisches Mechanismen.



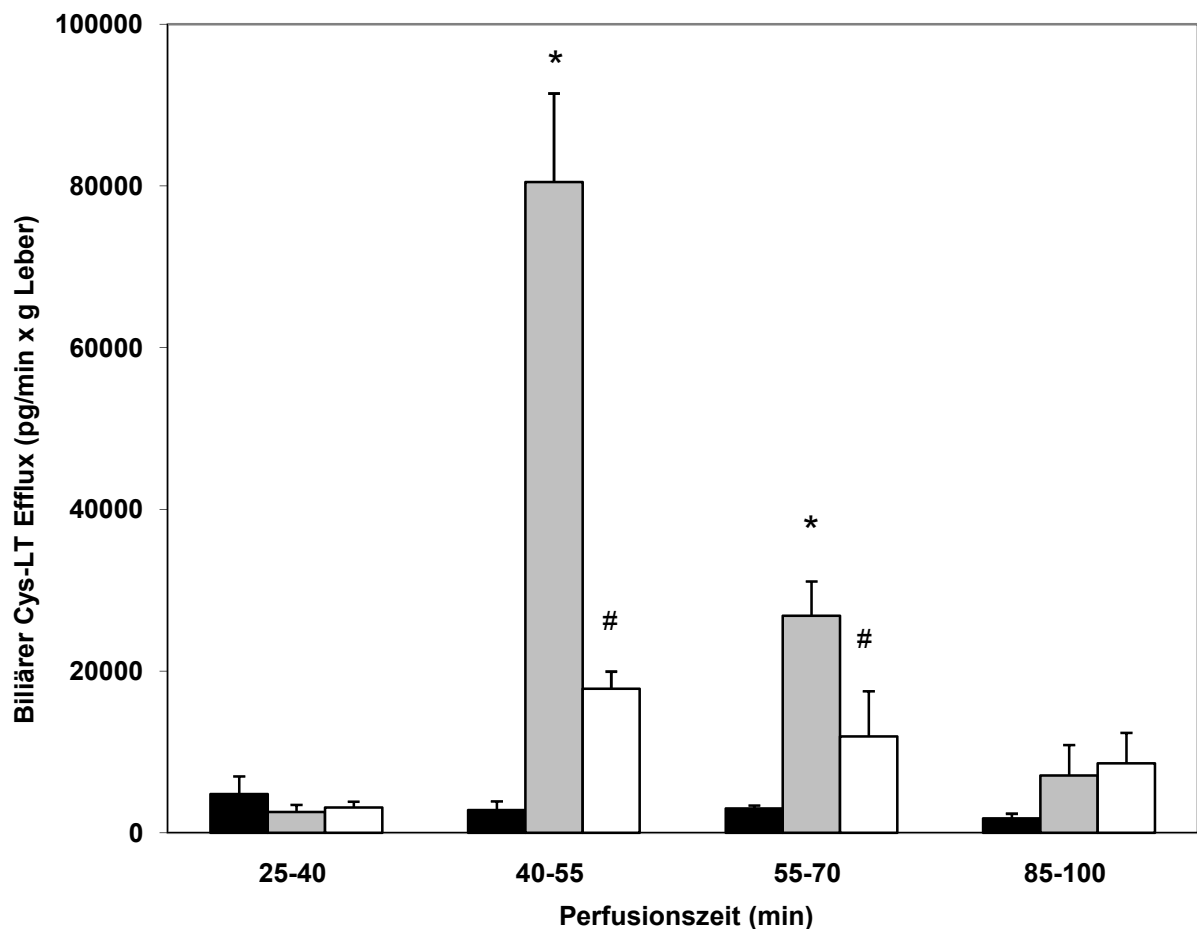
### 4.3 Hepatische Cys-LT-Bildung nach KS-Aktivierung

Es war im Vorfeld bekannt, dass Cys-LT über ausgeprägte vasokonstriktorische Eigenschaften im hepatischen Gefäßbett verfügen (Bilzer, 1993). Auch war durch die Aktivierung isolierter KS durch Zymosan eine Freisetzung von Cys-LT beobachtet worden (Decker 1990). Deshalb haben wir im ersten Schritt untersucht, ob sich im Model der isoliert perfundierten Rattenleber nach KS-Aktivierung erhöhte Cys-LT Konzentrationen im Leberperfusat nachweisen lassen. Mittels des verwendeten Cysteinyl-Leukotrien EIA ließen sich jedoch nach KS-Aktivierung durch Zymosan keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollperfusion feststellen (Abb. 19).



**Abb. 19: Kein Effekt der KS-Aktivierung auf sinusoidale Cys-LT Efflux-Raten.** Zymosan (Zy, 150  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n=6$ ) wurde von der 40. bis zur 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (◆,  $n=6$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (■,  $n=5$ ) konnte keine signifikante Änderung der Cys-LT- Effluxraten im Leberperfusat nachgewiesen werden.

Da Cys-LT äusserst effizient von Hepatozyten aufgenommen und in die Galle ausgeschieden werden, folgte im nächsten Schritt die Bestimmung der Cys-LT in der Galle. Tatsächlich fanden sich hier nach KS-Aktivierung massiv erhöhte Cys-LT Werte im Vergleich zur Kontrollperfusion ohne Zymosan (Abb. 20). Nach funktioneller Inaktivierung der KS mittels Gadoliniumchlorid ( $GdCl_3$ ) kam es zu einer signifikanten Abschwächung der biliären Cys-LT Ausscheidung, während sich der Gallefluss im Vergleich zur alleinigen Zymosaninfusion nicht änderte (Abb. 18 C).

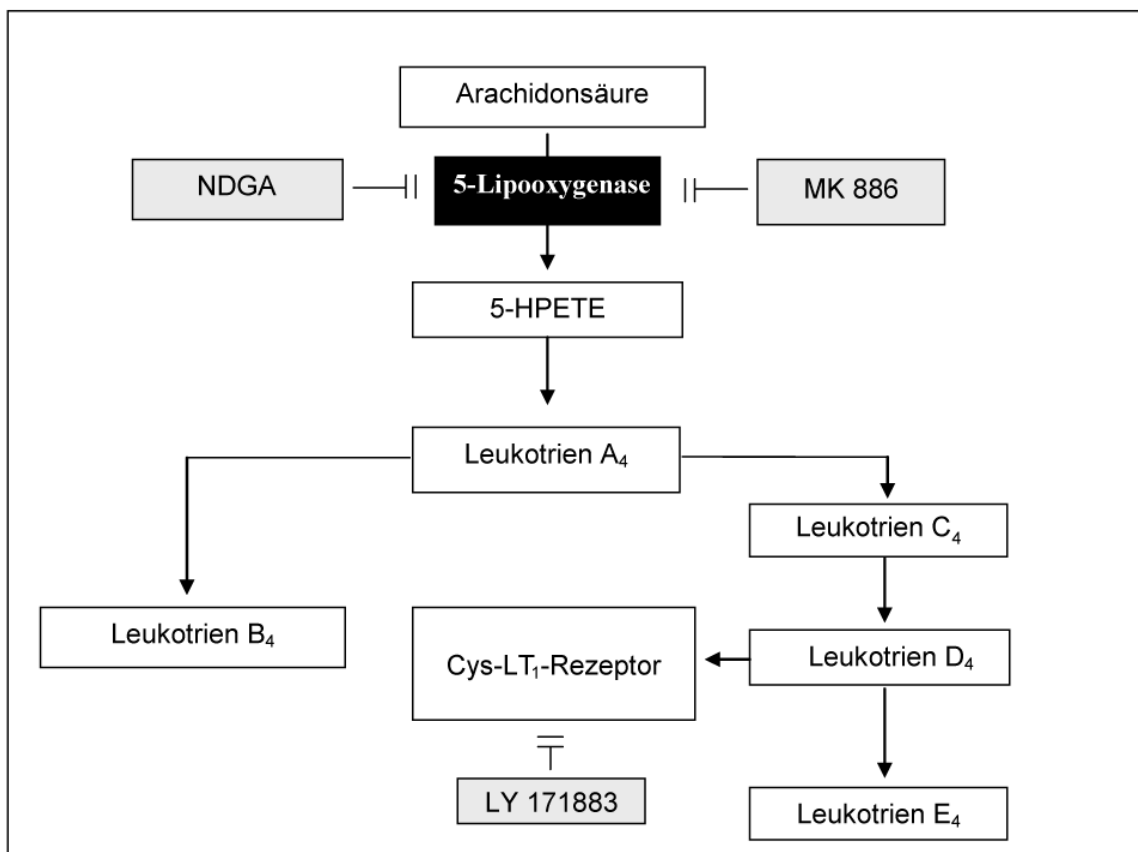


**Abb. 20: Massive Stimulation der biliären Cys-LT Exkretion nach KS-Aktivierung.** Dargestellt sind die biliären Cys-LT Werte, bestimmt aus gepoolter (15 min) Galle. Nach KS-Aktivierung durch Zymosan (■, 150  $\mu g/ml$  40. – 46. min., n=6) kam es im Vergleich zur Kontrollperfusion ohne Zymosan (■, n=6) zu einem massiven Anstieg der Cys-LT-Ausscheidung in die Galle. Durch Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid (□, n=6) konnte der Cys-LT-Anstieg signifikant reduziert werden.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und Zymosan plus  $GdCl_3$ ; # $p < 0.05$  vs. Zymosan.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die Beteiligung der Cys-LT an der durch KS-Aktivierung ausgelösten portalen Hypertension grundsätzlich möglich.

#### 4.4 Funktionelle Bedeutung der hepatischen Cys-LT Bildung nach KS-Aktivierung

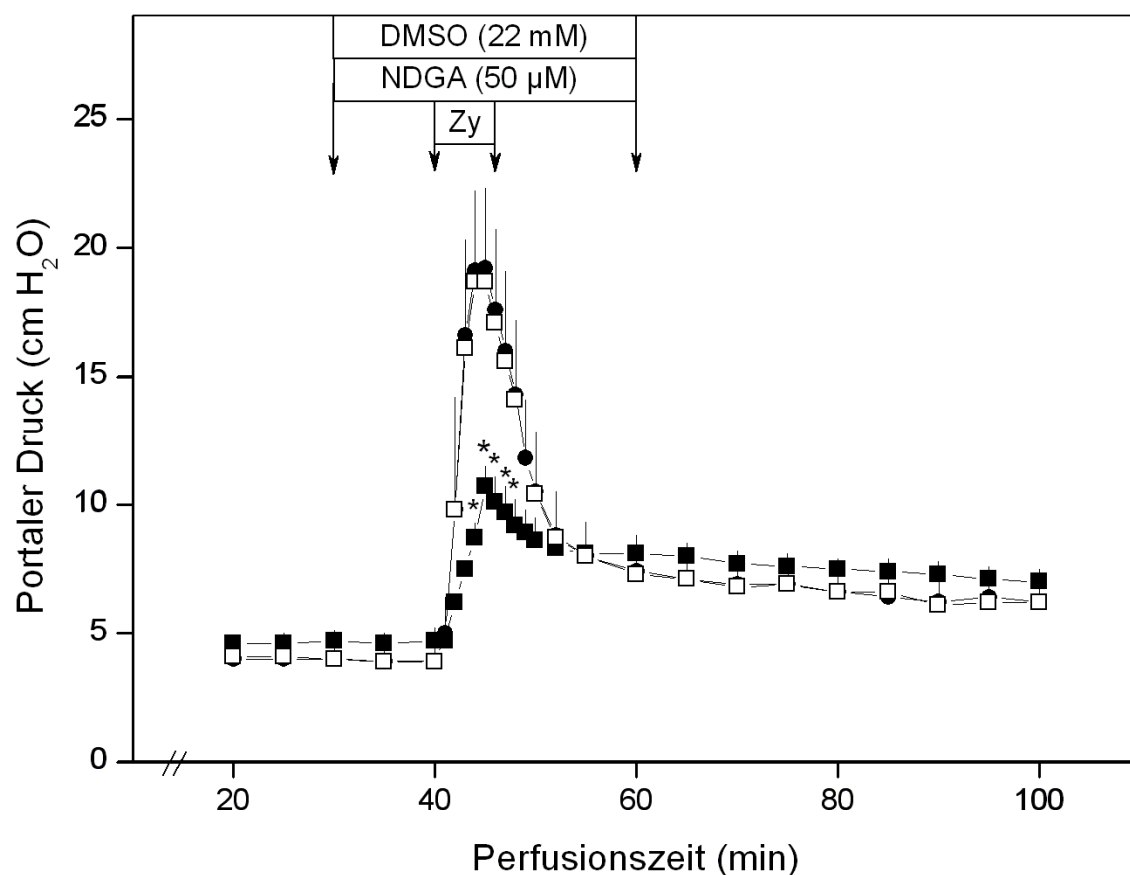
Nachdem der Nachweis einer gesteigerten Cys-LT-Bildung nach KS-Aktivierung erbracht war, zielten die folgenden Experimente darauf ab, eine mögliche funktionelle Bedeutung der Cys-LT-Bildung zu untersuchen. Die diesbezüglich relevanten Stoffwechselwege und Inhibitoren sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abb. 21: Lipoxygenase-Weg: Verwendete Inhibitoren und Antagonisten.** Detaillierte Beschreibung im Text. 5-HPETE= Hydroperoxy-Eikosatetraensäure.

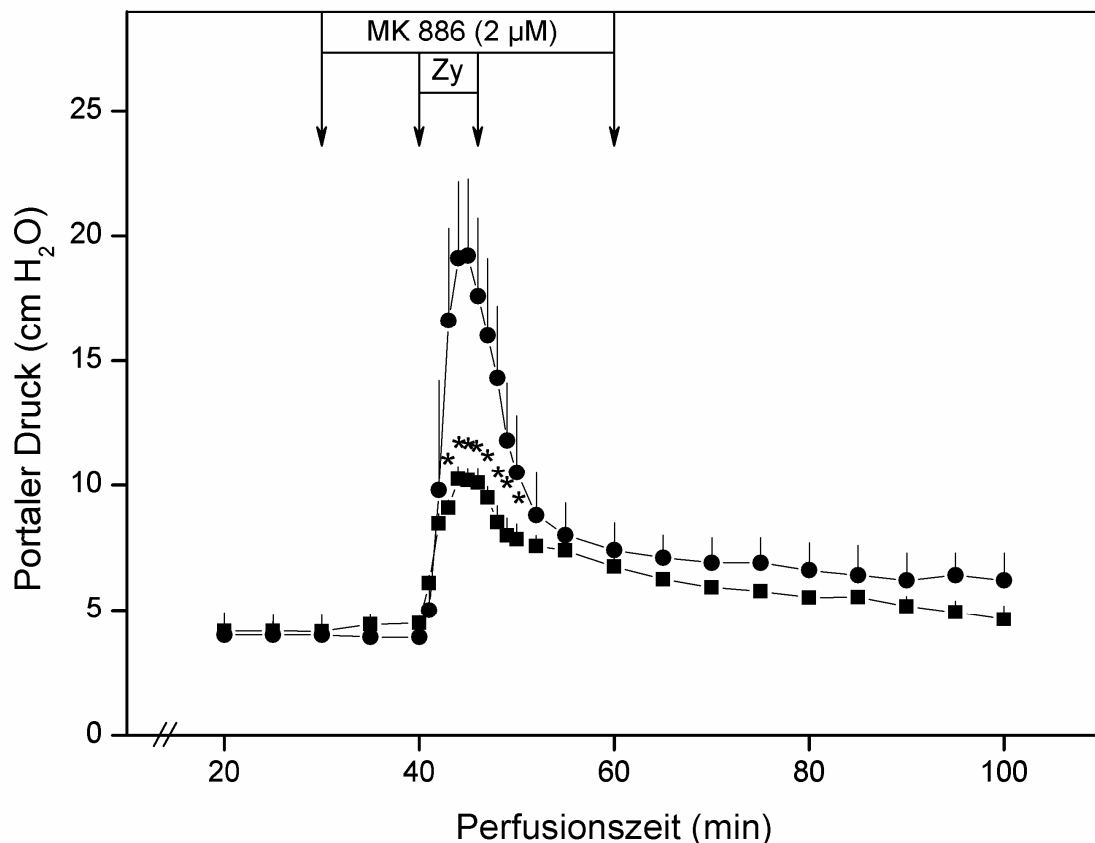
Bei der Verstoffwechslung der Arachidonsäure zu Leukotrienen stellt die 5-Lipoxygenase ein Schlüsselenzym dar. Deshalb wurde im ersten Schritt der Einfluss des klassischen 5-LPO-Inhibitors NDGA auf den portalen Druckanstieg nach Zymosaninfusion untersucht (Abb. 22). NDGA (50 µM) wurde von der 30. – 60.

Minute nach Beginn der Perfusion infundiert, Zymosan (150 µg/ml) von der 40. – 46. Minute. Die Infusion von NDGA führte zu einer signifikanten ( $p < 0.05$ ) Reduktion des maximalen portalen Druckes im Vergleich zur alleinigen Zymosanzufuhr. Da NDGA sowie auch die später untersuchten Inhibitoren MK 886 und LY 171883 in DMSO aufgelöst wurden, war die Untersuchung einer separaten DMSO-Gruppe erforderlich. Wie in Abb. 22 dargestellt, führte die Infusion von DMSO (22 mM) über insgesamt 30 Minuten zu keiner Beeinflussung der portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung durch Zymosan.



**Abb. 22: Lipooxygenase Hemmung durch NDGA vermindert den portalen Druckanstieg nach KS-Aktivierung.** Die kombinierte Infusion von Zymosan (Zy, 150 µg/ml) und NDGA (50 µM) (■, n=4) führte zu einer signifikanten Reduktion des maximalen portalen Druckanstieges im Vergleich zur alleinigen Zymosan-Infusion (●, n=6). Der Lösungsvermittler DMSO (22 mM, □, n=5) hatte dagegen keinen Einfluss auf den Verlauf des portalen Druckes.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Zymosan und Zymosan plus DMSO.

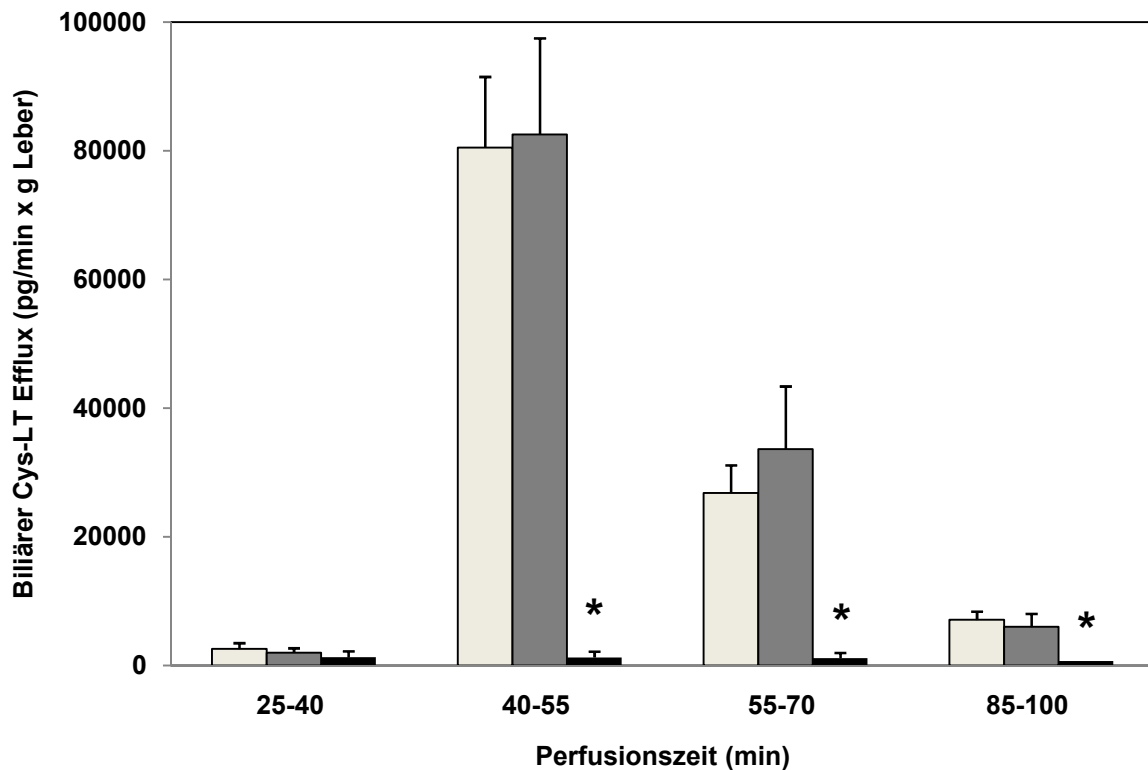
Im nächsten Schritt wurde der spezifische 5-LPO-Inhibitor MK 886 untersucht. MK 886 (2  $\mu\text{M}$ ) wurde, wie zuvor NDGA, von der 30. - 60. Minute infundiert. Wie bereits mit NDGA, führte auch die Behandlung mit MK 886 zu einer signifikanten Reduktion des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung (Abb. 23).



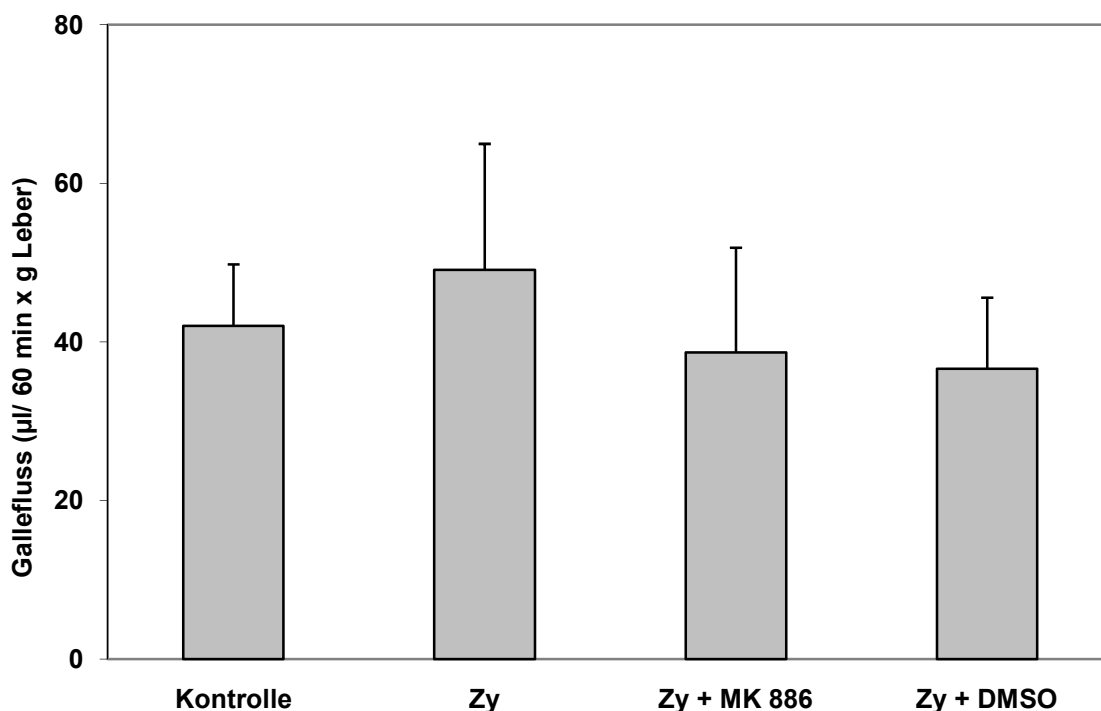
**Abb. 23: Lipooxygenase-Hemmung durch MK 886 reduziert den portalen Druckanstieg nach KS-Aktivierung.** Die kombinierte Infusion von Zymosan (Zy, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und MK 886 (2  $\mu\text{M}$ ) (■,  $n=6$ ) führte zu einer signifikanten Reduktion des maximalen portalen Druckanstieges im Vergleich zur alleinigen Zymosan-Infusion (●,  $n=5$ ).  $x \pm \text{SD}$ ; \* $p < 0.05$  vs. Zymosan.

Erwartungsgemäss führte MK 886 zu einer vollständigen Prävention der biliären Cys-LT Ausscheidung nach KS Aktivierung (Abb. 24 A), während der Gallefluss durch diesen Inhibitor nicht beeinflusst wurde (Abb. 24 B). Ein vergleichbarer inhibitorischer Effekt auf die biliäre Cys-LT-Freisetzung wurde auch bei  $\text{GdCl}_3$ -behandelten Lebern beobachtet (Abb. 20). Aktivierte KS führen somit zu einer massiven Steigerung der

hepatischen Cys-LT-Bildung mit vermehrter Exkretion in die Galle. Der Lösungsvermittler DMSO hatte keinen Einfluss auf die Cys-LT Freisetzung.

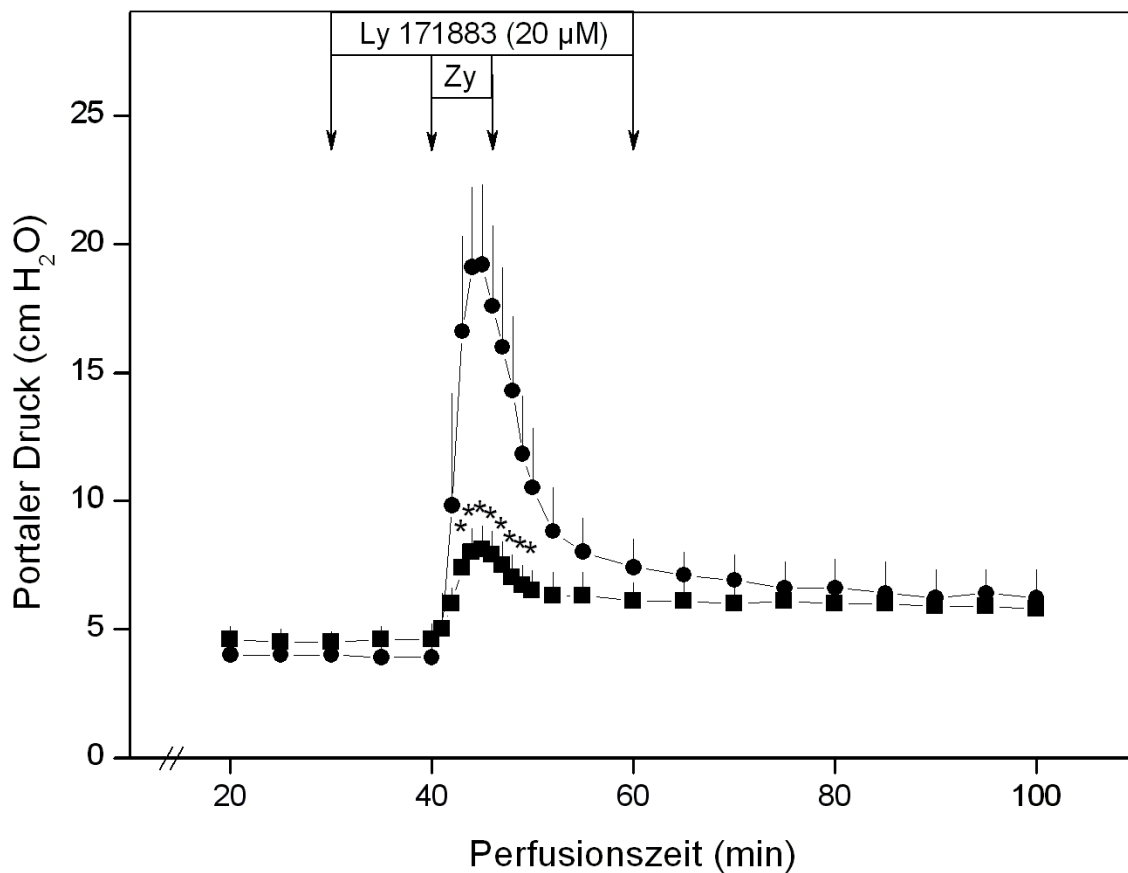


**Abb. 24 A: Gesteigerte biliäre Cys-LT Exkretion nach KS-Aktivierung: Reduktion durch 5-LPO Hemmung.** Nach KS-Aktivierung durch Zymosan (■, 150 µg/ml 40. – 46. min., n=5) kam es zu einem massiven Anstieg der Cys-LT-Ausscheidung in die Galle, nicht aber im Falle einer Hemmung der 5-LPO mittels MK 886 (2 µM, ■, n=6). Der Lösungsvermittler DMSO (22 mM, ■, n=5) zeigte keinen Einfluss auf die Cys-LT Freisetzung.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Zymosan und Zymosan plus DMSO.



**Abb. 24 B: Kein Einfluss von MK 886 und DMSO auf den Gallefluss nach KS-Aktivierung.** Dargestellt sind die kumulativen Galleflüsse zwischen der 40.-100. Minute der Leberperfusion. Die Galleflüsse wiesen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede auf.

Da vasokonstriktische Effekte der Cysteinyl-Leukotriene vorwiegend durch den sogenannten Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptor vermittelt werden, untersuchten wir im nächsten Schritt die Wirkung des selektiven Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten LY 171883 auf den portalen Druckanstieg nach Zymosaninfusion. Die Behandlung der Lebern mit LY 171883 (20 µM) führte ebenso wie bereits die 5-LPO Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung des maximalen portalen Druckanstiegs im Vergleich zur Zymosangruppe (Abb. 25). Die Cys-LT-Effekte in der Leber scheinen somit zumindest teilweise über den Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptor (synonym LTD<sub>4</sub>-Rezeptor) vermittelt zu sein. Zusammenfassend unterstützen die bisherigen Ergebnisse das Konzept der Cys-LT-medierten Erhöhung des portalen Druckes nach KS-Aktivierung.



**Abb. 25: Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Erhöhung des Pfortaderdruckes nach KS-Aktivierung.** Durch Infusion von LY 171883 (■, 20 μM, n=5) wurde der portale Druckanstieg durch Zymosan (●, Zy, 150 μg/ml, n=6) signifikant reduziert.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Zymosan.



#### **4.5 Sinusoidale Konstriktion nach KS-Aktivierung *in vivo*: Kein Einfluss von MK 886**

Die am Modell der isolierten Rattenleberperfusion gewonnenen Ergebnisse einer Cys-LT-abhängigen portalen Druckerhöhung, könnte auf Grund der bislang vorliegenden Informationen auf eine HS-Zell Kontraktion mit hierdurch bedingter sinusoidaler Konstriktion zurückzuführen sein (Kawada N *et al.*, 1992). Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgten *in vivo*-Experimente in Kombination mit dem Verfahren der Intravitalmikroskopie zur Bestimmung der Sinusoid-Durchmesser während der Zufuhr von Zymosan. Die Untersuchungen zeigten bei Sham-operierten Ratten entlang der Sinusoide mit der Literatur vereinbare unterschiedliche Durchmesser (Abb. 26 A-C). Die weitesten Durchmesser fanden sich hierbei perizentral ( $11.9 \pm 1.2 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zur periportal ( $9.98 \pm 0.99 \mu\text{m}$ ) und midzonalen Region ( $10.52 \pm 1.02 \mu\text{m}$ ). Während der KS-Aktivierung mittels Zymosan ( $30 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g Leber}$ ), kam es zu einer tendenziellen Abnahme der sinusoidalen Durchmesser in allen 3 Segmenten, was auf eine sinusoidale Konstriktion hinweist. Diese Abnahme erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Durch die Gabe des 5-LPO-Inhibitors MK 886 ( $6 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{g Leber}$ ) kam es zu keiner wesentlichen Abschwächung der sinusoidalen Konstriktion nach KS-Aktivierung mit Zymosan. Diese Ergebnisse zeigen die mögliche Beteiligung einer sinusoidalen Konstriktion an der portalen Druckerhöhung durch aktivierte Kupferzellen. Die fehlende Wirksamkeit des 5-LPO-Inhibitors MK 886 unterstützt dabei einen Cys-LT unabhängigen Mechanismus der sinusoidalen Konstriktion.

Abb. 26 A, periportal

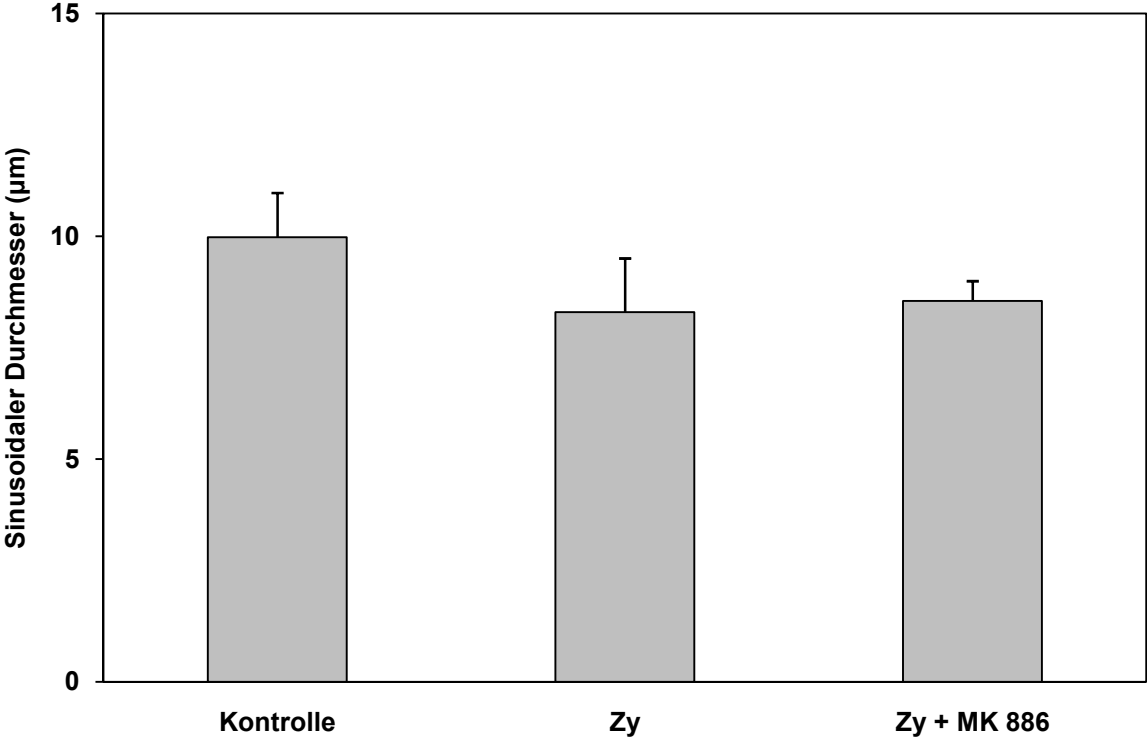


Abb. 26 B, midzonal

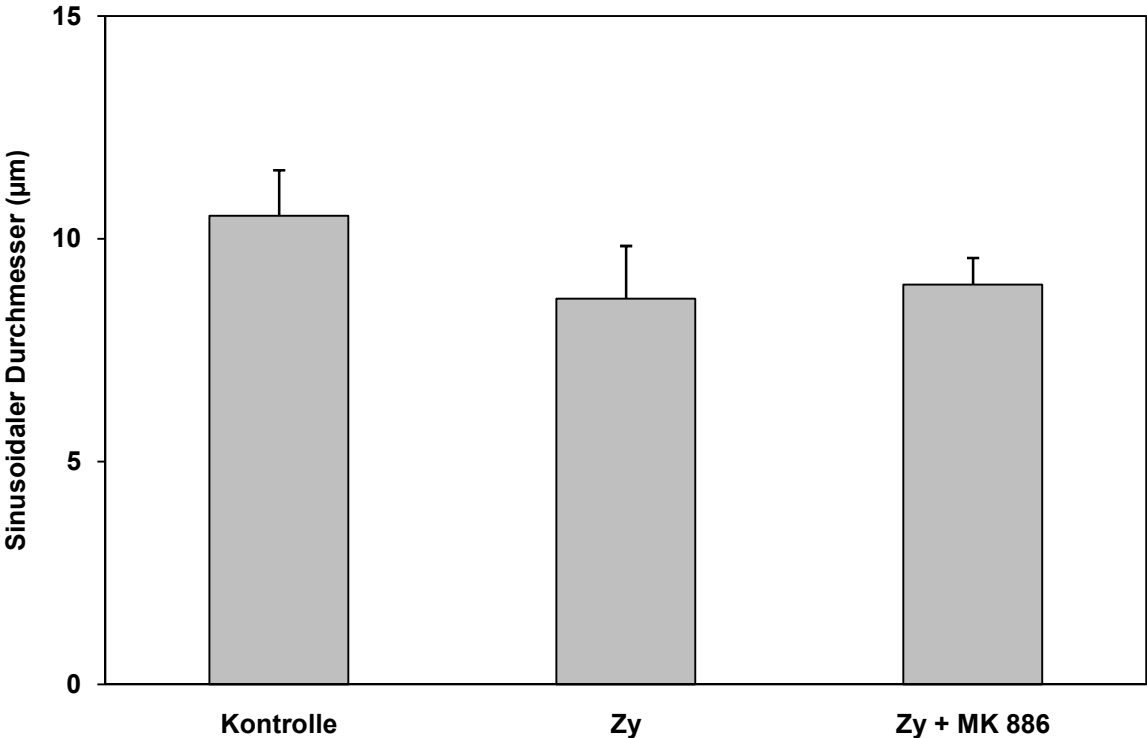
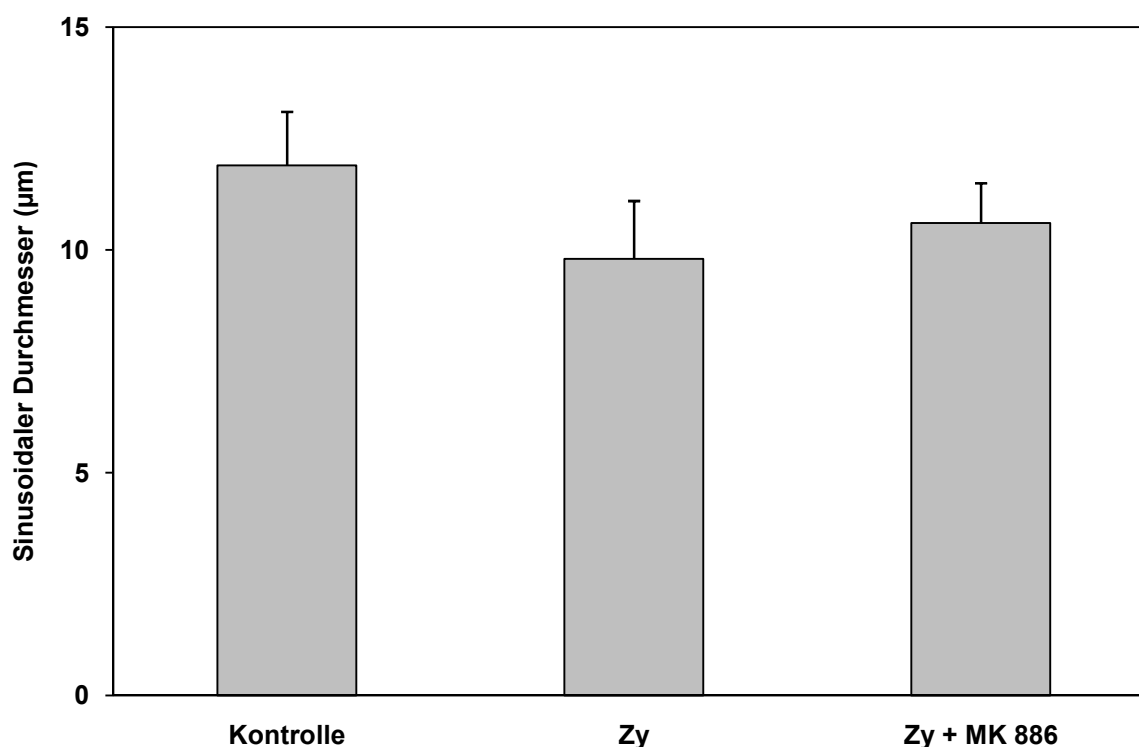


Abb. 26 C, perizentral

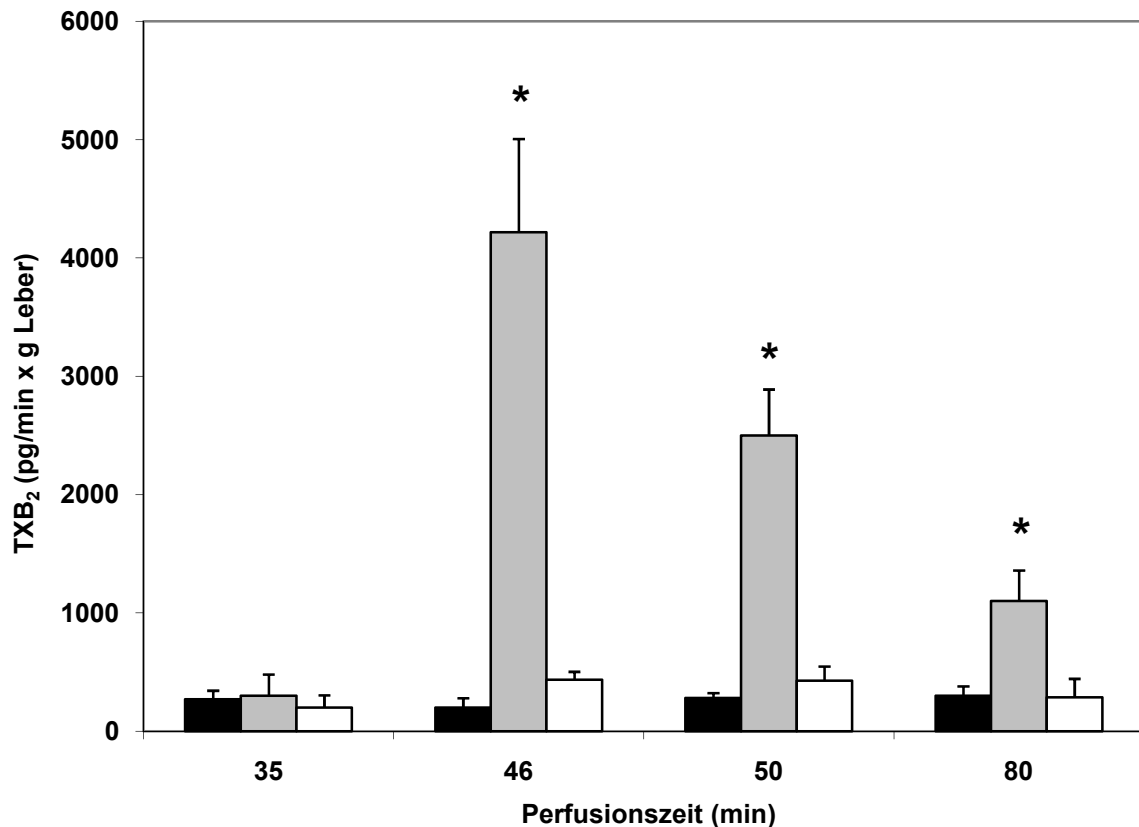


**Abb. 26 A-C: Nicht-signifikante Abnahme der sinusoidalen Durchmesser nach KS-Aktivierung in vivo.** Die Gabe von Zymosan ( $30 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g Leber}$ ) über die *V. gastrica sinistra* in die Pfortader führte zu einer nicht-signifikanten Verminderung der sinusoidalen Durchmesser. Diese Verminderung war perizentral (pz) besonders ausgeprägt. Die Abnahme der sinusoidalen Durchmesser nach KS-Aktivierung wurde durch die Gabe von MK 886 ( $6 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{g Leber}$ ) in allen 3 Regionen (periportal, midzonal und perizentral) nicht signifikant beeinflusst ( $n=5$ ).

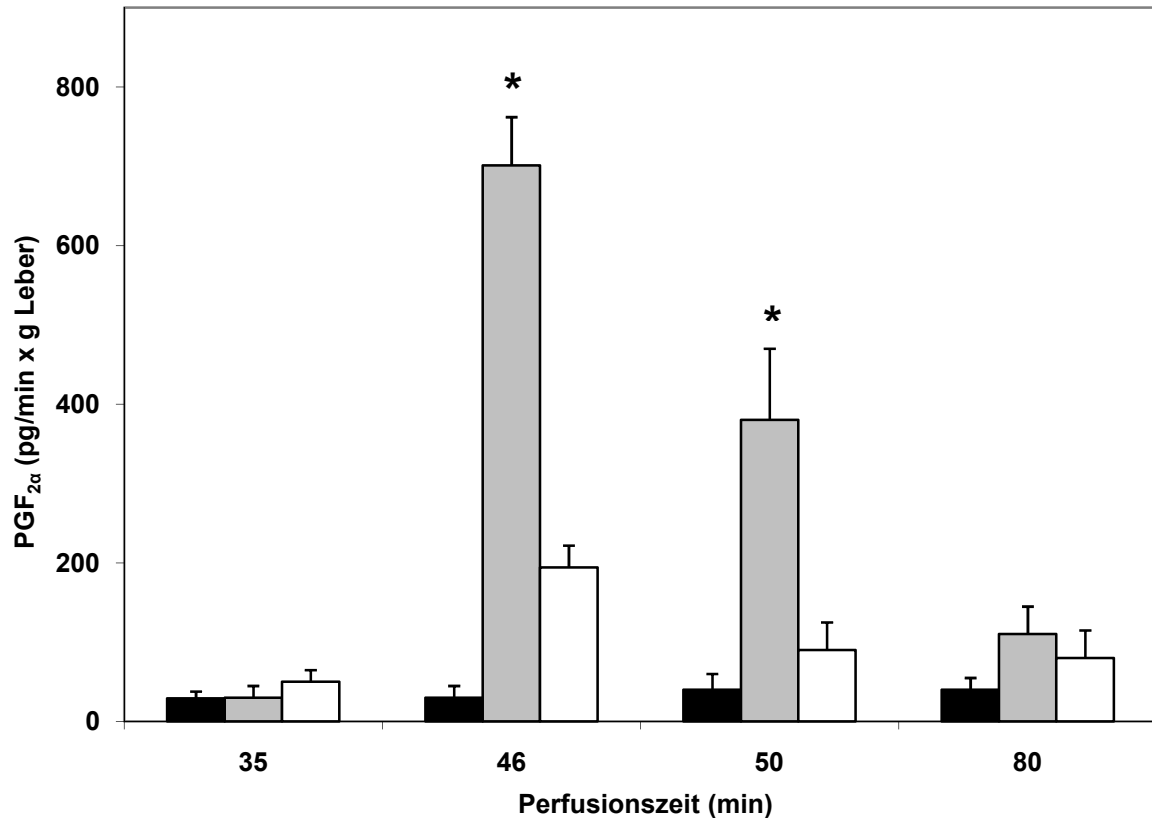
#### 4.6 Portaler Druckanstieg nach KS-Aktivierung durch $\text{TXA}_2$

Neben den Cys-LT wird auch den Prostaglandinen und insbesondere dem Prostanoid Thromboxan  $\text{A}_2$  eine wesentliche Rolle als Mediator des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung zugeschrieben. An isolierten KS wurde eine Freisetzung vasokonstriktorisch wirksamer Prostanoiden nach Aktivierung mit Zymosan beschrieben. Mit dieser Beobachtung vereinbar, kam es zu einem massiven Anstieg der vasokonstriktorischen Prostanoiden  $\text{F}_{2\alpha}$  und  $\text{D}_2$  sowie von  $\text{TXB}_2$  (ein stabilerer Metabolit des instabilen  $\text{TXA}_2$ ) im Leberperfusat nach Zymosanbehandlung (Abb. 27 A-C). Der portale Druck und die PG-Freisetzung verliefen dabei nahezu parallel. Durch Blockade der KS mittels  $\text{GdCl}_3$ -Vorbehandlung

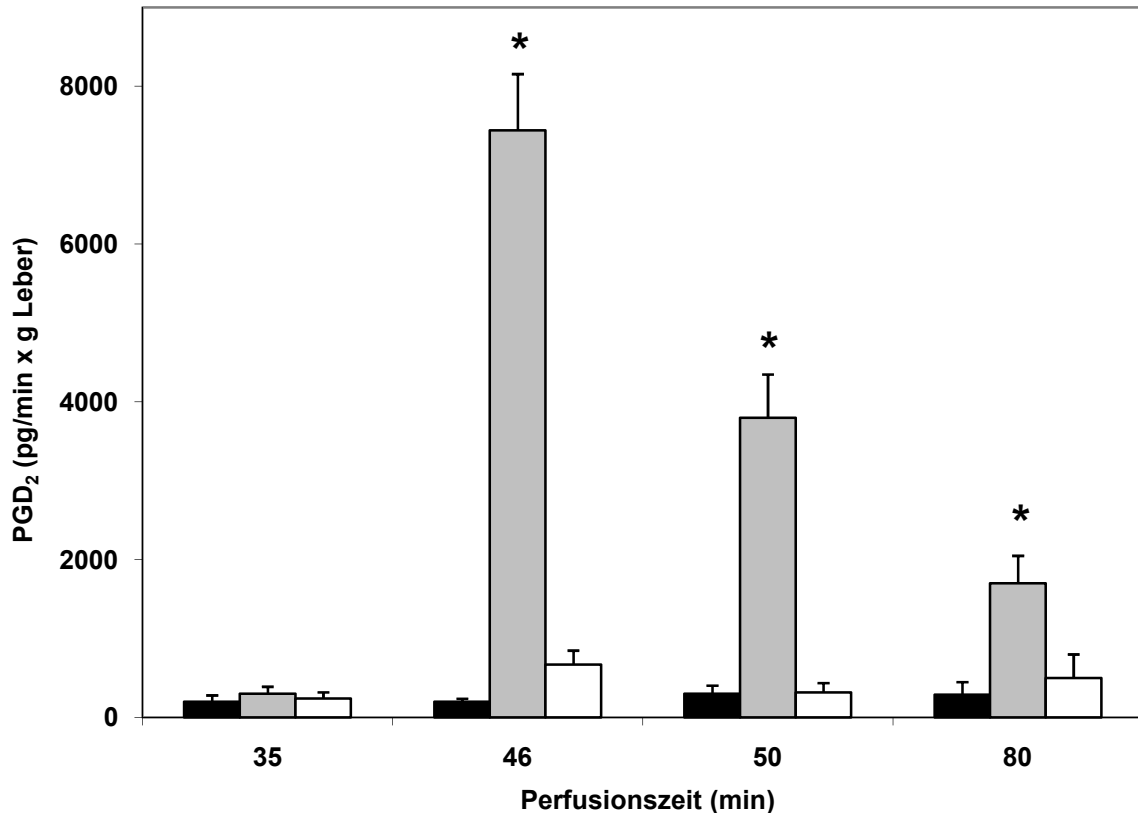
zeigte sich eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Verminderung der Prostaglandin-Ausscheidung. Diese Ergebnisse unterstützen eine COX-medierte Erhöhung des portalen Druckes nach KS-Aktivierung.



**Abb. 27 A: Massive Zunahme der hepatischen Thromboxan B<sub>2</sub>-Ausscheidung nach KS-Aktivierung.** Parallel zum Anstieg des portalen Druckes (nicht abgebildet) nach KS-Aktivierung mit Zymosan (■, 150 µg/ml, 40.-46. Minute, n=6) kam es im Vergleich zur Kontrollperfusion (■, n=6) zu einem massiven ( $p < 0.05$ ) Anstieg der TXB<sub>2</sub>-Ausscheidung in das Leberperfusat. Diese Beobachtung lässt auf eine Beteiligung vasokonstriktorischer Prostanoiden bei der durch KS-Aktivierung induzierten portalen Druckerhöhung schließen. Durch Vorbehandlung mit GdCl<sub>3</sub> (□, n=6) konnte der durch Zymosan stimulierte TXB<sub>2</sub>-Efflux beinahe vollständig verhindert werden.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und Zymosan plus GdCl<sub>3</sub>.

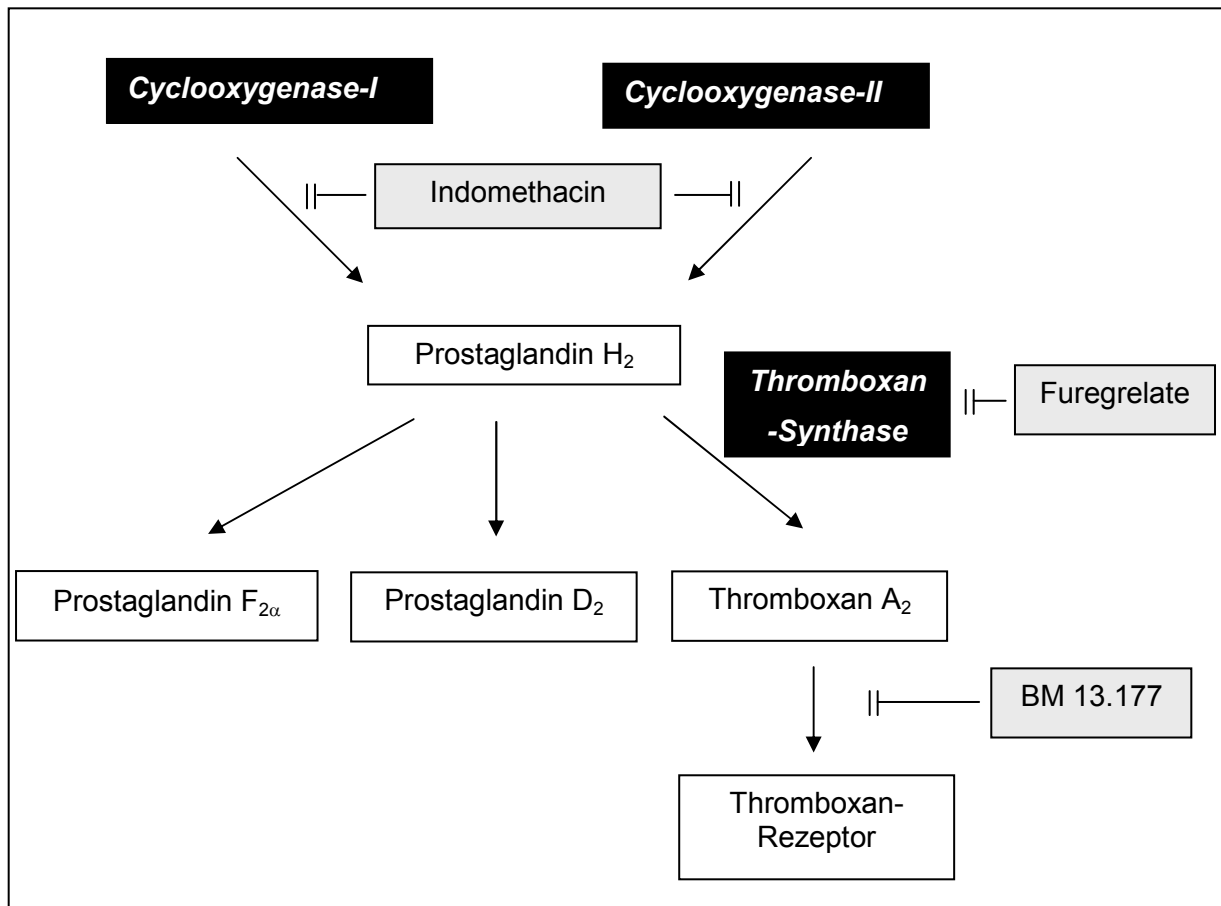


**Abb. 27 B: Massive Zunahme der hepatischen  $PGF_{2\alpha}$ -Freisetzung nach KS-Aktivierung.** Parallel zum Anstieg des portalen Druckes (nicht abgebildet) nach KS-Aktivierung mit Zymosan (■, 150 $\mu$ g/ml, 40.-46. Minute, n=6) kam es zu einem signifikanten ( $p < 0.05$ ) Anstieg der Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -Effluxraten im Vergleich zur Kontrollperfusion (■, n=6). Durch Vorbehandlung mit  $GdCl_3$  (□, n=6) wurde der durch Zymosan stimulierte sinusoidale Efflux von  $PGF_{2\alpha}$  nahezu vollständig verhindert.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und Zymosan plus  $GdCl_3$ .



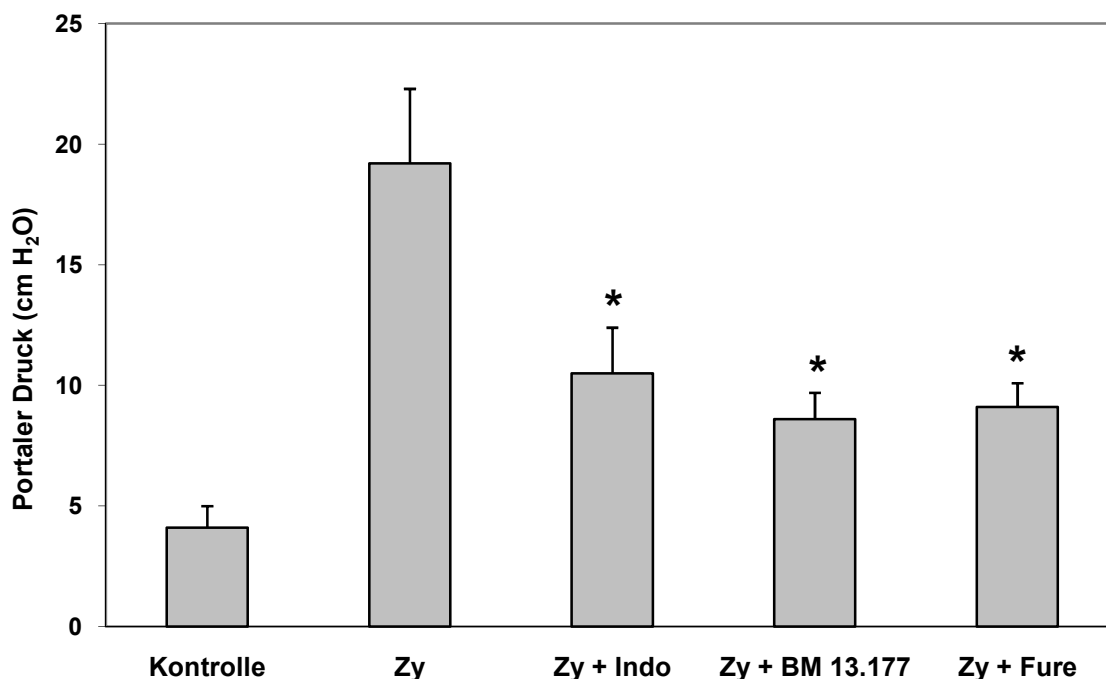
**Abb. 27 C: Massive Zunahme der hepatischen PGD<sub>2</sub>-Ausscheidung nach KS-Aktivierung.** Nach KS-Aktivierung mit Zymosan (■, 150µg/ml, 40.-46. Minute, n=6) kam es im Vergleich zur Kontrolle (■, n=6) zu einem signifikanten ( $p < 0.05$ ) Anstieg der sinusoidalen Prostaglandin D<sub>2</sub>-Effluxraten. Letztere konnten durch Vorbehandlung mit GdCl<sub>3</sub> (□, n=6) nahezu vollständig unterdrückt werden.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und Zymosan plus GdCl<sub>3</sub>.

Wie in den Experimenten der Abbildung 27 aufgezeigt, führt die Aktivierung von KS zu einer Freisetzung von Prostanoiden mit vasokonstriktorischem Potential. Im weiteren Verlauf sollte nun die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung in Bezug auf den portalen Druck aufgezeigt werden. Die hierfür eingesetzten Inhibitoren und ihre Angriffspunkte im jeweiligen Stoffwechselweg sind in Abb. 28 dargestellt.



**Abb. 28: Cyclooxygenase-Weg: Verwendete Inhibitoren und Antagonisten.**  
 Detaillierte Beschreibung im Text.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppen war bereits gezeigt worden, dass von den Prostanoiden TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und D<sub>2</sub> primär TXA<sub>2</sub> als ein entscheidender Mediator des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung anzusehen ist. Deshalb wurde in den Experimenten der Abb. 29 neben dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin (50 μM), Furegrelate (50 μM), ein Thromboxan-Synthasehemmer sowie BM 13.177 (20 μM), ein spezifischer TXA<sub>2</sub> Rezeptorantagonist untersucht (Abb. 28). Alle genannten Verbindungen bewirkten eine signifikante (p<0.05), ca. 50-prozentige Verminderung des portalen Druckanstieges durch Zymosan.



**Abb. 29: Einfluss von TXA<sub>2</sub>-Inhibitoren auf den portalen Druck.** Die Hemmung der Cyclooxygenase durch Indomethacin (50  $\mu$ M, n=5), führte ebenso wie die Blockade des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors durch BM 13.177 (20  $\mu$ M, n= 5) und die Hemmung der Thromboxansynthase durch Furegrelate (50  $\mu$ M, n=4), zu einer signifikanten ( $p<0.05$ ) Reduktion des maximalen portalen Druckanstieges nach Zymosan Gabe (Zy, n=6).  $\bar{x} \pm SD$ ; \* $p<0.05$  vs. Zymosan.

#### 4.7 Vergleich der separaten und gleichzeitigen Hemmung von COX- und 5-LPO Wegen

Da in den oben beschriebenen Experimenten durch Hemmung der TXA<sub>2</sub>- und Cys-LT –Wege jeweils eine ca. 50%ige Verminderung des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung nachgewiesen werden konnte, stellte sich im nächsten Schritt die Frage nach einer additiven Wirkung dieser Wirkstoffe. In weiteren Experimenten erfolgte deshalb die kombinierte Gabe von LY 171883 mit Indomethacin bzw. mit BM 13.177, sowie von NDGA mit Indomethacin. Anstatt der erwarteten additiven Wirkung, ergab sich durch diese Kombination jedoch abermals nur eine 50-prozentige Verminderung des Druckanstieges nach KS-Aktivierung (Abb. 30 A-C), wie er bereits bei der Gabe der Einzelsubstanzen beobachtet worden war. Somit erscheint eine additive vasokonstriktorische Wirkung der Eicosanoide TXA<sub>2</sub> und Cys-LT nicht wahrscheinlich. Vielmehr ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse von einer



Vernetzung der genannten Eicosanoide innerhalb eines komplexen Netzwerkes auszugehen.

Abb. 30 A

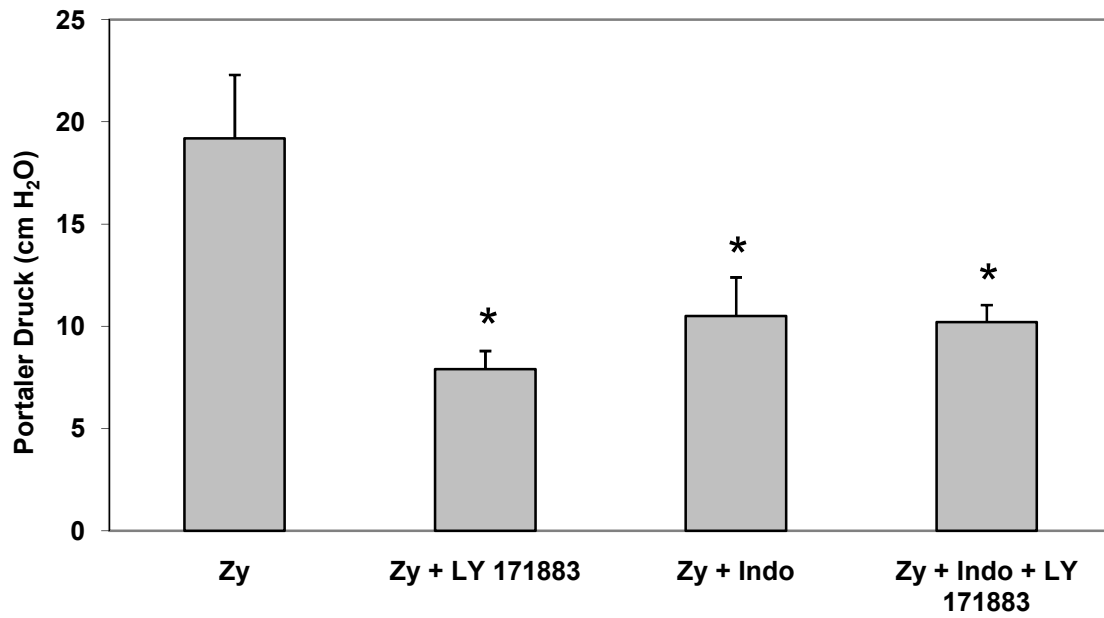


Abb. 30 B

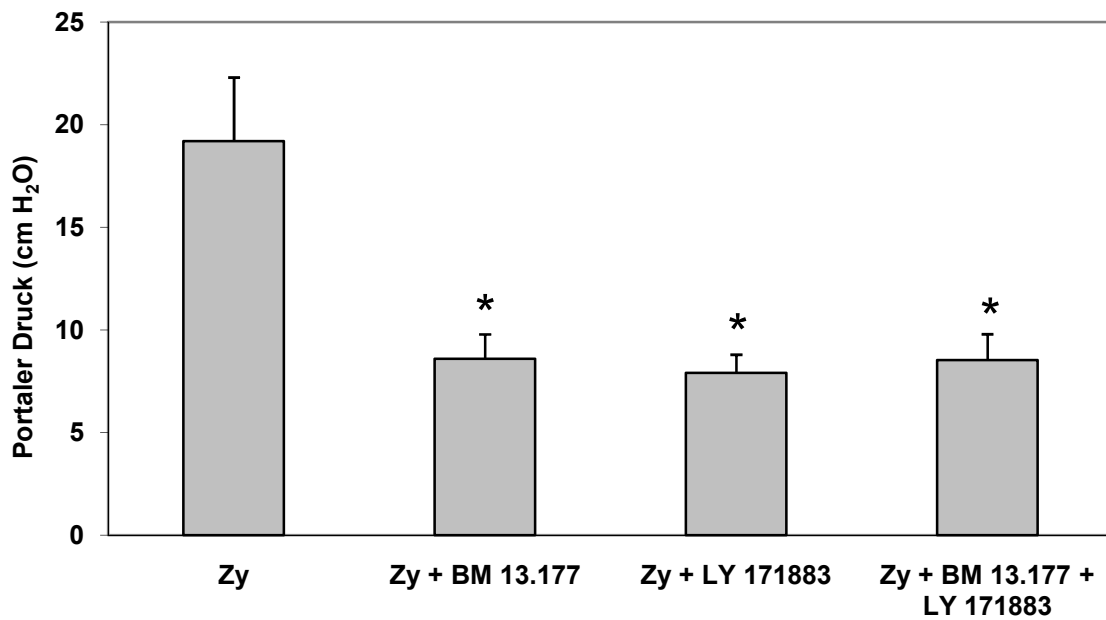
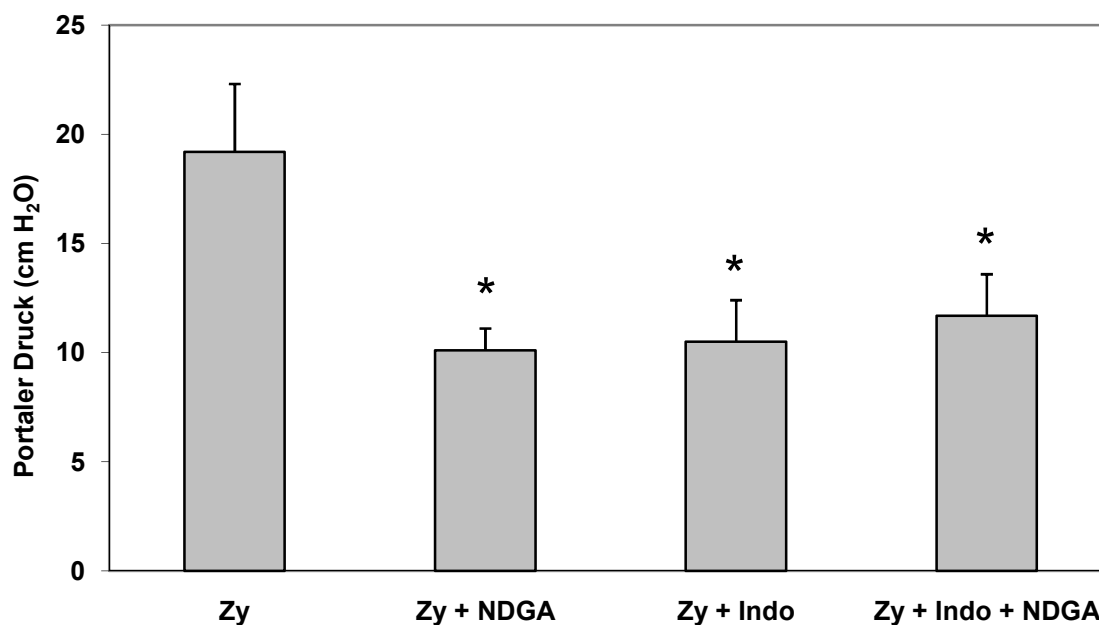


Abb. 30 C

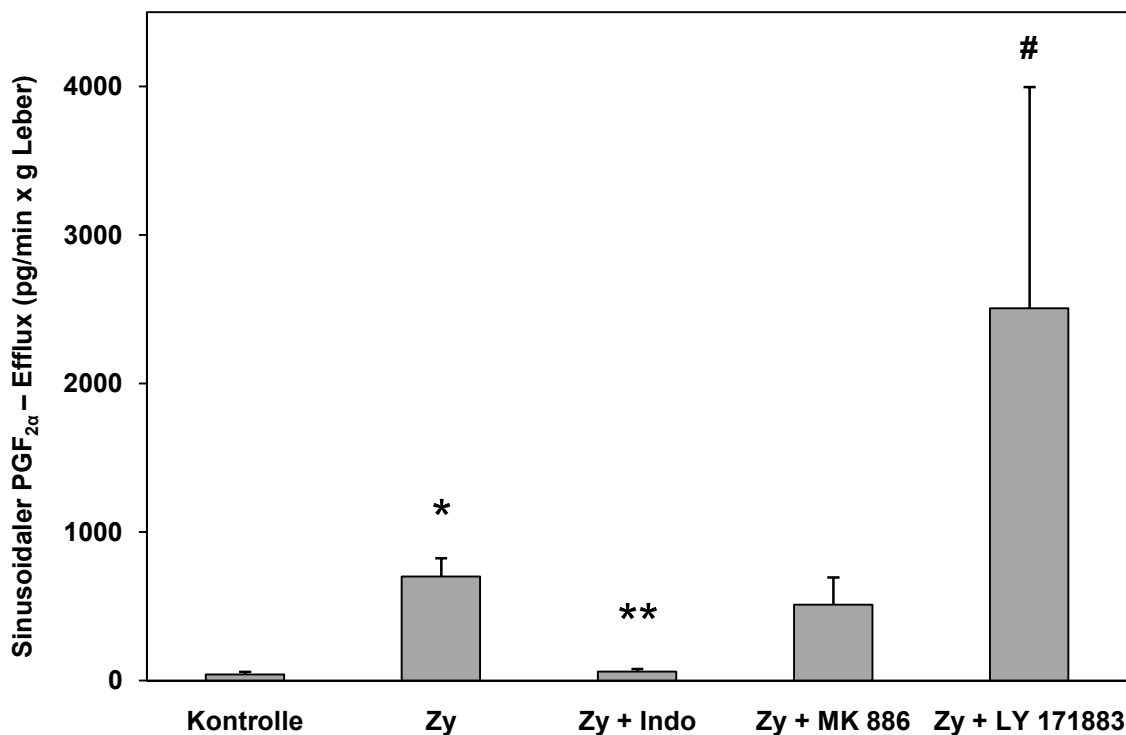


**Abb. 30 A-C: Vergleichbarer Einfluss von Inhibitoren/Antagonisten der Prostanoid- und Cys-LT- Wege auf den portalen Druck nach KS-Aktivierung.** Zymosan (Zy, 150 µg/ml) und Inhibitoren wurden nach dem Versuchsprotokoll der Abbildungen 13-15 verabreicht. Dargestellt sind die maximalen Druckerhöhungen 6 Minuten nach Beginn der Zymosaninfusion. Die Gabe des COX-Inhibitors Indomethacin (50 µM) zusammen mit dem Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten LY 171883 (20 µM) (n=5) (Abb. 30 A), konnte den Druckerhöhung durch Zymosan ebenso signifikant verringern wie die Kombination des Thromboxan A<sub>2</sub>-Antagonisten BM 13.177 (20 µM) mit LY 171833 (20 µM) (n=5) (Abb. 30 B) und die Kombination des 5-LPO Inhibitors NDGA (50 µM) mit Indomethacin (50 µM) (n=5) (Abb. 30 C). Vergleichbare Effekte hatte die alleinige Gabe von LY 171883 (n=5), NDGA (n=4), Indomethacin (n=5) und BM 13.177 (n=5) (Abb. 30 A-C).  $\bar{x} \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Zymosan.

#### 4.8 Beeinflussung der Prostanoid-Bildung durch Hemmung des Cys-LT-Weges

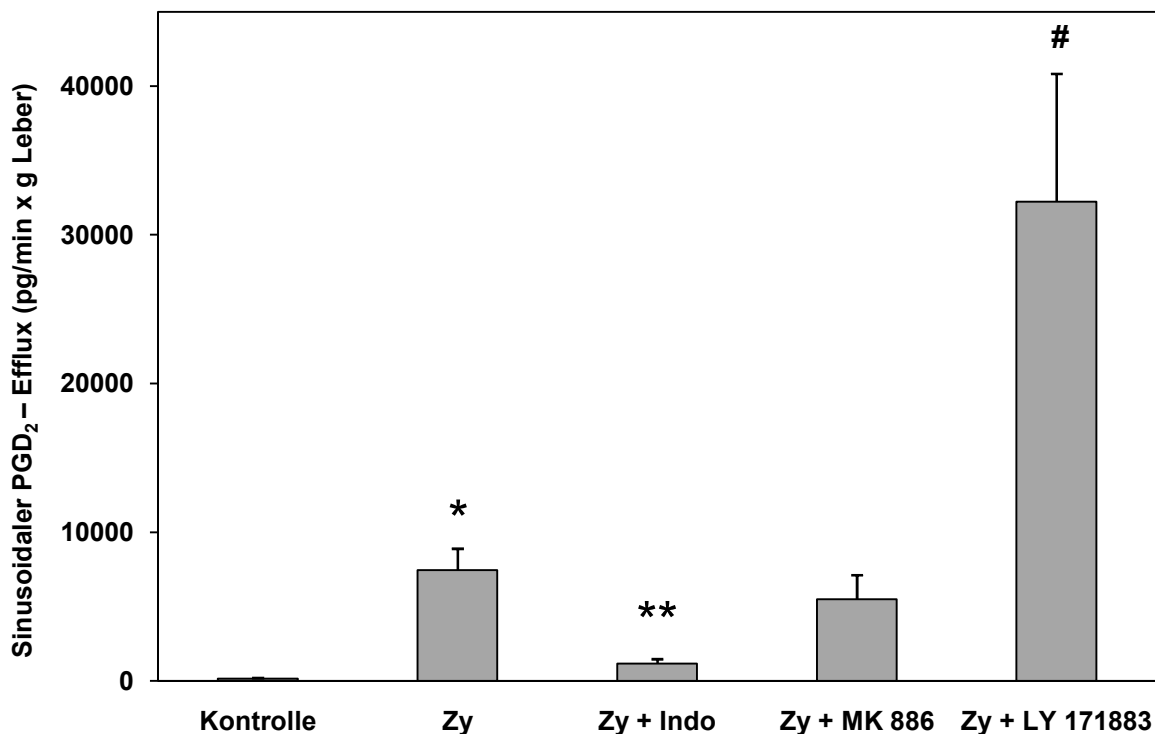
Nach Ausschluss einer additiven druckerhöhenden Wirkung von Cys-LT und TXA<sub>2</sub>, stellte sich im nächsten Schritt die Frage einer Vernetzung dieser Eikosanoide innerhalb eines gemeinsamen Pathways. Es wurde deshalb zunächst eine mögliche Beeinflussung der Prostanoidsynthese durch den 5-LPO-Inhibitor MK 886 bzw. den

Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten LY 171883 untersucht. Eine Vorbehandlung der Lebern mit MK 886 (2 µM) von der 30.-60. Minute hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ausscheidung von PGF<sub>2α</sub> (Abb. 31), PGD<sub>2</sub> (Abb. 32) und TXB<sub>2</sub> (Abb. 33). Dahingegen führte die Vorbehandlung mit Indomethacin (50 µM), ebenfalls von der 30.-60. Minute der Perfusion infundiert, erwartungsgemäss zu einer vollständigen Hemmung der Ausscheidung aller drei Prostanoiden. Überraschend war hingegen die massive Stimulation der Bildung aller drei Prostanoiden im Falle einer Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade durch LY 171883 (20 µM). Dieser Befund zeigt erstmals eine Vernetzung von Cys-LT Rezeptoren und Prostanoid-Synthese in der Leber. Ferner zeigen die Ergebnisse zweifelsfrei, dass die mit MK 886 und LY 171883 beobachteten drucksenkenden Effekte nicht auf einer gleichzeitigen Hemmung der Bildung vasokonstriktorischer Prostanoiden beruhen, bzw. sogar mit einer massiv gesteigerten Prostaglandin-Bildung einhergehen können. Der für alle Inhibitoren verwendete Lösungsvermittler DMSO hatte keinen Einfluss auf die durch Zymosan stimulierten Effluxraten von PGF<sub>2α</sub> (701±79 vs. 690±98 pg/min x g Leber), PGD<sub>2</sub> (7440±990 vs. 7603±830 pg/min x g Leber) und TXA<sub>2</sub> (4218±801 vs. 4135±792 pg/min x g Leber).

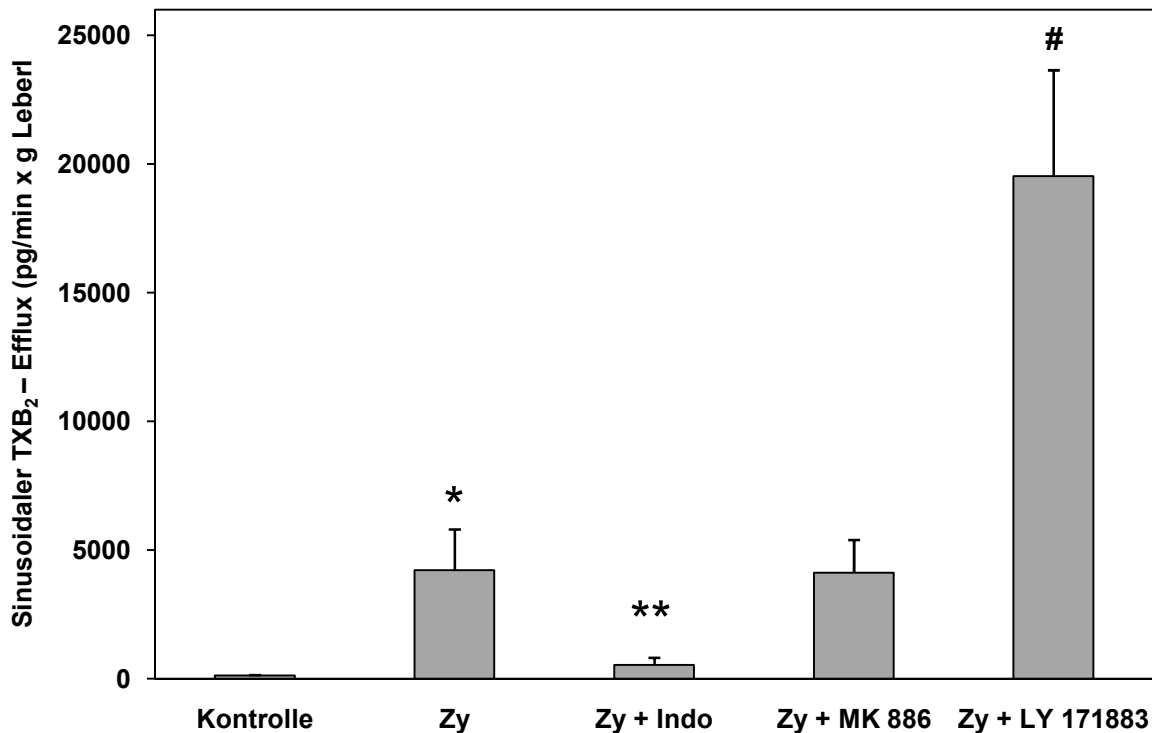


**Abb. 31: Einfluss von MK 886 und LY 171883 auf die Prostaglandin F<sub>2α</sub> Effluxraten Zymosan-behandelter Lebern.** Dargestellt sind die maximalen PGF<sub>2α</sub> Effluxraten zur 46. Minute. Die Gabe des 5-LPO Inhibitors MK 886 (2 µM, n=6) hatte

keinen signifikanten Einfluss auf die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausscheidung. Dagegen führte der COX Inhibitor Indomethacin ( $50 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) zu einer signifikanten Verminderung des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Effluxes. Die Gabe des Cys- $\text{LT}_1$  Rezeptorantagonisten LY 171883 ( $20 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) führte zu einem massiven Anstieg der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausscheidung. Der Lösungsvermittler DMSO hatte keinen Einfluss auf die Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ -Ausscheidung nach Zymosan-Infusion ( $x \pm \text{SD}$ ).  $x \pm \text{SD}$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle ; \*\*  $p < 0.05$  vs. Zymosan; #  $p < 0.05$  vs. Zymosan.



**Abb. 32: Einfluss von MK 886 und LY 171883 auf die Prostaglandin  $\text{D}_2$  Effluxraten Zymosan-behandelter Lebern.** Dargestellt sind die maximalen  $\text{PGD}_2$  Effluxraten zur 46. Minute. Die Gabe des 5-LPO Inhibitors MK 886 ( $2 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die  $\text{PGD}_2$ -Ausscheidung. Dagegen führte der COX Inhibitor Indomethacin ( $50 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) zu einer signifikanten Verminderung des  $\text{PGD}_2$ -Effluxes. Die Gabe des Cys- $\text{LT}_1$  Rezeptorantagonisten LY 171883 ( $20 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) führte zu einem massiven Anstieg der  $\text{PGD}_2$ -Ausscheidung. Der Lösungsvermittler DMSO hatte keinen Einfluss auf die Stimulation der Prostaglandin  $\text{D}_2$ -Bildung durch Zymosan ( $x \pm \text{SD}$ ).  $x \pm \text{SD}$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle ; \*\*  $p < 0.05$  vs. Zymosan; #  $p < 0.05$  vs. Zymosan.

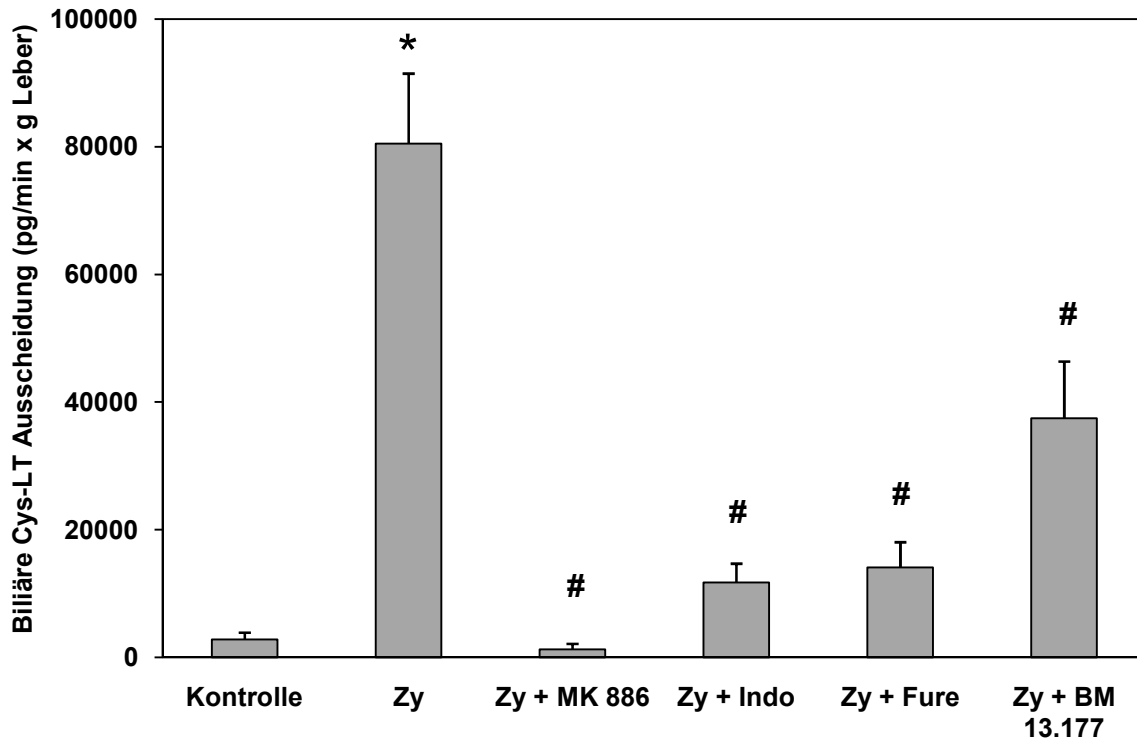


**Abb. 33: Einfluss von MK 886 und LY 171883 auf die Thromboxan B<sub>2</sub> Effluxraten Zymosan-behandelter Lebern.** Dargestellt sind die maximalen TXB<sub>2</sub> Effluxraten zur 46. Minute. Die Gabe des 5-LPO Inhibitors MK 886 (2 μM, n=5) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TXB<sub>2</sub> -Ausscheidung. Dagegen führte der COX Inhibitor Indomethacin (50 μM, n=5) zu einer signifikanten Verminderung des TXB<sub>2</sub>-Effluxes. Die Gabe des Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten LY 171883 (20 μM, n=5) führte zu einem massiven Anstieg der TXB<sub>2</sub> -Ausscheidung. Der Lösungsvermittler DMSO hatte keinen Einfluss auf die durch Zymosan stimulierte TXB<sub>2</sub>-Ausscheidung ( $x \pm SD$ ).  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle ; \*\*  $p < 0.05$  vs. Zymosan; #  $p < 0.05$  vs. Zymosan.

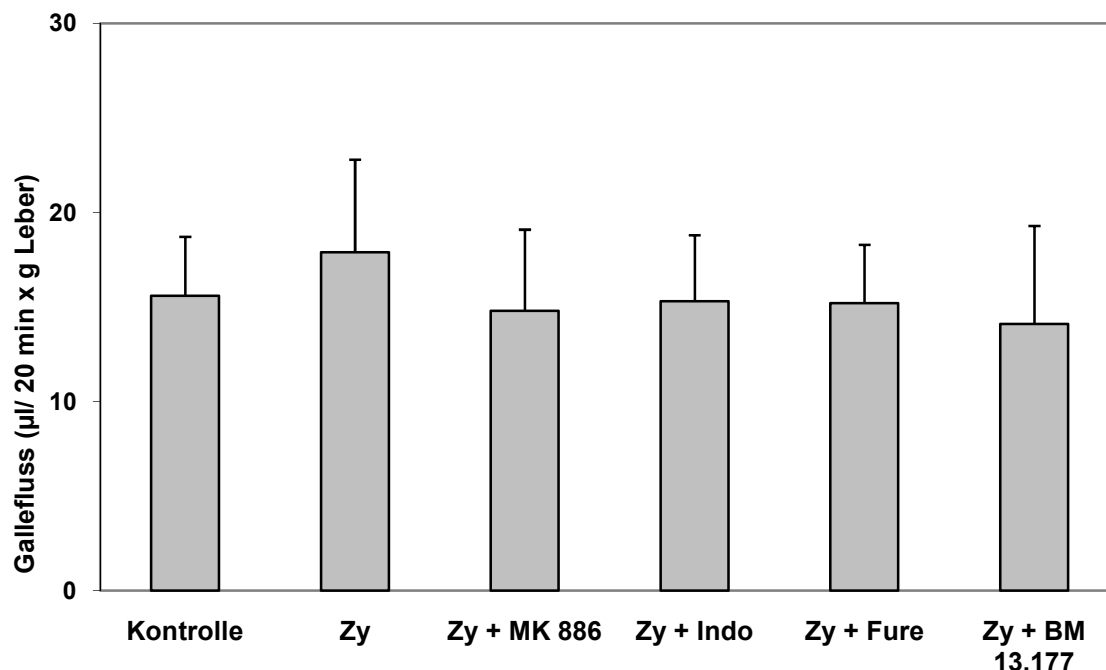
#### 4.9 Beeinflussung der Cys-LT-Bildung durch Hemmung von Prostaglandin/Thromboxan-Wegen

Abbildung 34 A zeigt den massiven Anstieg der biliären Cys-LT Elimination nach KS-Aktivierung, der durch den 5-LPO-Hemmer MK 886 vollständig unterdrückt wurde. Interessant war ferner die Beobachtung einer um ca. 80% verminderten Cys-LT Freisetzung im Falle einer COX-Hemmung durch Indomethacin bzw. TXA<sub>2</sub>-Synthesehemmung durch Furegrelate. Eine graduell schwächere Hemmung der Cys-

LT Freisetzung um ca. 60% konnte darüber hinaus durch selektive TXA<sub>2</sub>-Rezeptorblockade mit BM 13.177 erzielt werden. Ein signifikanter Unterschied in den Galleflüssen der jeweiligen Experimente wurde nicht beobachtet (34 B). Eine durch Prostaglandine und insbesondere TXA<sub>2</sub> vermittelte Stimulation der Cys-LT-Synthese kann somit angenommen werden.



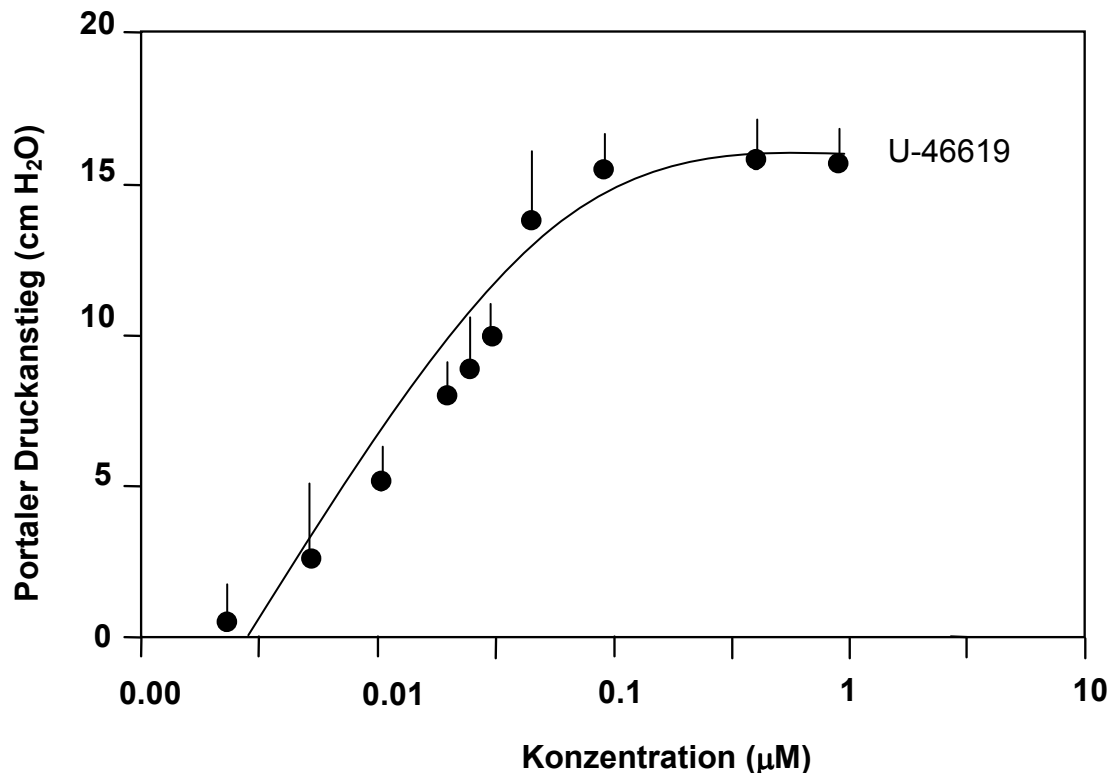
**Abb. 34 A: Einfluss von MK 886, Indomethacin, Furegrelate und BM 13.177 auf die Cysteinyl-Leukotrien-Effluxraten Zymosan-behandelter Lebern.** Dargestellt sind die maximalen Cys-LT-Effluxraten zur 46. Minute. Die Gabe des Thromboxan Synthesehemmers Furegrelate (50  $\mu$ M, n=4) und des COX-Inhibitors Indomethacin (50  $\mu$ M, n=5) führte ebenso zu einer signifikanten Reduktion der Cys-LT Ausscheidung in die Galle wie auch die Zufuhr des selektiven Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten BM 13.177 (20  $\mu$ M, n=5). Durch 5-LPO-Inhibitor mittels MK 886 (2  $\mu$ M, n=6) wurde die biliäre Cys-LT Efflux beinahe vollständig unterdrückt.  $x \pm$  SD; \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle; #  $p < 0.05$  vs. Zymosan.



**Abb. 34 B: Kein Einfluss von MK 886, Indomethacin, Furegrelate und BM 13.177 auf den Gallefluss.** Dargestellt sind die kumulativen Galleflüsse der in Abb. 33 A gezeigten Versuche von der 40.-60. Minute. Die Experimente wiesen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der gemessenen Galleflüsse auf.  $x \pm SD$ ,  $n=5/Gruppe$ .

#### 4.10 Portale Druckerhöhung durch $TXA_2$ : Ein durch Cys-LT vermittelter Mechanismus

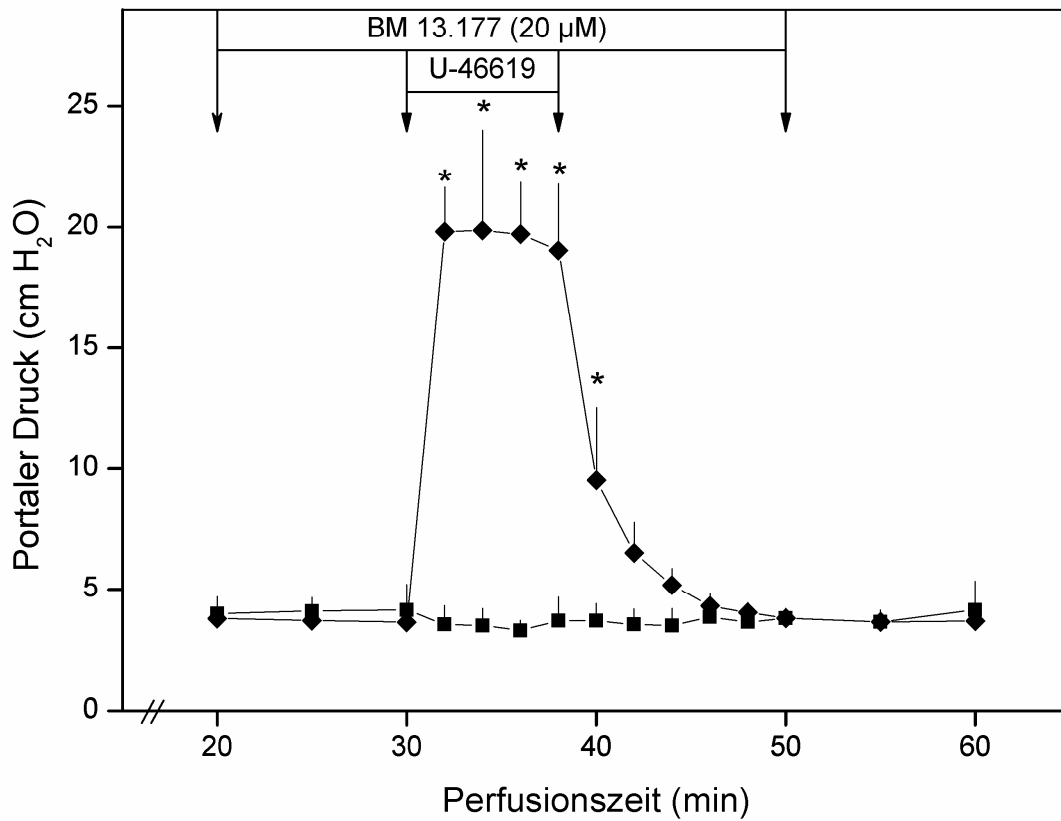
Um die Verknüpfung der Cys-LT- und  $TXA_2$ -Wirkungen bezüglich des portalen Druckanstiegs weiter zu untersuchen, wurden Lebern mit dem selektiven Thromboxan  $A_2$  Agonisten U-46619 perfundiert. Letzterer führte dosisabhängig zu einem Anstieg des portalen Druckes mit Maximalwerten bei Konzentrationen von  $\geq 100$  nM (Abb. 35). In diesem Konzentrationsbereich kam es zu einem Druckanstieg um  $16.3 \pm 2.7$  cm  $H_2O$ .



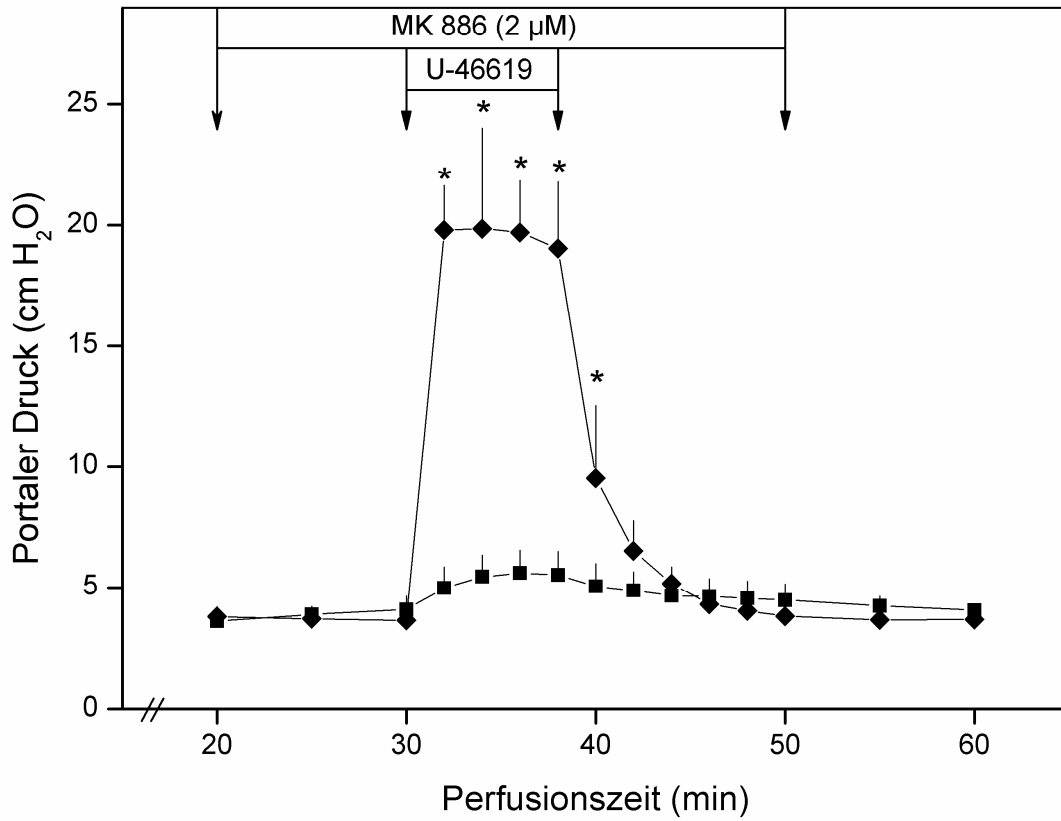
**Abb. 35: Dosisabhängiger Anstieg des portalen Druckes durch den TXA<sub>2</sub> - Agonisten U-46619.** Dargestellt sind jeweils die maximalen portalen Druckanstiege am Ende einer 6-minütigen U-46619 Infusion als  $x \pm SD$  von jeweils 3-4 Experimenten pro Konzentration. Das stärkste vasokonstriktorisches Potential zeigten U-46619 Konzentrationen von  $\geq 100$  nM. Die Berechnung der Kurve erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism.

Abbildung 36 zeigt den massiven Anstieg des portalen Druckes während der Infusion von 100 nM U-46619 (30.- 38. Minute), der nach Beendigung der Zufuhr auf Ausgangswerte zurückkehrte. Interessanterweise wurde der Druckanstieg nach TXA<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation nicht nur durch den TXA<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten BM 13.177 (Abb. 36 A) vollständig aufgehoben, sondern in gleicher Weise auch durch den 5-LPO-Inhibitor MK 886 (Abb. 36 B) und den Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten LY 171883 (Abb. 36 C). Die vasokonstriktorisches TXA<sub>2</sub> -Effekte scheinen somit über Cys-LT vermittelt zu werden.

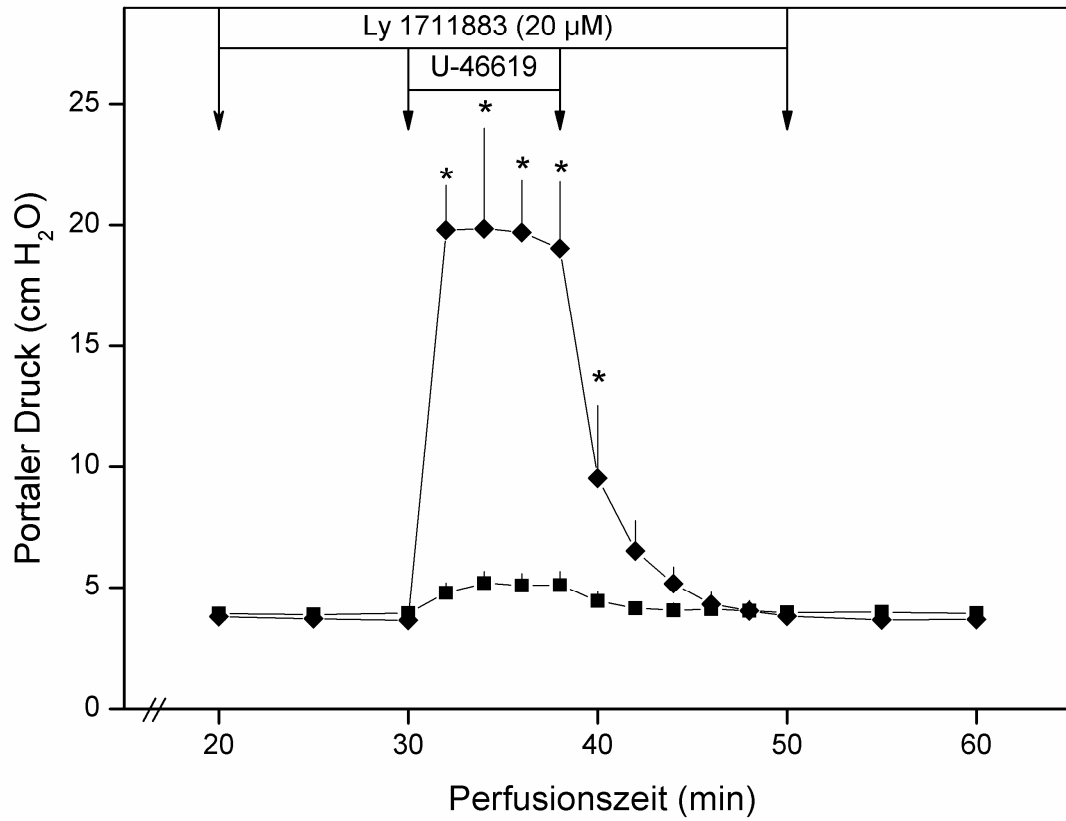




**Abb. 36 A: Einfluss von BM 13.177 auf den portalen Druckanstieg durch TXA<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation.** Durch die Gabe des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonisten BM 13.177 (■, 20 μM, n=6) wurde der massive Druckanstieg durch den Thromboxanagonisten U-46619 (◆, 100 nM, n=6) vollständig antagonisiert.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. BM 13.177 Gruppe.



**Abb. 36 B: Einfluss von MK 886 auf den portalen Druckanstieg durch U-46619.** Durch die Gabe des selektiven 5-LPO Inhibitors MK 886 (■, 2 μM, n=5) wurde der durch den Thromboxanagonisten U-46619 (◆, 100 nM, n=6) induzierte portale Druckanstieg nahezu vollständig aufgehoben.  $\bar{x} \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. MK 886 Gruppe.



**Abb. 36 C: Einfluss von LY 171883 auf den portalen Druckanstieg durch U-46619.** Durch die Gabe des Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten LY 171883 (■, 20 µM, n=6) wurde der massive Druckanstieg durch den Thromboxanagonisten U-46619 (◆, 100 nM, n=6) nahezu vollständig antagonisiert.  $x \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  vs. LY 171883 Gruppe.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mechanismen der portalen Hypertonie durch aktivierte KS in perfundierten Rattenlebern zu identifizieren. Insbesondere sollte die Rolle vasokonstriktorischer Cys-LT und Prostanoiden näher charakterisiert werden. Als wesentliche Ergebnisse bleiben festzuhalten:

- Nach Stimulation der Kupfferschen Sternzellen durch  $\beta$ -Glucan-reiche Zellwandbestandteile kommt es zu einem transienten Anstieg des portalen Druckes um annähernd 400%.
- Die Druckerhöhung nach Aktivierung der KS geht mit einer 30-80 fach gesteigerten Bildung von Cys-LT,  $\text{Pgd}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{TXA}_2$  einher.
- Die nach KS-Aktivierung zu beobachtende Druckerhöhung lässt sich mittels 5-LPO Inhibitoren (NDGA und MK 886) und Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten (LY 171883) sowie mit COX-Inhibitoren (Indomethacin), Thromboxansynthese-Inhibitoren (Furegrelate) und Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor-Antagonisten (BM 13.177) jeweils um etwa 50% reduzieren.
- Durch gleichzeitige COX- und 5-LPO Hemmung bzw.  $\text{TXA}_2$  und Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade gelingt ebenfalls nur eine Drucksenkung um 50%, was auf eine gemeinsame Vernetzung vasokonstriktorischer Mechanismen durch  $\text{TXA}_2$  und Cys-LT hinweist. Folgende Befunde unterstützen diese Hypothese:
  - Cys-LT<sub>1</sub> Rezeptorblockade steigert die Bildung der vasokonstriktorisches Prostanoiden  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{TXA}_2$ .
  - COX-Hemmung und  $\text{TxA}_2$  –Rezeptorblockade vermindert die Cys-LT Bildung nach KS-Aktivierung.
  - Eine ca. 400%-ige portale Druckerhöhung durch den  $\text{TXA}_2$  Rezeptoragonisten U-46619 wird sowohl durch 5-LPO-Hemmung als auch durch Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade vollständig aufgehoben.

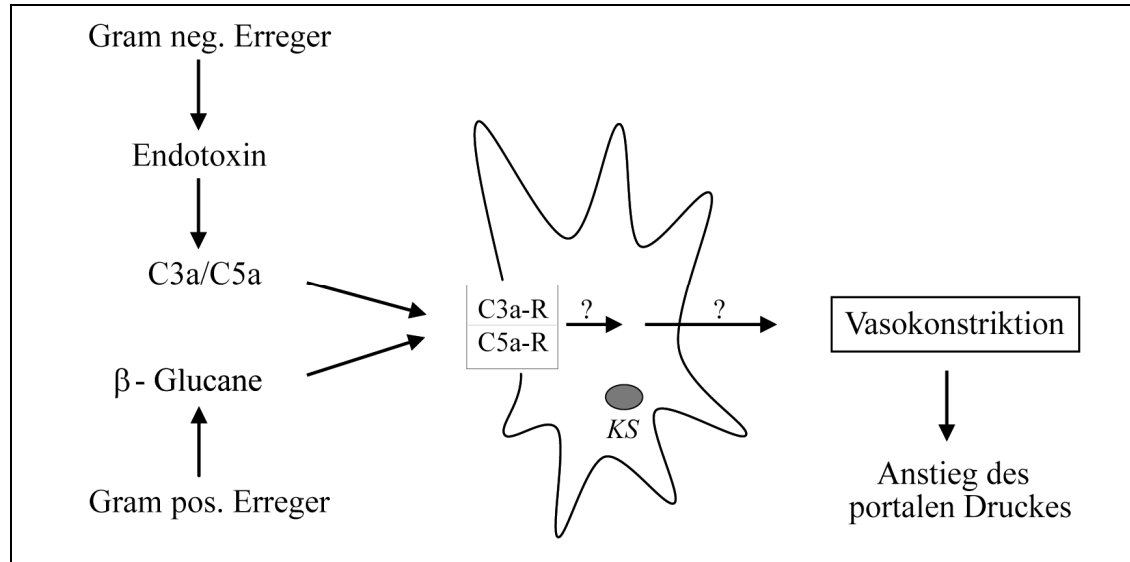
Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zu einem neuen Konzept der portalen Hypertension durch  $\beta$ -Glucane unter Beteiligung aktivierter KS,  $\text{TXA}_2$  und Cys-LT. Ferner zeigen diese Ergebnisse erstmals eine bislang nicht beschriebene Vernetzung von Prostanoid- und Cys-LT-Synthesewegen unter der Kontrolle von  $\text{TXA}_2$ - und Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptoren.

### **5.1. Portale Hypertension durch $\beta$ -Glucane**

Infektionen werden als wichtiger Trigger einer Ösophagusvarizenblutung bei Patienten mit Leberzirrhose angesehen (Bernard B *et al.*, 1999). Bisherige Konzepte gehen von einer zentralen Rolle bakterieller Endotoxine aus (Goulis J *et al.*, 1999). Letztere sind im Serum von Patienten mit Leberzirrhose häufig erhöht anzutreffen (Guarner C *et al.*, 1993) und könnten über eine Vielzahl postulierter aber bislang nicht eindeutig nachgewiesener Mechanismen den Pfortaderdruck erhöhen bzw. die Blutungsneigung bei Leberzirrhose steigern. Bislang noch unklar ist die Rolle der Aktivierung von Gewebemakrophagen durch Endotoxine und insbesondere die der Aktivierung von Kupffer-Zellen, die den grössten Makrophagen-Gewebepool des Menschen repräsentieren (Klein A *et al.*, 1994; Naito M *et al.*, 2004). Andererseits können Blutungen bei Infektionen nicht allein durch die Freisetzung von Endotoxinen erklärt werden, da nur bei etwa 50% der betroffenen Patienten gram-negative Infektionen zum Zeitpunkt der Blutung nachweisbar sind (Bernard B *et al.*, 1995). Insofern müssen weitere bakterielle Produkte als Trigger einer Varizenblutung angenommen werden. Interessante Kandidaten sind dabei die in der Zellwand von Bakterien und Pilzen verankerten  $\beta$ -Glucane, die über Bindung an Komplement-Rezeptoren eine starke Aktivierung von Makrophagen auslösen können (Thornton BP *et al.*, 1996). Ob und in welchem Masse die KS-Aktivierung durch  $\beta$ -Glucane dabei einen Einfluss auf den portalen Druck hat, war Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Die zur Klärung dieser Fragestellung durchgeführten Experimente erfolgten am Modell der isolierten Rattenleberperfusion mit einem Leukozyten-freien Perfusionspuffer. Durch Ausschaltung der systemischen Zirkulation wird dabei eine selektive Beobachtung intrahepatischer Vorgänge nach KS-Aktivierung ermöglicht (Gores GJ *et al.*, 1986). Die Aktivierung der KS erfolgte durch Zufuhr von Zymosan, eine Zellwandfraktion von *Saccharomyces cerevisiae*. Wie in früheren Untersuchungen bereits gezeigt, sind für die Makrophagenaktivierung  $\beta$ -Glucane dieser Zellwandpräparationen verantwortlich (Thornton BP *et al.*, 1996). Durch die Behandlung der Lebern mit Zymosan kam es 1. zu einem transienten Anstieg des portalen Druckes um 400% und 2. zu einem langanhaltenden Druckanstieg um 60% über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden nach Beendigung der Zymosaninfusion. Für die beobachtete Druckerhöhung war zweifelsfrei eine Aktivierung der KS verantwortlich. Hierfür sprechen Experimente nach 70%-iger

Inaktivierung der KS durch Vorbehandlung der Tiere mit  $GdCl_3$  (Jaeschke H, 1991; Pearson JM *et al.*, 1996; Schauer RJ *et al.*, 2001): Der mit Zymosan beobachtete Druckanstieg war um ca. 75% vermindert. Relevante Makrophagen-unabhängige Effekte der Zymosanpräparation auf die hepatische Zirkulation können deshalb weitgehend ausgeschlossen werden.  $\beta$ -Glucane der Zymosanpräparationen aktivieren Makrophagen durch die Stimulation von Komplementrezeptoren (Thornton BP *et al.*, 1996). Hiermit vereinbar, führte eine Stimulation dieser Rezeptoren durch direkte Zufuhr von Komplementfaktoren zu einer Erhöhung des portalen Druckes, nicht aber nach Inaktivierung der KS durch  $GdCl_3$  (Schieferdecker HL *et al.*, 1999). Insgesamt führen diese Ergebnisse zu einem neuen Konzept, das sowohl Erhöhungen des Pfortaderdruckes durch Infektionen mit gram-positiven als auch gram-negativen Erregern erklärt. Im Zentrum des Konzeptes stehen KS, deren Aktivierung durch bakterielle  $\beta$ -Glucane und Endotoxine via Komplementrezeptoren vasokonstriktorische Mechanismen in der Leber induziert und hierdurch den portalen Druck erhöht (Abb. 37).



**Abbildung 37. Durch Endotoxine und  $\beta$ -Glucane verursachte portale Hypertension. Detaillierte Beschreibung im Text.**

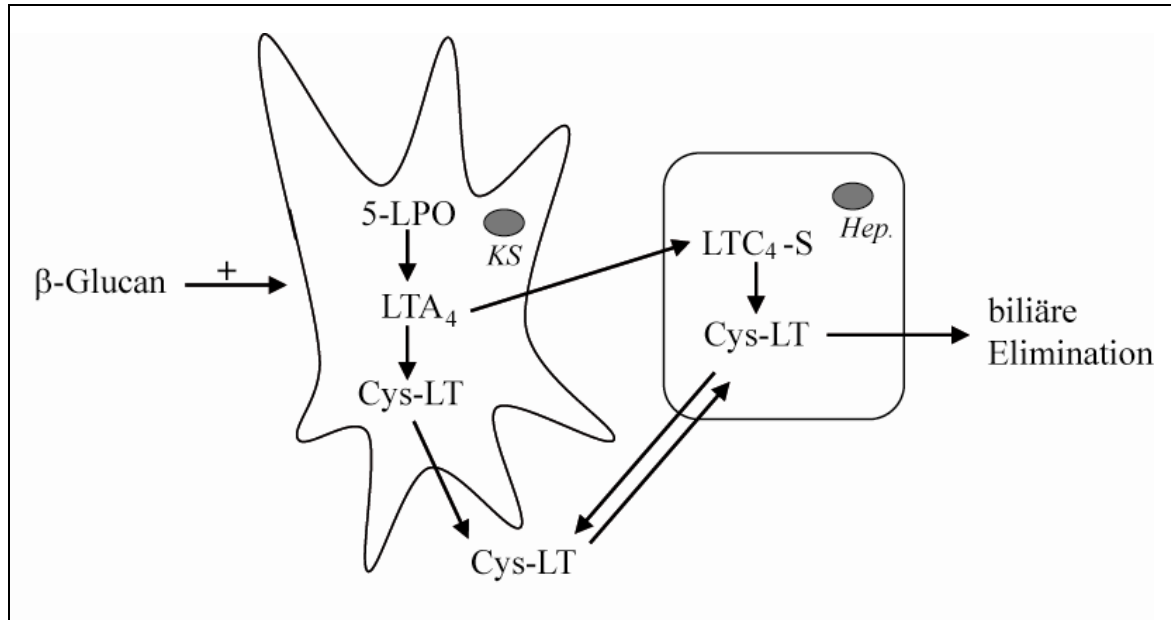
## 5.2 Hepatische Cys-LT Produktion nach KS-Aktivierung

Die Leber spielt nicht nur eine große Rolle bei der Metabolisierung und Elimination von systemischen Cys-LT, sie ist auch Produktionsort dieser Arachidonsäuremetaboliten. Die Zufuhr der Cys-LT LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub>, nicht aber LTE<sub>4</sub>, führte am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber zu einem mehrfachen Anstieg des portalen Druckes (Krell H *und* Dietze E, 1989; Bilzer M *et al.*, 1993). Darüber hinaus kommt es in Sepsis- Modellen zu einer massiven Zunahme der hepatischen Cys-LT Produktion (Jaeschke H *et al.*, 1992). Das an der Cys-LT-Synthese beteiligte (Schlüssel-)Enzym 5-LPO wird in KS und Sinusendothelzellen (SEC) exprimiert (Shimada K *et al.*, 1998). Ferner wird die 5-LPO durch Lipopolysaccharide (LPS) verstärkt exprimiert (Shimada K *et al.*, 1998). Das gleiche Phänomen konnten Shimada *et al.* auch für die LTC<sub>4</sub>-Synthase zeigen, die in Hepatozyten und SEC, nicht aber in KS exprimiert wird. Ob die Cys-LT nach KS-Aktivierung durch Zymosan vermehrt gebildet werden, ist bislang nicht untersucht worden.

Zur Klärung dieser Frage wurden im ersten Schritt die Cys-LT Konzentrationen im effluenten Perfusat bestimmt. Nach Stimulation der KS durch Zymosan war jedoch keine erhöhte Cys-LT-Ausscheidung im Perfusat im Vergleich zur Kontrollperfusion ohne Zymosan zu beobachten. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da Hepatozyten über äusserst effiziente Transporter zur Aufnahme und biliären Elimination von Cys-LT verfügen (Keppler D *et al.*, 1989). So konnte am Modell der perfundierten Rattenleber gezeigt werden, dass ca. 90% der extern zugeführten Cys-LT bei der ersten Leberpassage eliminiert werden (Wettstein M *et al.*, 1989).

Im nächsten Schritt wurde die Cys-LT Konzentration in der Galle bestimmt. Tatsächlich ging die Aktivierung der KS durch Zymosan mit einer nahezu 35-fachen Zunahme der biliären Cys-LT-Ausscheidung einher, die ihr Maximum zum Zeitpunkt der maximalen portalen Druckerhöhung erreichte. Die biliäre Ausscheidung der Cys-LT wurde durch den 5-LPO Inhibitor MK 886 vollständig gehemmt, während durch Inaktivierung der KS mittels GdCl<sub>3</sub> eine 80%-ige Reduktion der biliären Effluxraten ohne Effekte auf den Gallefluss beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen erstmals die Stimulation der hepatischen Cys-LT Synthese nach selektiver KS-Aktivierung in der intakten Leber. Hierfür könnte sowohl die in früheren Experimenten nachgewiesene Bildung von Cys-LT durch KS verantwortlich sein (Decker K, 1990; Farzaneh-Far R *und* Moore K, 2003), wie auch die postulierte transzelluläre

Synthese via Metabolisierung von  $LTA_4$  zu Cys-LT in Hepatozyten (Fukai F *et al.*, 1993 und 1996) (Abb. 38).



**Abbildung 38: Stimulation der hepatischen Cys-LT Synthese nach KS-Aktivierung: Mögliche zelluläre und transzelluläre Synthesewege. Hep., Hepatozyt. Detaillierte Beschreibung im Text.**

### 5.3 Cys-LT vermitteln den portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung

#### 5.3.1 Einfluss der 5-LPO Hemmung

In weiteren Experimenten wurde die hämodynamische Bedeutung der nach KS-Aktivierung gesteigerten Cys-LT Bildung untersucht, zumal in obigen Experimenten keine gesteigerte Freisetzung der Cys-LT in die Lebersinusoide nachweisbar war.

Dies gelang durch den Einsatz der 5-LPO Inhibitoren NDGA und MK 886. Beide bewirkten jeweils eine Reduktion des portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung um etwa 50 %. Da MK 886 und NDGA bereits zur 30. Minute zugegeben wurden, die KS-Aktivierung mittels Zymosan jedoch erst ab der 40. Minute erfolgte, konnte der Einfluss der Substanzen auf den basalen portalen Druck beurteilt werden: Hier wurden keine Veränderungen beobachtet. Die langanhaltende Druckerhöhung nach



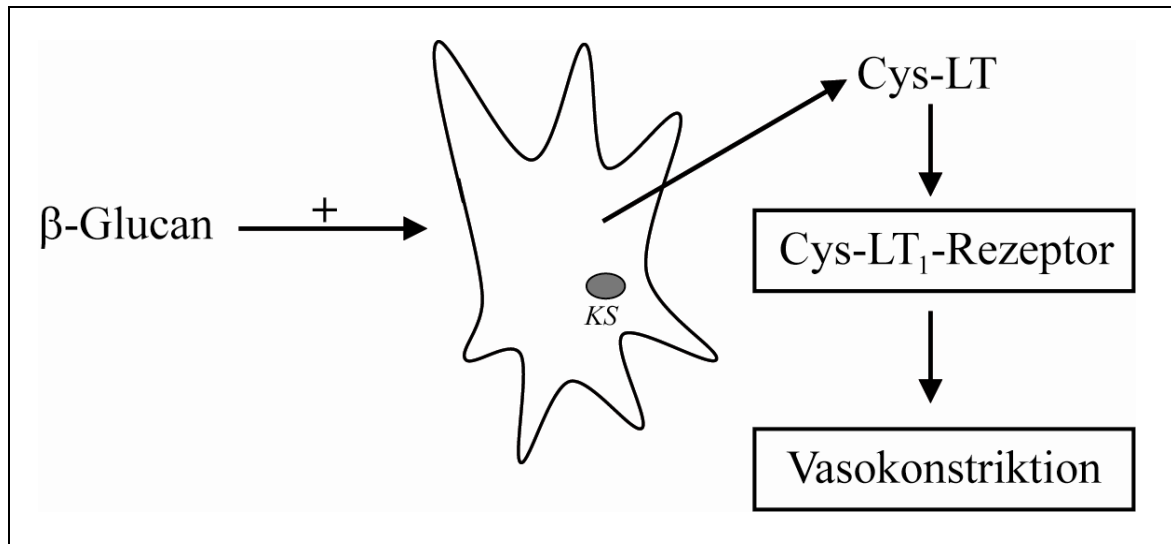
KS-Aktivierung wurde ebenfalls nicht beeinflusst, so dass diesbezüglich offensichtlich Cys-LT unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen dürften.

Durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Gadoliniumchlorid ergab sich eine Druckkurve, die in Ausmass und Verlauf des Druckanstieges mit der der 5-LPO Inhibitor-Gruppen vergleichbar ist. Dieses verwundert nicht, da Gadoliniumchlorid eine (unvollständige) funktionelle Inaktivierung der KS (Pearson JM *et al.*, 1996; Schauer RJ *et al.*, 2001) und in der Folge, wie bereits gezeigt, eine ca. 80-prozentige Reduktion der Cys-LT Produktion bewirkt. Die Beobachtung unterstreicht die zentrale Rolle der Cys-LT in der Vermittlung der Vasokonstriktion nach KS-Aktivierung. Die anhand unserer Experimente dokumentierte Senkung des portalen Druckanstieges durch Hemmung der Cys-LT Wirkung ist gut vereinbar mit Ergebnissen früherer Perfusionsarbeiten (Häussinger D *et al.*, 1988; Krell H und Dietze E, 1989; Bilzer M *et al.*, 1993). Während diese eine deutliche *Steigerung* des portalen Druckes durch LTC<sub>4</sub> Infusion um ca. 12 cm H<sub>2</sub>O zeigten (Bilzer M *et al.*, 1993) gelang uns mittels 5-LPO Inhibition eine *Senkung* des durch KS-Aktivierung gesteigerten portalen Druckes in einem vergleichbarem Ausmass. Passend hierzu, konnte unter MK 886-Einfluss eine beinahe vollständige Unterdrückung des biliären Cys-LT Effluxes gezeigt werden.

Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass neben den Cys-LT eine weitere LT-Subgruppe einen Einfluss auf die hepatische Mikrozirkulation nach Endotoxin-Exposition hat (Ito S *et al.*, 2007): LTB<sub>4</sub> vermittelte hierbei durch Bindung an den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor eine Verminderung der sinusoidalen Perfusion. Dieser Effekt konnte analog zu unseren Ergebnissen mit einer 5-LPO-Hemmung abgeschwächt werden. Im Lichte dieser neuen Erkenntnisse wäre es theoretisch denkbar, dass die Hemmung der LTB<sub>4</sub>-Bildung durch 5-LPO-Inhibition und nicht die der Cys-LT-Bildung bei der von uns beobachteten Minderung des portalen Druckanstieges die entscheidende Rolle spielt. Diese Unsicherheit kann durch die bisher aufgezeigten Ergebnisse und selbst durch die von uns nachgewiesene massive Steigerung der Cys-LT Synthese nach KS-Aktivierung und ihre beinahe vollständige Unterdrückung durch MK 886 nicht gänzlich ausgeräumt werden. Dies kann lediglich durch den Einsatz eines spezifischen Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten gelingen, da LTB<sub>4</sub> am Cys-LT<sub>1</sub>R keine Effekte auszulösen vermag (Sarau HM *et al.*, 1999).

### 5.3.2 Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor medierte portale Druckerhöhung nach KS Aktivierung

Im nächsten Schritt zielten Experimente mit dem selektiven Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten LY 171883 auf die nähere Untersuchung der Vermittlung vasokonstriktorischer Cys-LT Effekte auf Rezeptorebene. In der hierbei verwendeten Konzentration (20 µM) hemmt LY 171883 die Wirkung von LTD<sub>4</sub> am Cys-LT<sub>1</sub>R (synonym LTD<sub>4</sub>-Rezeptor) vollständig (Bilzer M *und* Lauterburg BH, 1993). Obgleich man davon ausgeht, dass der Cys-LT<sub>1</sub>R spezifisch für LTD<sub>4</sub> ist (Fleish JH *et al.*, 1988), wird durch LY 171883 in der angegebenen Konzentration auch die LTC<sub>4</sub> Wirkung vollständig unterdrückt (Bilzer M *und* Lauterburg BH, 1993). Diese Beobachtung lässt sich am ehesten mit der raschen Umwandlung von LTC<sub>4</sub> zu LTD<sub>4</sub> durch die Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) erklären. Letztlich kann somit davon ausgegangen werden, dass durch LY 171883 die Wirkung der beiden, für die Vasokonstriktion in der Leber wesentlichen Cys-LT auf Rezeptorebene verhindert wird. Tatsächlich liess sich in unseren Experimenten der portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung in gleicher Weise beeinflussen wie durch die bereits aufgeführten 5-LPO Inhibitoren. Auch LY 171883 blieb dabei ohne Einfluss auf den basalen portalen Druck und die langanhaltende portale Druckerhöhung nach Beendigung der Zymosan-Infusion. Die vergleichbare Potenz der beiden unterschiedlichen Substanzgruppen bezüglich der Reduktion des portalen Druckerhöhungs, lässt darauf schliessen, dass es der Cys-LT<sub>1</sub>R ist, über den der grösste Teil der Cys-LT-vermittelten Vasokonstriktion nach KS-Aktivierung in der gesunden Rattenleber vermittelt wird (Abb. 39). Im Falle einer relevanten Beteiligung von LTB<sub>4</sub> wäre dagegen eine stärkere Drucksenkung durch die 5-LPO-Inhibitoren im Vergleich zur alleinigen Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade zu erwarten gewesen.



**Abb. 39: Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor medierte portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung. Detaillierte Beschreibung im Text.**

Der Nachweis von Cys-LT<sub>1</sub>R gelang in vielen menschlichen Geweben, unter anderem auch in der Leber (Sarau HM *et al.*, 1999). Über das Vorkommen und die genaue Verteilung von Cys-LT Rezeptoren auf den einzelnen parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellen der Leber ist allerdings bis dato wenig bekannt (Tagasaki J *et al.*, 2000; Capra V *et al.*, 2007). Obgleich beispielsweise die meisten, für die Pathogenese des Asthmas relevanten Cys-LT Effekte auf die Luftwege ebenfalls über diese Rezeptor-Subklasse vermittelt werden, existieren auch Daten, die darauf hindeuten, dass einige Cys-LT Effekte, speziell auf das Gefäßgewebe, nicht mit den erhältlichen Cys-LT<sub>1</sub>R-Antagonisten zu hemmen sind. Dies gilt beispielsweise für die Konstriktion von Lungengefäßen durch Cys-LT (Walch L *et al.*, 2002). Derartige Cys-LT-Effekte werden momentan als Cys-LT<sub>2</sub>R-vermittelt klassifiziert. Da für diesen jedoch kein selektiver Antagonist verfügbar ist (Rovati GE und Capra V, 2007), blieb die Existenz von Cys-LT<sub>2</sub> Rezeptoren ein operationales Konzept bis es gelang, Cys-LT<sub>1</sub>- und Cys-LT<sub>2</sub>-R zu klonen (Lynch KR *et al.*, 1999; Heise CE *et al.*, 2000).

Der Mechanismus über den Cys-LT in der Leber zur Druckerhöhung nach KS-Aktivierung beitragen ist nicht bekannt. Vorstellbar wäre z.B. eine Kontraktion der im subsinusoidalen Raum gelegenen hepatischen Sternzellen (HS) (Kawada N *et al.*, 1992). Diese sind wohlbekannt Regulatoren des sinusoidalen Blutflusses (Abb. 3) und können über die sinusoidale Konstriktion den portalen Druck erhöhen. An

isolierten HS konnte Titos *et al.* die Fähigkeit der Cys-LT eine Kontraktion der HS auszulösen, nachweisen. Dabei bewirkte die Zufuhr von LTD<sub>4</sub> zu kultivierten HS eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit anschliessender zellulärer Kontraktion (Titos *et al.*, 2000). Diese Effekte wurden durch einen spezifischen Cys-LT<sub>1</sub>R-Antagonisten, komplett unterdrückt (Titos E *et al.*, 2000). Für Cys-LT kann also im Gegensatz zu TXA<sub>2</sub> (Fennekohl A *et al.*, 1999) auf HS eine ausreichende Rezeptorendichte als Voraussetzung für eine Kontraktionsauslösung angenommen werden. Ob Cys-LT tatsächlich auch die portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung über ähnliche Effekte auf sinusoidaler Ebene verursacht, war Gegenstand weiterer Experimente.

#### **5.4 IVM: Keine signifikante Konstriktion der Lebersinusoide durch Cys-LT**

Zur näheren Charakterisierung der durch Zymosan induzierten Mechanismen der portalen Druckerhöhung wurde die hepatische Mikrozirkulation *in vivo* untersucht. Für diesen Zweck fand die Technik der Intravitalmikroskopie (IVM) Anwendung. Hierzu wurde Zymosan über die V. gastroduodenalis in die Pfortader infundiert und hierdurch KS aktiviert. Tatsächlich kam es zu einer Abnahme der Durchmesser der Lebersinusoide, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Diese Abnahme war sowohl in periportalen als auch in midzonalen und perizentralen Segmenten nachzuweisen. Die Reduktion der sinusoidalen Durchmesser um maximal 20% erscheint auf den ersten Blick nicht ausreichend, um den gleichzeitig beobachteten enormen Anstieg des Pfortaderdruckes zu erklären. Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, dass der Gefässwiderstand durch die vierte Potenz des Gefässradius bestimmt wird (*Hagen-Poiseull'schen Gesetz*), so leuchtet ein, dass die aufgezeigte Abnahme des Gefässdurchmessers wesentlich zum beobachteten Druckanstieg beitragen könnte. Welche Mechanismen im Einzelnen an der durch Zymosan induzierten Verengung der Sinusoide beteiligt sind, lässt sich derzeit noch nicht beantworten. Eine Verlegung der Sinusoide durch Zymosan-Partikel oder nach Zymosan-Phagozytose angeschwollene KS scheidet als Hauptgrund für den erhöhten Widerstand praktisch aus, da es in der IVM vornehmlich die perizentralen Segmente sind, die eine besonders deutliche Verengung in der IVM erkennen lassen, während die grösste KS-Dichte periportal vorzufinden ist (Schauer RJ *et al.*, 2001). Eine Verringerung des

Sinusoiddurchmessers durch Leukozytenadhäsion, wie zuletzt bei der Endotoxinämie der Maus beschrieben (Katagiri H *et al.*, 2004; Ito S *et al.*, 2007), kann in unserem Fall ausgeschlossen werden, da wir einen leukozytenfreien Perfusionspuffer verwendeten (Sies H, 1978).

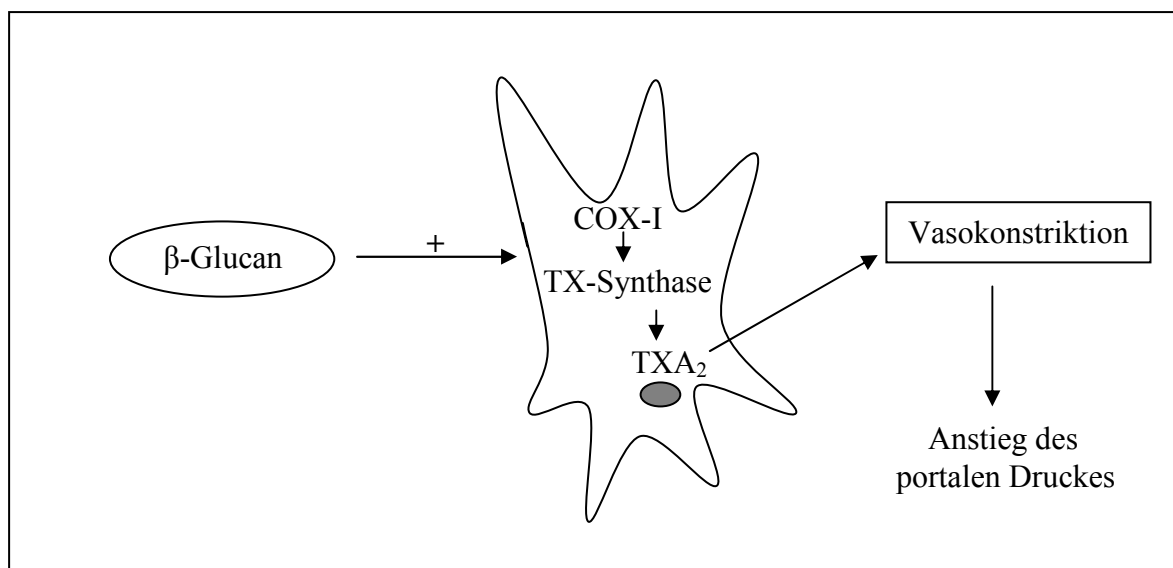
Letztlich konnte durch Behandlung der Tiere mit dem 5-LPO Inhibitor MK 886 keine Beeinflussung der sinusoidalen Durchmesser nach Zymosan-Gabe erzielt werden, während MK 886, wie bereits gezeigt, den portalen Druckanstieg um 50% reduzierte. Die für die IVM Experimente verwendete MK 886 Dosis, entsprach der in den Perfusionsexperimenten verabreichten Gesamtdosis, die sich auch mit Angaben in der aktuellen Literatur deckt (Guerrero AT *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Cys-LT abhängige Komponente der portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung offensichtlich keine sinusoidale Konstriktion verantwortlich ist. Letztere könnte aber durchaus den durch 5-LPO Inhibitoren und Cys-LT Antagonisten nicht hemmbaren portalen Druckanstieg erklären. Da die Aktivierung der KS innerhalb der sinusoidalen Strombahn erfolgt, kann selbstverständlich ein präsinusoidaler Mechanismus der portalen Druckerhöhung ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass MK 886 den portalen Druckanstieg nach KS Aktivierung massiv senkt, nicht aber den sinusoidalen Durchmesser beeinflusst, muss deshalb eine postsinusoidale Venokonstriktion als Ursache der durch Cys-LT vermittelten portalen Druckerhöhung angenommen werden. Mit dieser Hypothese gut vereinbar sind aktuelle Ergebnisse von Experimenten an der isoliert perfundierten Rattenleber (Cui S *et al.*, 2006). Sie zeigen, dass Cys-LT neben einer präsinusoidalen-, im gleichen Masse auch eine postsinusoidale Konstriktion auslösen können. Somit scheinen prinzipiell die Voraussetzungen für eine postsinusoidal stattfindende Cys-LT vermittelte Vaso-konstriktion nach KS-Aktivierung gegeben. Der Versuch intravitalmikroskopischer Untersuchungen der postsinusoidalen Region wurden durch unsere Arbeitsgruppe zwar unternommen, die hier ermittelten Gefäßdurchmesser variierten jedoch leider zu stark, um valide Ergebnisse gewährleisten zu können.

Welcher Mechanismus die von uns gezeigte Cys-LT vermittelte Kontraktion auslöst, bleibt zunächst unklar. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Venokonstriktion oder eine Beeinflussung von Sphinkteren am Übergang der Sinusoide zu den Venolen (McCuskey RS *und* Reilly FD, 1993).

### 5.5 Keine zusätzliche portale Drucksenkung durch kombinierte Hemmung von Prostanoid- und Cys-LT-Wegen

Sowohl der biphasische Druckverlauf als auch die massive, durch alleinige Infusion der bislang bekannten Vasokonstriktoren nicht erzielbare Erhöhung des portalen Druckes nach KS-Aktivierung, liefern Hinweise auf die Beteiligung verschiedener vasokonstriktorischer Mechanismen. Als weitere Komponenten eines vermutlich komplexen Netzwerkes unterschiedlicher Vasokonstriktoren konnte die COX-1 medierte Bildung der potentiell vasokonstriktorisches Prostanoid TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und PGD<sub>2</sub> nach KS-Aktivierung identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Cys-LT gelang hier der Nachweis im Leberperfusat, wobei die Bildung der einzelnen Prostanoid bis um den Faktor 80 gesteigert war. Von den genannten Prostanoiden zeigte letztendlich nur TXA<sub>2</sub> (Abb. 40) eine relevante Beteiligung an der durch KS- Aktivierung ausgelösten portalen Druckerhöhung (Steib CJ *et al.*, 2007), so dass sich die weiteren Untersuchungen bezüglich der Prostanoid auf diesen bekannten Vasokonstriktor (Samuelson B *et al.*, 1978) konzentrierten.



**Abb. 40: Thromboxan A<sub>2</sub> Synthese nach KS Aktivierung und nachfolgender Druckerhöhung. Detaillierte Beschreibung im Text.**

Durch den Einsatz von Substanzen die die Cys-LT Wirkung verhindern, liess sich der portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung um 50% vermindern. Dies gelang in einem ähnlichen Ausmass mit Indomethacin, BM 13.177 und Furegrelate, also durch Beeinflussung der TXA<sub>2</sub> Wirkung. Deshalb bestand die berechtigte Hoffnung, dass

der hämodynamische Effekt dieser unterschiedlichen Eicosanoide auf die Lebergefäße zumindest zum Teil additiver Natur ist. So hatte eine duale Blockade von Cyclooxygenase (mittels Ibuprofen) und Leukotrienen (mittels LY 171883) nach Endotoxinexposition teilweise synergistische Effekte auf die hämodynamische Situation der Niere gezeigt (Young JS *und* Passmore JC, 1990). Die von uns durchgeführte kombinierte Cys-LT- und TXA<sub>2</sub>-Blockade (NDGA plus Indomethacin, LY 171883 plus Indomethacin, LY 171883 plus BM 13.177) erbrachte jedoch nicht die erhoffte 100-prozentige, sondern abermals lediglich eine etwa 50-prozentige Verminderung des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung, wie sie bereits nach Gabe der Einzelsubstanzen beobachtet worden war. Dies lässt letztlich nur den Schluss zu, dass bezüglich der Vermittlung vasokonstriktorischer Effekte durch TXA<sub>2</sub> und Cys-LT eine Interaktion besteht.

#### **5.6 Vernetzung von Cys-LT und TXA<sub>2</sub> bei der Vermittlung des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung**

Interaktionen zwischen 5-LPO und COX-pathways wurden in verschiedenen Organsystemen und Geweben beschrieben. Dies betrifft neben gemeinsam vermittelten inflammatorischen Effekten (Goulet JL *et al.*, 1994) vor allem auch eine gegenseitige Beeinflussung der Synthese (Harizi H *et al.*, 2003; Massoumi R *et al.*, 2003; Maxis K *et al.*, 2006; Guerrero AT *et al.*, 2008). Bei den meisten Interaktionen handelt es sich hierbei um das Prinzip, dass bei der Hemmung des COX-Weges ein erhöhter Arachidonsäure-Flux über den 5-LPO-Weg erfolgt bzw. umgekehrt. Eine Erkrankung bei der dieses Prinzip eine pathogenetisch entscheidende Rolle spielt, ist das „Aspirin-induzierte-Asthma“ (Stevenson DD *und* Szczeklik A, 2006). Die traditionell favorisierte Erklärung hierfür ist eine „Shunting-Hypothese“ (Burka JF *und* Peterson NA, 1980): Die Arachidonsäure als gemeinsames Substrat für die Enzyme COX und 5-LPO (Abb. 9) wird hierbei durch die Aspirin vermittelte COX-Hemmung im Überschuss für die Synthese der bronchokonstriktorischen LT zur Verfügung gestellt.

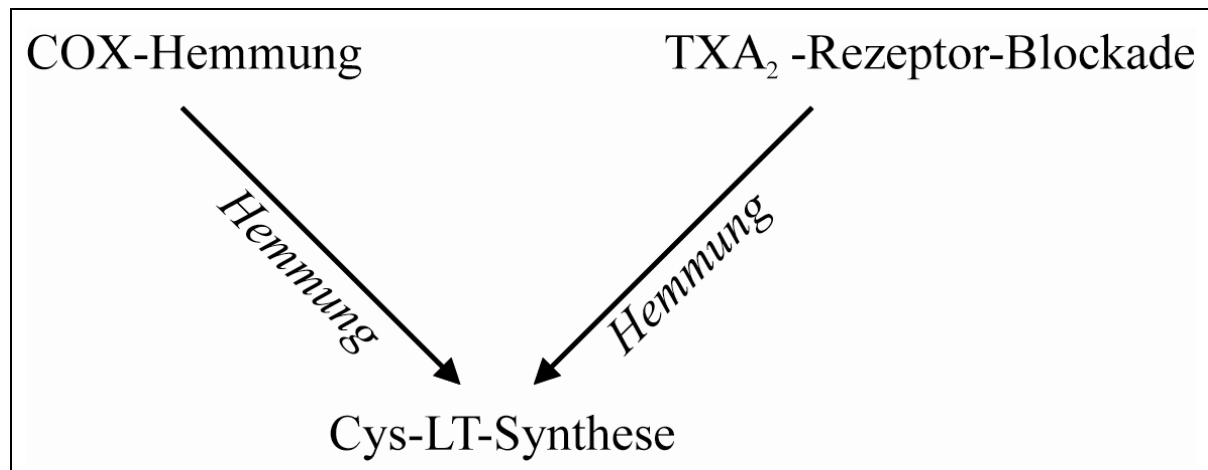
Ein solches Prinzip wäre auch eine gute Erklärung für die von uns beobachteten Druckeffekte bei 5-LPO- und COX-Inhibition. Dieser Hypothese sind wir durch die Messung der Prostanoiden und der Cys-LT im Perfusat bzw. in der Galle nachgegangen. Die Bestimmungen der einzelnen Eicosanoide erbrachten jedoch zu der

Hypothese völlig konträre Resultate. Durch Hemmung der COX mittels Indomethacin kam es anstatt zu der erwarteten Zunahme zu einer deutlichen *Abnahme* des biliären Cys-LT Effluxes. Zudem zeigte eine Vorbehandlung der Lebern mit dem 5-LPO Inhibitor MK 886 überraschenderweise keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$  und  $\text{TXB}_2$ , obgleich eine Beeinflussung des COX-Weges durch LT beschrieben und somit prinzipiell denkbar ist (St-Onge M *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Befunde ergeben sich daher keine Hinweise für die bisher favorisierte klassische Verlinkung von Cys-LT- und Prostanoid-Synthesewegen im Falle einer KS-Aktivierung. Auch für das „Aspirin-induzierte-Asthma“ gibt es inzwischen von der klassischen Theorie abweichende Vorstellungen, wie der Flux durch den 5-LPO-Weg durch Hemmung des COX-Weges gesteigert wird; hierbei nimmt die Hemmung von  $\text{PGE}_2$  als Vermittler einer 5-LPO Hemmung eine zentrale Rolle ein (Harizi H *et al.*, 2003). Diese Entwicklungen verdeutlichen die Komplexität der beteiligten Mechanismen bei der gegenseitigen Beeinflussung von Cys-LT und Prostanoiden. Eine weitere Aufklärung der beteiligten Mechanismen in der Leber nach KS-Aktivierung sollte nun durch die nähere Beleuchtung der Auswirkungen einer Cys-LT<sub>1</sub>- und TXA<sub>2</sub>-Rezeptorblockade erfolgen.



### 5.6.1 Cys-LT und TXA<sub>2</sub> – vermittelter portaler Druckerhöhung nach KS-Aktivierung: Vernetzung auf Rezeptorebene

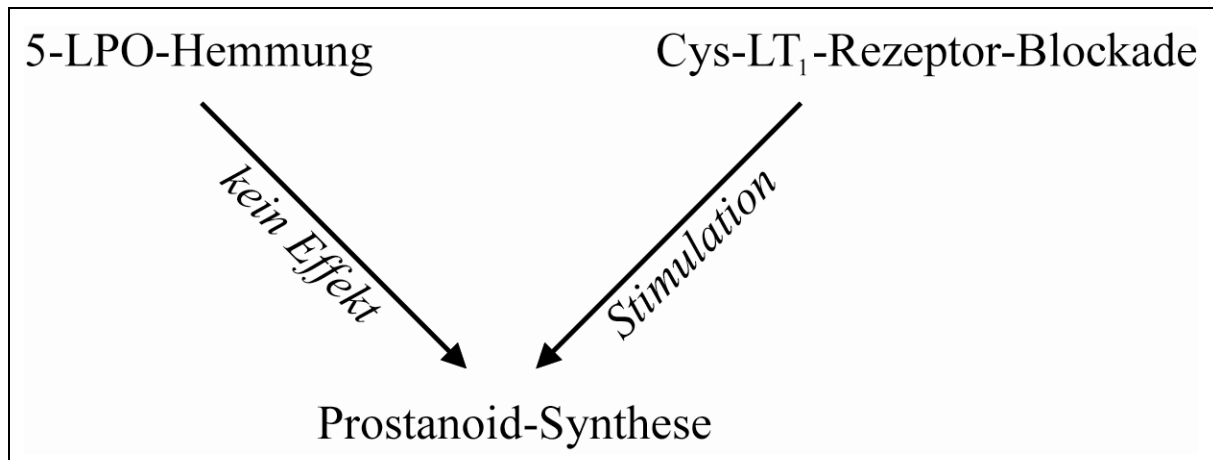
Auch die differenziertere Hemmung des TXA<sub>2</sub>-Weges mittels Furegrelate (Thromboxan-Synthese-Inhibitor) und BM 13.177 (TXA<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist) zeigte eine Hemmung der Cys-LT Bildung, welche im Ausmass vergleichbar war mit der nach COX-Hemmung. Daher kann angenommen werden, dass Prostanoid- und Cys-LT Wege über TXA<sub>2</sub> verknüpft sind. Hierbei wird die Cys-LT Bildung durch TXA<sub>2</sub> im Sinne einer Stimulation moduliert (Abb. 41). Die Regulation der Cys-LT-Synthese durch den TXA<sub>2</sub>-Rezeptor wurde beispielsweise in Thrombozyten beschrieben (Tornhamre S et al., 1995), hier allerdings mit inhibitorischem Charakter.



**Abb. 41: Stimulation der Cys-LT-Synthese durch TXA<sub>2</sub>.** Detaillierte Beschreibung im Text. Die Abnahme der Cys-LT Bildung durch COX- oder TXA<sub>2</sub>-Rezeptorhemmung betrug 60 bis 80%.

Auf der anderen Seite scheint auch die Prostanoid-Synthese durch Cys-LT auf Rezeptorebene beeinflusst zu werden. Nachdem MK 886 keinen Einfluss auf die Prostanoidbildung gezeigt hatte, konnte im Falle einer Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade durch LY 171883 überraschenderweise eine massive Stimulation der Bildung aller drei gemessener Prostanoiden (PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und TXA<sub>2</sub>) beobachtet werden (Abb. 42). Dieser Befund zeigt erstmals eine inhibitorische Regulation der Prostanoid-Synthese durch den Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor in der Leber. Ferner zeigen die Ergebnisse zweifelsfrei, dass die mit MK 886 und LY 171883 beobachteten drucksenkenden Effekte nicht auf einer gleichzeitigen Hemmung der Bildung vasokonstriktorischer

Prostanoide beruhen, sondern sogar mit einer massiv gesteigerten Prostaglandin-Bildung einhergehen können.



**Abb. 42: Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Inhibition der Prostanoid-Bildung. Detaillierte Beschreibung im Text.**

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse somit eine Stimulation der Cys-LT-Synthese durch TXA<sub>2</sub>, während eine Stimulation des Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptors die Bildung von TXA<sub>2</sub> als negativer feed-back Mechanismus inhibiert.

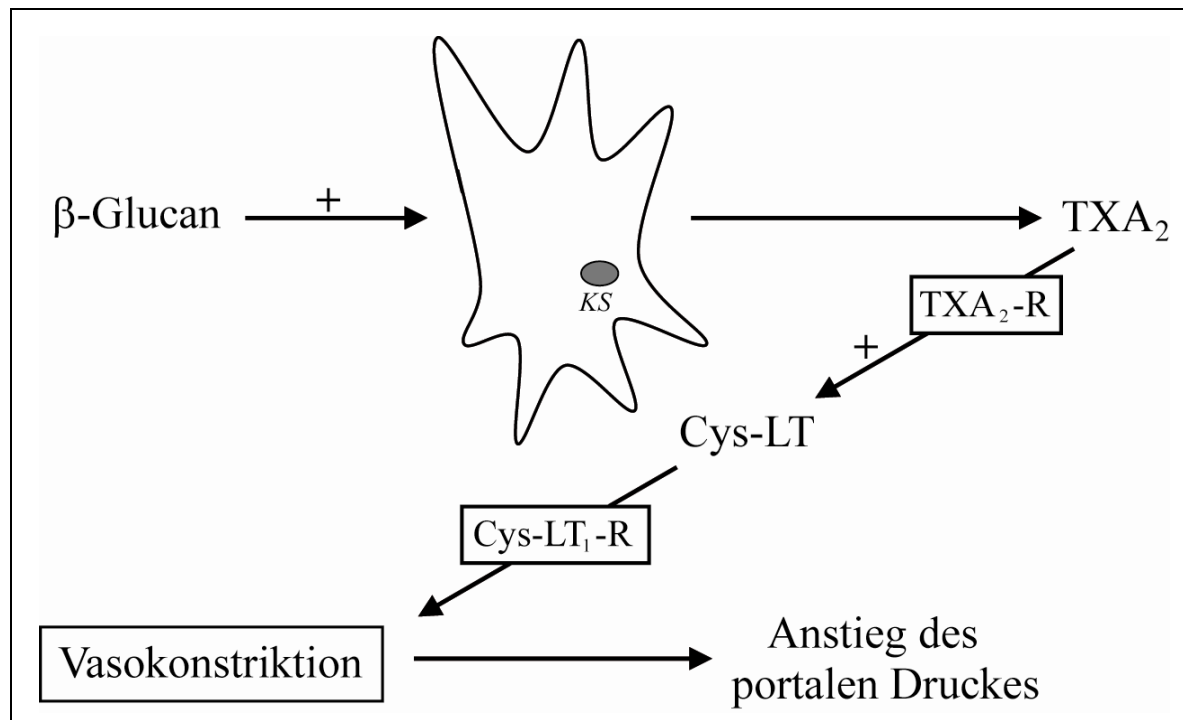
Eine derartige gegenseitige Beeinflussung von TXA<sub>2</sub> und Cys-LT bezüglich der Vermittlung von vasokonstriktorischen Effekten in der Leber nach KS-Aktivierung ist bislang nicht beschrieben worden. Dennoch finden sich für andere Systeme, wie etwa für die Vermittlung der Kontraktion glatter Muskulatur in der Lunge des Meerschweinchens (Piper PJ *et al.*, 1982), Angaben zu einer Interaktion zwischen Prostanoiden und Leukotrienen auf Rezeptorebene. Auch wenn Piper *et al.* eine Stimulation der TXA<sub>2</sub>-Synthese durch Cys-LT und somit den umgekehrten Fall beschreiben, so wird hierdurch dennoch die Möglichkeit einer gegenseitigen Beeinflussung der Synthese dieser Arachidonsäuremetaboliten verdeutlicht und unsere Hypothese prinzipiell unterstützt.

### **5.6.2 Sequenz der TXA<sub>2</sub>/Cys-LT Vernetzung bei der Vermittlung des portalen Druckanstieges**

Da eine kombinierte Inhibition von TXA<sub>2</sub> und Cys-LT gegenüber einer alleinigen Gabe keinen zusätzlichen Effekt auf den Druckanstieg nach KS-Aktivierung erbrachte, muss eine Interaktion im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke angenommen werden. In Zusammenschau der oben aufgeführten Ergebnisse scheinen Cys-LT die besagte Endstrecke der Eicosanoid-vermittelten Konstriktion der hepatischen Gefäße nach KS-Aktivierung darzustellen. Das entscheidende Experiment zur Klärung der gegenseitigen Beeinflussung von TXA<sub>2</sub> und Cys-LT und der Sequenz ihrer Verknüpfung gelang mit der gleichzeitigen Gabe des stabilen TXA<sub>2</sub>-Analogons U-46619 und LY 171883 bzw. MK 886: Mit beiden Substanzen war eine komplette Verhinderung des normalerweise durch U-46619 ausgelösten massiven Druckanstiegs zu erreichen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass sich die durch U-46619 und Cys-LT an der isoliert perfundierten Rattenleber auslösbaren hämodynamischen Veränderungen, im Sinne einer Abnahme des Perfusionsflusses, stark ähneln (Iwai M *et al.*, 1988).

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der verwendeten Inhibitoren LY 171883 und MK 886 erscheint eine Interaktion am TXA<sub>2</sub> Rezeptor als Ursache der beobachteten Drucksenkung unrealistisch. Vielmehr ergibt sich hieraus ein neues Konzept der Eicosanoid-vermittelten portalen Druckerhöhung. Hierbei stimuliert TXA<sub>2</sub> die Synthese der Cys-LT, die letztendlich einen signifikanten Anteil (50%) der portalen Druckerhöhung nach KS Aktivierung vermitteln (Abb. 43).

Mit diesem Konzept vereinbar ist auch die Beobachtung, dass sowohl Cys-LT (Shibamoto T *et al.*, 2005) als auch TXA<sub>2</sub> (Ruan Z *et al.*, 2004) in der Leber durch Einfluss auf die postsinusoidale Strombahn vasokonstriktorische Effekte vermitteln können.



**Abb. 43: Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelter Anstieg des portalen Druckes nach KS-Aktivierung.** Hypothese einer durch  $\text{TXA}_2$  stimulierten Cys-LT-Synthese. Detaillierte Beschreibung im Text.

### 5.7 Übertragbarkeit auf Zirrhose-Modelle

Die portale Hypertension und die damit assoziierte lebensbedrohliche Komplikation der Varizenblutung kommt vornehmlich bei Patienten mit Leberzirrhose vor. Deshalb verfolgt unsere Arbeitsgruppe das Ziel, die bisherigen Versuche auf das Modell der isoliert perfundierten zirrhotischen Rattenleber zu übertragen. Experimentelle Zirrhosemodelle stellen zum Beispiel die Tetrachlorkohlenstoff induzierte Zirrhose ( $\text{CCL}_4$ ) oder das Modell der bile duct ligation (BDL) (Kountouras J *et al.*, 1984) dar. Eine Aktivierung der KS ist auch in der zirrhotischen Leber möglich. Dies gelang mit Endothelinen (Yang Y *et al.*, 2003), PAF (platelet activating factor) (Noda *et al.*, 1996) und auch durch Zymosan (Chao TC *et al.*, 1999). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen einen massiven Anstieg des Pfortaderhochdruckes fibrotischer Rattenlebern nach KS-Aktivierung *in vitro* und *in vivo* (Steib CJ *et al.*, 2007). Ferner zeigen erste Ergebnisse an fibrotischen Rattenlebern ein bedeutend stärkeres Ansprechen auf den durch KS-Aktivierung freigesetzten Vasokonstriktor  $\text{TXA}_2$  (Yokoyama Y *et al.*, 2003; Miller AM *et al.*, 2007).

Es ist bekannt, dass der Metabolismus der Eicosanoide in der zirrhotischen Leber starken Veränderungen unterworfen ist (Huber M *et al.*, 1989). So wurde beispielsweise eine Induktion der 5-LPO in KS mit vermehrter Bildung von Cys-LT durch Hepatozyten beschrieben (Titos E *et al.*, 2000; Graupera M *et al.*, 2002), während die gesteigerte Bildung mit einer Verminderung des Abbaus und der Ausscheidungskapazität einhergeht (Hagemann W und Keppler D, 1988; Birney Y *et al.*, 2003). Sowohl in der gesunden als auch in der zirrhotischen Rattenleber steigern Cys-LT (LTD<sub>4</sub>) dosisabhängig den portalen Druck durch Anhebung des portohepatischen vaskulären Widerstandes (Graupera M *et al.*, 2002). Jedoch scheint der vasokonstriktorische Effekt der Cys-LT signifikant höher zu sein, was auf eine besondere Empfindlichkeit der zirrhotischen Leber auf Cys-LT hindeutet. Eine Inhibition der 5-LPO reduzierte in zirrhotischen Lebern den portalen Druck bedeutend stärker als in normalen Lebern. Eine selektive CysLT<sub>1</sub>R- bzw. eine duale CysLT<sub>1</sub>- und CysLT<sub>2</sub>R- Blockade vermochte zwar in den Kontrolllebern eine mit der nach 5-LPO Inhibition vergleichbaren Reduktion des portalen Druckes zu bewirken, in den zirrhotischen Lebern dagegen war dieser Effekt nur durch 5-LPO-Hemmung zu erreichen. Es ist deshalb möglich dass ein Cys-LT<sub>3</sub> Rezeptor existiert, der die vasokonstriktorischen Effekte der Cys-LT bei Leberzirrhose bewirkt (Graupera M *et al.*, 2002). Ob sich Beobachtungen auch im Falle des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung machen lassen, bleibt abzuwarten. Sollte sich dies jedoch bewahrheiten, so wären für therapeutische Optionen auf Rezeptorebene neue selektive Cys-LTR Antagonisten notwendig. Deren Entwicklung dürfte durch die z.T. bereits gelungene Klonierung von Cys-LT Rezeptorsubtypen vereinfacht worden sein (Capra V, 2004).

## **5.8 Klinische Relevanz und therapeutische Perspektiven**

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der enorme Anstieg des Pfortaderdruckes nach KS-Aktivierung. Bezüglich der klinischen Relevanz dieses Befundes bleibt festzuhalten, dass sich bei Patienten mit Ösophagusvarizenblutungen in bis zu 66% der Fälle bakterielle Infektionen nachweisen lassen (Soriano G *et al.*, 1992; Bernard B *et al.*, 1995 und 1999; Fukui H *et al.*, 1994). Da bakterielle Bestandteile wie Endotoxine und  $\beta$ -Glucane als potente KS-Aktivatoren bekannt sind (Su GL *et al.*, 2002), scheint eine KS-Aktivierung im Rahmen von Infektionen bei

Patienten mit Leberzirrhose prinzipiell denkbar. So stellte *Goulis* die Hypothese einer durch Endotoxin getriggerten Ösophagusvarizenblutung auf (*Goulis J et al.*, 1999). Selbst wenn es nach KS-Aktivierung in der klinischen Situation nicht zu einem ähnlich massiven portalen Druckanstieg wie in unserem Tier-Model kommen sollte, so könnte doch schon eine geringere Anhebung des Pfortaderdruckes eine Varizenblutung auslösen, da der basale Pfortaderdruck bei Leberzirrhose bereits deutlich erhöht ist (*Ready JB et al.*, 1991).

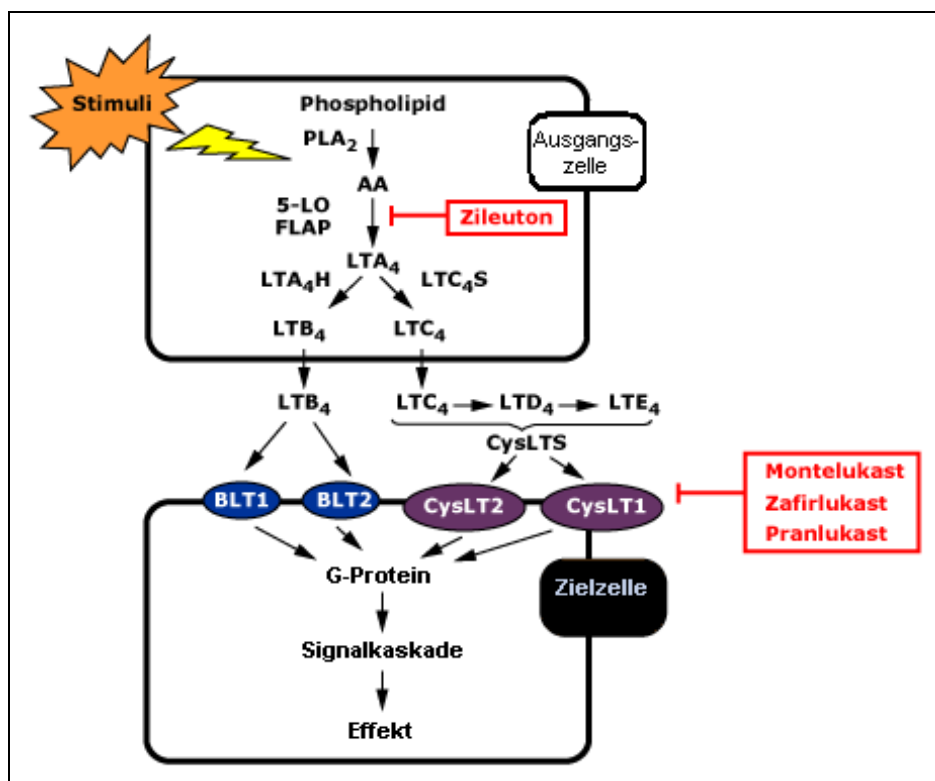
Durch unsere Ergebnisse konnte eine zentrale Rolle von  $\text{TXA}_2$  in der Vermittlung der portalen Druckerhöhung nach KS-Aktivierung nachgewiesen werden. Zudem liegen bereits erste Studien vor die zeigen, dass  $\text{TXA}_2$  auch in der zirrhotischen Ratten-Leber an der basalen portalen Druckerhöhung beteiligt ist (*Graupera M et al.*, 2002). Hierfür scheint eine vermehrte COX-II Expression in KS mit der Folge einer gesteigerten  $\text{TXA}_2$  Bildung verantwortlich zu sein (*Graupera M et al.*, 2003; *Yokoyama Y et al.*, 2003). Hemmt man die  $\text{TXA}_2$ -Wirkung, so lässt sich der portale Druckanstieg nach KS-Aktivierung in fibrotischen Lebern tatsächlich deutlich abschwächen (*Steib CJ et al.*, 2007). Jedoch müsste bei einer klinischen Anwendung von COX- Hemmern wie ASS oder Indomethacin (*Hernandez-Guerra M et al.*, 2005) mit schwerwiegenden Folgen gerechnet werden. Die durch die zirrrosebedingte Leberinsuffizienz bereits eingeschränkte Gerinnung würde durch Thrombozyten-Aggregationshemmer zusätzlich verschlechtert werden. Ein Umstand, der bei blutungsgefährdeten Ösophagusvarizen deletäre Folgen haben könnte (*Hochain P et al.*, 2000).

Die vorliegende Arbeit lieferte Hinweise, dass die vasokonstriktischen  $\text{TXA}_2$ -Effekte nach KS-Aktivierung letztlich über Cys-LT vermittelt werden. Daher liegt es nahe, primär eine Hemmung dieser „Endstrecke“ anzustreben.

Durch Cys-LT-Hemmung konnte eine etwa 50-prozentige Senkung des portalen Druckanstieges nach KS-Aktivierung erreicht werden. Eine komplette Verhinderung des Druckanstieges durch den alleinigen Einsatz von Anti-Cys-LT Medikamenten ist daher nicht zu erwarten. Eine signifikante Reduktion könnte jedoch bereits ausreichend sein, um eine Varizenruptur zu verhindern. Es ist deshalb durchaus erfolgsversprechend sich auf einen putativen Hauptmechanismus des Druckanstieges zu konzentrieren.

Die Hemmung der Cys-LT-Wirkung wäre aus mehreren Gründen attraktiv. Zum einen existieren bereits Cys-LT-Rezeptorantagonisten und -synthese-Hemmer, die zur

Therapie des Asthmas seit vielen Jahren als vergleichsweise sichere, oral verfügbare und effiziente Medikamente eingesetzt werden (Peters-Golden M, 2008). Zum anderen bietet ihr Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil (Lipworth BJ, 1999) weniger Anlass zur Sorge, dass sich eine weitere Verschlechterung der Blutungsneigung und der Leberfunktion einstellen könnte, als dies bei den COX-Hemmern der Fall ist. Cys-LT haben nicht nur vasokonstriktorische sondern auch ausgeprägte proinflammatorische Eigenschaften (Farzaneh-Far R und Moore K, 2003). Ein interessanter Nebeneffekt ihrer Beeinflussung im Rahmen der Behandlung der portalen Hypertension könnte somit sogar ein gewisser Schutz vor weiterer Leberschädigung sein (Keppler D *et al.*, 1985; Meng XJ *et al.*, 1997, Titos E *et al.*, 2005). Auch das oft zirrrosebegleitend auftretende hepatorenale Syndrom (HRS) dürfte durch Cys-LT-Modulatoren eher positiv beeinflusst werden (Badr KF *et al.*, 1984 und Capella GL, 2003).



**Abb. 44: Anti-Leukotrien Medikamente: Angriffspunkte der Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor-antagonisten und des 5-LPO Inhibitors** (modifiziert nach Peters-Golden M *et al.*, 2008). BLT1, Leukotrien B<sub>4</sub>-Rezeptor 1; BLT2, Leukotrien B<sub>4</sub>-Rezeptor 2; PLA<sub>2</sub>, Phospholipase A<sub>2</sub>; AA, Arachidonsäure. Detaillierte Beschreibung im Text.

Bei den vier klinisch verfügbaren Anti-Cys-LT Medikamenten handelt es sich um Zileuton, einen 5-LPO-Hemmer, sowie Montelukast, Pranlukast und Zafirlukast, Antagonisten am Cys-LT<sub>1</sub>R (Riccioni G *et al.*, 2007). Somit finden die von uns experimentell eingesetzten Substanzen MK 886 und NDGA ihre klinische Entsprechung in Zileuton, während LY 171883 den gleichen Wirkmechanismus wie Montelukast, Pranlukast und Zafirlukast aufweist (Abb. 44).

Bislang sind nur gegen den Cys-LT<sub>1</sub>R Medikamente entwickelt worden. Auch wenn es Hinweise gibt, dass zusätzliche Rezeptorklassen für die Cys-LT vermittelte Vasokonstriktion eine Rolle spielen könnten (Graupera M *et al.*, 2002; Jonsson EW, 1998), so lässt doch die erfolgreiche Hemmung des portalen Druckanstiegs nach Zymosan- bzw. U-46619-Gabe durch den Cys-LT<sub>1</sub>R Antagonisten LY 171883 den Schluss zu, dass die Blockade dieses Rezeptors in der Leber ein vielversprechender Therapieansatz ist.

Die Synthese der einzelnen Eicosanoide verläuft nicht gänzlich unabhängig voneinander. Eine Hemmung der Prostanoidbildung durch COX-Inhibitoren etwa, führt zu einer gesteigerten Bildung von Leukotrienen, wie die Pathogenese des Aspirin-induzierten-Asthma eindrucksvoll zeigt (Stevenson DD *und* Zuraw BL, 2003). Deshalb muss bei einer Beeinflussung des 5-LPO Weges sorgsam darauf geachtet werden, ob etwa eine vermehrte Synthese der COX-Produkte angestoßen wird, und inwieweit hierdurch Nebenwirkungen auftreten. Nach Cys-LT<sub>1</sub>-Blockade mit LY 171883 kam es in unseren Experimenten zu einem beträchtlichen Anstieg sämtlicher gemessener Prostanoiden (PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub>). Der Einsatz von MK 886 verursachte dahingegen keine Stimulation der Prostanoidsynthese, was den 5-LPO Hemmer Zileuton zu einem attraktiven Kandidaten für etwaige klinische Studien machen könnte. Es hat zudem gegenüber den Rezeptorantagonisten den theoretischen Vorteil, dass es weiter „stromaufwärts“ (Abb. 43) wirkt und infolgedessen die Synthese aller 5-LPO Produkte inklusive LTB<sub>4</sub> vermindert. Neben den Cys-LT wird auch dieser Leukotrien-Untergruppe ein Einfluss auf die hepatische Mikrozirkulation zugeschrieben. So konnte Ito kürzlich die LTB<sub>4</sub> vermittelte Abnahme der sinusoidalen Perfusion nach Endotoxinexposition zeigen (Ito S *et al.*, 2007). Sollte tatsächlich ein anderer Rezeptorsubtyp als CysLT<sub>1</sub>-R für die Cys-LT vermittelte Vasokonstriktion in der zirrhotischen Leber verantwortlich sein (Graupera M *et al.*, 2002), so würde das allenfalls den Einsatz der Rezeptorantagonisten in Frage stellen, nicht jedoch von Zileuton.



Die ursprünglich zur Asthma-Behandlung entwickelten Anti-LT Medikamente werden zunehmend auch bei anderen Erkrankungen wie etwa der Migräne eingesetzt (Capella GL *et al.*, 2003; Ricchioni G *et al.*, 2007). Die Frage ob eine derartige gezielte pharmakologische Intervention auch in der zirrhotischen Leber sinnvoll ist, kann nur durch eine weitere Aufklärung des komplexen Netzwerkes vaso-konstriktorischer und –relaxierender Mechanismen beantwortet werden. Sofern auch in der zirrhotischen Leber die Cys-LT diesbezüglich eine zentrale Rolle einnehmen, was sich bereits abzuzeichnen scheint (Graupera M *et al.*, 2002), so wären klinische Studien zum Einsatz von Cys-LT-Hemmern in der Prävention und zur Behandlung der akuten Varizenblutung vorstellbar.

## 6. Zusammenfassung

Basierend auf den Ergebnissen klinischer Studien müssen **bakterielle Infektionen als Trigger akuter Ösophagusvarizenblutungen** bei Patienten mit Leberzirrhose angenommen werden. Hierfür werden Permeabilitätsstörungen der Darmwand als Folge der portalen Hypertonie verantwortlich gemacht, die eine Einschwemmung pathogener Darmkeime in die portale Zirkulation begünstigen. **Kupffer'sche Sternzellen (KS)**, die residenten Makrophagen der Leber, kommen nicht nur als größte sondern auch als erste Makrophagenpopulation des menschlichen Körpers mit pathogenen Darmbakterien in Kontakt. Durch bakterielle Bestandteile wie Endotoxine oder die in der Zellwand von Bakterien und Pilzen verankerten  $\beta$ -Glucane, werden KS aktiviert und produzieren in der Folge verschiedene Vasokonstriktoren, die den portalen Druck massiv erhöhen. Die von aktivierten KS gebildeten Vasokonstriktoren sind deshalb als potenzielle Mediatoren einer Infekt-getriggerten Varizenblutung anzusehen. Von großem klinischen Interesse ist deshalb die Identifizierung der verantwortlichen Vasokonstriktoren als Basis für die Entwicklung pharmakologischer Strategien zur Prävention Infekt-getriggelter Varizenblutungen.

Bislang konnte die Beteiligung des Cyclooxygenase- Weges und insbesondere die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) an der portalen Druckerhöhung durch aktivierte KS nachgewiesen werden. Allerdings konnte im Tierexperiment durch den Einsatz von Cyclooxygenase- Inhibitoren und TXA<sub>2</sub> -Antagonisten der portale Druckanstieg nach KS Aktivierung nur um 50% reduziert werden, weshalb die Beteiligung weiterer Vasokonstriktoren angenommen werden muss. Die Identifizierung der bislang unbekannt Vasokonstriktoren als wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit erscheint nicht zuletzt auch deshalb von besonderem klinischen Interesse, da sich eine pharmakologische Hemmung der bislang identifizierten Cyclooxygenase- bzw. TXA<sub>2</sub>- abhängigen Wege der Vasokonstriktion bei Patienten mit Leberzirrhose wegen der Gefahr schwerwiegender Nebenwirkungen verbietet. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Rolle vasokonstriktorischer Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LT) bei der portalen Druckerhöhung durch aktivierte KS untersucht werden.

Die Experimente wurden am **Modell der isoliert perfundierten Rattennleber** mit einem zellfreien Krebs-Henseleit Puffer durchgeführt. Dieses Modell erlaubt die selektive Aktivierung der KS ohne störende Einflüsse durch extrahepatische

Makrophagen. KS wurden durch eine 6- minütige Infusion von Zymosan (150 µg/ml), β-Glucan- reiche Zellwandpartikel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, aktiviert. Als wesentliche Ergebnisse bleiben festzuhalten:

- **Portale Hypertension durch aktivierte KS:** Die Stimulation der Kupfferschen Sternzellen durch Zymosan führt zu einem transienten Anstieg des portalen Druckes um annähernd 400%. Daran schliesst sich eine mindestens zweistündige Druckerhöhung um ca. 60% an. Diese hämodynamischen Effekte konnten durch eine funktionelle Inaktivierung der KS mittels Gadoliniumchlorid- Vorbehandlung nahezu vollständig aufgehoben werden. Die Ergebnisse bestätigen somit das enorme drucksteigernde Potential der aktivierten KS.
- **Stimulation der hepatischen Cys-LT- Synthese nach KS-Aktivierung:** Die portale Druckerhöhung nach Aktivierung der KS ging mit einer 40-fachen Zunahme der Ausscheidung von Cys-LT in die Galle einher. Auch dieser Effekt konnte durch eine funktionelle Inaktivierung der KS mittels Gadoliniumchlorid aufgehoben werden. Eine Aktivierung der KS führt somit zu einer massiven Stimulation der hepatischen Cys-LT- Synthese, die prinzipiell für die beobachtete portale Druckerhöhung verantwortlich sein könnte.
- **Funktionelle Bedeutung der gesteigerten Cys-LT- Bildung:** Die gesteigerte Cys-LT- Freisetzung erfolgte ausschließlich in die Galle, während wir im Leberperfusat keine Zunahme der Cys-LT Konzentration nach KS- Aktivierung nachweisen konnten. Diese Beobachtung kann durch die Existenz äußerst effizienter Cys-LT- Transporter in der sinusoidalen Membran erklärt werden, wodurch >90% der Cys-LT aus dem portalen Blutstrom eliminiert und anschließend in die Galle ausgeschieden werden. Umso interessanter war deshalb die Frage der funktionellen Bedeutung der beobachteten Stimulation der Cys-LT- Synthese. Hierzu wurden Lebern mit den 5-LPO Inhibitoren NDGA und MK 886 in Kombination mit Zymosan perfundiert. Die untersuchten Inhibitoren führten zu einer signifikanten ( $p < 0.05$ ) Reduktion des maximalen portalen Druckanstieges nach KS- Aktivierung um 50%. Erwartungsgemäß wurde die nach KS- Aktivierung massiv gesteigerte biliäre Cys-LT- Ausscheidung durch MK 886 vollständig aufgehoben. Diese Ergebnisse

zeigen somit eine zentrale Bedeutung der gesteigerten Cys-LT- Bildung für die portale Hypertonie nach KS- Aktivierung.

- **Bedeutung des Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptors:** Basierend auf den oben aufgeführten Ergebnissen sollte im nächsten Schritt der für vasokonstriktorische Cys-LT- Effekte verantwortliche Cys-LT- Rezeptor identifiziert werden. Hierzu wurden Lebern mit dem Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten LY 171883 in Kombination mit Zymosan perfundiert. Abermals konnte hierdurch eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Reduktion des maximalen portalen Druckanstieges nach KS- Aktivierung um 50% erzielt werden. Ein durch Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelter Mechanismus der hepatischen Vasokonstriktion muss deshalb angenommen werden.
- **Cys-LT- unabhängige sinusoidale Konstriktion nach KS- Aktivierung:** Da Cys-LT eine Kontraktion kultivierter Ito-Zellen auslösen und letztere durch eine sinusoidale Konstriktion den portalen Druck erhöhen können, wurde im nächsten Schritt der Einfluss einer KS- Aktivierung auf den Durchmesser der Sinusoide *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie (IVM) untersucht. Hierbei konnte eine 20%-ige Abnahme der Sinusoid- Durchmesser in den periportal, midzonalen und perivenösen Zonen der sinusoidalen Strombahn nachgewiesen werden. Die Abnahme der Sinusoid- Durchmesser wurde durch den 5-Lipo Synthase Inhibitor MK 886 nicht beeinflusst, was für einen Cys-LT- unabhängigen Mechanismus der sinusoidalen Konstriktion spricht. Da ferner eine präsinusoidale Konstriktion bei intrasinusoidaler Aktivierung der KS ausgeschlossen werden kann, scheint für die beobachtete Cys-LT- abhängige Erhöhung des Pfortaderdruckes nach KS- Aktivierung eine Widerstandserhöhung in der postsinusoidalen Strombahn verantwortlich zu sein.
- **Keine zusätzliche portale Drucksenkung durch kombinierte Hemmung von Prostanoid- und Cys-LT- Wegen:** Die Aktivierung der KS durch Zymosan führte ferner zu einer bis um den Faktor 80 gesteigerten Bildung der Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und TXA<sub>2</sub>. Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung konnte durch Experimente mit dem COX- Inhibitor Indomethacin, dem TXA<sub>2</sub> –Synthasehemmstoff Furegrelate sowie dem TXA<sub>2</sub> – Rezeptorantagonisten BM 13.177 bestätigt werden: Der maximale Anstieg des portalen Druckes nach KS- Aktivierung wurde durch alle Wirkstoffe ähnlich um ca. 50% vermindert, was den bekannten COX-TXA<sub>2</sub>- medierten Mechanismus der portalen Druckerhöhung bestätigt. Es lag deshalb nahe, in weiteren

Experimenten die Hemmung dieses Prostanoidweges in Kombination mit dem 5-LPO- Inhibitor MK 886 und dem Cys-LT<sub>1</sub>- Rezeptorantagonisten LY 171883 zu untersuchen. Interessanterweise konnte durch unterschiedliche Kombinationen dieser Wirkstoffe (NDGA plus Indomethacin, LY 171883 plus Indomethacin, LY 171883 plus BM 13.177) ebenfalls nur eine 50%-ige Reduktion des portalen Druckanstieges nach KS- Aktivierung erzielt werden. Eine additive drucksteigernde Wirkung von Prostanoiden und Cys-LT kann somit in dem von uns verwendeten experimentellen Modell der KS- Aktivierung ausgeschlossen werden. Die weitere Aufklärung dieser nicht erwarteten Ergebnisse war Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

- **Vernetzung von Prostaglandin- und Cys-LT- Wegen in der Leber:** Allgemein akzeptiert ist die Ansicht, dass eine Hemmung der COX den Arachidonsäure- Flux durch den Leukotrien-Weg erhöht bzw. umgekehrt eine 5-LPO- Hemmung die Bildung von Prostanoiden steigern kann. Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse bislang nicht bekannte Interaktionen von Prostanoiden und Cys-LT in der Leber:
  - Überraschend war zunächst die Beobachtung, dass eine COX-Hemmung durch Indomethacin die Cys-LT- Bildung nicht erhöht, sondern erniedrigt. Ebenfalls überraschend war der Nachweis einer durch 5-LPO- Hemmung nicht beeinflussten Bildung der vasokonstriktorisches Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und TXA<sub>2</sub>. Auf Grund dieser Ergebnisse ergeben sich somit keine Hinweise für die bisher favorisierte klassische Verknüpfung von Prostanoid- und Cys-LT- Synthesewegen im Falle einer Aktivierung hepatischer KS.
  - Der inhibitorische Effekt einer COX-Hemmung auf die Cys-LT- Bildung konnte in gleichem Ausmaß durch TXA<sub>2</sub> –Rezeptorblockade erreicht werden. Prostanoid- und Cys-LT- Wege sind somit über TXA<sub>2</sub> verknüpft, wobei die Cys-LT Bildung durch TXA<sub>2</sub> im Sinne einer Stimulation moduliert wird.
  - Cys-LT<sub>1</sub> -Rezeptorblockade mit LY 171883, nicht aber die Hemmung der 5-LPO durch MK 886, steigerte die Bildung der vasokonstriktorisches Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und TXA<sub>2</sub>. Dieses Ergebnis zeigt erstmals eine inhibitorische Regulation der Prostanoidsynthese durch den Cys-LT<sub>1</sub> – Rezeptor. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse also eine

Stimulation der Cys-LT- Synthese durch TXA<sub>2</sub>, während eine Stimulation des Cys-LT<sub>1</sub> –Rezeptors die Bildung von TXA<sub>2</sub> als negativer feed-back Mechanismus inhibiert.

- Zusätzliche Hinweise für eine Vernetzung von TXA<sub>2</sub> -und Cys-LT- Signalwegen ergaben Experimente mit dem TXA<sub>2</sub> -Rezeptoragonisten U-46619. Letzterer führte zu einer 400%-igen Erhöhung des portalen Druckes, die sowohl durch eine 5-LPO-Hemmung mit MK 886 als auch durch Cys-LT<sub>1</sub>–Rezeptorblockade mit LY 171883 vollständig aufgehoben wurde.

**Zusammenfassend** führen diese Ergebnisse zu einem neuen Konzept der portalen Hypertension durch  $\beta$ -Glucane unter Beteiligung aktivierter KS, TXA<sub>2</sub> und Cys-LT. Ferner zeigen diese Ergebnisse erstmals eine bislang nicht beschriebene Vernetzung von Prostaglandin- und Cys-LT- Signalwegen unter der Kontrolle von TXA<sub>2</sub>- und Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptoren. Für die portale Druckerhöhung nach KS-Aktivierung muss ein durch TXA<sub>2</sub> medierter Mechanismus der Cys-LT –Bildung mit nachfolgender CysLT<sub>1</sub>–Rezeptorstimulation angenommen werden. 5-LPO-Inhibitoren wie MK 886, die die Synthese von Prostanoiden nicht beeinflussen, sind dabei als besonders aussichtsreiche Kandidaten zur pharmakologischen Prävention der Infekt- getriggerten portalen Hypertension zu erachten.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

BM 13.177	Sulotroban
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
Cys-LT	Cysteinyl-Leukotriene
Cys-LTR	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EIA	Enzyme immuno essay
ET	Endothelin
FLAP	Five-Lipooxygenase-Activating-Protein
Fure	Furegrelate= 5-(3-Pyrimidinylmethyl)-benzofurancarboxylic acid
GdCl <sub>3</sub>	Gadolinium (III) Chlorid Hexahydrat
HS	Hepatische Sternzelle
Indo	Indomethacin = 1-(p-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid
IVM	Intravitalmikroskopie
KS	Kupffer'sche Sternzellen
5-LPO	5-Lipooxygenase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
LY 171883	1-[2-hydroxy-3-propyl-4-[4-(1H-tetrazol-5-yl)butoxy]phenyl]-ethanone
MK 886	3-[1-(p-Chlorobenzyl)-5-(isopropyl)-3-t-butylthioindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid, Na
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid
NO	Stickstoffmonoxid
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXA <sub>2</sub> R	Thromboxan A <sub>2</sub> -Rezeptor
U-46619	9,11-Dideoxy-9α, 11α-methanoepoxy-prostaglandin F <sub>2α</sub>
Zy	Zymosan A

## 8. Literaturverzeichnis

Akerboom TP (a), Bilzer M, Sies H. Competition between transport of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugates from perfused rat liver into bile. *FEBS Lett* 1982; 5: 73-6.

Akerboom TP (b), Bilzer M, Sies H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem.* 1982; 25: 4248-52.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immun* 2001; 2: 675-80.

Badr KF, Baylis C, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Soberman RJ, Lewis RA, Austen KF, Corey EJ, Brenner BM. Renal and systemic hemodynamic responses to intravenous infusion of leukotriene C4 in the rat. *Circ Res* 1984; 54: 492-9.

Baker RR. The eicosanoids: A historical overview. *Clin Biochem* 1990; 23: 455-458.

Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Görbig MN, Garcia-Ramallo, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Rodes J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 615-624.

Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Aponte JJ, Berger D, Kist M, Blum HE. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2364-2370.

Bernard B, Cadranel JF, Valla D, Escolano S, Jarlier V, Opolon P. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: A prospective study. *Gastroenterology* 1995; 108: 1828-1834.



Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 1999; 29: 1655-1661.

Bilzer M, Lauterburg BH. Peptidoleukotrienes increase the efflux of glutathione from perfused rat liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993; 49: 715-721.

Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999; 276: G1137-G1144.

Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib CJ, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion* 2002; 66: 49-57.

Bilzer M, Gerbes AL. Kupffer Cells. In: Dufour JF; Claviel PA ed. Signaling pathways in liver diseases. Berlin, Heidelberg, New York. Springer Verlag, 2005: 45-52.

Birney Y, Redmond EM, Sitzmann JV, Cahill PA. Eicosanoids in cirrhosis and portal hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003; 72: 3-18.

Blendis L, Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 221-231.

Borgeat P, Samuelsson B. Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *J Biol Chem* 1979; 254: 7865-9.

Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38: 54-68.

Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* 2001; 159: 2081-8.

Burka JF, Peterson NA. Evidence for lipoxygenase pathway involvement in allergic tracheal contraction. *Prostaglandins* 1980; 19: 499-515.

Capella GL. Anti-leukotriene drugs in the prevention and treatment of hepatorenal syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 68: 263-5.

Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res* 2004; 50: 1-11.

Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev* 2007; 27:469-527.

Chao TC, Chao HH, Lin JD, Chen MF. Somatostatin and octreotide modulate the function of Kupffer cells in liver cirrhosis. *Regul Pept.* 1999; 79: 117-24.

Clark MA, Littlejohn D, Mong S, Crooke ST. Effect of leukotrienes, bradykinin and calcium ionophore (A 23187) on bovine endothelial cells: release of prostacyclin. *Prostaglandins* 1986; 31: 157-66.

Coleman RA, Eglen RM, Jones RL, Narumiya S, Shimizu T, Smith WL, Dahlén SE, Drazen JM, Gardiner PJ, Jackson WT. Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995; 23: 283-5.

Cramer EB, Pologe L, Pawlowski NA, Cohn ZA, Scott WA. Leukotriene C promotes prostacyclin synthesis by human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4109-4113

Cui S, Shibamoto T, Liu W, Takano H, Kurata Y. Effects of platelet-activating factor, thromboxane A<sub>2</sub> and leukotriene D<sub>4</sub> on isolated perfused rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006; 80: 35-45.

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

D'Amico G, Luca A. Natural history. Clinical-haemodynamic correlations. Prediction of the risk of bleeding. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1997; 11: 243-56.

D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Sem Liver Dis* 1999; 19: 475-505.

De Franchis R, Primignani M. Natural history of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 645-663.

De Franchis R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2005; 43: 167-76.

Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-261.

Dell'era A, Bosch J. The relevance of portal pressure and other risk factors in acute gastro-oesophageal variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl. 3:8-15.

Dieter P, Altin JG, Decker K, Bygrave FL. Possible involvement of eicosanoids in the zymosan and arachidonic-acid-induced oxygen uptake, glycogenolysis and Ca<sup>2+</sup> mobilization in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1987; 165: 455-460.

Dieter P, Schulze Specking A, Decker K. Ca<sup>2+</sup> requirement of prostanoid but not of superoxide production by rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1998; 177: 61-67.

Ember JA, Hugli TE. Complement factors and their receptors. *Immunopharm* 1997; 38: 3-15.

Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunbiol* 2005; 210: 153-160.

Farzaneh-Far R, Moore K. Cysteinyl-leukotrienes and the liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003; 72: 35-50.

Fennekohl A, Schieferdecker HL, Jungermann K, Püschel GP. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *J Hepatol* 1999; 30: 38-47.

Feuerstein N, Foeg M, Ramwell PW. Leukotrienes C4 and D4 induce prostaglandin and thromboxane release from rat peritoneal macrophages. *Br J Pharmacol* 1981; 72:389-391.

Fleish JH, Cloud ML, Marshall WS. A brief review of preclinical and clinical studies with LY 171883 and some comments on newer cysteinyl receptor antagonists. *Ann NY Acad Sci* 1988; 524: 356-368.

Fox ES, Thomas P, Broitmann SA. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun* 1987; 55: 2692-6.

Fukai F, Suzuki Y, Ohtaki H, Katayama T. Rat hepatocytes generate peptide leukotrienes from leukotriene A4. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 378-84.

Fukai F, Suzuki Y, Nishizawa Y, Katayama T. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes by Kupffer cell-hepatocyte cooperation in rat liver. *Cell Biol Int* 1996; 20: 423-8.

Fukui H, Matsumoto M, Tsujita S, Takaya A, Kojima H, Matsumura M, Tsujii T. Plasma endotoxin concentration and endotoxin binding capacity of plasma acute phase proteins in cirrhotics with variceal bleeding: an analysis by new methods. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9: 582-586.

Gerbes AL, Gülberg V, Wiggershauser T, Holl J, Reiser M. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) for variceal bleeding in portal hypertension: comparison of emergency and elective interventions. *Digestion Disease Science* 1998; 43: 2463-2469.

Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 1986; 6: 511-517.

Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM, Koller BH. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ;91: 12852-6.

Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet* 1999; 353: 139-142.

Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, Rodes J. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002; 122: 387-93.

Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abrales JG, Peralata C, Albarn D, Bragulat M, Corominola H, Bosch J, Rodes J. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003; 37: 172-181.

Gregory SH, Cousens LP, van Rooijen N, Dopp EA, Carlos TM, Wing EJ. Complementary adhesion molecules promote neutrophil - Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J Immunol* 2002; 268: 308-15.

Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Endoscopic variceal banding vs. pharmacological therapy for the prevention of recurrent variceal hemorrhage: what makes the difference? *Gastroenterology* 2002; 123: 1388-91.

Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-43.

Gülberg V, Schepke M, Geigenberger G, Holl J, Brensing KA, Wagershauser T, Reiser M, Schild HH, Sauerbrauch T, Gerbes AL. Transjugular portosystemic shunting is not superior to endoscopic variceal band ligation for prevention of variceal bleeding in cirrhotic patients: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroent* 2002; 37: 338-343.

Guerrero AT, Verri WA Jr, Cunha TM, Silva TA, Schivo IR, Dal-Secco D, Canetti C, Rocha FA, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 122-30.

Gunnarsdottir SA, Sadik R, Shev S, Simren M, Sjøvall H, Stotzer PO, Gallagher L, Abrahamsson H, Olsson R, Björnsson ES. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1362-1370.

Häussinger D, Stehle T, Gerok W. Effects of leukotriens and the thromboxane A<sub>2</sub> analogue U-46619 in isolated perfused rat liver. *Biological Chemistry* 1988; 369: 97-107.

Hagemann W, Keppler D. Leukotrienes and other eicosanoids in liver pathophysiology. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter DA, ed. *The liver: biology and pathobiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven press, Ltd; 1988.

Harizi H, Juzan M, Moreau JF, Gualde N. Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B<sub>4</sub> production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170: 139-46.

Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 30531-6.

Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 131-7.

Hochain P, Capet C, Colin R. Digestive complications of aspirin. *Rev Med Interne* 2000; 21: 50-59.

Huber M, Kastner S, Scholmerich J, Gerok W, Keppler D. Analysis of cysteinyl leukotrienes in human urine: enhanced excretion in patients with liver cirrhosis and hepatorenale syndrome. *Eur J Clin Invest* 1989; 19: 53-60.

Huber M, Muller J, Leier I, Jedlitschky G, Ball HA, Moore KP, Taylor GW, Williams R, Keppler D. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in monkey and man. *Eur J Biochem* 1990; 26: 309-15.

Iwai M, Jungermann K. Leukotrienes increase glucose and lactate output and decrease flow in perfused rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 29: 283-90.

Ito S, Ito Y, Katagiri H, Suzuki T, Hoka S, Yokomizo T, Shimizu T, Majima M. Leukotriene B<sub>4</sub>/Leukotriene B<sub>4</sub> receptor pathway is involved in hepatic microcirculatory dysfunction elicited by endotoxin. *Shock* 2007 Nov 8. [Epub ahead of print].

Jaeschke H. Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13: 737-743.

Jaeschke H, Raftery MJ, Justesen U, Gaskell SJ. Serum complement mediates endotoxin-induced cysteinyl leukotriene formation in rats in vivo. *Am J Physiol* 1992; 263: 947-52.

Jonsson EW. Functional characterization of receptors for cysteinyl leukotrienes in smooth muscle. *Acta physiol Scand Suppl* 1998; 641: 1-55.

Kappas A. A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics* 2004; 113: 119-123.

Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic micro-circulatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology* 2004; 39: 139-50.

Kawada N, Klein H, Decker K. Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 1992; 285: 367-371.

Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213: 815-823.

Keppler D, Huber M, Baumert T, Guhlmann A. Metabolic inactivation of leukotrienes. *Adv Enzyme Regul* 1989; 28: 307-19.

Keppler D, Müller M, Klunemann C, Guhlmann A, Krauss K, Müller J, Berger U, Leier I, Mayatepek E. Transport and in vivo elimination of cysteinyl leukotrienes. *Adv Enzyme Regul* 1992; 32:107-116.

Keppler D, Forsthove C, Hagmann W, Rapp S. Leukotrienes and liver injury. In: Bianchi L, Gerok W, Popper H, editors. *Trends in Hepatology* England: MTP Press; 1985.

Klein A, Zhadkewich M, Margolick J, Winkelstein J, Bulkley G. Quantitative discrimination of hepatic reticuloendothelial clearance and phagocytotic killing. *J Leuk Biol* 1994; 55: 248-52.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 305-11.

Krell H, Dietze E. Hemodynamic and metabolic responses to Leukotriene C<sub>4</sub> in isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 10: 300-305.



Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-28.

Lemberg A, Calabrese G, Majowicz M, Peredo H, Scorticati C, Filingier E, Perazzo JC. Prostanoid production in endothelial and Kupffer liver cells from monocrotaline intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17: 564-569.

Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet* 1999; 353: 57-62.

Lo GH, Chen WC, Chen MH, Hsu PI, Lin CK, Tsai WL. Banding ligation versus nadolol and isosorbide mononitrate for the prevention of esophageal variceal rebleeding. *Gastroenterology* 2002; 123: 728-734.

Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 1999; 399: 789-93.

Maltby NH, Taylor GW, Ritter JM, Moore K, Fuller RW, Dollery CT. Leukotriene C4 elimination and metabolism in man. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 3-9.

Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjölander A. Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of alpha2beta1-integrin. *Exp Cell Res* 2003; 289: 342-51.

Maxis K, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D. The shunt from the cyclooxygenase to lipoxygenase pathway in human osteoarthritic subchondral osteoblasts is linked with a variable expression of the 5-lipoxygenase-activating protein. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 181.

McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 1993; 13: 1-12.

Meng XJ, Carruth MW, Weinman SA. Leukotriene D4 activates a chloride conductance in hepatocytes from lipopolysaccharide-treated rats. *J Clin Invest* 1997; 15: 2915-22.

Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991; 23: 158-169.

Miller AM, Masrourpour M, Klaus C, Zhang JX. LPS exacerbates endothelin-1 induced activation of cytosolic phospholipase A2 and thromboxane A2 production from Kupffer cells of the prefibrotic rat liver. *J Hepatol* 2007; 46: 276-85.

Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28.

Noda S, Masumi S, Moriyama M, Kannan Y, Ohta M, Sugano T, Yamate J. Population of hepatic macrophages and response of perfused liver to platelet-activating factor during production of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. *Hepatology* 1996; 24: 412-8.

Ofek I, Sharon N, Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 1988; 56: 539-47.

Patch D, Sabin CA, Goulis J, Gerunda G, Greenslade L, Merkel C, Burroughs AK. A randomized, controlled trial of medical therapy versus endoscopic ligation for the prevention of variceal bleeding in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1013-1019.

Pearson JM, Brown AP, Schultze AE, Ganey PE, Roth RA. Gadolinium chloride treatment attenuates hepatic platelet accumulation after lipopolysaccharide administration. *Shock* 1996; 3: 408-415.

Perry A, Ofek I. Inhibition of blood clearance and hepatic tissue binding of E. coli by liver lectin-specific sugars and glycoproteins. *Infect immune* 1984; 257-62.

Peters-Golden M, Henderson WR. Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007; 357: 1841-1854.

Peters-Golden M. Agents affecting the 5-lipoxygenase pathway in treatment of asthma. In: *UpToDate*, Rose, BD (Ed), *UpToDate*, Waltham, MA, 2008.

Piper PJ, Samhoun MN. Stimulation of arachidonic acid metabolism and generation of thromboxane A<sub>2</sub> by leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> in guinea pig lung in vitro. *Br J Pharmacol* 1982; 77: 267-275.

Polio J, Groszmann RJ. Hemodynamic factors involved in the development and rupture of esophageal varices: a pathophysiologic approach to treatment. *Sem Liver Dis* 1986; 6: 318-331.

Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; 6: 252-262.

Ready JB, Robertson AD, Goff JC, Rector WG. Assessment of the risk of bleeding from esophageal varices by continuous monitoring of portal pressure. *Gastroenterology* 1991; 100: 1403-1410.

Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581.  
Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, D'Orazio N. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1966-77.

Rovati GE, Capra V. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *Scien World J* 2007; 1: 1375-92.

Ruan Z, Shibamoto T, Shimo T, Koizumi T, Tsuchida H, Kurata Y, Ogura T, Kubo K. Effects of platelet-activating factor and thromboxane A<sub>2</sub> on isolated perfused guinea pig liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2004; 73; 73-85.

Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Hem-oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic complications. *Physiol Rev* 2006; 86: 583-650.

Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberger M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annual Reviews Biochem* 1978; 47: 997-1029.

Samuelsson B, Borgeat P, Hammarstrom S, Murphy RC. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 1979; 17: 785-7.

Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 657-63.

Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K. Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 2001; 72: 1692-1699.

Schieferdecker HL, Pestel S, Püschel GP, Götze O, Jungermann K. Increase by anaphylatoxin C5a of glucose output in perfused rat liver via prostanoids derived from nonparenchymal cells: direct action of prostaglandins and indirect action of thromboxane A<sub>2</sub> on hepatocytes. *Hepatology* 1999; 30: 454-461.

Schieferdecker HL, Schlaf G, Jungermann K, Gotze O. Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 469-81.

Shibamoto T, Ruan Z, Cui S, Liu W, Kurata Y. Involvement of platelet-activating factor and leukotrienes in anaphylactic segmental venoconstriction in ovalbumin sensitized guinea pig livers. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 78: 218-30.

Shimada K, Navarro J, Goeger DE, Mustafa SB, Weigel PH, Weinman SA. Expression and regulation of leukotriene-synthesis enzymes in rat liver cells. *Hepatology* 1998; 28: 1275-81.

Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 1996; 24: 1256-63.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers LPS responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-82.

Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P450 systems. *Methods Enzymol* 1978;52: 48-59.

Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzales D. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992; 103: 1267-1272.

Spolarics Z. Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am J Physiol* 1996; 270: G660-6.

Steib CJ, Gerbes AL, Bystron M, op den Winkel M, Ebensberger S, Roggel F, Prüfer T, Göke B, Bilzer M. Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A<sub>2</sub>. *J Hepatol* 2007; 47: 228-238.

Stevenson DD, Zuraw BL. Pathogenesis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 24: 169-88.

Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 773-86.

St-Onge M, Flamand N, Biarc J, Picard S, Bouchard L, Dussault AA, Laflamme C, James MJ, Caughey GE, Cleland LG, Borgeat P, Pouliot M. Characterization of prostaglandin E<sub>2</sub> generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1235-45.

Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol* 2002; 283: 256-265.

Suematsu M, Goda N, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused liver. *J Clin Invest* 1995; 96: 2431-2437.

Suematsu M, Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary functions. *Hepatology* 2000; 31: 3-6.

Takasaki J, Kamohara M, Matsumoto M, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T, Nishikawa T, Kawai Y, Masuho Y, Isogai T, Suzuki Y, Sugano S, Furuichi K. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 316-22.

Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunology* 1996; 156: 1235-1246.

Titos E, Claria J, Bataller R, Bosch-Marce M, Gines P, Jimenez W, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 119: 794-805.

Titos E, Claria J, Planaguma A, Lopez-Parra M, Gonzalez-Periz A, Gaya J, Miquel R, Arroyo V, Rodes J. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 871-878.

Tornhamre S, Edenius C, Lindgren JA. Receptor-mediated regulation of leukotriene C4 synthase activity in human platelets. *Eur J Biochem* 1995; 234: 513-20.

Van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. Vascular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 1995; 22: 1538-46.

Villanueva C, Minana J, Ortiz J, Gallego A, Soriano G, Sainz S, Torras X. Endoscopic ligation compared with combined treatment with nadolol and isosorbide mononitrate to prevent recurrent variceal bleeding. *N Engl J Med* 2001; 345: 647-655.

Walch L, Norel X, Bäck M, Gascard JP, Dahlén SE, Brink C. Pharmacological evidence for a novel cysteinyl-leukotriene receptor subtype in human pulmonary artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 1339-45.

Westcott JY, Johnston K, Batt RA, Wenzel SE, Voelkel NF. Measurement of peptidoleukotrienes in biological fluids. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2640-8.

Wettstein M, Noe B, Haussinger D. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in the perfused rat liver: the influence of endotoxin pretreatment and the cellular hydration state. *Hepatology*. 1995; 22: 235-40.

Wettstein M, Gerok W, Häussinger D. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in non-recirculating rat liver perfusion. Hepatocyte heterogeneity in uptake and biliary excretion. *Eur J Biochem* 1989; 15: 115-24.

Yang Y, Harvey SA, Gandhi CR. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl<sub>4</sub>-induced cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 2003; 39: 200-207.

Yokoyama Y, Xu H, Kresge N, Keller S, Sarmadi AH, Baveja R, Clemens MG, Zhang JX. Role of thromboxane A<sub>2</sub> in early BDL-induced portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G453-460.

Young JS, Passmore JC. Hemodynamic and renal advantages of dual Cyclooxygenase and leukotriene blockade during canine endotoxic shock. *Circ Shock* 1990; 32: 243-55.

## 9. Publierte Ergebnisse und Preise

### **Originalarbeiten**

op den Winkel M, Gülberg V, Weiss M, Ebeling F, Gerbes AL, Samtleben W. Acute postinfectious glomerulonephritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *Submitted, Juli 2008.*

op den Winkel M, Bejarano P, Choe A, Rudich SM, Hanto DW. Liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma arising in a liver cell adenoma: A case report and review of the literature. *In preparation 2008.*

op den Winkel M, Steib CJ, Göke B, Gerbes AL, Bilzer M. Interplay of cysteinyl-leukotrienes and prostanoids in regulating portal pressure following Kupffer-Cell activation. *In preparation 2008.*

op den Winkel M, Auernhammer CJ, Jauch KW, Assmann G, Dietz C, Parhofer KG. Cushing Syndrom mit beidseitiger Nebennierenvergrößerung. *Internist* 2007;48:870-873.

Steib CJ, Gerbes AL, Bystron M, op den Winkel M, Ebensberger S, Roggel F, Prüfer T, Göke B, Bilzer M. Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A<sub>2</sub>. *J Hepatol* 2007; 47: 228-238.

Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: A novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003; 37: 286-295.

Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Meßmer K, Bilzer M. p38 MAPK- vermittelte Resistenz der Leber gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Ein neues Konzept der Hepatoprotektion durch ischämische Präkonditionierung. *Chirurgisches Forum* 2003; 32: 463-466.



### **Abstracts**

Bilzer M, Schauer RJ, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Gerbes AL. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: A novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *J Hepatol* 2003; 38: 36A.

Bilzer M, Schauer RJ, op den Winkel M, Gerbes AL. Induktion einer zellulären Resistenz gegen oxidativen Stress in der Leber – ein neuer p38 MAPK-vermittelter Mechanismus der Hepatoprotektion durch ischämischer Präkonditionierung. *Z Gastroenterologie* 2003; 56: 119-120.

Bilzer M, Steib C, Pruefer T, op den Winkel M, Schauer RJ, Gerbes AL. Kupffer cell activation induces portal hypertension through thromboxane A<sub>2</sub> and leukotriene-dependent sinusoidal constriction. *Hepatology* 2002; 36: 229A.

Bilzer M, Pruefer T, op den Winkel M, Schauer RJ, Gerbes AL. Thromboxane A<sub>2</sub> and leukotriene-dependent sinusoidal constriction following Kupffer cell activation: A novel mechanism of portal hypertension. *Gut* 2002;51:A3.

### **Preise**

Steib CJ, Gerbes AL, op den Winkel M, Ebensberger S, Roggel F, Prüfer T, Göke B, Bilzer M. Kupffer cells induce portal hypertension. – Förderpreis der Bayerischen Gesellschaft für Gastroenterologie 2006.

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. M. Bilzer. Neben der Überlassung des Themas, der Unterstützung beim Erlernen der experimentellen Methoden sowie der ausgezeichneten Betreuung möchte ich insbesondere auch die bemerkenswerte und sehr inspirierende Begeisterung für das Thema hervorheben.

Mein sehr herzlicher Dank gilt darüber hinaus Herrn Professor Dr. A. L. Gerbes für die immer sehr hilfreiche, konstruktive Kritik und die Förderung dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. B. Göke möchte ich ebenfalls für die Unterstützung dieser Arbeit sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen danken.

Herr Dr. Christian Steib danke ich für die wertvollen Anregungen bei der Abfassung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ingrid Liß für die Unterstützung bei der Durchführung von Prostaglandin und Cysteinyl-Leukotrien Analysen. Herrn Axel Schlossbauer danke ich für die Assistenz bei den Perfusionsexperimenten. Herrn Thomas Prüfer bin ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der *in vivo* Experimente zu Dank verpflichtet.

Der Firma Roche danke ich für die Bereitstellung des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten BM 13.177 (Solutroban).

Der Friedrich- Baur- Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojekts.

Meinen Eltern Monika Maria und PD Dr. med. Rolf Wilhelm op den Winkel, sowie meinen Geschwistern (Julia, Tina, Jan, Philip und Felix) und meiner Freundin Irina: Vielen Dank für Alles!

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mark op den Winkel  
 Geburtsdatum: 10. 11. 1977  
 Geburtsort: Basel (Schweiz)  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch  
 Konfession: katholisch

### Schulbildung

8/1984 - 6/1988 Grundschule Bochum-Linden  
 8/1988 - 6/1997 Theodor Körner Gymnasium, Bochum-Dahlhausen  
 11. 6. 1997 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

8/1997 - 9/1998 Rettungssanitäter, Arbeiter-Samariter-Bund Bochum

### Studium

10/1998 - 10/2000 Vorklinischer Studienabschnitt an der Philipps-Universität  
 Marburg  
 8/2000 Ärztliche Vorprüfung  
 10/2000- 04/2005 Klinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-  
 Universität München  
 8/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 9/2003 USMLE Step 1  
 3/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 4/2004 - 3/2005 Praktisches Jahr  
 4/2005 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erlaubnis zur Tätigkeit  
 als Arzt

### Praktika und studienbegleitende Tätigkeiten

10/1998 - 10/2000 Einsatz im Rettungsdienst und Krankentransport

- 9/2003 – 10/2003 Co-Assistent im Herbst-Präparierkurs der LMU-München
- 11/1997 – 12/1997 Anästhesie und Intensivmedizin im Rahmen der  
Rettungssanitäterausbildung. Knappschafts Krankenhaus  
Bochum-Langendreer, Ruhr-Universität Bochum
- 2/2001 – 3/2001 Famulatur Pädiatrie. Praxis Dr. Mahler, Flensburg
- 2/2002 – 3/2002 Famulatur Gastroenterologie. Klinikum Großhadern
- 7/2002 – 8/2002 Famulatur Chirurgie/Lebertransplantation. Klinikum Großhadern
- 8/2002 – 9/2002 Famulatur Chirurgie/Lebertransplantation. Beth Israel Deaconess  
Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA
- 2/2003 – 4/2003 Famulatur Pulmonologie/Kardiologie. The Prince Charles  
Hospital, Brisbane, University of Queensland, Australien
- 4/2004 – 8/2004 1. PJ Tertian: Innere Medizin  
Klinikum Großhadern, LMU München
- 8/2004 – 11/2004 2. PJ Tertian: Chirurgie  
Mount Sinai Medical Center, New York City, USA  
Tulane Medical Center, New Orleans, USA
- 11/2004 – 3/2005 3. PJ Tertian: Anästhesie und Intensivmedizin  
Klinikum Innenstadt, LMU München

### **Berufstätigkeit**

- seit 07/2005 Wissenschaftlicher Assistent der Medizinischen Klinik II des  
Klinikums Großhadern der LMU München bei Prof. Dr. B. Göke

### **Wissenschaftliche Ausbildung**

- Seit 11/2000 Beginn der vorliegenden Promotion bei PD Dr. M. Bilzer  
Zusätzliches Forschungsprojekt: „Ischämische Präkon-  
ditionierung der Leber“  
Betreuung: Prof. Dr. AL Gerbes und PD Dr. M. Bilzer,  
Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, LMU-München