

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MATINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG VON NEUROPEPTID Y AUF DIE REZEPTOR-UNABHÄNGIGE  
VASOKONSTRIKTION IM MESENTERIALEN GEFÄSSBETT DER RATTE  
IN ABHÄNGIGKEIT VOM BESTEHEN EINER PORTALEN HYPERTONIE

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johannes Hartl

2013





AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MATINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG VON NEUROPEPTID Y AUF DIE REZEPTOR-UNABHÄNGIGE  
VASOKONSTRIKTION IM MESENTERIALEN GEFÄSSBETT DER RATTE  
IN ABHÄNGIGKEIT VOM BESTEHEN EINER PORTALEN HYPERTONIE

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johannes Hartl

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reiner Wiest

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Anja Katrin Bosserhoff

Tage der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2014  
02. Mai 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	5
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	8
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	10
<b>1. Einleitung</b>	12
<b>2. Hintergrund</b>	14
2.1 Leberzirrhose	14
2.2 Portale Hypertension	15
2.2.1 Definition	15
2.2.2 Hämodynamik	15
2.2.3 Ätiologie und Pathogenese	15
2.3 Das Hyperdynamie Zirkulationssyndrom (HZS)	16
2.3.1 Pathophysiologie	16
2.3.2 Folgen und Komplikationen	18
2.4 Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur	20
2.4.1 Vasokonstriktorische Signalkaskaden	21
2.4.1.1 Phospholipase-C-/Proteinkinase-C-Signalweg	21
2.4.1.2 RhoA/Rho-Kinase-Signalweg	21
2.4.2 Vasodilatierende Signalkaskaden	23
2.4.3 Stickstoffmonoxid	23
2.4.3 Pathomechanismen bei Pfortaderhochdruck	24
2.4.3.1 Stickstoffmonoxid	25
2.4.3.2 Verminderte Gefäßreaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren	26
2.5 Cyclooxygenase-Signalweg	30
2.5.1 Phospholipase A <sub>2</sub>	31
2.5.2 Cyclooxygenase	33
2.5.3 Synthetische Inhibitoren der Cyclooxygenase	33
2.5.4 Prostaglandine	34
2.5.5 Thromboxan A <sub>2</sub>	35
2.6 Evidenz für Kaliumchlorid (KCl) als Ca <sup>2+</sup> -sensibilisierender Stimulus	36
2.7 Neuropeptid Y (NPY)	38
2.7.1 Struktur	38
2.7.2 Lokalisation	40

2.7.3	Funktion .....	41
2.7.4	Rezeptoren .....	42
<b>3.</b>	<b>Material und Geräte .....</b>	<b>45</b>
3.1	Substanzen.....	45
3.2	Geräte .....	45
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>48</b>
4.1	Tiermodell und Portalvenenligatur (PVL) .....	48
4.2	In-vitro-Perfusion nach McGregor.....	49
4.3	Präparation der Arterie mesenterica superior (AMS) nach McGregor .....	49
4.4	Statistische Auswertung .....	52
<b>5.</b>	<b>Versuchsprotokoll.....</b>	<b>53</b>
5.1	Versuchsreihe 1: Untersuchung der KCl-vermittelten Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte .....	53
5.2	Untersuchung der potenzierenden NPY-Effekte auf eine KCl-induzierte Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte.....	54
5.2.1	Versuchsreihe 2: Anhand von zwei Perfusionszyklen .....	54
5.2.2	Versuchsreihe 3: Anhand von einem Perfusionszyklus .....	54
5.3	Versuchsreihe 4: Untersuchung der Abhängigkeit der NPY-Effekte vom Cyclooxygenase-Signalweg bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte.....	55
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
6.1	Statistische Auswertung .....	56
6.2	Versuchsreihe 1: Untersuchung der KCl-vermittelten Vasokon- striktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte .....	56
6.3	Untersuchung der potenzierenden NPY-Effekte auf eine KCl-induzierte Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte.....	60
6.3.1	Versuchsreihe 2: Anhand von zwei Perfusionszyklen .....	60
6.3.2	Versuchsreihe 3: Anhand von einem Perfusionszyklus .....	63
6.4	Versuchsreihe 4: Untersuchung der Abhängigkeit der NPY-Effekte vom Cyclooxygenase-Signalweg bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte .....	65
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
7.1	Charakterisierung der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion und der potenzierenden NPY im mesenterialen Gefäßbett von portal hypertensiven Ratten...	68
7.2	Ausblick: NPY als zukünftiges Agens bei portaler Hypertonie .....	73
7.3	Weitere Investigationpunkte .....	75

<b>8. Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>9. Literaturquellen.....</b>	<b>78</b>
<b>Bilderquellen</b>	
<b>Danksagung</b>	
<b>Curriculum Vitae</b>	



# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	<b>Pathogenese des Hyperdynamen Zirkulationssyndroms mit Fokus auf die Splanchnikuszirkulation</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 2:</b>	<b>Regulation von Myosin im glatten Gefäßmuskel</b>	<b>22</b>
<b>Abbildung 3:</b>	<b>Cyclooxygenase-Signalweg</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 4:</b>	<b>Chemische Strukturformel von Indomethacin</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 5:</b>	<b>KCl-induzierte <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Sensibilisierung</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 6:</b>	<b>Komplette Aminosäuresequenz von NPY</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 7:</b>	<b>Darstellung der AMS im Operationssitus</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 8:</b>	<b>Darstellung des mesenterialen Gefäßbetts</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 9:</b>	<b>Perfusionsanlage</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 10:</b>	<b>Schematische Darstellung des Versuchsablaufs Versuchsreihe 1</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 11:</b>	<b>Schematische Darstellung des Versuchsablaufs Versuchsreihe 2</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 12:</b>	<b>Schematische Darstellung des Versuchsablaufs Versuchsreihe 3</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 13:</b>	<b>Schematische Darstellung des Versuchsablaufs Versuchsreihe 4</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 14:</b>	<b>Beispiel einer Druckaufzeichnung der Perfusion-Versuchsreihe 1 (Kontrolltier)</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 15:</b>	<b>Beispiel einer Druckaufzeichnung der Perfusion-Versuchsreihe 1 (PVL-Tier)</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 16:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 1 (erster Perfusionszyklus)</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 17:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 1 (zweiter Perfusionszyklus)</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 18:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 1 (Kontrolltiere)</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 19:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 1 (PVL-Tiere)</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 20:</b>	<b>Absolute Steigerung der Perfusionsdrücke Versuchsreihe 1</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 21:</b>	<b>Prozentuale Steigerung der Perfusionsdrücke Versuchsreihe 1</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 22:</b>	<b>Beispiel einer Druckaufzeichnung der Perfusion-Versuchsreihe 2 (Kontrolltier)</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 23:</b>	<b>Beispiel einer Druckaufzeichnung der Perfusion-Versuchsreihe 2 (PVL-Tier)</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 24:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 2 (Kontrolltiere)</b>	<b>62</b>

<b>Abbildung 25:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 2 (PVL-Tiere)</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 26:</b>	<b>Absolute Steigerung der Perfusionsdrücke Versuchsreihe 2</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 27:</b>	<b>Prozentuale Steigerung der Perfusionsdrücke Versuchsreihe 2</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 28:</b>	<b>Beispiel zweier Druckaufzeichnungen der Perfusion-Versuchsreihe 3 (Kontroll- und PVL-Tiere)</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 29:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 3 (Kontroll- und PVL-Tiere)</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 30:</b>	<b>Beispiel einer Druckaufzeichnung der Perfusion-Versuchsreihe 4 (Kontrolltier)</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 31:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 4 (Kontrolltier)</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 32:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve Versuchsreihe 4 (PVL-Tiere)</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatzyklase
AMS	Arteria mesenterica superior
AT1	Angiotensin-II(Typ1)-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
E <sub>max</sub>	Maximale Kontraktionskraft
ET1A	Endothelin-Rezeptor A
ET1B	Endothelin-Rezeptor B
eNOS	Epitheliale NO-Synthase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HSP 90	Hitze-Schock-Protein 90
HZS	Hyperdynames Zirkulationssyndrom
HZV	Herzzeitvolumen
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Kette-Phosphatase
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NANC	Non-adrenerge und non-cholinerge Neurone
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	Nicht signifikant
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PP	Pankreatisches Polypeptid
PVL	Portalvenenligatur
PYY	Peptid Y
PZ	Perfusionszyklus
Q	Blutfluss
R	Gefäßwiderstand
RAAS	Renin-Angiotension-Aldosteron-System
RhoGDI	Guanin-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor
Rho-GEF	Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor
RLC	Regulatorische Untereinheit der Myosin-Phosphatase

ROK	Rho-Kinase
SEM	Standardabweichung
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
Sham	Kontrolltier
SNS	Sympathisches Nervensystem
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
V1	Arginin-Vasopressin-Rezeptor 1a

# 1. Einleitung

Leberzirrhose sowie sämtliche Formen von portaler Hypertension können zur Ausprägung des Hyperdynamen Zirkulationssyndroms (HZS) führen. Dieses zeichnet sich durch eine generalisierte arterielle Vasodilatation, ein erhöhtes Herzzeitvolumen und eine verstärkte regionale Organdurchblutung aus (*Iwakiri and Grozsmann 2006*). Das HZS steht mit allen schwerwiegenden Komplikationen einer portalen Hypertension, wie etwa Aszites, Varizenblutung oder dem hepatorenenalen Syndrom, in direktem Zusammenhang (*Wiest et Lock 2000, 2003*). In der Pathogenese des HZS stellt die arterielle Vasorelaxation im Splanchnikusgebiet den entscheidenden Initiator dar (*Schierer et al. 1988; Colombato et al. 1992*). Die arterielle Gefäßweitstellung ist dabei zum einen durch eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren verursacht. Zum anderen durch eine gesteigerte Stickstoffmonoxid (NO) – vermittelte Vasorelaxation (*Grozsmann et Franchis 1999*). Vorausgegangene Studien kamen zu dem Schluss, dass es sich bei der vaskulären Hyporeaktivität um eine Fehlregulierung intrazellulärer Signalkaskaden handelt (*Neef M et al. 2003, MacGilchrist et al. 1990, Liao et al. 1994*). Hierbei scheint insbesondere die Down-Regulation und Störung des RhoA/Rho-kinase (ROK)-Signalwegs eine entscheidende Rolle zu spielen (*Hennenberg et al. 2006, 2008; Trebicka et al. 2008; Moleda et al. 2011*). Des Weiteren konnte belegt werden, dass die gesteigerte Expression der NO-Synthase (endothelial, neuronal, induzierbar) zu einer Überproduktion von NO und einer arteriellen Vasorelaxation führt (*Pateron et al. 2000; Jurzik et al. 2005*). Jegliche Substanz, die in der Lage ist, den beschriebenen Alterationen entgegenzuwirken, würde somit zu einer entscheidenden Verbesserung der hämodynamischen Situation bei Pfortaderhochdruck führen.

Bei Neuropeptid Y (NPY) scheint es sich um so eine Substanz zu handeln. NPY wird als Co-Transmitter zusammen mit Noradrenalin in präsynaptischen Vesikeln des sympathischen Nervensystems gespeichert (*Lundberg et al. 1986*). Dabei ist es vorwiegend in den Nervenfasern lokalisiert, welche die Widerstandsgefäße innervieren (*Zukowska-Grojec et al. 1993*). Untersuchungen unseres Labors konnten zeigen, dass der Neurotransmitter NPY im mesenterialen Gefäßbett von portal hypertensiven Ratten via Y1-Rezeptor die  $\alpha_1$ -adrenerge Kontraktion potenziert, die Gefäßreagibilität wiederherstellt sowie die NO-vermittelte Vasodilatation unterdrückt (*Wiest et al. 2006; Edvinsson et al. 1992; Nilsson et al. 1996; Moleda et al. 2011*). Darüber hinaus vermittelt NPY eine Steigerung der Expression und Aktivität der Rho-kinase. Dieser Effekt ist bei Zirrhose besonders deutlich ausgeprägt (*Moleda et al. 2011*). Neuropeptid Y scheint also den entscheidenden Faktoren in der Pathogenese des HZS entgegenzusteuern und

weist somit als zukünftige Therapieoption in der Behandlung von Leberzirrhose und Pfortaderhochdruck ein großes Potenzial auf.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Wirkung von NPY im mesenterialen Gefäßbett weiter charakterisiert werden. Hierbei rückte allerdings nicht die rezeptorabhängige, sondern erstmals die rezeptorunabhängige Kontraktion in den Fokus der Untersuchungen.

Diese wird neben der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der RhoA/Rho-kinase-Kaskade u.a. durch eine vermehrte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) durch das Enzym Phospholipase  $\text{A}_2(\text{PLA}_2)$  reguliert (*Somlyo et Somlyo 1994*). Es ist bekannt, dass NPY zwar per se zu keiner verstärkten AA-Freisetzung führt, bei der Co-Stimulation des  $\text{Y}_1$ - und  $\alpha_1$ -Rezeptors diese aber in synergistischer Weise potenziert (*Selbie et al. 1995*). Die Cyclooxygenase (COX) stellt dabei das Schlüsselenzym im AA-Stoffwechsel dar. Es überführt AA in einer zweischrittigen Reaktion in Prostaglandin $\text{H}_2$ , aus welchem sämtliche vasoaktiven Prostaglandine synthetisiert werden können (*Simmons et al. 2004; Hamberg et al. 1973*).

Verschiedene Studien der letzten Jahre zeigten zudem, dass es auch bei der rezeptorunabhängigen Kontraktion durch die Stimulation mit hohen Kaliumchlorid (KCl)-Dosen zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung im glatten Gefäßmuskel kommen kann. Anscheinend ist jeder Stimulus, der zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, imstande, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung zu bewirken. Dies ist v.a. auf eine Aktivierung der RhoA/ROK-Kaskade zurückzuführen (*Mita et al. 2002; Urban et al. 2003, Sakamoto et al. 2003, Ratz et al. 2005*).

Unter Beachtung der letztgenannten Gesichtspunkte sollten in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

1. Hat in unserer Versuchsanordnung durch die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung stattgefunden und ist diese bei portaler Hypertension gegebenenfalls beeinträchtigt?
2. Inwiefern ist die rezeptorunabhängige Kontraktion im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten vermindert und kann dies ggfs. durch NPY korrigiert werden?
3. Besteht neben der  $\alpha_1$ -adrenergen auch bei der rezeptorunabhängigen Kontraktion möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Wirkmechanismus von NPY und dem AA-Metabolismus? Ist ferner eine intakte COX für die NPY-Wirkung notwendig?

## 2. Hintergrund

### 2.1 Leberzirrhose

Bei der Leberzirrhose handelt es sich um ein histopathologisch definiertes Krankheitsbild. Das Hauptmerkmal stellt dabei die Fibroseentwicklung dar. Diese ist die Folge eines chronischen Vernarbungsprozesses, der durch den kontinuierlichen Zelluntergang bei einer chronischen Lebererkrankung unterhalten wird. Die zunehmende Fibrosierung wird hierbei durch die Aktivierung hepatischer Sternzellen induziert, welche vermehrt Kollagen in der extrazellulären Matrix ablagern. Hierdurch kommt es zwischen dem Portalfeld und der Zentralvene zur Ausbildung von Bindegewebssepten, aus welchen sich im weiteren Verlauf sog. Regeneratknoten abschnüren, sodass die Leberzirrhose also eine Kombination aus Parenchymuntergang, nodulärer Leberregeneration und Leberfibrose darstellt. Bei der Leberzirrhose handelt es sich um eine häufige Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa 300 Betroffenen pro 100.000 Einwohnern (*Berdel et al. 2004; Bacon et al. 2008*).

In Nordeuropa und Nordamerika stellt die alkoholtoxische Zirrhose mit einem Anteil zwischen 50 und 60 Prozent die häufigste Zirrhoseform dar. (*Berdel et al. 2004*). Alkohol per se sowie sein Abbauprodukt Acetaldehyd wirken auf hepatozelluläre Organelle und Enzymaktivitäten toxisch (*Lieber C.S 1988*). Zum anderen führen die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen sowie die Einschwemmung von Endotoxinen aus dem Darm zu einer Kupferzell-Aktivierung. Kupferzellen sind in der Lage, über die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  Caspasen zu aktivieren und somit die Apoptose einzuleiten (*Lieber 2001*). Des Weiteren führen sie über die Produktion profibrogener Zytokine zu einer Aktivierung der Sternzellen (*Bacon et al. 2008*).

Die chronische Virushepatitis gilt in Entwicklungsländern als die häufigste Ursache einer Leberzirrhose, in Deutschland ist sie die zweithäufigste. Bei Hepatitis B wird der Zelltod durch eine HLA-restringierte zelluläre Immunreaktion verursacht, bei der Hepatitis C sind die Mechanismen noch nicht geklärt (*Berdel et al. 2004*).

Die biliäre Leberzirrhose bietet ein anderes histopathologisches Bild als die alkoholtoxische oder hepatitische Leberzirrhose. Der genaue Mechanismus des Zelluntergangs bei Cholestase bzw. Cholangitis ist bisher unklar. Diskutiert werden u.a. atypische, zytotoxische Gallensäuren sowie die Akkumulation von zytotoxischen Leukotrienen (*Berdel et al. 2004*).

Bei Stoffwechseldefekten ist die Überladung der Zelle mit Stoffwechselprodukten für deren Untergang verantwortlich (*Berdel et al. 2004*).

## 2.2 Portale Hypertonie

### 2.2.1 Definition

Die portale Hypertonie wird als freier portovenöser Druck über 10 mmHg definiert. Sie stellt die häufigste und mit der größten Letalität vergesellschaftete Komplikation einer chronischen Lebererkrankung dar. Varizenblutungen, Aszites, hepatorenales Syndrom, hepatische Enzephalopathie und die meisten gravierenden Komplikationen einer chronischen Lebererkrankung sind auf die portale Hypertension zurückzuführen (*Wiest et. Lock 2000*).

### 2.2.3 Hämodynamik

Die Leber erhält 25 Prozent des Herzzeitvolumens, dies entspricht etwa einer Blutmenge von 1,5 l/min. Davon stammen 2/3 aus der Pfortader und lediglich 1/3 aus der A. hepatica. Der portovenöse Druck (P) ist nach dem Ohmschen Gesetz als eine Funktion aus Blutfluss (Q) und dem Gefäßwiderstand (R) wie folgt definiert:

**Ohmsches Gesetz:**  $P = Q \times R$

Dabei errechnet sich der Gefäßwiderstand gemäß dem Poiseuilleschen Gesetz:

**Poiseuillesches Gesetz:**  $R = 8\eta L / \pi r^4$

Die Viskositätskonstante  $\eta$  und die Gefäßlänge L sind dabei als konstant voranzusetzen. Entscheidend für den Gefäßwiderstand ist daher der Gefäßradius r, da er in der 4. Potenz in die Gleichung eingeht. Der Gefäßwiderstand wird im Wesentlichen von der Leber determiniert. Diese besitzt zur Regulation des Widerstands allerdings keine aktiven Regulationsmechanismen, sondern ist „passiver Empfänger“ der portalvenösen Blutmenge. Einzig die Widerstandsgefäße im Splanchnikusgefäßbett bestimmen somit den Einstrom. Eine gesunde Leber besitzt daher eine große Compliance, sodass der portale Druck über weite Bereiche der einströmenden Blutmengen konstant gehalten wird. Der zirrhotische Umbau des Lebergewebes geht allerdings mit einer Verminderung bzw. einem Verlust der Compliance einher, sodass eine Steigerung des portalvenösen Einstroms nicht mehr ausreichend kompensiert werden kann (*Wiest et. Lock 2000*).

### 2.2.4 Ätiologie und Pathogenese

Prinzipiell kann jede Widerstandserhöhung im portalvenösen System zu einer portalen Hypertension führen. Auf diese Tatsache stützt sich die ätiopathogenetische Einteilung des Pfortaderhochdrucks in prä-, intra- und posthepatisch. In 80 Prozent der Fälle ist die Ursache in



der Leber zu finden. Dabei setzt sich die intrahepatische Widerstandserhöhung aus einer mechanischen und einer dynamischen Komponente zusammen.

Eine mechanische Behinderung des portovenösen Blutstroms entsteht durch sämtliche Störungen der Leberarchitektur (*Groszmann et Franchis 1999*). Hierzu zählt etwa die Ausbildung von Regeneratknoten, die zunehmende Fibrosierung des Disse'schen Raums oder die Umwandlung der hochpermeablen Sinusoide in impermeable Membranen. Ein Vorgang, der als „Kapillarisation“ bezeichnet wird (*Popper et Schaffner 1958*).

Davon abgesehen weisen experimentelle Daten darauf hin, dass 30 Prozent des erhöhten Gefäßwiderstandes nicht mechanischer Natur, sondern rein funktionell sind und ausschließlich auf hämodynamische Gegebenheiten zurückgeführt werden können. An dieser Stelle sind v.a. vasokonstriktive Mediatoren wie Norepinephrin, Angiotensin und Vasopressin aufzuführen, die zu einer pathologischen Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes und des portalen Drucks beitragen (*Wiest et Lock 2003*). Katecholamine und Angiotensin greifen dabei an den hepatischen Arteriolen und Sternzellen an. Letztere sind bei Leberzirrhose aktiviert und modulieren mit ihren perisinusoidalen Zellausläufern den sinusoidalen Durchmesser (*Laleman et al. 2005; Gupta and Groszmann 1997*).

## **2.3 Das Hyperdynamie Zirkulationssyndrom (HZS)**

### **2.3.1 Pathophysiologie**

Das Hyperdynamie Zirkulationssyndrom (HZS) ist nicht nur als Komplikation der Leberzirrhose, sondern als Komplikation der portalen Hypertension allgemein zu verstehen, da sämtliche Formen von Pfortaderhochdruck zur Ausprägung des HZS führen können (*Iwakiri and Groszmann 2006b*). Das HZS zeichnet sich durch eine arterielle Vasodilatation im Splanchnikusgebiet sowie in der Peripherie, ein erhöhtes Herzzeitvolumen (HZV) und eine drastische Plasmaexpansion aus (*Groszmann 1999*).

Die arterielle Vasodilatation stellt hierbei den entscheidenden Initiator in der Pathophysiologie des HZS dar und geht somit einer Plasmaexpansion voraus (*Schierer et al. 1988; Colombato et al. 1992*). Betroffen ist dabei in erster Linie das Splanchnikusgebiet. Hier tritt bereits früh eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, Arginin-Vasopressin oder Endothelin auf (*Sieber et al. 1993, 1997; Hartleb et al. 1994; Kiel et al. 1985*). Diese Hyporeaktivität ist zum einen auf die Kumulation von hormonellen und endothelialen

Vasodilatoren wie etwa NO zurückzuführen. Dabei ist der exakte Stimulus dieser vasodilatierenden Botenstoffe bisher unbekannt. Allerdings scheinen eine gesteigerte Expression der endothelialen NO-Synthase sowie eine vermehrte *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Produktion in der intestinalen Mikrozirkulation am Beginn der Entwicklung des HZS beteiligt zu sein. Als Auslöser dieser Veränderung werden u.a. die erhöhte tangentielle Wandspannung und Scherkräfte diskutiert, wie sie im mesenterialen Gefäßbett bei portaler Hypertension auftreten (*Iwakiri and Groszmann 2006*). Zum anderen ist neben den diversen vasodilatierenden Substanzen von einem Defekt intrazellulärer Signalkaskaden auszugehen, durch welchen die Bindung von vasokonstriktorisches Substanzen an ihren Rezeptor nur eine verminderte Kontraktion erzeugt (*Vorobioff et al. 1984; Sieber et al. 1993*).

Bedingt durch die Gefäßweitstellung im Splanchnikusgebiet, entsteht eine relative Hypovolämie und Hypotonie, welche über eine Stimulation kardiopulmonaler Volumenrezeptoren im Niederdrucksystem (Vorhöfe, rechter Ventrikel und Lungenstrombahn) und arterieller Barorezeptoren im Hochdrucksystem (Karotissinus, Aortenbogen, juxtaglomerulärer Apparat der Niere) zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sowie zur Freisetzung von Arginin-Vasopressin im Hypothalamus führen. Der Organismus versucht so, wieder ein Gleichgewicht zwischen den vasodilatierenden und -konstriktorisches Faktoren herzustellen (*Wiest et. Lock 2003*).

All die genannten Vasokonstriktorsysteme wirken auf die Niere, wo sie zu einer verstärkten Wasserretention und Natriumrückresorption führen. Auf diese Weise tritt eine drastische Expansion des Plasmavolumens und des regionalen Blutflusses ein, was zusammen mit der Vasodilatation das Vollbild des HZS prägt. Hierbei ist typischerweise das Herzzeitvolumen (HZV) und die zirkulatorische Transitzeit von rechtem Vorhof zur Aorta erhöht, während der arterielle Blutdruck vermindert ist. Die Erhöhung des HZV resultiert dabei aus der Senkung der Vorlast sowie aus der gesteigerten Herzfrequenz. Das HZS stellt somit einen Kompensationsmechanismus der arteriellen Vasodilatation dar und korreliert außerdem in seiner Ausprägung mit dem Schweregrad der Leberzirrhose (*Braillon et al. 1986*).

Trotz der beschriebenen Expansion des gesamten Blutvolumens ist das zentrale Volumen bei Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose vermindert (*Henrikson et al. 1989*), da ein Großteil zum Auffüllen des splanchnischen Gefäßbettes verwendet wird, was als Splanchnikus-Pooling bezeichnet wird.

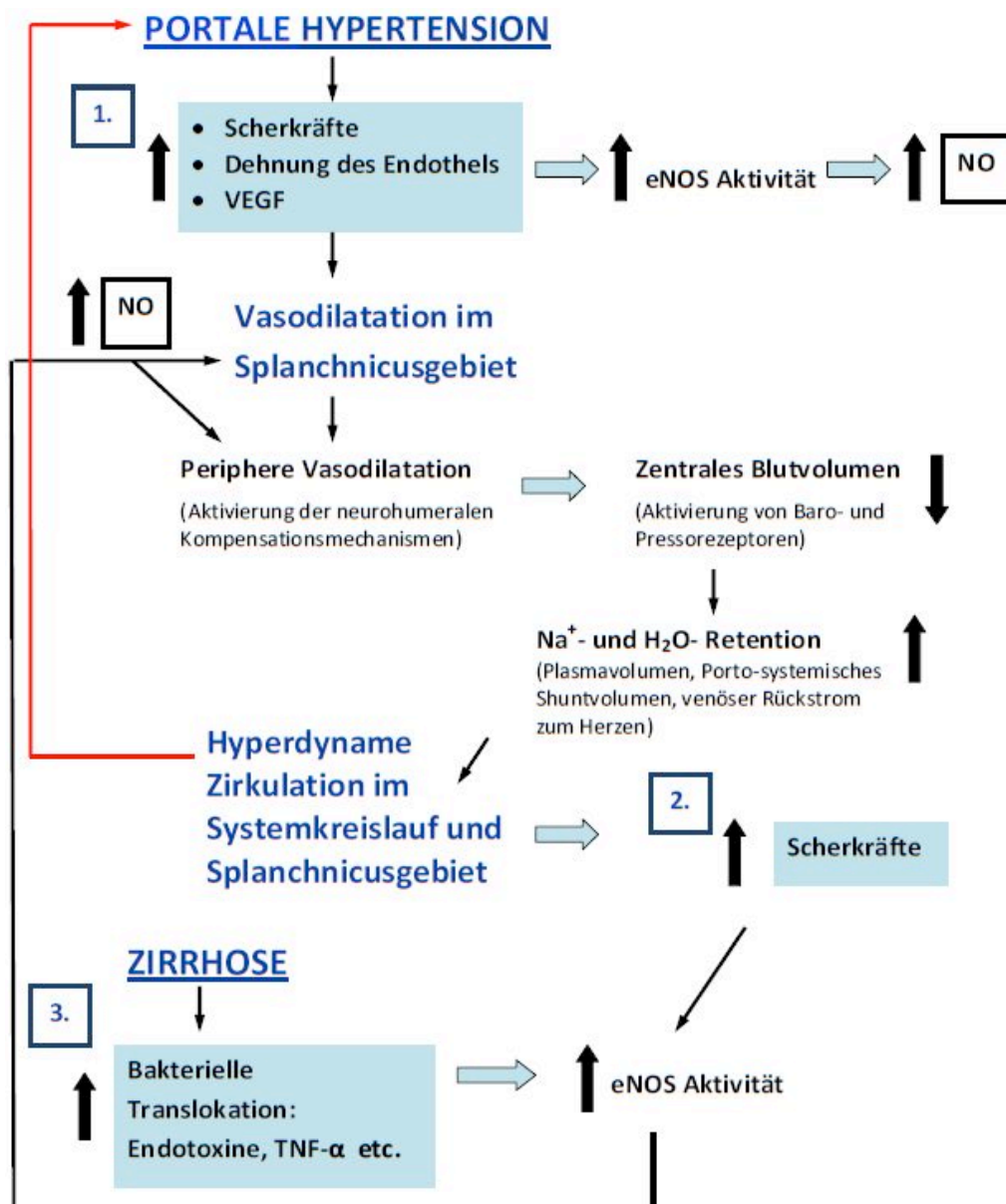
Mit Fortschreiten der Lebererkrankung reichen die Kompensationsmechanismen zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus nicht mehr aus und das Gleichgewicht verschiebt sich weiter zugunsten der vasodilatierenden Faktoren. Trotz der erhöhten Noradrenalin Spiegel bei Zirrhose (*Henrikson et al. 1984*) kommt es zu einer Weitstellung der Gefäße im Splanchnikusgebiet, die

sich bei weiterer Progredienz auch gegenüber exogenen Katecholaminen therapierefraktär zeigt. In Nieren, Muskeln, Gehirn und Haut bewirken die aktivierten Vasokonstriktorsysteme dagegen eine Vasokonstriktion (*Guevara M. 1998; Maroto et al. 1993*).

Eine portale Hypertonie geht mit einer verminderten Blutversorgung der Leber über die Pfortader einher. Trotzdem kommt es durch die beschriebenen Mechanismen zu einem vermehrten Bluteinstrom in das Splanchnikusgebiet und damit in das portovenöse System (*Vorobioff et al. 1984*). Dieses Blut wird allerdings über Umgehungskreisläufe an der Leber vorbei direkt dem systemischen Kreislauf zugeführt. In diesen Kollateralkreisläufen ist der Gefäßwiderstand jedoch im Vergleich zu einem gesunden portalvenösen System immer gesteigert (*Vorobioff et al. 1983*) und wird durch den vermehrten Bluteinstrom weiter erhöht. Dies bedeutet eine Progredienz der portalen Hypertension und der damit vergesellschafteten Komplikationen wie Aszites oder Varizenblutung.

### **2.3.2 Folgen und Komplikationen**

Das HZS könnte treffender als „*progressive vasodilatory syndrome*“ bezeichnet werden, weil die Vasodilatation den entscheidenden Faktor dieses Syndroms darstellt. Sie ist für alle vaskulären Veränderungen verantwortlich, welche nicht nur Folgen für die Zirkulation im Splanchnikusgebiet haben. Vielmehr muss das HZS als Multiorgan-Geschehen verstanden werden (*Iwakiri and Groszman 2006b*). So können sich gerade für das renale und pulmonale Organsystem weitreichende Komplikationen bis hin zum Hepatorenalen bzw. Hepatopulmonalen Syndrom ereignen. Andererseits begünstigt die Weitstellung zerebraler Gefäße die Diffusion neurotoxischer Substanzen. Ferner kann die hyperdynamische Zirkulation zu einer kardialen Überbelastung und der Entstehung eines high-output-failure führen (*Wiest and Lock 2000, 2003*).



**Abbildung 1:** Pathogenese des HZS mit Fokus auf die Splanchnikuszirkulation. (1) Faktoren, die bei portaler Hypertension früh hochreguliert werden. (2) Vermehrtes Plasmavolumen und HZV bewirken eine Zunahme der Scherkräfte. (3) Mechanismen, die bei Zirrhose zusätzlich die Entstehung des HZS fördern.

## 2.4 Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und Pathomechanismen bei

### Pfortaderhochdruck

Der kontraktile Mechanismus in der glatten Muskelzelle wird durch das teleskopartige Übereinanderschieben der Aktin- und Myosinfilamente getragen, was zu einer Verkürzung des Muskels führt. Die Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette (MLC) stellt hierfür die Voraussetzung dar. Diese Phosphorylierung bewirkt, dass die Myosin-ATPase durch Aktin aktiviert werden kann. Unter Ausbildung von Myosinquerbrücken interagieren die beiden Proteine Myosin und Aktin im Folgenden und es kommt unter ATP-Spaltung zur Muskelverkürzung (*Somlyo et al 1994, Rayement et al. 1993*).

Der Tonus der glatten Muskulatur wird somit durch das Ausmaß der MLC-Phosphorylierung bestimmt. Diese wird durch die beiden Gegenspieler MLC-Kinase (MLCK) und MLC-Phosphatase (MLCP) reguliert (*Somlyo et al. 2000, 2003*). Sämtliche vasoaktiven Stimuli erzielen ihre Wirkung, indem sie das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Enzymen beeinflussen. So verschieben vasokonstriktorisches Agenzien das Gleichgewicht zugunsten einer verstärkten Phosphorylierung, indem sie die MLC-Kinase aktivieren bzw. die MLC-Phosphatase inhibieren, während Vasodilatoren in gegensinniger Weise agieren (*Pfitzer 2001*).

Der Kontraktionsvorgang wird im glatten Gefäßmuskel durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eingeleitet. Diese wird bei der rezeptorunabhängigen Kontraktion über die Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und den konsekutiven transmembranären Einstrom getragen (*Ganitkevich et Isenberg 1991*). Bei der rezeptorvermittelten Kontraktion, wie etwa der  $\alpha_1$ -adrenergen, werden über die Stimulation G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren (GPCR) verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Hier wird  $\text{Ca}^{2+}$  zu Beginn der Kontraktion aus den intrazellulären Speichern des Sarkoplasmatischen Retikulums sowie der Mitochondrien mobilisiert (*Debbas et al 1975; Rasmussen et Barrett 1984*). Anschließend wird die Kontraktion durch extrazellulären Einstrom aufrechterhalten (*Khalil 1990, Smolyo 1994*).

Der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor sowie verschiedene andere Rezeptoren vasokonstriktorischer Agenzien sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt (*Somlyo et al. 1999*). Nach Rezeptorstimulation dissoziieren die  $\alpha$ -Proteine von ihren  $\beta/\gamma$ -Unterheiten ab und aktivieren in der Folge zwei wichtige Effektoren. Zum einen die Phospholipase  $\text{C}\beta$ , zum anderen die kleine GTPase RhoA (*Somlyo et Somlyo 1999*). Beide Enzyme sind Teil unterschiedlicher Kontraktionskaskaden, die zu einer verstärkten MLC-Phosphorylierung führen.

## 2.4.1 Vasokonstriktorisches Signalkaskaden

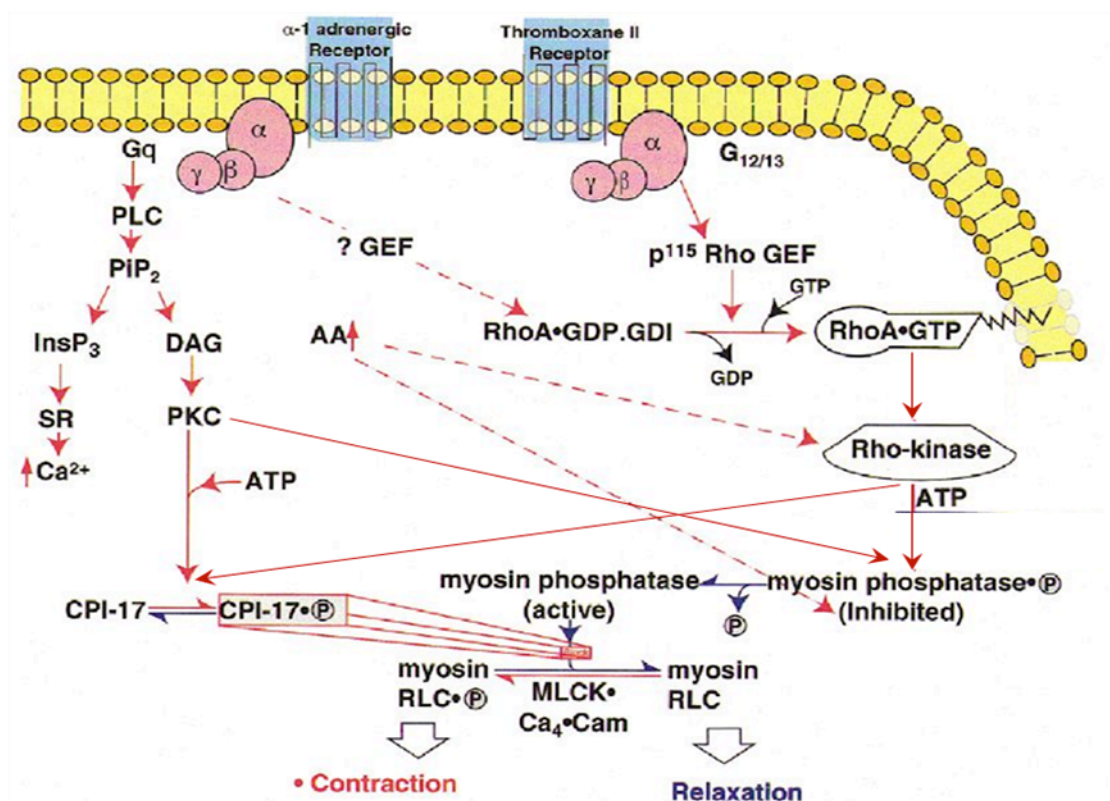
### 2.4.1.1 Phospholipase-C $\beta$ -Signalweg

Die Aktivierung der PLC $\beta$  führt über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zur Generierung der *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) (Berridge *et al.* 1984). Bei IP<sub>3</sub> handelt es sich um einen wasserlöslichen Metaboliten, der über die Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen auf dem Sarkoplasmatischen Retikulum einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und somit eine Membrandepolarisation bewirkt. Dies triggert die Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle der Plasmamembran. Über transmembranären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten kommt es nun zu einem Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. Während Ca<sup>2+</sup> im quergestreiften Muskel an Troponin bindet, bindet es im glatten Muskel an Calmodulin. Der dadurch entstehende Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex aktiviert das Enzym MLC-Kinase, welches die regulatorische Untereinheit der MLC an einem Serin-Rest in Position 19 phosphoryliert (Ito *et al.*, 2004; Kamm *et al.*, 2001). Der zweite *second messenger* der Signalkaskade, DAG, aktiviert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Diese inhibiert die MLC-Phosphatase, sodass die MLC-Phosphorylierung unabhängig von einem weiteren Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gesteigert werden kann. Dieser Mechanismus wird als Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung bezeichnet und wird neben dem IP<sub>3</sub>/DAG-Signalweg ebenfalls durch die RhoA/ROK-Kaskade erzielt (Pfitzer 2001, Somlyo *et al.* 1999, 2000, 2003).

### 2.4.1.2 RhoA/Rho-Kinase-Signalweg

Dieser Signalweg ist von der DAG/PKC-Kaskade vollkommen unabhängig, führt aber letztlich genauso wie diese über eine Inhibition der MLC-Phosphatase zu einer verstärkten Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung. Hierbei wird die MLCP durch zweierlei Mechanismen inhibiert. Zum einen auf direktem Weg durch Phosphorylierung von Threonin-Resten in Position 696 und 854. Während die Thr696-Phosphorylierung die katalytische Untereinheit des Enzyms hemmt (Feng *et al.* 1999), bewirkt die Thr853-Phosphorylierung ein Abdissoziieren der MLCP von Myosin und damit eine Entfernung von seinem Substrat (Velasco *et al.* 2002). Zum anderen kommt es durch die Aktivierung des MLCP-Inhibitors CIP-17 zu einer indirekten Hemmung der MLCP. CIP-17 wird sowohl durch die Rho-Kinase als auch durch die Proteinkinase C phosphoryliert. Dies stellt somit eine Kreuzungsstelle beider Signalwege dar (Eto *et al.* 2001). Die Phosphorylierung steigert das inhibitorische Potential gegenüber der MLCP um den Faktor 1000 bis 2000 (Kitazawa *et al.* 2003; Somlyo *et al.* 2003). Die kleine GTPase RhoA ist wie die meisten GTPasen in GTP-gebundener Form aktiv und GDP-beladen inaktiv. Die zytosolisch inaktive Form von RhoA wird durch

RhoGDI (Guanin-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor) komplexiert (Longenecker *et al.* 1999). Rho-GEFs (Guanine-Nucleotide-Exchange-Factors) aktivieren zytosolisches RhoA-RhoGDI, indem sie einen Nukleotidaustausch stimulieren (GTP ersetzt GDP). Weiterhin scheint eine Translokation zur Plasmamembran der nächste entscheidende Schritt für die Aktivierung des Enzyms zu sein (Gong *et al.*, 1997; Somylo *et al.* 2000; Urban *et al.* 2003b). Die Serin/Threonin-Kinase (Rho-Kinase) stellt den Effektor von RhoA-GTP dar. Der genaue Mechanismus der Rho-Kinase-Aktivierung durch RhoA konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden, jedoch wird eine Lokalisation beider Proteine zur Plasmamembran angenommen (Leung *et al.* 1995). Neben RhoA-GTP scheint zudem Arachidonsäure (AA) die Rho-Kinase aktivieren zu können (Fu *et al.* 1998; Feng *et al.* 1999). Außerdem bewirkt AA zumindest bei In-vitro-Versuchen eine Inhibierung der MLCP (Gong *et al.* 1995).



**Abbildung 2:** Regulation von Myosin im glatten Gefäßmuskel. Die Aktivierung der Rho-Kinase durch Rho-GTP bewirkt eine Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der Myosin-Phosphatase (RLC). Dies führt indirekt über eine MLCP-Inhibierung zu einer verstärkten RLC-Phosphorylierung. Eine Aktivierung des RhoA-Signalwegs findet in vielen Geweben u.a. über eine Stimulation des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors statt (siehe unten). Ebenso führt der PKC-Signalweg über eine Aktivierung des MLCP-Inhibitors CPI-17 zu einer verstärkten Myosin-Phosphorylierung. Weiterhin kann ein Anstieg von Arachidonsäure (AA) eine Aktivierung der Rho-Kinase sowie – zumindest in vitro – eine MLCP-Inhibierung bewirken.

## 2.4.2 Vasodilatierende Signalkaskaden

Eine Relaxation des glatten Gefäßmuskels wird durch die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP erzeugt (*Hofmann et al. 2000; Sausbier et al. 2000; Kimura et al. 1982; Orlov et al. 1996; Nelson et al. 2011*). Beide aktivieren ihre entsprechenden Effektoren, die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), welche eine Schlüsselrolle unter den vasorelaxierenden Agenzien einnehmen. Sie erzeugen entweder über eine Interaktion mit Kontraktionskaskaden oder über Aktivierung der MLC-Phosphatase eine Relaxation des Gefäßmuskels. Beide Nukleotide werden durch spezifische Zyklasen synthetisiert, die Guanylatzyklasen (GCs) und die Adenylatzyklasen (ACs). Diese werden wiederum durch verschiedene Signalmoleküle, zirkulierende hormonelle, neuronale oder parakrine Mediatoren, aktiviert (*Sausbier et al. 2000; Orlov et al. 1996, Nelson et al. 2011*).

### 2.4.2.1 Stickstoffmonoxid

Einen der bedeutendsten und am besten charakterisierten Vasodilatoren stellt hierbei Stickstoffmonoxid (NO) dar. Dieses äußerst wichtige Signalmolekül wirkt sowohl auto- und parakrin als auch als Neurotransmitter. *Fruchgott* und *Zawazki* gehörten 1980 zu den ersten, die die Existenz dieses Botenstoffs vermuteten. Sie stellten bei In-vitro-Perfusionen fest, dass die vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin im deendothelialisierten Gefäßbett weitaus weniger effektiv ist als bei intaktem Endothel. Aufgrund dieser Beobachtung postulierten sie die Existenz eines endothelialen Faktors, der für die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation verantwortlich ist (*Fruchgott and Zawazki 1980*).

Die Synthese von Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure Arginin wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert. Bisher konnten drei Isoformen dieses Enzyms identifiziert werden (*Sessa et al. 1994*). Unter normalen Bedingungen wird endogenes NO durch die kontinuierlich exprimierten Isoformen, die endotheliale NOS (eNOS) sowie die neuronale NOS (nNOS), gebildet. Letztere ist in perivaskulären non-adrenergen und non-cholinergen (NANC) Neuronen enthalten. Die dritte Isoform (iNOS) wird hauptsächlich in Makrophagen exprimiert und durch Lipopolysaccharide (LPS) und inflammatorische Zytokine induziert. Es gibt eine Reihe verschiedener Reize, die auf die NOS als Stimulus wirken. So wirken mechanische und physikalische Reize wie ein gesteigerter Blutfluss, intravasale Scherkräfte oder auch ein Abfall des O<sub>2</sub>-Partialdrucks auf die eNOS stimulierend (*Hori et al. 1998; Griffith T. 1995; Pohl U. et al. 1986*). Außerdem weiß man heute, dass, wie *Furchgott* bereits richtig vermutet hatte, auch eine rezeptorvermittelte Freisetzung von NO durch Acetylcholin, Bradykinin u.a. existiert. Die



neuronale NOS wird hingegen durch Membrandepolarisation aktiviert und führt auf diesem Weg zu einer Vasodilatation (*Toda et al. 1997*).

Neuere Untersuchungen belegen, dass die Regulation und Aktivierung der n- und eNOS zudem mit Chaperonen, insbesondere dem Hitze-Schock-Protein 90 (HSP90), eng verknüpft sind. So führen aktivierende Stimuli wie etwa intravasale Scherkräfte zur Assoziation von HSP90 mit NOS und konsekutiv zu einer verstärkten NO-Freisetzung. Vermutlich wirkt HSP90 als ein allosterischer Modulator, der die aktive Form der NOS stabilisiert und die Organisation des NOS-Komplexes mit anderen regulatorischen Proteinen erleichtert (*Garcia-Cardena et al 1998*).

Stickstoffmonoxid ist ein äußerst kurzlebiges, lipophiles Gas, das seine Wirkung erzielt, indem es in den glatten Gefäßmuskel diffundiert und dort an die lösliche GC bindet. Diese stellt also den für NO zuständigen Rezeptor dar. Durch die Aktivierung von sGC kommt es zu einem Anstieg des *second messengers* cGMP, welcher die PKG aktiviert (*Hofmann et al. 2000, Sausbier et al. 2000*). Dies hat über multiple Mechanismen eine Relaxation des Gefäßmuskels zur Folge. So wird die MLCP durch die PKG aktiviert, während gleichzeitig eine Aktivierung des MLCP-Inhibitors CIP-17 gehemmt wird (*Etter et al. 2001*). Ferner wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch eine Hemmung des transmembranären Einstroms sowie der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation vermindert (*Hofmann et al 2006; Lincoln et al. 2001*). Hohe cGMP-Konzentrationen gehen des Weiteren mit einer Inhibition des Thromboxan-Rezeptors (*Reid et al. 2003*) sowie der RhoA-Aktivierung (*Sauzeau et al. 2000; Sawada et al. 2001*) einher.

Die PKA bewirkt hingegen vornehmlich über eine Verminderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Vasodilatation (*Kimura et al. 1982; Orlov et al. 1996*) und verfügt dementsprechend im Vergleich zur PKG nur über eine limitierte Zahl vasodilatierender Mechanismen.

### 2.4.3 Pathomechanismen bei Pfortaderhochdruck

Der Vasodilatation im Splanchnikusgebiet kommt in der Entstehung des hyperdynamen Zirkulationssyndroms und der damit verbundenen Komplikationen die Schlüsselrolle zu. Es sind im Wesentlichen zwei Pathomechanismen, die zu dieser Vasodilatation führen. Eine tragende Rolle spielt hierbei zum einen die pathologisch gesteigerte Synthese von relaxierenden Agenzien, allen voran Stickstoffmonoxid (*Groszman et al. 1999*). Zum anderen führt die Hyporeaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren zu einem verminderten Gefäßtonus und konsekutivem Blutpooling im Splanchnikusgebiet (*Groszman et Franchis 1999*).

### 2.4.3.1 Stickstoffmonoxid

Eine Vielzahl von Studien am Tiermodell sowie an Patienten mit Zirrhose identifizierte die Überproduktion von NO als Schlüsselereignis in der Pathogenese der vaskulären Hyporeaktivität. So konnte bei zirrhatischen Patienten eine übersteigerte mesenteriale NO-Synthese einhergehend mit erhöhten systemischen cGMP- und Nitrat/Nitrit-Konzentrationen nachgewiesen werden (*Albornoz et al. 2001; Kirstetter et al. 1997*). Ferner existiert eine breite Studienlage, die erhöhte NO- und cGMP-Spiegel im Tiermodell belegt, etwa bei Ratten nach portaler Venenligatur (*Sieber et Groszman 1992, Groszman et al. 1992*), mit CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberzirrhose (*Kirstetter et al. 1997*) oder mit sekundärer biliärer Zirrhose (*Kimpel et al. 1998*).

Bei all diesen Tiermodellen sowie bei zirrhatischen Patienten konnte eine verstärkte Expression der eNOS beobachtet werden (*Martin et al. 1992*). Dabei zeigten Untersuchungen an Ratten mit Pfortaderligatur, dass die Hochregulierung der eNOS-Expression den hämodynamischen Veränderungen vorausgeht (*Wiest et al. 1999*). Dies ist vermutlich auf einen VEGF-getriggerten Mechanismus zurückzuführen. VEGF wird hier bereits in den ersten Stunden nach Ligatur vermehrt freigesetzt, während sich eine Vasodilatation erst nach Tagen einstellt (*Colombato et al. 1992, Abalde et al 2006*). Weitere wichtige Trigger der eNOS-Dysregulation scheinen neben vermehrt auftretenden Scherkräften (*Tazi et al. 2002*) eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Synthese (*Lopez-Talavera et al. 1995*) sowie die bakterielle Translokation zu sein (*Wiest et al. 1999b*). TNF $\alpha$  ist bei Patienten mit Zirrhose vermehrt im Blut nachzuweisen (*Wiest et al. 1999b*). Eine TNF $\alpha$ -Inhibierung konnte die eNOS-Dysregulation sowie die hämodynamische Situation teilweise normalisieren (*Lopez-Talavera et al. 1995*). Fortgeschrittene Stadien der Leberzirrhose gehen mit einer zunehmenden Permeabilität des Verdauungstrakts und erhöhten Plasmaspiegeln von Endotoxinen, allen voran LPS, einher. Dieser Vorgang wird als bakterielle Translokation bezeichnet und scheint an einer übersteigerten eNOS-Expression beteiligt zu sein (*Wiest et al. 1999b*). Es bleibt jedoch zu klären, inwiefern dies einen unabhängigen Trigger darstellt oder Teil des TNF $\alpha$ -Mechanismus ist, da auch LPS eine TNF $\alpha$ -Produktion bewirken kann (*Schwabe et al. 2004*).

Eine weitere Quelle der exzessiven NO-Synthese scheint jedoch die neuronale Isoform des Enzyms darzustellen. Untersuchungen am mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten belegten eine gesteigerte nNOS-Expression sowie eine erhöhte NO-Freisetzung bei elektrischer Stimulation perivaskulärer Neuronen (*Jurzik et al. 2005*).

All diese Ergebnisse belegen, dass die mesenterialen Gefäßwände von PVL-Tieren um ein Vielfaches mehr an eNOS-Proteinen enthalten und die perivaskulären Nervenendigungen einen gesteigerten Gehalt an nNOS aufweisen. Aus diesem Grund ist auch die Inhibierung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation bei PVL-Tieren deutlich effektiver und das Ansprechen auf

Vasodilatoren wie Acetylcholin deutlich gesteigert (*Niederberger et al 1996, Wiest et al 1999, Shah et al 1999*).

Als weiteren Mediator dieser pathologisch gesteigerten Expression der n- und eNOS konnte zudem HSP90 identifiziert werden. So zeigten *Shah et al.* bei In-vitro-Perfusionen, dass durch die selektive Inhibierung des HSP90-Signalwegs durch Geldanamycin die Hyporeaktivität des mesenterialen Gefäßbettes gegenüber Methoxamin von PVL-Ratten zu großen Teilen reversibel war (*Shah et al. 1999*).

#### **2.4.3.2 Verminderte Gefäßreaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren**

Die beschriebene Datenlage belegt eindrücklich die zentrale Rolle von NO in der Pathogenese des HZS. Jedoch darf man den Fokus nicht ausschließlich auf diesen Pathomechanismus richten. Auch nach Entfernung des Endothels und Inhibierung der NOS bleibt eine Rest-Hyporeaktivität bestehen (*Heinemann et al. 1997; Wiest et al. 2006*). Zahlreiche Studien konzentrierten sich daher auf das verminderte Ansprechen gegenüber endogenen Vasokonstriktoren und fanden in Endothel- und NO-unabhängigen Wegen Erklärungen für die Hypokontraktilität bei Pfortaderhochdruck (*Heller et al. 1999; Schepke et al. 2001; Wiest et al. 2006*). Ebenso wie diese Studien, hatte auch diese Arbeit das Ziel, die von NO unabhängigen Wege zu erforschen und auf diese Weise Einblicke in die Entwicklung der vaskulären Hyporeaktivität zu gewinnen.

#### ***Rezeptoren***

Das reduzierte Ansprechen auf endogene Vasokonstriktoren ist sowohl für die experimentelle als auch für die portale Hypertonie beim Menschen ein seit langem bekanntes Phänomen (*Groszmann et Franchis 1999*). Dabei kann die vaskuläre Hyporeaktivität nicht nur als Effekt der verstärkten Zirkulation endogener Vasodilatoren bei portaler Hypertonie interpretiert werden, sondern muss als eigenständiger Pathomechanismus angesehen werden. Bereits sehr früh existierten Studien, die ein vermindertes Ansprechen gegenüber Noradrenalin und Angiotensin belegten (*Laragh et al. 1963; Kiel et al. 1985*). In der Folge wurde dies ebenso für Methoxamin (*Sieber und Groszmann 1992*), Endothelin (*Hartleb et al. 1994*) und Vasopressin (*Joh et al. 1993*) nachgewiesen. Der Organismus versucht dieser Hyporeaktivität und den zirkulierenden Vasodilatoren entgegenzuwirken, indem er die Konzentrationen von konstriktorischen Mediatoren erhöht. So wurden bei Patienten mit Leberzirrhose beispielsweise erhöhte Spiegel von Angiotensin und Arginin-Vasopressin beschrieben (*Schroeder et al. 1976; Bichet et al. 1982*). Einen entscheidenden Kompensationsmechanismus stellt hier die Stimulation des sympathischen Nervensystems dar. Dadurch erhöhen sich der zentrale Sympathikotonus (*Floras et al. 1991*) und

die Plasmakonzentrationen von Noradrenalin (*Bernardi et al. 1987; Henriksen et al. 1984*). Mit dem Fortschreiten der Leberzirrhose und des Pfortaderhochdrucks reichen die hohen Spiegel an endogenen Katecholaminen für die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus jedoch nicht mehr aus und auch exogene Katecholamine können die arterielle Hypotonie nicht mehr beseitigen. Anfänglich vermutete man daher, die hohen Konzentrationen würden zu einer Down-Regulation der Katecholaminrezeptoren und deren Affinität führen. Diese Annahme konnte jedoch von verschiedenen Studien widerlegt werden. Das sympathische Nervensystem reguliert den peripheren arteriellen Widerstand v.a. durch den  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor (AR). Dieser zeigte bei portaler Hypertonie jedoch keine verminderte Affinität gegenüber Noradrenalin (*Liao et al. 1994*). Die Verwendung eines Thrombozyten- bzw. Lymphozyten-Modells ergab zudem bei Patienten mit Leberzirrhose auch keine Down-Regulation des  $\alpha_1$ -ARs (*MacGilchrist et al. 1990*). *Neef* und Mitarbeiter kamen sogar zu dem Schluss, dass einige der vasokonstriktionsvermittelnden Rezeptoren bei Zirrhose überexprimiert werden. Diese Aussage basiert auf Untersuchungen, welche die mRNA verschiedener Zellrezeptoren bei Zirrhosepatienten detektierten. Untersucht wurden der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor mit seinen Subtypen „a“, „b“ und „c“, der Angiotensin-II(Typ 1)-Rezeptor (AT II), der Arginin-Vasopressin-Rezeptor 1a (V1a) sowie der Endothelinrezeptor A und B (ETA und ETB). Hierbei fanden sich erhöhte mRNA-Spiegel für  $\alpha_{1b}$ AR, AT II, V1a und für die ETA- und ETB-Rezeptoren. Signifikante Unterschiede in der Expression der anderen Rezeptoren, einschließlich des  $\alpha_{1a}$ -Adrenorezeptors, wurden nicht nachgewiesen (*Neef et al. 2003*). Somit ist die Ursache der vaskulären Hyporeaktivität nicht etwa auf Rezeptorebene zu suchen, vielmehr handelt es sich um einen Post-Rezeptordefekt mit einer Störung intrazellulärer Kaskaden. Diese Störungen auf intrazellulärer Ebene bewirken offensichtlich auch, dass die rezeptorunabhängige Kontraktion bei Stimulation mit hohen KCl-Dosen alteriert ist (*Sieber et Groszmann 1992; Karatapanis et al 1994; Wu and Benoit 1994*).

### ***Second messenger***

Den ersten direkten Nachweis für ein gestörtes *second messenger*-System erbrachten *Wu* und *Benoit*. Sie führten Untersuchungen an den Dünndarmarteriolen von portal hypertensiven Ratten durch. Diese Experimente ergaben, dass die Vasokonstriktion mesenterialer Arterien von PVL-Tieren bei der rezeptorunabhängigen Stimulierung von G-Proteinen abgeschwächt ist. Darüber hinaus konnte eine verminderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sowie eine eingeschränkte Funktion der PKC festgestellt werden (*Wu and Benoit 1994*). Weiterhin wurde ein vermindertes Ansprechen auf IP3 und erhöhte Konzentrationen der *second messenger* cGMP und cAMP bei Pfortaderhochdruck beobachtet (*Huang et al. 1995*). Zyklisches AMP ist über eine Aktivierung der PKA in der Lage, eine Vasodilatation zu verursachen. Mittels einer Inhibierung der PKA

konnte daher in manchen Geweben die Vasodilatation und Hyporeaktivität reduziert werden (*Wu and Benoit 1994, 1997*).

Die Quelle des Aktivators  $\text{Ca}^{2+}$  ist sowohl der Extra- als auch der Intrazellularraum. Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist sowohl die physiologische Quelle als auch der Speicher von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Um diese Zellfunktion wahrnehmen zu können, ist auf dem SR eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lokalisiert, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe fungiert (*Chamberlain et al. 1983*). Durch die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern kommt es zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Konzentration (*Kahlil et al. 1990*). Aus diesem Grund versuchten viele Studien, die Hyporeaktivität der Gefäße zu erforschen, indem sie die Aspekte der intrazellulären Kalziummobilisierung näher untersuchten. Hieraus ging die wichtige Erkenntnis hervor, dass es sich bei der Vaskulopathie bei Hypertension um ein systemisches, und nicht etwa um ein lokales Problem handelt. *Huang* und Mitarbeiter zeigten, dass die ausgesprochene Hyporeaktivität gegenüber KCl und Phenylepinephrin viele Gründe hat. So scheinen sowohl die rezeptorgekoppelte Bildung von Inositolphosphat als auch der spannungs- und rezeptorabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sowie die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung involviert zu sein (*Huang et al. 1996*). Dabei sind erhöhte cAMP-Konzentrationen für den gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt offensichtlich mitverantwortlich. Diese sorgen für eine gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Speicher des SR und reduzieren gleichzeitig den Einstrom in die Zelle (*Kimura et al. 1982; Orlov et al. 1996*).

### ***RhoA/Rho-Kinase***

Der RhoA/Rho-Kinase-Signalweg konnte erst 1995 identifiziert werden (*Leung et al. 1995*). Er erfüllt eine Reihe von Funktionen, wie etwa die Organisation des Zytoskeletts, der Zellmotilität und -proliferation (*Aelst et al. 1997; Olson et al. 1995*). Heute gilt zudem als erwiesen, dass er einen wesentlichen Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung darstellt (*Somlyo et al., 2000, 2003; Sakurada et al. 2001*). Aus diesem Grund rückte er in den Fokus vieler Untersuchungen, die zum Ziel hatten, eine Fehlregulierung der Kaskade mit einem abnormalen Gefäßtonus in Verbindung zu bringen. *Uehata* und Mitarbeiter zeigten bereits 1997, dass ein Defekt mit der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie zusammenhängt (*Uehata et al., 1997*). Es ist naheliegend, dass eine gegensinnige Fehlregulierung der Kaskade zu einer vaskulären Hypokontraktilität führen könnte. Untersuchungen der Aortenmuskulatur von zirrhatischen Ratten erbrachten, dass Agonisten wie Methoxamin nur eine verminderte RhoA-Aktivierung erzielten und RhoA posttranskriptional down-reguliert war (*Henneberg et al., 2006*). Auch in den Mesenterialarterien wurden bei portaler Hypertension verminderte Konzentrationen von Rho-

mRNA gemessen. Zudem waren im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich weniger RhoA-Proteine mit der Zellmembran assoziiert (*Benoit et al. 2004*). Dies ist insofern von Bedeutung, da es sich bei membrangebundenem RhoA um die aktive Form des Proteins handelt (*Somlyo et Somlyo 2000*).

Eine Störung des Rho-Signalwegs scheint somit in die Entstehung der vaskulären Hyporeaktivität involviert zu sein. Dabei könnten die erhöhten Spiegel von zyklischen Nukleotiden zu den Defekten der Kaskade beitragen. Dies trifft zum einen auf die pathologisch gesteigerten Konzentrationen von cAMP zu. Durch Inhibierung des Effektors von cAMP, der PKA, konnten beispielsweise die Konzentrationen von membrangebundenem RhoA wieder auf normale Werte angehoben werden (*Benoit et al. 2004*). Diese Beobachtung geht mit den Ergebnissen anderer Labore einher. Hier war die PKA in der Lage, RhoA zu phosphorylieren, was eine Dissoziation des Proteins von der Zellmembran in das Zytosol bewirkte (*Lang et al. 1996*). Zum anderen liegen auch Hinweise dafür vor, dass die Rho-abhängige Signaltransduktion durch die übersteigerten cGMP-Konzentrationen bei Zirrhose beeinflusst wird. Der *second messenger* von Stickstoffmonoxid, cGMP, vermittelt in der glatten Muskelzelle völlig konträre Effekte zu der Rho-Kaskade: cGMP führt zu einer verminderten -Sensibilität und unterdrückt die Proliferation der Gefäßmuskulatur (*Sawada et al. 2009; Sawada et al. 2000, Seasholtz et al. 1999*). Hohe cGMP-Konzentrationen sorgen für eine Aktivierung cGMP-abhängiger Kinasen. Diese sind ebenso wie die PKA in der Lage, RhoA zu phosphorylieren und dadurch zu inaktivieren. (*Sauzeau et al. 2000; Sawada et al. 2001*). Es wäre möglich, dass gerade in Situationen der NO-Überproduktion dieser Weg verstärkt beschritten wird und zu einer verminderten Kontraktilität beiträgt.

### ***PLC/PKC-Signalweg***

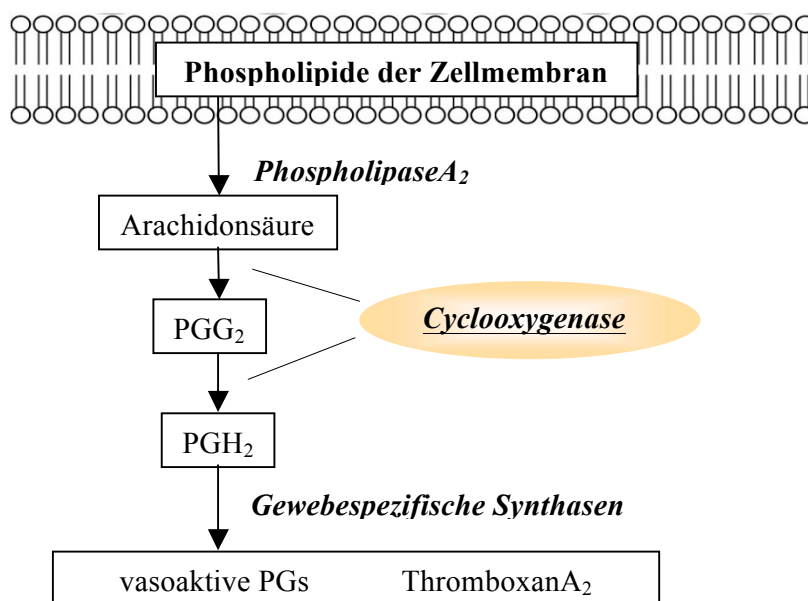
Die PKC gehört zu den intrazellulären Hauptsignalwegen der Vasokonstriktion und steuert auf zellulärer Ebene eine Vielzahl von Prozessen. Hierzu zählt neben der Kontraktion die Modulation von Wachstumsfaktoren, der Zellmorphologie und der Expression der Signaltransduktion. All diese Vorgänge verhalten sich bei portaler Hypertonie bei Patienten und Tieren abnormal (*Tazi et al. 1997; Heller et al. 1999; Spinozzi et al. 1991; Pateron et al. 1999*). Die Signaltransduktion scheint hierbei bereits unmittelbar nach Rezeptorstimulation fehlreguliert zu sein, wahrscheinlich auf Ebene der G $\alpha$ -Untereinheit. Bei der  $\alpha$ -adrenergen Stimulation führt dies zu einer verminderten PLC-Aktivierung und folglich zu einer verminderten IP<sub>2</sub> und DAG-Synthese (*Lin et al. 2005*). Die verminderte PLC-Aktivierung könnte zudem die verminderte Aktivierung der DAG-abhängigen Isoformen der PKC erklären (*Tazi et al. 2000*). Bisher wurden elf Isoformen der PKC identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass bei zirrhatischen Ratten die PKC $\alpha$  vermindert

expremiert wird. So war die Expression der zytosolischen und der membranständigen PKC $\alpha$  bei Kontrolltieren doppelt so hoch (*Tazi et al. 2002*). Ähnliches ist auch aus Studien an der Aortenmuskulatur (*Singer et al., 1992*) und des mesenterialen Gefäßbettes bekannt (*Haller et al. 1995*). Es ist zu vermuten, dass bei portaler Hypertonie außer der PKC $\alpha$  auch andere Isoformen fehlreguliert sind. Die PKC $\delta$  ist beispielsweise ausschließlich in zirrhotischen Ratten in membranständiger Form vorhanden, nicht aber in Kontrolltieren (*Tazi et al. 2000*). Viele weitere Arbeiten brachten eine verminderte PKC-Aktivität mit der vaskulären Hyporeaktivität in Verbindung und konnten zudem einen Teil der pathologischen intrazellulären Vorgänge genauer entschlüsseln. Beispielsweise wurde eine verminderte PKC-Aktivität als Ursache einer gestörten Funktion der Na/K-ATPase ausgemacht, was eine vaskuläre Hyporeaktivität zur Konsequenz hatte (*Lahaye et al. 1998*). Für die Störungen des zweiten intrazellulären Hauptsignalwegs, der Rho-Kaskade, ist ein Zusammenhang mit der Überproduktion NO zu vermuten. Auch die PKC könnte auf direktem oder indirektem Weg ein Ziel von Stickstoffmonoxid sein. Es wurde bereits belegt, dass NO das aktive Zentrum der PKC durch die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken inhibieren kann (*Gopalakrishna R. et al. 1993*). Auch auf indirektem Weg ist eine Inhibierung der PKC durch NO vorstellbar. Erhöhte cGMP-Spiegel könnten etwa eine Hemmung der Phosphatidylinositol-Hydrolyse vermitteln (*Langlands et al. 1990; Murthy et al. 1993*). Umgekehrt scheint aber auch eine aktive PKC den NO-Effekten entgegenwirken zu können. Dies geschieht etwa auf der Ebene der NO-Produktion durch eine Inhibierung der NOS (*Bredt et al. 1992*). Daneben vermag die PKC durch eine Inhibition der von NO aktivierten Signalwege eine Relaxation der glatten Muskulatur zu verhindern (*Murphy et al. 1994*). Es bleibt zu klären, welche Abläufe bei der Interaktion zwischen dem NO- und PKC-Signalweg letztlich eine Rolle spielen, sie scheinen jedenfalls bei Pfortaderhochdruck zu einer Hypokontraktilität zu führen (*Atucha et. al. 1997*).

## 2.5 Cyclooxygenase-Signalweg

Der Cyclooxygenase-Signalweg mündet in die Synthese verschiedener vasoaktiver Prostaglandine und wird durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> eingeleitet. Die verschiedenen Mitglieder der heterogenen PLA<sub>2</sub>-Superfamilie hydrolysieren die sn2-Esterbindung von Membranphospholipiden. Bei dieser Reaktion werden Lysophospholipide und AA als Spaltprodukte freigesetzt. Die Synthese sämtlicher Prostaglandine (PG's) ist vom

Arachidonsäuremetabolismus abhängig (Bergstrom et al. 1964). AA wird durch das Enzym Cyclooxygenase zunächst zyklisiert und oxidiert, wodurch  $\text{PGG}_2$  generiert wird. Aus dieser Reaktion leitet sich der Name des Enzyms ab. Die COX weist jedoch weiterhin eine Peroxidase-Aktivität auf, durch welche aus  $\text{PGG}_2$  in einem zweiten Schritt  $\text{PGH}_2$  entsteht (c.Hamberg et al., 1974).  $\text{PGH}_2$  kann dann durch verschiedene Isomerasen und Oxidoreduktasen in jegliches Prostaglandin sowie in Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TA}_2$ ) überführt werden.



**Abbildung 3:** Signaltransduktion des Cyclooxygenase-Signalwegs

### 2.5.1 Phospholipase $\text{A}_2$

Auch wenn verschiedene andere Enzyme wie die PLC theoretisch in der Lage sind, eine Freisetzung von AA zu bewirken, kommt der  $\text{PLA}_2$  in dieser Hinsicht sicherlich eine Schlüsselrolle zu. Die  $\text{PLA}_2$  gehört zu einer großen Familie an Enzymen, die die *sn2*-Esterbindung von Membranphospholipiden unter der Generierung von AA und Lysophospholipiden hydrolysieren. Diese heterogene Gruppe wird aufgrund der zellulären Lokalisation und der Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  für eine enzymatische Aktivität in drei Hauptgruppen unterteilt: Die sekretorische Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{sPLA}_2$ ), die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige cytosolische  $\text{PLA}_2$  ( $\text{cPLA}_2$ ) sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige intrazelluläre  $\text{PLA}_2$  ( $\text{iPLA}_2$ ) (Dennis et al. 1994).

Die  $\text{sPLA}_2$  ist ein niedermolekulares Enzym, das im Extrazellularraum gefunden wird. Sie ist in einer Tertiärstruktur aufgebaut, welche aufgrund von mehreren Disulfidbrücken gegenüber



Proteasen und denaturierenden Einflüssen eine hohe Stabilität aufweist (*Dennis et al. 1997; Tischfield et al. 1997; Balsinde et al. 1999*).

Bei der cPLA<sub>2</sub> handelt es sich um ein hochmolekulares Enzym (85kDa), das ubiquitär in praktisch allen menschlichen Geweben konstitutiv expremiert wird (*Kurusu et al., 1998; Krammer et al. 1996; Balsinde et al. 1999*). In der Molekularstruktur findet sich eine Ca<sup>2+</sup>-bindende Domäne. Bei einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird diese besetzt und dadurch eine Translokation des Enzyms zur Plasmamembran ermöglicht. Dies stellt für die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> den entscheidenden Schritt dar (*Clark et al. 1991; Channon et al. 1990*). Viele Agonisten, die einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bewirken, führen dadurch zu einer erhöhten PLA<sub>2</sub>-Aktivität und damit zu deutlich höheren AA-Spiegeln (*Clark et al., 1995; Lin et al. 1992*). Des Weiteren wird die cPLA<sub>2</sub> über die Phosphorylierung an einem Serin-Rest reguliert. Bisher konnte lediglich für Kinasen aus der MAP-Kaskade auf diesem Weg eine gewisse Aktivitätssteigerung nachgewiesen werden. Aber auch verschiedene andere Proteinkinasen sind in der Lage, cPLA<sub>2</sub> zu phosphorylieren, so auch die PKC. Dabei führt dies anscheinend jedoch nicht zu einer verstärkten enzymatischen Aktivität. Trotzdem gibt es deutliche Hinweise dafür, dass die PKC auf Umwegen an der PLA<sub>2</sub>- und AA-Regulation beteiligt ist. Wahrscheinlich ist die PKC in der Lage, verschiedene Kinase-Kaskaden in Gang zu setzen, die schließlich zu einer Aktivierung der PLA<sub>2</sub> führen (*Qiu et al. 1994*). Hinsichtlich der enzymatischen Tätigkeit besitzt die PLA<sub>2</sub> eine gewisse Selektivität für AA-enhaltende Phospholipide (*Balsinde et al. 1999; Leslie et al. 1997; Clark et al. 1995*).

Bei der iPLA<sub>2</sub> handelt es sich um das zuletzt identifizierte Mitglied der PLA<sub>2</sub>-Superfamilie. Auch wenn einige Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten in verschiedenen Geweben schon seit geraumer Zeit bekannt waren (*Dennis et al. 1997*), konnte die iPLA<sub>2</sub> bezüglich ihrer Sequenz und Molekularstruktur erst vor kurzem genauer analysiert werden. Bisher sind drei Isoformen des Enzyms bekannt. Entsprechend der Reihenfolge ihrer Identifizierung werden sie als iPLA<sub>2</sub>α, iPLA<sub>2</sub>β und iPLA<sub>2</sub>γ bezeichnet (*Andrews et al. 1988; Tang et al. 1998; Mancuso et al. 2000*). Mit der cytosolischen PLA<sub>2</sub> haben sie die intrazelluläre Lokalisation, Molekulargewicht und katalytischen Mechanismen gemeinsam (*Balsinde et al. 1997*). Im Gegensatz zu dieser ist ihre enzymatische Aktivität jedoch nicht von Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen abhängig. Wie sich herausstellte, wird ein Großteil der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in vielen Zelltypen durch die iPLA<sub>2</sub> vermittelt; so etwa in pankreatischen β-Zellen (*Ramanadham and Wolf 1994*), Kardiomyozyten (*McHowat et al. 1998*), Neuronen des Hippocampus (*Wolf et al. 1995*) und auch in glatten Muskelzellen (*Miyake et al. 1992*). Intrazelluläre Phospholipasen A<sub>2</sub> sind auf zellulärer Ebene an der Regulation diverser Prozesse beteiligt, wie etwa der Produktion von Arachidonsäure (*McHowat et al. 1998; Murakami et al. 1999*) und konsekutiv von Eicosanoiden (*Akiba et al. 1999*), der Zellproliferation (*Rhoshak*

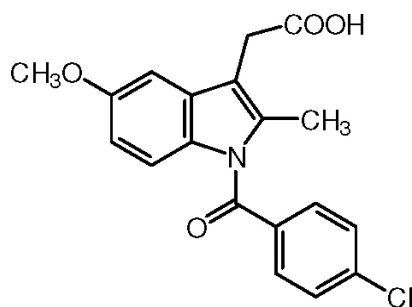
*et al. 2000*) sowie Apoptose (*Atsumi et al. 2000*) oder auch der Induktion der iNOS (*Isenovic and LaPointe 2000*). Ferner scheinen sie an der rezeptorvermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung und AA-Produktion beteiligt zu sein (*Guo et al. 2002*).

### 2.5.2 Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym des AA-Metabolismus. Es besitzt zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten, die an unterschiedlichen Orten des Enzyms lokalisiert sind (*Marshall and Kulmacz 1988*). Dabei handelt es sich neben der namensgebenden zyklisierenden und oxidierenden Funktion um eine Peroxidase-Aktivität. Letztere führt dazu, dass das Produkt der Cyclooxygenase-Reaktion,  $\text{PGG}_2$ , in einem weiteren Schritt in  $\text{PGH}_2$  überführt wird (*Hamberg et al. 1974*). Wie bereits früh vermutet, weiß man heute von der Existenz einer endogenen (COX-1) und einer induzierbaren (COX-2) Isoform (*Garavito and DeWitt 1999; Marnett 2000; Smith et al. 2000*).

### 2.5.3 Synthetische Cyclooxygenase-Inhibitoren

Aspirin ist ein Inhibitor, der COX-1 und COX-2 kovalent modifiziert, indem er einen Serin-Rest acetyliert. Aspirin stellt dabei den einzigen Vertreter von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSARs) im medizinischen Gebrauch dar, der auf diese Art wirkt. Die restlichen NSARs erzielen hingegen über kompetitive Inhibition ihre Wirkung. Bei dieser Klasse von NSARs muss man jedoch weiter zwischen zeitabhängigen und zeitunabhängigen Inhibitoren differenzieren. Diese Unterscheidung beruht darauf, dass die verschiedenen Inhibitoren unterschiedlich schnell im aktiven Zentrum binden und auch wieder unterschiedlich schnell aus diesem ausgewaschen werden können (*Marnett and Kalgutkar 1998*). So zeigen Inhibitoren wie Ibuprofen sehr rasche On- und Off-Raten (*Selinsky et al. 2001*). Andere dagegen, wie etwa Indomethacin, sind zeitabhängig. Bei zeitabhängigen NSARs kommt es zunächst zu einer lockeren, instabilen Bindung in der enzymatisch aktiven Domäne und schließlich in einem zweiten Schritt über elektrostatische Anziehungskräfte zur Ausbildung eines Komplexes, welcher sogar stabiler als die kovalente Modifizierung durch Aspirin ist (*Loll et al. 1994, 1996; Picot et al. 1994*). Dieser zweite Schritt stellt den zeitlimitierenden Faktor dar. Neben dieser Unterteilung der NSARs gibt es noch eine weitere, die sich auf die Spezifität der NSARs bezüglich der beiden COX-Isoformen bezieht. Dabei wird einerseits zwischen unselektiven Inhibitoren unterschieden, die sowohl COX-1 als auch COX-2 inhibieren. Indomethacin wird dieser Klasse zugerechnet. Dem gegenüber steht eine neuere Generation von NSARs, die in erster Linie potente Inhibitoren der COX-2 sind.



**Abbildung 4:** Chemische Strukturformel von Indomethacin  $C_{19}H_{16}ClNO_4$ .

#### 2.5.4 Prostaglandine

Prostaglandine sind an der Regulation von vielfältigen physiologischen Prozessen beteiligt, so etwa bei Entzündungsreaktionen.  $PGE_2$  und  $PGI_2$  verursachen z.B. die Entzündung der Synovia von Arthritis-Patienten (*Munich et al. 1995*) und potenzieren dabei das durch Bradykinin induzierte Schmerzempfinden (*Ferreira et al. 1972*). Ferner wurde  $PGE_2$  als dasjenige Molekül identifiziert, welches im Hypothalamus durch eine Sollwertverschiebung Fieber generiert (*Cao et al. 1998*). Im GI-Trakt wirken Prostaglandine auf verschiedene Weise zytoprotektiv. Dies geschieht durch einen hemmenden Einfluss auf die HCl-Produktion im Magen, durch eine Stimulation der Mukussekretion (*Johansson and Kollberg 1979*) sowie eine verstärkte Schleimhautdurchblutung (*Konturek et al. 1980*). Weiterhin kommen den PGs wichtige Funktionen im kardiovaskulären System zu, wo sie ganz unterschiedliche und zum Teil auch gegensätzliche Aufgaben erfüllen. So können  $PGE_2$  und  $PGF_{2\alpha}$  in Abhängigkeit vom untersuchten Gefäßbett entweder vasodilatierend oder vasokonstriktorisches wirken. Von Bedeutung ist ferner das endothelial synthetisierte  $PGI_2$ . Dieses stellt das Prostazyklin-Synthase-Enzym dar und reguliert ebenso die Thrombusbildung wie auch den vaskulären Tonus, indem es vasokonstriktorisches Faktoren entgegenwirkt (*Fitzgerald et al. 1983*). Schließlich ist bekannt, dass inflammatorische Zytokine Immunzellen zur PG-Sekretion stimulieren (*Fels et al. 1986*) und diese immunmodulatorisch wirken.  $PGE_2$  inhibiert beispielsweise die IL-2 und  $INF\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten (*Betz and Fox 1991*). Neben den aufgeführten Effekten beeinflussen PGs noch viele andere Prozesse im Organismus, etwa in der Lunge, der Niere oder dem Gehirn. Auch an pathologischen Vorgängen, wie der Pathogenese von malignen Erkrankungen (*Levine et al. 1981*) oder der Alzheimer-Krankheit (*Hendrie et al. 1997*), scheinen PGs beteiligt zu sein. All diese Effekte werden durch die Bindung an PG-Rezeptoren vermittelt. Dabei handelt es sich in

der Regel um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (Simmons et al 2004).

### 2.5.5 Thromboxan A<sub>2</sub>

Es ist bekannt, dass Thromboxan-A<sub>2</sub>-Rezeptoren an mindestens vier verschiedene G-Proteine gekoppelt sein können, die verschiedene *second messenger*-Systeme in Gang setzen. Dazu gehören IP3/DAG, cAMP, die kleinen G-Proteine Rho und Ras, die Proteinkinase C und A und andere. Es scheint weiterhin, dass die Präferenz für einen dieser Signalwege nicht nur zell- sondern auch organspezifisch ist (Huang et al. 2005). Dies lässt sich auch für die glatte Gefäßmuskulatur konstatieren. So konnte unter der Verwendung des PKC-Inhibitors Calphostin C im pulmonalen Gefäßbett keine verminderte Kontraktionsfähigkeit festgestellt werden (Janssen et al. 2001), in der mesenterialen Muskulatur erwies sich Calphostin C jedoch als effizienter Inhibitor (*unveröffentlichte Daten aus unserem Labor*). Neben der PKC scheint es in vielen Geweben v.a. die Rho-Kinase zu sein, die durch Thromboxan A<sub>2</sub> aktiviert wird (Sakurada et al. 2001; Janssen et al. 2001).

Was die Wirkung von TA<sub>2</sub> auf die Gefäßwände und die vaskuläre Muskulatur betrifft, so wurde diese bisher in akute und chronische Effekte unterteilt. Akut wirkt TA<sub>2</sub> als prothrombotisches Agens, das die entscheidenden Vorgänge der primären Hämostase einleitet und ein äußerst potenter Vasokonstriktor ist (Chan et al. 1986; Moncada et Higgs 1986). Was die chronische Wirkung betrifft, so sah man TA<sub>2</sub> v.a. im Zusammenhang mit der Pathogenese von arterieller Hypertonie, Herzinsuffizienz, zerebralen Vasospasmen und anderen vaskulären Fehlregulierungen. Dies schien dabei vornehmlich auf das kardiovaskuläre System von Männern zuzutreffen (Chan et al. 1986). Dem gegenüber stehen neuere Erkenntnisse, die zeigen, dass TA<sub>2</sub> auch an der Blutdruckregulation unter physiologischen Bedingungen beteiligt ist. Besonders interessant ist die Erkenntnis, dass TA<sub>2</sub> hierbei v.a. als Gegenspieler von NO und anderen Vasodilatoren gesehen werden muss. Bei Frauen ist beispielsweise eine Östrogen-vermittelte Hochregulation der NOS zu beobachten. Um eine Hypotonie zu verhindern, kommt es parallel zu einer verstärkten TA<sub>2</sub>-Synthese (Seller et Stallone 2008). Dieser protektive Effekt von TA<sub>2</sub> scheint jedoch auch in pathologischen Situationen, unabhängig vom Geschlecht, zum Tragen zu kommen. So steuert TA<sub>2</sub> den vasodilatierenden Faktoren bei einer Sepsis entgegen und verhindert auf diese Weise die Entstehung einer vaskulären Hyporeaktivität (Yamada et al. 2003).

## 2.6 Evidenz für KCl-induzierte-Sensibilisierung

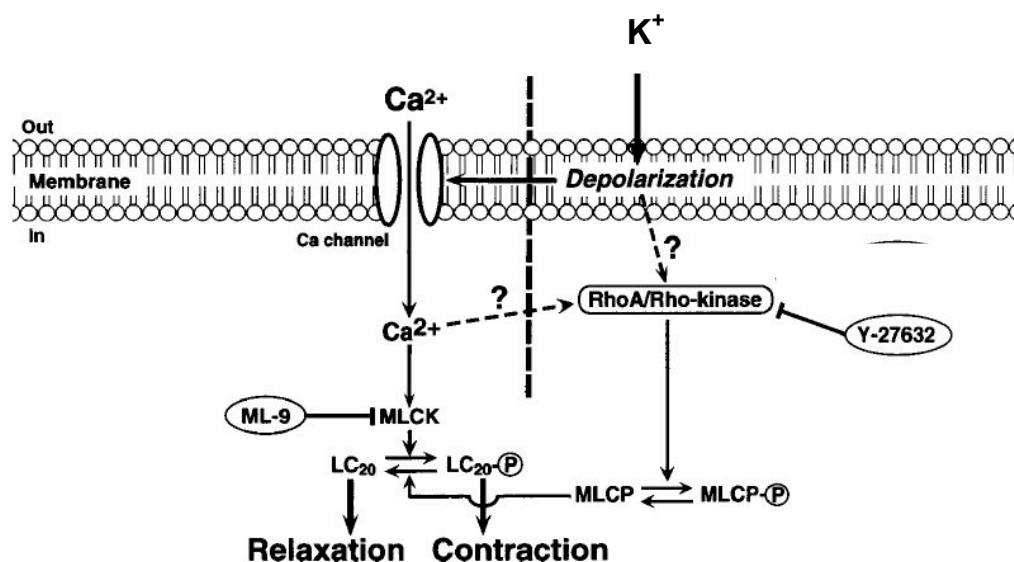
In der glatten Gefäßmuskulatur erzeugen kontraktile Stimuli über eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-vermittelte Aktivierung der MLC-Kinase eine Kontraktion. Davon abgesehen, sind verschiedene Stimuli in der Lage, unabhängig von einem weiteren Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Kraftentwicklung zu steigern; ein Mechanismus, der als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung bezeichnet wird und durch die Aktivierung von GPCR eingeleitet wird (*Somlyo et al. 1994*). Der vermeintlich einfache Stimulus KCl führt jedoch ausschließlich über die Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und die Aktivierung der MLCK durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex zu einer Vasokonstriktion (*Karaki et al. 1991; Ganitkevich et Isenberg 1991*). Dieses Modell geht auf Studien der späten 1980er Jahre zurück, worin GPCR-Agonisten für eine gegebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine größere Kraftentwicklung als der Stimulus KCl erzielten (*Karaki et al. 1988, 1989*). Seither werden hohe KCl-Dosen herangezogen, um Vergleiche zwischen der Signaltransduktion bei Membrandepolarisation (elektromechanische Signaltransduktion) und der rezeptorgekoppelten Kontraktion (pharmakomechanische Signaltransduktion) anzustellen.

Allerdings legen neuere Studien nahe, dass auch der vermeintlich einfache Stimulus KCl eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung erzielen kann (*Okada et al. 1994*). Hierfür verantwortlich scheint v.a. der RhoA/ROK-Signalweg zu sein. So konnte nach KCl-Stimulation eine verstärkte GTP-Beladung von RhoA sowie eine verstärkte Translokation zur Plasmamembran beobachtet werden (*Mita et al. 2002; Urban et al. 2003*). Ferner wurde eine gesteigerte MLCP-Inhibierung gemessen, welche durch ROK-Inhibierung zu über 50 % gehemmt wurde (*Sakurada et al. 2003*). In Mesenterialarterien von Ratten wurde die KCl-induzierte Kontraktion durch den selektiven ROK-Inhibitor Y-27632 in ähnlichem Ausmaß wie die Phenylephrin- oder Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ -induzierte Vasokonstriktion inhibiert (*Sakamoto et al. 2003*).

Der präzise Mechanismus, der eine solche KCl-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung vermitteln könnte, wurde noch nicht entschlüsselt. Hier kommen verschiedene Mediatoren einer RhoA-Kinase-Aktivierung in Betracht. Hohe KCl-Dosen könnten beispielsweise über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation aus intrazellulären Speichern die  $\text{iPLA}_2$  aktivieren (*Urena et al. 2009; Liu et al. 2009*). Ferner kann über einen transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom eine Aktivitätssteigerung der cytosolischen Isoform der  $\text{PLA}_2$  erzielt werden (*Hirabayashi et al. 2004*). Dies hätte eine verstärkte Arachidonsäure-Synthese zur Folge. Arachidonsäure gilt als äußerst potenter Aktivator der Rho-Kinase (*Feng et al. 1999*). Außerdem können aus AA sämtliche vasoaktiven Prostaglandine, insbesondere Thromboxan  $\text{A}_2$ , synthetisiert werden (*Bergstrom et al. 1964*). Diese könnten als auto- und parakrin wirkende Substanzen über eine GPCR-Stimulierung eine  $\text{Ca}^{2+}$ -

Sensibilisierung und ROK-Aktivierung bewirken. Ferner ist eine Aktivierung durch RhoA denkbar. So konnte durch Blockade auf Ebene von RhoA eine 30- bzw. 40-prozentige Inhibierung der KCl-vermittelten Kontraktilität beobachtet werden (*Otto et al. 1996; Mita et al. 2002*). Wie allerdings der Stimulus KCl eine RhoA-Aktivierung erzielen könnte, ist unklar. Ferner war in manchen Studien, abhängig vom untersuchten Gewebe, eine ROK-Aktivierung vom transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom abhängig (*Urban et al. 2004; Sakurada et al. 2003*).

Diesen neuen Einsichten in die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion sollte in dieser Arbeit Rechnung getragen werden. Es galt zu untersuchen, ob eine KCl-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung in unserer Versuchsanordnung stattgefunden hat und ob diese im Rahmen der vaskulären Hyporeaktivität bei PVL-Tieren einer Alteration unterworfen ist.



**Abbildung 5:** KCl-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung. Modifiziert nach *Mita et al. 2002*.

## 2.7 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y gehört zur Substanzklasse der Co-Transmitter. Hierbei handelt es sich um Stoffe, die zu den klassischen Neurotransmittern in den Varikositäten postganglionärer Neurone ko-lokalisiert sind und zusammen mit diesen freigesetzt werden. Aufgrund der gemeinsamen evolutionären Entwicklung ist NPY eng mit dem Pankreatischen Polypeptid (PP) und dem Peptid YY (PYY) verwandt (*Larhammar et al. 1996*). Trotz dieser Verwandtschaftsbeziehung unterscheiden sich die Peptide hinsichtlich Lokalisation, Funktion und Struktur (*Sundler et al. 1993; Michel et al. 1998*).

NPY ist im Bereich des peripheren Nervensystems in erster Linie in sympathischen Nervenendigungen lokalisiert. Das Peptid YY hingegen wird vorwiegend in endokrinen Zellen des Dünndarms synthetisiert und gespeichert. Außerdem kann es im Pankreas zusammen mit Glukagon sowie in den unteren Dünndarmabschnitten gemeinsam mit Enteroglukagon auftreten. Das pankreatische Polypeptid befindet sich überwiegend in den Langerhanschen Inseln der Bauchspeicheldrüse. Dort wird es allerdings nicht gemeinsam mit den anderen Botenstoffen des endokrinen Pankreas gespeichert. Jedoch ist zu bemerken, dass die Peptide der NPY-Familie in manchen Fällen auch von anderen Zelltypen exprimiert werden können.

Hinsichtlich der Funktion muss man zunächst festhalten, dass NPY zur Stoffklasse der Neurotransmitter zählt, während PYY und PP zu den Hormonen gerechnet werden. Trotzdem sind alle drei Peptide an der Regulation vieler verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt. Zu diesen zählen etwa die Stimulation der Nahrungsaufnahme, die Anxiolyse (*Colmers et Bleakman 1994; Wettstein et al. 1995*), die Hemmung der Insulinsekretion (*Wang et al. 1994*), die Regulation der Motilität im Intestinaltrakt (*Sheikh et al. 1991*), die Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung an der präsynaptischen Membran im zentralen sowie im peripheren Nervensystem (*Lundberg et al. 1995*) oder auch die Regulation der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion im GI-Trakt und in der Niere (*Playford et Cox 1996*). Weiterhin konnten steuernde Einflüsse auf den zirkadianen Rhythmus und die Freisetzung von Sexualhormonen aus der Hirnanhangsdrüse nachgewiesen werden (*Dumot et al. 1992*). Neben all diesen multiplen Funktionen sind v.a. noch die vasokonstriktorisches Eigenschaften von NPY aufzuführen (*Michel et Rascher, 1995*).

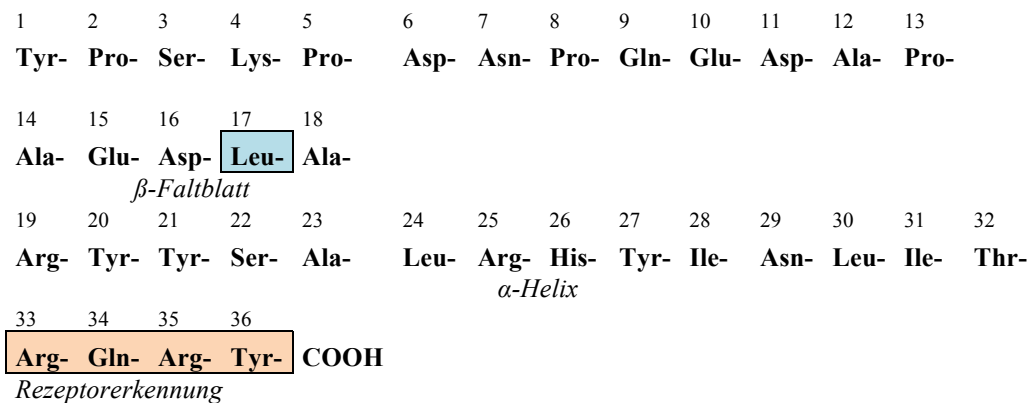
### 2.7.1 Struktur

Im Jahr 1982 ermöglichten neue technische Verfahren, eine Reihe bisher unbekannter biologisch aktiver Peptide nachzuweisen, darunter auch das PYY. Zunächst ging man davon aus, dass dieses

sowohl im GI-Trakt als auch im ZNS vorhanden sei und mit einem aus dem Gehirn isolierten Peptid identisch ist. Kurze Zeit später gelang es jedoch *Tatemoto* und Mitarbeitern zu zeigen, dass das neuronale Molekül zwar strukturelle und biologische Gemeinsamkeiten mit PYY aufweist, es sich aber um ein bisher nicht charakterisiertes Peptid handelt, das als Neuropeptid Y bezeichnet wurde (*Tatemoto et al. 1982a*). Bei der Bezeichnung nahm man auf die neuronale Lokalisation sowie auf die Aminosäure Tyrosin Bezug. Diese tritt sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende des Peptids auf und ist insgesamt fünfmal im Molekül enthalten. Dem wurde durch das Y in der Namensgebung Rechnung getragen (*Tatemoto et al. 1982a*). Die erste Sequenzierung von NPY wurde ebenfalls von *Tatemotos* Arbeitsgruppe durchgeführt und ergab, dass seine Primärstruktur zu 70 % mit PYY und zu 50 % mit PY übereinstimmt. Offensichtlich hatte man also eine neue Peptid-Familie identifiziert, die aus PYY, PY und eben NPY besteht (*Tatemoto et al. 1982b*). Bereits Jahre vor der Sequenzierung von NPY wurden PP-ähnliche Peptide mittels immunhistochemischen Methoden im Gehirn, aber auch im peripheren Nervensystem identifiziert (*Sundler et al. 1979*). Als dann schließlich NPY-Antikörper verfügbar waren, wurde ersichtlich, dass es sich bei NPY in keinem Fall um eine Substanz handelt, die nur im ZNS lokalisiert ist, sondern im gesamten Körper weite Verbreitung findet (*Lundberg et al. 1982*).

Ebenso wie die Primärstruktur von PP und PYY, besteht auch NPY aus 36 Aminosäuren. Dabei handelt es sich bei NPY um eine der evolutionär am höchsten konservierten Strukturen überhaupt. Wenn man die Sequenz in verschiedenen Säugetieren vergleicht, stellt man nur an zwei Positionen eine Variabilität der Aminosäuren fest. Somit ist NPY das zuletzt identifizierte, aber evolutionsgeschichtlich älteste Mitglied der Peptid-Gruppe (*Larhammer et al. 1993*). Die Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Primärstruktur innerhalb der NPY-Familie schlagen sich auch in der dreidimensionalen Anordnung der Peptide nieder. Dabei bilden die N-terminalen Aminosäuren eine Prolin-reiche helikale Struktur, der ein 152°-Loop folgt. Dieser hat zu Folge, dass die anschließende  $\alpha$ -Helix dem ersten Peptidabschnitt in antiparalleler Richtung gegenüberliegt. Das Molekül wird schließlich durch ein flexibles C-terminales Ende abgeschlossen. Durch die beschriebene Tertiärstruktur entsteht eine haarnadelähnliche Anordnung, die als „PP-fold“ bezeichnet wird. (*Fuhlendorff et al. 1990; Blundell et al. 1985*). Das NPY-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und kodiert eine aus 97 Aminosäuren bestehende Vorstufe, aus der durch proteolytische Spaltung NPY hervorgeht. (*Cerda-Reverter et Larhammar 2000; Minth et al. 1984*). Für die Interaktion mit dem Rezeptor sind die vier C-terminalen Aminosäuren sowie der N-terminale Bereich von Bedeutung (*Beck-Sickinger et al. 1990; Gordon et al. 1990*). Ebenso wie Peptid YY, wird auch NPY am N-terminalen Ende durch die Serin-Protease Dipeptidyl-Peptidase IV abgebaut (*Mentlein et al. 1993*).





**Abbildung 6:** Komplette Aminosäuresequenz von NPY (*modifiziert nach Tatemoto et al., 1982b*). Humanes NPY unterscheidet sich vom dargestellten tierischen NPY durch Methionin in Position 17 anstatt Leucin (*Cordor et al. 1984*).

### 2.7.2 Lokalisation

Neuropeptid Y ist wie bei allen Säugetieren auch beim Menschen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem fast ubiquitär vorhanden. Dabei ist es sehr häufig, jedoch nicht immer, als Co-Transmitter von Noradrenalin lokalisiert. So ergaben immunhistochemische Untersuchungen ein paralleles Verteilungsmuster von NPY und einem Enzym der NA-Synthese, der Tyrosin-Hydroxylase (*Gulbenkian et al. 1993*). Es konnten bisher verschiedene Peptide identifiziert werden, die in postganglionären sympathischen Nervenfasern neben Noradrenalin kolo- lokalisiert sind. Zu diesen Peptiden wird also auch NPY gerechnet (*Sundler et al. 1993; Lundberg J.M. 1986*). Dabei trifft dies in vielen Organsystemen in erster Linie auf die perivaskulären Neurone zu (*Edvinsson et al. 1984*). So wurde NPY in der Gefäßinnervation des Respirations- und Gastrointestinaltrakts, der Schilddrüse, des Uterus, der Samenleiter sowie der Koronar- und der zerebralen Gefäße in hohen Konzentrationen nachgewiesen (*Slunder et al. 1989*). Interessant ist hierbei, dass eine Sympathektomie zu einer 70-prozentigen Reduktion der NPY-Konzentration in den Hirngefäßen führte (*Edvinsson et al. 1987*). Besonders die kleinen Widerstandsgefäße und Arterien vom muskulären Typ werden von NPY-haltigen Neuronen innerviert. In den großen elastischen Gefäßen des arteriellen Systems und in den Venen ist die NPY-Innervation hingegen wenig ausgeprägt (*Lundberg et al. 1982*). Neuropeptid Y ist jedoch auch außerhalb von sympathischen Nervenzellen in vielen Organen enthalten. Dazu zählen etwa der Gastrointestinaltrakt, die Speicheldrüsen, die Schilddrüse, das Pankreas, das Urogenitalsystem und vor allem das Gehirn. Hier wird NPY im Allgemeinen in Zellen synthetisiert, die sich in ihrer

Funktion ähneln (z.B. Somatostatin- oder GABA-Zellen). Diese Zellarten finden sich in erster Linie in der Hirnrinde des Frontlappens. Aber auch in anderen Arealen wurden Zellen identifiziert, die neben Noradrenalin, Adrenalin oder Serotonin auch NPY produzieren. Die größte NPY-Dichte konnte allerdings in periventriculären Neuronen festgestellt werden (*Kalra et al. 1991; Sahu et al. 1989*).

### 2.7.3 Funktion

Entsprechend des ubiquitären Vorkommens von NPY ist es auch an multiplen Prozessen beteiligt. Im ZNS stimuliert Neuropeptid Y die Nahrungsaufnahme und ist vermutlich in der Ausbildung von Diabetes mellitus und Adipositas involviert (*Gerald et al. 1996*). Weiterhin spielt NPY eine Rolle bei der Freisetzung von Hormonen, der Anxiolyse und der Modulation der Gedächtnisfunktion. Auch in Stresssituationen und bei Aufregung sind erhöhte NPY-Spiegel zu messen (*Zukowska-Grojec et al. 1996; Lundberg et al. 1985*). Gleiches wurde zudem in pathologischen Zuständen für das kardiale System festgestellt. So finden sich bei Patienten mit Angina-pectoris-Beschwerden bzw. Myokardischämie erhöhte NPY-Konzentrationen (*Farnco-Cereceda et al. 1990*).

Wie bereits beschrieben, findet sich NPY sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem überwiegend in postganglionären sympathischen Nervenfasern als Co-Transmitter von Noradrenalin. So wurde z.B. eine hohe Dichte an NPY-Neuronen in der glatten Muskulatur der Arterien und Arteriolen der Lunge, des Harnwegesystems (*Allen et al. 1990*), im Pankreas (*Slunder et al. 1983*), der Schilddrüse (*Grunditz et al. 1984*) oder in der Nachbarschaft der Zerebralarterien gefunden. Aber gerade auch im Gastrointestinaltrakt sind NPY-Fasern rund um die Blutgefäße lokalisiert worden (*Lee et al. 1985*). Dabei übernimmt das in diesen sympathischen Neuronen enthaltene NPY blutdruckregulierende Funktionen (*Franco-Cereceda et Liska 1998*). Dies kann über drei verschiedene Wirkungsweisen erfolgen. Zum einen wurde für NPY per se eine direkte vasokonstriktorische Wirkung nachgewiesen, welche gegenüber einer  $\alpha$ -Adrenorezeptorblockade nicht sensibel war (*Lundberg et al. 1982*). Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass diese direkten vasokonstriktorisches Effekte bei mikromolaren NPY-Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, nicht auftreten (*Wiest et al. 2006*). Neben diesem direkten Weg erhöht NPY jedoch in erster Linie über zwei wesentliche Mechanismen den vaskulären Druck. Den ersten dieser Mechanismen stellt die Inhibierung von verschiedenen vasodilatierenden Effekten dar. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass NPY die Effekte der Vasodilatoren Acetylcholin, Substanz P und Adenosin in verschiedenen Gefäßbetten hemmt. In den koronaren und mesenterialen Gefäßen inhibiert NPY zudem die  $\beta_2$ -vermittelte Relaxation der Gefäßmuskulatur (*Han et al. 1987; Prieto et al. 2000*). Schließlich unterdrückte

NPY im Splanchnikusgebiet auch die Vasorelaxation, die durch die Stimulation von perivaskulären Neuronen induziert wird. Es ist bekannt, dass es sich hierbei um NANC-Neurone handelte (*Kawasaki et al. 1991*). Bei Pfortaderhochdruck ist im mesenterialen Gefäßbett ein verstärktes Ansprechen auf das vasodilatierende Agens Acetylcholin (*Heinemann et Stauber 1996*) und die Stimulation von NANC-Neuronen (*Sieber et al. 1997*) zu beobachten. Es zeigte sich, dass hier NPY diese verstärkte Sensibilität gegenüber diesen Vasodilatoren beseitigen konnte. Es ist bekannt, dass ACh- und NANC-Neurone vor allem über die Aktivierung der NOS und konsekutiven NO-Freisetzung eine Verminderung des Perfusionsdrucks erzeugen (*Toda et al. 1997, 2003*). Aus diesem Grund wird seit längerem spekuliert, ob die NPY Effekte zumindest zum Teil über eine Interaktion mit dem NO-Signalweg erzielt werden. Wie bereits beschrieben, führt die Interaktion zwischen HSP90 und NOS bei portaler Hypertonie zu einer pathologisch gesteigerten NO-Synthese. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass gerade NPY eine äußerst hohe Affinität bezüglich der regulatorischen Domäne von HSP90 aufweist. Weiterhin ist auffällig, dass der HSP90-Inhibitor Geldanamycin die NANC- und ACh-vermittelte Kontraktion inhibiert. Dieser behob in PVL-Ratten die Endothel-vermittelte Hyporeaktivität in gleicher Weise, wie die Verwendung von NPY (*Shah et al. 1999*). Wenn man all diese Daten mit einbezieht, so beweist das zwar keine Interaktion von NPY und HSP90, macht diese jedoch zumindest wahrscheinlich.

Schließlich existiert noch ein zweiter Weg, über welchen NPY befähigt ist, den vaskulären Perfusionsdruck zu erhöhen, nämlich über eine Potenzierung der rezeptorvermittelten Kontraktion. Insbesondere für die adrenerge Kontraktion existieren hierfür umfangreiche Studien. So wurde die Vasokonstriktion von Noradrenalin, Histamin, Prostaglandin, Endothelin, 5-Hydroxytryptamin oder Angiotensin II durch das Peptid signifikant verstärkt (*Edvinsson et al. 1984*). *Wiest* und Mitarbeiter zeigten, dass diese auch bei deendothelialisiertem Gewebe beobachtet werden kann und somit von der NO-Produktion unabhängig ist (*Wiest et al. 2006*). NPY fand in den aufgeführten Studien in Konzentrationen Verwendungen, in denen es per se keine vasokonstriktorischen Effekte erzielte. In dieser Arbeit wurde nun erstmals versucht, ähnliche potenzierende Effekte bei der rezeptorunabhängigen Kontraktion nachzuweisen.

### 2.7.3 Rezeptoren

Die Peptide der NPY-Familie agieren durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen. Schon früh wurde ersichtlich, dass mindestens zwei verschiedene Subtypen dieser Rezeptoren existieren. Bei Versuchen mit C-terminalen Fragmenten von NPY zeigte sich nämlich, dass diese Fragmente zwar einen Teil der ursprünglichen NPY-Effekte erzielen können, allerdings andere, wie etwa die vasokonstriktorischen Effekte, nicht beobachtet werden konnten (*Wahlestedt et al. 1986*). Aus diesen Untersuchungen ergab sich die

historische Unterteilung in einen Y1-Rezeptor, der nur durch das vollständige Peptid aktiviert wird, und den Y2-Rezeptor, der bereits durch die Bindung der Peptidfragmente stimuliert werden kann. Bisher konnten fünf unterschiedliche Rezeptoren mittels molekularen Klonierungsversuchen identifiziert werden: Y1, Y2, Y4, Y5 und Y6 (*Michel et al. 1998*). Allerdings sind die Y1-, Y4- und Y6-Rezeptoren näher zueinander verwandt, als zu dem Y2- oder Y5-Rezeptor. Dies beruht nicht etwa nur auf einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz, sondern auch an dem unterschiedlichen Gehalt an Cystein-Molekülen. Man nimmt an, dass die Cystein-Moleküle Disulfidbrücken ausbilden und so zu unterschiedlichen Tertiärstrukturen beitragen (*Larhammer 1996*). Aber auch die Form der zytoplasmatischen Schleifen unterscheidet sich innerhalb der Y-Rezeptor-Familie. So bildet der Y5-Rezeptor einen ausgesprochen großen dritten zytoplasmatischen „Loop“ aus. Lediglich der Y3-Rezeptor konnte bis dato nicht mittels Klonierungsversuchen näher charakterisiert werden (*Larhammer 1996*). Alle Y-Rezeptoren sind jedoch an eine einzige Klasse von G-Proteinen gekoppelt, nämlich an Gi/o-Proteine (*Michel et al., 1998*).

Der Y1-Rezeptor konnte von allen Y-Rezeptoren als erster erfolgreich geklont werden. Dies gelang zunächst bei Ratten (*Eva et al., 1990*), später folgte u.a. eine Identifizierung des Rezeptors bei Mäusen (*Eva et al., 1992*) sowie in menschlichem Gewebe (*Larhammer et al., 1992*). Zwei Jahre nach den ersten gelungenen Klonierungsversuchen wurde zudem das kodierende Gen identifiziert (*Eva et al., 1992*). Es existieren zwei Splice-Varianten des Rezeptors. Beide binden NPY, allerdings scheint die Signaltransduktion bei der kürzeren Variante weniger effektiv zu sein (*Nakamura et al., 1995*). Die vasokonstriktorische Wirkung von NPY ist im Wesentlichen auf die Stimulierung des Y1-Rezeptors zurückzuführen. Dies konnte insbesondere für das mesenteriale Gefäßbett nachgewiesen werden (*Prieto et al., 1995*). Aber auch in vielen anderen Geweben ist der Y1-Rezeptor lokalisiert. So etwa im Bereich der renalen Gefäße (*Nakamura et al., 1995*), in Koronar-, Meningial- und Cerebralgefäßen (*Uddman et al., 2002*). Neben der Vasokonstriktion ist der Y1-Rezeptor ebenfalls an der Vermittlung vieler anderer physiologischer Effekte von Neuropeptid Y beteiligt. Etwa an der Anxiolyse (*Heilig et al., 1989*), der Stimulierung der Nahrungsaufnahme (*Wyss et al., 1998*) sowie der Regulation der Sekretions- und Absorptionsvorgänge in der intestinalen Mukosa (*Mannon et al., 1999*).

Der Y2-Rezeptor weist gegenüber dem Y1-Rezeptor nur eine 31-prozentige Strukturhomologie auf (*Gerald et al., 1995*). Er ist v.a. im ZNS an NPY-haltigen Neuronen lokalisiert (*Caberlotto et al., 2000*). Die Hauptfunktion des Y2-Rezeptors liegt in der präsynaptischen Inhibition der Noradrenalin-Freisetzung (*Westfall et al., 1996*). Der Rezeptor findet sich aber auch in geringen Mengen in der Peripherie, v.a. in der Niere (*Ohtomo et al., 1996*). Auch in der Peripherie

unterdrückt er die präsynaptische Noradrenalin-Freisetzung (*Wahlestedt et al., 1986*) und sorgt darüber hinaus für eine Stimulation der Na/K-ATPase (*Michel et al., 1992*).

Die Existenz eines Y3-Rezeptors kann bis heute nicht als gesichert gelten. So konnten bisher keine spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten beschrieben werden und zudem erbrachten auch Klonierungsversuche keine positiven Ergebnisse (*Rimland et al., 1991; Michel et al., 1998*). Die Annahme der Existenz dieses Rezeptorsubtyps stützt sich auf die Beobachtung, dass sich NPY in verschiedenen Geweben als sehr viel potenteres Agens erwies als PYY. Diese hohe Affinität für NPY und relativ geringe Bindungskapazität für PYY kann bei keinem anderen Y-Rezeptor beobachtet werden (*Wahlestedt et al., 1991; Dumont et al., 1994*). Bezüglich der möglichen Funktionen eines Y3-Rezeptors existieren aus Versuchen an Rattenaorten Hinweise, dass er dort unter hypoxischen Bedingungen die endotheliale Zellproliferation stimuliert (*Chen et al., 2007*).

Innerhalb der Y-Rezeptorfamilie weist der Y4-Rezeptor die einzigartige Eigenschaft auf, für PP eine sehr hohe, für NPY und PYY dagegen nur eine sehr geringe Affinität zu zeigen. Aus diesem Grund handelt es sich wahrscheinlich um einen PP-Rezeptor (*Lundell et al., 1995*). Beim Menschen konnte die Expression des Y4-Rezeptors v.a. im Intestinaltrakt, in der Prostata und im Pankreas ausgemacht werden (*Lundell et al., 1995*). Im Bereich des ZNS konnte die mRNA des Rezeptors bis auf gewisse Areale des Hirnstamms kaum lokalisiert werden (*Parker et Herzog, 1999*).

NPY vermittelt im Hypothalamus eine Stimulation der Nahrungsaufnahme. Dieser Effekt beruht auf der Bindung an den Y5-Rezeptor, der aus diesem Grund den Beinamen „food intake“-Rezeptor erhielt (*Gerald et al., 1995, 1996*). 1996 konnte das Transkript des Y5-Rezeptors mittels *northern blotting* und *in situ hybridization* im Hypothalamus von Ratten erstmals detektiert werden (*Gerald et al., 1995*). Neben der Lokalisation als „food intake“-Rezeptor konnte der Y5-Rezeptor mittlerweile zudem im peripheren Nervensystem von Pankreas, Milz und Hoden nachgewiesen werden (*Statnick et al., 1998*).

1996 wurde von erfolgreichen Klonierungsversuchen eines Y-Rezeptors berichtet, der zunächst als Y5-Rezeptor bezeichnet wurde (*Weinberg et al., 1996*). Allerdings beschrieben andere Arbeitsgruppen denselben Klon als PP- bzw. Y2b-Rezeptor (*Gregor et al., 1996; Matsumoto et al., 1996*). Um Verwechslungen zu vermeiden, einigte man sich daher auf die Bezeichnung Y6-Rezeptor. Das Gen dieses Rezeptors wurde bisher bei Mäusen, Hunden, Kaninchen, Kühen, Hühnern und dem Menschen nachgewiesen, scheint jedoch bei Ratten nicht vorhanden zu sein (*Burkhoff et al., 1998*). Neben den Y1- und Y5-Rezeptoren konnte auch der Y6-Rezeptor in Regionen des Hypothalamus nachgewiesen werden, die für Appetitregulation verantwortlich sind. Jedoch scheint er keinerlei Einfluss auf die Nahrungsaufnahme zu haben, sodass bisher die Funktionen dieses Rezeptors nicht geklärt werden konnten (*Mullins et al., 2000*).

### 3. Material und Geräte

#### 3.1 Substanzen

Aqua Resist	VWR-International
Calciumchlorid-Dihydrat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Carbogen	Linde Technische Gase
D(+)-Glucose-Monohydrat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Fluka, Steinheim
Domitor (0,2 ml=0,05 mg Medetomidin)	Pfizer, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Steinheim
Ethanol (67%)	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Fentanyl	Curamed Pharma
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Indomethacin	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH
Magnesiumsulfat-7-Hydrat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Midazolam	Curamed Pharma
NaCl, 0,9 %, steril	Braun, Melsungen

Natriumchlorid, Pulver	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Neuropeptid Y	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Phenobarbital	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### 3.2 Geräte

Autoklav	Wolf, Geislingen
Carbogen-Flasche	Linde Technische Gase
Drei-Wege-Hahn aus Kunststoff	NeoLab, Heidelberg
Einhängethermostat C10	Haake Deutschland
Einmalspritzen, Discardit 2/5/10 ml steril	Becton-Dickinson, San Jose, USA
Eismaschine, UBE 125	Ziegra, Isernhagen
Glasbehälter (div. Volumina)	Schott, Mainz
Laborwaage, SC 2020	Ohaus, Giessen
Magnetrührer, IKAMag REO	Heidolph, Kehlheim
Microlance Kanülen	Becton-Dickinson, San Jose, USA

Nahtmaterial, vicryl, violett 3	Ethicon, Norderstedt
P-23-Db Perfussionsdruck-Messelektrode (Transducer)	Statham, Oxnard, CA, USA
Parafilm M (250 ft x 4 in)	Pechiney Plastic Packaging Inc., Neenah, USA
Pasteurpipetten, 5/10/20 ml	Brand, Wertheim
Perfusionsanlage	(Eigenbau) PD Dr. med R. Wiest, Uni- Regensburg
Perfusionsschlauch, 140 cm	Heidelberger Verlängerung
Perfusionsschlauch, Mikro PE: 0,5x1,0 mm	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Pipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
PowerLab 4/20	PowerLab/ADInstruments, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Pumpe IPC 8-Kanal	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Pumpenschläuche, Tygon R-3607	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Reaktionsgefäße 1 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Falcon, Heidelberg
Reinstwasseranlage, Milli-Q-Plus	Ultra Pure Water Systems, Billerica, USA
Schlauchverbindungen 2-3,5 mm	NeoLab, Heidelberg
Schüttler REAX 2	Heidolph, Schwabach



Stickstoff	Linde Technische Gase
Telacomp, Tupfer, x-ray, 10x10 cm	Hartmann, Heidelberg
Transducer, BLPR one 05A	World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA
T-Stücke, Mikro 2,3-3,5 mm	NeoLab, Heidelberg

## 4. Methoden

### 4.1 Tiermodell und Portalvenenligatur

Es wurde das Tiermodell der Pfortader-Ligatur verwendet. Als Kontrolltiere wurden gleichaltrige und gesunde männliche CD-Ratten gewählt. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 260 und 300g. Alle hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser und wurden in klimatisierten Räumen bei einer konstanten Temperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten. Die Experimente wurden gemäß den Vorschriften der Deutschen Gesellschaft für Physiologie, Haltung und Gebrauch von Labortieren durchgeführt. Die Pfortader-Ligatur wurde entsprechend der Methode von Chojkier und Groszmann (*Chojkier et Groszmann 1981*) durchgeführt. Dazu wurden männliche Ratten mit einem Gewicht von 240-260g mit einem Anästhesie-Cocktail narkotisiert. Die Pharmaka wurden in folgendem Verhältnis gemischt und über eine intramuskuläre Injektion verabreicht:

- 1.) 2ml Fentanyl+4ml Midazolam+3ml Dormitor+1ml NaCl (0,9%).
- 2.) Dosis: 0,1 ml/100 gKG

Daraufhin wurden die Tiere abdominal rasiert und die Haut mit Jodlösung desinfiziert. Während der gesamten Operation wurde unter aseptischen Bedingungen gearbeitet. Im ersten Schritt wurden eine Mittelliniszur gesetzt und der Bauchraum eröffnet, sodass die Pfortader proximal der Bifurkation in exponierter Stellung zu sehen war. Daraufhin wurde mit Nahtmaterial (Viracyl,

violett, 3-0,1 mm x 1,50 m) eine Kanüle an der Pfortader fixiert, die im Anschluss wieder entfernt wurde. Danach wurde der Bauchraum wieder geschlossen. Innerhalb von zehn Tagen hatte sich das hyperdynamische Zirkulationssyndrom stabilisiert und die Tiere konnten für Studie herangezogen werden.

#### **4.2 In-vitro-Perfusion nach McGregor**

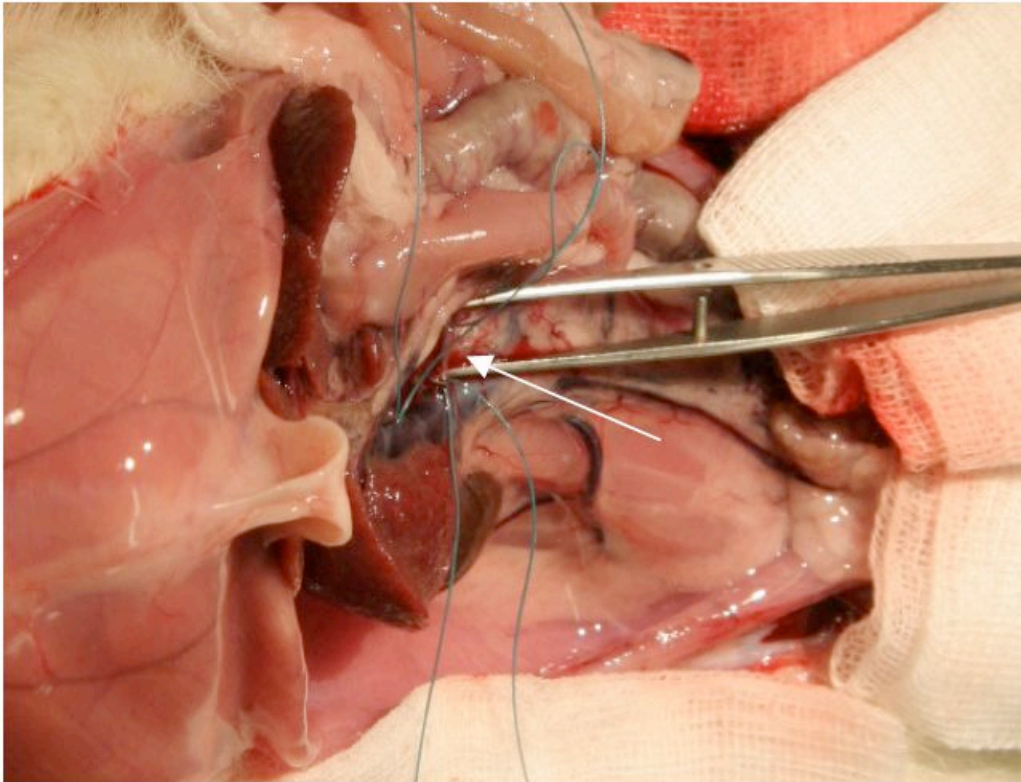
Für die Studie wurde die McGregor-Methode (*McGregor, 1965*) zur Perfusion der A. mesenterica superior (AMS) gewählt. Da die AMS bei Ratten beinahe das komplette Splanchnikusgebiet versorgt, stellt dieses Verfahren eine besonders geeignete Methode zur Perfusion des Splanchnikus-Gebiets dar. Von Vorteil ist zudem, dass sowohl das Hauptgefäß als auch alle Arterienäste nur in einer Flussrichtung durchströmt werden und das Perfusat kontinuierlich abgeleitet wird. Dadurch durchströmen alle eingesetzten Substanzen das Gefäßbett nur ein einziges Mal, wodurch eine Rezirkulation der Agenzien, die die Perfusionsergebnisse beeinflussen könnte, vermieden wird. Während der gesamten Perfusionszeit wurde auf eine äußerst genaue Einstellung des Perfusionsdrucks sowie der Perfusionsvolumina geachtet. Dadurch wurden annähernd in-vivo Verhältnisse erreicht.

#### **4.3 Präparation der AMS nach McGregor**

Vor der Präparation der A. mesenterica superior wurden die Tiere mit einem Anästhesie-Cocktail narkotisiert (Dosis und Zusammensetzung siehe oben).

Der Cocktail wurde intramuskulär in einer Dosis von 0,1ml/100g KG verabreicht. Die anxiolytische, hypnotische und stark analgetische Wirkung der Pharmaka setzte innerhalb weniger Minuten ein. Daraufhin wurden die Tiere abdominal rasiert, auf dem OP-Tisch fixiert und die Haut mit einer Jodlösung desinfiziert. Die Öffnung des Bauchraums sowie die Präparation der A. mesenterica superior erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

Im nächsten Schritt wurde nun die AMS von umgebendem Gewebe befreit und vorsichtig freigelegt. Anschließend wurde das Gefäß direkt am Aortenursprung mit Nahtmaterial (Viracyl, violett, 3-0,1 mm x 1,50 m) ligiert.



**Abbildung 7:** Darstellung der Arteria mesenterica superior (Pfeil) und Ligatur des Gefäßes

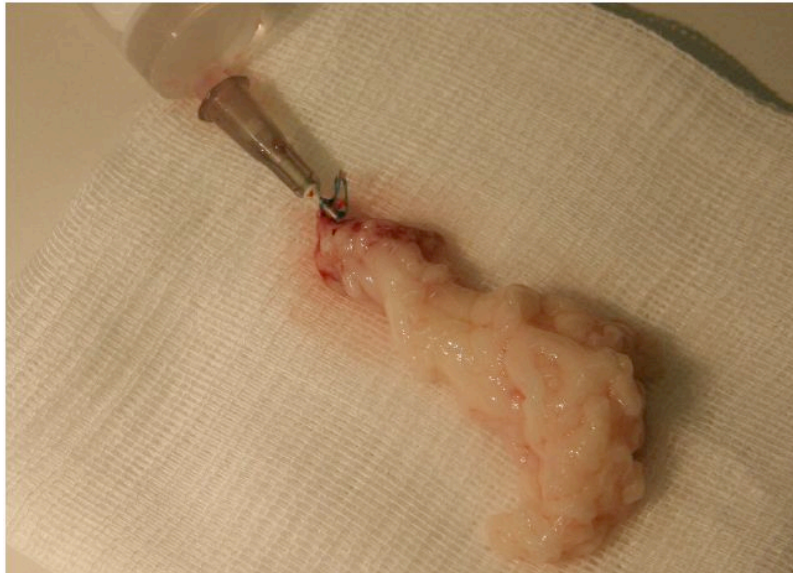
Nun konnte eine nur wenige Millimeter lange Inzision gesetzt werden, über welche eine Microlance Kanüle mit einem etwa 1,5 cm langen Mikroschlauch aus Polyethylen (0,5 mm x 1,0 mm) in das Lumen der AMS eingeführt wurde. Anschließend wurde die Kanüle abermals unter Verwendung von Nahtmaterial (Viracyl, violett, 3-0,1 mm x 1,50 m) fixiert. Daraufhin wurden zum Entbluten die Aorta und die V. cava durchtrennt und das Gefäßbett der AMS mit 25 ml 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung durchgespült.

*Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung:*

1. NaCl: 118mM
2. KCl: 4,7 mM
3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,2 mM
4.  $\text{MgSO}_4$ : 1,2 mM
5.  $\text{CaCl}_2$ : 2,5 mM
6.  $\text{NaHCO}_3$ : 25mM
7. EDTA: 0,026 mM
8. Glucose: 11 mM

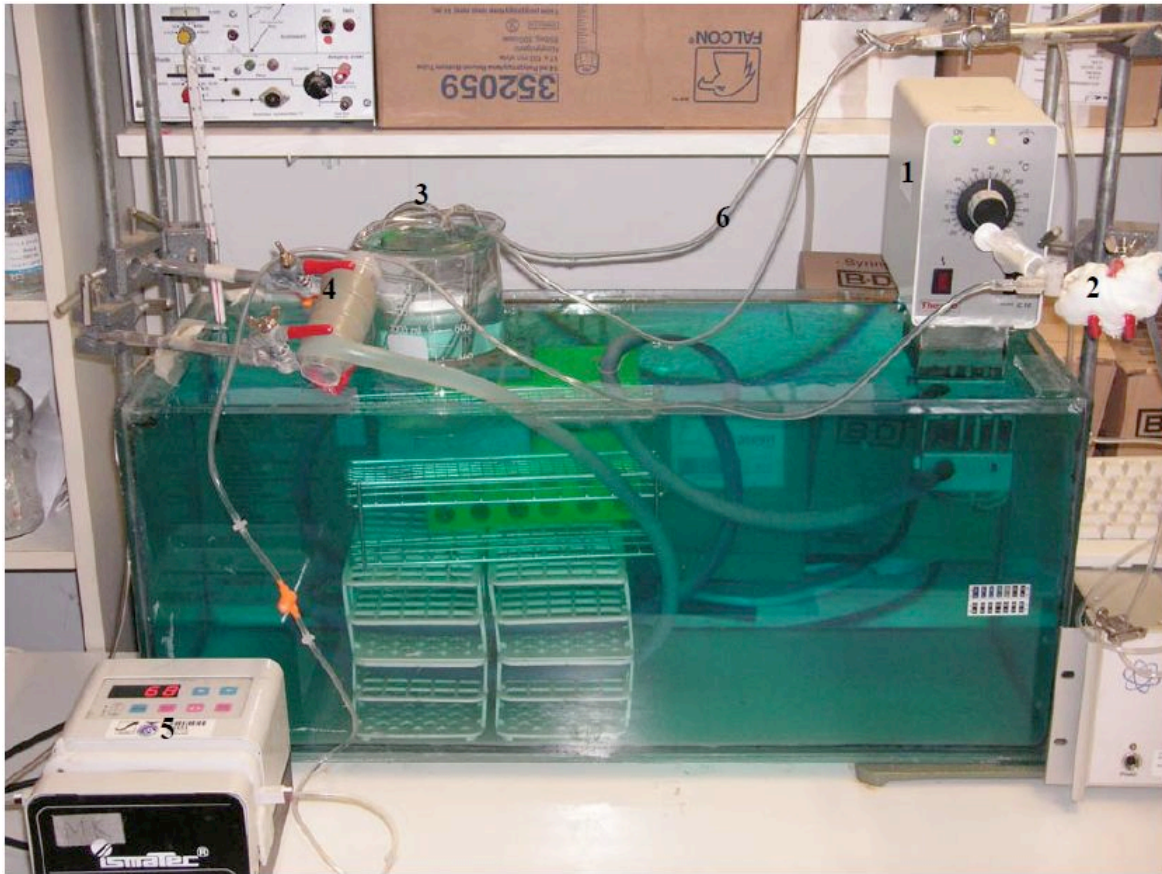
Die Lösung wurde permanent mit Carbogen (95 %  $\text{O}_2$ ; 5 %  $\text{CO}_2$ ) angereichert. Der pH-Wert betrug 7,4.

Im letzten Schritt der Präparation erfolgte die Trennung der AMS und ihrem Gefäßbett von der Darmwand. Hierbei wurde darauf geachtet, dass dies äußerst wandnah geschah, wodurch man eine möglichst große Zahl an Widerstandsgefäßen für die anschließende Perfusion erhielt.



**Abbildung 8:** Mesenteriales Gefäßbett nach kompletter Resektion.

Um die Austrocknung des Gefäßbetts zu vermeiden, wurde es von einem Paraffinfilm umhüllt und dann an den Perfusor angeschlossen. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Gewebe von Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert, wobei das Perfusionsvolumen kontinuierlich 4 ml/min betrug. Dieses wurde durch eine peristaltische Ismatec-Pumpe (Ismatec IPC-8-Kanal) aufrechterhalten. Der Perfusionsdruck wurde mittels eines speziellen Druckumwandlers Transducer P-23-Db gemessen und an ein Aufzeichnungsgerät (PowerLab Quadbridge and PowerLab 4/20) weitergegeben. Die Messdaten wurden am PC graphisch dargestellt und gesichert. Die beschriebene Methode erlaubte eine 4- bis 6-stündige zuverlässige Datenerhebung bei vitalem Gewebe.



**Abbildung 9:** Perfusionsanlage (Eigenbau Prof. Dr. R. Wiest). 1) Thermostat 2) Transducer 3) Perfusionslösungen (z.B. K.H- oder KCl-Lsg.) 4) Perfusionskammer mit dem Gefäßbett 5) Ismatec-Pumpe 6) Carbogen-Schlauch. Das Wasserbad und alle verwendeten Lösungen wurden auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und mit Sauerstoff angereichert. Die Ismatec-Pumpe gewährleistete eine konstante Flussrate von 4 ml/min. Veränderungen der Drücke im Gefäßbett wurden vom Transducer gemessen und vom PowerLab 4/20 aufgezeichnet.

#### 4.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte bzw. ungepaarte t-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Alle Ergebnisse wurden in Mittelwerten  $\pm$  SEM (Standardabweichung) angegeben. Für sämtliche statistische Berechnungen sowie zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde SPSS verwendet



## 5. Versuchsprotokoll

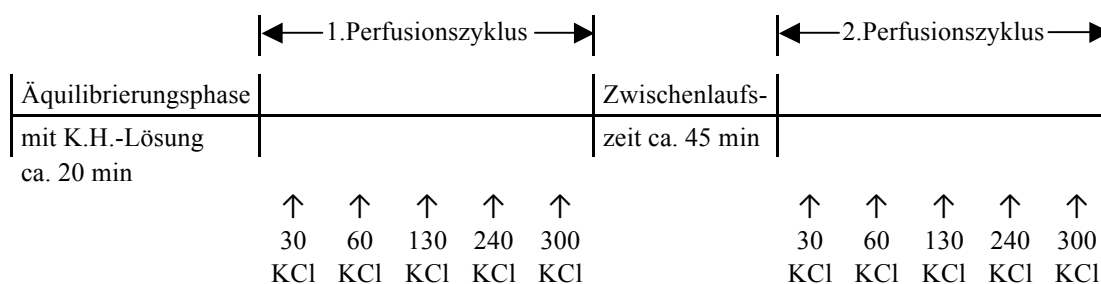
### 5.1 Versuchsreihe 1: Untersuchung der KCl-vermittelten Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte

In dieser Versuchsreihe wurde das Gefäßbett der AMS sowohl von portal hypertensiven als auch von Kontrolltieren in vitro perfundiert. Dabei wurde das Reaktionsvermögen auf den Stimulus hoher extrazellulärer KCl-Konzentrationen untersucht.

Alle Perfusionen des Gefäßbettes wurden zunächst mit einer 20-minütigen Äquilibrationsphase in 37°C warme, oxygenierte Krebs-Henseleit-Lösung eingeleitet. Anschließend wurde das Gewebe mit den bereits zuvor angefertigten KCl-Lösungen (30-300mM) in aufsteigender Reihenfolge, non-kumulativ perfundiert. Zwischen der Zugabe der einzelnen KCl-Lösungen wurde ein ca. 10-minütiger zeitlicher Abstand eingehalten, sodass der Perfusionsdruck jeweils auf die Baseline abgefallen war.

Nach Beendigung des ersten Zyklus folgte eine ca. 45-minütige Auswaschphase. In dieser Zeit konnte sich die Kontraktion der letzten KCl-Dosis wieder normalisieren und der Perfusionsdruck auf die Baseline abfallen. Anschließend wurde der zweite Perfusionszyklus mit den entsprechenden KCl-Konzentrationen (vgl. erster Zyklus) eingeleitet.

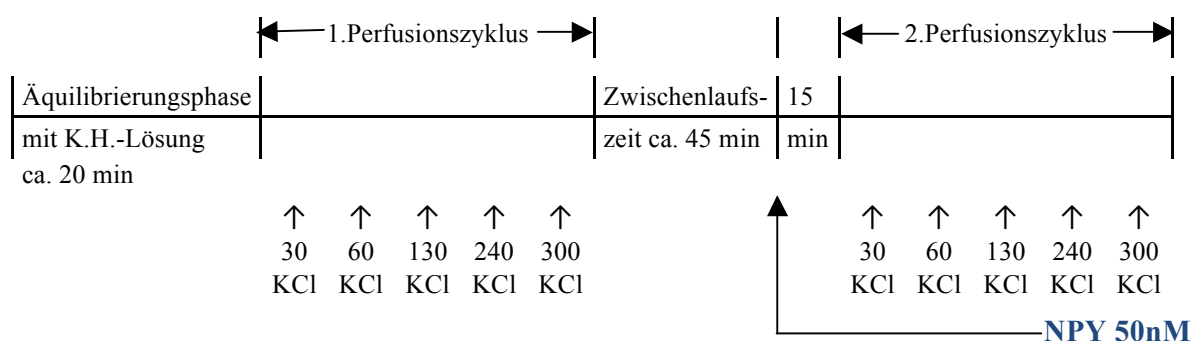
Diese Versuchsanordnung sollte zum einen prüfen, ob im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion eine Hyporeaktivität besteht. Zum anderen sollte untersucht werden, ob durch die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen im ersten Perfusionszyklus eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung stattfindet und ob diese ggfs. bei Pfortaderhochdruck einer Alteration unterworfen ist.



## 5.2 Untersuchung der potenzierenden NPY-Effekte auf eine KCl-induzierte Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett

### 5.2.1 Versuchsreihe 2: Anhand von zwei Perfusionszyklen

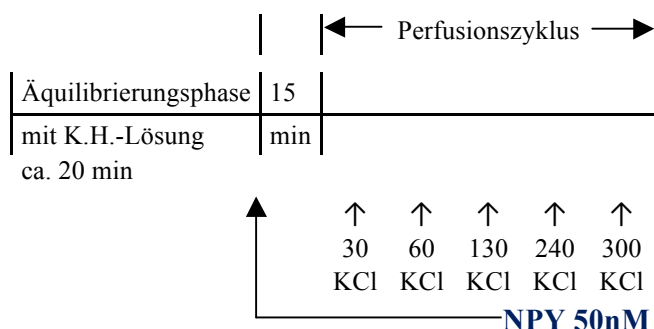
In dieser Versuchsreihe galt es nun zu klären, inwiefern NPY befähigt ist, die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion zu potenzieren und die vaskuläre Hyporeaktivität bei PVL-Tieren zu beheben. Es wurden hier Perfusionen entsprechend dem Protokoll der ersten Versuchsreihe durchgeführt, allerdings wurde vor Beginn des zweiten Perfusionszyklus das Gewebe mit NPY-Lösung für 15 Minuten vorinkubiert. NPY wurde in allen Versuchsreihen in einer 50nM-Konzentration zugegeben und war während des zweiten Perfusionszyklus anwesend.



### 5.2.2 Versuchsreihe 3: Anhand von einem Perfusionszyklus

Unter der Annahme, dass durch die Kontraktionsabläufe im ersten Perfusionszyklus gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierenden Vorgänge stattfanden, sollten diese Effekte in dieser Versuchsreihe umgangen und die alleinige NPY-Wirkung gemessen werden.

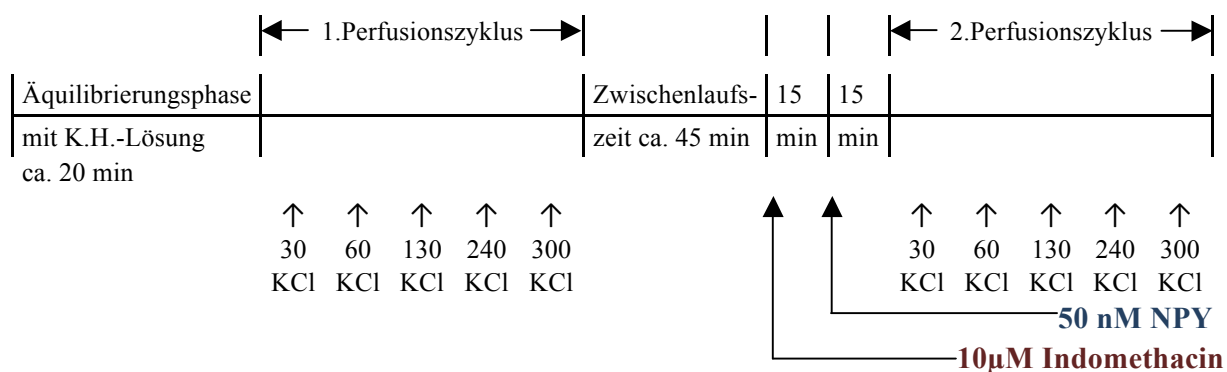
Hierfür wurde im Anschluss an die 20-minütige Äquilibrationsphase schon zu Beginn mit NPY in 50 nM Lösung vorinkubiert, daraufhin wurden wiederum die gleichen KCl-Konzentrationen wie in den vorherigen Versuchsreihen zugegeben. Auch diese Anordnung wurde selbstverständlich für Kontroll- und PVL-Ratten durchgeführt.



### 5.3 Versuchsreihe 4: Untersuchung der Abhängigkeit der NPY-Effekte vom Cyclooxygenase-Signalweg bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte

In der letzten Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der NPY-vermittelten Potenzierung der rezeptorunabhängigen Gefäßkontraktion von einer intakten Cyclooxygenase unter Verwendung des COX-Inhibitors Indomethacin untersucht.

Hierzu wurde der erste Zyklus identisch zu den beiden ersten Versuchsreihen durchgeführt. Vor Beginn des zweiten Perfusionszyklus wurde zunächst mit 10  $\mu$ M Indomethacin-Lösung und anschließend mit 50 nM NPY-Lösung für jeweils 15 Minuten vorinkubiert. Daraufhin wurde der zweite Perfusionszyklus begonnen.



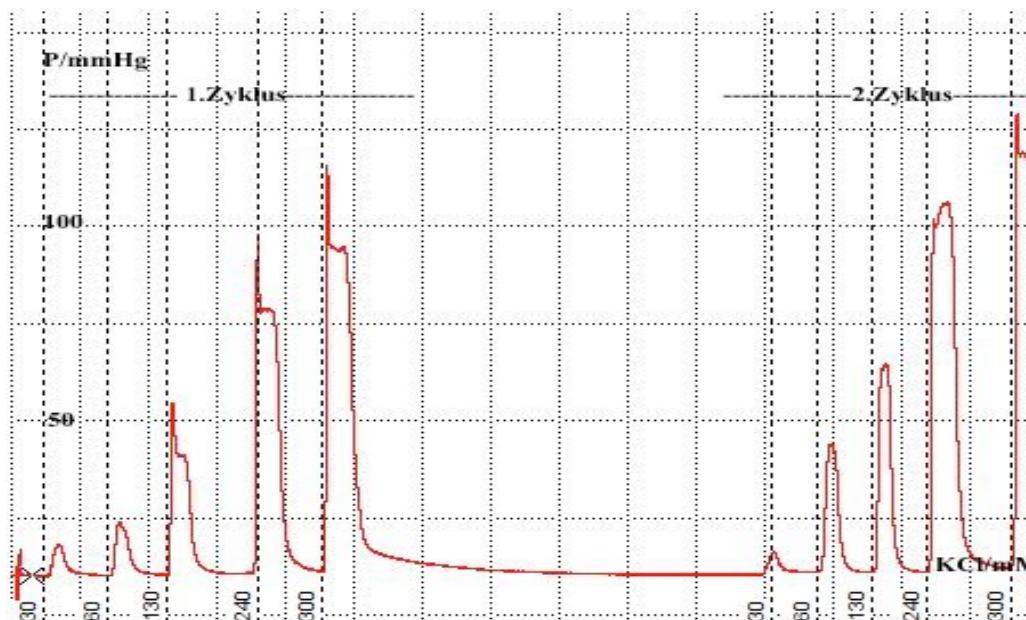


## 6. Ergebnisse

### 6.1 Basale Ausgangswerte

Die Versuchstiere der Sham- und PVL-Gruppe unterschieden sich nicht bzgl. Körpergewicht bzw. Alter (Kontrolle:  $273\text{g} \pm 11.5\text{g}$  vs. PVL:  $296\text{g} \pm 5.8\text{g}$ ). Die PVL-Tiere wiesen bezogen auf das Körpergewicht ein signifikant höheres Milzgewicht (Kontrolle:  $2,60 \pm 0,11\text{g/kgKG}$  vs. PVL:  $3,9 \pm 0,14\text{g/kgKG}$ ;  $p < 0,0001$ ) sowie ein kleineres Lebergewicht (Kontrolle:  $46,5 \pm 1,92\text{g/kgKG}$  vs. PVL:  $35,2 \pm 1,52\text{g/kgKG}$ ;  $p < 0,0001$ ) auf. Der im Gefäßbett herrschende Ruhedruck vor Zugabe vasokonstringierender Substanzen unterschied sich ebenfalls und war bei PVL-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert (Kontrolle:  $14,13 \pm 2,5\text{mmHg}$ , PVL:  $10,1 \pm 1,9\text{mmHg}$ ;  $p < 0,05$ ).

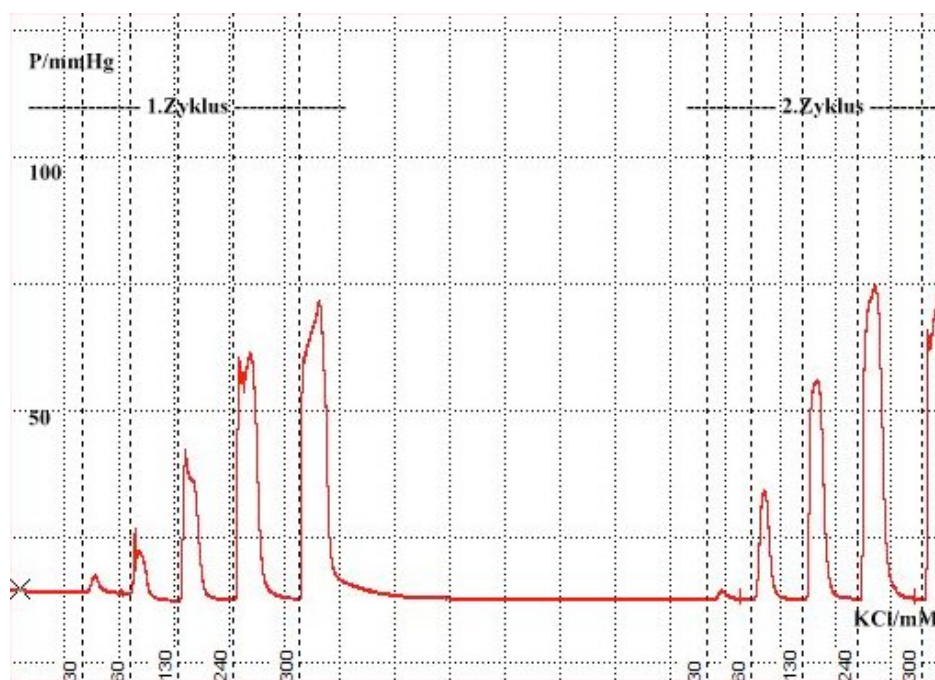
### 6.2 Versuchsreihe 1: Untersuchung der KCl-vermittelten Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte



**Abbildung 14:** Druckaufzeichnung der In-Vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines Kontrolltiers.

In Abbildung 14 ist die PowerLab-Aufzeichnung eines Kontrolltiers abgebildet. Im zweiten Perfusionszyklus können für sämtliche KCl-Konzentrationen höhere Drücke gemessen werden. Diese Steigerung ist zwar nur relativ gering ausgeprägt (Abb. 20, 21), allerdings für sämtliche

KCl-Konzentrationen auf signifikantem ( $p < 0,05$ ) bzw. hoch signifikantem ( $p < 0,001$ ) Niveau vorhanden (Abb. 18). Außerdem konnte eine gewisse Steigerung der Perfusionsdrücke in jeder einzelnen Perfusion für sämtliche Konzentrationen auf äußerst reproduzierbare Weise beobachtet werden.



**Abbildung 15:** Druckaufzeichnung einer In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines PVL-Tiers.

Dieselbe Versuchsanordnung wurde auch für das mesenteriale Gefäßbett von PVL-Tieren durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die PowerLab-Aufzeichnung einer PVL-Ratte. Sowohl im ersten (Abb. 16) als auch im zweiten Perfusionszyklus (Abb. 17) werden in der PVL-Gruppe deutlich niedrigere Drücke gemessen ( $p < 0,05$ ). Bei portal hypertensiven Ratten besteht somit ein vermindertes Ansprechen gegenüber dem Stimulus KCl.

Auch in der PVL-Gruppe werden im zweiten Perfusionszyklus höhere Drücke erzielt, allerdings ist dies nur für KCl-Konzentrationen von 130 und 240 mmol signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb.19).

Die Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurven lässt sich am besten bei der Betrachtung der  $EC_{50}$ -Werte als Maß für die vaskuläre Sensitivität beurteilen. Sie betrugen:

Sham:  $92 \pm 17,8 \text{ mM}$  vs.  $114,1 \pm 23,1 \text{ mM}$ ,  $p < 0,001$

PVL:  $91 \pm 33,1 \text{ mM}$  vs.  $108,1 \pm 31,2 \text{ mM}$ ,  $p < 0,05$ .

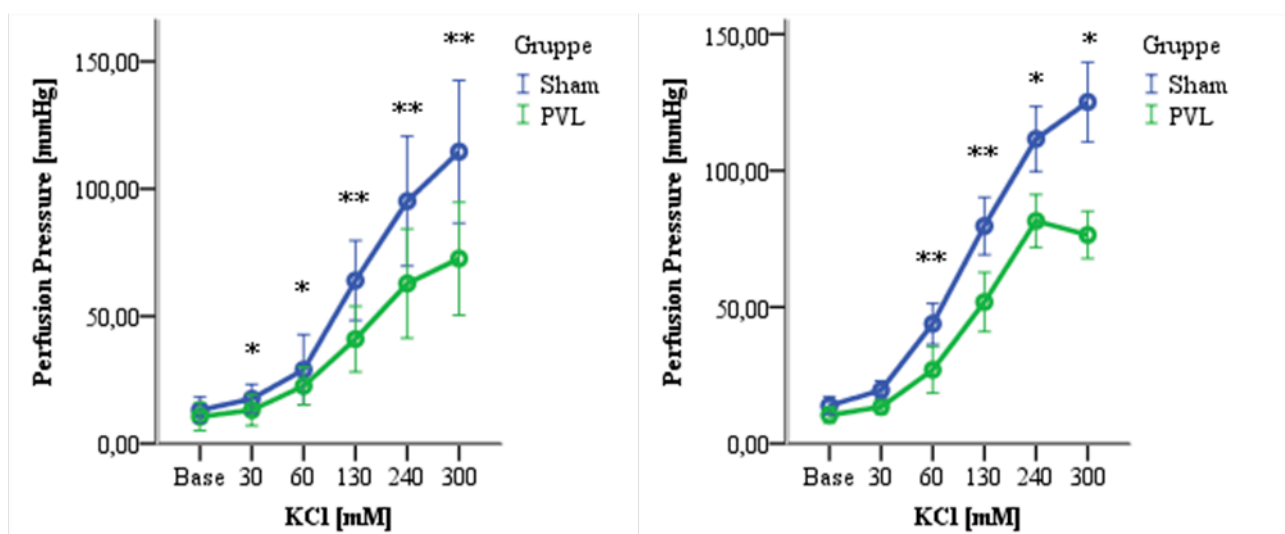
Bezüglich der  $EC_{50}$ -Werte ist zwischen der Kontroll- und PVL-Gruppe weder im ersten noch im zweiten Perfusionszyklus ein signifikanter Unterschied zu messen.

Die maximale Kontraktionskraft ( $E_{\max}$ ) liegt allerdings in beiden Perfusionszyklen bei PVL-Tieren unter dem Niveau der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

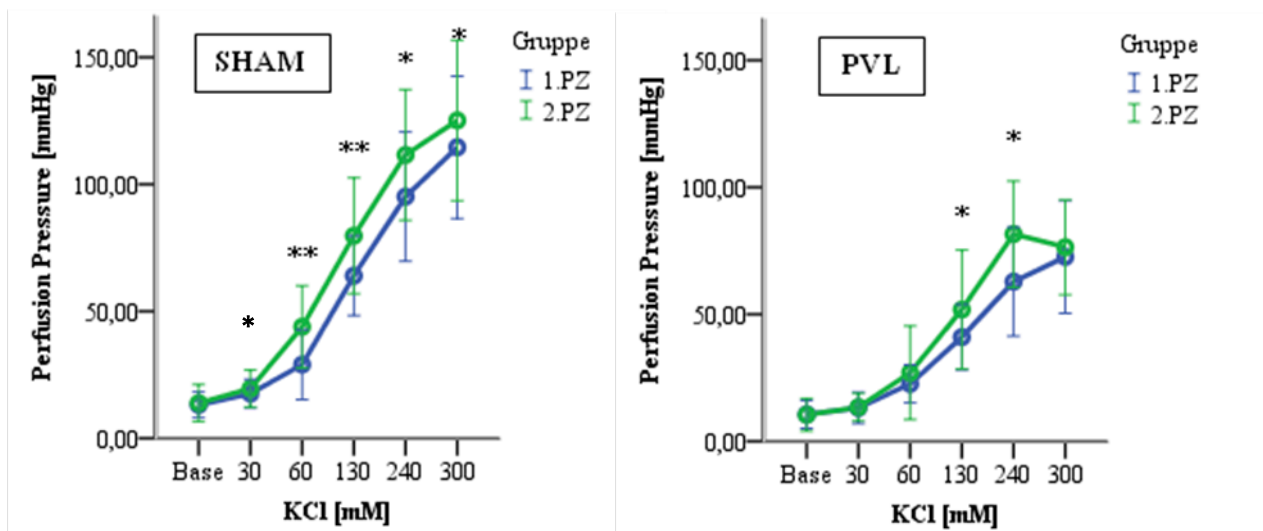
Es besteht also keine verminderte vaskuläre Sensitivität, vielmehr ist die vaskuläre Kontraktilität bei portaler Hypertension vermindert.

Ferner ist für  $E_{\max}$  bei beiden Gruppen keine signifikante Steigerung im zweiten Perfusionszyklus zu messen. Durch die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen im ersten Perfusionszyklus hat somit eine Steigerung der Gefäßsensitivität, nicht jedoch der -kontraktilität stattgefunden.

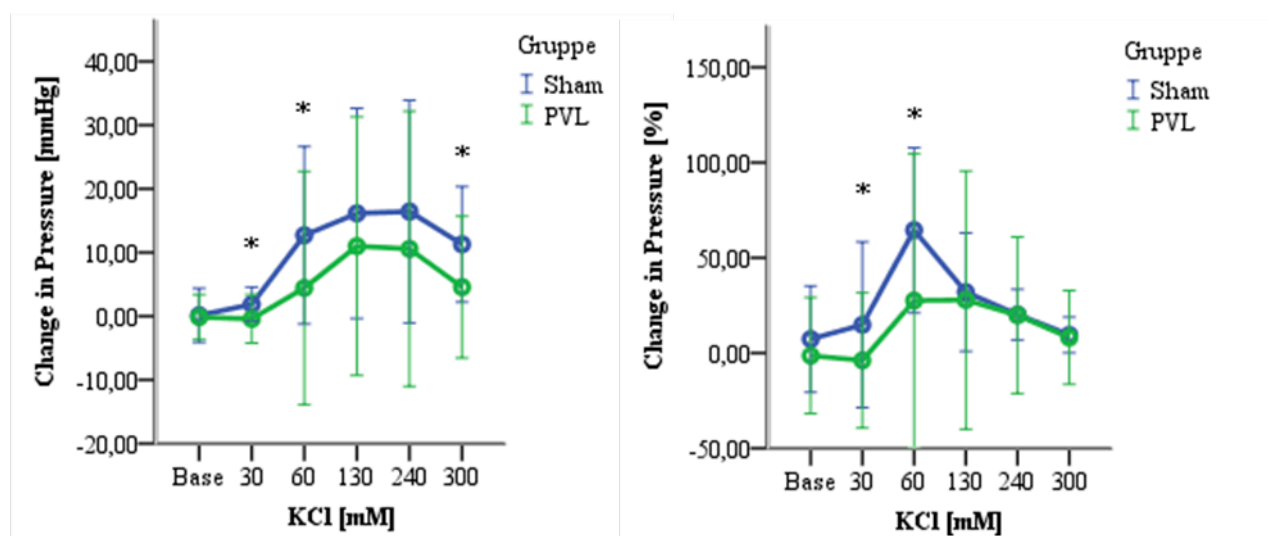
Zieht man die absolute bzw. prozentuale Steigerung der Perfusionsdrücke zum Vergleich der Sensibilisierungspotenz eines ersten Perfusionszyklus heran, so ist die Steigerung zumindest für niedrige KCl-Dosen in der PVL-Gruppe schwächer als bei gesunden Tieren ausgeprägt (Abb. 20, 21).



**Abbildungen 16/17:** Dargestellt ist die KCl-induzierte Vasokonstriktion im ersten (Abb.16) und zweiten (Abb.17) Perfusionszyklus. Für sämtliche KCl-Dosen werden in beiden Perfusionszyklen in der PVL-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) bzw. hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere Perfusionsdrücke gemessen als in der Kontrollgruppe.  $n=8$  für Kontroll- und  $n=7$  für PVL-Tiere. PZ: Perfusionszyklus. Sham: Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .



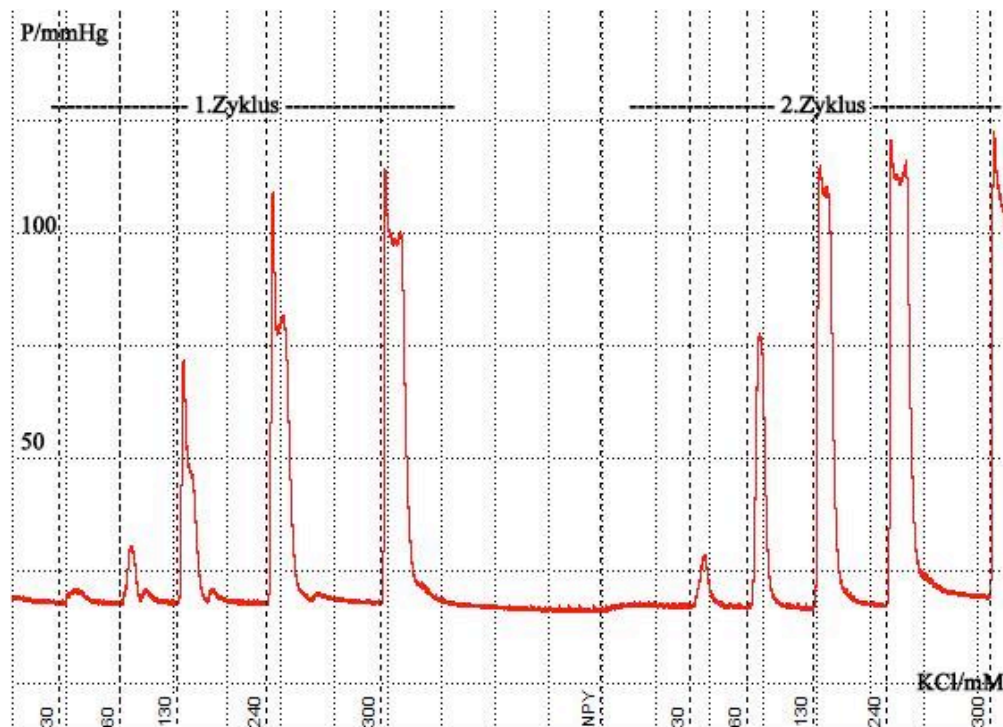
**Abbildungen 18/19:** Sowohl in der Kontrollgruppe (Abb.18) als auch bei PVL-Tieren (Abb.19) kommt es im zweiten Perfusionszyklus zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Allerdings ist die Steigerung der Perfusionsdrücke in der PVL-Gruppe nur für KCl-Dosen von 130 und 240 mM signifikant ( $p < 0,05$ ) ausgeprägt, während diese bei Kontrolltieren alle Konzentrationen deutlich vorhanden ist.  $n=8$  für Kontroll- und  $n=7$  für PVL-Tiere. PZ: Perfusionszyklus. Sham: Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .



**Abbildungen 20/21:** Sowohl die absolute (Abb.20) als auch die prozentuale (Abb.21) Steigerung der Perfusionsdrücke im zweiten Zyklus, bezogen auf die Drücke im ersten Perfusionszyklus, fällt für kleine KCl-Dosen in der PVL-Gruppe signifikant niedriger aus ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  für Kontroll- und  $n=7$  für PVL-Tiere. PZ: Perfusionszyklus. Sham: Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ .

### 6.3 Untersuchung der potenzierenden NPY Effekte auf eine KCl-induzierte Vaskonstriktion im mesenterialen Gefäßbett

#### 6.3.1 Versuchsreihe 2: Anhand von zwei Perfusionszyklen



**Abbildung 22:** Druckaufzeichnung einer In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines Kontrolltiers.

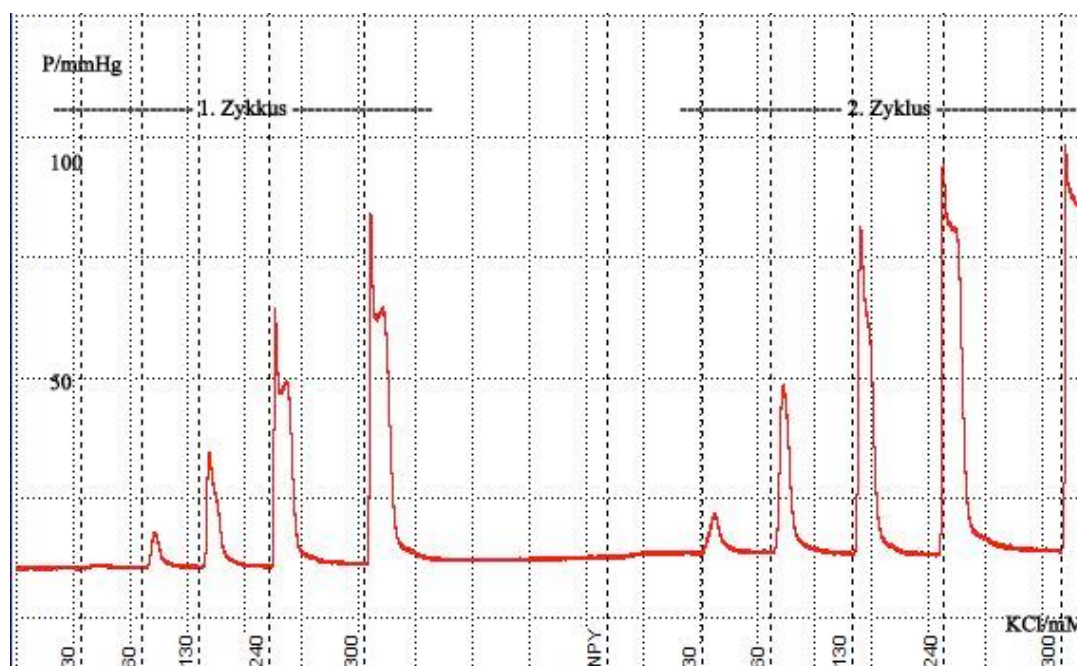
In Abbildung 22 ist die durch das PowerLab aufgezeichnete In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines Kontrolltiers dargestellt. Nach NPY-Zugabe zeigt sich hier im zweiten Zyklus eine deutliche Steigerung der Perfusionsdrücke. Bis auf die höchste KCl-Konzentration von 300mM können für alle verwendeten KCl-Dosen signifikant höhere Perfusionsrücke nach Vorinkubation mit NPY gemessen werden ( $p < 0,05$ ).

Vergleicht man die absolute sowie prozentuale Steigerung der Perfusionsdrücke mit der ersten Versuchsreihe, so fällt in Gegenwart von NPY die Steigerung bis auf die höchsten KCl-Konzentrationen deutlich höher aus ( $p < 0,05$ ).

Der maximale Perfusionsdruck bzw. die maximale Kontraktionskraft wird durch NPY im Vergleich zum ersten Zyklus bei Kontrolltieren nicht angehoben (n. s.). Vielmehr stellt sich eine ausgeprägte Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve ( $EC_{50}$ : 56,9mM vs. 124+22,4mM,  $p < 0,001$ ) ein.



Bei Kontrolltieren lässt sich also in Gegenwart von NPY keine gesteigerte Gefäßkontraktilität, jedoch eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Stimulus KCl erzeugen. Am deutlichsten ist dies für eine Konzentration von 60mM ausgeprägt. Hier beträgt der Mittelwert des Perfusionsdrucks im ersten Zyklus  $29 \pm 5,9 \text{ mmHg}$ , im zweiten Zyklus  $64,6 \pm 12,9 \text{ mmHg}$ , dies entspricht einer Steigerung von 123% (Abb. 26, 27).



**Abbildung 23:** Druckaufzeichnung einer In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines PVL-Tiers.

Bei PVL-Tieren können als Ausdruck der vaskulären Hyporeaktivität im ersten Zyklus für sämtliche KCl-Konzentrationen geringere Perfusionsdrücke sowie ein niedrigerer Ruhedruck als bei Kontrolltieren beobachtet werden ( $p < 0,001$ ).

NPY ist jedoch befähigt, für alle KCl-Dosen, einschließlich der maximalen Konzentration, eine signifikante Steigerung der Perfusionsdrücke zu erzielen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 23, 25).

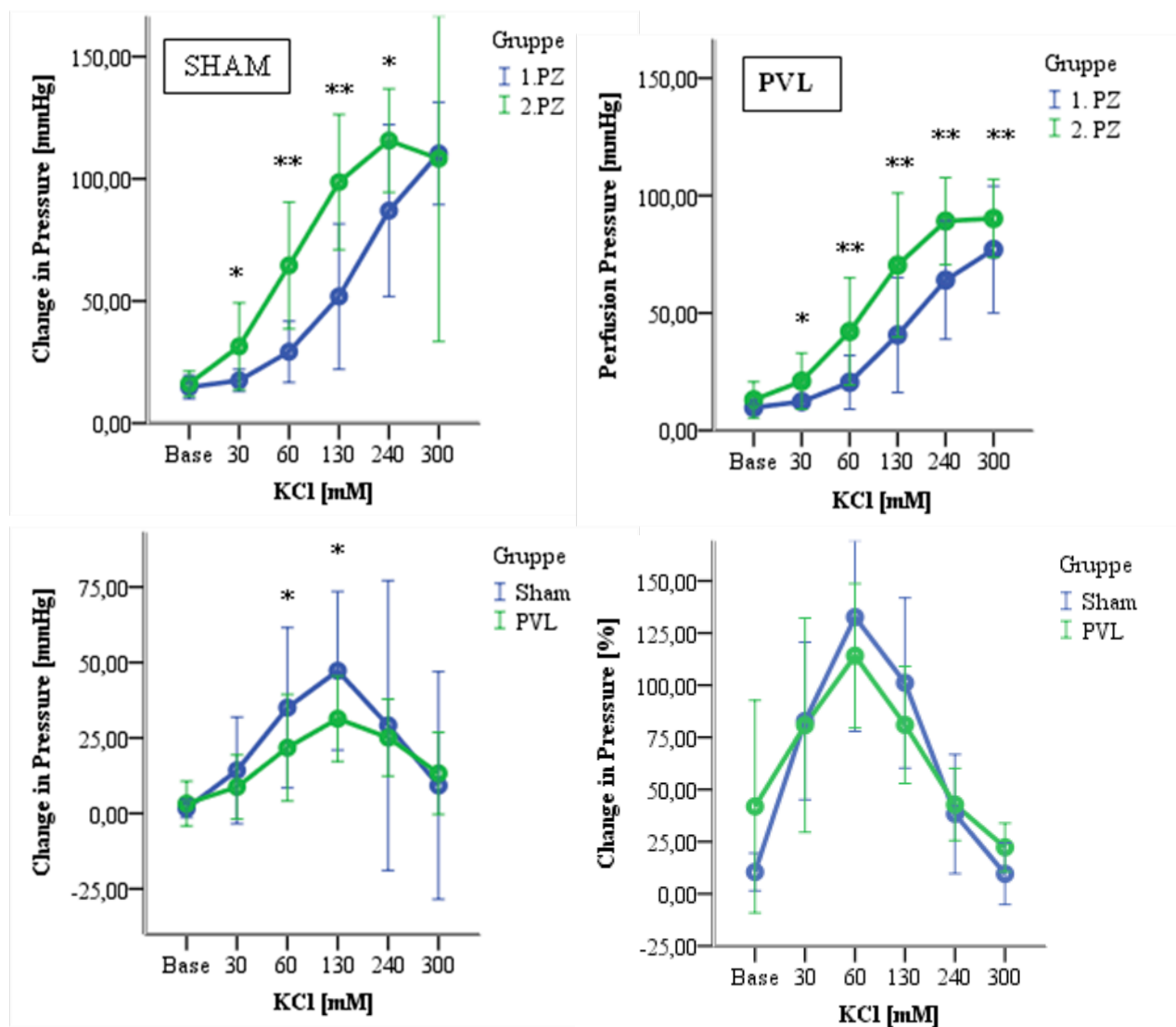
Auch in der PVL-Gruppe ist die absolute und prozentuale Steigerung für sämtliche KCl-Konzentrationen wesentlich deutlicher ausgeprägt als in der ersten Versuchsreihe, wo auf eine Vorinkubation mit NPY verzichtet wurde ( $p < 0,05$ ).

Bezüglich der  $EC_{50}$ -Werte bestand für die beiden Versuchsgruppen weder im ersten noch im zweiten Perfusionszyklus ein Unterschied (n. s.). Die Steigerung der Gefäßsensitivität war somit für beide Versuchsgruppen in gleichem Ausmaß vorhanden. Die  $EC_{50}$ -Werte betrugen:

Sham,  $EC_{50}$ : 56,9mM vs.  $124 \pm 22,4 \text{ mM}$ ,  $p < 0,001$

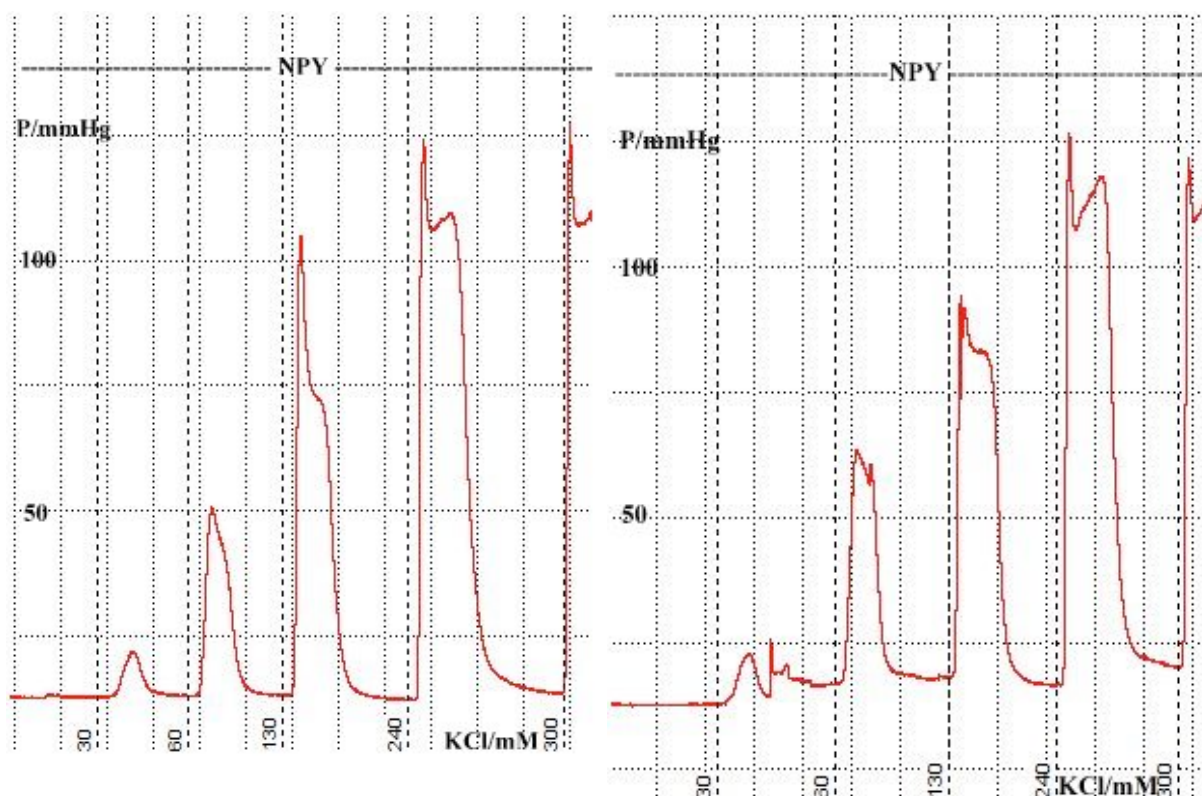
PVL,  $EC_{50}$ : 69 $\pm$ 21mM vs.  $129 \pm 35,6 \text{ mM}$ ,  $p < 0,001$

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, kann unter NPY-Wirkung bei PVL-Tieren eine signifikante Steigerung der maximalen Kontraktionskraft erzielt werden ( $p < 0,05$ ). Bezüglich  $E_{\max}$  ist zwischen der PVL- und der Kontrollgruppe in Gegenwart von NPY kein Unterschied mehr zu berechnen (n. s.). Vergleicht man die erzielten Perfusionsdrücke für die jeweiligen KCl-Dosen im zweiten Zyklus, so bleiben diese bei PVL-Tieren weiterhin knapp unter dem Niveau der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).



**Abbildungen 24-27:** Dargestellt ist die KCl-induzierte Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett von Kontroll- (Abb.24) und PVL-Ratten (Abb.25) vor und nach Inkubation mit NPY. In beiden Gruppen kommt es zu einer deutlichen Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Darüber hinaus erhöht NPY in der PVL-, nicht jedoch in der Kontrollgruppe, den Perfusionsdruck für die maximale KCl-Konzentration. Außerdem ist die absolute (Abb.26) sowie die prozentuale (Abb.27) Steigerung der Perfusionsdrücke nach Vorinkubation mit NPY bezogen auf die Drücke im ersten Perfusionszyklus abgebildet.  $n=8$  für Kontroll- und  $n=8$  für PVL-Tiere. Sham, Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

### 6.3.2 Versuchsreihe 3: Anhand von einem Perfusionszyklus



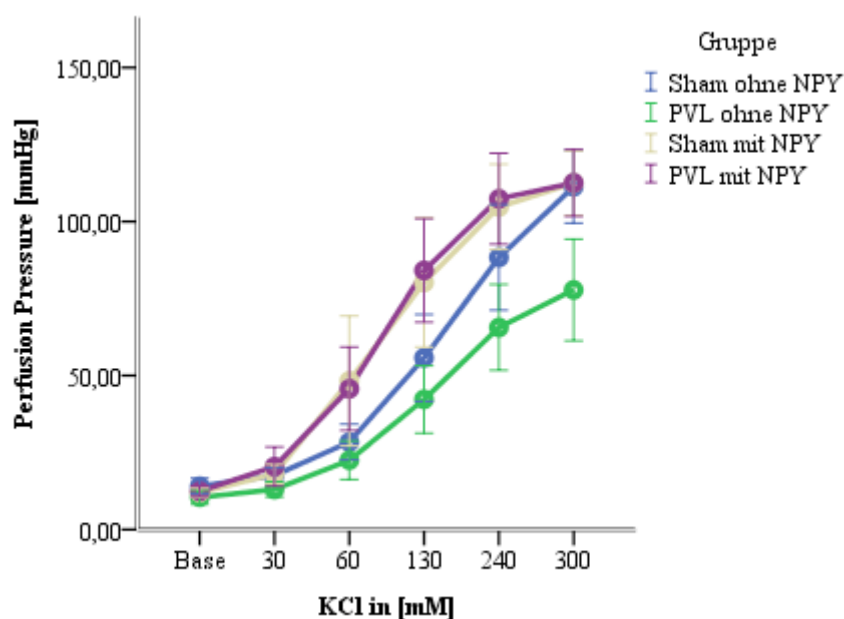
**Abbildung 28:** Druckaufzeichnung einer In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines Kontrolltiers (links) und eines PVL-Tiers (rechts).

Sowohl in den abgebildeten Druckaufzeichnungen (Abb. 28) als auch in Abbildung 29 ist gut zu erkennen, dass sich für PVL- und Kontrolltiere nahezu identische Perfusionsdrücke ergeben, wenn bereits zu Beginn mit NPY vorinkubiert wird. Lagen in der vorherigen Versuchsreihe, wo NPY erst in einem zweiten Perfusionszyklus zugegeben wurde, die jeweiligen Perfusionsdrücke bei PVL-Tieren noch knapp unter dem Niveau von gesunden Ratten, so kann hier für keine KCl-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen berechnet werden.

Im Vergleich zu den ersten Perfusionszyklen, wo auf eine Zugabe von NPY verzichtet wurde, kann sowohl für Kontroll- ( $EC_{50}$ :  $73,7 \pm 24,6 \text{ mM}$  vs.  $118,9 \pm 21,8 \text{ mM}$ ) als auch für PVL-Tiere ( $EC_{50}$ :  $75,6 \pm 13,6 \text{ mM}$  vs.  $118,7 \pm 33,6 \text{ mM}$ ) eine deutliche Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve beobachtet werden. Zwischen den  $EC_{50}$ -Werten war weder ohne noch nach Zugabe von NPY ein signifikanter Unterschied zwischen PVL- und Kontrolltieren festzustellen. NPY hat somit die Gefäßreaktivität für beide Gruppen in gleichem Ausmaß erhöht.

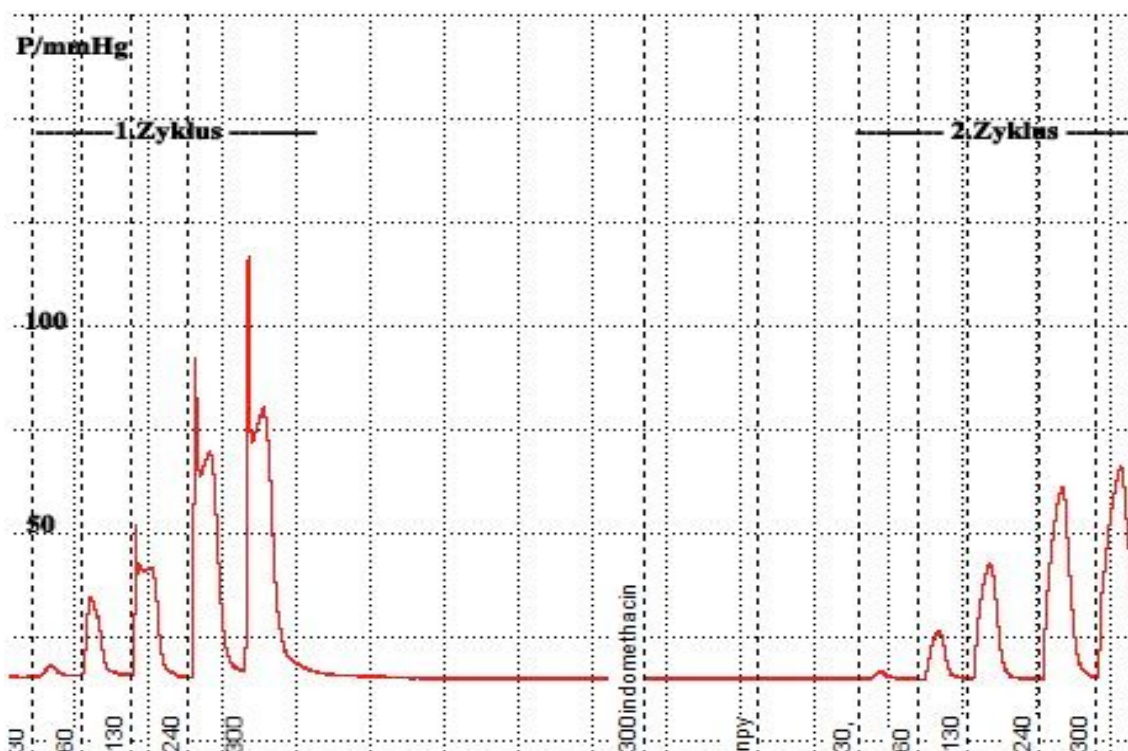
Die maximale Kontraktionskraft, welche in der PVL-Gruppe deutlich vermindert war ( $p < 0,05$ ), wird analog zur vorherigen Versuchsreihe lediglich für PVL- nicht aber für Kontrolltiere signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ).





**Abbildung 29:** Dargestellt ist die KCl-induzierte Vasokonstriktion von Kontroll- und PVL-Tieren mit und ohne Vorinkubation mit NPY. In dieser Versuchsreihe wurde - um etwaige  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierende Vorgänge zu umgehen - bereits zu Beginn mit NPY vorinkubiert. Dies hatte nahezu identische Kurvenverläufe für beide Versuchsgruppen zur Folge. Außerdem sind die ersten Perfusionszyklen der vorherigen Versuchsreihen abgebildet, wo auf eine Vorinkubation mit NPY verzichtet wurde. Das mesenteriale Gefäßbett von portal hypertensiven Ratten spricht ohne Vorinkubation mit NPY deutlich geringer auf den Stimulus KCl an als gesundes Gewebe. In Gegenwart von NPY zeigen sich nahezu identische Kurvenverläufe. In der PVL-Gruppe zeigt sich zudem eine Steigerung des maximalen Perfusionsdrucks. Sham: Kontrollgruppe. n=17 für Kontrolltiere ohne NPY, n= 15 für PVL-Tiere ohne NPY, n=6 für Kontrolltiere mit NPY, n=7 für PVL-Tiere mit NPY. Sham, Kontrollgruppe.

#### 6.4 Versuchsreihe 4: Untersuchung der Abhängigkeit der NPY-Effekte vom Cyclooxygenase Signalweg bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett der Ratte



**Abbildung 30:** Druckaufzeichnung einer In-vitro-Perfusion des mesenterialen Gefäßbetts eines Kontrolltiers.

In Abbildung 30 ist die Powerlab-Aufzeichnung einer gesunden Ratte dargestellt. Die Perfusion wurde analog zur zweiten Versuchsreihe durchgeführt, allerdings wurde das Gewebe vor NPY-Zugabe mit Indomethacin inkubiert. Deutlich zu sehen: NPY ist zu keiner potenzierenden Wirkung mehr befähigt.

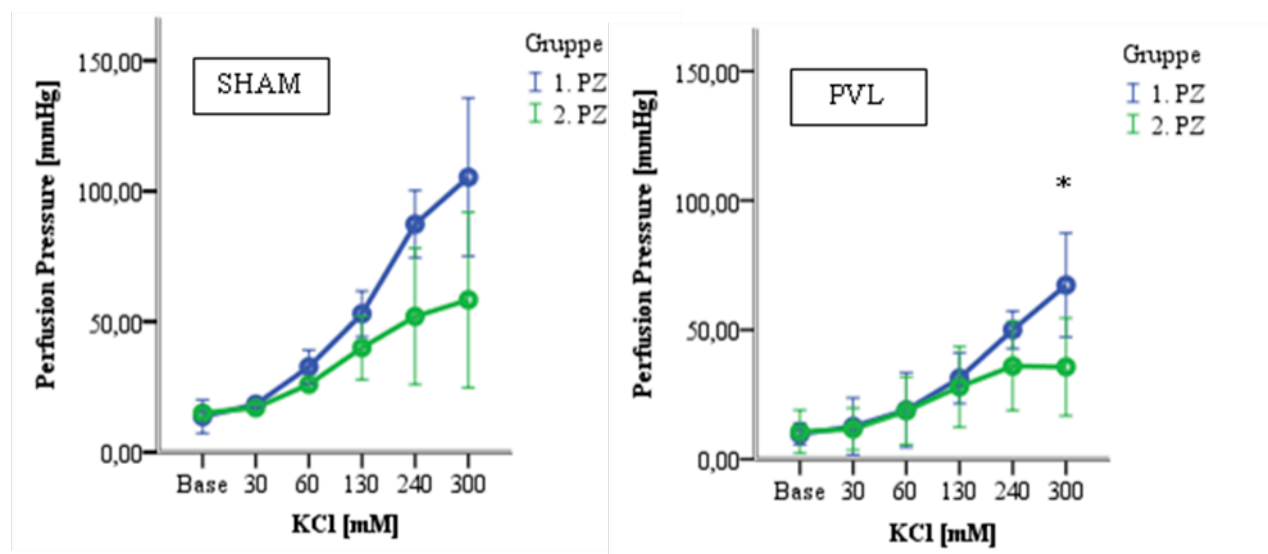
Für niedrige KCl-Konzentrationen ergeben sich in beiden Perfusionszyklen nahezu identische Drücke. Bei den beiden höchsten KCl-Konzentrationen von 240 und 300 mM lassen sich im zweiten Zyklus zwar tendenziell niedrigere Perfusionsdrücke beobachten, aber es lässt sich für keine KCl-Konzentration ein signifikanter Unterschied der Perfusionsdrücke zwischen beiden Zyklen berechnen (Abb. 31).

Diese Versuchsreihe wurde selbstverständlich auch für die PVL-Gruppe durchgeführt. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsreihen war NPY in Gegenwart von Indomethacin nicht in der Lage, die maximale Kontraktionskraft zu steigern. Für die höchste KCl-Konzentration von 300mM waren die erzielten Perfusionsdrücke in Gegenwart von Indomethacin sogar signifikant

niedriger als im ersten Zyklus. Für die übrigen KCl-Konzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede in den Perfusionsdrücken zu beobachten (Abb. 32).

Die  $EC_{50}$ -Werte sind im zweiten Perfusionszyklus niedriger als im ersten Zyklus (Sham:  $132,7 \pm 14,1 \text{ mmHg}$  vs.  $70,2 \pm 16,1 \text{ mmHg}$ , PVL:  $168,3 \pm 64,0 \text{ mmHg}$  vs.  $65,3 \pm 11,8 \text{ mmHg}$ ). Eine Steigerung der Gefäßsensibilität im Sinne einer Linkverschiebung der Dosis-Wirkungskurve ist aber dennoch in keinsten Weise zu beobachten. Die Abnahme der  $EC_{50}$ -Werte ist lediglich auf den Kurvenverlauf im zweiten Perfusionszyklus, mit nahezu unveränderten Perfusionsdrücken für niedrige KCl-Konzentrationen und gleichzeitig einer Abnahme für hohe KCl-Konzentrationen, zurückzuführen (Abb. 30/31). Auf die Ruhedrucke hatte die Administration von Indomethacin jeweils keinen Einfluss.

Diese Ergebnisse lassen zum einen eine Beteiligung des Arachidonsäure-Metabolismus an den NPY-Effekten im mesenterialen Gefäßbett vermuten. Zum anderen belegen sie ebenso wie vorausgegangene Studien die Bedeutung des Arachidonsäure-Metabolismus in der Regulation des Gefäßmuskeltonus (Somlyo et al., 1994).



**Abbildung 31/32:** Dargestellt ist die KCl-induzierte Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett von Kontrolltieren (Abb.30) und PVL-Ratten (Abb.31). Im zweiten Perfusionszyklus wurde jeweils mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin und anschließend mit NPY vorinkubiert. Für niedrige KCl-Konzentrationen ergeben sich für beide Perfusionszyklen nahezu identische Kurvenverläufe. Für die beiden höchsten KCl-Dosen werden im zweiten Zyklus tendenziell niedrigere Perfusionsdrücke erzielt.  $n=3$  für Kontroll- und  $n=3$  für PVL-Tiere. PZ: Perfusionszyklus. Sham: Kontrollgruppe. \* $p < 0,05$ .

## 7. Diskussion

Portaler Hochdruck jeglicher Genese führt zu einer hämodynamischen Dysregulation, welche zur Ausbildung eines hyperdynamen Zirkulationssyndroms (HZS) führt. Dieses basiert auf einem Ungleichgewicht vasokonstriktiver und vasodilatativer Stimuli. So bildet sich einerseits eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren aus (*Sieber et al. 1993; Hartleb et al. 1994; Kiel et al. 1985; Grozsmann and Franchis 1999*), andererseits stellt sich eine verstärkte Akkumulation vasodilatierender Mediatoren ein, allen voran Stickstoffmonoxid (*Grozsmann et Franchis 1999*). Das Vollbild des HZS zeichnet sich durch einen verminderten mesenterialen und systemischen Gefäßwiderstand, eine Expansion des Plasmavolumens sowie eine konsekutive Steigerung des Herzzeitvolumens aus (*Vorobioff et al. 1983, Colombato et al. 1992*). Dabei verändern sich diese Parameter in sequenzieller Weise. So geht eine Abnahme des splanchnischen Gefäßwiderstands einer Änderung der systemischen Parameter voraus (*Vorobioff et al. 1983*). Ferner ist die hämodynamische Dysregulation im Splanchnikusgebiet besonders deutlich ausgeprägt (*Vorobioff et al. 1983; Colombato et al. 1992*). Dem mesenterialen Gefäßbett kommt daher in der Pathophysiologie des HZS eine zentrale Rolle zu. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Charakterisierung der NPY-Effekte bei portaler Hypertension Perfusionen des mesenterialen Gefäßbetts von PVL- und Kontrollratten herangezogen.

### 7.1 Charakterisierung der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion und der potenzierenden NPY-Effekte im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten

***Inwiefern ist die rezeptorunabhängige Kontraktion im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten vermindert und kann dies ggfs. durch NPY korrigiert werden?***

Im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Ratten besteht im Vergleich zu gesunden Tieren ein deutlich vermindertes Ansprechen gegenüber dem Stimulus KCl. Dies konnte in dieser Arbeit für sämtliche verwendeten KCl-Konzentrationen beobachtet werden. Hierbei zeigten sich zwischen PVL- und Kontrolltieren bezüglich des EC<sub>50</sub>-Wertes als Maß für die Gefäßsensitivität keine signifikanten Unterschiede, allerdings war die Kontraktilität bei PVL-Tieren stark vermindert. Bereits andere Studien konnten als Ursache für die vaskuläre Hyporeaktivität im Splanchnikusgebiet einen Rezeptordefekt ausschließen, vielmehr ist diese auf eine Fehlregulierung intrazellulärer Signalkaskaden zurückzuführen (*Huang et al. 1996; Liao et al. 1994; MacGilchrist et al. 1990*). Dies äußert sich auch in einem verminderten Ansprechen

gegenüber rezeptorunabhängigen Vasokonstriktoren, wie in dieser Arbeit durch die Verwendung des membrandepolarisierenden Stimulus Kaliumchlorid untermauert werden konnte.

In Gegenwart von NPY ist für die PVL- und Kontrollgruppe eine deutliche Verbesserung der Gefäßsensitivität zu beobachten. Bezüglich des  $EC_{50}$ -Wertes lässt sich für die Kontrollgruppe eine Abnahme von 79 mM und für die PVL-Gruppe von 69 mM berechnen. Indirekt bedeutet dies eine Steigerung der vaskulären Sensitivität um mehr als das Doppelte des Ursprungswertes. Dabei lässt sich weder im ersten noch im zweiten Perfusionszyklus ein signifikanter Unterschied zwischen den  $EC_{50}$ -Werten beider Versuchsgruppen berechnen. NPY war somit in der Lage, die Gefäßsensitivität in hypertensivem Gewebe in gleichem Ausmaß wie bei gesunden Tieren zu steigern.

Ferner war NPY befähigt, die maximale Kontraktionskraft in der PVL-Gruppe, nicht aber bei Kontrolltieren, zu steigern. Bezüglich  $E_{max}$  war unter der NPY-Wirkung zwischen beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar. Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade die vaskuläre Kontraktilität, nicht aber die Sensitivität, bei PVL-Ratten vermindert war. Wird NPY erst in einem zweiten Perfusionszyklus zugegeben, so bleiben die Perfusionsdrücke in der PVL-Gruppe knapp unter dem Niveau von gesunden Tieren. Wird hingegen, um eine etwaige  $Ca^{2+}$ -Sensibilisierung in einem ersten KCl-Zyklus zu umgehen, nur ein Perfusionszyklus nach Vorinkubation mit NPY durchgeführt, so sind in beiden Versuchsgruppen die erzielten Dosis-Wirkungskurven nahezu vollkommen identisch. NPY konnte hier somit die vaskuläre Hyporeaktivität vollständig kompensieren.

Die spezifische Wirkungsweise von NPY bei portaler Hypertension war bereits für die  $\alpha_1$ -adrenerge Vasokonstriktion bekannt (*Wiest et al. 2006*) und konnte hier nun erstmals auch für die rezeptorunabhängige Kontraktion im mesenterialen Gefäßbett nachgewiesen werden.

Diese Arbeit hatte nicht zum Ziel, die genauen Mechanismen der zellulären Signaltransduktion zu entschlüsseln, welche der NPY-Wirkung zu Grunde liegen. Es bleibt daher zu spekulieren, wie NPY auf zellulärer Ebene exakt wirkt. Aufgrund der Ergebnisse vorausgegangener Studien sind hierfür verschiedene Mechanismen in Betracht zu ziehen.

Hier sind v.a. der Rho-Kinase-Signalweg sowie eine Inhibition der NO-Synthase anzuführen. Beides war in Untersuchungen der rezeptorabhängigen Vasokonstriktion bei Pfortaderhochdruck in besonderem Maße ausgeprägt, sodass es sich hierbei vermutlich um Hauptmechanismen in der spezifischen NPY-Wirkung handelt (*Moleda et al. 2011*). Darüber hinaus scheint NPY den Fehlregulierungen des  $Ca^{2+}$ -Haushalts entgegenzuwirken. In der glatten Muskulatur des mesenterialen Gefäßbetts erzielt NPY seine Wirkung durch die Bindung an den Y1-Rezeptor (*Wahlestedt and Reis 1993; Prieto et al. 1997, 2000*). Die Stimulierung dieses Rezeptortyps hat

einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Folge (*Motulsky et Michel 1988*). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle scheint dabei im mesenterialen Gefäßbett ein transmembranärer Einstrom über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu sein (*Prieto et al. 1997, 2000; Tanaka et al. 1995*).

***Besteht neben der  $\alpha_1$ -adrenergen auch bei der rezeptorunabhängigen Kontraktion möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Wirkmechanismus von NPY und dem Arachidonsäure-Metabolismus?***

Von diesen multiplen Effekten abgesehen, wurde in dieser Arbeit des Weiteren ein Zusammenhang zwischen der NPY-Wirkung und dem Cyclooxygenase-Signalweg untersucht. Bei diesem wird durch das Enzym Phospholipase  $\text{A}_2$  AA freigesetzt, aus welcher im Folgenden sämtliche vasoaktiven Prostaglandine synthetisiert werden können (*Hamberg et al. 1973*). Dies wird als wichtiger Mechanismus in der Regulation des Gefäßtonus angesehen (*Somlyo et Somlyo 1994*). Das Schlüsselenzym stellt hierbei die COX dar (*Simmons et al. 2004*). Aus diesem Grund sollte unter Verwendung des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin untersucht werden, ob eine intakte COX für die NPY-Wirkung notwendig ist.

Für die potenzierenden Effekte von NPY bei der rezeptorabhängigen Kontraktion existieren bereits Studien, die einen Zusammenhang zwischen den NPY-Wirkmechanismen und dem AA-Metabolismus herzustellen versuchten. Anhand zellexperimenteller Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NPY per se zu keiner vermehrten AA-Freisetzung führt, bei Co-Stimulation des  $\text{Y}_1$ - und  $\alpha_1$ -Rezeptors diese jedoch in synergistischer Weise potenziert (*Selbie et al. 1997*). In Studien an humanen Kapazitätsgefäßen war NPY sowohl in Gegenwart von Indomethacin als auch bei Zugabe eines Thromboxan  $\text{A}_2$ -Inhibitors zu keiner Potenzierung der  $\alpha_1$ -adrenergen Vasokonstriktion mehr befähigt. Dies macht eine verstärkte Synthese vasoaktiver Prostaglandine und hier insbesondere Thromboxan  $\text{A}_2$  als Effektor der potenzierenden NPY-Effekte bei Kapazitätsgefäßen wahrscheinlich (*Fabi et al. 1998*). Ein Mechanismus, der auch bei den Widerstandsgefäßen im mesenterialen Gefäßbett ausgeprägt sein könnte. Sowohl bei der  $\alpha_1$ -adrenergen als auch bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion erzeugt die Administration von NPY per se keine Kontraktion. Erst bei Zugabe eines Vasokonstriktors bzw. hoher KCl-Dosen wird die Vasokonstriktion potenziert. Ähnliches konnte für das Somatostatin-Analogon Octreotid bei der  $\alpha_1$ -adrenergen Vasokonstriktion beobachtet werden. Octreotid führt per se zu keiner Vasokonstriktion, potenziert die  $\alpha_1$ -adrenerge Kontraktion jedoch eindrucklich (*Wiest et Groszmann 2001*). Durch Inhibition auf Ebene der Cyclooxygenase bzw. der  $\text{PLA}_2$  konnte dieser Octreotid-Effekt aufgehoben werden (*Wiest et Groszmann 2001*). Diese ähnliche Wirkungsweise lässt die Spekulation zu, dass der COX-Signalweg nicht nur durch Octreotid, sondern auch durch NPY aktiviert werden könnte.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in dieser Arbeit wurde nun erstmals auch ein Zusammenhang zwischen der NPY-Wirkung und dem COX-Signalweg für die rezeptorunabhängige Kontraktion im mesenterialen Gefäßbett untersucht.

Es zeigte sich parallel zu den Ergebnissen der  $\alpha_1$ -adrenergen Kontraktion, dass NPY in Gegenwart von Indomethacin die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion nicht potenzieren konnte. NPY konnte weder eine weitere Steigerung der Gefäßsensibilität noch der Kontraktionskraft erzielen.

NPY könnte somit die rezeptorunabhängige Kontraktion unter anderem über eine verstärkte Aktivierung des Phospholipase A<sub>2</sub>-Signalwegs und eine verstärkte Synthese vasoaktiver Produkte aus dem AA-Metabolismus potenzieren. Hier kommt etwa Thromboxan A<sub>2</sub> als möglicher auto- und parakrin wirkender Effektor in Frage. Von Thromboxan A<sub>2</sub> ist bekannt, dass es in Situationen mit vermehrt zirkulierenden Vasodilatoren diesen entgegenwirkt (*Seller et Stallone 2008*). Dies scheint beispielsweise bei Sepsis durch Inhibition der NOS der Fall zu sein (*Yamada et al. 2003*).

***Hat in unserer Versuchsanordnung durch wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen eine Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung stattgefunden und ist diese bei portaler Hypertension ggfs. beeinträchtigt?***

Verschiedene Studien der letzten Jahre hatten zum Ziel, die intrazellulären Vorgänge bei der KCl-induzierten Kontraktion im glatten Gefäßmuskel näher zu entschlüsseln. Sie legen die Vermutung nahe, dass auch der vermeintlich einfache Stimulus KCl eine gewisse Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung im glatten Gefäßmuskel erzeugen kann (*Mita et al. 2002; Urban et al. 2003; Sakamoto et al. 2003*).

Diesen Ergebnissen sollte in dieser Arbeit Rechnung getragen werden. Daher galt es zu untersuchen, inwiefern die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen in unserer Versuchsanordnung eine Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung bewirkt hat und ob diese bei Pfortaderhochdruck gegebenenfalls einer Alteration unterworfen ist.

Auch ohne die Administration von NPY konnte bei Kontrolltieren eine moderate aber signifikante Steigerung der Perfusionsdrücke im zweiten Zyklus erzielt werden. Es ist hier anzumerken, dass die Perfusionsdrücke in Anwesenheit von NPY deutlich stärker gesteigert werden konnten, eine gewisse Steigerung jedoch höchst reproduzierbar bei jeder einzelnen Perfusion auch in Abwesenheit von NPY für sämtliche KCl-Konzentrationen gemessen werden konnte. Für eine KCl-Konzentration von 60 mM betrug die Steigerung des Perfusionsdrucks immerhin knapp 50 Prozent.

Ebenso können bei PVL-Tieren im zweiten Zyklus erhöhte Perfusionsdrücke erzielt werden, allerdings fällt hier die Steigerung geringer als in der Kontrollgruppe aus und ist zudem nur für

KCl-Konzentrationen von 130 und 240 mM signifikant ( $p < 0.05$ ). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen im ersten Perfusionszyklus eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung stattgefunden hat, welche als Ausdruck der vaskulären Dysfunktion bei PVL-Tieren vermindert bzw. nicht signifikant ausgeprägt war.

Dass auch bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion durch Stimulation mit hohen KCl-Konzentrationen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung erzielt werden kann, steht im Widerspruch zum etablierten Modell der Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Hierin erzeugt der vermeintlich einfache Stimulus KCl ausschließlich über die Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und einen konsekutiven Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Vasokonstriktion (*Karaki et al. 1991*). Die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hingegen erzielt für eine bestimmte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine stärkere Kraftentwicklung als der Stimulus KCl. Dieser Mechanismus wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung bezeichnet und durch die Aktivierung multipler intrazellulärer Kaskaden und Enzyme, wie der RhoA-Kinase und der PKC, getragen (*Somlyo et al. 1994*).

Es scheint, dass auch bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung der RhoA-Kinase führen (*Sakurada et al. 2003*). Hier ist u. a. eine ROK-Aktivierung über einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (*Sakurada et al. 2003*; *Urban et al. 2003*), eine Aktivierung durch RhoA (*Sakurada et al. 2003*) sowie durch Arachidonsäure (*Bolotina et Csutora 2005*; *Hirayabashi et al. 2004*) anzuführen. Ferner könnte die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch auto- und parakrin wirkende Arachidonsäure-Metaboliten eine Rolle spielen (*Leslie 2004*).

Wie beschrieben, werden möglicherweise all diese Mechanismen durch NPY beeinflusst. So existieren verschiedene Studien, die eine verstärkte ROK-Aktivierung (*Moleda et al. 2011*), eine vermehrte AA-Freisetzung (*Selbie et al. 1997*) sowie einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (*Motulsky et Michel 1988*; *Prieto et al. 1997*, *Selbie et al. 1995*) in der glatten Gefäßmuskulatur durch Neuropeptid Y belegen. Außerdem lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung zu, dass NPY die KCl-vermittelte Kontraktion u. a. durch die vermehrte Synthese vasokonstriktiver Prostaglandine potenzieren könnte.

### ***Schlussfolgerungen***

Die vaskuläre Hypokontraktilität bei Pfortaderhochdruck wird nicht auf Rezeptorebene, sondern durch die Fehlregulierung intrazellulärer Signalkaskaden verursacht (*MacGilchrist et al. 1990*; *Neef et al. 2003*). Dies führt auch zu einem verminderten Ansprechen gegenüber dem Stimulus KCl, der seit langem zur Umgehung rezeptorgekoppelter Vorgänge verwendet wird (*Karaki et al.*



1988, 1989). Interessanterweise potenziert NPY die rezeptorabhängige sowie die KCl-induzierte Vasokonstriktion bei Pfortaderhochdruck potenter als bei gesundem Gewebe. Neuropeptid Y scheint folglich gerade in die fehlregulierten Signalkaskaden korrigierend einzugreifen.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nicht nur zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden führt, sondern diese oft auch mit Signalkaskaden anderer Rezeptoren in synergistischer Weise interagieren. Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle in der Modulation und Feinabstimmung der verschiedenen rezeptorgekoppelten Signalwege (*Selbie and Hill 1998*). Das Somatostatin-Analogon Octreotid ist beispielsweise nicht in der Lage, die KCl-induzierte Vasokonstriktion zu potenzieren, erst in Gegenwart eines rezeptorstimulierenden Vasokonstriktors zeigt es eine vasokonstriktive Wirkung. Hier scheint also die synergistische Interaktion zweier rezeptorgekoppelter Signalwege entscheidend zu sein (*Wiest et al. 2001*). Anhand der Untersuchung der KCl-induzierten Vasokonstriktion konnte in dieser Arbeit nun erstmals nachgewiesen werden, dass der Neurotransmitter NPY die Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett auf eine rezeptorunabhängige, unspezifische Weise potenziert. Neben der Stimulierung des Y1-Rezeptors durch NPY scheint also keine Co-Stimulation eines zweiten Rezeptors durch einen weiteren Vasokonstriktor notwendig zu sein. Vielmehr bewirkt die Korrektur fehlregulierter Signalkaskaden durch NPY offensichtlich, dass ein bestimmter Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine entsprechend stärkere Vasokonstriktion zu Folge hat. Hier konnte somit ein wichtiger und neuer Aspekt für das Verständnis der vasokonstriktiven NPY-Effekte beleuchtet werden.

Es existieren verschiedene Studien, die dem vermeintlich simplen Stimulus KCl eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung zusprechen (*Mita et al. 2002; Urban et al. 2003; Sakamoto et al. 2003*). Offensichtlich ist auch in unserer Versuchsanordnung durch die wiederholte Stimulation mit hohen KCl-Dosen in einem ersten Perfusionszyklus eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung aufgetreten. Interessanterweise scheinen die involvierten Signalkaskaden bei portaler Hypertension einer Alteration unterworfen zu sein, sodass die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierenden Vorgänge in der PVL-Gruppe vermindert ausgeprägt waren. Dies erklärt auch, wieso die Perfusionsdrücke in der PVL-Gruppe knapp unter dem Niveau gesunder Tiere blieben, wenn NPY erst in einem zweiten Perfusionszyklus zugegeben wurde. Wurde jedoch zur Umgehung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierender Vorgänge nur ein Perfusionszyklus nach Vorinkubation mit NPY durchgeführt, ergaben sich für beide Untersuchungsgruppen nahezu identische Perfusionskurven. Werden also die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierenden Mechanismen in einem ersten KCl-Zyklus umgangen, um ausschließlich die potenzierenden NPY-Effekte zu messen, so ist für die PVL- und Kontrollgruppe die gleiche vaskuläre Reaktivität zu beobachten. Dies bedeutet, dass NPY die rezeptorunabhängige

Vasokonstriktion gerade in der PVL-Gruppe besonders effektiv potenziert hat und die Pathomechanismen bei portaler Hypertonie vollständig kompensieren konnte.

Ferner lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung zu, dass NPY die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion u.a. über eine Aktivierung des PLA<sub>2</sub>-Signalwegs potenziert. Weder die Gefäßsensibilität noch die Kontraktionskraft konnten nach Zugabe von Indomethacin durch NPY weiter gesteigert werden. Es wäre somit möglich, dass NPY die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion durch die vermehrte Synthese vasoaktiver Arachidonsäure-Metabolite wie Thromboxan A<sub>2</sub> steigert, welche ihrerseits über die Stimulierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion potenzieren. Für hohe KCl-Konzentrationen waren in Gegenwart von Indomethacin tendenziell niedrigere Perfusionsdrücke zu beobachten. Es bleibt somit zu klären, inwiefern mittels Indomethacin speziell die NPY-Wirkung und nicht die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion an sich gehemmt wurde.

## **7.2 Ausblick: NPY als zukünftiges Agens bei portaler Hypertonie?**

Die Datenlage aus einer Vielzahl von verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen sowie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die effektive vasokonstriktive Wirkungsweise von NPY bei Pfortaderhochdruck am Tiermodell (*Moleda et al. 2011; Wiest et al. 2006, Franchis et Groszmann 1999*). Neuropeptid Y wirkt den entscheidenden Mechanismen in der Entstehung des HZS entgegen: dem verminderten Ansprechen gegenüber endogenen Vasokonstriktoren und der Akkumulation von vasodilatierenden Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (*Franchis et Groszmann 1999*). Dies trägt entscheidend zur Besserung der hämodynamischen Situation bei Zirrhose bei. Aus *in vivo*-Versuchen an Ratten ging hervor, dass bei Bestehen eines Hyperdynamen Zirkulationssyndroms NPY den mesenterialen und systemischen Gefäßwiderstand erhöht sowie das HZV reduziert, ohne dabei diese Parameter bei gesunden Ratten zu beeinflussen (*Moleda et al. 2011*). Interessanterweise waren die potenzierenden NPY-Effekte auf die Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett in portal hypertensivem Gewebe stärker als bei gesunden Tieren ausgeprägt. Damit scheint NPY das bisher einzige vasoaktive Agens zu sein, das bei portaler Hypertension einen größeren Effekt als bei normotensiven Tieren zeigt. Alle anderen vasokonstriktiven Substanzen, wie z.B. Endothelin-1, Angiotensin-II und Vasopressin, die im mesenterialen Gefäßbett portal hypertensiver Tiere getestet wurden, waren dort weniger potent als bei Kontrolltieren (*Groszmann and Franchis 1999*). Diese spezifische Wirkung von NPY macht es als mögliches zukünftiges Agens bei Zirrhose besonders interessant. Allerdings basieren diese

Ergebnisse lediglich auf Studien am Tiermodell. Über mögliche erwünschte und unerwünschte NPY-Effekte nach intravenöser Gabe beim Menschen existiert nur eine sehr dünne Datenlage (*Ahlborg et Lundberg 1991, 1992; Lundberg et al. 1987*). Keine dieser Studien wurde an Patienten mit portaler Hypertonie durchgeführt.

Ferner kommen im medizinischen Alltag bereits verschiedene Agenzien zum Einsatz, die über eine Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet den portalen Fluss und den portalen Druck reduzieren. Bei akuter Varizenblutung sind dies neben Vasopressin und Somatostatin in erster Linie deren Analoga Terlipressin und Octreotid. (*D'amonico et al. 1999*), wobei ausschließlich für Terlipressin eine Senkung der Mortalität nachgewiesen werden konnte (*Ioannou et al. 2003*). Terlipressin ist zudem auch bei anderen Komplikationen des HZS, wie dem hepatorenalem Syndrom (*Wong et al. 2012*) oder bei therapierefraktärem Aszites (*Fimiani et al. 2011*), wirksam. Es bleibt zu klären, ob NPY diesen Agenzien hinsichtlich Wirksamkeit, unerwünschter Nebenwirkungen und Verfügbarkeit überlegen sein könnte.

Was die Wirksamkeit betrifft, kann sowohl für Terlipressin (*Heinemann et Stauber 1997; Baik et al. 2005*) als auch für NPY (*Wiest et al. 2006; Moleda et al. 2011*) eine deutliche Verbesserung der vaskulären Reaktivität beobachtet werden. Bei *in vitro*-Perfusionen des mesenterialen Gefäßbetts portal hypertensiver Ratten war NPY befähigt, die vaskuläre Reaktivität gegenüber Methoxamin sogar über das Niveau von gesunden Tieren anzuheben (*Moleda et al. 2011*). Unter Terlipressin blieb dagegen eine „Rest“-Hypokontraktilität bestehen (*Stauber et Heinemann 1997*).

Hinsichtlich der möglichen Nebenwirkungen müssen v. a. unerwünschte vasokonstriktorische Effekte von NPY außerhalb des Splanchnikusgebietes in Betracht gezogen werden. Bei Terlipressin sind beispielsweise mesenteriale, periphere oder kardiale Ischämien in bis zu 3 % der Patienten zu beobachten, bei Vasopressin weitaus häufiger (*Ionnou et al. 2004*). In den wenigen Studien am Menschen wurde NPY in einer Konzentration von 3 bzw. 5 pmol/kg/min für jeweils 40 Minuten perfundiert. Die hierbei erreichten NPY-Konzentrationen hatten keinerlei systemische kardiovaskulären Auswirkungen (*Lundberg et al. 1987; Ahlborg et al. 1992*).

Ein besonderes Augenmerk wird auch auf die Nierenperfusion in Gegenwart von NPY zu richten sein. Zirrhosepatienten sind wegen eines verminderten effektiven Blutvolumens und der verstärkten Synthese systemisch wirkender Vasokonstriktoren von der Entwicklung eines HRS gefährdet (*Wong et al. 2001*). Das HRS stellt die extremste Ausprägung des HZS dar (*Schierer et al. 1988*) und geht mit einer besonders schlechten Prognose einher (*Gines et al. 1993*). Von Vasopressin-Analoga ist bekannt, dass sie über eine Wiederherstellung des Gefäßwiderstands bei Zirrhosepatienten mit Niereninsuffizienz den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate verbessern (*Lenz et al. 1991*). In einer der wenigen Studien am Menschen zeigte sich bei gesunden Probanden, dass die intravenöse Gabe von NPY eine um 13 % verringerte

Nierenperfusion bewirkte (*Ahlborg et Lundberg 1992*). Bei Patienten mit Zirrhose könnte sich eine verminderte Nierendurchblutung wegen der Gefahr eines HRS fatal auswirken. Es bleibt allerdings abzuwarten, ob in diesem Patientengut die Wiederherstellung des mesenterialen und systemischen Gefäßwiderstands durch NPY – ähnlich wie bei Vasopressin-Analoga – nicht sogar zu einer Verbesserung der Nierendurchblutung beiträgt. Bei Ratten mit portaler Hypertension führte die Gabe von NPY jedenfalls zu keinem verminderten renalen Blutfluss (*Moleda et al. 2011*).

Neben den z. T. schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen weist Vasopressin mit einer Halbwertszeit von einer Minute zudem ein ungünstiges pharmakokinetisches Profil auf. Daher mussten nebenwirkungsärmere Vasopressin-Analoga mit einer längeren Plasmahalbwertszeit entwickelt werden. Für NPY konnte eine Plasmahalbwertszeit von über vier Stunden ermittelt werden (*Lundberg et al. 1987; Ahlborg et al. 1992*). Dies entspricht in etwa der Halbwertszeit von Terlipressin (*D' amino et al. 1999*). Sowohl bei Vasopressin-Analoga als auch bei NPY handelt es sich um kostspielige, in etwa gleich teure Agenzien. Allerdings lagen die bisher verwendeten NPY-Dosen (*Lundberg et al. 1987; Ahlborg et al. 1992*) deutlich unter denen von Terlipressin (*García-Pagán et al. 2012*).

### 7.3 Weitere Investigationenpunkte

In weiteren Experimenten wäre interessant, die genauen Mechanismen der NPY-Effekte auf zellulärer Ebene weiter zu beleuchten. Hier könnten zum einen der PLA<sub>2</sub>-Signalweg als auch die ROK-Kaskade Gegenstand weiterer Investigationen sein.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass NPY die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion über eine verstärkte Aktivierung der PLA<sub>2</sub>-Kaskade und konsekutiv einer verstärkten Synthese vasoaktiver Prostaglandine, insbesondere von Thromboxan A<sub>2</sub>, potenzieren könnte. Dies muss aber durch weitere Untersuchungen validiert werden.

Die rezeptorunabhängige Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung wird vorwiegend durch den RhoA/ROK-Signalweg getragen (*Osada et al. 1994; Mit et al. 2000*). Es stellt sich die Frage, inwiefern dieser Signalweg bei der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion einer Alteration unterworfen ist und inwiefern NPY diese Fehlregulierung ggfs. beseitigt.

Schließlich bleibt der NPY-Effekt bei portaler Hypertension am Menschen zu klären. Es wäre durchaus möglich, dass NPY den bisher eingesetzten Vasokonstriktoren wie etwa Octreotid und

Terlipressin überlegen ist. Insbesondere, da NPY die einzige Substanz zu sein scheint, die am Tiermodell bei portaler Hypertension im mesenterialen Gefäßbett stärker vasokonstriktiv wirkt als bei gesunden Ratten (*Wiest et al. 2001; Moleda et al. 2011; Heinemann et Stauber 1992b; Franchis et Grozsmann 1999*).

## 8. Zusammenfassung

Sowohl bei Zirrhose als auch bei sämtlichen Formen der portalen Hypertension kommt es zur Ausbildung eines Hyperdynamen Zirkulationssyndroms. Dieses geht mit einer generalisierten arteriellen Vasodilatation, einem erhöhten Herzzeitvolumen und einer verstärkten regionalen Organdurchblutung einher. Das HZS ist an sämtlichen Komplikationen der Leberzirrhose bzw. der portalen Hypertension beteiligt (*Iwakiri et Grozsmann 2006; Wiest et Lock 2000, 2003*). Die arterielle Vasodilatation, welche betont im Splanchnikusgebiet auftritt, stellt den entscheidenden Faktor in der Entstehung des Hyperdynamen Zirkulationssyndroms dar. Für diese arterielle Gefäßweitstellung sind die Hyporeaktivität gegenüber endogenen Vasokonstriktoren sowie die verstärkte Akkumulation von vasodilatierenden Mediatoren, v. a. Stickstoffmonoxid, ursächlich (*Franchis et Groszman 1999*).

NPY scheint gerade diesen beiden Hauptmechanismen in der Entstehung des HZS entgegenzuwirken und weist somit als zukünftiges therapeutisches Agens bei Komplikationen im Rahmen von Pfortaderhochdruck großes Potential auf. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die NPY-Effekte im mesenterialen Gefäßbett näher beleuchtet. Hier konzentrierten wir uns allerdings nicht auf die GPCR-induzierte, sondern erstmals auf die nicht-rezeptorvermittelte Vasokonstriktion. Zur Umgehung rezeptorgekoppelter Vorgänge wurden aufsteigende KCl-Konzentrationen verwendet, welche über eine Membrandepolarisation und die Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Kontraktion erzeugen (*Ganitkevich et Isenberg 1991*). Sämtliche Versuche wurden sowohl an portal hypertensiven Ratten als auch an einer Kontrollgruppe durchgeführt.

Als Ausdruck der vaskulären Dysregulation zeigen sich in der PVL-Gruppe ein verminderter Ruhedruck sowie ein deutlich reduzierter maximaler Perfusionsdruck. Die Administration von Neuropeptid Y führte zu einer ausgesprochenen Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, dieser Effekt war bei Kontroll- und PVL-Tieren in gleicher Weise ausgeprägt. Darüber hinaus bewirkte NPY in der PVL, nicht aber in der Kontrollgruppe, eine Steigerung der maximalen

Gefäßkontraktilität, sodass sich nach Zugabe von NPY nahezu identische Perfusionskurven für beide Versuchsgruppen ergaben. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass NPY analog zur  $\alpha_1$ -adrenergen auch die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett bei Pfortaderhochdruck besonders wirksam potenziert und die vaskuläre Dysregulation kompensiert. Das verminderte Ansprechen gegenüber endogenen Vasokonstriktoren ist auf die Fehlregulierung intrazellulärer Signalkaskaden und nicht auf einen Rezeptordefekt zurückzuführen (*Huang et al. 1996; Liao et al. 1994; MacGilchrist et al. 1990*). Aufgrund der spezifischen Wirkungsweise von NPY bei portaler Hypertension ist von einem korrigierenden Effekt von NPY auf die dysregulierten intrazellulären Vorgänge auszugehen. Durch den Nachweis der potenzierenden NPY-Wirkung auf die rezeptorunabhängige Vasokonstriktion im mesenterialen Gefäßbett konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass für diese Effekte neben der Aktivierung des Y1-Rezeptors durch NPY keine Co-Stimulation eines zweiten Rezeptors durch ein weiteres vasokonstriktives Agens notwendig ist.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin hob die potenzierende NPY-Wirkung gänzlich auf. Dies macht eine Beteiligung des Enzyms an der NPY-Wirkung wahrscheinlich. So wäre beispielsweise eine verstärkte Synthese vasokonstriktorischer Mediatoren, v. a. Thromboxan  $A_2$ , durch eine Aktivierung der  $PLA_2$ -Kaskade denkbar. Dies ist jedoch rein spekulativ und es bedarf weiterer Untersuchungen bezüglich der NPY-Effekte in Zusammenhang mit der COX-Kaskade.

Darüber hinaus existieren seit längerem Studien, die dem Stimulus KCl durch Aktivierung der ROK-Kaskade eine gewisse  $Ca^{2+}$ -Sensibilisierung zusprechen (*Mita et al. 2002; Urban et al. 2003; Sakamoto et al. 2003*). Dies kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert werden. Auch wenn die entsprechenden Effekte im Vergleich zur potenzierenden NPY-Wirkung gering ausfallen, waren sie doch in signifikanter Weise nachweisbar. Ferner zeigte sich, dass die  $Ca^{2+}$ -sensibilisierenden Mechanismen bei Pfortaderhochdruck offenbar gestört sind. Auch hier müssen weitere Untersuchungen auf zellulärer Ebene klären, welche Mechanismen der KCl-induzierten  $Ca^{2+}$ -Sensibilisierung zugrunde liegen. Hier könnte insbesondere der RhoA/ROK-Signalweg Gegenstand weiterer Investigationen sein.

## Literaturliste

Andriantsitohaina R., Stoclet J.C. Potentiation by neuropeptide Y of vasoconstriction in rat resistance arteries (1988). *Br J Pharmacol* 95:419–428.

Bacon, Fauci, Braunwald, Kasper, Haser, Longo, Jameson, Loscalzo: *Harrisons Innere Medizin* Band 2 17.Auflage (2008); Kap. 13, S.2434-2438.

Bard J.A., Walker M.W., Branchek T.A., Weinshank R.L. (1995). Cloning and functional expression of a Human Y4 Subtype Receptor for Pancreatic Polypeptide, Neuropeptide Y, and Peptide YY. *J Biom Chem* 270:26762-26765.

Beck-Sickinger AG., Gaida W, Schnorrenberg G., Lang R Jung G. (1990). Neuropeptide Y: Identification of the binding site. *Int J Pept Protein Res.* 36: 522-530.

Berdel W.E., Böhm M., Classen M., Diehl V., Kochsiek K., Schmiegel W. *Innere Medizin*, 5.Auflage (2004); Kap. 14, S.1262-1265.

Berridge M.J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 220:345-360.

Blundell T.L., Tatemoto K., Wood S.P., Pitts J.E., Barlow D.J., Glover I.D. (1985). Coformational studies on the pancreatic polypeptide hormone family. *Eur J Biochem* 142:379-385.

Bolotina V.M. and Csutora P. (2005). CIF and other mysteries of the store-operated Ca<sup>2+</sup>-entry pathway. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 30(7):378-387.

Braillon A., Cales P., Valla D., Gaudy D., Geoffroy P., Lebrec D. (1986). Influence of the degree of liver failure on systemic and splanchnic haemodynamics and on response to propranolol in patients with cirrhosis. *Gut* 27:1204-1209.

Burkhoff A., Linemeyer D.L., Salon J.A. (1998). Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and it's absence in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 53:311-316.

Caberlotto L., Fuxe K., Hurd Y.L. (2000). Characterization of NPY mRNA-expressing cells in the human brain: co-localization with Y2 but not Y1 mRNA in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and striatum. *J Chem Neuroanat* 20:327-337.

- Chen Z.H., Feng G.G., Ishikawa N., Fujiwara Y., Shimada Y. (2007). Possible roles of neuropeptide Y Y<sub>3</sub>-receptor subtype in rat aortic endothelial cell proliferation under hypoxia, and its specific signal transduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(2): 959-67.
- Chojkier M., Groszmann R.J. (1981). Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 240(5):G371-5.
- Colmers W.F., Bleakman D. (1994). Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci* 17:373-379.
- Colombato L., Albeillo A., Groszmann R.J. (1992). Temporal Relationship of Peripheral Vasodilatation, Plasma Volume Expansion and the Hyperdynamic Circulatory State in Portal-hypertensive Rats. *Hepatology* 15:323-328.
- Connor M., Yeo A., Henderson G. (1997). Neuropeptide Y Y<sub>2</sub> receptor and somatostatin sst<sub>2</sub> receptor coupling to mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 120:455-563.
- Debbas G., Hoffman L., Landon E. and Hurwitz L. (1975). Electron microscopic localization of calcium in vascular smooth muscle. *Anat Rec* 182:447-472.
- Dumont Y., Martel J.-C., Fournier A., St-Pierre S. and Quirion R. (1992). Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol* 38:125-167.
- Dumont Y., Cadieux A., Pheng L.H., Fournier A., St-Pierre S., Quirion R. (1994). Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> agonists devoided of activity for the Y<sub>3</sub> receptor sub-type. *Brain Res Mol Brain Res* 26(1-2): 320-4.
- Edvinsson L., Ekblad E., Hakanson R., Wahlestedt C. (1984). Neuropeptide Y potentiates the effects of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol* 83:519-525.
- Edvinsson L., Copeland J.R., Emson P.C., McCulloch J., Uddman R. (1987). Nerve fibres containing neuropeptide Y in the cerebrovascular bed: immunocytochemistry, radioimmunoassay, and vasomotor effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:45-57.
- Edvinsson L., Adamsson M. (1992). Neuropeptide Y inhibits relaxation of guinea pig cerebral, coronary, and uterine arteries: blockade by D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(3):466-472.



Eto M., Kitazawa T., Yazawag M., Mukai H., Ono Y., Brautigan D.L. (2001). Histamine-induced Vasoconstriction Involves Phosphorylation of a Specific Inhibitor Protein for Myosin Phosphatase by Protein Kinase C  $\alpha$  and  $\delta$  Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 276(31):29072-29078.

Eva C., Keinänen K., Monyer H., Seeburg P., Sprengel R. (1990). Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuro peptide receptor family. *FEBS Letters* 271: 81-84.

Eva C., Oberto A., Sprengel R. and Genazzani E. (1992). The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression. *FEBS Lett* 314:285-288.

Feng J., Ito M., Ichikawa K., Isaka N., Nishikawa M., Harthorne D.J., Nakano T. (1999). Inhibitory Phosphorylation Site for Rho-associated Kinase on Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *J Biol Chem* 275(52):37385-37390.

Fu X., Gong M., Jia T., Somlyo A.V., Somlyo A. (1998). The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTP $\gamma$ S-, and phorbol ester-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization of smooth muscle. *FEBS Letters* 440:183-187.

Fuhlendorff J., Langeland J., Melberg S.G., Thøgersen H., Schwartz T.W. (1990). The Antiparallel Pancreatic Polypeptide Fold in the Binding of Neuropeptide Y to Y1 and Y2 Receptors. *The J Biol Chem* 265: 11706-11712.

Fukata Y., Oshiro M., Kaibuchi K. (1998). Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem*;273:34663–34666.

Ganitkevich and Isenberg (1991). Depolarization-mediated intracellular Calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 435:187-205.

Gerald C., Walker M.W., Vaysse P.J., He C., Branchek T.A., Weinshank R.L. (1995). Expression, Cloning and Pharmacological Characterization of a Human Hippocampal Neuropeptide Y/Peptide YY Y2 Receptor Subtype. *Journal Biol Chem* 270:26758-26761.

Gerald C., Walker M.W., Criscione L., Gustafson E.L., Batzl-Hartmann C., Smith K.E., Vayesse P. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382:168-171.

Gong M.C., Kinter M.T., Somlyo A.V., Somlyo A.P. (1995). Arachidonic acid and diacylglycerol associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 486:113-122.

Gong M.C., Fujihara H., Somlyo A.V., Somlyo A.P. (1997). Translocation of rhoA Associated with Ca<sup>2+</sup> Sensitization of Smooth Muscle. *J Biol Chem* 272(16):10704-10709.

Gordon E.A., Krstenansky J.L. and Fishman P.H. (1990). Centrally truncated neuropeptide Y analog acts as an agonist for Y1 receptors on SK-N-MC cells. *Neurosci Lett* 119:187-190.

Gregor P., Millham M.L., Feng Y., Decarr L.B., McCaleb M.L. and Cornfield L.J. (1996). Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett* 381:58-62.

Groszmann R.J., de Franchis R. Chapter: portal hypertension. In: Schiff E, Madrey W, Sorel JB, editors. *Diseases of the liver*. 8th ed., 1999.

Grouzmann E., Meyer C., Bürki E., Brunner H. (2001). Neuropeptide Y Y2 receptor signalling mechanisms in the human glioblastoma cell line LN319. *Peptides* 22:379-386.

Guevara M., Bru C., Gines P., Fernández-Esparrach G., Sort P., Batailler R., Arroyo V., Rodés R. (1998). Increased Cerebrovascular Resistance in Cirrhotic Patients With Ascitis. *Hepatology* 28:39-44.

Gulbenkian S., Saetrum Opgaard O., Ekman R., Costa Andrade N., Wharton J., Polak J.M., Queiroz e Melo J., Edvinsson L. (1993). Peptidergic innervation of human epicardial coronary arteries. *Circ Res* 73:579-588.

Gupta TK, Chen L., Groszmann RJ (1997). Pathophysiology of Portal hypertension. *Baillieres Clin Gastroenterol* 11(2):203-19.

Haller H., Lindschau C., Quass P., Distler A., Luft F.C. (1995). Differentiation of vascular smooth muscle cells and the regulation of protein kinase C – alpha. *Circ Res* 76:21-29.

Hamberg M., Samuelsson B., (1973). Detection and Isolation of an Endoperoxide Intermediate in Prostaglandin Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(3):899-903.

Hartleb M., Moreau R., Cailmail S., Gaudin C. and Lebrec D. (1994). Vascular hyporesponsiveness to endothelin 1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 107:1085-1093.

Heilig M., Söderplam B., Engel J.A., Widerlöv E. (1989). Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology* 98:524-529.

Heinemann A., Stauber R.E. (1996). Vasodilator responses to nitric oxide are enhanced in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 26(9):824-6.

Hennenberg M., Biecker E., Trebicka J., Jochem K., Zhou Y., Schmitdt M., Jakobs K.H., Sauerbruch T., Heller J. (2006). Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 130:838-854.

Hennenberg M., Trebicka J., Sauerbruch T., Heller J. (2008). Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 57(9):1300-14.

Henriksen J.H., Ring-Larsen H., Kanstrup I.L. (1984). Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with decompensated cirrhosis. *Gut* 25:1034-1043.

Henriksen J.H., Bendtsen F., Sorensen T.I., Stadelager C., Ring-Larsen H. (1989). Reduced central blood volume in cirrhosis. *Gastroenterology* 97:1506-1513.

Huang Y.T., Wang G.F., Yang M.C.M., Chang S.P., Lin H.C. and Hong C.Y. (1996). Vascular hyporesponsiveness in Aorta from portal hypertensive rats: Possible Sites of Involvement. *The J of Pharmacol and Exp Therapeutics* 278:535-542.

Ito M., Nakano T., Erdodi F., Harthshorne D.J. (2004). Myosin Phosphatase: Structure, regulation and function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 259:197-209.

Iwakiri and Groszmann (2006). The Hyperdynamic Circulation of Chronic Liver Diseases: From the Patient to the Molecule. *Hepatology* 2:120-130.

Jurzik L., Froh M., Straub R.H., Schömerich J., Wiest R. (2005). Up-regulation of nNOS and associated increase in nitric vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 43:258-265.

Karaki H., Sato K., and Ozaki H., (1988). Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca-tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 151:325-328.

Kamm K.E. and Stull J.T. (2001). Dedicated Myosin Light Chain Kinases with Diverse Cellular Functions. *J Biological Chem* 276(7):4527-4530.

Karaki H., Sato K., Ozaki H. (1991). Different effects of verapamil on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *J Pharmacol* 55:35–42.

Kawasaki H., Nuki C., Saito A., Takasaki K. (1991). NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 261: H683-H690.

Khalil R.A., Lodge N.J., Saida K., Gelband C.H. and van Breemen C. (1990). Calcium mobilization in vascular smooth muscle and its relevance to the etiology of hypertension. In hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management, ed. by J.H. Laragh and B.M. Brenner. Pp. 547-563.

Kiel J., Pitts V., Benoit J.N., Granger D.N. and Shepherd A. (1985). Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats. *Am. J. Physiol* 248: G192.

Kimura M., Kimura I., Kobayashi S. (1982). Relationship between cyclic AMP-dependent protein kinase activation and  $\text{Ca}$  uptake increase of sarcoplasmic reticulum fraction of hog biliary muscles relaxed by cholecystinin-c-terminal peptides. *Biochem Pharmacol* 31(19):3077-3083.

Kitazawa T., Eto M., Woodsome T.P., Khalequzzaman Md (2003). Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 546(3):879-889.

Laleman W., Landeghem L., Wilmer A., Fervery J., Nevens F. (2005). Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int.* 25:1079-90.

Larhammar D., Söderberg C., Blomquist A.G. (1993). Evolution of neuropeptide Y family of peptides. In : Colmers W.F., Wahlestedt C. Eds. The biology of neuropeptide Y and related peptides. Totawa , NJ: Humana Press, 1-64.

Larhammar D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 62:1-11.

Larhammer D., Cerdá-Reverter J.M. (2000). Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem Cell Biol* 78(3): 371-92.

Leslie C., Gijón M.A. (2004). Regulation of Arachidonic Acid release and phospholipase  $\text{A}_2$  activation. *J Leukoc Biol* 65:330-336.

- Leung T., Manser E., Tan L., Lim L. (1995). A Novel Serine/Threonine Kinase binding the Ras-related RhoA GTPase Which Translocates the Kinase to Peripheral Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 270(49):29051-29054.
- Liao J.F., Yu P.C., Lin H.C., Lee F.Y., Kuo J.S., and Yang M.C.M. (1994). Study on the vascular reactivity and  $\alpha_1$ -adrenoceptors of portal hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 111: 439-444.
- Lieber C.S. (1988). Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *New Engl J Med* 319:1639-1659.
- Lieber C.S. (2001). Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. *Pathol Biol* 49:738-52.
- Llach J., Gines P., Arroyo V., Rimola A., Tito L., Badalamenti S. (1988). Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites. *Gastroenterology* 94:482-487.
- Longenecker K., Read P., Derewenda U., Datuer Z., Liu X., Garrard S., Walker L., Somlyo A.V., Nakamoto R.K., A.P. Somlyo, Derewenda Z.S. (1999). How RhoGDI binds Rho. *Biological Grystallography* 55(9):1503-1515.
- Lundberg J.M. and Tatemoto K. (1982). Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistance to  $\alpha$ -adrenoceptor blockade. *Acta Physiol Scand* 116:393-402
- Lundberg J.M., Rudehill A., Sollevi A., Theodorsson-Norheim E., Hamberger B. (1986). Frequency and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci Lett* 63:96-100.
- Lundberg J.M. Pernow J., Modin A. (1995). Prejunctional regulation of reserpine-resistant sympathetic vasoconstriction and release of neuropeptide Y in the pig. *Journal of the Autonomic Nervous System* 57:13-21.
- Lundell I., Blomqvist A.G., Berglund M.M., Schober D.A., Johnson D., Statnick M.A., Gadske R.A., Gehlert D.R. and Larhammar D. (1995). Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J Biol Chem* 270:29123-29128.
- MacGilchrist (1990). Binding studies of platelet  $\alpha_2$ - and lymphocyte  $\beta_2$ -adrenoceptors in patients with cirrhosis. *Brit J Clin Pharmacol* 30:644-647.

- Malyshev E., Tazi K.A., Moreau R., Lebrec D. (2007). Discrepant effects of inducible nitric oxide synthase modulation on systemic and splanchnic endothelial nitric oxide synthase activity and expression in cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 22:2195-2201.
- Mannon P.J., Mervin S.J., Sheriff-Carter K.D. (1994). Characterization of a Y-1 preferring NPY/PYY receptor in HT-29 cells. *Am J Physiol* 267:G901-G907.
- Maroto A., Ginès P., Arroyo V., Salo J., Clària J., Jiménez W., Bru C., Rivera F., Rodeés J. (1993). Brachial and femoral artery blood flow in cirrhosis: relationship to kidney dysfunction. *Hepatology* 17(5):788-93.
- Matsumoto M., Nomura T., Momose K., Ikeda Y., Kandou Y., Akiho H., Togami J., Kimura Y., Okada M., Yamaguchi T. (1996). Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem* 271:27217-27220.
- McGregor D.D. (1965). The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric vessels of the rat. *J Physiol (London)* 177:21–30.
- Mentlein R., Dahms P., Grandt D., Kruger R. (1993). Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept* 49:133-144.
- Michel M.C., GAida W., Beck-Sickinger A.G., Wieland H.A., Doods H., Dürr H., Jung G., Schnorrenberg G. (1992). Further Characterization of Neuropeptide Y Receptor Subtypes using Centrally truncated Analogs of Neuropeptide Y: Evidence for Subtype-Differentiating Effects on Affinity and Intrinsic Efficacy. *Molecular Pharmacol* 42:542-648.
- Michel M.C. and Rascher W. (1995). Neuropeptide Y – a possible role in hypertension? *J Hypertens* 13:385-395.
- Michel M.C., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods H.N., Herzog H., Larhammar D., Quirion R., Schwartz T., Westfall T. (1998). XVI. International Union of Pharmacology Recommendation for the Nomenclature of Neuropeptide Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacological Reviews* Vol. 50, No.1:143-150.
- Minth C.D., Bloom S.R., Polak J.M. and Dixon J.E. (1984). Cloning, characterization and DNA sequence of human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 81:4577-4581.
- Missiaen L., De Smedt H., Droogmans G., Himpens B., Casteels R., (1992). Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 56:191±231.

Mita M., Yanagihara H., Hishinuma S., Saito M., Walsh M.P., (2002). Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J.* 364:431-440.

Moleda L., Trebicka J., Dietrich P., Gäbele E., Hellerbrand C., Straub R.H., Sauerbruch T., Schoelmerich J., Wiest R., (2011). Amelioration of portal hypertension and the hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhotic rats by neuropeptide Y via pronounced splanchnic vasoaction. *Gut* 60(8):1122-32.

Motulsky H.J. et Michel M.C., (1988). Neuropeptide Y mobilizes  $Ca^{2+}$  and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am J Physiol*: 255:E880-5.

Mullins D.E., Guzzi M., Xia L., Parker E.M., (2000). Pharmacological characterization of the cloned neuropeptide Y  $y_6$  receptor. *European Journal of Pharmacology* 395:87-93.

Murray K.J., (1990) Cyclic AMP and Mechanisms of Vasodilation. *Pharmac. Ther.* (47): 329-345.

Nakamura M., Sakanaka C., Aoki Y., Ogasawara H., Tsuji T., Kodama H., Matsumoto T., Shimizu T., Noma M. (1995). Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing. Isolation, genomic structure, and function expression of the receptors. *J Biol Chem* 270:30102–30110

Neef M., Biecker E., Heller M., Schepke M., Nischalke H.D., Wolff M., Spengler U., Reichen J., Sauerbruch T. (2003). Portal hypertension with increased mRNA levels of vasopressor G-protein-coupled receptors in human hepatic arteries. *Eur J of Clin Invest* 33:249-255.

Nelson M.T., Patlak J.B., Worley J.F., Standen N.B., (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *AJP – Cell Physiology* 259:C3-C18.

Nilsson T., You J., Sun X., Hedner T., Edvinsson L., (1996). Characterization of neuropeptide Y receptors mediating contraction, potentiation and inhibition of relaxation. *Blood Press* 5(3):164-169.

Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. (1996). cAMP Signaling Inhibits Dihydropyridine-Sensitive  $Ca^{2+}$  Influx in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 27(3 Pt 2):774-780.

Parker R.M.et. Herzog H. (1999). Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 11:1431-1448.

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

Pfister G. (2001). Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91:497-503.

Playford R.J. and Cox H.M. (1996). Peptide YY and neuropeptide Y: Two peptides intimately involved in electrolyte homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 17:436-438.

Popper H. and Zak F.G. (1958). Pathological aspects of cirrhosis. *Am J of Med* 24:593-625.

Prieto D., Simonsen U., Berg Nyborg N.C. (1995). Regional involvement of an endothelium derived contractile factor in the vasoactive actions of neuropeptide Y in bovine isolated retinal arteries. *Brit J Pharmacol* 116: 2729-2737.

Prieto D., Buus C., Mulvany M.J., Nilsson H. (1997). Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential. *J Physiol* 502.2: 281-292.

Prieto D., Buus C., Mulvany M.J., Nilsson H. (2000). Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y1-receptor in rat mesenteric small arteries. *Brit J Pharmacol* 129:1689-1699.

Rasmussen H. and Barrett P.Q. (1984). Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev* 64: 938-984.

Ratz P.H., Berg K.M., Urban N.H., Miner A.S., (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:769-783.

Ratz P.H., Miner A.S., Barbour S.E. (2009). Calcium-independent phospholipase A2 participates in KCl-induced calcium sensitization of vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 46(1):65-72.

Rayment I., Holden H.M., Whittaker M., Yohn C.B., Lorenz M., Holmes K.C., Milligan R.A., (1993). Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261:58-65.

Rimland J., Xin W., Sweetnam P., Saijoh K., Nestler E.J., Duman R.S. (1991). Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor DNA. *Mol Pharmacol* 40(6):869-75.



Sakamoto K., Hori M, Izumi M, Oka T, Kohama K, Ozaki H, Karaki H, (2003). Inhibition of High K-induced Contractio by the ROCKs Inhibitor Y-27632 in Vascular Smooth Muscle: Possible Involvement of ROCKs in Signal Transduction Pahtway. *J Pharmacol Sci* 92:56-69.

Sakurada S., Takuwa N., Sugimoto N., Yang Y., Seto M., Sasaki Y., Takuwa Y., (2003). Ca-Dependent Activiation of Rho and Rho Kinase in Membrane Depolarization-Induced and Receptor Stimulation-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction. *Cir Res* 93:548-556.

Schierer R.W., Arroyo V., Bernadrri M., Epstein M., Henriksen J.H., Rodés J. (1988). Peripheral Arterial Vasodilation Hypothesis: A Proposal for the Inititation of Renal Sodium and Water Retention in Chirrrosis. *Hepatology* 8(5):1151-1157.

Selbie L.A., Darby K., Schmitz-Peiffer C., Browne C.L., Herzog H., Shine J., (1995). Synergistic interaction of Y1-neuropeptide Y and alpha 1b-adrenergic receptors in the regulation of phospholipase C, protein kinase C, and arachidonic acid production. *J Biol Chem* 270(20):11789–96.

Seller M.M. and Stallone J.N. (2008). Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol Herat Cure Physiol* 294:978-986.

Shah V., Wiest R., García-Gardena G., Groszmann R.J., Sessa W.J. (1999). HSP90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol* 277:G463-8.

Sheikh S.P. (1991). Neuorpeptide Y and peptide YY: major modulators of gastrointestinal blood flow and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 261:701-715.

Sieber C.C. and Groszmann R.J. (1992). Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 103:235-239.

Sieber C.C., Loepz-Talavera J.C., Groszmann R.J. (1993). Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitis cirrhotic rats. *Gastroenterology* 104(6):1750-4.

Simmons D., Botting R.M., Hla T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387-437.

Singer H.A., Schworer C.M., Sweeley C., Benschoter H. (1992). Activation of protein kinase C isozymes by contractile stimuli in arterial smooth muscle. *Arch Biochem Biophys* 299:320-329.

Somlyo A.P., Somlyo A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-236.

Somlyo A.P., Somlyo A.V. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 134:201-234.

Somlyo A.P., Somlyo A.V. (2000). Signal transduction and regulation by G proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522:177-185.

Somlyo A.P., Somlyo A.V. (2003).  $Ca^{2+}$  Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev.* 83:1325-1358.

Statnick M.A., Schober D.A., Gackenhimer S., Johnson D. Gehlert D.R. Burnett J.P., Mayne N.G. (1998). Characterization of the neuropeptide Y5 receptor in the human hypothalamus: a lack of correlation between Y5 mRNA levels and binding sites. *Brain Research* 10:16-28.

Sundler F., Böttcher G., Ekblad E., Hakanson R. (1993). PP, PYY and NPY: Occurrence and distribution in the periphery. In: *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides* pp 157-196.

Tazi K.A., Moreau R., Cailmail S., Gadano A., Trombino C., Lebrec D. (1997). Altered growth and lack of responsiveness to angiotensin II in aortic vascular smooth muscle cells from cirrhotic rats. *Gastroenterology*: 112:2065-2072.

Tanaka Y., Nakazawa T., Saito M., Ishii, Iwata S. (1995).  $Ca^{2+}$  handling mechanisms underlying neuropeptide Y-induced contraction in canine basilar artery. *Eur J Pharmacol* 289:59-66.

Tatemoto K. (1982a). Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 79:2514-2518.

Tatemoto K. (1982b). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 79:5485-5489.

Tatemoto K., Carlquist M. and Mutt V. (1982). Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296:659-660.

Tazi K.A., Moreau R., Heller J., Poirel O., Lebrec (2000). Changes in Protein Kinase C Isoforms in Association With Vascular Hyporeactivity in Cirrhotic Rat Aortas. *Gastroenterology* 119:201-210.

Toda N., Ayajiki K., Uchiyama M., Okamura T. (1997). Nitric oxide-mediated neurogenic vasodilatation in isolated monkey lingual arteries. *Am J Physiol* 272:582-8.

Toda N., Okamura T. (2003). The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. *Pharmacol Rev* 55:271-324.

Trebicka J., Leifeld L., Hennenberg M., Biecker E., Eckhardt A., Fischer N., Porbsting A.S., Clemens C., Lammert F., Sauerbruch T., Heller J., (2008). Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 47:1264-1276.

Uddman R., Moller S., Nilsson T., Nystrom S., Ekstrand J., Edvinsson L. (2002). Neuropeptide Y Y1 and neuropeptide Y Y2 receptors in human cardiovascular tissues. *Peptides* 23(5):927-934.

Urban N.H., Berg K.M., Ratz P.H., (2003). K<sup>+</sup> depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca<sup>2+</sup> sensitization of arterial muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:1377-1385.

Urban N.H., Berg K.M., Ratz P.H. (2003b). K<sup>+</sup> depolarization induces RhoA kinase Translocation to caveolae and Ca<sup>2+</sup> sensitization of arterial muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:1377-1385.

Velasco G., Armstrong C., Morrice N., Frame S., Cohen P. (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Letters* 527:101-104.

Vorobioff J., Bredfeldt J.E. and Groszmann R.J. (1983). Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model : a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 244:G52-G57.

Wahlestedt C., Reis D.J., Grundemar L. (1991). Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brainstem. *J Pharmacol Exp Ther* 258(2):633-8.

Wahlestedt C., Reis D.J. (1993). Neuropeptide Y-related peptides and their receptors: Are the receptor potential therapeutic drug targets. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol* 32:309–352.

Wahlestedt C., Yanaihara N., Hakanson R. (1986). Evidence for different pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Rept* 13:307-318.

Weinberg D.H., Sirinathsinghji D.J., Tan C.P., Shiao L.L., Morin N., Rigby M.R., Heavens R.H., Rapoport D.R., Bayne M.L., Cascieri M.A., Strader C.D., Linemeyer D.L., MacNeil D.J. (1996). Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* 271:16435-16438.

Wettstein J.G., Broqua P., Rocher M.N., Bauthier-Martin B., Junien J.L. (1995). Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus maze and fear-potentiated startle procedures. *Behav pharmacol* 6(3):215-222.

Wiest R., Shah V., Sessa W.C., Groszmann R.J. (1999). NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276:1043-1051.

Wiest R., Garcia-Tsao G., Cadelina G., Shah V., Groszmann R.J. (1999b). Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes enhances eNOS-derived NO overproduction in mesenteric vasculature of cirrhotic rats: role for impairment in vascular contractility. *J Clin Invest* 104:1223–1233.

Wiest R., Lock G., Schölmerich J. (2000). Portale Hypertension, *Der Internist* 41:1077-1095.

Wiest R., Tsai NH, Groszmann RJ (2001). Octreotide potentiates PKC-dependent vasoconstrictors in portal hypertensive and control-rats. *Gastroenterology* 120(4):975-83.

Wiest R., Lock G., Schölmerich J., (2003). Das hepatorenale Syndrom – Pathophysiologie und Therapie, *Intensivmed* 40: 13-33.

Wiest R., Jurzik L., Moleda L., Froh M., Schnabl B., v.Hörsten S., Schölmerich J., Straub R.H. (2006). Enhanced Y1-receptor-mediated vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension. *Journal of Hepatology* 44:512-519.

Wu Z.Y. and Benoit J.N. (1994). Nonreceptor-mediated intestinal vasoconstriction in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 267:H370-375.

Wyss P., Stricker-Krongrad A., Brunner L., Miller J., Crossthwaite A., Whitebread S., Criscione L. (1998). The pharmacology of neuropeptide Y (NPY) receptor-mediated feeding in rats characterizes better Y5 than Y1, but not Y2 or Y4 subtypes. *Regul Pept.* 75-76: 363-71.

Yamada T., Ushikubi F., Narumiya S., Kikuchi K., Yuhki K. (2003). Thromboxane A<sub>2</sub> Regulates Vascular Tone via Its Inhibitory Effect on the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 108:2381-2386.

Yanagisawa T., Okada Y. (1994). KCl depolarization increases  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 267:614-621.

Zukowska-Grojec Z., Wahlestedt C. (1993). Sources and actions of neuropeptide Y in the cardiovascular system. In: Colmers WF, Wahlestedt C, editors. *Neuropeptide Y and related peptides*. New York: Humana.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Johannes Hartl  
 Adresse: Rehmstrasse 20, 22299 Hamburg  
 Email: j.hartl@uke.de  
 Geburtsdatum: 08.04.1985  
 Geburtsort: Vilshofen  
 Familienstand: ledig

## Beruflicher Werdegang

03/2013: Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie, Tropenmedizin, Ärztlicher Leiter: Prof. A. Lohse

## Hochschulausbildung

04/2012: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,0  
 05/2010: Auslandssemester, Universidad de Desarrollo, Santiago de Chile  
 09/2007: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0  
 2005 - 2012: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
 2004 - 2005: Studiengang Diplomphysik, Universität Regensburg

## Praktisches Jahr

### 3. Tertial Chirurgie

12/2011 - 02/2012	Universitätsklinik Regensburg	Notaufnahmefunktion, Gefäßchirurgie
10/2011 - 12/2011	Rigshospitalet, Kopenhagen	Unfallchirurgie, Orthopädie

### 2. Tertial Innere Medizin

06/2011 - 10/2011	Universitätsspital Zürich	Infektiologie, Notaufnahmefunktion, Gastro- und Hepatologie
06/2011	Universitätsklinik Regensburg	Hämatologie/Onkologie

### 1. Tertial Neurologie

02/2011 - 06/2011	Bezirksklinikum Regensburg	Neurologie
-------------------	----------------------------	------------

## Schulausbildung

2001 - 2004	Gymnasium in Deggendorf, Abschluss: Abitur, Note 1,4
1992 - 2001	Grundschule und Realschule in Osterhofen, Abschluss: Mittlere Reife, Note 1,0

### **Publikationen**

---

Hartl J, Werner T, Schramm C. An unresectable Klatskin's tumor? Gastroenterology 2014; 46(7):e3-4.

Hartl J, Zenouzi R, Lohse AW. Autoimmune Hepatitis - Aktuelle Entwicklungen einer zunehmenden Erkrankung. DMW Heft 5/2014.

Hartl J, Schramm C, Lohse AW et al. Patient selection based on treatment duration and liver biochemistry increases success rates after treatment withdrawal in autoimmune hepatitis. J Hepatol 2014 - *UNDER REVISION*

Comparison of autochthonous and imported cases of hepatitis A or hepatitis E. Hartl J, Lüth S, Pischke S et al. Z Gastroenterol 2014 - *UNDER REVISION*

Hartl J, Moleda L, Dietrich P et al. Neuropeptide Y (NPY) restores non-receptor dependent vasoconstrictive action in mesenteric arteries in portal hypertension. - *UNDER SUBMISSION*

Hamburg, den 15.07. 2014

## Danksagung

Mein Dank gilt zunächst den Betreuern dieser Arbeit, Herrn Prof. Reiner Wiest und Herrn Lukas Moleda. Sie haben mich in meinem Interesse für wissenschaftliches Arbeiten sowie für die Hepatologie bestärkt und mich somit für meinen weiteren Weg entscheidend beeinflusst. Herrn Prof. Wiest möchte ich insbesondere dafür danken, dass er mich stets ermutigt hat, mich mit eigenen Überlegungen und Anmerkungen einzubringen und somit meine Begeisterung für die Thematik bzw. die Forschung allgemein weiter geschürt hat. Herrn Moleda für die hervorragende Einarbeitung in Operationstechniken und Methodik. Beide standen zudem auch über diese Arbeit hinaus auf freundschaftliche Art und Weise als Ansprechpartner zur Verfügung, dies weiß ich in besonderem Maße zu schätzen.

Außerdem möchte ich mich selbstverständlich bei meinen Eltern und meiner Partnerin Anna-Kristin Müller bedanken, auf deren Rückhalt ich mich immer verlassen konnte.

Schließlich gilt mein Dank Herrn Alexander Gradl, der es freundlicherweise auf sich genommen hat, diese Arbeit bzgl. der Rechtschreibung Korrektur zur lesen.