



Aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Großhadern

der Ludwig-Maximilians Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS erhöht den Pfortaderdruck in der fibrotischen Rattenleber: Kupfferzell-abhängige Mechanismen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Christina Hartmann

aus
Ulm

Jahr
2014

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Diepolder Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Christian J. Steib
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	16.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Ätiologie der Leberzirrhose.....	1
1.2	Komplikationen der Leberzirrhose.....	2
1.3	Definition und Pathogenese der portalen Hypertonie	3
1.4	Regulation der intrahepatischen Mikrozirkulation.....	5
1.5	Aktuelle Konzepte zu Prävention und Therapie der Varizenblutung bei Leberzirrhose	7
1.6	Spontan bakterielle Peritonitis durch bakterielle Translokation	11
1.7	Toll-like Rezeptor Signalweg.....	13
1.8	Rolle der Kupfferzellen	14
2	Fragestellung.....	16
3	Methoden	18
3.1	Tierversuche	18
3.2	Induktion einer Leber-Fibrose mittels Gallengangsligatur (BDL).....	18
3.3	Induktion einer Leberzirrhose mittels Thioacteamid (TAA)	19
3.4	Isolierte Rattenleberperfusion <i>in situ</i>	19
3.5	Bestimmung der LDH-Aktivität im effluenten Perfusat	21
3.6	Messung von Serum-Parametern	22
3.7	Versuchsprotokolle der <i>in situ</i> Perfusion	22
3.7.1	Intraperitoneale Gabe von LPS	22
3.7.2	Aktivierung von Kupfferzellen mittels Zymosan.....	22
3.7.3	Blockade von Kupfferzellen.....	22
3.7.4	Rolle der Vasokonstriktoren.....	23
3.7.5	Infusion der Vasokonstriktoren Thromboxan A ₂ und Leukotrien C ₄	23
3.8	<i>In vivo</i> -Messung des Portaldruckes.....	23
3.9	Montelukast Behandlung und Kupfferzellaktivierung <i>in vivo</i>	25
3.10	Histologische Beurteilung der Lebern.....	26
3.11	ELISA.....	26
3.11.1	Bestimmung von Thromboxan B ₂	26
3.11.2	Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen	27
3.12	Gelelektrophorese und Western Blot Analyse	27
3.13	Statistik.....	28
4	Material.....	29
4.1	Chemikalien, Medikamente und Puffer für Tierversuche	29
4.2	Rezeptoragonisten, Antagonisten und Inhibitoren	30

4.3	Chemikalien, Reagenzien und Antikörper für Western Blot	30
4.4	Lösungen für Western Blot	31
4.5	Material für ELISA	32
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Erhöhung des portalen Druckes durch vorherige Aktivierung mit LPS	33
5.2	Anstieg der Proteinexpression von TLR4 und MyD88 nach LPS Vorbehandlung ..	37
5.3	Erhöhte Produktion von Vasokonstriktoren und ihre funktionelle Relevanz	38
5.4	Unveränderte Empfindlichkeit auf Vasokonstriktoren nach LPS Vorbehandlung ..	41
5.5	Effekte von LPS auf den Pfortaderdruck in vivo	43
5.6	Effekte der Behandlung mit Montelukast auf portale Hypertonie bei BDL und TAA Ratten <i>in vivo</i>	45
5.6.1	Effekte von Montelukast auf Histologie und Serumparameter.....	46
5.6.2	Effekt von Montelukast auf portale Hypertonie.....	48
6	Diskussion.....	52
6.1	Effekte der Vorbehandlung mit LPS auf den portalen Druck.....	53
6.2	Kupfferzell-abhängige Effekte der intraperitonealen LPS Gabe	54
6.3	Produktion und Ansprechbarkeit von Vasokonstriktoren nach LPS Vorbehandlung	55
6.4	Effekt der Behandlung mit dem Leukotrienrezeptorblocker Montelukast.....	56
7	Zusammenfassung	59
8	Abkürzungsverzeichnis.....	61
9	Abbildungsverzeichnis	62
10	Tabellenverzeichnis	63
11	Literaturverzeichnis	64
12	Publizierte Ergebnisse	77
13	Danksagung	78
14	Eidesstattliche Versicherung	79

1 Einleitung

1.1 Ätiologie der Leberzirrhose

Erkrankungen der Leber sind häufig und weltweit verbreitet. Deswegen kommt ihnen eine große medizinische Bedeutung zu. Viele dieser Lebererkrankungen führen in fortgeschrittenem Stadium zu einer Leberzirrhose. Die verschiedenen Hauptursachen für eine Leberzirrhose variieren je nach Region und Bevölkerungsgruppe.

Alkoholabusus ist eine der Hauptursachen einer Leberzirrhose weltweit und spielt vor allem in den Industrienationen (Europa und USA) eine führende Rolle. Weltweit sind ca. 38% - 50% der Todesfälle durch Leberzirrhose auf eine Alkohol induzierten Leberzirrhosen zurückzuführen (Mandayam et al., 2004).

An zweiter Stelle stehen Virushepatitiden (B, C), die in den Industrienationen in ungefähr 40% - 50% der Fälle Ursache einer entstehenden Leberzirrhose sind. In Afrika und Asien liegen die chronischen Virushepatitiden mit ungefähr 60% - 80% an erster Stelle der Lebererkrankungen, die eine Leberzirrhose zur Folge haben können (Perz et al., 2006).

Die chronische Schädigung der Leber kann jedoch auch in vielen anderen Erkrankungen der Leber begründet sein. Zunehmende Bedeutung spielt die nicht alkoholische bedingte Fettleberhepatitis (NASH), die weltweit immer häufiger auftritt und neben der alkoholischen Fettleberhepatitis (ASH) vor allem in den westlichen Industrienationen von zunehmender Bedeutung ist. Die Prävalenz der Fettleberhepatitis in der Gesamtpopulation beträgt in Europa ungefähr 3% - 16% und in den USA 6% - 15% mit steigender Tendenz. Die Prävalenz der nicht alkoholischen Fettleber, die der Fettleberhepatitis voraus gehen kann, liegt deutlich höher bei bis zu 40% (Bellentani et al., 2010, Ratzu et al., 2010).

Andere Ursachen einer Leberzirrhose können Autoimmunerkrankungen (z. B. Autoimmunhepatitis), biliäre Erkrankungen (z. B. primäre sklerosierende Cholangitis) oder hereditär-metabolische Lebererkrankungen (z. B. Hämochromatose, M. Wilson) sein. Auch kardiovaskuläre Ursachen wie das Budd-Chiari-Syndrom oder eine chronische Rechtsherzinsuffizienz können Ursachen für einen Leberzirrhose sein. Außerdem können auch maligne Erkrankungen, welche zu Tumor- oder Metastasenbildung in der Leber führen, im Verlauf der Erkrankung ebenfalls eine Zirrhose verursachen (Bahr und Manns, 1999).

1.2 Komplikationen der Leberzirrhose

Im Rahmen der Leberzirrhose können zahlreiche Komplikationen mit zum Teil sehr schwerwiegenden Auswirkungen auftreten. Diese Komplikationen beeinflussen sich häufig gegenseitig, verstärken sich auf Grund von Wechselwirkungen und ziehen weitere Komplikationen nach sich (siehe Abb. 1).

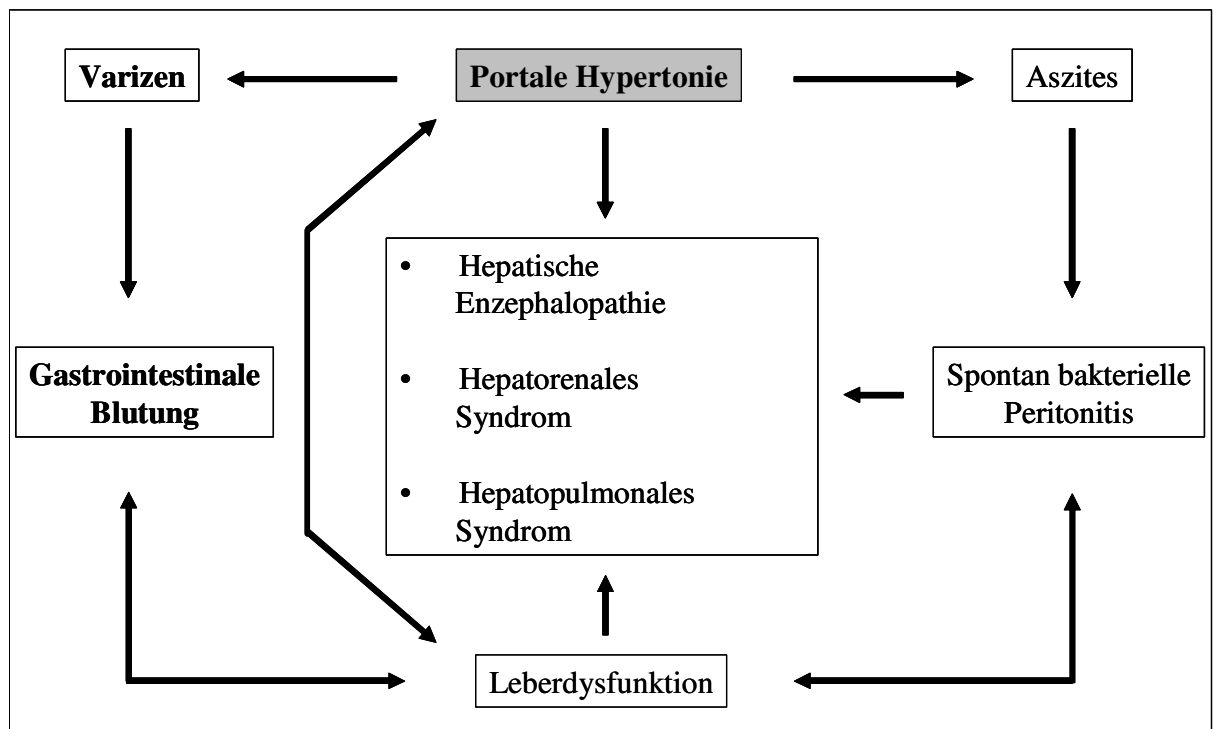


Abb. 1: Komplikationen bei Leberzirrhose. (modifiziert nach J. Härtl, Dissertation: Aktivierung der Kupfferzellen in der Leber durch H_2O_2 : Ein wichtiger Mechanismus der portalen Hypertension, 2010)

Die Leberdysfunktion führt unter anderem zu einer verminderten Syntheseleistung von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, welche sich in einem Abfall des Quickwertes mit gesteigerter Blutungsneigung widerspiegelt. Andere Indikatoren einer verminderten Syntheseleistung der Leber sind ein erniedrigtes Gesamteiweiß und ein verminderter Albuminspiegel im Serum. Die eingeschränkte Entgiftungsfunktion der Leber zeigt sich in einem Anstieg des Bilirubinwertes, der sich klinisch durch einen Ikterus präsentiert. Außerdem kann die verminderte Entgiftungsfunktion der Leber zu einer Ammoniakretention führen. Ein hoher Ammoniakspiegel ist der Auslöser der hepatischen Enzephalopathie. Es können auch metabolische Störungen (Elektrolytentgleisungen,

Diabetes mellitus, Malnutrition) auftreten und andere Organe können geschädigt werden, wie beim hepatorenenalen oder hepatopulmonalen Syndrom. Außerdem treten bei Patienten mit Leberzirrhose vermehrt Infektionen auf und als Spätfolge der Zirrhose kann ein hepatozelluläres Karzinom auftreten (Schuppan und Afdhal, 2008).

Entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Leberzirrhose hat die portale Hypertonie. Zum einen kommt es durch portale Hypertonie zu Aszitesbildung, welche oft mit einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) vergesellschaftet ist (Caly und Strauss, 1993). Zum anderen bilden sich zudem durch eine Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes Kollateralgefäße zur Umgehung der Leber aus. Im Verlauf kann daraus die Gefahr der oberen gastrointestinalen Blutung aus Ösophagus- oder Magenfundusvarizen entstehen.

Diese schwerwiegende Blutungskomplikation ist eine häufige und lebensbedrohliche Folge der Leberzirrhose (de Franchis und Dell'Era, 2008). Ungefähr 80% der Patienten mit Leberzirrhose entwickeln im Verlauf der Erkrankung Ösophagus- oder Fundusvarizen (de Franchis und Primignani, 2001), da die Leberzirrhose fast immer mit einer portalen Hypertonie einhergeht. Bei Erstblutung aus Ösophagus-/ Fundusvarizen zeigt sich eine vom Stadium der Leberzirrhose abhängige Letalität zwischen 10% und 50% (de Franchis und Primignani, 2001). Trotz großer Fortschritte in der Therapie, liegt die Mortalität bis zu 6 Wochen nach einer Blutung immer noch bei 20% (D'Amico und De Franchis, 2003). Erfolgt im Verlauf keine Rezidivprophylaxe, so erleiden bis zu 60% der Patienten innerhalb von 1-2 Jahren Rezidivblutungen, wobei dann die Letalitätsrate bei 33% liegt (Villanueva und Balanzo, 2008). In 35%-66% der Fälle ist ein erstes oder wiederholtes Blutungsereignis mit einer bakteriellen Infektion, am häufigsten mit einer spontan bakteriellen Peritonitis assoziiert (Bernard et al., 1995). Zusätzlich korreliert die Entwicklung einer SBP mit dem Versagen eine Blutung unter Kontrolle zu bringen und mit einer höheren Mortalität nach einer Blutung (Goulis et al., 1998). Eine Varizenblutung ist die Haupttodesursache bei Patienten mit Leberzirrhose (D'Amico und De Franchis, 2003, Carbonell et al., 2004), deswegen ist die Prävention dieser Komplikation besonders wichtig.

1.3 Definition und Pathogenese der portalen Hypertonie

Die portale Hypertonie wird definiert als ein pathologischer Anstieg des portalvenösen Druckes. Der Druckanstieg hat zur Folge, dass der Druckgradienten zwischen der Portalvene und der Vena cava inferior (der sogenannte Pfortaderdruckgradient) über die

Norm (1-5 mmHg) ansteigt (Bosch et al., 2009). Der Druckgradient wird als HVPG (hepatic venous pressure gradient) gemessen. Dazu wird als Marker des sinusoidalen Druckes der Verschlussdruck (Wedge-Druck) der Vena hepatica (wedged hepatic vein pressure, WHVP) und zusätzlich der Druck der nicht verschlossenen Vena hepatica (free hepatic vein pressure, FHVP) gemessen. Um den intraabdominellen Druck mit zu berücksichtigen und damit den Portalvenendruck korrekt zu bestimmen, erfolgt die Berechnung des HVPG nach folgender Formel (Sanyal et al., 2008):

$$\text{HVPG} = \text{WHVP} - \text{FHVP}.$$

Das klinische Syndrom der portalen Hypertension wird dabei definiert durch einen Druckgradienten der Portalvene, welcher 5 mmHg übersteigt (Sanyal et al., 2008). Klinische Untersuchungen der Hämodynamik haben gezeigt, dass sich Ösophagusvarizen und Aszites ausbilden können, wenn der HVPG auf über 10 mmHg ansteigt (Ripoll et al., 2007). Ein Blutungsrisiko dieser Varizen besteht, wenn der HVPG den Wert von 12 mmHg überschreitet (Tiani et al., 2008). Das Blutungsrisiko lässt sich signifikant senken, wenn es therapeutisch gelingt, den HVPG auf < 12 mmHg zu senken (D'Amico et al., 2006). Häufigste Ursache für eine Portaldruckerhöhung ist ein im Rahmen einer Leberzirrhose erhöhter intrahepatischer Strömungswiderstand. Nach dem Ohm'schen Gesetz ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$P (\text{Druck}) = Q (\text{Blutfluss}) \times R (\text{Gefäßwiderstand})$$

Bei der Leberzirrhose wird dieser intrahepatische Gefäßwiderstand vor allem durch zwei Komponenten, eine statische und eine dynamische, beeinflusst (Sanyal et al., 2008):

- I. mechanische Obstruktion des Flusses durch den fibrotischen Umbau der Leberarchitektur und
- II. aktive Kontraktion von glatter Gefäßmuskulatur und aktivierten hepatischen Sternzellen.

Zusätzlich kommt es durch den erhöhten Pfortaderdruck zu der Entstehung von Kollateralkreisläufen und einer begleitenden splanchnischen und systemischen Vasodilatation. Diese wird durch eine vermehrte Ausschüttung von endogenen Vasodilatoren und ein erniedrigtes Ansprechen auf Vasokonstriktoren hervorgerufen. In der Folge kommt es dadurch zu einem vermehrten portalvenösen Zufluss und zu einer weiteren Verstärkung des Anstiegs des Pfortaderdruckes (Bosch, 2007, Bosch et al., 2003).

1.4 Regulation der intrahepatischen Mikrozirkulation

Eine wichtige Komponente der portalen Hypertonie bei Leberzirrhose ist die Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes (Bosch und Garcia-Pagan, 2000). Das aus den unpaarigen Bauchorganen in der Portalvene gesammelte Blut passiert die Leber durch die sinusoidale Strombahn. In der sinusoidalen Strombahn sind unterschiedliche Zellarten gelegen. Sie ist sowohl aus parenchymalen, als auch nichtparenchymalen Leberzellen aufgebaut. Das Grundgerüst bilden dabei die Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten. In den Sinusoiden befinden sich nichtparenchymale Zellen. Dazu zählen Sinusendothelzellen, hepatische Sternzellen und Kupfferzellen. Diese Zellen haben keine direkte Verbindung mit dem Leberparenchym. Sie sind von den Hepatozyten durch den sogenannten Disse-Raum getrennt (siehe Abb. 2).

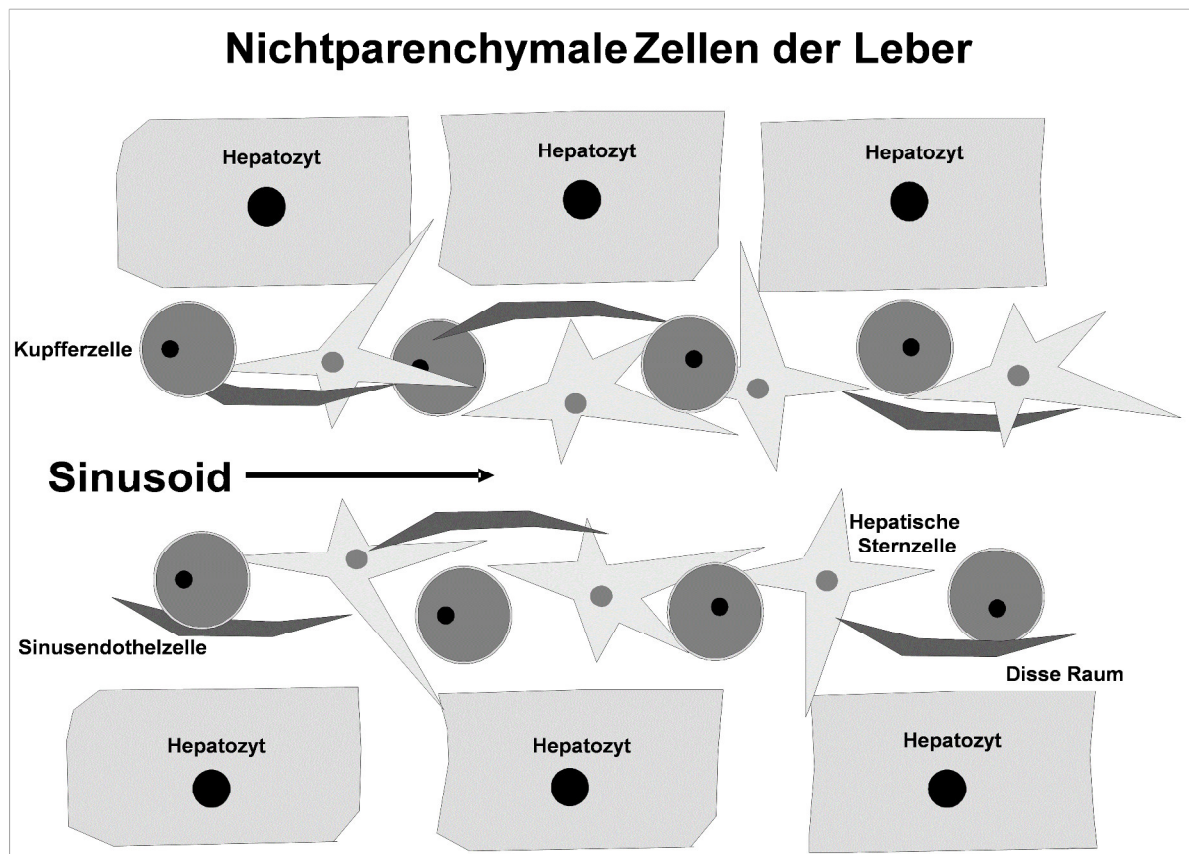


Abb. 2: Zellulärer Aufbau des Leberparenchyms. Schematische Darstellung eines Lebersinusoid mit den nichtparenchymalen Zellen (Sinusendothelzellen, hepatische Sternzellen, Kupfferzellen). Zusätzlich sind auch der Disse Raum und die Hepatozyten (parenchymale Zellen) mit abgebildet. (modifiziert nach J. Härtl, Dissertation: Aktivierung der Kupfferzellen in der Leber durch H_2O_2 : Ein wichtiger Mechanismus der portalen Hypertension, 2010)

Für eine intakte hepatische Mikrozirkulation ist eine feinabgestimmte Interaktion und Zusammenarbeit aller nichtparenchymalen Zellen notwendig (Vollmar und Menger, 2009).

In der zirrhotischen Leber kommt es zu einem Anstieg von Vasokonstriktoren, wie Thromboxan A₂ (Graupera et al., 2003, Steib et al., 2007, Yokoyama et al., 2003, Xu et al., 2005) und Cysteinyl-Leukotrienen (Graupera et al., 2002, Titos et al., 2000), bei einer gleichzeitigen Abnahme von Vasodilatoren (Hendrickson et al., 2003, Perri et al., 2006) wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO). Dieses Ungleichgewicht scheint in der zirrhotischen Leber die entscheidende Rolle bezüglich portaler Druckanstiege zu spielen (Bosch, 2007).

Diese ausgeschütteten vasoaktiven Substanzen wirken auf die hepatischen Sternzellen, die auf Grund ihrer Myosinfilamente die Fähigkeit zur aktiven Kontraktion haben. Bei dieser Kontraktion verformen sich die hepatischen Sternzellen. Dies führt zu einer Vorwölbung von Sinusendothelzellen in den sinusoidalen Raum. Die Folge ist eine Verringerung des sinusoidalen Durchmessers. Damit kommt es zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes der Sinusoide und damit zu einer Druckerhöhung in den zuführenden Gefäßen (Reynaert et al., 2002).

Die Kontraktion der Myosinfilamente in den hepatischen Sternzellen wird durch einen Ca²⁺ abhängigen und einen unabhängigen Mechanismus reguliert. Bei dem Ca²⁺ abhängigen Mechanismus bindet intrazelluläres Ca²⁺ an Calmodulin. Dieser Komplex bindet dann an das Enzym Myosinleichtkettenkinase, dieses wird aktiviert und phosphoryliert Myosinleichtketten. Durch die Phosphorylierung von Myosinleichtketten kommt es zur Kontraktion. Der zweite Mechanismus ist Ca²⁺ unabhängig. Die Rho-Kinase, eine kleine GTPase, reguliert die Phosphorylierung von Myosinleichtketten durch Hemmung der Myosinphosphatase und durch direkte Phosphorylierung der Myosinleichtketten (Reynaert et al., 2008). Sowohl der Ca²⁺ abhängige als auch der unabhängige Mechanismus spielen bei der Kontraktion der hepatischen Sternzellen eine große Rolle. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Ca²⁺ unabhängige Mechanismus bei aktivierten hepatischen Sternzellen und in zirrhotischen Lebern dominiert (Laleman et al., 2007).

All diese komplexen Mechanismen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der portalen Hypertonie und somit auch bei der Entwicklung von Ösophagus- und Magenfundusvarizen.

1.5 Aktuelle Konzepte zu Prävention und Therapie der Varizenblutung bei Leberzirrhose

Unter den zahlreichen Komplikationen, die im Rahmen einer Leberzirrhose auftreten, gehört die Blutung aus Ösophagus- oder Magenfundusvarizen zu den schwerwiegendsten. Die hohe Letalitätsrate bei Erstblutung und das ausgeprägte Rezidivrisiko bei unbehandelten Patienten erfordern dringend eine präventive Therapie. Man unterscheidet zwischen einer Primärprophylaxe bei Patienten mit Leberzirrhose und Ösophagus- oder Magenfundusvarizen zur Verhinderung eines ersten Blutungsereignisses und einer Sekundärprophylaxe bei Patienten nach voran gegangener Blutung zur Verhinderung einer Reizidivblutung.

Die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) spielt zur Ermittlung des Risikos einer Varizenblutung eine entscheidende Rolle und sollte bei jeder Erstdiagnose einer Leberzirrhose veranlasst werden. In die Einschätzung des Risikos für eine Ösophagusvarizenblutung gehen die Faktoren HVPG (>12 mmHg), Varizendurchmesser, endoskopisch sichtbare „red colour signs“, welche ein Zeichen für Dünnstellen der Varizenwand mit hohem Rupturrisiko darstellen, und Ausmaß des Leberausfalls (Child-Pugh-Klassifikation) ein (Sanyal et al., 2008).

Zur Prävention oberer GI-Blutungen im Rahmen einer Leberzirrhose werden mehrere Konzepte unterschieden. Das therapeutische Vorgehen ergibt sich, wie in Abb. 3 dargestellt, aus dem Befund der ÖGD.

Liegen keine Varizen vor, wird empfohlen die ÖGD in Abhängigkeit von der Krankheitsprogression und den Zeichen der portalen Hypertension nach 1 – 3 Jahren zu wiederholen. Bei kleinen Varizen mit < 5 mm Durchmesser und einer Zirrhose im Child-Pugh-Stadium A – B ohne „red colour signs“ ist das Blutungsrisiko gering. Um eine Progression der Varizen zu verhindern werden jedoch β -Rezeptorantagonisten empfohlen. Bei Patienten mit kleinen Varizen und „red colour signs und/oder einer fortgeschrittenen Leberzirrhose im Stadium Child-Pugh C ist das Risiko einer Varizenblutung höher. Es sollte eine Primärprophylaxe mit einem nicht kardioselektiven β -Blocker erfolgen. Bei Varizen mit einem Durchmesser > 5 mm beträgt das jährliche Blutungsrisiko 15%. Es sollte eine Primärprophylaxe mit einem β -Blocker oder eine Varizenligatur durchgeführt werden (Wittenburg et al., 2011).

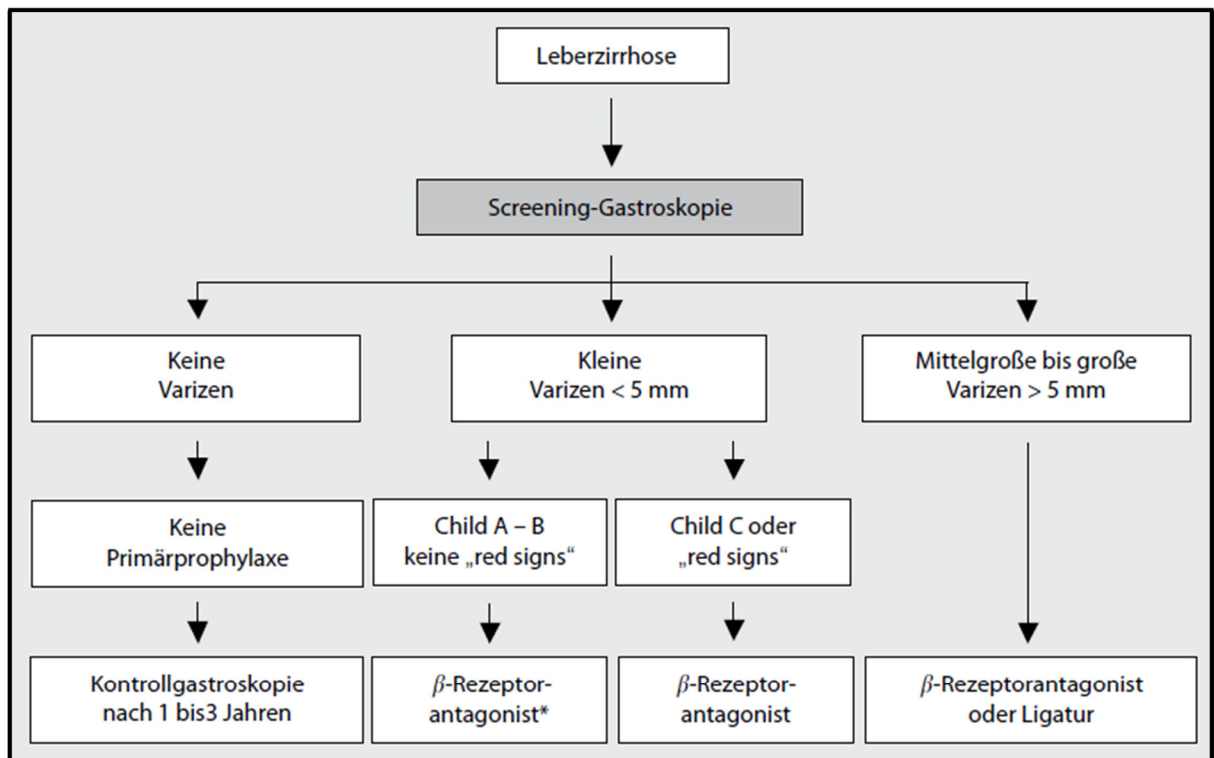


Abb. 3: Diagnostische und therapeutische Strategien zur Primärprophylaxe einer Ösophagusvarizenblutung. Zum Stellenwert der β -Rezeptorantagonisten im Vergleich zur Ligatur siehe Text. * Zur Prävention der Progression der Varizen. (Originalabbildung aus Wittenburg et al., 2011)

Welcher der beiden therapeutischen Strategien favorisiert werden sollte, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Nicht kardioselektive β -Blocker verursachen eine Vasokonstriktion der Arteriolen im mesenterialen Gefäßsystem und vermindern so den Anstieg des Portaldruckes durch geringeren Blutfluss (Sanyal et al., 2008, Bosch und Abraldes, 2005, Kroeger und Groszmann, 1985). Darüber hinaus senken sie über eine Reduktion der Herzfrequenz und der damit verbundenen Beeinflussung des Herzminutenvolumens zusätzlich den Zufluss von Blut ins Portalsystem. Auf diese Weise kann das Risiko einer Blutung von 25% auf 15% gesenkt werden (D'Amico et al., 1999). Die Metaanalyse von Studien, welche die endoskopische Varizenligatur als Primärprophylaxe der Ösophagusvarizenblutung untersuchten, zeigte, dass die endoskopische Varizenligatur das Blutungsrisiko von 23% auf 14% senkte (Khuroo et al., 2005). Bezüglich des Überlebens erbrachten beide Therapieformen gleiche Ergebnisse, womit die Methoden vergleichbar sind. Die Gabe von Beta-Blockern stellt somit als weniger invasive Maßnahme die Methode der Wahl zur Ersttherapie dar, sofern keine Kontraindikationen wie chronische Herzinsuffizienz oder COPD vorliegen (Sanyal et al., 2008). Ein zusätzlicher Nutzen aus

einer Kombination beider Methoden kann im Rahmen der Primärprophylaxe derzeit nicht eindeutig belegt werden und wird nicht empfohlen, da die Nebenwirkungen zunehmen (Sarin et al., 2005, Garcia-Pagan et al., 2008).

Die Gabe nicht-selektiver Beta-Blocker zur Verhinderung der Ausbildung von Varizen bei Patienten mit Leberzirrhose zeigte bisher keinen Erfolg und ist nicht indiziert (Groszmann et al., 2005, Tiani et al., 2008). Daher bieten sich zur Verhinderung der Ausbildung von Varizen vor allem Maßnahmen an, die Einfluss auf das Fortschreiten der Zirrhose nehmen, wie zum Beispiel Abstinenz bei alkoholinduzierter Zirrhose, antivirale Therapie bei viraler Zirrhose oder Änderung der Lebensgewohnheiten mit Gewichtsreduktion bei NASH, womit eine Progression der Erkrankung gemindert werden kann (Tiani et al., 2008).

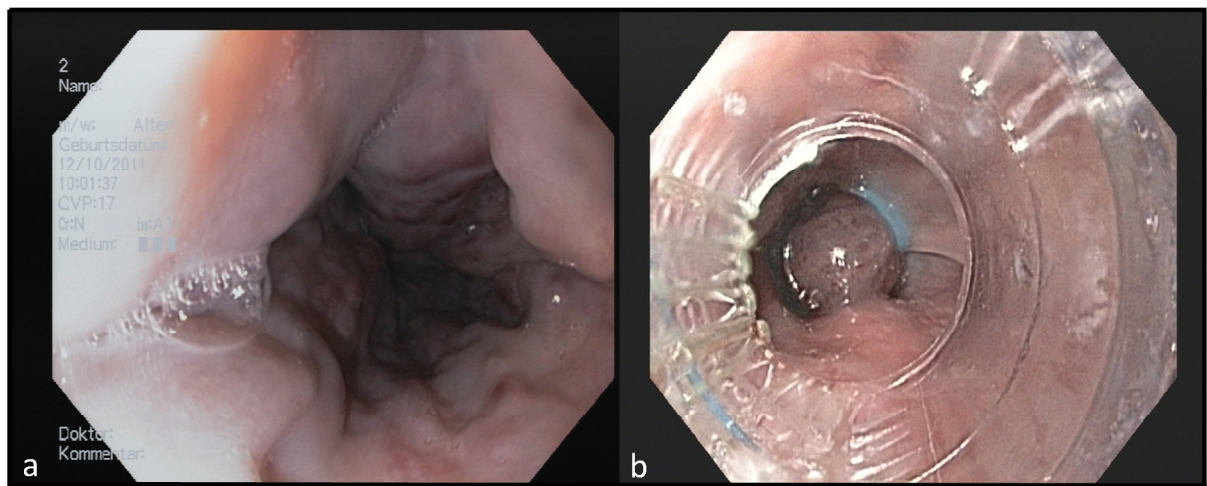


Abb. 4 Ösophagusvarizen (a) und Gummibandligatur einer Varize (b). Abbildung aus der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, LMU München.

Bei der Behandlung der akuten Blutung wird heute bevorzugt auf eine Kombination aus endoskopischer und pharmakologischer Therapie zurückgegriffen. Meist wird dafür die endoskopische Varizenligatur mit der Gabe von den vasoaktiven Substanzen Terlipressin oder Somatostatin kombiniert (de Franchis, 2010). Eine medikamentöse Therapie mit vasoaktiven Substanzen kann die Blutung bei etwa 80% der Patienten zum Stillstand bringen. Bei fehlenden Kontraindikationen und hohem Verdacht auf eine Varizenblutung sollte bereits vor der Endoskopie eine Therapie mit einer der oben genannten vasoaktiven Substanzen begonnen werden.

Maßnahmen der Blutstillung werden bereits in der Akuttherapie durch eine frühe Rezidivblutungsprophylaxe ergänzt. Bei einer akuten Varizenblutung wird zur Prophylaxe der frühen Rezidivblutung so zeitnah wie möglich mit einer antibiotischen Therapie mit Chinolonen oder Cephalosporinen der dritten Generation begonnen. Auf diese Weise werden die in Zusammenhang mit einer Blutung häufig vorliegenden bakteriellen Infektionen als mögliche Auslöser früher Rezidive behandelt. Damit kann die Überlebenschancen der akuten Blutungsepisode verbessert werden (Bernard et al., 1999, Hou et al., 2004). Ebenfalls zur frühen Rezidivprophylaxe erfolgt eine weitere Gabe von Terlipressin oder Somatostatin für 2 – 5 Tage (Abralde und Bosch, 2007). Nach neueren Studien zeichnen sich bessere Ergebnisse mit Terlipressin, dem synthetischen Analogon von Vasopressin, zur Prophylaxe einer frühen Rezidivblutung ab. Außerdem scheint Terlipressin bislang die einzige vasoaktive Substanz zu sein, die in der Lage ist die Mortalität der akuten Varizenblutung zu senken (Garcia-Pagan et al., 2012, Ioannou et al., 2003). Die Erfolgsrate eine erste Blutung kontrollieren zu können, wurde bei Patienten, die mit Terlipressin behandelt wurden, mit 81% beschrieben. Die Rate eine frühe Rezidivblutung zu erleiden liegt bei der Behandlung mit Terlipressin bei 14% (Escorsell et al., 2000).

Bleiben Patienten nach einer ersten Varizenblutung unbehandelt, so erleiden 63% von ihnen binnen ein bis zwei Jahren eine Rezidivblutung, bei der die Mortalität bei 27% liegt (D'Amico und Luca, 1997). Dies verdeutlicht, dass eine Rezidivblutungsprophylaxe (Sekundärprophylaxe) dringend erforderlich ist.

Zusätzlich zur Prävention der frühen Rezidivblutung sind im Rahmen der Rezidivblutungsprophylaxe weitere, langfristig wirksame Maßnahmen zu ergreifen. Die endoskopische Varizenligatur reduziert das relative Risiko einer Rezidivblutung um 37% (Laine und Cook, 1995), nicht-selektive β -Blocker mindern das Blutungsrisiko um 33% (D'Amico et al., 1999). Bezüglich des Langzeitüberlebens ergaben sich bisher keine signifikanten Unterschiede der Therapiearten. Die Kombination aus endoskopischer Varizenligatur und β -Blockern scheint in der Rezidivprophylaxe der alleinigen endoskopischen Ligatur überlegen (Lo et al., 2000, Sanyal et al., 2008).

Bei Versagen der aufgeführten Therapieformen besteht die Möglichkeit der Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS). Die Anlage eines TIPS sollte generell nicht als Ersttherapie zur Verhinderung von Blutungsrezidiven angewandt werden, da sie der medikamentösen und endoskopischen Therapie in der Prophylaxe nicht überlegen ist, jedoch ein höheres Risiko für eine hepatische Enzephalopathie birgt

(Escorsell et al., 2002). Allerdings kann eine frühe TIPS Anlage innerhalb von 72 Stunden (idealerweise ≤ 24 Stunden) nach initialer endoskopischer und pharmakologischer Therapie bei Patienten mit hohem Risiko für ein Therapieversagen (z.B. Child-Pugh-Stadium C) in Betracht gezogen werden (de Franchis, 2010). Im Fall einer nicht beherrschbaren akuten Varizenblutung kann durch TIPS-Anlage in über 90% der Fälle eine Hämostase erreicht werden (Sanyal et al., 2008). Eine weitere Senkung der Rezidivblutungsrate kann mit TIPS-Anlage allerdings nicht erzielt werden (Gulberg et al., 2002).

Trotz Reduktion des Auftretens erneuter Blutungsepisoden durch die geschilderten Methoden bleibt die Häufigkeit der Rezidivblutungen mit 30% bis 50% innerhalb von zwei Jahren relativ hoch (Groszmann und Garcia-Tsao, 2002). Es ist daher von großer Bedeutung, neue Therapieansätze zu entwickeln. Voraussetzung dafür ist die Gewinnung umfassenderer Kenntnisse der Mechanismen der Pathogenese der portalen Hypertonie, um zur Prophylaxe einer Blutung aus Ösophagus- oder Fundusvarizen eine Senkung des Portaldruckes sowie eine Vermeidung von plötzlich auftretenden Druckspitzen in Portalvene und Umgehungskreisläufen der Leber erzielen zu können.

1.6 Spontan bakterielle Peritonitis durch bakterielle Translokation

Eine Infektion bei Patienten mit Leberzirrhose erhöht die Mortalität um das bis zum Vierfache (Arvaniti et al., 2010). Die häufigste Infektion bei Vorliegen von Aszites und Leberzirrhose ist eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP). Die SBP ist definiert als eine bakterielle Infektion der Peritonealhöhle ohne Hinweis auf eine andere intraabdomielle Infektion. Die Diagnosestellung erfolgt mittels einer diagnostischen Aszitespunktion beim Nachweis von mehr als 250 neutrophilen Granulozyten pro mm^3 Aszites. Die Klinik von Patienten mit SBP ist häufig relativ symptomarm. Eine SBP sollte aber immer vermutet werden, wenn es zu einer Verschlechterung der Leberfunktion, z. B. eines Anstiegs des Bilirubins oder einer hepatischen Enzephalopathie bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites kommt. Wegen der schweren assoziierten Komplikationen ist eine frühe Diagnosestellung, Therapie und die Durchführung einer antibiotischen Primär- bzw. Sekundärprophylaxe besonders wichtig (Wasmuth und Trautwein, 2010).

Ein wesentliches pathogenetisches Konzept für die Entwicklung einer SBP basiert auf dem Nachweis einer vermehrten Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen aus dem Darm bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites. Bei Gesunden

leben intestinale Bakterien als Kommensalen im Gastrointestinaltrakt ihres Wirtes und spielen eine wichtige Rolle für das Immunsystem und die Ernährung (Wiest und Garcia-Tsao, 2005). Bakterielle Translokation ist als Migration von Bakterien oder bakteriellen Produkten von dem intestinalen Lumen durch die gastrointestinale Schleimhaut in mesenteriale Lymphknoten oder andere extraintestinale Organe definiert (Berg and Garlington, 1979). Bakterielle Translokation verkörpert eine Störung des Gleichgewichts zwischen Wirt und Kommensale, die eine inflammatorische Antwort und letztendlich eine Infektion zur Folge hat (Wiest und Garcia-Tsao, 2005). Normalerweise werden Bakterien der physiologischen Darmflora schnell phagozytiert, wenn sie ihren regulären Lebensraum verlassen und können nur überleben, wenn das Immunsystem des Wirts geschwächt ist. Es wurde gezeigt, dass gram-negative Bakterien (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und andere Enterobakterien) besonders effizient in die mesenterialen Lymphknoten translozieren (Steffen et al., 1988) und interessanterweise sind diese Keime am häufigsten für eine Infektion bei Patienten mit Leberzirrhose verantwortlich (Garcia-Tsao, 1992).

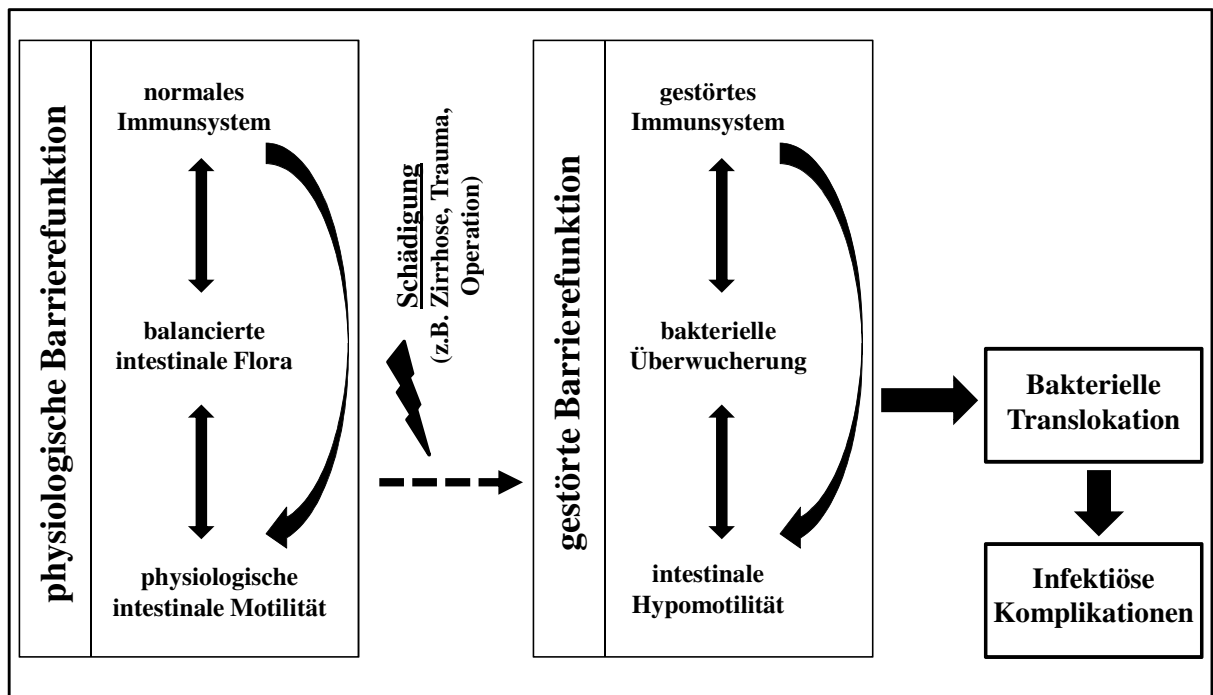


Abb. 5: Bakterielle Translokation. Die physiologische intestinale Barriere bleibt durch ein Gleichgewicht zwischen Immunsystem, intestinaler Flora und intestinaler Motilität erhalten. Verletzungen und Krankheiten (z.B. Zirrhose) stören dieses Gleichgewicht und führen zu einer gestörten Barrierefunktion. Dadurch kommt es zu bakterieller Translokation und den entsprechenden infektiösen Komplikationen (modifiziert nach Balzan et al., 2007)

Patienten mit Zirrhose haben eine erhöhte Anfälligkeit für schwere Infektionen, abhängig von der Schwere der Leberdysfunktion. Zum einen tritt bei ungefähr einem Drittel aller Patienten mit Zirrhose intestinale Hypomotilität auf (Madrid et al., 1997), die zu bakterieller Überwucherung führt. Zum anderen führt portale Hypertonie zu Veränderungen der gastrointestinalen Schleimhaut und somit zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität (Thalheimer et al., 2005). Als Folge dieser Veränderungen kommt es zu bakterieller Translokation von intestinalen Bakterien. Bakterielle Translokation stellt einen Hauptmechanismus in der Pathogenese der spontan bakteriellen Peritonitis und somit auch bei anderen Komplikationen der Zirrhose dar (Garcia-Tsao und Wiest, 2004).

1.7 Toll-like Rezeptor Signalweg

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind eine Familie von Transmembranproteinen, die eine wichtige Rolle für das angeborene Immunsystem in der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen wie Pilzen, Bakterien und Viren spielen. TLRs werden auf vielen verschiedenen Abwehrzellen, zum Beispiel auch auf hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen, exprimiert und erkennen unterschiedliche mikrobielle Produkte als pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) (Akira et al., 2006). Nach der Erkennung von PAMPs induzieren die TLRs über ihren Signalweg direkt eine wirksame Antwort des angeborenen Immunsystems. Nach Bindung eines Liganden an einen TLR wird eine Kaskade initiiert, in deren Verlauf verschiedene Adapterproteine involviert sind. Dabei kommt dem Adapterprotein MyD88 eine zentrale Rolle zu. Am Ende der Signalkaskade steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, um eine antibakterielle oder antivirale Immunantwort zu induzieren (Beutler et al., 2006, O'Neill und Bowie, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Toll-like Rezeptor 4 genauer untersucht. TLR4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandbestandteile von gram-negativen Bakterien und bindet sie mit den Korezeptoren MD-2 und CD14 (Takeda und Akira, 2005). Der TLR4 Signalweg führt über das Adapterprotein MyD88 und die Interleukin-1 assoziierte Kinase (IRAK) zu einer Aktivierung des TNF-aktivierten Faktor-6 (TRAF-6). TRAF-6 vermittelte Signalwege führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Daraus resultiert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Akira et al., 2001). Diese proinflammatorischen Zytokine führen über eine Aktivitätserhöhung und

vermehrten Neusynthese der zytosolischen Phospholipase A₂ zu einer vermehrten Bildung von freier Arachidonsäure und somit einer erhöhten Bildung von Eikosanoiden wie Thromboxan und Cysteinylleukotrienen.

Die anatomische Verbindung zwischen Leber und Gastrointestinaltrakt über die Pfortader führt dazu, dass die Leber ständig bakteriellen Produkten ausgesetzt ist, wobei LPS und somit auch der TLR4 eine wichtige Rolle spielt (Crispe, 2009).

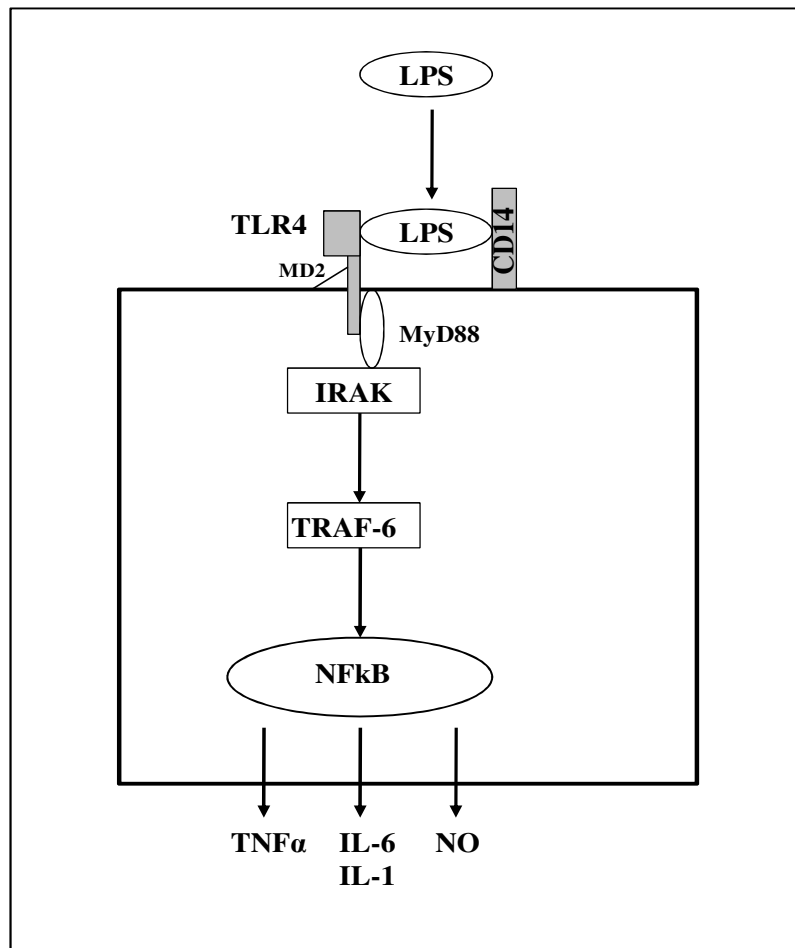


Abb. 6: Schematische Darstellung des TLR4 Signalweges. CD14: CD14 Rezeptor; IL-1: Interleukin-1; IL-6: Interleukin-6; IRAK: Interleukin-1 assoziierte Kinase; LPS: Lipopolysaccharide; MD2: TLR4 Kofaktor; MyD88: Adapterprotein; NFκB: Transkriptionsfaktor κB; NO: Stickstoffmonoxid; TLR4: Toll-like Rezeptor 4; TNF-α: Tumornekrosefaktor α; TRAF-6: TNF-aktivierter Faktor 6 (Details siehe Text).

1.8 Rolle der Kupfferzellen

Bei Kupfferzellen (KCs) handelt es sich um die Makrophagen der Leber. Sie machen 80-90% der gewebständigen Makrophagen des Körpers aus (Bilzer et al., 2006). Damit

spielen sie sowohl in der lokalen, als auch in der systemischen Abwehr von Krankheitserregern eine zentrale Rolle. Ihre Funktion beinhaltet Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Schwabe et al., 2006). Durch ihre Lokalisation in den Sinusoiden der Leber kommt ihnen eine bedeutende Abwehrfunktion gegenüber Bakterien, bakteriellen Endotoxinen und mikrobiellen Produkten zu, die aus dem Darmbereich über die Pfortader in die Leber gelangen (Fox et al., 1987). Folglich sind Kupfferzellen ständig proinflammatorischen Faktoren, z.B. bakteriellen Endotoxinen, ausgesetzt, die zu einer Aktivierung der Kupfferzellen führen. Nach Aktivierung setzen Kupfferzellen unter anderem Zytokine, Prostanoid, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies frei (Decker, 1990). Die wichtigsten Aktivoren von Kupfferzellen sind die Komplementfaktoren C3a und C5a (Schieferdecker et al., 2001), β -Glykane von Bakterien und Pilzen (Thornton et al., 1996) und Lipopolysaccharide (LPS). Lipopolysaccharide sind Endotoxine von gram-negativen intestinalen Bakterien. LPS aktiviert Kupfferzellen direkt über den TLR4 Signalweg (Su, 2002). Daraus resultiert unter anderem die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-12, IL-18 und IL-10 (Seki et al., 2001).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass bei bis zu $\frac{2}{3}$ der Patienten mit einer ersten Varizenblutung oder einem frühzeitigen Rezidiv eine bakterielle Infektion dokumentiert wurde (de Franchis, 2005, Bosch und Garcia-Pagan, 2000, Rimola et al., 1985, Soriano et al., 1992, Bernard et al., 1995, Goulis et al., 1998). Eine bedeutende Rolle bei portalen Druckerhöhungen in der gesunden und in der fibrotischen Leber spielt die Aktivierung von Kupfferzellen durch LPS im Rahmen einer bakteriellen Infektion. Der Portaldruckerhöhung wird dabei unter anderem durch den Vasokonstriktor Thromboxan A₂ vermittelt (Steib et al., 2007), der von Kupfferzellen in großen Mengen produziert wird (Dieter et al., 1989). Zielzellen dieser Thromboxan A₂-Ausschüttung sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die in den Sinusoiden lokalisierten und zur Kontraktion befähigten hepatischen Sternzellen (Zhou et al., 2006, Reynaert et al., 2008).

Kupfferzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der portalen Hypertension und somit auch bei der daraus resultierenden Komplikationen der Ösophagus- und Magenvarizenblutung. Ein verbessertes Verständnis der genauen Pathophysiologie ist wichtig, um die aktuellen Präventions- und Interventionsstrategien erweitern zu können.

2 Fragestellung

Bei Patienten mit Zirrhose steigt das Risiko einer Varizenblutung beim Auftreten von Infektionen, wie zum Beispiel einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP). Der genaue Mechanismus dieses pathophysiologischen Phänomens ist noch nicht bekannt.

Beim Auftreten einer SBP kommt es zu einem hohen Anfall von bakteriellen Produkten, wie zum Beispiel von LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. LPS führt zu einer Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLRs), die sich vermehrt auf Makrophagen, wie zum Beispiel den hepatischen Kupfferzellen, finden. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass TLR-Aktivatoren unter anderem über Kupfferzellen durch die Produktion von intrahepatischen Vasokonstriktoren zu einem Anstieg des portalen Druckes führen. Dieser Mechanismus führt zu den experimentellen Fragestellungen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen.

Ungenügend untersucht sind bisher die Effekte einer intraperitonealen LPS-Vorbehandlung auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand und die möglicherweise beteiligten Kupfferzell-abhängigen Mechanismen.

Die Mechanismen der Ausschüttung von intrahepatischen Vasokonstriktoren sind besonders wichtig, weil diese Effekte der Druckerhöhung potentiell reversibel sind. Deswegen sind sie ein Ansatzpunkt für neue pharmakologische Interventionen bei Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertonie.

Es ergeben sich folgende Fragen, welche in der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollen:

Teil I:

- 1) Welche Auswirkung hat die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS und eine darauffolgende Aktivierung der Kupfferzellen auf den Pfortaderdruck?
- 2) Welche Mechanismen liegen einer möglichen Druckveränderung zu Grunde?

Teil II:

- 1) Welche Rolle spielen die Kupfferzell-abhängigen Vasokonstriktoren?
- 2) Wie könnte man Antagonisten der Vasokonstriktoren zu therapeutischen Zwecken einsetzen?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden die in Abb. 7 dargestellten Hypothesen untersucht.

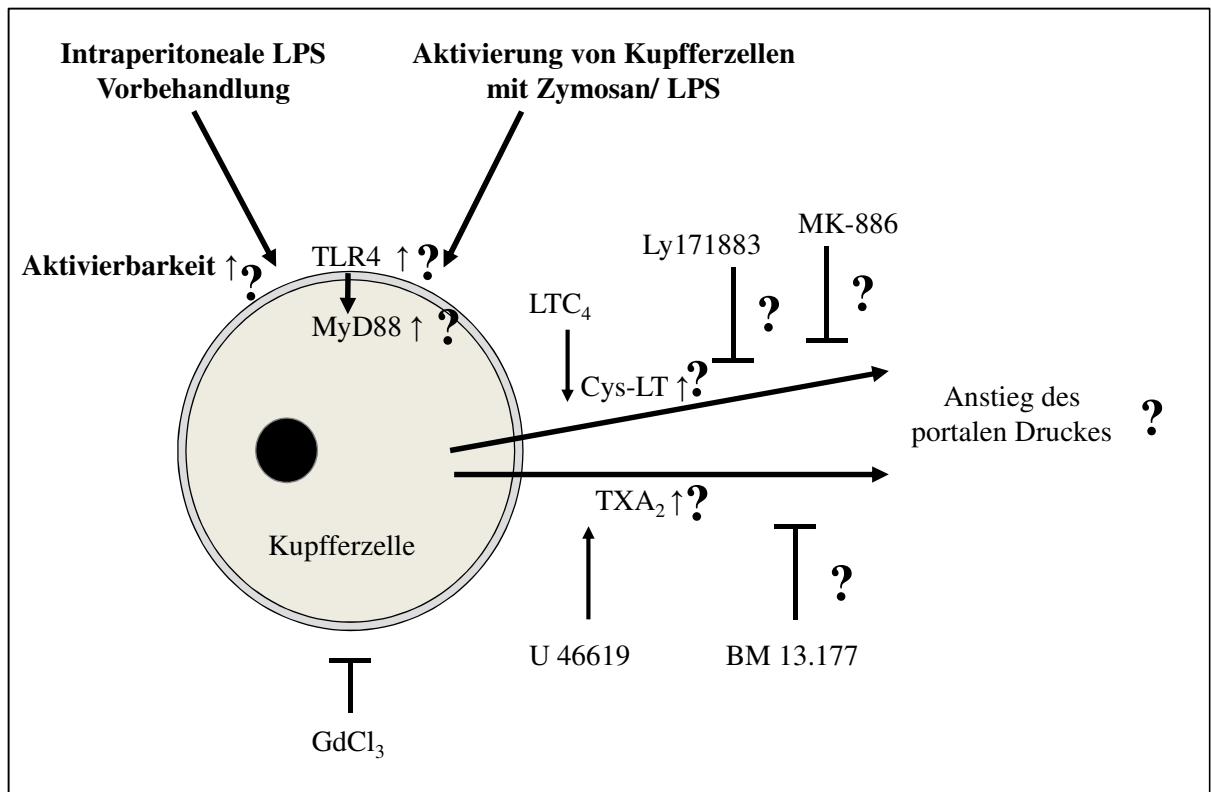


Abb. 7: Gesamtdarstellung der verabreichten Substanzen. Die Abbildung zeigt die dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothesen auf. Die dafür zu untersuchenden Mechanismen sind mit „?“ gekennzeichnet, + markiert hemmende, ↑ markiert aktivierende Einflüsse auf die dargestellten Mechanismen. Ly171883 ist ein Leukotrienrezeptorantagonist, MK-886 ist ein Leukotriensynthaseinhibitor, BM13.177 ist ein Thromboxanrezeptorantagonist, U46619 ist ein Thromboxananalogon.

3 Methoden

3.1 Tierversuche

Alle Tiere wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz gehalten. Die Experimente wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Die Zeit bis Versuchsbeginn verbrachten die Tiere in einem gleich bleibend klimatisierten Raum in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus. In Käfigen zu jeweils 2 Tieren hatten sie durchgehend freien Zugang zu Wasser und Standardfutter der Firma Altromin (Lage, Deutschland). Nach der Lieferung konnten sich die Tiere generell 5 Tage akklimatisieren, bevor Versuche oder Operationen durchgeführt wurden.

3.2 Induktion einer Leber-Fibrose mittels Gallengangsligatur (BDL)

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht zwischen 180 und 200 g wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit NaCl 0,9% im Verhältnis 1:3 verdünntem, steril filtriertem Pentobarbital (Narcoren) betäubt (50mg/kg KG). Nach Rasur der Ratten im Abdominalbereich wurden diese, mittels eines Keils im unteren Bereich der Brustwirbelsäule überstreckt, auf einer Operationsplatte fixiert. Nach Desinfektion des OP-Gebietes mit Povidon-Iod-Lösung (Braunol) wurde jeweils das gesamte Tier mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Der Zugang erfolgte über eine mediane Laparotomie. Nach Darstellung des Gallenganges wurde dieser mit Fäden der Stärke 3-0 zweifach ligiert und zwischen den beiden Ligaturen durchtrennt (Steib et al., 2007). Nach Wundverschluss wurden die Ratten für mindestens 24h in einem Einzelkäfig gehalten. Erst nach vollständigem Aufwachen und Erholung von der Narkose wurden wieder zwei Ratten in einen Käfig zusammengesetzt. Dreimal wöchentlich erfolgte die Substitution von Vitamin K mittels Injektion von 0,04 ml Konaktion subcutan zur Prophylaxe von Blutungskomplikationen.

Bei sham-operierten Tieren wurde die Operation auf gleiche Weise durchgeführt, nur wurde bei ihnen der Gallengang nach Darstellung nicht ligiert. Auch diese Tiere erhielten Vitamin K nach obigem Schema.

Die isolierte Leberperfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer und die *in vivo*-Experimente wurden, wie im Folgenden beschrieben, jeweils genau vier Wochen nach der Operation durchgeführt.

3.3 Induktion einer Leberzirrhose mittels Thioacetamid (TAA)

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g bekamen eine Behandlung mit Thioacetamid (TAA) für 18 Woche. Um den Gewichtsverlauf zu kontrollieren, wurden sie einmal pro Woche gewogen. Als Startdosis wurde 0,3% TAA in das Trinkwasser der Tiere gemischt. Wenn sich das Körpergewicht von einer Woche zur anderen veränderte, wurde die TAA Dosis angepasst, wie von Laleman et al. beschrieben (Laleman et al., 2006).

Die TAA Konzentration wurde um 50 % erhöht, wenn das Gewicht mehr als 20 g pro Woche anstieg oder das Gesamtgewicht des Tieres mehr als 60 g zunahm. Im umgekehrten Fall wurde die TAA Konzentration um 50% erniedrigt, wenn das Tier mehr als 20 g pro Woche an Gewicht verlor oder von seinem ursprünglichen Gesamtgewicht mehr als 60 g verlor.

Die isolierte Leberperfusion und die *in vivo*-Experimente wurden jeweils 126 Tage nach Beginn der Behandlung mit TAA durchgeführt.

3.4 Isolierte Rattenleberperfusion *in situ*

Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Natriumpentobarbital (Narcoren, 50 mg/kg KG) betäubt. Nach Kontrolle auf Schmerzfreiheit wurden die Tiere auf einer Operationsplatte in Rückenlage fixiert. Zunächst wurde in der Leiste die Vena femoralis freipräpariert und es erfolgte eine Injektion von 250 IU Heparin. Danach wurde die Bauchwand eröffnet. Um die Pfortader wurden zwei Ligaturen vorgelegt, eine weitere Ligatur wurde um die Vena cava inferior, cranial der Nierenvenen, vorgelegt. Aus der Vena cava inferior wurden 3-4 ml Blut entnommen, um die Serumparameter alkalische Phosphatase (aP), Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ GT), Bilirubin, Aspartataminotransferase (AST (GOT)) und Alaninaminotransferase (ALT (GPT)) zu bestimmen. Im Anschluss wurde die Pfortader inzidiert und mit einem Teflon-Venenkatheter (14-G) kanüliert. Die beiden Pfortaderligaturen dienten dabei zur Fixierung dieses Katheters. Die Leber wurde umgehend mit einem konstanten Fluss von $3,5 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Leber perfundiert. Um eine Druckschädigung des Lebergewebes durch einen Stau des Perfusats zu vermeiden, wurde sofort nach Anperfusion die Vena cava im unteren Abdominalbereich durchtrennt, um während der weiteren Operation einen Perfusatabfluss zu gewährleisten. Danach wurde eine Thorakotomie durchgeführt. Die Vena cava inferior

wurde durch den rechten Vorhof des Herzens kanüliert, so dass die Spitze der Kanüle cranial der Lebervenen zu liegen kam. Nach Ligatur der Vena cava inferior oberhalb der Nierenvenen wurde somit sichergestellt, dass das gesamte, über die Pfortader infundierte, Perfusat über die Cava-Kanüle abfließen konnte. Hieraus wurden während des Versuchs Perfusatproben entnommen. Ferner wurde die spannungsfreie Positionierung aller Katheter kontrolliert. In allen Experimenten wurden die Lebern volumenkonstant und nicht rezirkulierend mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4; 37°C) perfundiert. Dazu wurde der Puffer durch einen Schlauchoxygenator geleitet. Dabei wurde er mit Carbogen (O₂ 95%; CO₂ 5%) begast. Der Oxygenator bestand aus einem 15 m langen Silikonschlauch (Wandstärke 0,2 mm, Innendurchmesser 2 mm), welcher in einer gasdichten Kammer um einen thermostatisierten Aluminiumblock gewickelt war.

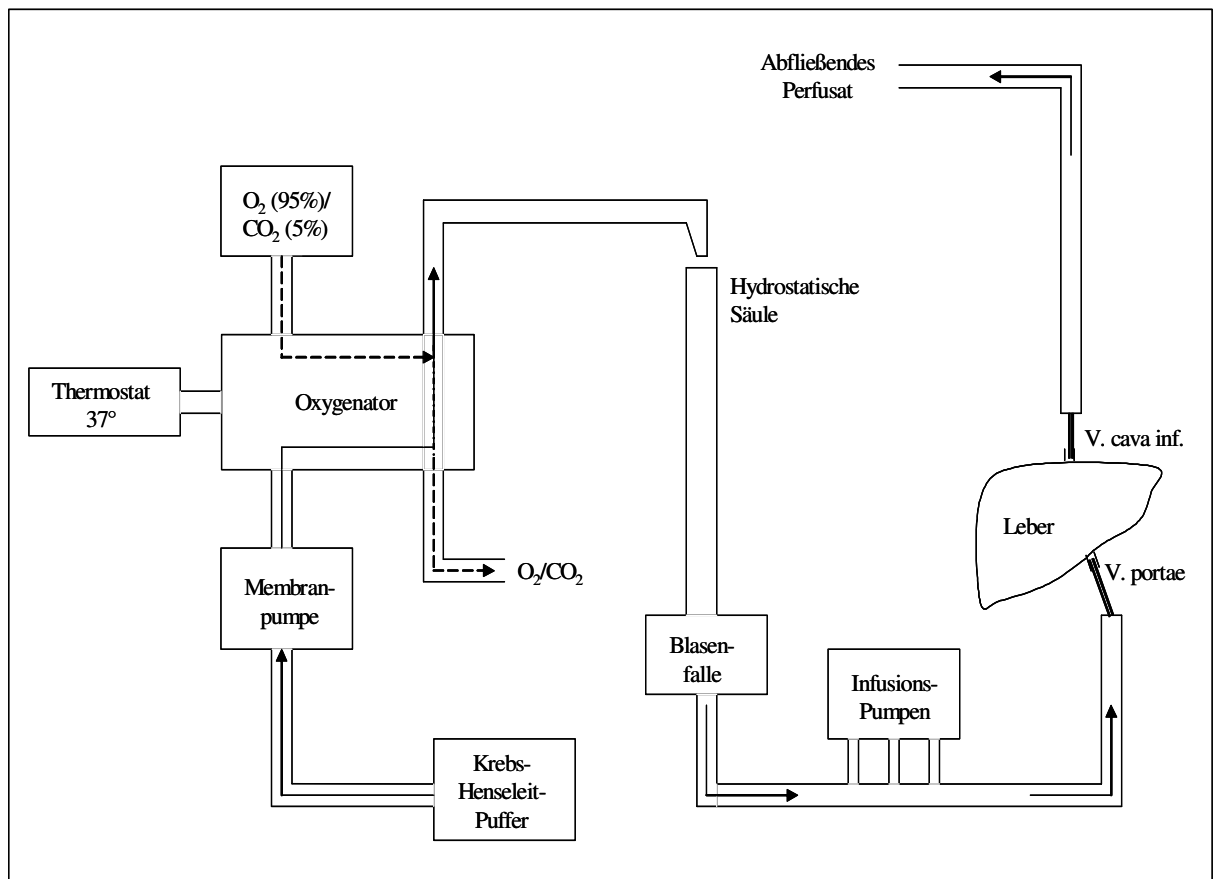


Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Anlage zur isolierten Leberperfusion. Detaillierte Beschreibung siehe Text. (modifiziert nach J. Härtl, Dissertation: Aktivierung der Kupfferzellen in der Leber durch H₂O₂: Ein wichtiger Mechanismus der portalen Hypertension, 2010)

Die Pfortaderkanüle war mit einem Steigrohr verbunden, an dem anhand einer vertikalen Skala direkt die momentanen Perfusionsdrücke in cm H₂O abgelesen werden konnten. Bei sham-operierten und nicht operierten Tieren wurde der Gallengang mit einem Polyethylenröhrchen (PE10, Innendurchmesser 0,4 mm) kanüliert, um die Galleproduktion zu überwachen. In den ersten 30 Minuten nach Anperfusion der Leber wurden keine Substanzen verabreicht, um dem Organ nach der Operation im System eine Stabilisierungsphase zu ermöglichen. Während dieser 30-minütigen Stabilisierungsperiode mussten als Zeichen der Lebensfähigkeit der Leber folgende Kriterien erfüllt sein: stabiler Perfusionsdruck, Galleproduktion größer als 0,8 µl min⁻¹g⁻¹Leber (bei sham-operierten und nicht operierten Tieren) und Lactat-Dehydrogenase-Effluxwerte geringer als 5 mU min⁻¹g⁻¹Leber. Die LDH-Aktivität wurde wie im Folgenden beschrieben bestimmt. Falls eines der genannten Kriterien nicht erfüllt wurde, wurde der Versuch nicht weitergeführt.

3.5 Bestimmung der LDH-Aktivität im effluenten Perfusat

Unmittelbar im Anschluss an die jeweiligen Versuche der isolierten Leberperfusion wurde die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Leberperfusat als Indikator der Zellschädigung bestimmt. Hierfür wurden während der Versuche zu standardisierten Zeiten gewonnene Perfusatsproben (20.; 30.; 40.; 44.; 46.; 50.; 55.; 60.; 70.; 80.; 90. und 100. Versuchsminute) analysiert. Die Messungen erfolgten photometrisch bei 25°C. Folgender Testansatz wurde verwendet:

Leberperfusat	500 µl
Phosphat-Puffer (0,05 M, pH 7,5) + Pyruvat (60 mM)	500 µl
NADH (10 mg/ml)	10 µl

Falls erforderlich erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 (→ 950 µl Puffer + 50 µl Probe). Die Abnahme der Extinktion bei 365 nm wurde kontinuierlich registriert. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Extinktionskoeffizient $e_{365} = 3,34 \text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Außerdem wurden die Durchflussrate des Perfusats durch die Leber und das Lebergewicht mit berücksichtigt, so dass in die LDH-Bestimmung folgender Faktor mit einging:

$$\text{Faktor}_{\text{LDH}} = (1010 \times 1000 \times \text{Durchfluss}) \times (3,34 \times 500 \times \text{Lebergewicht})^{-1}$$

3.6 Messung von Serum-Parametern

Bei den Versuchen der isolierten Leberperfusion wurden wie oben beschrieben vor Anperfusion ca. 3-4 ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen und zentrifugiert, um Serum-Parameter zu bestimmen. Diese Analyse beinhaltete aP, γ -GT, Bilirubin, AST(GOT) und ALT(GPT). Die Messungen erfolgten im Institut für klinische Chemie der LMU München im Klinikum Großhadern.

3.7 Versuchsprotokolle der *in situ* Perfusion

3.7.1 Intraperitoneale Gabe von LPS

Alle der folgenden Experimente wurden mit und ohne eine zusätzliche intraperitoneale Gabe von LPS durchgeführt. Bei der LPS Gabe wurde den Tieren 3 Stunden vor dem Versuch LPS (*Escherichia coli* 026:B6) mit der Dosis 1 mg/kg KG gelöst in 0,9% NaCl intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere bekamen eine Vorbehandlung mit NaCl (0,9%) ohne LPS.

3.7.2 Aktivierung von Kupfferzellen mittels Zymosan

Die Kupffer-Zellen wurden durch die Infusion mit Zellwandpartikeln von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan A) aktiviert (n=5). Die Aktivierung der Kupfferzellen erfolgt über die Bindung der β -Glucan-Komponente des Zymosans an den Komplementrezeptor CR3 der Kupfferzellen (Thornton et al., 1996).

Die Zymosansuspension (37,5mg/ 50ml Wasser) wurde für 30 min bei 95°C gekocht, um Enzyme, wie zum Beispiel Phospholipasen, zu zerstören. Danach wurden kaltes Wasser und 10fach konzentrierter Krebs-Henseleit-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 250ml hinzu gefügt. Die fertige Zymosansuspension in Krebs-Henseleit-Puffer (150 μ g/ml) wurde von Minute 40 bis 46 nach dem Start des Perfusionsexperiments infundiert.

3.7.3 Blockade von Kupfferzellen

Zusätzlich zu der LPS Gabe wurde bei einem Teil der Versuche eine Kupfferzellblockade mittels einer Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid durchgeführt (n=5) (Roland et al., 1999).

Die Blockade der Kupfferzellen wurde durch eine intraperitoneale Injektion von Gadoliniumchlorid (10 mg/kg KG) 48 und 24 Stunden vor Versuchsbeginn durchgeführt. Kontroll-Tiere erhielten NaCl 0,9% (1 ml/kg KG; intraperitoneal 48 und 24 h vor Versuchsbeginn). Die beiden Formen der Vorbehandlung wurden jeweils bei sham-operierten Tieren (n=5), als auch bei gallengangsligierten Tieren (BDL; n=5) durchgeführt, woraus sich insgesamt vier Gruppen ergaben.

3.7.4 Rolle der Vasokonstriktoren

Um die Bedeutung der ausgeschütteten Vasokonstriktoren auf den portalen Perfusionsdruck zu untersuchen, wurden verschiedene Rezeptorantagonisten und Inhibitoren in unterschiedlichen Perfusionsexperimenten infundiert.

Der Leukotrienrezeptorantagonist Ly171883 (20 μ M) und der Thromboxanrezeptorantagonist BM 13.177 (20 μ M) wurden von Minute 30 bis 60 zusätzlich zu der LPS Vorbehandlung (1 mg/kg KG) und der Zymosangabe (150 μ g/ml, Minute 40 bis 46) infundiert. Jeweils 5 Tiere bekamen den LT Rezeptorantagonisten und 5 Tiere den TX Rezeptorantagonisten.

Der LT Synthaseinhibitor MK-886 (0,6 mg/kg KG) wurde 30 min vor der LPS Vorbehandlung (1 mg/kg KG für 3h) intraperitoneal verabreicht. Zymosan (150 μ g/ml) wurde während der Leberperfusion von Minute 40 bis 46 infundiert. Der Versuch begann insgesamt 3,5 Stunden nach der Gabe des LT Synthaseinhibitors MK-886.

3.7.5 Infusion der Vasokonstriktoren Thromboxan A₂ und Leukotrien C₄

Um die direkte Wirkung der Vasokonstriktoren TXA₂ und LTC₄ zu untersuchen, wurden das TXA₂ Analogon U46619 (0,1 μ M) und LTC₄ (20nM) von Minute 40 bis 46 infundiert (jeweils n=5).

Die Infusion der Vasokonstriktoren wurde in Versuchen mit und ohne zusätzliche intraperitoneale LPS Vorbehandlung (1 mg/kg KG für 3 h) durchgeführt (jeweils n=5).

3.8 *In vivo*-Messung des Portaldruckes

Die Experimente wurden 4 Wochen nach Gallengangsligatur (BDL) durchgeführt. Die Ratten wurden mit 1:3 mit NaCl 0,9% verdünntem, steril filtriertem Natrium-Pentobarbital

(Narcoren), welches intraperitoneal injiziert wurde, betäubt. Direkt vor den Versuchen wurde das Körpergewicht bestimmt. Nach Kontrolle der Narkosetiefe wurden die Ratten in Rückenlage auf einer Operationsplatte fixiert. Die Tiere wurden dabei auf mehreren Lagen Zellstoff gelagert, um Temperaturverluste gering zu halten. Zunächst wurde die linke Arteria carotis auf einer längeren Strecke freipräpariert. Es wurden zwei Ligaturen vorgelegt und die Arterie mittels zweier Gefäßklemmen verschlossen. Nach Inzision mit einer Mikroschere zwischen den Klemmen wurde ein Katheter zur arteriellen Druckmessung in die Arterie eingebracht, welcher mit den Ligaturen fixiert wurde. Dann wurde die proximale Gefäßklemme entfernt und Puls und arterieller Druck mittels eines Druckabnehmers kontinuierlich auf einen Monitor übertragen (Sirecust 404 von Siemens, Deutschland, und Transducer Gabarith von Becton Dickinson, Singapur). Der Carotiskatheter war an eine Infusionspumpe angeschlossen, welche den Katheter mit NaCl 0,9% bei einer Förderrate von 12 ml/h spülte.

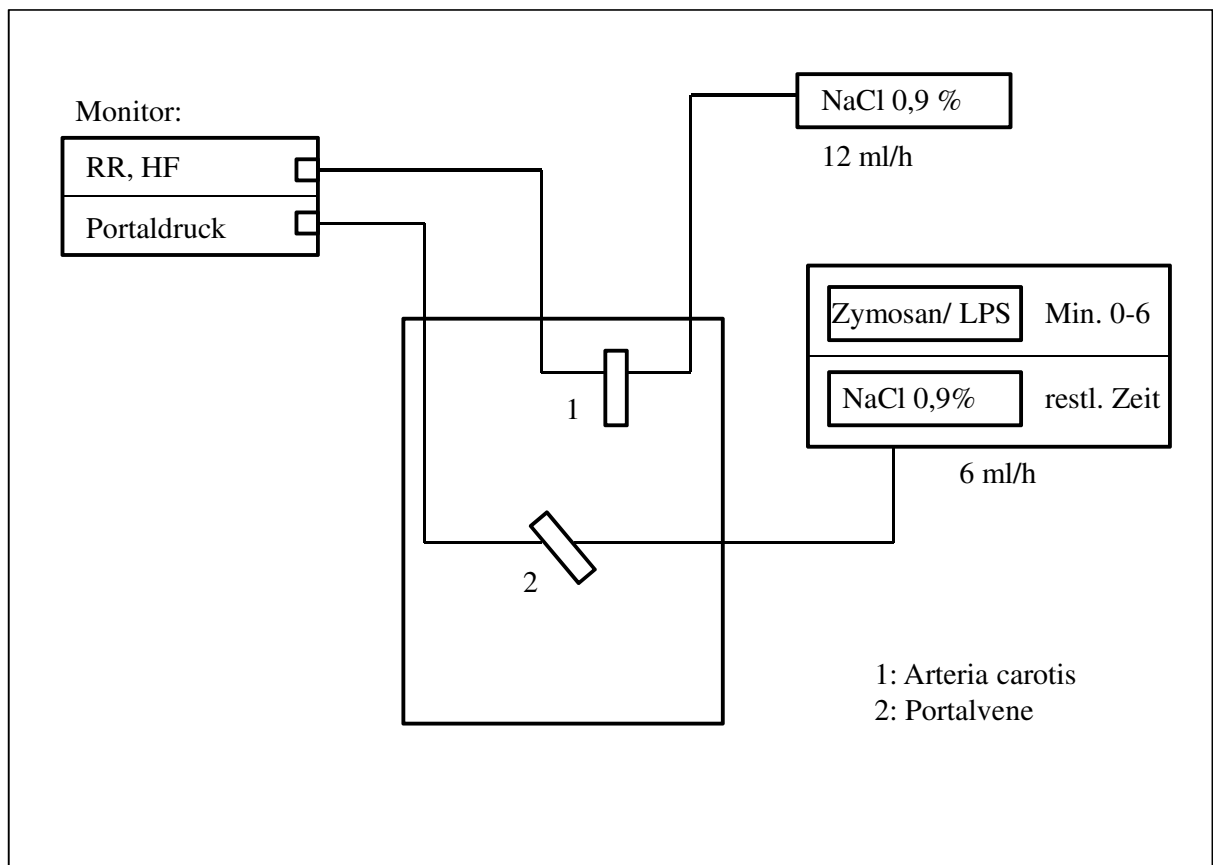


Abb. 9: Schematische Darstellung der in vivo Versuchsanordnung.

Detaillierte Beschreibung siehe Text. (modifiziert nach J. Härtl, Dissertation: Aktivierung der Kupfferzellen in der Leber durch H₂O₂: Ein wichtiger Mechanismus der portalen Hypertension, 2010)

Bei stabilen Vitalparametern wurde eine Laparotomie durchgeführt. Es wurde ein PE-Katheter (23 g; 0,6 x 30 mm) mit einer Kanüle über die Vena ileocolica eingebracht und bis zum Zusammenfluss von Pfortader und Vena splenica vorgeschoben. Diese Kanüle diente gleichzeitig der Infusion von mikrobiellen Produkten (Zymosan oder LPS) und der Messung des Portaldruckes mittels eines weiteren Druckabnehmers. Solange über diese Kanüle keine Substanzen verabreicht wurden, wurde sie kontinuierlich mit NaCl 0,9% mit einer Förderrate von 6 ml/h gespült. Die gemessenen Druckwerte wurden ebenfalls kontinuierlich an den oben genannten Monitor übertragen und parallel zu den gemessenen Werten von Puls und arteriellem Druck angezeigt. Zum Temperaturerhalt wurde über der Ratte eine Wärmelampe installiert und zur Kontrolle im Abdominalraum lebernah ein Temperaturfühler positioniert. Nach einer Stabilisierungsphase von 10 Minuten wurden zwei unterschiedliche mikrobielle Produkte in verschiedenen Experimenten über die Pfortader infundiert: entweder β -glucan-reiches Zymosan (3,2 mg/min) von Minute 0 bis 6 (n=7) oder Zellwandpartikel von gramnegativen Bakterien (LPS) (4 mg/kg KG) von Minute 0 bis 6 (n=7). In einer zusätzlichen Reihe von Experimenten wurden die Tiere 3 h vor dem Experiment mit LPS (1mg /kg KG) intraperitoneal vorbehandelt. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, Zymosan oder LPS über die Pfortader hinzu gegeben (jeweils n=7).

3.9 Montelukast Behandlung und Kupfferzellaktivierung *in vivo*

In jeder der folgenden experimentellen Gruppen wurden drei verschiedene Bedingungen untersucht:

- 1) Infusion von 0,9% NaCl Lösemittel (100 μ l/min, über 6 Minuten)
- 2) Kupfferzellaktivierung mittels Zymosan (intraportale Gabe, 3,2 mg/min, Minute 0-6)
- 3) Kupfferzellaktivierung mittels intraportaler Gabe von LPS (4 mg/kg KG, 100 μ l/min, Minute 0-6)

Bei den Tiere aus Gruppe 1 (Lösemittel n=5, Zymosan n=5, LPS n=5) wurde eine Gallengansligatur (BDL) für 28 Tage durchgeführt (siehe 3.2). Während dieser 28 Tage bekamen die Ratten eine Kontrolldiät mit dem Futter C1000 (Altromin, Lage), anschließend wurden die Experimente mit der Infusion von Lösemittel, Zymosan oder LPS durchgeführt.

Auch die Ratten aus Gruppe 2 bekamen eine Gallengansligatur für 4 Wochen (Lösemittel n=5, Zymosan n=7, LPS n=7). Die Tiere wurden für 18 Tage mit dem Kontrollfutter C1000 gefüttert und bekamen anschließend für die darauf folgenden 10 Tage C1000, welches den Leukotrienrezeptor-Antagonisten Montelukast beinhaltete (Altromin, durchschnittlich 0,125 mg/kg KG pro Tag, von Tag 18 bis 28).

Die Ratten in Gruppe 3 bekamen eine Behandlung mit TAA für 126 Tage mit dem Trinkwasser (Lösemittel n=5, Zymosan n=5, LPS n=5). Sie wurden mit dem Kontrollfutter C1000 ohne Montelukast gefüttert.

Gruppe 4 bestand ebenfalls aus Ratten die TAA mit ihrem Trinkwasser für 126 Tage bekommen haben (Lösemittel n=5, Zymosan n=7, LPS n=7). Ab Tag 116 bekamen diese Tiere das C1000 Futter mit Montelukast (durchschnittlich 0,125 mg/kg KG pro Tag, von Tag 116 bis 126) anstatt der Kontrolldiät.

3.10 Histologische Beurteilung der Lebern

Das Lebergewebe wurde unmittelbar nach den Versuchen entnommen und in 4%, gepuffertem Formalin fixiert. Die Aufarbeitung und Färbung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der LMU München. Das Gewebe wurde gemäß Standard-Methoden in Ethanol entwässert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden 4 µm dicke Streifen geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Elastica-van-Gieson (EvG) nach Standardprotokollen gefärbt.

3.11 ELISA

3.11.1 Bestimmung von Thromboxan B₂

Im Rahmen der isolierten Leberperfusion wurden zu standardisierten Zeiten Proben aus dem effluenten Perfusat entnommen (20.; 30.; 40.; 44.; 46.; 50.; 55.; 60.; 70.; 80.; 90. und 100. Versuchsminute). Da Thromboxan A₂ sehr schnell abgebaut wird, erfolgte die Bestimmung des stabilen Abbauproduktes Thromboxan B₂. Die in den Lebern produzierten Thromboxan-Spiegel wurden durch Messung der Freisetzung ins effluente Perfusat in den verschiedenen Phasen der Versuche bestimmt. Dabei wurden die Thromboxan B₂-Spiegel jeweils doppelt mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) der Firma Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA) nach Protokoll des Herstellers gemessen.

3.11.2 Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen

Auch für die Bestimmung der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LT) Leukotrien C₄, D₄ und E₄ wurden zu den oben genannten Zeitpunkten Proben aus dem effluenten Perfusat entnommen. Um die Cys-LT Spiegel im Perfusat zu messen wurde jeweils Doppelwerte mittels ELISA der Firma Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) nach Protokoll des Herstellers bestimmt.

3.12 Gelelektrophorese und Western Blot Analyse

Um die Expression des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4), des MyD88 Adapterproteins und des Cys-LT₁ Rezeptors zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen aus Rattenleberlysaten mit den entsprechenden Antikörpern Anti-TLR4, Anti-MyD88 und Anti-Cys-LT₁ durchgeführt.

Das Material für diese Analysen wurde durch Homogenisierung aus Rattenlebern gewonnen, die zuvor in den Perfusionsversuchen verwendet wurden. Das gewonnene Homogenisat wurde zweimal zentrifugiert. Anschließend wurde aus dem Überstand eine Proteinbestimmung mittels der BCA-Methode gemacht (Brown et al., 1989). Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt.

Um die Proben nach der Proteingröße aufzutrennen, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gele für die Elektrophorese wurden nach einem Standardrezept hergestellt (siehe 4.4). Es wurden jeweils eine Probe mit einem Proteingehalt von 20 µg mit 7 µl 4-fach Ladepuffer und RIPA-Puffer zu einer Gesamtmenge von 30 µl gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt und mit Lauffpuffer in einer Elektrophoresekammer (Biorad) bei 70 V für 30 Minuten und anschließend bei 120 V für 1 Stunde der Proteingröße nach aufgetrennt. Ein Proteingrößenmarker wurde zur Kontrolle mitgeführt.

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Proteine wurden in einer Blottingkammer (Biorad), die mit Transferpuffer gefüllt war, mit einer Stromstärke von 400mA für 1 Stunde von dem Gel auf eine Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde in TBS-T + 5% Milchpulver blockiert, um die Proteine auf der Membran zu fixieren.

Die Membran wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben entsprechend mit TBS-T + 5% Milchpulver

verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 5 Minuten wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden verdünnten Sekundärantikörper in TBS-T + 5% Milchpulver inkubiert.

	Primärantikörperverdünnung		Sekundärantikörperverdünnung
TLR4	1:200	anti-goat	1:2000
MyD88	1:500	anti-rabbit	1:5000
Cys-LT	1:500	anti-rabbit	1:5000

Tab. 1: Verdünnung der Antikörper für den Western Blot.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T für jeweils 5 Minuten wurden die reaktiven Banden mittels eines Chemiluminescent-Detection-Kit (ECL Plus, Amersham Pharmacia) aktiviert und auf einem Röntgenfilm mit Hilfe eines Entwicklungsgeräts (Agfa curix 60) sichtbar gemacht. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Die quantitative Analyse der Banden wurde mit dem Programm ImageJ (NIH) durchgeführt.

3.13 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (der Einzelwerte) dargestellt. Die Analyse der Daten wurde unter Anwendung des Student-t-Test und der ANOVA-Varianzanalyse durchgeführt. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Darstellung des Signifikanzniveaus erfolgte mit Windows Excel.

4 Material

4.1 Chemikalien, Medikamente und Puffer für Tierversuche

Aqua bi-dest.	Kerndl, Weißenfeld
Braunol (Povidon-Iod 7,5%)	Braun, Melsungen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Carbogen (O ₂ 95%, CO ₂ 5%)	Linde, Pullach
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin (Formaldehydlösung 4%)	Microcos, Garching
Gadolinium (III) Chlorid Hexahydrat	Sigma, St. Louis
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Isopropanol (70%)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Konakion	Roche, Mannheim
Krebs-Henseleit-Puffer:	NaCl 118 mM
	KCl 4,8 mM
	KH ₂ PO ₄ 1,2 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1,2 mM
	NaHCO ₃ 25 mM
	CaCl ₂ 1,5 mM
LPS	Sigma, St. Louis
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Montelukast	Cayman Chemical, Ann Arbor
Narcoren (Natriumpentobarbital)	Merial, Hallbergmoos
Natriumchlorid (Lösung, 0,9%)	Braun, Melsungen
Natriumchlorid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, reinst	Merck, Darmstadt
Stickstoff (N ₂ , flüssig)	Linde, Pullach
Thioacetamid	Sigma, St. Louis
Zymosan	Sigma, St. Louis

4.2 Rezeptoragonisten, Antagonisten und Inhibitoren

BM 13.177 (TX Rezeptorantagonist)	Roche, Mannheim
LT C ₄	Cayman Chemical, Ann Arbor
Ly171883 (LT Rezeptorantagonist)	Calbiochem, Darmstadt
MK-886 (LT Synthaseinhibitor)	Sigma, St.Louis
U46619 (TXA ₂ Analogon)	Cayman Chemical, Ann Arbor

4.3 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper für Western Blot

β-Aktin	Millipore, Billerica
Acrylamid (30%)	Bio-RAD, Hercules
Anti-CysLT ₁ Rezeptor	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Anti-goat (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Anti-MyD88	Abcam, Cambridge
Anti-rabbit	GE Healthcare, München
Anti-TLR4	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma, St. Louis
Blotting Grade Blocker, non-fat dry milk	Bio-RAD, Hercules
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis
Chemiluminescent-Detection-Kit (ECL PLUS)	Amersham Pharmacia, Uppsala
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Marker (Dual Color)	Biorad, Hercules
2-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Polysorbat-20 (Tween)	Promega, Madison
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe

SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylen- diamin (C ₆ H ₁₆ N ₂))	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + Salzsäure)	Roth, Karlsruhe

4.4 Lösungen für Western Blot

10-fach Elektrophoresepuffer:	Glycin	144,13 g
	TRIS	30,3 g
	SDS	10 g
	Aqua dest.	1000 ml
4-fach Ladepuffer (Lämmli-Puffer):	Sammelgelpuffer	25 ml
	Glycerin	50 ml
	SDS	4 g
	Bromphenolblau	200 mg
	Aqua dest.	100 ml
	jeweils 1 ml Ladepuffer + 100 µl 2-Mercaptoethanol	
Lysepuffer (RIPA-Puffer):	NaCl	877 mg
	Tris-HCl	788 mg
	NP40	1 ml
	Deoxycholsäure	250 mg
	SDS	100 mg
	Aqua dest.	100 ml
Sammelgel:	30% Acrylamid	1 ml
	Sammelgelpuffer	4,9 ml
	APS	50 µl
	TEMED	5,5 µl
Sammelgelpuffer:	TRIS	15,15 g

	SDS	1 g
	HCl (6 mol/l)	pH=6,8
	Aqua dest.	250 ml
10-fach Transferpuffer:	Glycin	144,13 g
	TRIS	30,3 g
	Aqua dest.	1000 ml
Trenngel (10%):	30% Acrylamid	5 ml
	Trenngelpuffer	9,85 ml
	APS	150 µl
	TEMED	6 µl
Trenngelpuffer:	TRIS	45,5 g
	SDS	1 g
	HCl (6 mol/l)	pH=8,8
	Aqua dest.	250 ml
10-fach Waschpuffer (TBS):	TRIS	24,2 g
	NaCl	80 g,
	HCl (6 mol/l)	pH=7,6
	Aqua dest.	1000 ml
TBS-T:	TBS	100 ml
	Aqua dest.	900 ml
	Tween	1 ml

4.5 Material für ELISA

Enzyme Immunoassay Kit Thromboxane B₂,

Catalog No. 900-002

Assay Designs, Ann Arbor

Cysteinyl Leukotriene EIA Kit

Catalog No. 520501

Cayman Chemical, Ann Arbor

5 Ergebnisse

5.1 Erhöhung des portalen Druckes durch vorherige Aktivierung mit LPS

Der portale Druck der BDL Ratten, der unmittelbar vor der isolierten Leberperfusion bestimmt wurde, war auf $21,5 \pm 1,2$ cm H₂O erhöht. Diese Erhöhung war stärker ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe, den sham-operierten Tieren ($8,8 \pm 0,9$ cm H₂O).

Alle BDL Tiere hatten im Vergleich zu sham-operierten Tieren erhöhte Leberwerte. Zusätzlich war bei den BDL Tieren das Gewicht der Milz erhöht.

	Sham Ratten	BDL Ratten
γ-GT (U/l)	$1,3 \pm 0,4$	*$21 \pm 1,3$
Bilirubin (mg/dl)	$0,2 \pm 0,1$	*$8,3 \pm 0,5$
AST (GOT) (U/l)	45 ± 8	*98 ± 17
ALT (GPT) (U/l)	34 ± 5	38 ± 5

Tab. 2: Serumparameter. Bei den gallengangsligierten Tieren (BDL) zeigten sich fast alle im Rahmen der Leberdiagnostik erhobenen Werte signifikant (* $p < 0,05$) erhöht.

Der Pfortaderdruck bei BDL Ratten wurde durch eine intraperitoneale Gabe von LPS noch weiter erhöht auf $25,2 \pm 1,7$ cm H₂O. Im Gegensatz dazu hatte die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS keine Auswirkung auf den basalen Pfortaderdruck bei sham-operierten Tieren ($9,1 \pm 0,8$ cm H₂O). Nach der Pfortaderdruckmessung in vivo wurde jeweils die Leber isoliert und eine in situ Perfusion durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen war der Pfortaderdruck in der BDL Gruppe, die eine intraperitoneale LPS Vorbehandlung erhalten hatte, höher als in der Gruppe von BDL Tieren, die keine LPS Vorbehandlung bekommen hatte. Außerdem war der portale Perfusionsdruck der in situ perfundierten Lebern ebenfalls wieder in der BDL Gruppe höher als bei sham-operierten Tieren der Kontrollgruppe.

Der maximale Zymosan-induzierte Anstieg des portalen Perfusionsdruckes war in der BDL Gruppe mit intraperitonealer LPS Vorbehandlung höher als in der BDL Gruppe ohne LPS Gabe. Dieser Unterschied im maximalen Druckanstieg zwischen den beiden Gruppen war bis zum Ende des Pefusionsexperiments zu beobachten. Im Gegensatz dazu hatte die

LPS Vorbehandlung bei sham-operierten Ratten keinen Einfluss auf den Anstieg des portalen Perfusionsdruckes.

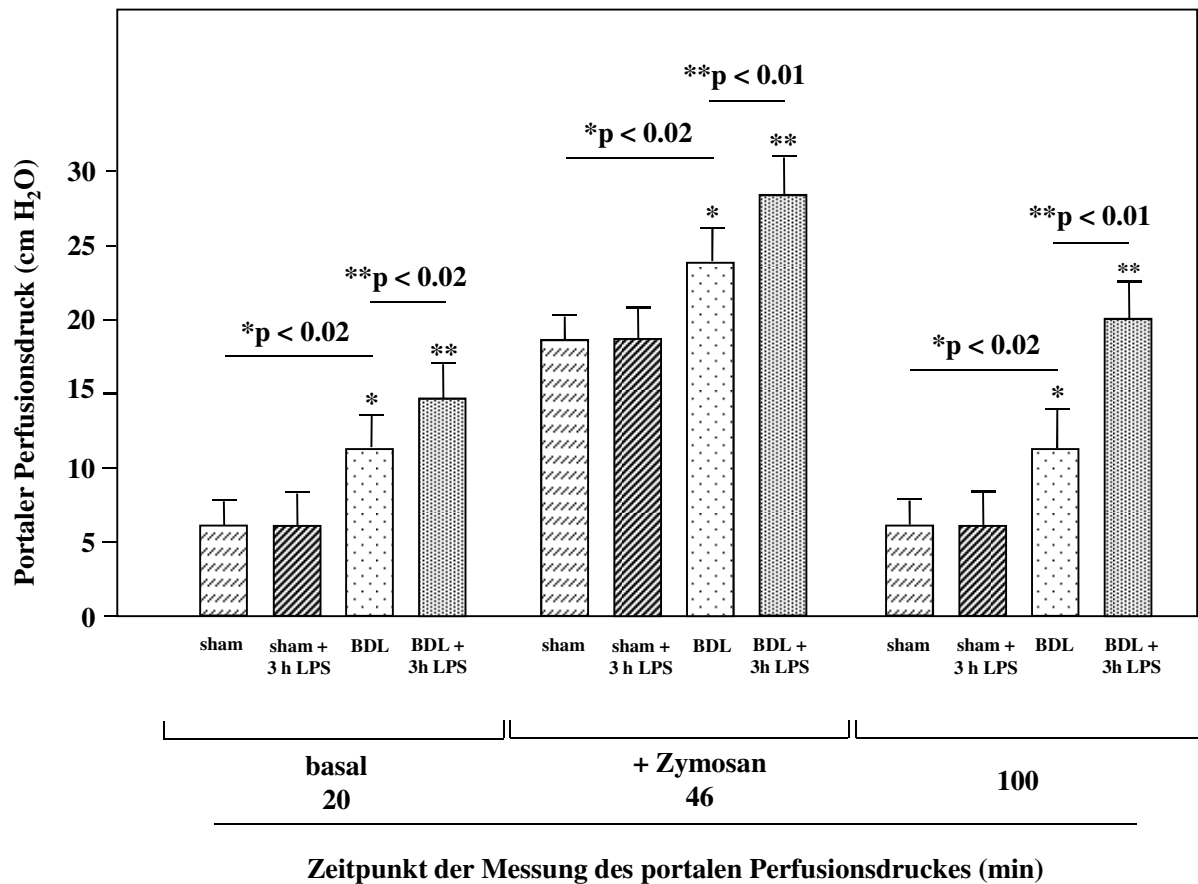


Abb. 10: LPS intraperitoneal erhöht den Pfortaderdruckanstieg bei Leberfibrose. Sham-operierte Tiere (n=5) hatten einen niedrigeren basalen portalen Perfusionsdruck im Vergleich zu gallengangsligierten Tieren (p<0,02, BDL für 4 Wochen, n=5). Der basale portale Perfusionsdruck aber auch der maximale Pfortaderdruck ließen sich durch eine Vorbehandlung mit LPS für 3h (1 mg/kg KG intraperitoneal, n=5) bei Tieren mit biliärer Fibrose nochmals steigern (p<0,01). Dieser Effekt konnte bei sham-operierten Ratten nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurde der vorübergehende Anstieg des portalen Perfusionsdruckes durch eine intraperitoneale LPS Vorbehandlung bei BDL Tieren zu einem lang anhaltenden Druckanstieg ausgedehnt (p<0,01). Auch dieser Effekt konnte bei sham-operierten Tieren nicht beobachtet werden.

Die Lebern von sham-operierten Ratten und BDL Ratten mit und ohne LPS Vorbehandlung wurden histologisch betrachtet. Sie wurden jeweils mit H&E und EvG gefärbt und anschließend analysiert, um morphologische Veränderungen durch die LPS Vorbehandlung auszuschließen.

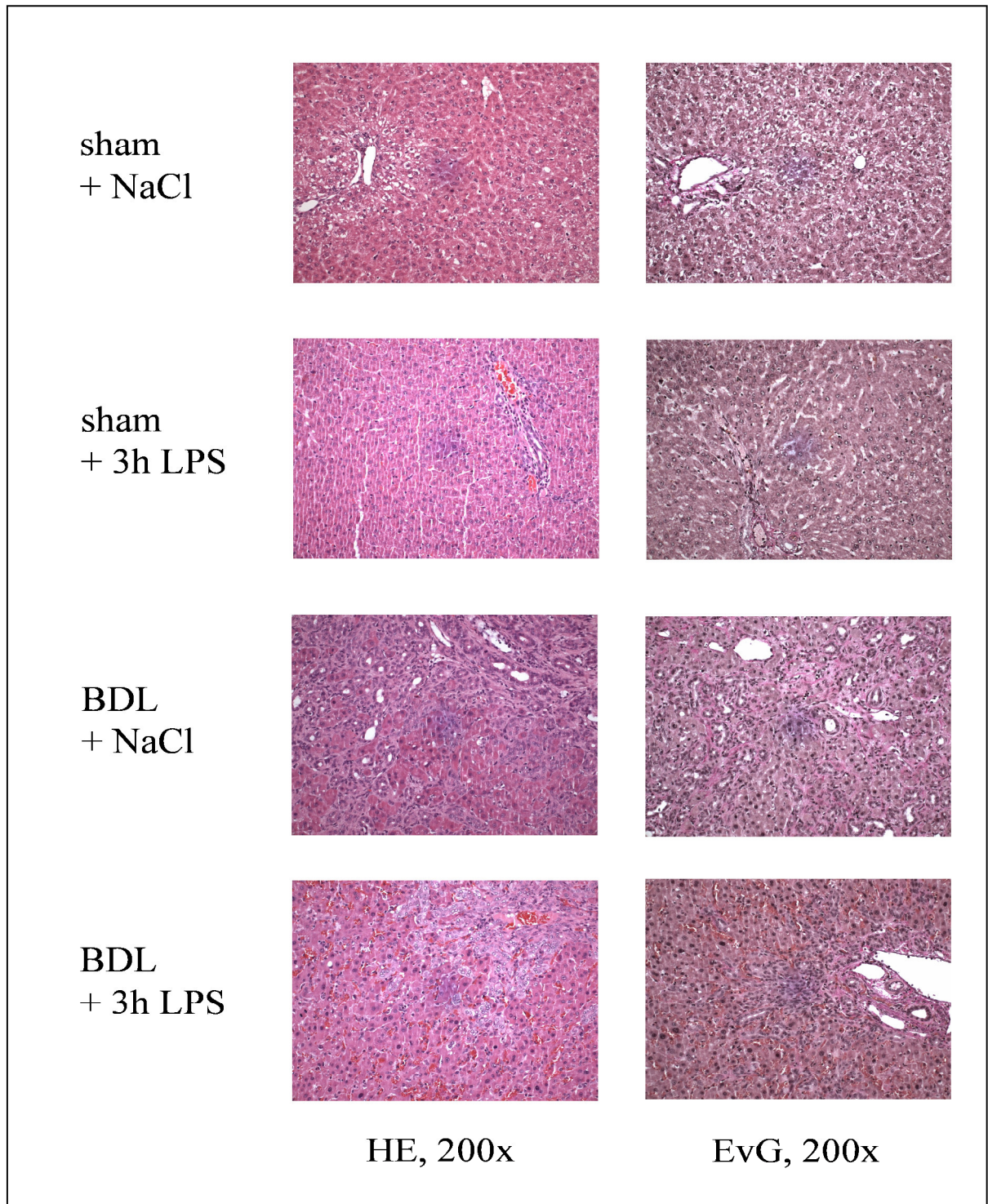


Abb. 11: Vergleich der Lebern von sham und BDL Tieren (HE und EvG Färbung). Die mikroskopische Analyse der Lebern zeigte eine normale Leberhistologie bei sham-operierten Ratten, sowohl mit als auch ohne LPS Vorbehandlung. Das typische histologische Bild einer BDL Leber (Proliferation der Gallengänge, gemischte zelluläre Infiltrate rund um die Portalvene, isolierte Nekroseareale, fibrotische Veränderungen) zeigte sich sowohl bei BDL Tieren ohne LPS Gabe als auch bei BDL Tieren mit LPS Vorbehandlung. Durch die LPS Vorbehandlung waren keine sichtbaren morphologischen Veränderungen entstanden.

Sham-operierte Ratten mit LPS Vorbehandlung oder Kontrollvorbehandlung mit NaCl (0,9%) zeigten eine normale Leberhistologie nach histologischer Färbung. Die Lebern von BDL Ratten zeigten typische morphologische Leberveränderungen durch die Operation. Es zeigten sich eine Proliferation der Gallengänge, gemischte zelluläre Infiltrate um die Portalvene, isolierte nekrotische Areale und fibrotische Veränderungen. Allerdings konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Lebern von BDL Ratten mit LPS Vorbehandlung und BDL Ratten mit NaCl Vorbehandlung fest gestellt werden.

Um die Kupfferzell-abhängigkeit des Druckanstieges zu zeigen, wurden die Kupfferzellen durch eine $GdCl_3$ Gabe blockiert. Der Effekt einer intraperitonealen LPS Vorbehandlung mit darauffolgender Zymosan Gabe auf den Anstieg des Pfortaderdruckes, konnte durch die Vorbehandlung mit $GdCl_3$ signifikant abgeschwächt werden.

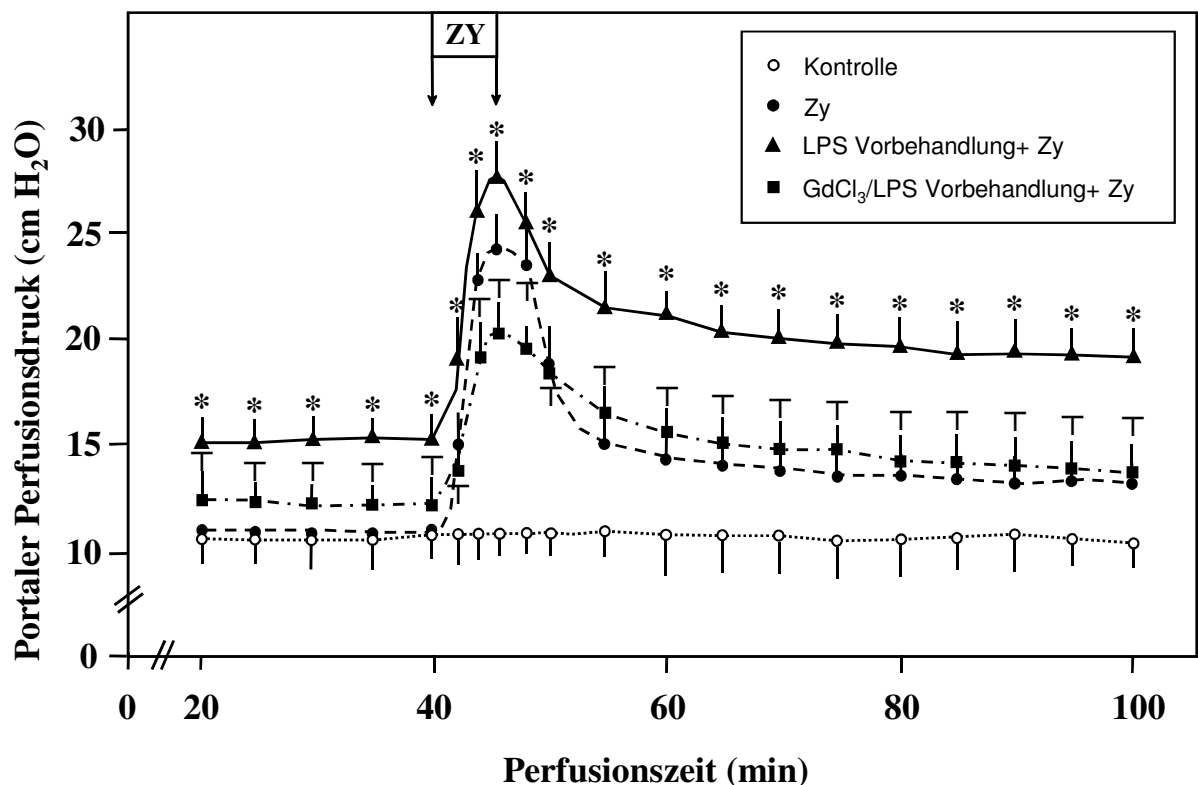


Abb. 12: Kupfferzell-abhängigkeit des Druckanstieges. Die Kupfferzellaktivierung mittels Zymosan (150 μ g/ml, Minute 40-46, n=5) erhöhte vorübergehend den portalen Perfusionsdruck bei BDL Ratten im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Vorbehandlung mit NaCl 0,9%, n=5). Die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS (1 mg/kg KG für 3 h, n=5) erhöhte den basalen, den maximalen und den lang anhaltenden Anstieg des portalen Perfusionsdruckes ($p < 0,05$). In einem nächsten Experiment wurden BDL Tiere mit $GdCl_3$ vorbehandelt (10 mg/kg KG intraperitoneal, 24 und 48 h vor Beginn des Versuches) um die Kupfferzellen zu blockieren. Anschließend wurden sie mit LPS intraperitoneal

vorbehandelt (1 mg/kg KG für 3 h) und Zymosan wurde von Minute 40 bis 46 während der isolierten Leberperfusion infundiert. Die Vorbehandlung mit GdCl₃ schwächte den Anstieg des basalen, maximalen und lang anhaltenden Perfusionsdruckes signifikant ab (p<0,05).

5.2 Anstieg der Proteinexpression von TLR4 und MyD88 nach LPS Vorbehandlung

Die Expression von TLR4 und dem Adapterprotein MyD88 wurde mittels Western Blot und anschließender Quantifizierung analysiert. Eine intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS für 3 Stunden führte bei BDL Ratten zu einer Hochregulation von TLR4 und MyD88 in der Leber. Dieser Effekt von LPS auf die hepatische TLR4 und MyD88 Expression konnte durch Kupfferzellblockade mittels GdCl₃ verhindert werden.

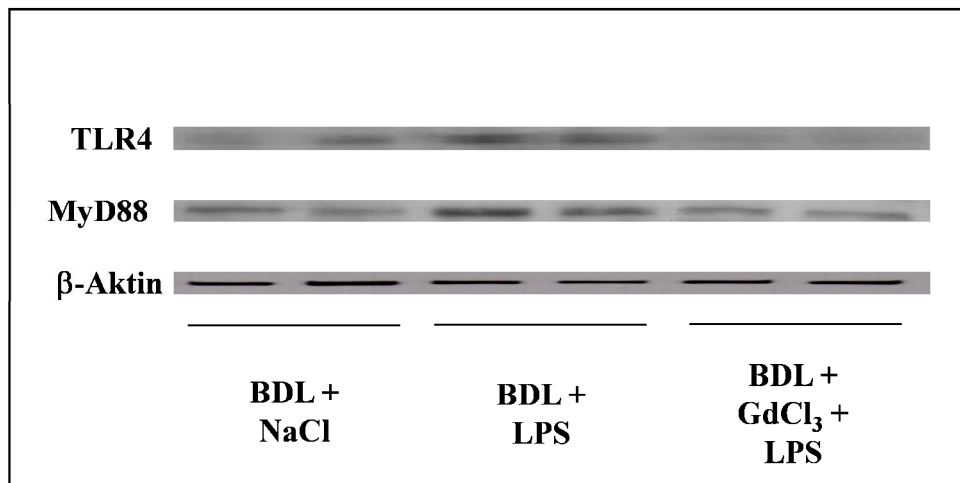


Abb. 13: Anstieg der Expression von TLR4 und MyD88 nach Vorbehandlung mit LPS. Die Proteinexpression (mittels Western Blot) von TLR4 und MyD88 war bei BDL Ratten mit intraperitonealer LPS Vorbehandlung (1 mg/kg KG für 3 h, n=5) im Vergleich zu BDL Tieren aus der Kontrollgruppe (Vorbehandlung mit NaCl 0,9%, 1 mg/kg KG, n=5) erhöht. Die erhöhte Expression bei BDL Tieren mit LPS Vorbehandlung wurde durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit GdCl₃ (10 mg/kg KG, 24 und 48 h vor Beginn des Experiments, n=5) zur Blockade der KCs abgeschwächt. β-Aktin wurde als unabhängige Kontrolle verwendet.

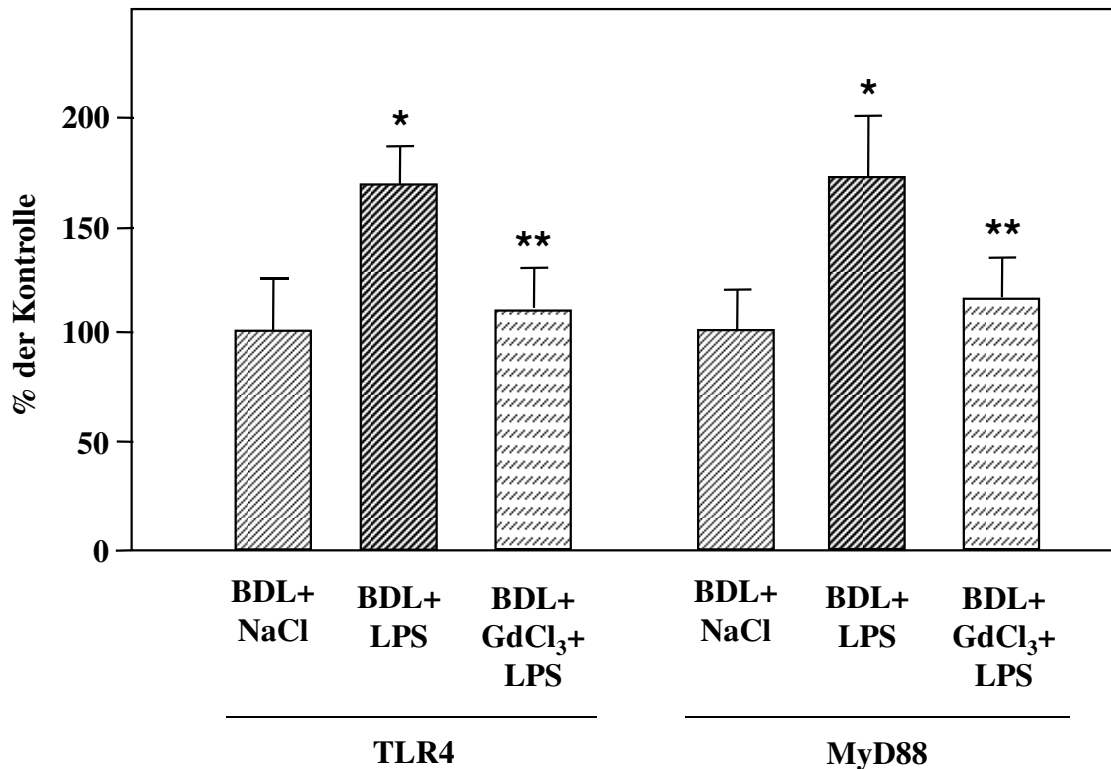


Abb. 14: Anstieg der Expression von TLR4 und MyD88 nach Vorbehandlung mit LPS. Die Ergebnisse des Western Blot wurden durch quantitative Analysen mit dem Programm ImageJ (NIH, USA) bestätigt.

5.3 Erhöhte Produktion von Vasokonstriktoren und ihre funktionelle Relevanz

Der Zymosan induzierte Anstieg des portalen Perfusionsdruckes war mit einer Zymosan induzierten vermehrten Produktion der Vasokonstriktoren Thromboxan B₂ und Cysteinyl-Leukotrienen vergesellschaftet. TXB₂ ist das stabile Abbauprodukt des sich sehr schnell abbauenden TXA₂. Der Anstieg einer vermehrten Ausschüttung von Vasokonstriktoren in der BDL Gruppe war nur vorübergehend. In der Gruppe mit LPS Vorbehandlung konnte jedoch eine lang anhaltende Erhöhung der Ausschüttung von Vasokonstriktoren beider Gruppen (TXB₂ und LTC₄/D₄) beobachtet werden. Die initialen und maximalen Werte von TXB₂ und Cys-LTs, die im effluenten Perfusat gemessen wurden, konnten durch eine LPS Vorbehandlung erhöht werden.

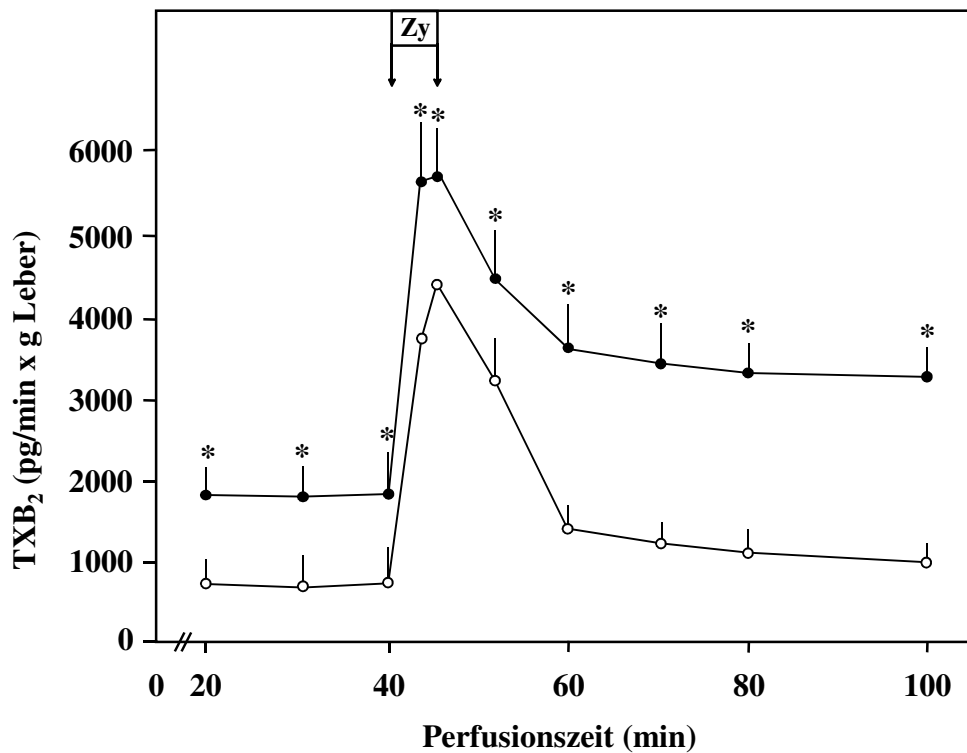


Abb. 15: Erhöhte Produktion von TXB₂ nach intraperitonealer Vorbehandlung mit LPS bei Leberfibrose. Der Anstieg des portalen Perfusionsdruckes bei BDL Ratten nach Gabe von Zymosan (○, Zy, 150 µg/ml, Minute 40-46, n=5) wurde von einer vermehrten Produktion von TXB₂, dem stabilen Abbauprodukt von TXA₂, begleitet. Zusätzlich zu der durch Aktivierung der Kupfferzellen mittels Zymosan (150 µg/ml, Minute 40-46, p<0,05) ausgelösten Ausschüttung von TXB₂ wurde die TX Produktion durch eine Vorbehandlung mit LPS (●, 1 mg/kg KG für 3 h, n=5) nochmals gesteigert.

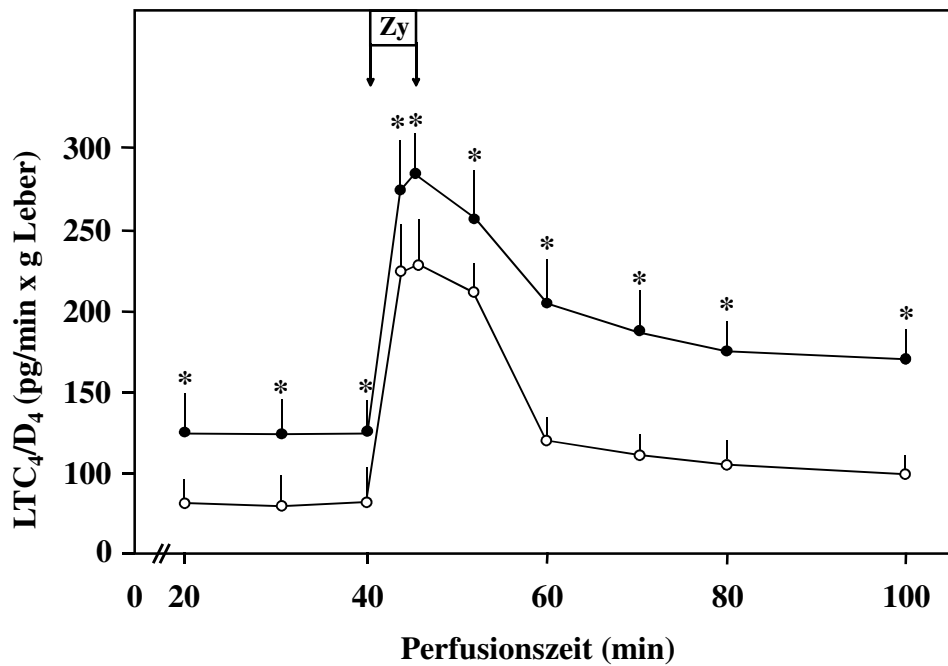


Abb. 16: Erhöhte Produktion von Leukotrien C₄/D₄ nach intraperitonealer Vorbehandlung mit LPS bei Leberfibrose. Der Anstieg des portalen Perfusionsdruckes bei BDL Ratten nach Gabe von Zymosan (○, Zy, 150 µg/ml, Minute 40-46, n=5) wurde von einer vermehrten Produktion von Cysteinyl-Leukotrienen begleitet. Zusätzlich zu der durch Aktivierung der Kupferzellen mittels Zymosan (150 µg/ml, Minute 40-46, p<0,05) ausgelösten Ausschüttung, wurde die LTC₄/D₄ Produktion durch eine Vorbehandlung mit LPS (●, 1 mg/kg KG für 3 h, n=5) nochmals gesteigert.

Die funktionelle Relevanz der Ausschüttung dieser Vasokonstriktoren wurde durch die Gabe des LT Rezeptorantagonisten Ly171883, des LT Synthaseinhibitors MK-886 und des TX Rezeptorantagonisten BM 13.177 untersucht. Die Blockade des LT Rezeptors schwächte sowohl den durch Zymosan ausgelösten maximalen schnellen, als auch den lang anhaltenden Anstieg des portalen Perfusionsdruckes deutlich ab. Das gleiche Ergebnis wurde durch Gabe des TX Rezeptorantagonisten BM 13.177 erreicht. Der lang anhaltende und auch der maximale, durch Zymosan induzierte, Pfortaderdruckanstieg konnten durch eine zusätzliche Infusion von BM 13.177 gesenkt werden. Die intraperitoneale Vorbehandlung über 3,5 Stunden mit dem LT Synthaseinhibitor MK-886 führte zu einer Absenkung des basalen, maximalen und lang anhaltenden Anstiegs des portalen Perfusionsdruckes.

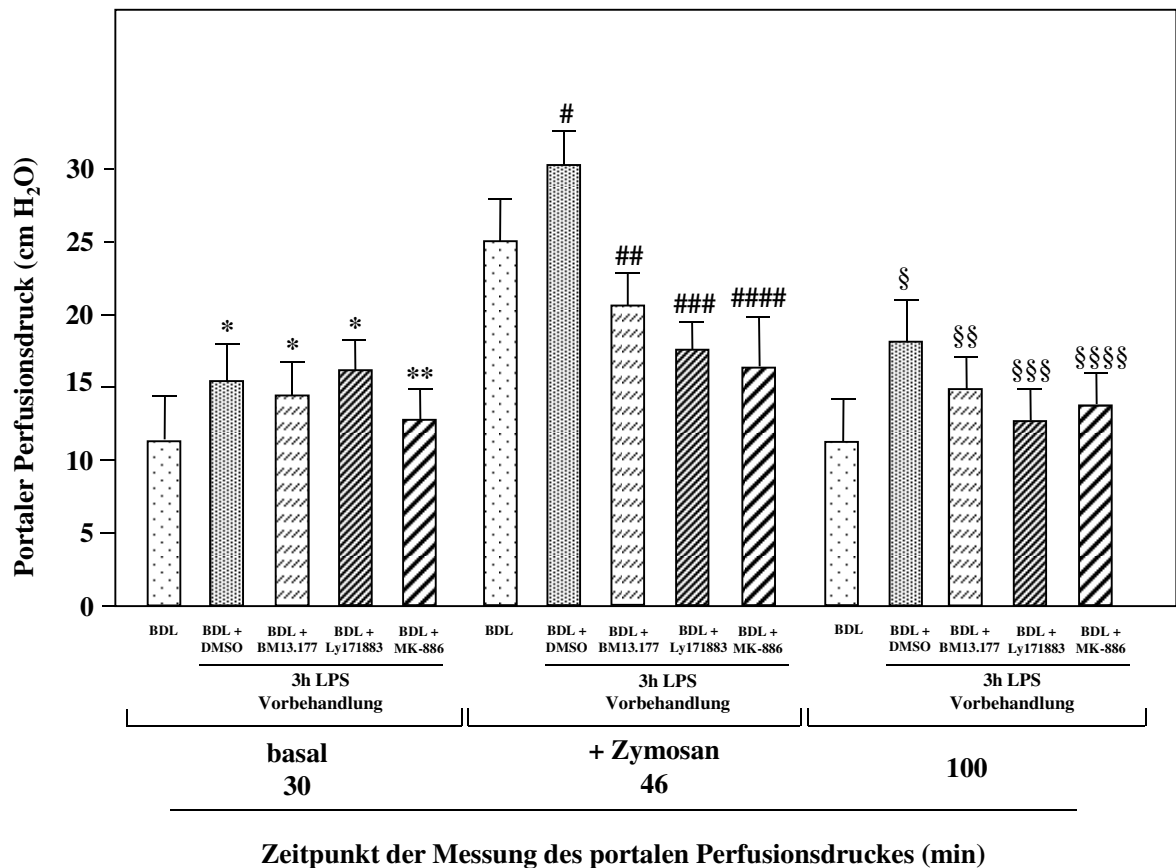


Abb. 17: Funktionelle Rolle der Vasokonstriktoren. Durch Kupferzellaktivierung mittels Zymosan (150 µg/ml, Minute 40-46, n=5) erhöhte sich bei BDL Tieren der portale Perfusionsdruck. Die intraperitoneale Gabe von LPS (1 mg/kg KG für 3 h, n=5) erhöhte den basalen, maximalen und lang anhaltenden portalen Perfusionsdruck (*p<0,05, #p<0,05, §p<0,05). Im gleichen Versuchsaufbau führte die zusätzliche Infusion des LT C₄/D₄ Rezeptorantagonisten Ly171883 (20 µM, Minute 30-60, n=5) oder des TXA₂ Rezeptorantagonisten BM 13.177 (20 µM, Minute 30-60, n=5) zu einer Absenkung des akuten (##p<0,05, ###p<0,05) und lang anhaltenden (§§p<0,05, §§§p<0,05) Anstiegs des portalen Perfusionsdruckes. Die Gabe des LT Synthaseinhibitors MK-886 (0,6 mg/kg KG intraperitoneal, 30 Minuten vor der LPS Gabe) verringerte den basalen (**p<0,05), den maximalen (####p<0,05) und den lang anhaltenden (§§§§p<0,05) Anstieg des portalen Perfusionsdruckes.

5.4 Unveränderte Empfindlichkeit auf Vasokonstriktoren nach LPS Vorbehandlung

Im Gegensatz zu der Produktion der Vasokonstriktoren, die sich durch LPS erhöhen ließ, wurde die Empfindlichkeit auf Vasokonstriktoren durch eine LPS Vorbehandlung für 3 Stunden nicht beeinflusst.

Die Infusion des TX Analogons U46619 führte zu einem vorübergehenden Anstieg des portalen Perfusionsdruckes bei BDL Ratten. Weder der maximale noch der lang anhaltende portale Perfusionsdruck wurde durch die Vorbehandlung mit LPS beeinflusst.

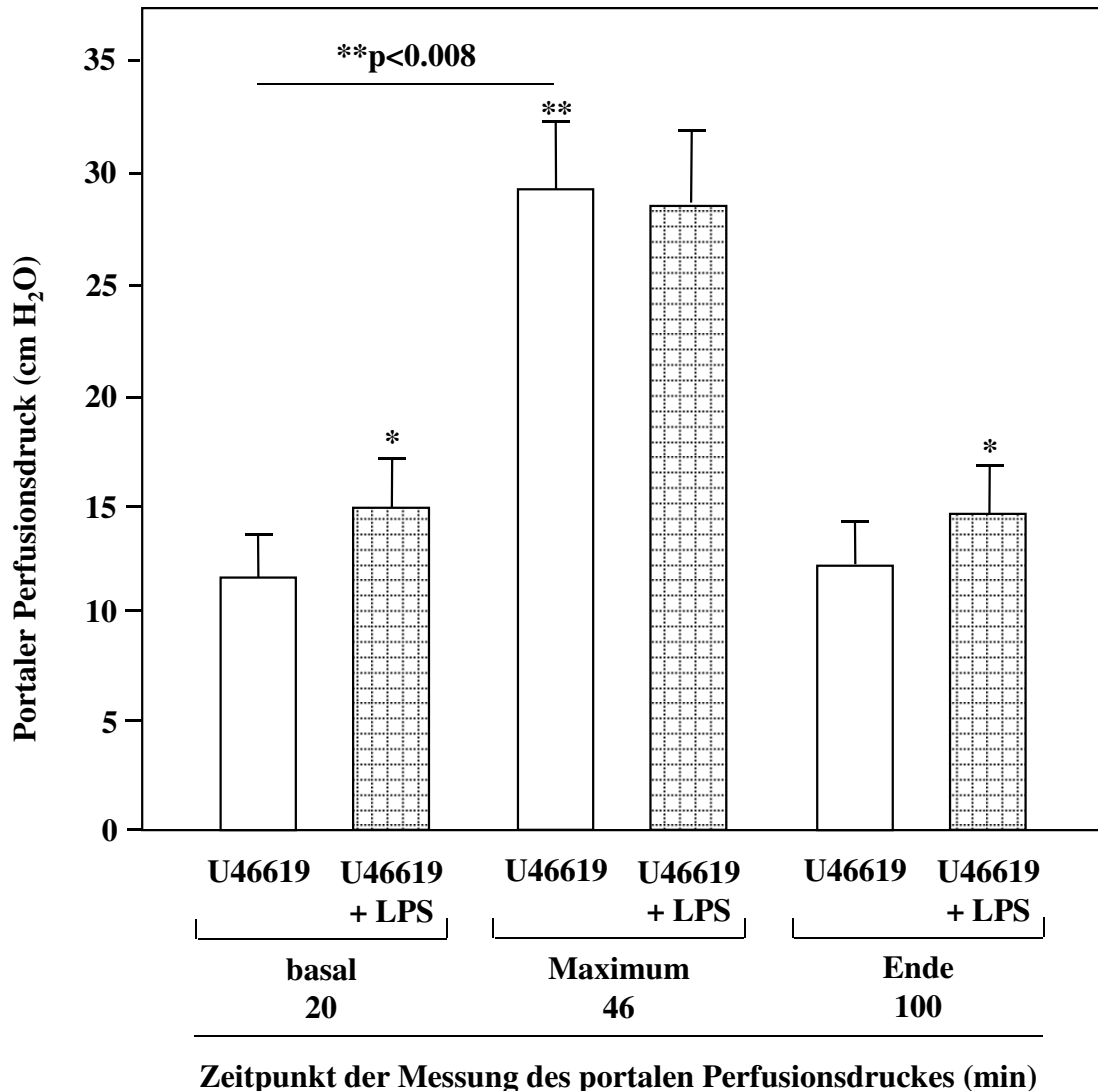


Abb. 18: LPS intraperitoneal hat keinen Einfluss auf die vasokonstriktorische Antwort. Die Infusion des TX Analogons U46619 (0,1 μ M, Minute 40-46, n=5) erhöhte den portalen Perfusionsdruck (**p<0,008) bei Tieren mit biliärer Fibrose. Dieser Druckanstieg wurde durch eine intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS (1 mg/kg KG für 3 h, n=5) nicht weiter erhöht.

Wie bei der Gabe von U46619, führte auch die Infusion von LTC₄ zu einer transienten Erhöhung des Pfortaderdruckes. Der maximale Perfusionsdruck nach Gabe von LTC₄ war etwas niedriger als nach der Infusion von U46619. Abermals wurde weder der maximale

noch der lang anhaltende portale Perfusionsdruckanstieg, der durch LTC₄ ausgelöst wurde, durch die Vorbehandlung mit LPS beeinflusst.

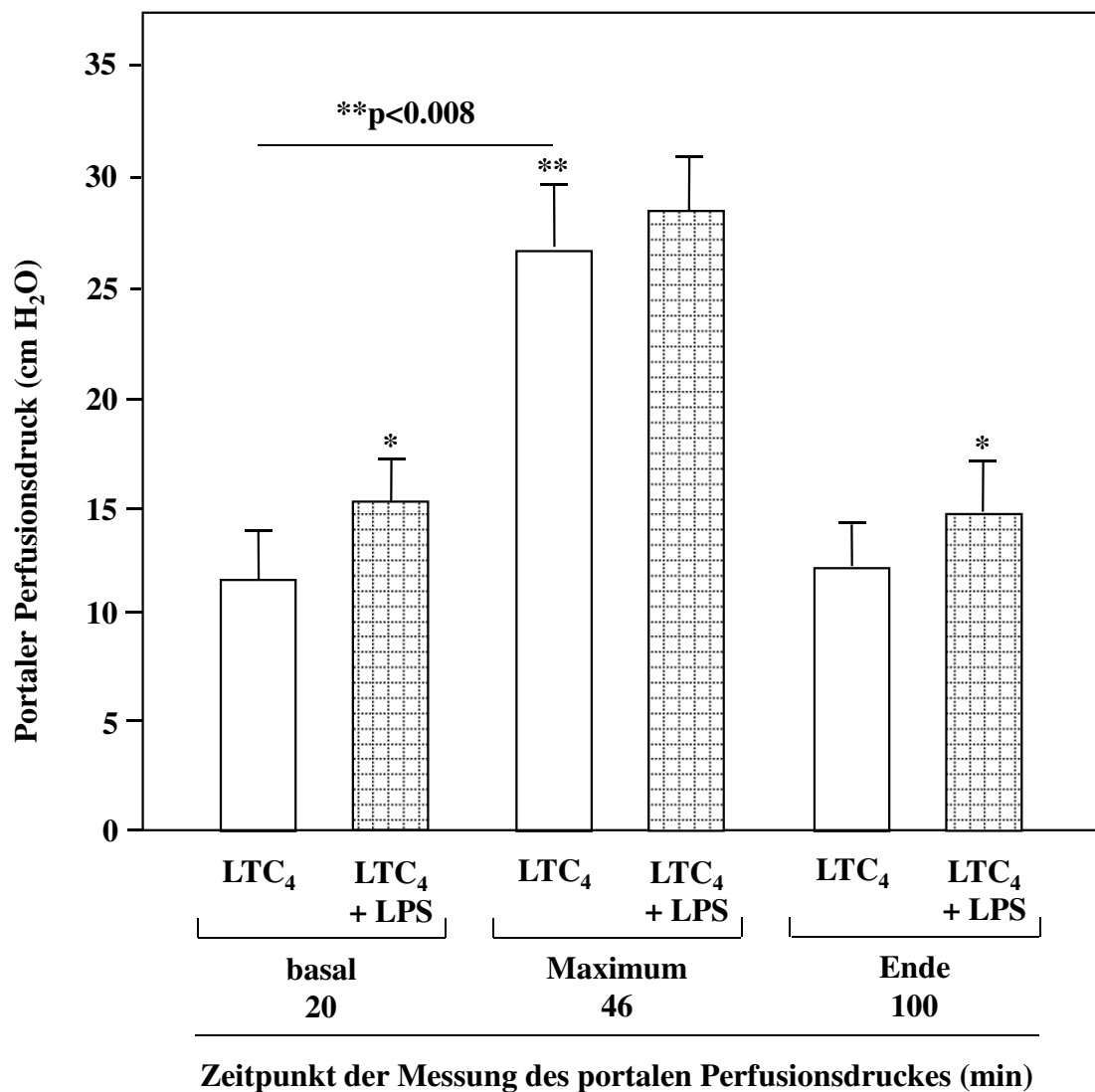


Abb. 19: LPS intraperitoneal hat keinen Einfluss auf die vasokonstriktorische Antwort. Die Gabe von LTC₄ (20 nM, Minute 40-46, n=5) führte zur einer Erhöhung des portalen Perfusionsdruckes (**p < 0,008). Eine intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS (1 mg/kg KG für 3 h, n=5) änderte den Anstieg des portalen Perfusionsdruckes nicht.

5.5 Effekte von LPS auf den Pfortaderdruck in vivo

Die Ergebnisse aus der isolierten Leberperfusion wurden durch in vivo Experimente bestätigt. Der Druck in der Pfortader war in der BDL Gruppe mit LPS Vorbehandlung höher als in der BDL Gruppe ohne LPS Vorbehandlung. Die intraportale Gabe von Zymosan oder LPS während des Experiments erhöhte den portalen Pefusionsdruck. Die

absolute Spanne des Druckanstieges nach Zymosan oder LPS Infusion war vergleichbar, sowohl in der Gruppe ohne, als auch in der Gruppe mit LPS Vorbehandlung. Allerdings war der absolute Wert des maximalen portalen Perfusionsdruckes in der Gruppe mit LPS Vorbehandlung höher als in der Gruppe ohne LPS Vorbehandlung. Auch der lang anhaltende durch Zymosan oder LPS ausgelöste Anstieg des Pfortaderdruckes wurde durch eine intraperitoneale LPS Vorbehandlung vor der intraportalen Gabe von Zymosan oder LPS signifikant erhöht. Der mittlere arterielle Druck (MAP) sank durch die intraperitoneale LPS Vorbehandlung leicht, aber nicht signifikant, ab. Die zusätzliche intraportale LPS Gabe während des Experimentes beeinflusste den mittleren arteriellen Druck nicht, wohingegen die intraportale Infusion von Zymosan den MAP erniedrigte.

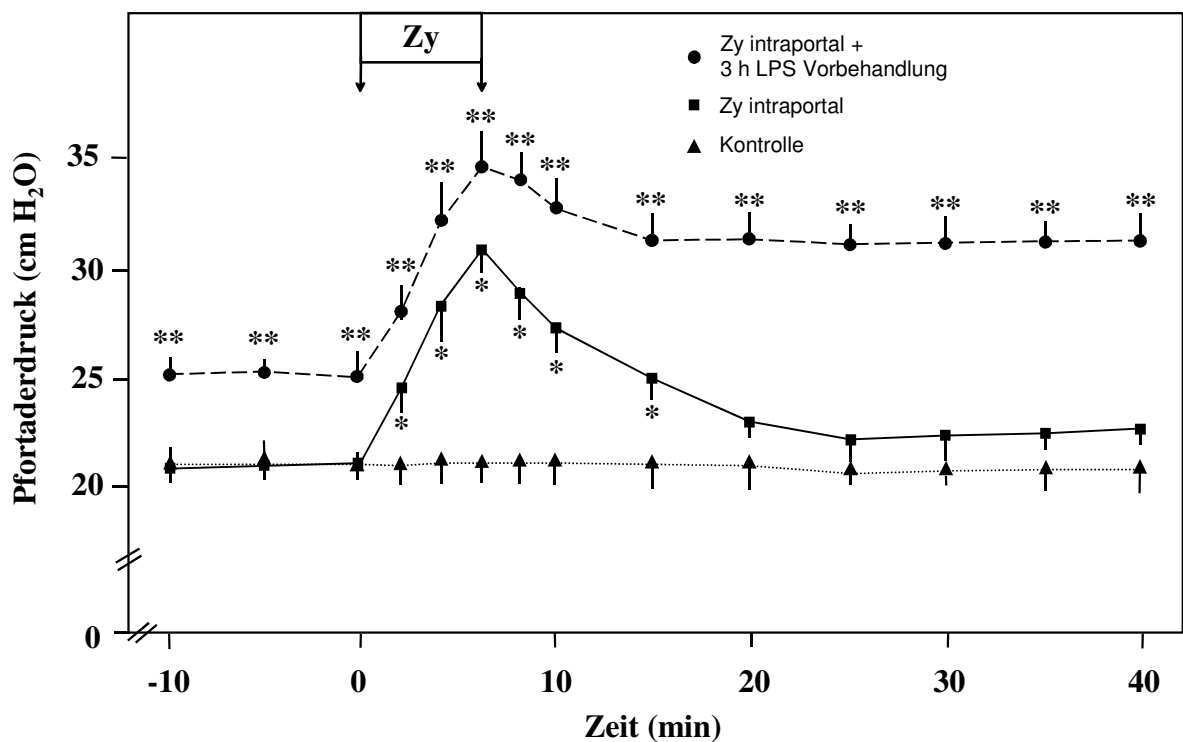


Abb. 20: *In vivo* Effekt von LPS intraperitoneal für 3 h und einer zusätzlichen intraportalen Zymosan Gabe. LPS intraperitoneal (●, 1 mg/kg KG für 3 h, n=5, **p<0,05) verlängerte im *in vivo* Versuch den transienten Anstieg des Pfortaderdruckes zu einem lang anhaltenden Druckanstieg nach intraportaler Infusion von Zymosan (■, 3,2 mg/min, Minute 0-6, n=7, *p<0,05). Kontrollexperimente mit einer Stabilisierungszeit von 10 Minuten und einer anschließenden Beobachtungsperiode von 40 Minuten zeigte keine Veränderung des portalen Druckes (▲, n=4).

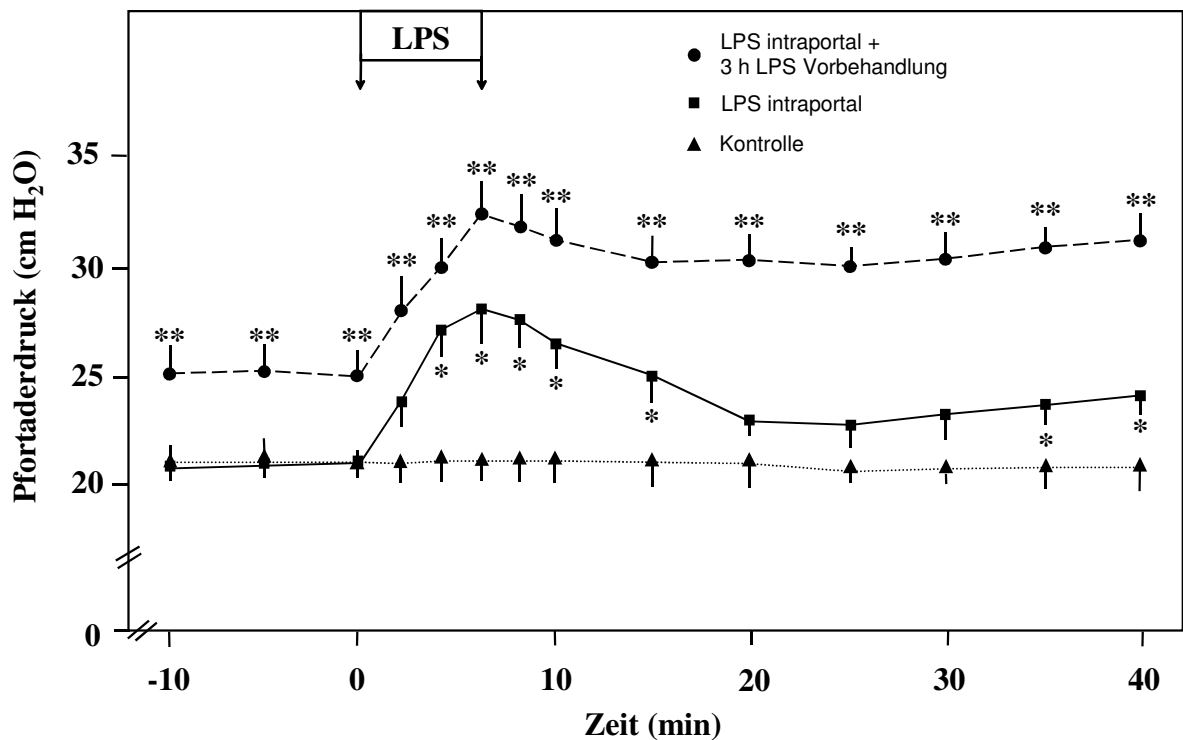


Abb. 21: *In vivo* Effekt von LPS intraperitoneal für 3 h und einer zusätzlichen intraportalen LPS Gabe. Anschließend an die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS (1 mg/kg KG für 3 h) wurde bei fibrotischen Lebern in *in vivo* Experimenten zusätzlich LPS über die Pfortader infundiert (●, **p<0,05, n=5). Im Vergleich zu den Experimenten ohne LPS Vorbehandlung (■, n=5) waren der basale und der maximale Pfortaderdruck aber auch der Pfortaderdruck am Ende der Beobachtungsperiode von 40 Minuten erhöht. Die intraportale LPS Infusion alleine (■, *p<0,05, n=5) führte zu einer akuten Druckerhöhung und zu einem Anstieg des Pfortaderdruckes am Ende der Beobachtungszeit von 40 Minuten.

5.6 Effekte der Behandlung mit Montelukast auf portale Hypertonie bei BDL und TAA Ratten *in vivo*

Sowohl TXA₂ als auch LTC₄ scheinen eine wichtige Rolle bei portaler Hypertonie durch intrahepatische Vasokonstriktion zu spielen. Die Behandlungsoptionen mit einem TXA₂ Rezeptorantagonisten bei Patienten mit Leberzirrhose sind wegen seiner starken Wirkung auf die Blutgerinnung limitiert. Im Gegensatz dazu könnte die Gabe des Leukotrienrezeptorantagonisten Montelukast, welcher sich schon in der Asthmatherapie bewährt hat, eine vielversprechende Therapieoption bei Patienten mit Leberzirrhose darstellen. Deswegen wurde die Wirksamkeit von Montelukast untersucht, den Pfortaderdruck im *in vivo* Modell zu senken. Dieses wurde an zwei unterschiedlichen Zirrhosemodellen der Ratte durchgeführt, dem BDL und dem TAA Modell. Eine

intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS wurde bei dieser Versuchsreihe nicht durchgeführt.

5.6.1 Effekte von Montelukast auf Histologie und Serumparameter

Die EvG Färbung der Rattenlebern zeigte Zeichen einer typischen biliären Fibrose nach Gallengangsligatur (BDL) und nach TAA Gabe war histologisch eine schwere Zirrhose zu erkennen.

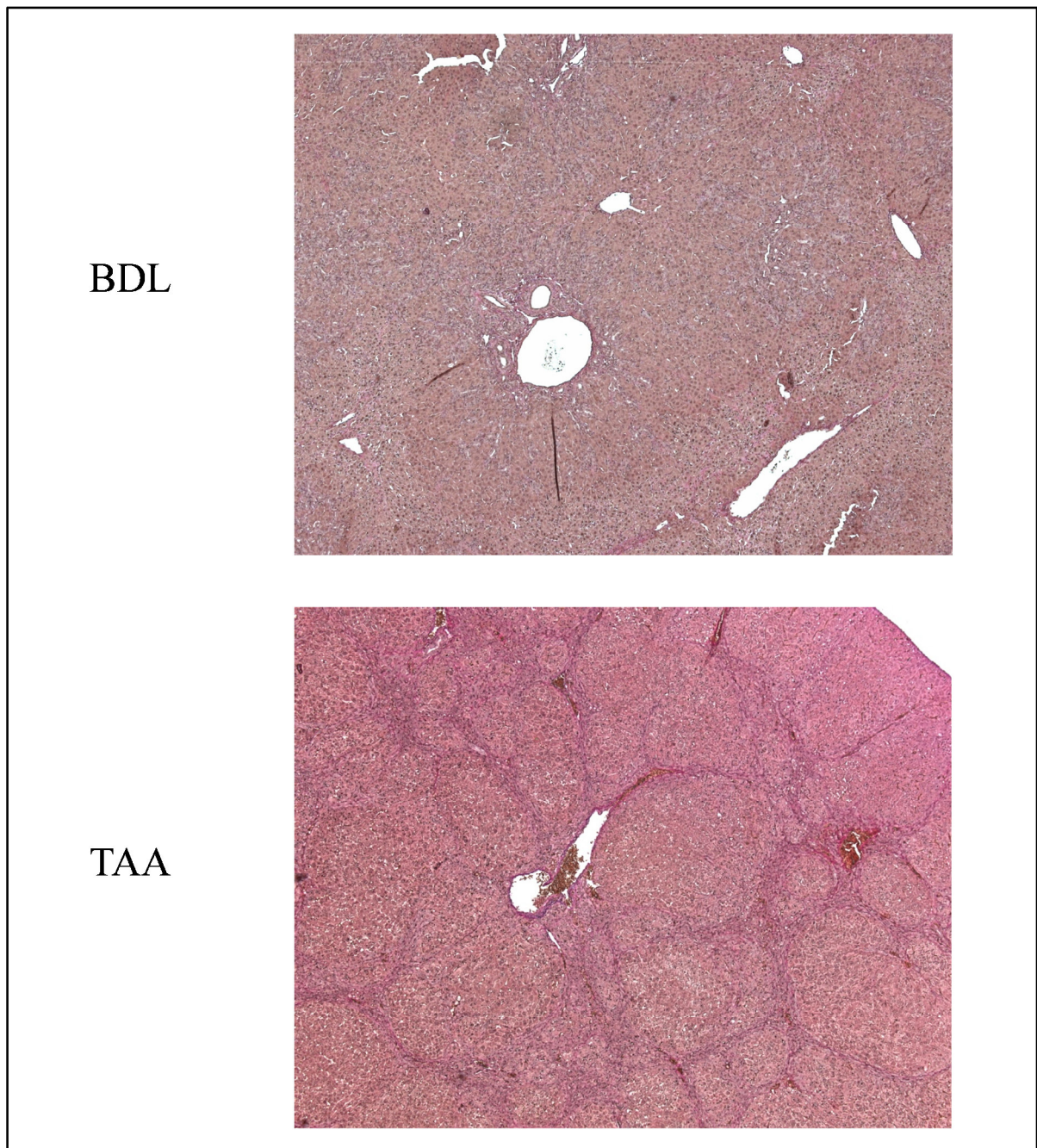


Abb. 22: **Histologische Analyse der Rattenlebern vier Wochen nach Gallengangsligatur und nach 18-wöchiger TAA Behandlung.** In der EvG Färbung zeigte sich bei BDL Tieren das typische Bild eine biliären Fibrose. Nach Behandlung mit TAA über 18 Wochen zeigten sich histologisch die Charakteristika einer schweren Zirrhose.

Die Tiere bekamen entweder eine Kontrolldiät (C1000) oder ein Futtermischung aus C1000 und Montelukast. Die Leber- und Nierenfunktion wurde in allen Behandlungsgruppen durch Serumanalysen am Ende der Experimente kontrolliert. Natrium, Kalium, Kreatinin, Bilirubin, Alaninaminotransferase (ALT), Aspartataminotransferase (AST), alkalische Phosphatase und γ -GT Werte und der Fibrosegrad wurden durch eine Behandlung mit Montelukast nicht beeinflusst (BDL-C1000 versus BDL-C1000/Montelukast, TAA-C1000 versus TAA-C1000/Montelukast).

	BDL + C1000	BDL + C1000/Montelukast	TAA + C1000	TAA + C1000/Montelukast
Natrium (mmol/l)	142 ± 4	137 ± 6	141 ± 5	139 ± 3
Kalium (mmol/l)	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,8	4,0 ± 0,9	4,0 ± 0,5
Kreatinin (mg/dl)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Bilirubin (mg/dl)	8,2 ± 1,3*	7,6 ± 1,7*	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,3
AST (U/l)	545 ± 36**	498 ± 39**	157 ± 13**	143 ± 17**
ALT (U/l)	134 ± 29**	138 ± 24**	142 ± 21**	145 ± 14**
γGT (U/l)	31 ± 5,2	32 ± 4,3	18 ± 3,5	17 ± 2,7
aP (U/l)	650 ± 23**	672 ± 40**	712 ± 40**	634 ± 40**

Tab. 3: **Serumparameter.** Gallengansligierte Tiere (BDL, 4 Wochen) und Tiere mit Thioacetamidbehandlung (TAA, 18 Wochen) erhielten die Kontrolldiät C1000 oder C1000 gemischt mit Montelukast, um Leukotrienrezeptoren zu blockieren. Bilirubin war nur bei BDL Tieren erhöht (*), nicht bei TAA Ratten. Die Werte AST, ALT und aP waren bei allen Tieren mit Zirrhose erhöht (**). Die Behandlung mit Montelukast veränderte die Serumparameter weder in der einen, noch in der anderen Zirrhosegruppe.

Die Expression des Cys-LT₁ Rezeptors in der Western Blot Analyse war bei BDL und TAA Tieren erhöht.

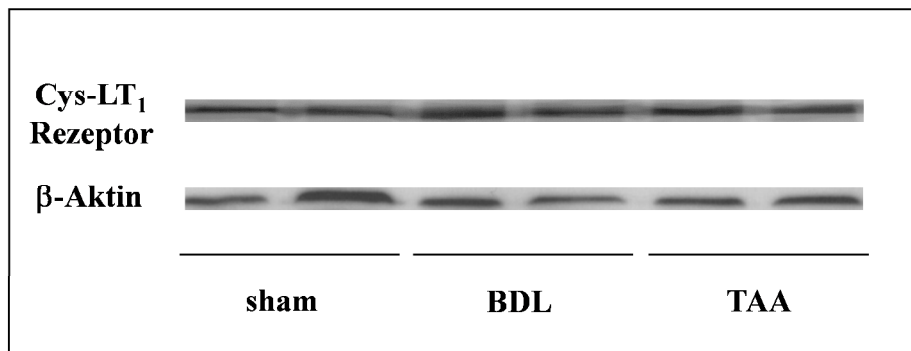


Abb. 23: Die Expression des Cys-LT₁ Rezeptors wurde mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich eine erhöhte Expression bei BDL und TAA Tieren im Vergleich zu sham-operierten Tieren.

5.6.2 Effekt von Montelukast auf portale Hypertonie

Die Behandlung mit Montelukast für 10 Tage erniedrigte den basalen Pfortaderdruck in beiden Tiermodellen der Zirrhose. Der Pfortaderdruck stieg in beiden Zirrhosemodellen nach der Gabe von β-Glukan-reichem Zymosan oder LPS stark an. Der absolute Anstieg des Pfortaderdruckes und folglich auch der maximale Druck in der Pfortader wurde sowohl in der BDL als auch in der TAA Gruppe durch die Gabe von Montelukast gesenkt.

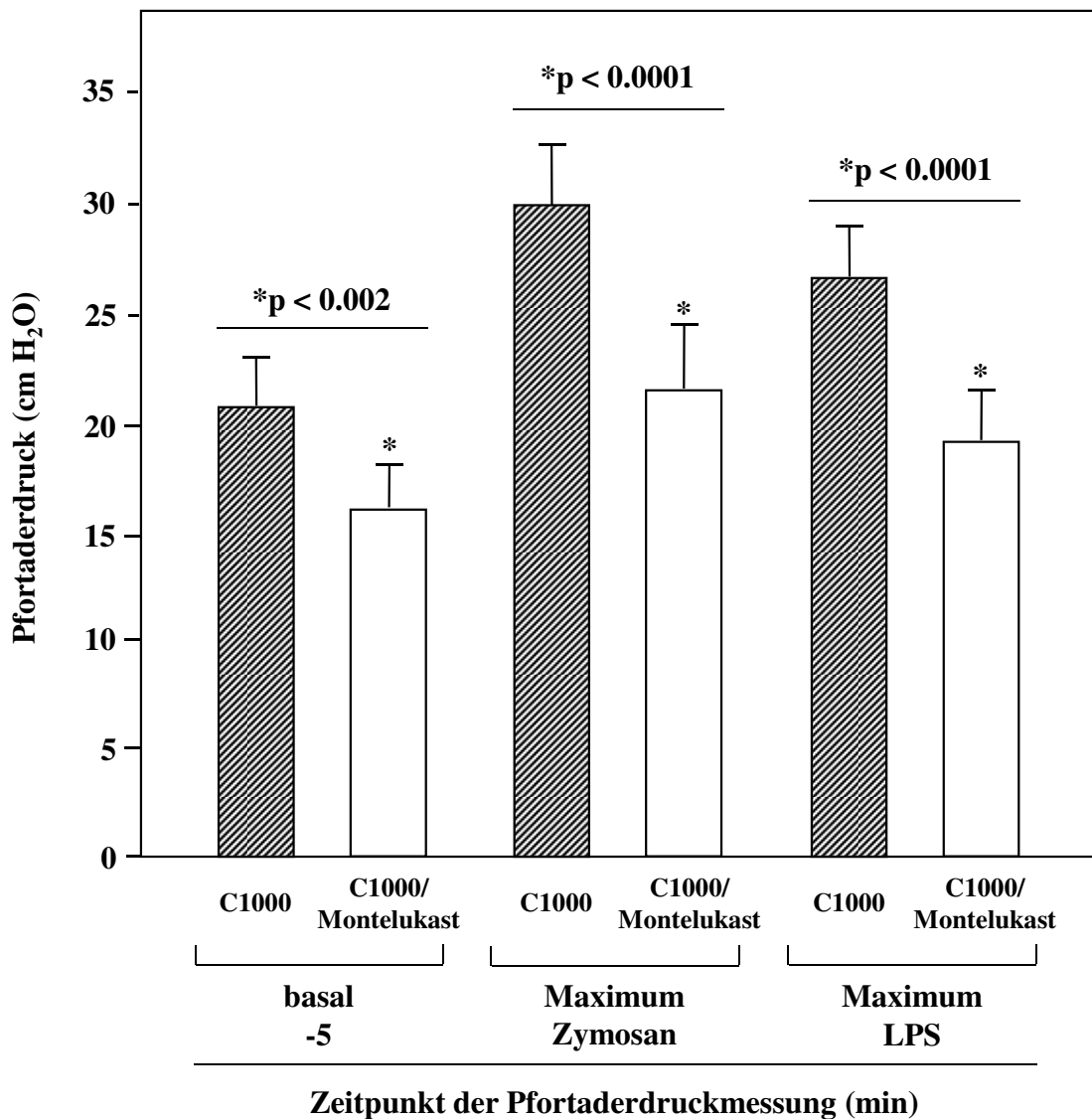


Abb. 24: Die Behandlung mit Montelukast beim BDL Tiermodell erniedrigte den basalen Pfortaderdruck und schwächte den Kupfferzellvermittelten Anstieg des Pfortaderdruckes ab. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Bei den Ratten wurde eine Gallengangsligatur 28 Tage vor dem Experiment durchgeführt. Die erste Gruppe bekam eine Kontrolldiät mit dem Futter C1000, gefolgt von einer Infusion entweder mit gelöstem NaCl 0,9 % (n=5), mit Zymosan (n=7) oder LPS (n=7). Die zweite Gruppe erhielt das Kontrollfutter C1000, welches von Tag 18 bis 28 Montelukast (durchschnittlich 0,125 mg/kg KG pro Tag) enthielt. Diese orale Behandlung erniedrigte den basalen Pfortaderdruck, den absoluten Anstieg des Pfortaderdruckes und den maximalen Pfortaderdruck nach KC Aktivierung mittels Zymosan, (intraportal 3,2 mg/min, Minute 0 bis 6, maximaler gemessener Pfortaderdruck in Minute 6, n=5) oder LPS intraportal (4 mg/kg KG, 100 μ l/min, Minute 0 bis 6, maximal gemessener Pfortaderdruck in Minute 6, n=5).

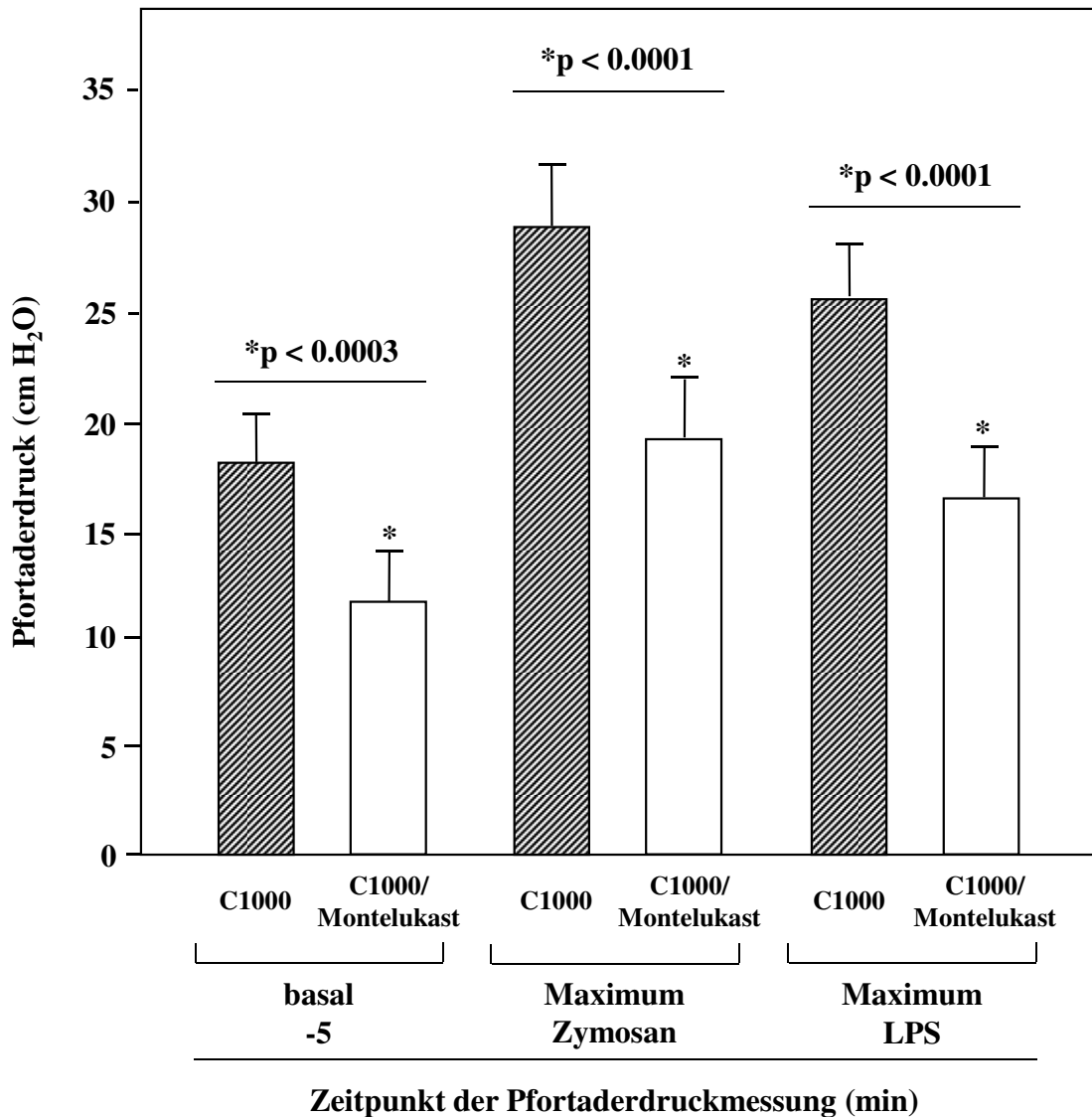


Abb. 25: Die Behandlung mit Montelukast beim TAA Tiermodell erniedrigte den basalen Pfortaderdruck und schwächte den Kupferzellvermittelten Anstieg des Pfortaderdruckes ab. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. TAA wurde mit dem Trinkwasser für 126 Tage verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde mit dem Futter C1000 gefüttert. Während des Experiments wurde entweder gelöstes NaCl 0,9% (n=5), Zymosan (n=5), oder LPS (n=5) infundiert. Die andere Gruppe bekam das Kontrollfutter C1000, das von Tag 116 bis 126 Montelukast enthielt. Die Behandlung mit Montelukast erniedrigte den basalen Pfortaderdruck, den absoluten Anstieg des Druckes und den maximalen Pfortaderdruck nach KC Aktivierung mittels Zymosan (n=7) oder LPS (n=7).

	C1000	C1000 + Montelukast
BDL-Zymosan	9,2 ± 1,7 cm H₂O	5,3 ± 1,4* cm H₂O
BDL-LPS	5,4 ± 1,2 cm H₂O	3,1 ± 1,1* cm H₂O
TAA-Zymosan	10,3 ± 1,8 cm H₂O	7,3 ± 1,4* cm H₂O
TAA-LPS	7,1 ± 1,7 cm H₂O	4,1 ± 1,9* cm H₂O

Tab. 4: Wirkung von Montelukast auf den Pfortaderdruck. Die Behandlung mit Montelukast für 10 Tage senkte den absoluten Anstieg des Pfortaderdruckes (Differenz $p_{\max} - p_{\min}$) sowohl bei BDL als auch bei TAA Tieren signifikant (* $p < 0,05$).

Montelukast senkte der Pfortaderdruck, allerdings wurde der mittlere arterielle Druck von einer Behandlung mit Montelukast nicht beeinflusst. Die Aktivierung von Kupfferzellen mittels Zymosan erniedrigte den MAP in beiden Zirrhosemodellen, sowohl in der Gruppe mit C1000 Kontrolldiät, als auch in der Gruppe, die mit C1000/Montelukast gefüttert wurde.

Mittlerer arterieller Druck (mmHg)	Minute 5	Minute 6	Minute 40
<u>BDL</u>			
C1000 + Zymosan	116 ± 14	107 ± 12	82 ± 9*
C1000/Montelukast + Zymosan	112 ± 12	108 ± 10	97 ± 8*
C1000 + LPS	110 ± 12	112 ± 7	115 ± 7
C1000/Montelukast + LPS	114 ± 11	115 ± 12	117 ± 15
<u>TAA</u>			
C1000 + Zymosan	110 ± 14	93 ± 12	75 ± 9*
C1000/Montelukast + Zymosan	112 ± 12	90 ± 9	83 ± 11*
C1000 + LPS	109 ± 14	110 ± 12	112 ± 12
C1000/Montelukast + LPS	112 ± 15	114 ± 8	111 ± 14

Tab. 5: Mittlerer systemischer arterieller Druck. In vivo Messung des MAP bei gallengangsligierten Tieren (BDL, 4 Wochen) und TAA behandelten Tieren (TAA, 18 Wochen), die mit einer Kontrolldiät C1000 mit oder ohne Zugabe des CysLT₁ Rezeptorantagonisten Montelukast gefüttert wurden. Der mittlere systemische arterielle Druck sank nur bei den Tieren ab, die zusätzlich mit Zymosan behandelt wurden (* $p < 0,05$)

6 Diskussion

Ziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente war es, die Auswirkungen einer intraperitonealen Vorbehandlung mit LPS auf den Pfortaderdruck und die damit in Verbindung stehenden Kupfferzell-abhängigen Mechanismen zu untersuchen. Außerdem sollte die Rolle der beteiligten Vasokonstriktoren evaluiert werden, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden. Mit der Gabe des Leukotrienrezeptorantagonisten Montelukast wurde eine mögliche neue Therapieoption für Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertension in zwei unterschiedlichen Rattenmodellen der Zirrhose untersucht.

Die verwendeten Versuchsanordnungen dieser Arbeit lieferten folgende Ergebnisse:

Teil I:

- 1) Die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS für 3 h bei BDL Tieren erhöhte den basalen Pfortaderdruck und verlängerte den Pfortaderdruckanstieg, der durch eine zweite Gabe von LPS oder Zymosan ausgelöst wurde, von einem vorübergehenden zu einem lang anhaltenden Druckanstieg.
- 2) Nach der Vorbehandlung mit LPS war die Expression von TLR4 und dem Adapterprotein MyD88 in der Leber erhöht und es kam zu einer verstärkten Ausschüttung der Vasokonstriktoren TX und LT.
- 3) Im Gegensatz dazu verändert eine LPS Vorbehandlung die Ansprechbarkeit auf TX oder LT nicht.

Teil II:

- 1) Die Behandlung mit Montelukast verringerte die portale Hypertonie in zwei verschiedenen Rattenmodellen der Zirrhose und verhinderte den kupfferzell-abhängigen Anstieg des Pfortaderdruckes.

Diese Ergebnisse wurden zunächst im Rahmen des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber erarbeitet. Um die Bedeutung dieser Daten am Gesamtorganismus zu überprüfen, wurden danach *in vivo*-Experimente durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden sham-operierte Tiere und gallengansligierte Tiere (BDL) verwendet. Für die Montelukast Experimente wurden als zweites Modell der Zirrhose TAA Tiere eingesetzt.

Als Kriterien für das Vorliegen einer Zirrhose dienten die Serumparameter aP, γ GT, Bilirubin, AST (GOT) und ALT (GPT), Aszitesbildung, charakteristische Veränderung der Histologie der Leber und erhöhter Portaldruck *in vivo*.

6.1 Effekte der Vorbehandlung mit LPS auf den portalen Druck

Die initialen Experimente zeigten, dass der basale portale Perfusionsdruck *in situ* und der Pfortaderdruck *in vivo* bei BDL Ratten höher war, als bei sham-operierten Tieren. Die intraperitoneale Gabe von LPS für 3 Stunden erhöhte den Anstieg des basalen Pfortaderdruckes noch weiter. Außerdem führte die LPS Vorbehandlung zusätzlich zu einer Erweiterung des vorübergehenden Druckanstieges durch Gabe von Zymosan oder LPS zu einem lang anhaltenden Druckanstieg. Diese Effekte konnten bei Tieren mit Fibrose 4 Wochen nach Gallengansligatur beobachtet werden. Die intraperitoneale Gabe von LPS hatte keinen Einfluss auf den portalen Perfusionsdruck bei sham-operierten Tieren.

Dieser experimentelle Ansatz könnte auch im klinischen Alltag eine große Rolle spielen. Es ist bekannt, dass Patienten mit Leberzirrhose auch häufig an einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) erkranken (Caly und Strauss, 1993). Um eine SBP zu simulieren, bekamen Ratten mit Leberzirrhose LPS intraperitoneal appliziert. Bei Ratten mit Leberzirrhose ist das Auftreten von bakterieller Translokation charakteristisch, die als pathophysiologischer Auslöser der SBP betrachtet wird (Neugebauer et al., 2008). Interessanterweise beeinflusste die intraperitoneale Gabe von bakteriellen Endotoxinen den portalen Druck und verstärkte zusätzlich die Antwort auf mikrobielle Komponenten, die die Leber über die Pfortader erreichten. Es sind verschiedene Wege vorstellbar, wie bakterielle Bestandteile als „second hit“ in die Pfortader gelangen. Zum einen könnten bakterielle Produkte als Konsequenz der SBP den systemischen Blutfluss erreichen und somit zur Leber gelangen. Zum anderen haben Patienten mit Leberzirrhose eine erhöhte Darmpermeabilität bei gleichzeitig erniedrigter Darmmotilität. Dies kann dazu führen, dass es zur bakteriellen Kontamination der Pfortader durch Translokation von Darmbakterien zu mesenterialen Lymphknoten kommt (Garcia-Tsao und Wiest, 2004). Zusätzlich haben Patienten mit Leberzirrhose ein beeinträchtigtes Immunsystem und es ist wahrscheinlich, dass sie deswegen häufiger an bakteriellen Infektionen leiden.

6.2 Kupfferzell-abhängige Effekte der intraperitonealen LPS Gabe

Die gleichzeitige Behandlung mit dem Kupfferzell-depletierenden Agens $GdCl_3$ reduzierte den basalen, maximalen und lang anhaltenden Anstieg des portalen Perfusionsdruckes, der durch eine Vorbehandlung mit LPS ausgelöst wurde. So deutet sich an, dass die durch eine LPS Vorbehandlung ausgelösten Effekte hauptsächlich Kupfferzell-vermittelt waren. $GdCl_3$ wurde schon in verschiedenen Studien verwendet, um Kupfferzellen zu blockieren (Krohn et al., 2009, Tejima et al., 2004). Der Kupfferzell-abhängige und lang anhaltende Anstieg des portalen Perfusionsdruckes im Anschluss an eine Vorbehandlung mit LPS stimmte mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein (Miller et al., 2007). In der früheren Studie führte eine Vorbehandlung mit LPS für sechs Stunden bei präfibrotischen Ratten mit einer Gallengangsligatur über eine Woche zu einem Anstieg des basalen, maximalen und lang anhaltenden portalen Perfusionsdruckes. In der vorliegenden Arbeit hatten die Ratten 4 Wochen nach Gallengangsligatur eine ausgeprägte Leberfibrose und das Ausmaß der portalen Hypertonie wurde sowohl *in situ* als auch *in vivo* ermittelt.

Außerdem wurde die zusätzliche intraportale Gabe von zwei unterschiedlichen mikrobiellen Produkten, Zymosan und LPS, untersucht. Dass die Antwort des portalen Druckes auf diese mikrobiellen Bestandteile nach der intraperitonealen Vorbehandlung mit LPS für 3 Stunden verstärkt war, lässt eine veränderte Reaktion der beteiligten Zellen als Konsequenz der LPS Vorbehandlung vermuten. Diese Hypothese wurde mittels Western Blot Analysen aus Leberhomogenisat überprüft. Die Proteinexpression von TLR4 und seinem Adapterprotein MyD88 war in früheren Studien bei BDL Tieren, im Vergleich zu sham-operierten Tieren, erhöht (Seki et al., 2007). Interessanterweise ließ sich in dieser Arbeit zeigen, dass eine Vorbehandlung mit LPS für 3 Stunden bei BDL Lebern zu einer weiteren Hochregulation von TLR4 und MyD88 führte. Dieser LPS induzierte Anstieg der Expression ließ sich durch eine Vorbehandlung mit $GdCl_3$ abschwächen.

In der Leber werden TLR4 und MyD88 auf Kupfferzellen, Sinusendothelzellen und hepatischen Sternzellen exprimiert (Bilzer et al., 2006, Uhrig et al., 2005, Guo et al., 2009). Kupfferzellen sind in großem Maße an der Produktion von Vasokonstriktoren in den kleinen intrahepatischen Blutgefäßen beteiligt, die nach Aktivierung von Kupfferzellen ausgeschüttet werden und zu einer Erhöhung des Pfortaderdruckes führen

(Steib et al., 2007, Xu et al., 2005). Die Effekte, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, scheinen vor allem Kupfferzell-abhängig zu sein, da es mit der Gabe von $GdCl_3$ gelang, die Expression von TLR4 und MyD88 nach LPS Vorbehandlung zu erniedrigen.

6.3 Produktion und Ansprechbarkeit von Vasokonstriktoren nach LPS Vorbehandlung

Die Zellen die durch intrahepatische Vasokonstriktoren am meisten beeinflusst werden, sind hepatische Sternzellen und Myofibroblasten (Zhou et al., 2006, Trebicka et al., 2010, Trebicka et al., 2007, Reynaert et al., 2002). Der Mechanismus der Kontraktion dieser Zellen kann in einen Ca^{2+} -abhängigen und einen Ca^{2+} -unabhängigen, Rho-Kinase abhängigen, Signalweg unterteilt werden. Es wurde gezeigt, dass beide Signalwege in der zirrhotischen Leber hochreguliert werden. Allerdings scheint der Ca^{2+} -unabhängige Rho-Kinase Signalweg von größerer Relevanz bei der zirrhotischen Leber zu sein (Laleman et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass es bei BDL Ratten zu einer Hochregulation von RhoA und Rho-Kinase kommt (Zhou et al., 2006). Dennoch wird in der Literatur weiterhin kontrovers darüber diskutiert, ob der Pfortaderdruckanstieg nach Thromboxan- und Cysteinyl-Leukotrienausschüttung durch den Ca^{2+} -abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus vermittelt wird (Steib et al., 2010, Titos et al., 2000, Reynaert et al., 2008).

Es wurde die Produktion von Vasokonstriktoren nach Vorbehandlung mit LPS untersucht. Außerdem wurde untersucht ob sich die Empfindlichkeit auf die Gabe von intrahepatischen Vasokonstriktoren durch eine Vorbehandlung mit LPS verändert. Nach den voran gegangenen Ergebnissen könnte man einen erhöhten Druckanstieg nach LPS Vorbehandlung erwarten. Eine Vorbehandlung mit LPS erhöhte die Produktion von zwei wichtigen Vasokonstriktoren: Thromboxan und Cysteinyl-Leukotrienen. Die erhöhte Produktion von Thromboxan nach LPS Vorbehandlung wurde schon früher beschrieben (Xu et al., 2005), wohingegen, soweit bekannt, die erhöhte Produktion von Leukotrienen nach LPS Vorbehandlung noch nicht beschrieben wurde. Der Effekt von Antagonisten des Leukotrien- und des Thromboxanrezeptors, sowie eines Leukotriensynthaseinhibitors auf den portalen Perfusionsdruck zeigte die funktionelle Relevanz der erhöhten Produktion von Vasokonstriktoren. Es kam zu einer deutlichen Abschwächung des Druckanstiegs in der Pfortader. Die große Bedeutung des Thromboxanrezeptors für die hepatische Mikrozirkulation wurde schon früher gezeigt (Steib et al., 2007, Katagiri et al., 2008). Wie

in der vorliegenden Arbeit dargestellt wird, könnten Cysteinylleukotriene und ihre Rezeptoren von ähnlicher Relevanz für die hepatische Mikrozirkulation sein, denn durch die Hemmung der Leukotriensynthese wurde der Anstieg des portalen Perfusionsdruckes erniedrigt. Im Gegensatz zu Thromboxanantagonisten haben Inhibitoren der Leukotriensynthese den Vorteil, dass sie keine nachteilige Wirkung auf die Blutgerinnung haben. Sie könnten deswegen eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit zusätzlich zu der frühen antibiotischen Therapie bei Patienten mit SBP darstellen.

Vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl die Infusion des Thromboxananalogs U46619 als auch die direkte Gabe von LTC₄, wie schon früher beschrieben (Titos et al., 2000), zu einem Anstieg des portalen Perfusionsdruckes führte. Interessanterweise wurde diese Antwort durch eine LPS Vorbehandlung bei BDL Ratten allerdings nicht beeinflusst. Soweit bekannt, ist dies bislang nicht untersucht worden.

6.4 Effekt der Behandlung mit dem Leukotrienrezeptorblocker Montelukast

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Annahme zu, dass es nach Aktivierung von KCs durch LPS zu einer Ausschüttung der Vasokonstriktoren Thromboxan und Cysteinylleukotrienen kommt und dies zu intrahepatischer Vasokonstriktion und zu einer Verstärkung der portalen Hypertension führt. Basierend auf diesen pathophysiologischen Erwägungen und der Tatsache, dass sich Thromboxanantagonisten wegen der Beeinflussung der Blutgerinnung nicht gut als therapeutische Option eignen, wurde in dieser Arbeit eine Therapie mit Montelukast an zwei verschiedenen Rattenmodellen der Leberzirrhose untersucht.

Montelukast wirkt als kompetitiver Inhibitor durch Bindung am CysLT₁ Rezeptor (Riccioni et al., 2007). Sowohl LTC₄ als auch LTD₄ binden an den Cys-LT₁ Rezeptor (Capra et al., 2006). Die Tagesdosis von Montelukast wurde in Anlehnung an die Standarddosis ermittelt, die man beim Menschen in der Asthmatherapie verwendet (10 mg/Tag für einen Mann mit ca. 80 kg/KG, folglich: 0,125 mg/kg KG pro Tag). Die Daten zeigten, dass die Expression des Cys-LT₁ Rezeptors bei BDL und TAA Leber hochreguliert wird. Dementsprechend führte eine Behandlung mit Montelukast für 10 Tage in beiden Modellen der Zirrhose zu einer Absenkung des basalen Pfortaderdruckes,

des absoluten Zymosan induzierten Anstieg des Pfortaderdruckes und des maximalen Pfortaderdruckes nach Aktivierung der Kupfferzellen mit zwei verschiedenen Aktivatoren. Der Effekt von Montelukast war unabhängig von dem gewählten Zirrhosemodell der Ratte zu beobachten, jedoch war der Effekt bei dem TAA Modell deutlicher ausgeprägt. Eine signifikante Menge von Leukotrienen wird durch Sekretion in die Galle eliminiert und die relative Menge von LTD₄, die in die Galle ausgeschieden wird, ist im TAA Modell erhöht (Muller et al., 1996). Deswegen ist die kompetitive Hemmung des CysLT₁ Rezeptors mit dem weniger potenten LTD₄ in dem TAA Modell mit intaktem Gallengang leicht zu erreichen. Allerdings war die Behandlung mit Montelukast sogar bei einer zu Grunde liegenden Lebererkrankung, die den Gallengang betrifft, trotzdem wirksam.

In früheren Studien wurden beobachtet, dass die Wirkung des CysLT₁ Rezeptorinhibitors MK-571 gering war und dass der Effekt viel weniger ausgeprägt war als bei AA-861 (Graupera et al., 2002). AA-861 ist ein Inhibitor der 5-Lipoxygenase und verhindert so die Leukotriensynthese. Der Unterschied zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, wo durch die Gabe eines CysLT₁ Rezeptorinhibitors signifikante Effekte erzielt wurden, lässt sich eventuell mit der Verwendung eines anderen Perfusionsmodelles (rezirkulierend) und eines anderen Tiermodelles (CCl₄) in der oben erwähnten Studie erklären. In der Studie von Graupera et al. konnten Leukotriene, die von der Leber kommen und in dem rezirkulierenden Perfusionssystem akkumulieren, den Effekt von MK-571 abschwächen. Allerdings war die Gabe des 5-Lipoxygenaseinhibitors effektiv und unterstützt damit die These, dass das Leukotriensystem einen neuen therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung der portalen Hypertension darstellt.

Der systemische Blutdruck wurde durch die Behandlung mit Montelukast in den Rattenmodellen der Leberzirrhose nicht beeinflusst (Tab. 5). Allerdings führte die Gabe des β -Glukan-reichen Zymosans zu einer Absenkung des systemischen Blutdrucks, wie schon beschrieben wurde (Steib et al., 2007). Dieser Effekt wurde nach Gabe von LPS nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Abfall des systemischen Blutdrucks könnte der systemische Effekt von Zytokinen darstellen, die von immunologischen Zellen, wie zum Beispiel Kupfferzellen oder Leukozyten, nach der Aktivierung durch mikrobielle Bestandteile ausgeschüttet werden. Der Anstieg des Pfortaderdruckes war nach der Gabe von Zymosan höher als nach der Infusion von LPS. Eventuell würden höhere Dosen von LPS den Pfortaderdruck ebenfalls in dem Maße

erhöhen, in dem es nach der Gabe von Zymosan der Fall ist. Somit könnte auch LPS zu einer Absenkung des systemischen Blutdrucks führen, wie es bei der Sepsis der Fall ist.

Eine Schädigung der zirrhotischen Leber durch die Behandlung mit Montelukast wurde durch die Beurteilung von Serumparameter ausgeschlossen (Tab. 3), die nach der Behandlung unverändert waren.

Neue Studien an Kindern mit Asthma haben gezeigt, dass das klinische und laborchemische Sicherheitsprofil von Montelukast mit dem der Placebogruppe zu vergleichen ist (Bisgaard et al., 2009). Der große Vorteil einer Montelukastbehandlung im Vergleich zu einer Behandlung mit einem Thromboxaninhibitor ist, dass die Blutgerinnung durch Montelukast nicht beeinflusst wird. Dies ist von signifikanter Bedeutung bei der Behandlung von Patienten mit Leberzirrhose, die häufig schon wegen ihrer Grunderkrankung unter Störungen der Blutgerinnung leiden.

7 Zusammenfassung

Eine der häufigsten Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertonie ist die spontan bakterielle Peritonitis (SBP). Folge der SBP bei vorbestehender portaler Hypertonie ist oftmals eine Varizenblutung, die die Mortalität der Patienten signifikant erhöht. Die Pathophysiologie der portalen Hypertonie ist nicht im Detail geklärt. Die Behandlungsmöglichkeiten SBP-assoziiierter Komplikationen der Leberzirrhose wie Varizenblutungen oder eine Verschlechterung der Nierenfunktion sind begrenzt.

Im Teil I der Arbeit wird im Tiermodell eine SBP durch die intraperitoneale Behandlung mit LPS simuliert und die Wirkung von LPS bei Leberzirrhose untersucht. Nach intraperitonealer Vorbehandlung mit LPS und einer darauffolgende Aktivierung der Kupfferzellen bei vorliegender Leberzirrhose kommt es zu einer vermehrten Produktion von intrahepatischen Vasokonstriktoren, vor allem von Thromboxan A₂ und Cysteinyl-Leukotrienen. Diese führen durch intrahepatische Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des Pfortaderdruckes. Als Mechanismus für die Druckerhöhung könnte der TLR-Signalweg eine Rolle spielen, da die Expression von TLR4 und MyD88 in zirrhotischen Lebern erhöht ist. Es ist zu vermuten, dass über diesen Signalweg eine LPS Überempfindlichkeit vermittelt wird. Die gewonnenen Daten am Tiermodell geben neue Hinweise auf die Pathogenese der portalen Druckerhöhung nach SBP. Diese könnte auch bei Patienten mit Leberzirrhose durch eine plötzliche massive Konfrontation mit LPS im Rahmen einer SBP zu einer schwerwiegenden Verschlechterung einer bestehenden portalen Hypertonie und in Folge zu einer Varizenblutung führen.

Da die Therapieoptionen limitiert sind und die Mortalität durch eine SBP signifikant steigt, sind neue Therapieoptionen besonders wichtig. Ein Ansatzpunkt könnte eine Blockade der Rezeptoren der ausgeschütteten Vasokonstriktoren sein, da diese maßgeblich zu einer Erhöhung des Pfortaderdruckes führen. Im Teil II der Arbeit zeigt sich, dass der Leukotrienrezeptorblocker Montelukast zu einer Senkung des Pfortaderdruckes in zwei verschiedenen Rattenmodellen bei Leberzirrhose führt. Außerdem gelang es durch die Gabe von Montelukast, den akuten Druckanstieg nach Infusion von TLR-Aktivatoren zu senken. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann Montelukast eine wichtige Therapieoption bei Leberzirrhose-assoziierten bakteriellen Infektionen und portaler Hypertonie darstellen.

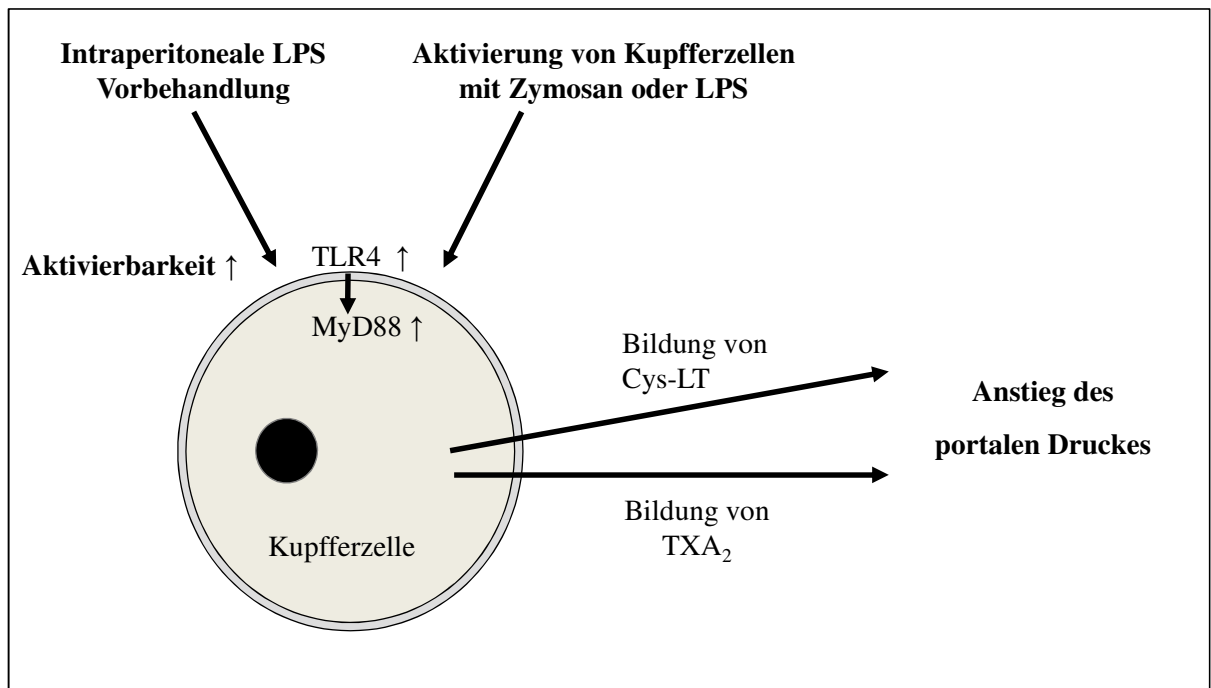


Abb. 26: **Zusammenfassung I:** Die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS führt über eine erhöhte Aktivierbarkeit der Kupferzelle über den TLR4-MyD88 Signalweg zu einem Anstieg des Pfortaderdruckes.

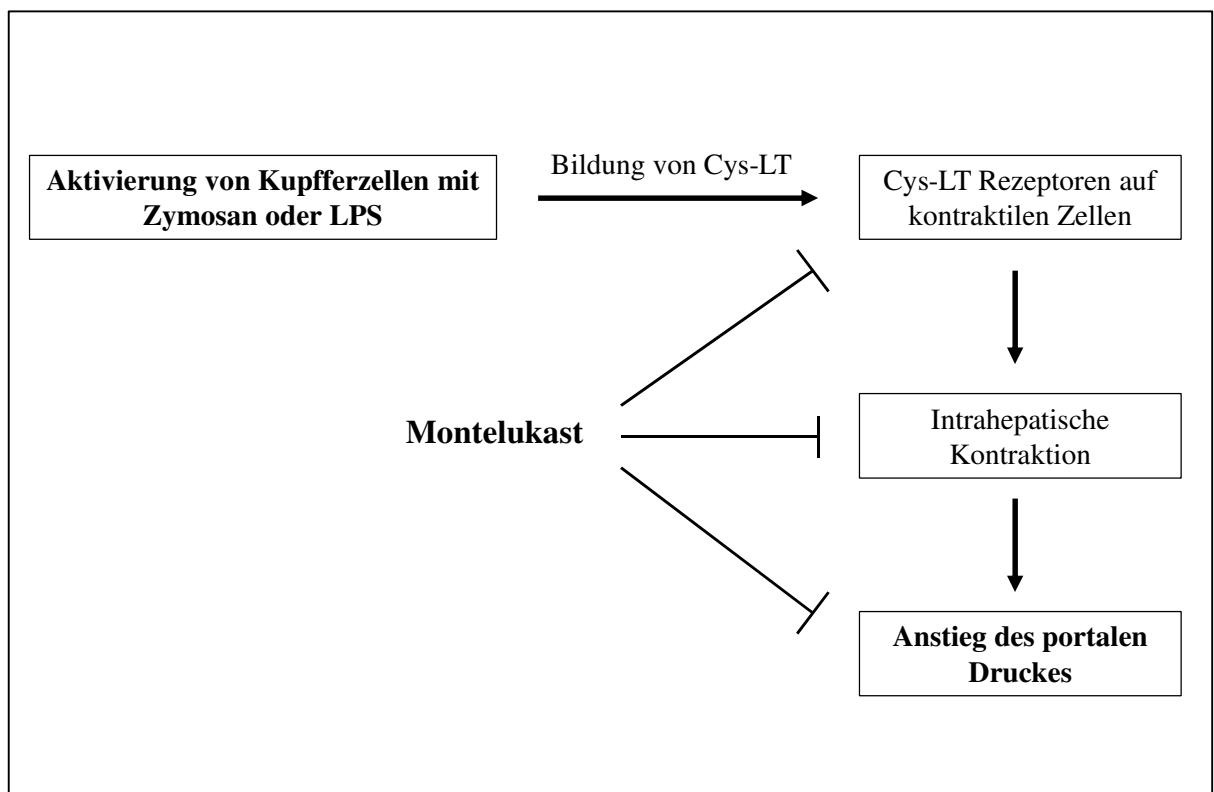


Abb. 27: **Zusammenfassung II:** Montelukast blockiert den CysLT₁ Rezeptor und erniedrigt den Druck in der Pfortader.

8 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALT (GPT)	Alaninaminotransferase (Glutamatpyruvattransaminase)
aP	alkalische Phosphatase
AST (GOT)	Aspartataminotransferase (Glutamatoxalacetattransaminase)
BCA	Bicinchinon-Säure
BDL	Gallengangsligatur (bile duct ligation)
BM 13.177	Solutroban
BT	Bakterielle Translokation
CO	Kohlenmonoxid
Cys-LT	Cysteinyl-Leukotriene
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EvG	Elastica-van-Gieson Färbung
FHVP	free hepatic vein pressure
GdCl ₃	Gadolinium Chlorid
γGT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
GI-Blutung	gastrointestinale Blutung
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HF	Herzfrequenz
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HVPG	hepatic venous pressure gradient
IU	Internationale Einheiten
KC	Kupfferzelle
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
Ly171883	1-[2-Hydroxy-3-Propyl-4-[4-(1H-Tetrazol-5-yl) Butoxy] Phenyl]- Ethanone
MAP	mittlerer arterieller Druck
MK-886	1-[(4-Chlorophenyl) Methyl]-3-[(1,1-Dimethylethyl) Thio]-α,α- Dimethyl-5-(1-Methylethyl)-1H-Indole-2-Propionsäure
MyD88	Myeloid differentiation factor 88, Adapterprotein

NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
RR	Blutdruck
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sham	Kontrolltiere, die trotz OP keine Gallengangsligatur haben
TAA	Thioacetamid (C ₂ H ₅ NS)
TIPS	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TLR	Toll-like Rezeptor
TX	Thromboxan
U-46619	9,11-Dideoxy-9,11-Methanoepoxy-Prostaglandin F _{2α}
WHVP	wedged hepatic vein pressure
Zy	Zymosan

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Komplikationen bei Leberzirrhose.....	2
Abb. 2:	Zellulärer Aufbau des Leberparenchyms.....	5
Abb. 3:	Diagnostische und therapeutische Strategien zur Primärprophylaxe einer Ösophagusvarizenblutung.....	8
Abb. 4:	Akute Ösophagusvarizenblutung.....	9
Abb. 5:	Bakterielle Translokation.....	12
Abb. 6:	Schematische Darstellung des TLR4 Signalweges.....	14
Abb. 7:	Gesamtdarstellung der verabreichten Substanzen.....	17
Abb. 8:	Schematische Darstellung der verwendeten Anlage zur isolierten Leberperfusion.....	20
Abb. 9:	Schematische Darstellung der in vivo Versuchsanordnung.....	24
Abb. 10:	LPS intraperitoneal erhöht den Pfortaderdruckanstieg bei Leberfibrose.....	34
Abb. 11:	Vergleich der Lebern von sham und BDL Tieren.....	35
Abb. 12:	Kupferzell-abhängigkeit des Druckanstieges.....	36
Abb. 13:	Anstieg der Expression von TLR4 und MyD88 nach Vorbehandlung mit LPS.....	37
Abb. 14:	Anstieg der Expression von TLR4 und MyD88 nach Vorbehandlung mit LPS.....	38

Abb. 15: Erhöhte Produktion von TXB ₂ nach intraperitonealer Vorbehandlung mit LPS bei Leberfibrose.....	39
Abb. 16: Erhöhte Produktion von Leukotrien C ₄ /D ₄ nach intraperitonealer Vorbehandlung mit LPS bei Leberfibrose.	40
Abb. 17: Funktionelle Rolle der Vasokonstriktoren.	41
Abb. 18: LPS intraperitoneal hat keinen Einfluss auf die Ansprechbarkeit der Vasokonstriktoren.	42
Abb. 19: LPS intraperitoneal hat keinen Einfluss auf die Ansprechbarkeit der Vasokonstriktoren.	43
Abb. 20: <i>In vivo</i> Effekt von LPS intraperitoneal für 3 h und einer zusätzlichen intraportalen Zymosan Gabe.	44
Abb. 21: <i>In vivo</i> Effekt von LPS intraperitoneal für 3 h und einer zusätzlichen intraportalen LPS Gabe.	45
Abb. 22: Histologische Analyse der Rattenlebern vier Wochen nach Gallengangsligatur und nach 18-wöchiger TAA Behandlung.	47
Abb. 23: Die Expression des Cys-LT ₁ Rezeptors wurde mittels Western Blot analysiert.	48
Abb. 24: Die Behandlung mit Montelukast beim BDL Tiermodell erniedrigte den basalen Pfortaderdruck und schwächte den Kupfferzellvermittelten Anstieg des Pfortaderdruckes ab.....	49
Abb. 25: Die Behandlung mit Montelukast beim TAA Tiermodell erniedrigte den basalen Pfortaderdruck und schwächte den Kupfferzellvermittelten Anstieg des Pfortaderdruckes ab.....	50
Abb. 26: Zusammenfassung I.	60
Abb. 27: Zusammenfassung II.	60

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verdünnung der Antikörper für den Western Blot.....	28
Tab. 2: Serumparameter.....	33
Tab. 3: Serumparameter.....	47
Tab. 4: Wirkung von Montelukast auf den Pfortaderdruck.	51
Tab. 5: Mittlerer systemischer arterieller Druck.....	51

11 Literaturverzeichnis

- ABRALDES, J. G. & BOSCH, J. 2007. The treatment of acute variceal bleeding. *J Clin Gastroenterol*, 41 Suppl 3, S312-7.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. & KAISHO, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2, 675-80.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- ARVANITI, V., D'AMICO, G., FEDE, G., MANOUSOU, P., TSOCHATZIS, E., PLEGUEZUELO, M. & BURROUGHS, A. K. 2010. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*, 139, 1246-56, 1256 e1-5.
- BAHR, M. J. & MANNS, M. P. 1999. [Liver cirrhosis]. *Internist (Berl)*, 40, 1308-22.
- BALZAN, S., DE ALMEIDA QUADROS, C., DE CLEVA, R., ZILBERSTEIN, B. & CECCONELLO, I. 2007. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*, 22, 464-71.
- BELLENTANI, S., SCAGLIONI, F., MARINO, M. & BEDOGNI, G. 2010. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*, 28, 155-61.
- BERG, R. D. & GARLINGTON, A. W. 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*, 23, 403-11.
- BERNARD, B., CADRANEL, J. F., VALLA, D., ESCOLANO, S., JARLIER, V. & OPOLON, P. 1995. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective study. *Gastroenterology*, 108, 1828-34.

- BERNARD, B., GRANGE, J. D., KHAC, E. N., AMIOT, X., OPOLON, P. & POYNARD, T. 1999. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology*, 29, 1655-61.
- BEUTLER, B., JIANG, Z., GEORGEL, P., CROZAT, K., CROKER, B., RUTSCHMANN, S., DU, X. & HOEBE, K. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*, 24, 353-89.
- BILZER, M., ROGGEL, F. & GERBES, A. L. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 26, 1175-86.
- BISGAARD, H., SKONER, D., BOZA, M. L., TOZZI, C. A., NEWCOMB, K., REISS, T. F., KNORR, B. & NOONAN, G. 2009. Safety and tolerability of montelukast in placebo-controlled pediatric studies and their open-label extensions. *Pediatr Pulmonol*, 44, 568-79.
- BOSCH, J. 2007. Vascular deterioration in cirrhosis: the big picture. *J Clin Gastroenterol*, 41 Suppl 3, S247-53.
- BOSCH, J. & ABRALDES, J. G. 2005. Variceal bleeding: pharmacological therapy. *Dig Dis*, 23, 18-29.
- BOSCH, J., ABRALDES, J. G., BERZIGOTTI, A. & GARCIA-PAGAN, J. C. 2009. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6, 573-82.
- BOSCH, J., ABRALDES, J. G. & GROSZMANN, R. 2003. Current management of portal hypertension. *J Hepatol*, 38 Suppl 1, S54-68.
- BOSCH, J. & GARCIA-PAGAN, J. C. 2000. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol*, 32, 141-56.

- BROWN, R. E., JARVIS, K. L. & HYLAND, K. J. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem*, 180, 136-9.
- CALY, W. R. & STRAUSS, E. 1993. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, 18, 353-8.
- CAPRA, V., AMBROSIO, M., RICCIONI, G. & ROVATI, G. E. 2006. Cysteinyl-leukotriene receptor antagonists: present situation and future opportunities. *Curr Med Chem*, 13, 3213-26.
- CARBONELL, N., PAUWELS, A., SERFATY, L., FOURDAN, O., LEVY, V. G. & POUPON, R. 2004. Improved survival after variceal bleeding in patients with cirrhosis over the past two decades. *Hepatology*, 40, 652-9.
- CRISPE, I. N. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 27, 147-63.
- D'AMICO, G. & DE FRANCHIS, R. 2003. Upper digestive bleeding in cirrhosis. Post-therapeutic outcome and prognostic indicators. *Hepatology*, 38, 599-612.
- D'AMICO, G., GARCIA-PAGAN, J. C., LUCA, A. & BOSCH, J. 2006. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology*, 131, 1611-24.
- D'AMICO, G. & LUCA, A. 1997. Natural history. Clinical-haemodynamic correlations. Prediction of the risk of bleeding. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 11, 243-56.
- D'AMICO, G., PAGLIARO, L. & BOSCH, J. 1999. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Semin Liver Dis*, 19, 475-505.
- DE FRANCHIS, R. 2005. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*, 43, 167-76.

- DE FRANCHIS, R. 2010. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*, 53, 762-8.
- DE FRANCHIS, R. & DELL'ERA, A. 2008. Novel developments in esophageal vascular disorders. *Curr Opin Gastroenterol*, 24, 490-5.
- DE FRANCHIS, R. & PRIMIGNANI, M. 2001. Natural history of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis*, 5, 645-63.
- DECKER, K. 1990. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*, 192, 245-61.
- DIETER, P., PETERS, T., SCHULZE-SPECKING, A. & DECKER, K. 1989. Independent regulation of thromboxane and prostaglandin synthesis in liver macrophages. *Biochem Pharmacol*, 38, 1577-81.
- ESCORSELL, A., BANARES, R., GARCIA-PAGAN, J. C., GILABERT, R., MOITINHO, E., PIQUERAS, B., BRU, C., ECHENAGUSIA, A., GRANADOS, A. & BOSCH, J. 2002. TIPS versus drug therapy in preventing variceal rebleeding in advanced cirrhosis: a randomized controlled trial. *Hepatology*, 35, 385-92.
- ESCORSELL, A., RUIZ DEL ARBOL, L., PLANAS, R., ALBILLOS, A., BANARES, R., CALES, P., PATERON, D., BERNARD, B., VINEL, J. P. & BOSCH, J. 2000. Multicenter randomized controlled trial of terlipressin versus sclerotherapy in the treatment of acute variceal bleeding: the TEST study. *Hepatology*, 32, 471-6.
- FOX, E. S., THOMAS, P. & BROITMAN, S. A. 1987. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun*, 55, 2962-6.
- GARCIA-PAGAN, J. C., DE GOTTARDI, A. & BOSCH, J. 2008. Review article: the modern management of portal hypertension--primary and secondary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 28, 178-86.

- GARCIA-PAGAN, J. C., REVERTER, E., ABRALDES, J. G. & BOSCH, J. 2012. Acute variceal bleeding. *Semin Respir Crit Care Med*, 33, 46-54.
- GARCIA-TSAO, G. 1992. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol Clin North Am*, 21, 257-75.
- GARCIA-TSAO, G. & WIEST, R. 2004. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18, 353-72.
- GOULIS, J., ARMONIS, A., PATCH, D., SABIN, C., GREENSLADE, L. & BURROUGHS, A. K. 1998. Bacterial infection is independently associated with failure to control bleeding in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology*, 27, 1207-12.
- GRAUPERA, M., GARCIA-PAGAN, J. C., ABRALDES, J. G., PERALTA, C., BRAGULAT, M., COROMINOLA, H., BOSCH, J. & RODES, J. 2003. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology*, 37, 172-81.
- GRAUPERA, M., GARCIA-PAGAN, J. C., TITOS, E., CLARIA, J., MASSAGUER, A., BOSCH, J. & RODES, J. 2002. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*, 122, 387-93.
- GROSZMANN, R. J. & GARCIA-TSAO, G. 2002. Endoscopic variceal banding vs. pharmacological therapy for the prevention of recurrent variceal hemorrhage: what makes the difference? *Gastroenterology*, 123, 1388-91.
- GROSZMANN, R. J., GARCIA-TSAO, G., BOSCH, J., GRACE, N. D., BURROUGHS, A. K., PLANAS, R., ESCORSELL, A., GARCIA-PAGAN, J. C., PATCH, D., MATLOFF, D. S., GAO, H. & MAKUCH, R. 2005. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 353, 2254-61.

- GULBERG, V., SCHEPKE, M., GEIGENBERGER, G., HOLL, J., BRENSING, K. A., WAGGERSHAUSER, T., REISER, M., SCHILD, H. H., SAUERBRUCH, T. & GERBES, A. L. 2002. Transjugular intrahepatic portosystemic shunting is not superior to endoscopic variceal band ligation for prevention of variceal rebleeding in cirrhotic patients: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol*, 37, 338-43.
- GUO, J., LOKE, J., ZHENG, F., HONG, F., YEA, S., FUKATA, M., TAROCCHI, M., ABAR, O. T., HUANG, H., SNINSKY, J. J. & FRIEDMAN, S. L. 2009. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology*, 49, 960-8.
- HENDRICKSON, H., CHATTERJEE, S., CAO, S., MORALES RUIZ, M., SESSA, W. C. & SHAH, V. 2003. Influence of caveolin on constitutively activated recombinant eNOS: insights into eNOS dysfunction in BDL rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285, G652-60.
- HOU, M. C., LIN, H. C., LIU, T. T., KUO, B. I., LEE, F. Y., CHANG, F. Y. & LEE, S. D. 2004. Antibiotic prophylaxis after endoscopic therapy prevents rebleeding in acute variceal hemorrhage: a randomized trial. *Hepatology*, 39, 746-53.
- IOANNOU, G. N., DOUST, J. & ROCKEY, D. C. 2003. Systematic review: terlipressin in acute oesophageal variceal haemorrhage. *Aliment Pharmacol Ther*, 17, 53-64.
- KATAGIRI, H., ITO, Y., ITO, S., MURATA, T., YUKIHIKO, S., NARUMIYA, S., WATANABE, M. & MAJIMA, M. 2008. TNF-alpha induces thromboxane receptor signaling-dependent microcirculatory dysfunction in mouse liver. *Shock*, 30, 463-7.
- KHUROO, M. S., KHUROO, N. S., FARAHAT, K. L., KHUROO, Y. S., SOFI, A. A. & DAHAB, S. T. 2005. Meta-analysis: endoscopic variceal ligation for primary prophylaxis of oesophageal variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther*, 21, 347-61.

- KROEGER, R. J. & GROSZMANN, R. J. 1985. Effect of selective blockade of beta 2-adrenergic receptors on portal and systemic hemodynamics in a portal hypertensive rat model. *Gastroenterology*, 88, 896-900.
- KROHN, N., KAPOOR, S., ENAMI, Y., FOLLENZI, A., BANDI, S., JOSEPH, B. & GUPTA, S. 2009. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines-chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells. *Gastroenterology*, 136, 1806-17.
- LAINE, L. & COOK, D. 1995. Endoscopic ligation compared with sclerotherapy for treatment of esophageal variceal bleeding. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 123, 280-7.
- LALEMAN, W., VAN LANDEGHEM, L., SEVERI, T., VANDER ELST, I., ZEEGERS, M., BISSCHOPS, R., VAN PELT, J., ROSKAMS, T., CASSIMAN, D., FEVERY, J. & NEVENS, F. 2007. Both Ca²⁺ -dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G556-64.
- LALEMAN, W., VANDER ELST, I., ZEEGERS, M., SERVAES, R., LIBBRECHT, L., ROSKAMS, T., FEVERY, J. & NEVENS, F. 2006. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest*, 36, 242-9.
- LO, G. H., LAI, K. H., CHENG, J. S., CHEN, M. H., HUANG, H. C., HSU, P. I. & LIN, C. K. 2000. Endoscopic variceal ligation plus nadolol and sucralfate compared with ligation alone for the prevention of variceal rebleeding: a prospective, randomized trial. *Hepatology*, 32, 461-5.
- MADRID, A. M., CUMSILLE, F. & DEFILIPPI, C. 1997. Altered small bowel motility in patients with liver cirrhosis depends on severity of liver disease. *Dig Dis Sci*, 42, 738-42.

- MANDAYAM, S., JAMAL, M. M. & MORGAN, T. R. 2004. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, 24, 217-32.
- MILLER, A. M., MASRORPOUR, M., KLAUS, C. & ZHANG, J. X. 2007. LPS exacerbates endothelin-1 induced activation of cytosolic phospholipase A2 and thromboxane A2 production from Kupffer cells of the prefibrotic rat liver. *J Hepatol*, 46, 276-85.
- MULLER, D., ENDERLE, G. J., LOW, O., DIETZE, E. & KRELL, H. 1996. Bile ductular proliferation and altered leukotriene elimination in thioacetamide-induced fibrosis of rat liver. *J Hepatol*, 25, 547-53.
- NEUGEBAUER, H., HARTMANN, P., KRENN, S., GLUCK, T., SCHOLMERICH, J., STRAUB, R. & WIEST, R. 2008. Bacterial translocation increases phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes in portal hypertension: priming independent of liver cirrhosis. *Liver Int*, 28, 1149-57.
- O'NEILL, L. A. & BOWIE, A. G. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7, 353-64.
- PERRI, R. E., LANGER, D. A., CHATTERJEE, S., GIBBONS, S. J., GADGIL, J., CAO, S., FARRUGIA, G. & SHAH, V. H. 2006. Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G535-42.
- PERZ, J. F., ARMSTRONG, G. L., FARRINGTON, L. A., HUTIN, Y. J. & BELL, B. P. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 45, 529-38.
- RATZIU, V., BELLENTANI, S., CORTEZ-PINTO, H., DAY, C. & MARCHESINI, G. 2010. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*, 53, 372-84.

- REYNAERT, H., THOMPSON, M. G., THOMAS, T. & GEERTS, A. 2002. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*, 50, 571-81.
- REYNAERT, H., URBAIN, D. & GEERTS, A. 2008. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)*, 291, 693-8.
- RICCIONI, G., BUCCIARELLI, T., MANCINI, B., DI ILIO, C. & D'ORAZIO, N. 2007. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem*, 14, 1966-77.
- RIMOLA, A., BORY, F., TERES, J., PEREZ-AYUSO, R. M., ARROYO, V. & RODES, J. 1985. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology*, 5, 463-7.
- RIPOLL, C., GROSZMANN, R., GARCIA-TSAO, G., GRACE, N., BURROUGHS, A., PLANAS, R., ESCORSELL, A., GARCIA-PAGAN, J. C., MAKUCH, R., PATCH, D., MATLOFF, D. S. & BOSCH, J. 2007. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology*, 133, 481-8.
- ROLAND, C. R., NAZIRUDDIN, B., MOHANAKUMAR, T. & FLYE, M. W. 1999. Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality. *Hepatology*, 29, 756-65.
- SANYAL, A. J., BOSCH, J., BLEI, A. & ARROYO, V. 2008. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*, 134, 1715-28.
- SARIN, S. K., WADHAWAN, M., AGARWAL, S. R., TYAGI, P. & SHARMA, B. C. 2005. Endoscopic variceal ligation plus propranolol versus endoscopic variceal ligation alone in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Am J Gastroenterol*, 100, 797-804.

- SCHIEFERDECKER, H. L., SCHLAF, G., JUNGERMANN, K. & GOTZE, O. 2001. Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. *Int Immunopharmacol*, 1, 469-81.
- SCHUPPAN, D. & AFDHAL, N. H. 2008. Liver cirrhosis. *Lancet*, 371, 838-51.
- SCHWABE, R. F., SEKI, E. & BRENNER, D. A. 2006. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, 130, 1886-900.
- SEKI, E., DE MINICIS, S., OSTERREICHER, C. H., KLUWE, J., OSAWA, Y., BRENNER, D. A. & SCHWABE, R. F. 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*, 13, 1324-32.
- SEKI, E., TSUTSUI, H., NAKANO, H., TSUJI, N., HOSHINO, K., ADACHI, O., ADACHI, K., FUTATSUGI, S., KUIDA, K., TAKEUCHI, O., OKAMURA, H., FUJIMOTO, J., AKIRA, S. & NAKANISHI, K. 2001. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol*, 166, 2651-7.
- SORIANO, G., GUARNER, C., TOMAS, A., VILLANUEVA, C., TORRAS, X., GONZALEZ, D., SAINZ, S., ANGUERA, A., CUSSO, X., BALANZO, J. & ET AL. 1992. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology*, 103, 1267-72.
- STEFFEN, E. K., BERG, R. D. & DEITCH, E. A. 1988. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis*, 157, 1032-8.
- STEIB, C. J., GERBES, A. L., BYSTRON, M., OP DEN WINKEL, M., HARTL, J., ROGGEL, F., PRUFER, T., GOKE, B. & BILZER, M. 2007. Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A(2). *J Hepatol*, 47, 228-38.

- STEIB, C. J., HENNENBERG, M., BEITINGER, F., HARTMANN, A. C., BYSTRON, M., DE TONI, E. N. & GERBES, A. L. 2010. Amiloride reduces portal hypertension in rat liver cirrhosis. *Gut*, 59, 827-36.
- SU, G. L. 2002. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G256-65.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- TEJIMA, K., ARAI, M., IKEDA, H., TOMIYA, T., YANASE, M., INOUE, Y., NAGASHIMA, K., NISHIKAWA, T., WATANABE, N., OMATA, M. & FUJIWARA, K. 2004. Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats. *Gastroenterology*, 127, 1488-96.
- THALHEIMER, U., TRIANTOS, C. K., SAMONAKIS, D. N., PATCH, D. & BURROUGHS, A. K. 2005. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut*, 54, 556-63.
- THORNTON, B. P., VETVICKA, V., PITMAN, M., GOLDMAN, R. C. & ROSS, G. D. 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol*, 156, 1235-46.
- TIANI, C., ABRALDES, J. G. & BOSCH, J. 2008. Portal hypertension: pre-primary and primary prophylaxis of variceal bleeding. *Dig Liver Dis*, 40, 318-27.
- TITOS, E., CLARIA, J., BATALLER, R., BOSCH-MARCE, M., GINES, P., JIMENEZ, W., ARROYO, V., RIVERA, F. & RODES, J. 2000. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology*, 119, 794-805.

- TREBICKA, J., HENNENBERG, M., LALEMAN, W., SHELEST, N., BIECKER, E., SCHEPKE, M., NEVENS, F., SAUERBRUCH, T. & HELLER, J. 2007. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology*, 46, 242-53.
- TREBICKA, J., HENNENBERG, M., ODENTHAL, M., SHIR, K., KLEIN, S., GRANZOW, M., VOGT, A., DIENES, H. P., LAMMERT, F., REICHEN, J., HELLER, J. & SAUERBRUCH, T. 2010. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 53, 702-12.
- UHRIG, A., BANAFSCHE, R., KREMER, M., HEGENBARTH, S., HAMANN, A., NEURATH, M., GERKEN, G., LIMMER, A. & KNOLLE, P. A. 2005. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*, 77, 626-33.
- VILLANUEVA, C. & BALANZO, J. 2008. Variceal bleeding : pharmacological treatment and prophylactic strategies. *Drugs*, 68, 2303-24.
- VOLLMAR, B. & MENGER, M. D. 2009. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 89, 1269-339.
- WASMUTH, H. E. & TRAUTWEIN, C. 2010. [Liver fibrosis : clinics, diagnostics and management]. *Internist (Berl)*, 51, 14-20.
- WIEST, R. & GARCIA-TSAO, G. 2005. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*, 41, 422-33.
- WITTENBURG, H., TENNERT, U. & BERG, T. 2011. [Complications of liver cirrhosis]. *Internist (Berl)*, 52, 1061-70; quiz 1071-2.

XU, H., KORNESZCZUK, K., KARAA, A., LIN, T., CLEMENS, M. G. & ZHANG, J. X. 2005. Thromboxane A2 from Kupffer cells contributes to the hyperresponsiveness of hepatic portal circulation to endothelin-1 in endotoxemic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288, G277-83.

YOKOYAMA, Y., XU, H., KRESGE, N., KELLER, S., SARMADI, A. H., BAVEJA, R., CLEMENS, M. G. & ZHANG, J. X. 2003. Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G453-60.

ZHOU, Q., HENNENBERG, M., TREBICKA, J., JOCHEM, K., LEIFELD, L., BIECKER, E., SAUERBRUCH, T. & HELLER, J. 2006. Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut*, 55, 1296-305.

12 Publierte Ergebnisse

STEIB C. J., **HARTMANN A. C.**, V HESLER C., HENNENBERG M., BILZER M., GERBES A.L. 2010. Intraperitoneal LPS amplifies portal hypertension in rat liver fibrosis. *Lab Invest.* Jul; 90(7):1024-32.

STEIB C. J., BILZER M., OP DEN WINKEL M., PFEILER S., **HARTMANN A. C.**, HENNENBERG M., GÖKE B., GERBES A. L. 2010. Treatment with the leukotriene inhibitor montelukast for 10 days attenuates portal hypertension in rat liver cirrhosis. *Hepatology.* Jun; 51(6):2086-96.

STEIB C. J., **HARTMANN A. C.**, HESLER C., HAERTL J., GERBES A. L. 2009. Intraperitoneal LPS enhances kupffer cell dependent portal pressure increase in fibrosis. AASLD ABSTRACT, *Hepatology.* Apr; 50(4) (Suppl): 477A.

13 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes, möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas herzlich danken, außerdem für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung mit seiner großzügigen Unterstützung durchführen zu können.

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorarbeitsbetreuer, Herrn Dr. med. Christian J. Steib, für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und an die technische Arbeit im Labor. Seine stete Bereitschaft zu konstruktiven Gesprächen, seine Ideen und Ratschläge haben diese Arbeit entscheidend beeinflusst. Vielen Dank für die herausragende Betreuung.

Außerdem danke ich dem Förderungsprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU für die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“.

Frau Dr. med. Frigga Beitinger vom Pathologischen Institut der LMU München danke ich für die histologische Beurteilung der entnommenen Gewebeproben.

Des Weiteren möchte ich den technischen Assistenten Frau Ingrid Liss und Herrn Christoph von Hesler für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei organisatorischen und labortechnischen Fragen danken. Außerdem danke ich auch dem gesamten restlichen Team des Forschungslabors, die mir bei Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zum Abschluss danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung, ob mit Tipps und guten Ratschlägen oder als Lektoren dieser Arbeit seid ihr mir immer eine große Hilfe gewesen.

14 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS erhöht den Pfortaderdruck in der fibrotischen Rattenleber: Kupfferzell-abhängige Mechanismen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangungen eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Anna Christina Hartmann