

**Aus dem Center for Cardiovascular Research,
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin,
eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Einfluss des A1-Adenosin-Rezeptorantagonisten SLV329 auf die Nierenfunktion
im Modell der Thioacetamid-induzierten Leberzirrhose der Ratte**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Susi Heiden
Tierärztin aus Cottbus**

**Berlin 2009
Journal Nr.:3361**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Berthold Hocher
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats ; animal models; liver; liver diseases; cirrhosis; hepatorenal syndrome [MeSH];
glomerular filtration rate; adenosine; hepatotoxins; diuresis

Tag der Promotion: 08.03.2010

Inhalt

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Adenosin.....	3
2.1.1	Aufbau, Metabolismus und Vorkommen	3
2.1.2	Klassifizierung und Funktion der Adenosinrezeptoren.....	3
2.1.3	Adenosin und die Leber	5
2.1.4	Adenosin und die Niere.....	7
2.2	Das hepatorenale Syndrom.....	11
2.2.1	Die Leberzirrhose	11
2.2.2	Niereninsuffizienz	12
2.2.3	Nierenversagen bei Lebererkrankungen.....	13
2.2.4	Das hepatorenale Syndrom.....	13
2.3	Das Tiermodell.....	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Tiere und Tierhaltung.....	24
3.2	Versuchsdesign.....	24
3.3	Materialien	26
3.3.1	Der Wirkstoff SLV329.....	26
3.3.2	Antikörper	27
3.4	Methoden.....	28
3.4.1	Nicht-invasive Blutdruckmessung	28
3.4.2	Untersuchung im Stoffwechselkäfig.....	28
3.4.3	SLV329-Serumspiegelbestimmung	30
3.4.4	Organentnahme	30
3.4.5	Histologische Methoden.....	30
3.4.6	Western-Blot	34
3.4.7	Statistik.....	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Körpergewichte	38
4.2	Organgewichte und makroskopische Beurteilung der Organe.....	40
4.3	Futteraufnahme.....	41
4.4	Wasseraufnahme	42
4.5	Ergebnisse der Serumuntersuchungen	43
4.5.1	Serumparameter zu Beginn des Versuches	43
4.5.2	Serumparameter in der achten Woche des Versuches	44
4.5.3	Serumparameter in Woche 16 des Versuches	45
4.5.4	Ergebnisse der SLV329-Konzentrationsbestimmung	47
4.6	Ergebnisse der Urinuntersuchungen.....	48
4.6.1	Urinparameter zu Beginn des Versuches	48
4.6.2	Urinparameter in der achten Woche des Versuches.....	49
4.6.3	Urinparameter in Woche 16 des Versuches	50
4.7	Glomeruläre Filtrationsrate	51

4.8	Blutdruck.....	53
4.9	Herzfrequenz.....	54
4.10	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.....	55
4.10.1	Untersuchung der Leber.....	55
4.10.2	Untersuchung der Nieren.....	57
4.11	Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen.....	60
4.11.1	Adenosin-Rezeptorexpression in der Leber.....	60
4.11.2	Adenosin-Rezeptorexpression in den Nieren.....	62
4.12	Mortalität.....	64
5	Diskussion.....	65
5.1	Diskussion der Methoden.....	67
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	73
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	82
6	Zusammenfassung.....	83
7	Summary.....	85
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Abkürzungsverzeichnis.....	103
10	Anhang.....	104
11	Publikationen.....	110
12	Danksagung.....	111
13	Selbständigkeitserklärung.....	112

1 Einleitung und Fragestellung

Die jährliche Inzidenz der Leberzirrhose in Europa und in den USA liegt bei ca. 250 pro 100.000 Einwohner (Herold 2007). Im Jahre 1988 stand die Leberzirrhose unter den häufigsten Todesursachen in den USA an neunter Stelle, in der Altersgruppe der 45-64jährigen gar an fünfter Stelle (Grant et al. 1988).

Bei 8% der Patienten mit dekompensierter Zirrhose tritt innerhalb eines Jahres ein hepatorenales Syndrom (HRS) auf (Arroyo et al. 2008). Der schnell progressive HRS Typ 1 hat ein mittleres Überleben von weniger als zwei Wochen und eine Überlebensrate von 10% nach drei Monaten. Die mildere Verlaufsform, HRS Typ 2, mit einem langsam progredienten Nierenversagen, hat eine Überlebensrate von 70% nach drei Monaten (Gines et al. 1993).

Dem HRS liegt eine ausgeprägte renale Vasokonstriktion und Natriumretention zugrunde, in deren Folge die glomeruläre Filtrationsrate abnimmt, während im extrarenalen Kreislauf eine Vasodilatation herrscht und zu einer effektiven arteriellen Hypovolämie führt.

Adenosin ist an der Pathogenese des hepatorenen Syndroms über mehrere Mechanismen beteiligt. Im Wesentlichen sind diese die Entwicklung einer Leberfibrose, die Ausbildung des hepatorenen Reflexes, Vasokonstriktion der kortikalen Nierengefäße und die Verstärkung der NaCl-Resorption in der Niere. Die drei letztgenannten Adenosineffekte werden durch A₁-Adenosin-Rezeptoren (A₁R) vermittelt. Damit bietet die Behandlung mit A₁-Adenosin-Rezeptorantagonisten an diesen drei Punkten die Möglichkeit der Intervention.

Zu einem der Auslöser des HRS zählt die forcierte Diurese bei Leberzirrhose mit Aszites (Westphal and Brogard 1997;Laffi et al. 1994). Besonders beim Einsatz von Schleifendiuretika kommt es oftmals zur Verschlechterung der Nierenfunktion.

A₁R-Antagonisten wurden bereits in verschiedenen Krankheitsbildern erfolgreich erprobt, um einen nierenschonende diuretische Wirkung zu erzielen (Dittrich et al. 2007;Yao et al. 2001;Nagashima et al. 1995;Nagashima et al. 1994). Auch bei Leberzirrhose konnte nach der einmaligen Applikation von A₁R-Antagonisten die Steigerung des Urinflusses und der Natriumausscheidung festgestellt werden (Stanley et al. 1998). Durch die Kombinationstherapie mit Furosemid und dem A₁R-Antagonisten BG9719 wurde bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz ein stärkerer Anstieg der Diurese erreicht als bei den Monotherapien mit diesen Stoffen. Durch die Verknüpfung mit der BG9719-Behandlung wurde die bei der Furosemidbehandlung beobachtete Verschlechterung der Nierenfunktion aufgehoben (Gottlieb et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass die Behandlung mit einem A₁R-Antagonisten und/oder der Kombination aus einem A₁R-Antagonisten und Furosemid eine diuretische

Wirkung bei Leberzirrhotikern haben könnte, die ohne Verschlechterung, oder sogar mit einer Verbesserung, der Nierenfunktion einhergeht.

Sowohl die renalen als auch die Adenosinrezeptoren in der Leber spielen in der Entwicklung einer Nierenfunktionsstörung bei Leberzirrhose eine wichtige Rolle. Die Expressionen der Adenosinrezeptoren wurden bisher nur in der Leber von Mäusen mit Leberzirrhose untersucht. Über die Adenosinrezeptorexpression in der Niere gibt es bisher keine Erkenntnisse.

Die Thioacetamid-induzierte Leberzirrhose stellt ein geeignetes Modell für die Leberzirrhose des Menschen dar (Muller et al. 1988). Die chronische Applikation von niedrigen Konzentrationen von Thioacetamid (TAA) bei Ratten resultiert in makronodulärer Leberzirrhose mit Erhöhung des relativen Lebergewichtes, Anstieg des portalen Blutdruckes, Dilatation der Gefäße im Splanchnikusgebiet und Minderung des systemischen Blutdruckes (Li et al. 2002;Laleman et al. 2006). Die histologischen Befunde dieses Modells ähneln der Histologie der humanen fortgeschrittenen Leberzirrhose. Auch die Änderungen der portalen und systemischen Blutdrücke sind typische funktionelle Folgen der humanen Leberzirrhose und wichtige Faktoren in der Entwicklung des HRS. Im Modell der TAA-induzierten Leberzirrhose wurde auch die für diesen Versuch wichtige Minderung der Nierenfunktion festgestellt (Ming et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass im Modell der TAA-induzierten Leberzirrhose, ähnlich wie beim Menschen, aus einer Leberzirrhose über die Entwicklung der portalen Hypertonie und systemischen Hypotonie die Verschlechterung der Nierenfunktion resultiert.

Aus diesen Kenntnissen und Überlegungen ergeben sich für die vorgelegte Arbeit folgende Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat die Behandlung mit dem A₁R-Antagonisten SLV329 auf die Nierenfunktion und auf die Diurese im Leberzirrhosemodell der Ratte?
- Bringt die Kombinationstherapie mit Furosemid und SLV329 Vorteile gegenüber der Monotherapie mit Furosemid bzw. SLV329 hinsichtlich Nierenfunktion und Diurese?
- Wie wird die Expression der Adenosinrezeptoren in Leber und Nieren durch die Leberzirrhose mit verminderter Nierenfunktion beeinflusst?
- Hat die Behandlung mit Furosemid, mit SLV329 oder deren Kombination einen Effekt auf die Expression der Adenosinrezeptoren in Leber und Nieren im Leberzirrhosemodell der Ratte mit verminderter Nierenfunktion?

2 Literaturübersicht

2.1 Adenosin

2.1.1 Aufbau, Metabolismus und Vorkommen

Adenosin ist ein aus der Nukleinbase Adenin und dem Zucker β -D-Ribose bestehendes Nukleosid.

Adenosin wird in allen Geweben des Organismus gebildet. Es entsteht zum größeren Teil beim intra- und extrazellulären Abbau von Adenin-Nukleotiden und zum geringeren Teil bei der intrazellulären Hydrolyse von S-Adenosyl-Homozystein (Jackson and Dubey 2001). Da es sehr schnell von Adenosinkinasen phosphoryliert oder durch die Adenosindesaminase weiter abgebaut wird, beträgt seine Halbwertszeit nur wenige Sekunden (Moser et al. 1989). Entsprechend passt sich die Adenosinkonzentration rasch an veränderte Umstände an und seine direkte Wirkung beschränkt sich auf das absondernde Gewebe und dessen unmittelbare Umgebung.

Unter physiologischen Bedingungen liegt die extrazelluläre Adenosinkonzentration zwischen 30 und 300 nM und ist direkt mit der lokalen Energiebilanz verknüpft. Die intrazellulären Konzentrationen liegen bei dem Mehrfachen, aber ein Großteil der Adenosinmoleküle ist an Proteine gebunden und so unzugänglich für Enzyme und unfähig die Zelle zu verlassen. Freies Adenosin passiert die Zellmembran mit Hilfe von Nukleosidtransportern und kann extrazellulär an die Adenosinrezeptoren binden (Thorn and Jarvis 1996).

Wenn der Energiebedarf der Zelle das Energieangebot übersteigt, werden zuerst die schnell mobilisierbaren Reserven der Zelle, die Adenosintriphosphat-Moleküle (ATP) abgebaut. Bei diesem Prozess fällt vermehrt Adenosin an und agiert dann extrazellulär als Signalmolekül an den Adenosinrezeptoren.

Adenosin nimmt in verschiedenen Geweben auf verschiedene physiologische Vorgänge Einfluss. Grundsätzlich hat Adenosin eine gewebesetzende Funktion unter ischämischen und hypoxischen Bedingungen. Es verbessert die Sauerstoffversorgung, mindert den Sauerstoffbedarf und bremst die hypoxiebedingte Gewebeschädigung.

2.1.2 Klassifizierung und Funktion der Adenosinrezeptoren

Die biologischen Wirkungen von Adenosin werden über G-Protein gekoppelte plasmamembranständige Rezeptoren vermittelt. Adenosinrezeptoren werden derzeit aufgrund

von Unterschieden in der Aminosäuresequenz, ihrer Affinität zu Liganden und in der Signaltransduktion in vier Subtypen unterteilt: A₁-Adenosin-Rezeptor (A₁R), A_{2A}-Adenosin-Rezeptor (A_{2A}R), A_{2B}-Adenosin-Rezeptor (A_{2B}R) und A₃-Adenosin-Rezeptor (A₃R) (Ralevic and Burnstock 1998).

Adenosin ist der einzige endogene Ligand von A₁R und A₂R (A₂R = A_{2A}R+A_{2B}R). An A₃R kann außer Adenosin auch sein Abbauprodukt Inosin ein Sekundärsignal auslösen (Fredholm et al. 2001).

Der hochaffine A₁R und der niedrig affine A₃R sind im Allgemeinen an inhibitorische G-Proteine der Gi/o Familie gekoppelt, wogegen der hochaffine A_{2A}R und der niedrig affine A_{2B}R generell stimulatorische Gs Proteine aktivieren. So veranlassen A₁R und A₃R über Gi- und Go-Proteine die Hemmung der Adenylatzyklen, wohingegen A_{2A}R- und A_{2B}R-Stimulation zur Aktivierung der Adenylatzyklase führt (Fredholm et al. 2001).

An den Gefäßen führt Adenosin, A_{2A}R und A_{2B}R vermittelt, zu Vasodilatation und verbessert so die Versorgung der Gewebe (Berne et al. 1983). Eine Ausnahme bildet die Niere, wo außer vasodilatatorischen A_{2A}R auch vasokonstriktorische A₁R an den Gefäßmuskelfasern vorhanden sind (Silldorff et al. 1996). Da bei Erhöhung des Blutflusses in der Nierenrinde auch die glomeruläre Filtrationsrate steigen würde, und so auch der Energiebedarf für die Reabsorption von Natrium, wäre dies eine kontraproduktive Funktion bei Ischämie. Deshalb kommt es in der Nierenrinde bei Adenosinakkumulation zu Vasokonstriktion und im Mark zu Vasodilatation.

Am Herzen wirkt Adenosin negativ chronotrop, negativ dromotrop, negativ inotrop und antiarrhythmisch. Die kardialen Effekte werden direkt von Adenosin oder durch seine Modulation der adrenergen und noradrenergen kardialen Stimulation vermittelt (Belardinelli et al. 1989).

Adenosin hält auch im Nervengewebe - durch Hemmung der Transmitterfreisetzung, durch Hyperpolarisation der Neurone und durch Hemmung bestimmter Ca-Kanäle - den Energiebedarf niedrig. So wird das Gewebe unter Ischämie und Hypoxie vor einer überhöhten externen Stimulation geschützt (Dunwiddie and Masino 2001).

Außerdem hemmt Adenosin nach der Reperfusion die Freisetzung von freien Radikalen aus den neutrophilen Zellen und die Plättchenaggregation an den Gefäßwänden (Cronstein et al. 1990; Agarwal et al. 1994).

Ein weiterer gewebeschützender Effekt von Adenosin ist, dass es im hypoxischen, entzündeten Gewebe über A_{2A}R-Aktivierung die umliegenden Immunzellen hemmt und so die Ausbreitung der entzündlichen Prozesse verhindert (Sitkovsky et al. 2004).

2.1.3 Adenosin und die Leber

In der Leber sind alle vier Adenosin-Rezeptortypen vertreten (Dixon et al. 1996). Die wichtigsten adenosinvermittelten Effekte in der Leber sind die Beeinflussung der Glykogenolyse, die Minderung der Fibrose und das Auslösen des hepato-renale Reflexes.

Einfluss auf die Glykogenolyse

Bei *in vitro* Untersuchungen wurde beobachtet, dass Adenosin sowohl in isolierten Hepatozyten als auch im kompletten Organ die Glykogenolyse verstärkt (Hoffer and Lowenstein 1986; Buxton et al. 1986). In mehreren Experimenten wurde untersucht, über welche Rezeptoren dieser Effekt vermittelt wird. Allerdings ergaben die Untersuchungen unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Ergebnisse mit Hinweisen auf A₁R-, A_{2A}R- und A_{2B}R-Beteiligung, so dass keine endgültige Aussage gemacht werden kann (Bartrons et al. 1984; Gonzalez-Benitez et al. 2002; Harada et al. 2001).

Es gibt Anzeichen, dass die Veränderung des Glykogenmetabolismus beim Diabetes auch adenosinbedingt ist. Dafür sprechen der erhöhte Leber-Adenosinspiegel im Streptozotocin-induzierten Diabetesmodell und die erhöhte A_{2A}R- und A₃R-Expression im gleichen Modell (Pawelczyk et al. 2003; Grden et al. 2007).

Einfluss auf die Leberfibrose

Aus den Untersuchungen von Chan et al. an isolierten Hepatozyten weiß man, dass unter Hepatotoxin-Exposition vermehrt Adenosin in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Chan et al. 2006). Bei *in vivo* Versuchen derselben Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass A_{2A}R-defiziente Mäuse nach Applikation von Lebergiften keine Fibrose entwickeln und die Behandlung mit A_{2A}R-Antagonisten oder unspezifischen Adenosin-Antagonisten die Fibrosierung bei Wildtyp-Mäusen reduzieren. In Experimenten mit A₃R-defizienten Tieren oder mit A₁R- bzw. A_{2B}R-Antagonisten-behandelten Wildtyp-Mäusen wurde nach Kohlenstofftetrachlorid-Applikation eine gleich starke Leberfibrose wie bei den unbehandelten Wildtypen festgestellt (Chan et al. 2006).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Adenosin in der Entstehung von Leberfibrose eine Schlüsselrolle spielt und seine fibrotische Einflüsse in der Leber über A_{2A}R vermittelt werden.

Der hepatorenale Reflex

Die Leber ist direkt beteiligt an der Regulierung der Natrium- und Wasserausscheidung über die Nieren (Lang et al. 1991; Morita et al. 1991). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Steuerung dieser Regulationsmechanismen über Osmo- Baro- und Chemorezeptoren in der Leber erfolgt (Andrews and Palmer 1967; Niiijima 1969; Passo et al. 1973; Ming et al. 2002; DiBona and Sawin 1995). Durch Erhöhung der Osmolalität, des portalen Blutdruckes oder der Adenosinkonzentrationen oder durch Abfall der Natriumkonzentration steigt die Aktivität der afferenten vagalen und sympathischen Nervenfasern. Die Erregung der Afferenzen wird im Hypothalamus auf sympathische Efferenzen übergeleitet, die renale Vasokonstriktion und vermehrter Natriumresorption im proximalen Tubulus bewirken (Schmitt 1973; Morita et al. 1991). Diese Reiz-Reaktions-Kette wird als hepatorener Reflex bezeichnet.

Untersuchungen im Rattenmodell haben demonstriert, dass der hepatorenale Reflex über A_1R getriggert wird. Bei Minderung des portalen Blutflusses über 30 Minuten ist ein Rückgang des Urinflusses um 38% und der Natriumausscheidung um 44% zu beobachten (Ming et al. 2002). Dieser Effekt ist unabhängig von dem portalen Blutdruck und kann durch hepatische Denervation oder durch intrahepatische Applikation von A_1R -Antagonisten aufgehoben werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei vermindertem portalem Blutfluss die Adenosinkonzentration in der Leber steigt und über A_1R den hepatorenen Reflex auslöst.

Die diuretische Wirkung der hepatischen A_1R konnte auch im Rattenmodell der Thioacetamid-induzierten Zirrhose gezeigt werden (Ming et al. 2005). Bei den zirrhotischen Tieren wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren ein verminderter Urinfluss und eine verminderte Natriumausscheidung gemessen. Nach intraportaler Gabe von A_1R -Antagonisten stiegen diese beiden Parameter auf die gleichen Höhen wie bei den mit A_1R -Antagonisten behandelten Kontrolltieren. Bei der intravenösen Verabreichung von A_1R -Antagonisten war in diesem Versuch keine Auswirkung auf die Diurese zu erkennen.

Die bedeutende Rolle der portalen Adenosin- A_1R -Wirkung im hepatorenen Reflex, wurde nochmals durch eine direkte intrahepatische Infusion von Adenosin bestätigt (Ming and Lautt 2006). Es wurde eine mit A_1R -Antagonisten aufhebbare Minderung des Urinflusses beobachtet. Außerdem konnte im gleichen Versuch gezeigt werden, dass auch intravenös gegebene A_1R -Antagonisten den Urinfluss steigern können und dass der A_2R nicht am hepatorenen Reflex beteiligt ist.

2.1.4 Adenosin und die Niere

In der Niere sind alle vier Sorten der Adenosinrezeptoren vertreten (Pawelczyk et al. 2005). Die renale Natriumresorption ist der vornehmliche Verbraucher von ATP und ist somit der wichtigste Lieferant von Adenosin.

Adenosin hat in der Niere Einfluss auf den Gefäßtonus, auf die Reninfreisetzung, auf den Ionen- und Flüssigkeitstransport und ist am tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus beteiligt (Vallon et al. 2006).

Vasoaktive Einflüsse von Adenosin in der Niere

Nach einer einmaligen intrarenalen Injektion von Adenosin ist eine sofortige, kurzanhaltende Minderung der renalen Durchblutung zu erkennen. Bei länger anhaltender intrarenaler Infusion kann man initial einen 1-2 minütigen Abfall des renalen Blutflusses beobachten und anschließend ist eine leichte Erhöhung der Durchblutung im Vergleich zum Basalwert feststellbar (Osswald 1975). Dass die anfängliche Abnahme der Nierendurchblutung durch A_1R -Antagonisten verhinderbar ist und sie bei A_1R -knockout-Mäusen gar nicht erst auftritt, lässt erkennen, dass dies eine Folge von A_1R -Aktivierung ist (Aki et al. 1997; Traynor et al. 1998). Um zu verstehen, wie es zu dieser biphasischen Wirkung von Adenosin kommt, wurden die verschiedenen Widerstandsgefäße der Niere getrennt untersucht.

An den afferenten Arteriolen führt Adenosin zu einer starken Vasokonstriktion, die durch steigende Adenosinkonzentration intensiviert wird und dann bei sehr hohem Adenosinspiegel wieder abnimmt (Osswald et al. 1978; Weihprecht et al. 1992). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zuerst die gefäßverengenden A_1R stimuliert werden und erst bei höheren Adenosinkonzentrationen die weniger affine $A_{2B}R$ zur Erweiterung der Gefäße führen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die mit A_1R -Agonisten hervorgerufene Konstriktion der afferenten Arteriolen stärker ist und auch bei höheren Konzentrationen nicht erschläfft (Weihprecht et al. 1992).

Bei afferenten Arteriolen der oberflächlich liegenden Nephronen löst Adenosin eine stärkere Konstriktion aus als bei den juxtaglomerulär gelegenen Nephronen. Auch die über $A_{2B}R$ vermittelte Erweiterung der Arteriolen findet in den oberflächlichen Nephronen erst bei höherer Adenosinkonzentration statt (Nishiyama et al. 2001). Diese funktionellen Unterschiede erklären sich aus den unterschiedlichen Rezeptorexpressionen. Die afferenten Arteriolen der oberflächlich liegenden Nephronen haben im Vergleich zu den tiefer gelegenen mehr A_1R und weniger A_2R (Dietrich and Steinhausen 1993).

Die isolierten efferenten Arteriolen zeigen auch die in den afferenten Arteriolen gesehene biphasische Reaktion, allerdings sind Konstriktion und Dilatation weniger stark ausgeprägt (Nishiyama et al. 2001).

In isolierten Vasa recta kommt es im Vergleich zu den vorgeschalteten Gefäßen schon bei viel geringeren Adenosinkonzentrationen zu Abnahme der Konstriktion (Silldorff et al. 1996). Bei in vivo Versuchen wurde nach Adenosinapplikation in die Medulla nur Vasodilatation beobachtet, was an dem relativ hohen basalen Adosin Gehalt in diesem Teil der Niere liegt (Zou et al. 1999a).

Im Ruhezustand ist die interstitielle Adenosinkonzentration im Nierenmark höher als in der Rinde (Siragy and Linden 1996). In der Medulla führt die Erhöhung der basalen Adenosinkonzentration zur Dilatation der Vasa recta, während es im Cortex zuerst zur Konstriktion der Arteriolen kommt und erst bei höherer Adosinanhäufung die Gefäße dilatieren.

Einfluss von Adenosin auf die Reninfreisetzung

Bei verschiedenen Tierarten und auch beim Menschen wurde ein Rückgang der Reninfreisetzung nach intrarenaler Adenosinapplikation festgestellt (Arend et al. 1984; Jackson 1991). Durch die Infusion von A₁R-Agonisten konnte der gleiche Effekt erreicht werden, wogegen die A₂R-Aktivierung eine Erhöhung der Plasma-Renin-Spiegel erzeugte (Churchill and Bidani 1987). Die Verabreichung von A₁R-Antagonisten führte beim Menschen zur Erhöhung der Reninkonzentration im Plasma (Balakrishnan et al. 1993). Auch bei Stimulation der Reninsekretion (durch natriumarme Diät, Furosemidapplikation oder Reduktion des renalen arteriellen Druckes) wird mit der Gabe von A₁R-Antagonisten die Freisetzung nochmals verstärkt (Kuan et al. 1990; Kuan et al. 1989; Paul et al. 1989). Ebenso wird der Rückgang der Reninsekretion bei hoher tubulärer NaCl-Konzentration durch eine A₁R-Antagonisten-Gabe abgeschwächt (Weihprecht et al. 1990).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Reninfreisetzung sowohl von A₁R als auch von A₂R reguliert wird. Schon unter physiologischen Umständen vermittelt Adenosin über A₁R eine Hemmung der Reninfreisetzung.

Die Reninsekretion wird auch bei verminderter Aktivität der Ionentransporter, wie z.B. bei Furosemidgabe, durch Adenosin gehemmt. Deshalb vermutet man, dass das Reninsekretion-hemmende Adenosin nicht nur aus der ATP-Hydrolyse der Ionentransporter stammt, sondern auch aus dem Abbau des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP).

Die Stimulation für die Reninsekretion ist in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Friis et al. 2002). Der Anstieg der cAMP-Konzentration führt zur Abgabe von cAMP in den extrazellulären Raum und kann dann zu Adenosin abgebaut werden. Da Adenosin die Reninfreisetzung hemmt, vermutet man ein cAMP-Adenosin-vermitteltes negatives Feedback. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass bei intrarenaler Applikation von cAMP die gleichen Effekte gesehen werden wie bei einer Adosininjektion (Tagawa and Vander 1970).

Einfluss von Adenosin auf den Ionen- und Flüssigkeitstransport

Adenosin kann außer über Modulation des renalen Blutflusses und der Reninfreisetzung auch unmittelbar den Ionen- und Flüssigkeitstransport in Tubuli und Sammelrohr beeinflussen.

Sowohl bei Ratten als auch bei Menschen wurde bei systemischen Gaben von A_1R -Antagonisten eine erhöhte Diurese beobachtet, welche hauptsächlich durch die Minderung der Resorption im proximalen Tubuli verursacht wurde (Mizumoto et al. 1993; van Buren et al. 1993).

Bei der gemeinsamen Verabreichung von A_1R - und A_3R -Antagonisten wird der diuretische Effekt von A_1R -Antagonisten aufgehoben, obwohl die Behandlung nur mit A_3R -Antagonisten keinen Effekt auf die Ausscheidung hat (Mozaffari et al. 2000). Dieser Befund deutet auf eine antagonistische Wirkung zwischen A_1R und A_3R hin. Eine mögliche Erklärung ist, dass unter physiologisch niedrigem Adenosinspiegel die A_3R nicht an der Regulierung des Natrium- und Wassertransportes beteiligt sind und erst bei pathologisch hohem Spiegel in die Regelung des Flüssigkeitshaushaltes eingreifen. Der Anstieg der A_3R -Dichte und die Abnahme der A_1R -Anzahl unter länger anhaltender Salzbelastung bestätigt diese Annahme (Zou et al. 1999b).

Angesichts der diuretischen Wirkung der A_1R -Antagonisten ist es überraschend, dass nach der intrarenalen Applikation von A_1R -Agonisten auch eine erhöhte Wasser- und Natriumausscheidung gemessen wurde (Yagil et al. 1994). Die Erklärung für diese Befunde ist die bimodale Wirkung der A_1R auf den Na^+/H^+ -Austauscher 3 (NHA3), welcher im proximalen Tubulus der Henle-Schleife für die Natriumresorption zuständig ist (Preisig and Rector, Jr. 1988). In vitro wurde gezeigt, dass der NHA3 durch niedrige Konzentrationen von A_1R -Agonisten stimuliert und durch hohe Konzentrationen gehemmt wird (Di Sole et al. 2003). So steigert Adenosin unter physiologischen Bedingungen in den proximalen Tubuli die Natriumresorption und hemmt sie bei Erhöhung der Adenosinkonzentrationen, wie zum Beispiel bei Ischämie, und mindert so den renalen Sauerstoffverbrauch (Di Sole 2008).

Auch in dem aufsteigenden dicken Schenkel der Henle-Schleife hemmt Adenosin unter hypoxischen Bedingungen A_1R -vermittelt die $NaCl$ -Resorption. Diese Aussage beruht auf Versuchsergebnissen mit isolierter Tubuli, in denen bei A_1R -Aktivierung ein verminderter Chloridstrom gemessen wurde (Beach and Good 1992). Dieser Mechanismus schützt wiederum das Gewebe unter ischämischen Bedingungen durch die Minderung des Sauerstoffverbrauchs (Beach et al. 1991).

Neben den beschriebenen Wirkungen auf die Natrium- und Wasserretention wurden Effekte von Adenosin auch auf weitere Ionentransporter festgestellt.

In der Zellkultur von Epithelzellen des distalen Konvoluts wurde die Magnesiumaufnahme durch die Aktivierung von A_1R stimuliert und durch A_2R gehemmt (Kang et al. 2001). In Zelllinien des Sammelrohrs wurde die Erhöhung der Kalziumresorption und die Hemmung

von Natriumkanälen durch Aktivierung der A₁R beobachtet (Hoenderop et al. 1998; Wei et al. 2006). Sowohl die Epithelzellen des distalen Konvoluts als auch die Zellen des Sammelrohrs zeigen A₁R vermittelt eine Aktivierung der Chloridkanäle (Light et al. 1990; Rubera et al. 2001).

Da diese Einflüsse bisher nur in *in vitro* Untersuchungen registriert wurden, ist die *in vivo* Bedeutung bisher nicht geklärt.

Tubuloglomerulärer Feedback (TGF)

Bei Zunahme des NaCl-Gehalts im distalen Tubulus kommt es über eine Sensorfunktion der Macula densa zur Minderung der glomerulären Filtrationsrate desselben Nephrons (single nephron GFR, SNGFR). Dies wird einerseits durch Änderung des Gefäßtonus der afferenten Arteriolen, andererseits durch Veränderung der Reninsekretion realisiert. Bei Erhöhung der Elektrolytkonzentration im distalen Tubulus kommt es zur Vasokonstriktion an den afferenten Arteriolen des Nephrons und die Reninsekretion wird gemindert.

Bei Ratten wurde durch Hemmung von A₁R die TGF-induzierte Minderung der SNGFR geschwächt (Schnermann et al. 1977). Der TGF konnte auch durch Hemmung von Nukleotidtransportern und durch Inhibitoren des AMP-Abbaus gedrosselt werden (Kawabata et al. 2002; Thomson et al. 2000).

Versuche an A₁R-Knockout Mäusen haben die Beteiligung von A₁R am TGF nochmals bestätigt. In zwei voneinander unabhängig gezüchteten A₁R-defizienten Mäuselinien wurde gezeigt, dass ohne A₁R kein TGF auslösbar ist (Brown et al. 2001; Sun et al. 2001).

Bei hohem NaCl-Gehalt im Primärharn erhöhen sich die Aktivitäten der basolateral liegenden Na⁺/K⁺-ATPasen und der apikal liegenden H⁺/K⁺-ATPasen in den Zellen der Macula densa (Peti-Peterdi et al. 2002; Osswald et al. 1980). Das dabei vermehrt anfallende AMP wird von endo- oder ekto-5-Nukleotidase zu Adenosin abgebaut (Zimmermann 1992). Das sich im Interstitium anhäufende Adenosin bindet dann an den A₁R der extraglomerulären Mesangiumzellen (Toya et al. 1993). Durch Aktivierung der A₁R wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und führt zur Konstriktion der Zellen (Olivera et al. 1989). Durch Gap Junctions zwischen den Mesangiumzellen, den Renin-bildenden Zellen und den Zellen der afferenten Arteriolen wird der Kalzium-Impuls weitergegeben. Die erhöhte Kalziumkonzentration führt dann zur Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen bzw. zur Hemmung der Reninfreisetzung aus den Epitheloidzellen (Ren et al. 2002).

2.2 Das hepatorenale Syndrom

2.2.1 Die Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist das irreversible Endstadium einer chronischen Lebererkrankung. Sie ist durch Leberzelluntergang, Fibrose und eine abnorme noduläre Regeneration mit Verlust der normalen Läppchenstruktur gekennzeichnet.

In der westlichen Welt sind die wesentlichen Auslöser der Leberzirrhose chronischer Alkoholismus (ca. 60%) und Infektionen mit hepatotropen Viren (Hepatitis B und C; ca. 30%), seltener autoimmune Erkrankungen (primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, autoimmune Hepatitis) und genetisch verursachte Stoffwechselerkrankungen wie die Hämochromatose, der M. Wilson oder der α 1-Antitrypsinmangel (Herold 2007).

Zirrhose entsteht infolge von kontinuierlichem und langdauerndem Leberzelluntergang. Dieser stellt einen Dauerreiz für Wachstum und Proliferation der Hepatozyten sowie für die Fibrogenese dar, welche den strukturellen Umbau der Leber bewirken (Gerok and Blum 1995). Die unkoordinierten regenerativen Prozesse bei der Leberzirrhose werden durch Nekrosen und durch die gesteigerte metabolische Aktivität der noch intakten Zellen induziert. Es entstehen isolierte und überschießende Leberzell- und Gallengangsregenerate, sodass die normale Läppchenstruktur bei der Leberregeneration nicht gewahrt bleibt.

Die Schädigung der Hepatozyten führt zur Einwanderung von Entzündungszellen und zur Freisetzung von Zytokinen aus Kupffer-Zellen, Hepatozyten und Thrombozyten. Diese aktivieren die Ito-Zellen, die zu Myofibroblasten differenzieren und verstärkt extrazelluläre Matrix synthetisieren. Neben der verstärkten Fibrogenese werden auch die Enzyme zur Fibrolyse vermehrt gebildet. In der Bilanz unterliegt jedoch der Abbau der extrazellulären Matrix, und mit Fortschreiten der Erkrankung bilden sich fibrotische Stränge. Diese umschließen Parenchyminseln und so kommt es zu Ausbildung von Pseudolobuli. Die Umbauvorgänge durch die Zunahme und Verdichtung der extrazellulären Matrix im Disse-Raum gehen mit der sogenannten „Kapillarisation der Sinusoide“ einher. Es entsteht eine Barriere zwischen sinusoidalem Blut und Leberzelle und diese führt zu Erschwerung des Stoffaustausches und zu Erhöhung des Strömungswiderstandes in den Sinusoiden. Die Rarefizierung der Sinusoide durch den fibrotischen Umbau, die Einengung der verbliebenen Sinusoide durch Kollagenablagerungen, und die Kompression der Gefäße durch Regeneratknoten erhöhen den Strömungswiderstand in der Leber und verursachen einen Anstieg des portalen Blutdruckes (Schuppan and Afdhal 2008).

Wesentliche Folgen und Komplikationen der Leberzirrhose sind die Ausbildung von Aszites, von oberflächlichen portokavalen Anastomosen in Ösophagus, Magen und Rektum (Varizen), portalhypertensive Gastropathien und Enteropathien, eine hepatische Enzephalopathie und ein erhöhtes Infektionsrisiko.

Varizen

Die Steigerung der portalen Hypertonie auf Werte über 12 mmHg kann zur Ausbildung oberflächlich gelegener portokavaler Anastomosen führen, die häufig Blutungen in Ösophagus, Magen oder Rektum verursachen.

Auslöser der Blutung aus Ösophagusvarizen ist die Steigerung des Pfortaderdruckes auf über 12 mmHg (Garcia-Tsao, Groszmann, variceal bleeding 1985).

Gastropathien und Enteropathien

Ebenfalls auf der portalen Hypertonie beruhen die portal hypertensiven Gastropathien und -Enteropathien. Durch die Stauung kommt es zu Gefäßektasien in der Schleimhaut von Magen, bzw. Darm mit Verdickung der Basalmembran und Ödemen in der Mukosa und Submukosa. Klinisch können gastrointestinale Blutungen, meist chronische Sickerblutungen, auftreten. Diese Hämorrhagien werden oft durch eine bestehende Blutgerinnungsstörung kompliziert, welche auf die verminderte Syntheseleistung der Leber zurückzuführen ist.

Hepatische Enzephalopathie

Die beeinträchtigte Entgiftungsfunktion der Leber bewirkt einen Anstieg der Konzentration von Ammoniak, Merkaptanen, Gamma-Aminobuttersäure, kurzkettigen Fettsäuren und aromatischen Aminosäuren im Körper. Diese Stoffe können eine Schwellung der Astrozyten verursachen und zur Störung der glioneuronalen Kommunikation führen und so eine hepatische Enzephalopathie auslösen.

Aszites

Die aufgrund der portalen Hypertonie gesteigerte Lymphproduktion und die verminderte Albuminsynthese führen zu einem Anstieg des hydrostatischen Druckes und zu einem Abfall des kolloidosmotischen Druckes im Plasma. Es kommt zum Austritt von Flüssigkeit in die Bauchhöhle. Die daraus resultierende Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens aktiviert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und das sympathische Nervensystem und verstärkt so die Natrium- und Wasserretention, was den Aszites weiter verschlechtert.

Bei Fortschreiten der Krankheit werden die Kompensationsmechanismen aufgrund des verminderten effektiven Blutvolumens immer stärker, was durch die extreme renale Vasokonstriktion und Natrium- und Wasserretention in einer funktionellen Niereninsuffizienz, dem hepatorenalen Syndrom, resultieren kann.

2.2.2 Niereninsuffizienz

Unter Niereninsuffizienz versteht man das Unvermögen des Organs, die harnpflichtigen Stoffe in ausreichendem Maße auszuschcheiden, so dass es zu deren Anreicherung im Blut (Azotämie) und schließlich zur Harnvergiftung (Urämie) kommt. Nach den Ursachen wird prärenales, renales und postrenales Nierenversagen unterschieden (Mann et al. 1986).

Die primäre Ursache eines prärenalen Nierenversagens ist die verminderte Perfusion des Nierenparenchyms. Diese kann als Folge von Hypovolämie, verminderter Herzleistung, systemischer Vasodilatation und renaler Vasokonstriktion auftreten. Renale Ursachen für eine Niereninsuffizienz sind im Wesentlichen Nephrotoxine, Infektionskrankheiten oder Folgen von Multiorganversagen. Bei länger anhaltender prärenal verursachter Ischämie können sich Tubulusnekrosen entwickeln und so zur renalen oder intrinsischen Niereninsuffizienz führen. Eine partielle oder vollständige Obstruktion der harnableitenden Wege kann eine postrenale Niereninsuffizienz zur Folge haben.

Bei dem hepatorenenalen Syndrom handelt es sich um eine prärenale Niereninsuffizienz.

2.2.3 Nierenversagen bei Lebererkrankungen

Leber- und Nierenfunktionsstörungen treten oft zusammen auf, entweder bei Erkrankungen die sowohl die Leber als auch die Nieren schädigen, (z.B. Leptospirose und Intoxikationen) oder bei primärer Erkrankung eines der beiden Organe, die zu einer Schädigung des anderen Organs führt (Betrosian et al. 2007). Bei Leberleiden können verschiedene Auslöser zu Nierenschädigungen führen. Verminderung des intravasalen Volumens und ausgeprägter Hypotonie, z.B. durch gastrointestinale Blutung, Diarrhö oder Schock, können ebenso eine Rolle spielen wie schwere Sepsis, nephrotoxische Kontrastmittel oder nephrotoxische Medikamente (McCormick and Donnelly 2008;Laffi et al. 1994).

Das hepatorenale Syndrom (HRS) ist eine spezielle Form des Nierenversagens, die bei fulminanter Hepatitis und Leberzirrhose auftritt. Es kommt zu einer rein funktionellen, reversiblen Niereninsuffizienz, zunächst ohne bedeutende Veränderung des histologischen Bildes der Niere. Nach Transplantation der Nieren von HRS-Patienten in Patienten mit gesunder Leber oder nach Transplantation von einer gesunden Lebern in HRS-Patienten nehmen die Nieren oftmals wieder ihre Funktion auf (Koppel et al. 1969;Iwatsuki et al. 1973).

2.2.4 Das hepatorenale Syndrom

Das HRS ist eine häufige Komplikation bei zirrhotischen Patienten, die Aszites entwickeln. Die jährliche Inzidenz in dieser Gruppe beträgt 8% (Arroyo et al. 2008). Der Abfall der glomerulären Filtrationsrate beruht auf einer starken renalen Vasokonstriktion, die zu einer Minderperfusion der Nieren führt (Epstein et al. 1970). Die Wasser- und Natriumausscheidung wird vermindert, die Patienten zeigen eine starke Verminderung des Harnflusses, haben erhöhte Serumkreatininspiegel und entwickeln oft eine Hyponatriämie. Die äußerlich erkennbaren Symptome bei HRS sind Ikterus, Aszites und Ödeme.

2.2.4.1 Klinische Typen des HRS

Das HRS wird nach Intensität und Verlauf in zwei Typen eingeteilt. HRS Typ 1 ist durch ein rapid progressives Nierenversagen gekennzeichnet, mit Verdopplung des Serumkreatinins auf Werte über 2,5 mg/dl (221 µmol/l) oder Halbierung der Kreatinin-Clearance auf Werte unter 20ml/Min innerhalb von zwei Wochen. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim HRS Typ 2 um eine mildere Verlaufsform mit einem langsam progredienten Nierenversagen. Es kommt zur Erhöhung des Serumkreatinins auf über 1,5mg/dl (133 µmol/l) oder zur Minderung der Kreatinin-Clearance auf Werte unter 40 ml/Min über einen längeren Zeitraum (Alessandria et al. 2005).

HRS Typ 1 hat ein mittleres Überleben von weniger als zwei Wochen und eine Überlebensrate von 10% nach drei Monaten. Der HRS Typ 2 hat eine deutlich günstigere Prognose mit einer Überlebensrate von 70% nach drei Monaten (Gines et al. 1993).

Auslöser für HRS sind neben der stetigen Verschlechterung der Leberfunktion häufig eine spontane bakterielle Peritonitis, großvolumige Parazentese ohne ausreichenden Volumenersatz, gastrointestinale Blutungen sowie häufig zu aggressive Diuretikatherapien (Follo et al. 1994; Terra et al. 2005; Cardenas et al. 2001; Westphal and Brogard 1997; Laffi et al. 1994).

2.2.4.2 Pathogenese

Die Pathogenese des HRS ist sehr komplex. Im Wesentlichen kann man die bisher bekannten Pathomechanismen in drei Punkten zusammenfassen. Erstens kommt es zu Veränderungen im Kreislauf (Hypothese der peripheren arteriellen Vasodilatation), zweitens verändern sich die Syntheseraten von renalen und humoralen vasoaktiven Stoffen und drittens wirkt ein direkter nervaler Reflex von der Leber auf die Niere (hepatorenal Reflex). Diese Mechanismen verlaufen zeitgleich und bedingen und beeinflussen einander.

2.2.4.2.1 Hypothese der peripheren Vasodilatation

Bei einer Leberzirrhose oder auch bei einer akuten, schweren Lebererkrankung kommt es aufgrund von Schwellung der Leberzellen und durch Fibrosierung zu einer Steigerung des Strömungswiderstandes in den Sinusoiden, welcher zur Entstehung einer portalen Hypertonie führt (Blendis et al. 1982). Dabei steigt der portokavale Druckgradient von physiologischen 3-6 mmHg auf über 12 mmHg (Moore and Aithal 2006). Die portale Hypertonie, die aus ihr resultierende vermehrte Endotoxin-Einschwemmung aus dem Darm und die verstärkte Synthese an Zytokinen stimulieren die Stickoxidsynthesen (Lang et al. 1993). Die erhöhte

Synthese von Stickoxid (NO) und anderen vasodilatatorischen Substanzen wie Adenosin, Prostaglandine, Thromboxane, calcitonin-gene related peptid, Glukagon oder Substanz P im Splanchnikusgebiet führt zur peripheren Vasodilatation (Gupta et al. 1992; Martin et al. 1998; Cardenas et al. 2008; Sitzmann et al. 1989; Fernandez-Rodriguez et al. 1995; Silva et al. 1990). Nach der Hypothese der „peripheren arteriellen Vasodilatation“ wird in der Phase der kompensierten Zirrhose der verminderte periphere Widerstand durch sympathikusvermittelte gesteigerte Herzrate und Herzauswurfvolumen ausgeglichen (Schrier et al. 1988). Mit Fortschreiten der Krankheit verstärkt sich die arterielle Vasodilatation soweit, dass die erhöhte Herzleistung nicht mehr die effektive arterielle Hypovolämie kompensieren kann. Durch die entstehende arterielle Hypotonie werden die arteriellen Dehnungsrezeptoren vermindert stimuliert und es kommt zu einer weiteren Steigerung des Sympathikotonus (Ring-Larsen et al. 1982). Sie bewirkt eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und eine verstärkte Resorption von Natrium und Wasser (DiBona and Kopp 1997). Durch den abnehmenden renalen Perfusionsdruck wird auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, welches einerseits zur Natriumretention führt, andererseits vasokonstriktiv wirksam ist (Epstein et al. 1977). Allerdings sind aufgrund der exzessiven Stickstoffbildung sowohl die sympathischen als auch die RAAS-bedingten Mechanismen in ihrer pressorischen Wirksamkeit eingeschränkt. Im weiteren Verlauf wird wegen des verminderten effektiven Plasmavolumens vermehrt Vasopressin aus der Neurohypophyse freigesetzt. Dieses wirkt zusätzlich gefäßverengend und bewirkt eine ionenfreie Wasserresorption in der Niere (Bichet et al. 1982).

Durch die Aktivierung dieser neurohumoralen volumenregulatorischen Systeme kommt es zwar zu einer erheblichen Flüssigkeitsretention, aber wegen des verminderten kolloidosmotischen Druckes und der erhöhten Gefäßpermeabilität kann die Flüssigkeit nicht intravasal gehalten werden und es entwickelt sich ein Aszites. Trotz ausgeprägter Vasokonstriktion in Nieren, Muskulatur, Haut und Gehirn kommt es zum weiteren Fall des effektiven Blutvolumens (Fernandez-Seara et al. 1989; Guevara et al. 1998a; Maroto et al. 1993; Maroto et al. 1994).

Bei Verlaufsuntersuchungen von HRS-Patienten wurde festgestellt, dass sie verminderte Herzleistungen hatten im Vergleich zu den Werten vor Entwicklung des HRS, also im Stadium mit ausgeprägter Zirrhose und Aszites mit normalen Kreatininspiegel (Ruiz-del-Arbol et al. 2003; Ruiz-del-Arbol et al. 2005).

Laut der „Hypothese der peripheren arteriellen Vasodilatation“ entsteht das HRS durch das Zusammenspiel folgender Faktoren: extreme Minderung des effektiven Blutvolumens durch die fortschreitende arterielle Vasodilatation im Splanchnikusgebiet; renale Vasokonstriktion durch Stimulation von RAAS, sympathischem Nervensystem (SNS) und Vasopressin und Minderung der Herzleistung (Arroyo et al. 2008). Trotz der anhaltenden Stimulation der Vasopressoren gelingt systemisch keine Kompensation der arteriellen Vasodilatation, aber es

kommt in der Nierenrinde zu einer starken Minderperfusion. Durch die Verschlechterung der Herzleistung wird die Nierenversorgung weiter beeinträchtigt und dies führt zu einer weiteren Verschlechterung der renalen Funktion, die in ein HRS resultieren kann (siehe Abb.1).

Hypothese der peripheren arteriellen Vasodilatation

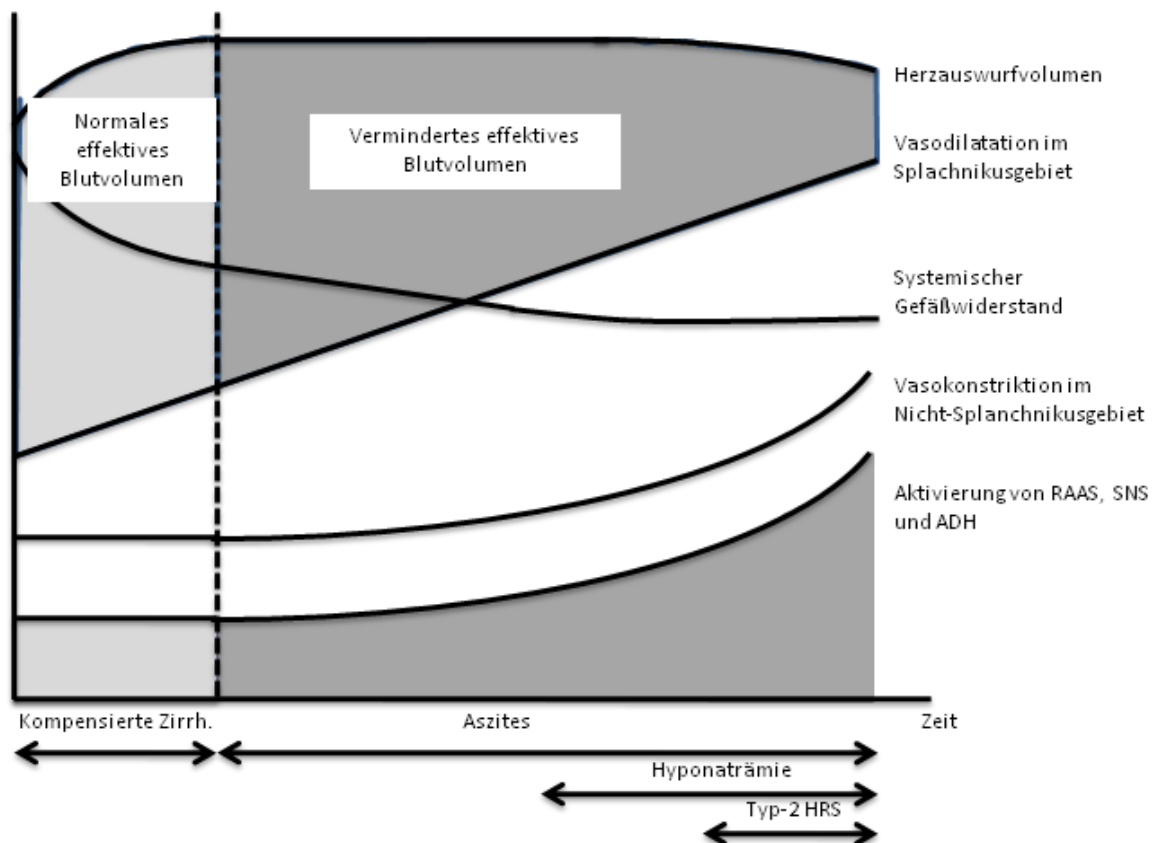


Abb.1: Schematische Darstellung der „Hypothese der peripheren arteriellen Vasodilatation“ - nach Arroyo (Arroyo et al. 2008)

In der Phase der kompensierten Zirrhose wird die verstärkte arterielle Vasodilatation im Splanchnikusgebiet und die Minderung des systemischen Gefäßwiderstandes durch die erhöhte Herzleistung ausgeglichen. So kommt es in dieser Phase zu keiner bedeutenden Minderung des effektiven Blutvolumens.

Mit der Progression des Leberleidens wird die arterielle Vasodilatation im Splanchnikusgebiet weiter verstärkt. Da die Herzleistung nicht mehr weiter gesteigert werden kann, kommt es zu einer effektiven Hypovolämie. Diese aktiviert das RAAS, das SNS und verursacht eine gesteigerte Vasopressinfreisetzung. Mit Fortschreiten der Krankheit werden diese Systeme immer stärker und führen zu einer extremen renalen Vasokonstriktion. Es kommt zu erheblicher Flüssigkeitsretention, aber wegen des verminderten kolloidosmotischen Drucks und der erhöhten Gefäßpermeabilität kann die Flüssigkeit nicht intravasal gehalten werden und es entwickelt sich ein Aszites. Durch die Minderung der Herzleistung kommt es zu weiterer Abnahme des effektiven Blutvolumens, welche die Nierenversorgung weiter beeinträchtigt. Die Verschärfung der Minderperfusion der Nieren führt zu einer weiteren Verschlechterung der renalen Funktion, die zu einem hepatorenalen Syndrom führen kann.

2.2.4.2.2 Konzentrationsänderungen von weiteren vasoaktiven Stoffen

Bei Untersuchungen von Zirrhose- und HRS-Patienten wurden, außer der in der „Hypothese der peripheren arteriellen Vasodilatation“ zusammengefassten, noch weitere an der Pathogenese beteiligte vasoaktive Mechanismen gefunden.

Die renalen Adenosin Gewebespiegel steigen bei Zirrhosepatienten durch die verstärkte Natriumresorption und durch die renovasokonstriktorisch bedingte Unterversorgung der Nieren an (Llach et al. 1993). Da Adenosin in der Nierenrinde vasokonstriktorisch wirkt, wird die Versorgung des Organs zusätzlich verschlechtert und es entwickelt sich ein Circulus vitiosus.

Die Infusion von Dipyridamol, welches die extrazelluläre Adenosinkonzentration durch Hemmung der Adenosin-Wiederaufnahme steigert, führte bei Zirrhosepatienten zur Minderung der Natrium- und Wasserausscheidung. Zirrhosepatienten mit Aszites und einer erhöhten RAAS-Aktivität zeigten besonders starke Effekte (Llach et al. 1993).

Endothelin-1 (ET-1) ist ein sehr starker Vasokonstriktor und bewirkt zusätzlich die Kontraktion der Mesangiumzellen. Schon nach der Verabreichung von sehr niedrigen ET-1-Dosen kommt es zur Verminderung von renaler Perfusion, GFR, Natriumausscheidung und Urinfluss (Sorensen et al. 1994). HRS-Patienten haben im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Plasma-ET-1-Konzentrationen (Moore et al. 1992). Bei Zirrhosepatienten wurde eine positive Korrelation zwischen venösem ET-1-Spiegel und der Serumkreatininkonzentration und eine negative Korrelation zwischen ET-1-Spiegel und Serumnatriumkonzentration bzw. dem Blutdruck festgestellt. Die in den Venen von Niere und Leber gemessene ET-1-Spiegel waren nicht höher als in der Oberschenkelvene, was gegen eine vermehrte Synthese speziell in Leber und Niere spricht. Die Untersucher vermuten, dass die ET-1-Freisetzung durch die bei der Hypovolämie aktivierten Barorezeptoren gesteuert wird (Moller et al. 1993).

Bei Untersuchungen von Patienten mit Zirrhose oder akutem Leberversagen wurde festgestellt, dass die Patienten, die HRS entwickeln, höhere Endotoxin-Plasmakonzentrationen haben, als die ohne Nierenbeteiligung (Tachiyama et al. 1988). Die Gruppe von Wilkinson hat eine Korrelation zwischen Endotoxämie und verminderter Nierenleistung bzw. Mortalität festgestellt (Wilkinson et al. 1976). Es wird vermutet, dass bei schweren Leberschäden das Retikulohistiozytäre System geschwächt wird und deshalb die aus dem Darm absorbierten Endotoxine nicht mehr genügend eliminiert werden können. Der hohe Endotoxinspiegel stimuliert die Zellen zur Bildung von Eikosanoiden. Bei HRS-Patienten wurden veränderte Werte an Thromboxan, Leukotrien-C4 und -D4 und Prostaglandin-E2 gefunden.

Die vasodilatativ wirkenden Prostaglandine sind sehr wichtig für den Erhalt der Nierenfunktion in der Phase der starken peripheren Vasokonstriktion. Bei fortgeschrittenen Lebererkrankungen ohne Nierenbeteiligung sind die Urinkonzentrationen von Prostaglandin-E2 und -I2 erhöht, vermindern sich aber bei beeinträchtigter Nierenfunktion (Guarner et al. 1986).

Thromboxan wird bei renaler Ischämie gebildet und führt zur Vasokonstriktion und Kontraktion der Mesangiumzellen. Die Studien, die sich mit Thromboxan bei HRS beschäftigt haben, haben sehr unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Einige hatten Hinweise auf eine vermehrte renale Produktion, andere haben keine Unterschiede oder sogar eine verminderte Synthese festgestellt (Zipser et al. 1983;Laffi et al. 1986;Rimola et al. 1986).

Leukotrien-C4 und -D4 sind starke renale Vasokonstriktoren. Patienten mit HRS haben, verglichen mit aszitischen Leberkranken ohne renale Beteiligung, eine siebenfach höhere Leukotrien-E4-Konzentration im Urin. Verglichen mit gesunden Menschen ist die Konzentration dieses Abbauproduktes von Leukotrien-C4 und -D4 sogar um das 54-fache erhöht (Moore et al. 1990).

Das vasokonstriktorisch wirkende F2-Isoprostan wird durch Peroxidation von Arachidonsäuren bei oxidativem Stress gebildet (Roberts and Morrow 1994). Freie Radikale entstehen vermehrt aufgrund von Hypoxie und Endotoxämie. Die Plasmakonzentration von F2-Isoprostane ist bei HRS-Patienten im Vergleich zu nur Leber- oder Nierenerkrankten um das 5-fache erhöht (Morrow et al. 1993).

Um der Ischämie entgegenzuwirken, wird auch die renale NO-Synthese angeregt, die durch die Vasodilatation der renalen Gefäße zur Verbesserung der Versorgung führt. Im Tierversuch wurde die Verminderung der Durchblutung der Niere und der GFR bei der Hemmung der NO-Synthese bei zirrhotischen Tieren festgestellt (Ros et al. 1995).

2.2.4.2.3 Hepatorenaler Reflex

Die direkte nervale Steuerung der Natrium- und Wasserausscheidung von der zirrhotischen Leber wurde wiederholt in Tierexperimenten festgestellt (Ming et al. 2002;Ming and Lauth 2006). Für die Beteiligung des hepatorenalen Reflexes im HRS spricht, dass es nach der lumbalen Sympathikusblockade bei HRS-Patienten zur Erhöhung von Nierendurchblutung, GFR und Natriumausscheidung kommt (Solis-Herruzo et al. 1987).

Aufgrund der Komplexität der Pathogenese des HRS ist die Ursache der Entwicklung eines HRS aus einer dekompensierten Zirrhose oder einer schweren Leberschädigung nicht eindeutig zu definieren. Im Krankheitsverlauf führt die zunehmende Konstriktion der Nierengefäße über die Abnahme der renalen Perfusion zu einem Circulus vitiosus mit

vermehrter Ausschüttung von Vasokonstriktoren. Um dieser Ischämie entgegenzuwirken und die Diurese aufrechtzuhalten, werden in der Niere vasodilatatorische Substanzen, wie Prostaglandine und NO produziert. Schließlich entwickelt sich ein HRS, wenn sich ein Ungleichgewicht zugunsten der Vasokonstriktoren einstellt.

2.2.4.3 Therapie

Eine Besserung der Nierenfunktion beim HRS ist ohne Besserung der Leberfunktion nur selten spontan möglich. Die Therapien sollten deshalb auf die Stabilisierung der Nierenfunktion und auf den Erhalt aller wichtigen Körperfunktionen bis zur Besserung des Leberleidens oder bis zur Lebertransplantation abzielen.

Studien mit HRS-Patienten haben gezeigt, dass die Verabreichung von Vasopressinanaloga in Kombination mit Plasmaexpandern auf Albuminbasis bei großen Teilen der Patienten zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt und das Überleben nach einer Transplantation begünstigt (Ortega et al. 2002; Restuccia et al. 2004). Bei einer vierstündigen Ornipressinbehandlung von HRS-Patienten stiegen die Inulin-Clearance um 65%, die Natriumausscheidung um 259% und der Urinfluss um 45%. Während der periphere Widerstand sich erhöhte, kam es in der Niere zur Minderung der Vasokonstriktion und so zur Erhöhung des renalen Blutflusses um 44%. Ferner konnte eine verminderte Reninaktivität und Noradrenalin-Konzentration im Plasma gemessen werden (Lenz et al. 1991).

Durch Anlegen eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS) kann die im Splanchnikusgebiet angestaute Blutmenge wieder dem systemischen Kreislauf zugeführt werden. Der Shunt verbindet einen intrahepatischen Pfortaderast mit einer Lebervene bzw. mit der Vena cava inferior. Der Durchmesser des Shunts wird so eingestellt, dass der portokavale Druckgradient auf ca. 5 mmHg reduziert wird. So wird der portale Druck gemindert, indem ein Anteil des Blutes aus der Pfortader dem systemischen Kreislauf zugeführt und nur noch ein Teil über die Leber geführt wird (Wong 2006).

Bei Patienten mit therapierefraktärer Bauchwassersucht wurde einen Monat nach Einsetzen des TIPS die Normalisierung von Plasmarenin- und Aldosteronwerten mit Minderung der Natriumresorption festgestellt, allerdings blieben die Noradrenalin Spiegel hoch (Wong et al. 1995). Sowohl bei Typ 1 als auch bei Typ 2 HRS-Patienten konnten die Verbesserung der Serum-Kreatininwerte und des Kreislaufes beobachtet werden. Da das mittlere Überleben bei Typ 1 HRS-Patienten durch TIPS-Implantation von 1,9 Wochen auf 6,4 bzw. 21 Wochen verlängert wurde, sollte eine TIPS-Implantation als Überbrückung bis zu einer Lebertransplantation in Betracht gezogen werden (Gulberg and Gerbes 2002; Brensing et al. 2000; Guevara et al. 1998b).

Bei dem sogenannten Molecular Absorbents Recirculation System (MARS) können sowohl die wasserlöslichen als auch die an Albumin gebundenen Substanzen aus dem Blut entfernt werden (Mitzner et al. 2001b). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass es unmittelbar nach der MARS-Dialyse zur Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und des Urinflusses und zur Verminderung des Aszites und der Plasmakonzentrationen von Bilirubin, Kreatinin und Harnstoff kommt. Von den acht Patienten mit HRS Typ 1 sind drei während des Krankenhausaufenthaltes verstorben. Die Überlebenden konnten nach mehrmaligen MARS-Behandlungen nach durchschnittlich 25 Tagen das Krankenhaus verlassen und waren nach einem Jahr alle am Leben (Mitzner et al. 2001a). Die Erhöhung der Überlebensrate durch die MARS-Behandlung wurde auch durch andere klinische Studien bestätigt (Mullen 2002;Mitzner et al. 2000). Die positiven Effekte dieses Verfahrens werden auf die Absorption von Gallensäure, Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff und vasoaktive Stoffe, wie Prostaglandine und NO zurückgeführt (Mitzner et al. 2001c).

Da das dem HRS zugrundeliegende Leberversagen in den meisten Fällen nicht reversibel ist, stellt die Lebertransplantation das ideale Verfahren dar, sowohl die Hepatopathie als auch das Nierenversagen zu therapieren.

In einer Studie mit 130 HRS-Patienten waren die Überlebensraten nach Lebertransplantation nach 1, 3 und 5 Jahren 74%, 64% bzw. 62%. Die Überlebensraten von Patienten mit HRS waren ca. 10% niedriger als bei Patienten ohne Nierenbeeinträchtigung (Ruiz et al. 2007).

Bei einer Untersuchung an 28 Patienten mit HRS Typ 1, waren vier Monate nach orthotoper Lebertransplantation vier Patienten verstorben, acht blieben dialysepflichtig und 16 Patienten erlangten erneut eine ausreichende Nierenfunktion. Die präoperative Dialyse und die Wartezeiten bis zur Transplantation korrelierten nicht mit der Verbesserung der Nierenfunktion (Marik et al. 2006). Die kombinierte Leber- und Nierentransplantation verbessert das Überleben im Vergleich zur Lebertransplantation nicht (Ruiz et al. 2006).

Die Lebertransplantation ist die einzige definitive Therapieoption für HRS-Patienten. Die kurze Überlebenszeit beim HRS Typ 1 macht jedoch die Lebertransplantation bei den meisten dieser Patienten unwahrscheinlich.

2.2.4.4 Prophylaxe

Präventivmaßnahmen gegen die Entwicklung von HRS bei Patienten mit Leberleiden und Aszites bestehen in der Verhinderung eines Volumenmangels, Vermeidung oder frühe Behandlung von Peritonitis und Sepsis und Verzicht auf potentiell nierenschädigende Medikamente (McCormick and Donnelly 2008). Nichtsteroidale Antiphlogisitika, Aminoglykoside, nierentoxische Kontrastmittel und exzessive Diuretikatherapien sind bei

dekompensierten zirrhotischen Patienten kontraindiziert (Peak and Sheller 2007;McCormick et al. 1997).

Die Inzidenz des Nierenversagens kann bei Zirrhosepatienten mit Peritonitis durch intravenöse Albuminverabreichung gemindert werden (Sort et al. 1999).

Auch die prophylaktische Behandlung mit Oxofloxacin verbessert die Prognose von Patienten mit dekompensierter Zirrhose. Durch die Behandlung sinkt die Inzidenz der spontanen bakteriellen Peritonitis und des HRS (Fernandez et al. 2007).

2.2.4.4.1 Diuretikaesatz bei Aszites

Das Auftreten eines Aszites verschlechtert die Prognose der Zirrhosepatienten, da der erhöhte intraabdominale Druck zur Steigerung des portalen Druckes führt. Durch das Pressen auf das Zwerchfell können außerdem die pulmonalen und kardialen Funktionen beeinträchtigen werden.

Die Basistherapie bei Aszitespatienten ist die weitgehende Bettruhe in Rückenlage, natriumarme Diät und bei Hyponatriämie die zusätzliche Wasserrestriktion (Moller et al. 2008;Wilken-Jensen et al. 1989). Bereits diese Maßnahmen führen bereits bei ca. 20% der Patienten zu Ausschwemmung des Aszites (Forns et al. 1994).

Bei Patienten, die auf diese Basistherapie nicht ansprechen, ist der Einsatz von Diuretika begründet. Da die gesteigerte Natriumresorption bei Leberzirrhose vorwiegend im distalen Tubulus erfolgt, ist nur der Einsatz von am distalen Tubulus wirkenden Diuretika sinnvoll. Spironolacton, ein am distalen Tubulus wirkender Aldosteronantagonist, ist die erste Wahl unter den Diuretika zur Aszitestherapie (Hou and Sanyal 2009). Empfohlen ist initial eine Tagesdosis von 100 mg, die man stufenweise bis zu 400 mg pro Tag steigern kann (Moore and Aithal 2006). Wenn dieses Vorgehen keinen Erfolg bringt, sollte zusätzlich Furosemid verabreicht werden. Hier sollte die Anfangsdosis bei 40 mg pro Tag liegen, die man stufenweise, vorsichtig bis zu 160 mg pro Tag erhöhen kann.

Mögliche Nebenwirkungen der Diuretikabehandlung sind Tachykardie, Enzephalopathie oder Verminderung der Kreatinin-Clearance (Sherlock et al. 1966).

HRS wird oftmals durch eine „aggressive“ diuretische Therapie iatrogen verursacht (Keller et al. 1995;Laffi et al. 1994). Dabei kommt es aufgrund der zu schnellen Ausschwemmung von Wasser zu einer Verminderung des Plasmavolumens, die dann zur weiteren Aktivierung von RAAS und SNS und zur erhöhten Synthese von Vasopressin und Angiotensin II führt (Kalambokis et al. 2005). Diese bewirken dann die weitere Verschlechterung der Nierendurchblutung, die sich bis zum irreversiblen HRS weiterentwickeln kann (Gulberg and Gerbes 1998).

Bei 5 bis 10% der Patienten kann trotz maximaler Diuretikadosis keine ausreichende Mobilisierung des Aszites erzielt werden oder die Diuretika müssen wegen Nebenwirkungen

abgesetzt oder reduziert werden (Forns et al. 1994). Die mangelnde Wirkung der Diuretika ist durch die starke renale Vasokonstriktion bedingt (Brater 1985). Die Diuretika erreichen wegen der geringen renalen Durchblutung nur vermindert oder gar nicht ihren Wirkungsort. Durch die verminderte GFR sinkt in der Tubulusflüssigkeit die Konzentration der Chloridionen, so dass Diuretika nur vermindert wirken können (Chiandussi et al. 1978).

Sowohl bei stark eingeschränkter Nierenfunktion als auch bei Diuretika-Resistenz wird von einer Fortsetzung der diuretischen Therapie abgeraten. Zur Behandlung des Asziten von diesen Patienten werden wiederholte Parazentesen, peritoneo-venöse Shunts oder TIPS genutzt (Moller et al. 2008).

Zu den potentiellen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten bei Asziten mit und ohne geminderter Nierenleistung wird die Regelung der A₁R-Wirkung gezählt (Moller et al. 2008).

2.3 Das Tiermodell

In der Literatur gibt es nur wenige Berichte über Tiermodelle für Leberzirrhose mit Beeinträchtigung der Nierenfunktion oder für das HRS.

Der Versuch von Saracyn et al., ein dem humanen hepatorenalen Syndrom gleichenden Krankheitsbild durch Galaktosaminapplikation an Ratten zu schaffen, ist gescheitert. Die Tiere hatten zwar erhebliche Leberschäden, aber keine Erhöhung der Kreatinin- und Harnstoffwerte (Saracyn et al. 2004).

In dem Experiment von Rincon et al. führte die einmalige Gabe von Kohlenstofftetrachlorid (CCl₄) an bereits zirrhotischen Ratten zur Minderung der GFR und der Natriumausscheidung und zur Erhöhung der Renin-Aktivität im Plasma. Da die histologischen Untersuchungen der Nieren nur geringe Veränderungen, wie Verdickung der Kapillarwände und erhöhte Mesangiumzellzahlen ergaben, folgerten die Autoren, dass in ihrem Modell die in dem HRS sich entwickelnde funktionelle Niereninsuffizienz auftrat (Rincon et al. 1999).

In dem Versuch von Pereira et al. bewirkt die Ligatur der Gallengänge eine ausgeprägte Leberfibrose mit Verschlechterung der Nierenfunktion. Die Werte von Kreatinin-Clearance, Serumkreatinin, Natriumausscheidung zeigten sechs Wochen nach Setzen der Ligatur eine deutliche Beeinträchtigung der Nieren ohne Veränderung des histologischen Bildes (Pereira et al. 2008).

In dem Modell von Ming et al. wurde bei lang anhaltender Thioacetamid-Applikation eine Verschlechterung der Nierenfunktion beobachtet. In dem Versuch wurde, die der Pathogenese des HRS entsprechende, Vasodilatation im Splanchnikusgebiet und ein Abfall des arteriellen Druckes festgestellt. Außerdem waren Urinfluss und Natriumausscheidung vermindert (Ming et al. 2005).

Wir entschieden uns in unserem Versuch für das zuletzt aufgeführte Modell, deshalb soll an dieser Stelle näher darauf eingegangen werden.

Thioacetamid (TAA) ist ein gängiges Lebertoxin zur Erzeugung von Leberzirrhose oder akutem Leberversagen im Tiermodell (Brodehl 1961). Um akutes Leberversagen zu induzieren, werden ein- oder mehrmals hohe Konzentrationen intraperitoneal, subkutan oder über die Schlundsonde verabreicht. Es kommt zu Schädigungen des Lebergewebes mit Nekrosen, entzündlichen Infiltrationen und starker Erhöhung der Transaminasenkonzentrationen (Giffen et al. 2002;Matsuhashi et al. 2005;Margeli et al. 2003).

Zur Induktion der Leberzirrhose zeigt sich die chronische orale Applikation von TAA als gut geeignet (Murayama et al. 2007;Haider et al. 2004;Laleman et al. 2006). Allerdings wurden bei TAA, wie auch bei anderen Lebertoxinen, große individuelle Unterschiede festgestellt. Dosen, die für das eine Tier tödlich sind, können bei einen weniger empfindlichen Tier nur leichte Leberschäden verursachen (Li et al. 2002;Perez 1983). Deshalb haben Li und seine Arbeitsgruppe ein Modell entwickelt, in dem die TAA-Dosen entsprechend der Gewichtsentwicklung der Tiere angepasst werden (Li et al. 2002). Sie haben TAA im Trinkwasser gelöst und mit einer Initialkonzentration von 0,03% an die Tiere verabreicht. In der Versuchsgruppe, bei welcher die Konzentration über die folgenden 12 Wochen nicht geändert wurde, lag die Mortalität bei 30%, und bei 25% der Tiere war nur eine leichte Leberschädigung festzustellen. In der Gruppe, in der die TAA-Konzentration ab einer bestimmten Zu- und Abnahme erhöht bzw. reduziert wurde, gab es keine Tierverluste und 90% der Tiere zeigten eine ausgeprägte makronoduläre Zirrhose.

Aufgrund dieser überzeugenden Ergebnisse haben wir uns bei unserem Tierversuch für das TAA-induzierte Zirrhosemodell mit Anpassung der Konzentrationen an die Gewichtsentwicklung entschieden.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Der Versuch wurde im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens ausgeführt. (Anzeigennummer G0163/06). Die Tierhaltung und alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für den Versuch wurden insgesamt 85 männliche Wistar unilever Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 274g von der Firma Harlan Winkelmann angefordert. Die Tiere wurden zu zweit vergesellschaftet und in Kunststoffkäfigen TypIII mit erhöhten Gitterdeckeln und Filterhauben auf Standardeinstreu für Labortiere gehalten. Im Tierstall herrschten kontrollierte Umgebungsbedingungen: 20°C Raumtemperatur, 45(±5)% Luftfeuchtigkeit und eine Lichtperiode von 8 bis 20 Uhr.

Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Ratten- und Mäuse-Alleinfuttermittel von Altromin. Mit dem Beginn der Behandlung erhielten die behandelten Tiere dieses Futter, versetzt mit dem Wirkstoff SLV329.

3.2 Versuchsdesign

Nach der Ankunft wurde den Tieren eine Eingewöhnungsphase von einer Woche gewährt. Danach wurden die ersten Blutdruck- und Pulsmessungen und der erste Stoffwechselversuch durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt:

1. Kontrolltiere
2. Tiere mit TAA-Behandlung

TAA wurde den Tieren über das Tränkwasser zugeführt. In den ersten zwei Wochen wurde TAA in der Initialkonzentration von 0,03% im Tränkwasser verabreicht. Ab der dritten Woche wurden die Konzentrationen entsprechend der individuellen Gewichtsentwicklung der Ratten angepasst. Bei einer wöchentlichen Gewichtszunahme von 25g oder mehr wurde die Konzentration um 0,015% erhöht, bei einer Gewichtsreduktion von 25g oder mehr wurde die Konzentration um 0,015% gesenkt.

Am Ende der achten Woche wurde erneut ein Stoffwechselversuch durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Tiere in acht Gruppen eingeteilt. Bei der Einordnung der Tiere in die verschiedenen Gruppen wurde darauf geachtet, dass die vier mit TAA behandelten Gruppen sich aus möglichst ähnlichen Tieren (Allgemeinzustand, Körpergewicht) zusammensetzten.

Die Gruppen waren folgende:

1. Kontrolltiere (Kontrolle, N=8)
2. Kontrolltiere mit Furosemidbehandlung (Kont.+Fur., N=8)
3. Kontrolltiere mit SLV329-Behandlung (Kont.+SLV, N=8)
4. Kontrolltiere mit Furosemid- und SLV329-Behandlung (Kont.+Fur.+SLV, N=8)
5. TAA behandelte Tiere (TAA, N=14)
6. TAA behandelte Tiere mit Furosemidbehandlung (TAA+Fur., N=13)
7. TAA behandelte Tiere mit SLV329-Behandlung (TAA+SLV, N=12)
8. TAA behandelte Tiere mit Furosemid- und SLV329-Behandlung (TAA+Fur.+SLV, N=14)

Die TAA-Gabe wurde in den entsprechenden Gruppen fortgeführt. Da aber die Gewichtsentwicklung ab diesem Punkt nicht nur von der TAA-Wirkung, sondern auch von der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329 abhängig sein konnte, wurde die Anpassung der TAA-Dosen auf die Gewichtsentwicklung eingestellt. Die individuelle TAA-Dosis der achten Woche wurde bis zur zwölften Woche beibehalten und dann einmalig bei allen TAA-behandelten Tieren um 0,015% erhöht.

Furosemid wurde dreimal die Woche in einer Konzentration von 7,5mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Der Wirkstoff SLV329 wurde von der Firma Altromin in verschiedenen Konzentrationen in das Standardfutter eingearbeitet. Die Tiere erhielten entsprechend ihrer Futteraufnahmen Futter mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen. Die angestrebte Tagesdosis war 5mg SLV329 pro kg Körpergewicht. Am Tag zehn der Behandlung und vier Wochen nach Behandlungsbeginn mit SLV329 wurde bei sechs Tieren zur Kontrolle des Wirkstoffspiegels Blut abgenommen. In der zwölften Woche fand eine weitere Blutdruckmessung statt. Am Ende der Woche 16 wurde erneut ein Stoffwechselversuch durchgeführt.

Die Tiere wurden bis zur Woche 18 weiter mit TAA behandelt und nach einer Entgiftungsphase erfolgte die Tötung durch Blutentzug unter Isofluran-Narkose. Leber, Nieren und Herz wurden entnommen, gewogen, in Formalin fixiert bzw. bei -80°C konserviert.

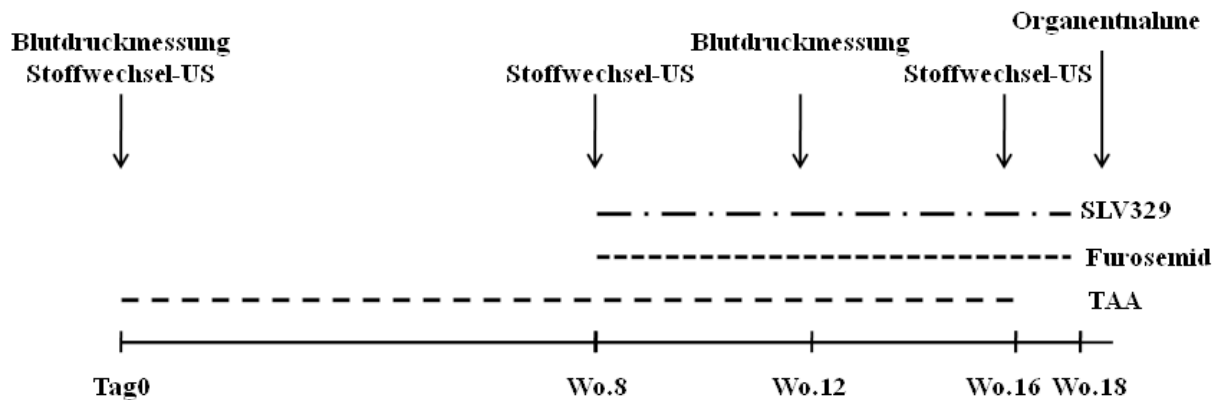


Abb.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Vor Versuchsbeginn wurde bei allen Tieren Stoffwechselversuche durchgeführt und der Blutdruck gemessen. Anschließend wurde mit der achtzehnwöchigen TAA-Gabe begonnen. Ab der achten Woche wurde zusätzlich Furosemid oder SLV329 verabreicht. In der achten Woche (noch vor dem Beginn der Furosemid- oder SLV329-Behandlungen) und in der sechzehnten Woche (nach acht Wochen Behandlung mit Furosemid oder SLV329) wurden erneut Stoffwechselversuche durchgeführt. In der zwölften Woche des Versuches wurde die Blutdruckmessung wiederholt. Am Ende des Versuches wurden die Tiere getötet und Herz, Leber und Nieren entnommen.

3.3 Materialien

Im Anhang befindet sich die Aufzählung von den in diesem Versuch verwendeten Geräten, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen und Software.

3.3.1 Der Wirkstoff SLV329

Der Wirkstoff SLV329 ist ein selektiver, kompetitiver A_1R -Antagonist mit einem pK_i -Wert von 9,2 (Solvay Pharmaceuticals 2005). Die Selektivität für die anderen Adenosinrezeptoren ist mindestens hundertfach schwächer und es wurde keine bedeutende Affinität gegenüber anderen humanen Rezeptoren und Ionenkanälen festgestellt.

Die Bioverfügbarkeit bei Ratten nach oraler Verabreichung beträgt 82%, die nicht plasmaproteingebundene Fraktion beträgt bei Menschen 0,45. SLV329 wird von den Hepatozyten glukuronidiert oder sulfatiert und danach biliär ausgeschieden. Die Exkretion bei Ratten beträgt 24 Stunden nach einer einzelnen Dosis 90%. Der No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) liegt bei Ratten bei 40 mg/kg/d oraler Dosis über vier Wochen. Nach einer einmonatigen Behandlung mit 160 mg/kg/d SLV329 wurden bei Ratten tubulo-interstitielle Nephritiden und kristalline Ablagerungen in den Nieren festgestellt.

SLV329 wird eine für A₁R-Antagonisten typische diuretische Wirkung zugeschrieben. Bei anästhesierten Ratten führt SLV329 dosisabhängig zur Erhöhung der Urinproduktion (bis zum 3,4fachen des Basiswertes) und zur Verstärkung der Natriurese (bis zu 8,9fachen des Basiswertes) und der Chloridausscheidung (bis zu 3,4fachen des Basiswertes), ohne dabei die GFR zu mindern.

SLV329 befindet sich in der Phase der präklinischen Untersuchungen und ist bereits ein „Clinical Candidate“, das bedeutet, dass es für Phase I der klinischen Studien verwendbar ist. Für diesen Versuch wurde der Wirkstoff SLV329 von der Firma Altromin in das Standardfutter eingearbeitet. Die Stabilität des Wirkstoffes wurde nach dem Pelletieren und Lagerung von der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover untersucht.

3.3.2 Antikörper

Antikörper	Firma
Anti-A ₁ R - A268	Sigma
Anti-A _{2A} R – AB1559	Millipore
Anti-A _{2B} R - AB1589P	Millipore
Anti-A ₃ R – AB 1590P	Millipore
Anti-Aktin – A5060	Sigma
G anti-rabbit Ig-G-HRP – sc-2054	Santa Cruz Biotechnology

3.4 Methoden

3.4.1 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Mit Hilfe eines automatischen, nicht-invasiven Messsystems wurde vor dem Versuchsbeginn und in der zwölften Versuchswoche der systolische Blutdruck der Tiere gemessen.

Die Ratten wurden vor der eigentlichen Messung dreimal mit dem Verfahren konfrontiert, um sich an dieses gewöhnen zu können. Die Untersuchung fand in einem ruhigen Raum statt und durch den sanften Umgang wurde versucht, die Aufregung der Tiere möglichst gering zu halten.

Für die Messung wurden die Tiere in eine spezielle Plexiglasröhre (Restrainer) mit einer kleinen Öffnung an der Rückwand gebracht, aus welcher der Schwanz herausgeführt wurde. Um eine Hyperämisierung der Schwanzarterien zu erreichen, wurden die Tiere mittels einer Rotlichtlampe ca. 10 Minuten erwärmt. Danach wurde die aufblasbare Druckmanschette an die Schwanzwurzel angelegt und ca. 1,5cm distal davon der Pulsabnehmer.

Die Manschette besteht aus einem kurzen Kunststoffrohr, an dem eine weiche Gummimembran befestigt ist. Ein Schlauch verbindet die Manschette mit einem Druckgenerator, der diese mit einer Geschwindigkeit von 5mmHg/sek aufbläst. Durch die Druckerhöhung in der Manschette werden die Schwanzarterien gestaut. Nach dem Erreichen von einem Druck von 200mmHg wird der Druck langsam wieder abgelassen. Der Puls wird distal der Manschette von dem Pulsabnehmer erfasst. Wenn der Druck in der Manschette den Druck in den Arterien übersteigt, werden die Arterien okkludiert und der Pulssensor erkennt keine Pulsation mehr. Während des langsamen Druckabfalls in der Manschette setzen die Pulswellen wieder ein. Mit Hilfe der Powerlab Software[®] werden die Druck- und Pulswellen graphisch dargestellt. Anhand dieser Graphik wird der in der Manschette herrschende Druck im Moment des Wiedereinsetzen der Pulswellen abgelesen und als systolischer Blutdruck registriert.

Es fanden drei Messungen pro Tier und Termin statt. Der Mittelwert der drei Messungen wurde als systolischer Blutdruck für das jeweilige Tier zu dem jeweiligen Zeitpunkt gewertet.

3.4.2 Untersuchung im Stoffwechselkäfig

Zur Bestimmung der Nierenfunktion wurden die Tiere vor dem Versuch, in der achten und in der sechzehnten Woche in Stoffwechselkäfige gesetzt. Diese Käfige sind so konstruiert, dass Harn und Kot separat in entsprechenden Röhrchen aufgefangen werden können.

Vor und nach dem 24-stündigen Verbleib in den Stoffwechselkäfigen wurden die Tiere gewogen. In dieser Zeit wurde den Ratten kein TAA verabreicht, um die Kontamination der

Stoffwechselfäufige möglichst gering zu halten. Die aufgenommenen Wasser- und Futtermengen und die Menge des abgesetzten Harns wurden protokolliert. Unmittelbar nach dem Stoffwechselfersuch wurde eine Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Die Blutproben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach mit einer Geschwindigkeit von 3500 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen Seren und der während des Stoffwechselfersuchs gesammelte Urin wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Die Messungen der unten genannten Parameter fanden in der Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik für Endokrinologie der Charité, Campus Benjamin Franklin statt.

Serumuntersuchung:

Die Seren wurden mit Hilfe eines Autoanalyzers (Cobas Integra 800) auf die folgenden Parameter untersucht: Asparat-Aminotransferase (AST = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GOT), Alanin-Aminotransferase (ALT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GPT), Gesamt-Bilirubin, Albumin, Kreatinin, Glukose, Cholinesterase, α -Amylase, Lipase und Kreatinkinase.

Urinuntersuchung:

Die Urinproben wurden mit dem oben genannten Autoanalyzer auf die folgenden Parameter untersucht: Kreatinin, Albumin, Kalium und Natrium.

Ermittlung der Glomerulären Filtrationsrate:

Die GFR ist das Gesamtvolumen des Primärharns, das in einer definierten Zeiteinheit von allen Glomeruli beider Nieren zusammen gefiltert wird. Diese wird ermittelt, indem man den Quotienten aus Kreatininkonzentration im Urin und Serum-Kreatininkonzentration mit dem Urinfluss in ml/Min multipliziert.

$$GFR = C_{ur.crea} * V_{Ham} / C_{ser.crea}$$

C für Konzentration

V für Urinflussvolumen pro Zeiteinheit

3.4.3 SLV329-Serumspiegelbestimmung

Um zu überprüfen, ob die Substanz SLV329 therapeutisch wirksame Konzentration im Blut der Tiere erreichte, wurde bei einer Stichprobe von sechs behandelten Tieren zehn Tage und vier Wochen nach Behandlungsbeginn Blut entnommen. Die aus den Blutproben gewonnenen Seren wurden von der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover untersucht. Die Proben wurden mittels Flüssigchromatografie aufgetrennt, um danach die SLV329-Fraktion mittels Massenspektrometrie zu quantifizieren.

3.4.4 Organentnahme

Unmittelbar nach dem Töten wurden Herz, Leber und Nieren entnommen und gewogen. Die Nieren wurden durch einen longitudinalen Schnitt halbiert, aus dem rechten Lappen der Leber wurden durch drei transversale Schnitte zwei ca. 1cm dicke Scheiben abgeschnitten. Die Nierenhälften und eine Leberscheibe wurden dann in Einbettkassetten gelegt und zum Fixieren in eine 4%ige Formalinlösung überführt. Aus jedem Organ wurde ein Teil in ein Reaktionsgefäß verbracht und sofort mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Kühlung erfolgte danach bei -80°C.

3.4.5 Histologische Methoden

3.4.5.1 Formaldehyd/Alkohol-Fixierung

Prinzip:

Durch die Fixierung in Formalin werden Autolyse und Heterolyse der Organe verhindert. Formaldehyd bindet an unterschiedliche Teile der Proteinmoleküle und bildet dadurch Halbacetale mit freien Hydroxymethylgruppen. Diese Gruppen bilden dann Querverbindungen mit anderen passenden Gruppen der Proteine. Dieses Proteinnetz wird durch Methylenbrücken stabilisiert und verleiht dem Gewebe genügend Festigkeit, um die nachfolgenden Einbettungsprozesse zu überstehen. Mit der anschließenden Überführung in Alkohol wird zusätzlich das intrazelluläre Wasser verdrängt und dadurch verhindert, dass sich Keime ansiedeln.

Durchführung:

Die Organe wurden 24 Stunden in eine 4%ige Formalin/PBS-Lösung und anschließend mindestens für 24 Stunden in eine 70%ige Ethanol-Lösung gelegt.

3.4.5.2 Paraffineinbettung

Prinzip:

Bei der Paraffineinbettung werden die fixierten Präparate zunächst mit aufsteigenden Konzentrationen von Alkohol entwässert und in einem Intermedium (im unseren Fall Aceton) eingelegt. Danach überführt man die Präparate in eine gesättigte Paraffinlösung. Das Aceton verdunstet, die Paraffin-Konzentration steigt bis auf nahezu 100 %. Anschließend werden die Präparate mit heißem Paraffin eingeblockt. Nach dem Auskühlen erhält man schnittfeste Paraffinblöcke, in welchem die Präparate eingebettet sind.

Durchführung:

Die Paraffineinbettung erfolgte automatisch (Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel 1000, Thermo Electron Corporation). Anschließend wurden die Organe am Paraffin-Automaten in Histo-Ausgussformen eingebettet. Auf der angeschlossenen Kühlplatte wurden die fertigen Proben ausgehärtet und konnten nach kurzer Zeit am Mikrotom weiterverarbeitet werden.

3.4.5.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Am Mikrotom wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und nach Strecken in einem 45°C warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen und auf der Wärmeplatte getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger für 30 Minuten in einen 60°C warmen Wärmeschrank gestellt, um eine Fixierung der Schnitte auf den Objektträgern zu erlangen.

3.4.5.4 Färbungen

Die Leberschnitte wurden mit der Sirius-Rot-Färbung, die Nierenschnitte mit Sirius-Rot-, Elastica van Gieson- und Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS) gefärbt. Alle Färbungen lassen sich grundsätzlich in die folgenden vier Schritte einteilen:

Entparaffinieren und Bewässern:

Paraffin wird durch zwei fünfminütige Xylolbäder aus den Strukturen des Schnittes gelöst. Die folgende absteigende Alkoholreihe (jeweils zwei Minuten in 100%igem, 95%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol) dient zum langsamen Bewässern der Schnitte, um sie für die wasserlöslichen Farbstoffe zugänglich zu machen.

Einsatz der Färbelösung:

Mit Hilfe der unterschiedlichen Färbelösungen werden unterschiedliche Strukturen dargestellt.

Entwässern:

Die gefärbten Schnitte werden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils kurz in 70%igem und 80%igem Ethanol und jeweils zwei Minuten in 95%igem und 100%igem Ethanol) entwässert und anschließend in Xylol als Intermedium zwischen Alkoholbehandlung und Eindecken aufbewahrt.

Eindecken:

Anschließend werden alle Schnitte mit Deckglas und DePeX eingedeckt.

Die Protokolle der einzelnen Färbungen befinden sich im Anhang.

3.4.5.4.1 Sirius-Rot-Färbung

Prinzip:

Sirius Rot ist ein anionischer Farbstoff, dessen NaSO_3 -Seitengruppen sich mit den basischen Gruppen von Kollagen verbinden und sie so rot anfärben. Das restliche Gewebe wird gelb angefärbt. Mit dieser Färbung kann das Ausmaß der interstitiellen Fibrose in Leber und Niere detektiert werden.

Auswertung:

Die Sirius Rot gefärbten Schnitte wurden mit einem Olympus BH2 Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung untersucht. Zur morphometrischen Analyse wurden pro Nierenpräparat 30 Ausschnitte und pro Leberpräparat so viele Ausschnitte wie möglich mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Ausschnitte sollten keine Gefäße und bei den Nieren keine Glomeruli enthalten und sollten frei von Artefakten sein. Zur Bestimmung des Kollagenanteils pro Bildausschnitt wurden die Aufnahmen in dem Programm ImageJ in 8-Bit-Grauwertbilder konvertiert. Mit Hilfe des Befehls Image>Adjust>Threshold wurde der Schwellenwert festgelegt, bis zu dem ein Pixel anhand der Farbtiefe als Signal (Kollagen) gewertet wird. Dann wurde die Signalfläche (Analyze>Set Measurements>Area, Analyze>Measure) in Pixel ermittelt. Die interstitielle Fibrose wurde als prozentualer Anteil der Sirius Rot positiven Fläche an der Gesamtfläche des Bildes angegeben. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Analyse aller Ausschnitte gebildet.

3.4.5.4.2 Elastica van Gieson-Färbung

Prinzip:

Diese Färbung dient zur Beurteilung der Arterien.

Durch das basische Resorcin-Fuchsin werden die sauren, aus Elastomuzin bestehenden Hüllschichten der elastischen Fasern dunkelviolett angefärbt. Die Kerne werden durch Eisenhämatoxylin blau, das Zytoplasma durch die feindispers gelösten Pikrinsäure rot und Bindegewebestrukturen durch den grobdispers gelösten Säurefuchsin dunkelrot angefärbt.

Auswertung:

Die quer angeschnittenen Arterien in den Elastica van Gieson gefärbten Schnitte wurden mit einem Mikroskop aufgesucht und mit einer Digitalkamera bei 20fachen Vergrößerung fotografiert. In dem Programm ImageJ wurden durch Umfahrung der äußeren und inneren Begrenzung der Media der Umfang von Innen- und Außenbegrenzung der Media in Pixel vermessen. Aus diesen Daten wurden die Fläche der Media und die Fläche des Gefäßlumens errechnet.

$$A_{\text{Media+Lumen}} = \pi * r_{\text{Media außen}}^2 = \pi * (U_{\text{Media außen}}/2)^2$$

$$A_{\text{Lumen}} = \pi * r_{\text{Media innen}}^2 = \pi * (U_{\text{Media innen}}/2)^2$$

$$A_{\text{Media}} = A_{\text{Media+Lumen}} - A_{\text{Lumen}}$$

A für Fläche

r für Radius

U für Umfang

Anschließend wurde die Media-Lumen-Ratio der Gefäße berechnet.

$$R_{\text{Media/Lumen}} = A_{\text{Media}}/A_{\text{Lumen}}$$

R für Ratio

3.4.5.4.3 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS)

Prinzip:

Mit der PAS-Färbung werden kohlenhydrathaltige Komponenten, zum Beispiel Polysaccharide, Glykoproteine und Glykolipide dargestellt. Durch die Periodsäure werden die Glycolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert und erhalten somit eine reduzierende Wirkung. Die in dem Schiff'sche Reagenz enthaltene fuchschweifelige Säure bindet sich an die

Aldehygruppen und bildet einen stabilen Farbkomplex. PAS-positive Materialien stellen sich rosa bis rot dar, durch die Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Zellkerne blauviolett angefärbt.

Auswertung:

Die Glomerulosklerose wurde als Vorhandensein von PAS-positivem Material im Glomerulum definiert. Es wurden alle Glomeruli eines Schnittes mit Hilfe der folgenden semiquantitativen Scores beurteilt:

- 1 – weniger als 25% PAS-positiver Anteil von der gesamten Glomerulusfläche
- 2 – PAS-positive Fläche zwischen 25 und 50%
- 3 – PAS-positive Fläche zwischen 50 und 75%
- 4 – PAS-positive Fläche zwischen 75 und 100%.

Aus den sämtlichen Scores eines Schnittes wurde der Mittelwert errechnet, der dann als Glomerulosklerose-Status des Organs gewertet wurde. Die Beurteilung wurde von zwei unabhängigen, verblindeten Untersuchern durchgeführt.

3.4.6 Western-Blot

Mit der Western-Blot-Methode wurden die relativen Mengen von A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R und A₃R in Leber- und Nierengewebe ermittelt. Die Evaluierung der Methode basierte auf dem von Jackson et al. beschriebenen Verfahren (Jackson et al. 2002).

Prinzip:

Beim Western-Blot-Verfahren werden zunächst die Proteine anhand ihrer Größe durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend auf eine Trägermembran übertragen und mit immunochemischen Methoden detektiert (Towbin et al. 1979). Eine parallel durchgeführte Amplifikation des Housekeeping-Proteins β -Aktin ermöglicht eine semiquantitative Analyse der Rezeptorexpression und so den Vergleich zwischen den Gruppen.

Durchführung:

Herstellung von Gewebemogenaten:

Die Leber- und Nierenproben (bestehend aus Nierenmark und -rinde) wurden unter Flüssigstickstoff pulverisiert und dann in Lysepuffer überführt. Nach Durchmischen und Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurden sie mit 13000U/min bei

20°C über 45 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und weiterverwendet und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz:

Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bindet an Proteine und verändert dabei seine Farbe. Diese Änderung kann bei einer Extinktion von 595nm gemessen werden. Durch die Verwendung einer Eichreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen kann man mittels einer Eichkurve die Proteinkonzentrationen in den Proben ermitteln.

Für die Proteinbestimmung wurden 40µl Probe und 40µl Bradford-Reagenz in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde die Extinktion bei 595nm gemessen. Aus den Messwerten wurde dann mit Hilfe der Eichreihe die Konzentration der jeweiligen Probe errechnet.

Nach Erhalt der Proteinkonzentration wurden die Proben einheitlich mit Lysepuffer auf eine Proteinkonzentration von 5µg/µl verdünnt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine an im Überschuss zugesetztes Natriumdodecylsulfat und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt.

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend in 10%igem Trenngel aufgetrennt. Es wurden dabei MIDI-vertikale Doppel-Elektrophoresekammern verwendet.

Die Proben wurden mit 4fach konzentriertem Ladepuffer, Rotiload und Wasser versetzt und über 1 Minute bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung bei Raumtemperatur wurden 12µl der auf 1,9µg/µl konzentrierten Proben auf das Gel aufgetragen. Auf jedes Gel wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe aufgetragen. Dazu wurde ein Gemisch aus allen Proben gefertigt und dieses dann auf Konzentrationen 2,5-; 3,75-; 5-; 6,25- und 7,5µg/µl verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde ebenfalls wie für die Proben beschrieben auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde mit 80V für ca. 30 Minuten begonnen, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Die weitere Elektrophorese konnte mit 110V fortgesetzt werden bis die Farbstofffront die Enden der Kammern erreichte. Als Molekularmassenmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekularmassengrößen (PageRuler Proteinleader).

Proteintransfer durch Western-Blot:

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Semi-Dry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran geblotet. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffer-System verwendet, bei dem die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier zwischen zwei Graphitplatten als Pufferreservoir dienen. Zwischen diesen Graphitplatten wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von $1,5\text{mA}/\text{cm}^2$ für eine Stunde aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten durch Ponceau S angefärbt und anschließend mit TBST-Puffer wieder entfärbt.

Detektion mit spezifischen Antikörpern:

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5%-Milch-TBS-Tween-Lösung inkubiert. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen in 50ml Zentrifugenröhrchen eingerollt und rotierend über Nacht mit dem Primärantikörper mit der folgenden Konzentration inkubiert.

$A_1R - 0,025\%$, $A_{2A}R - 0,1\%$, $A_{2B}R - 0,1\%$, $A_3R - 0,2\%$, Aktin – $0,0025\%$

Im Anschluss wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit TBS-Tween gewaschen, um den nichtgebundenen Überschuss an Primärantikörpern zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper in einer Konzentration von $0,0001\%$ für eine Stunde hinzugegeben.

Erneut wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nun durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detektionssystems (ECL). Gleiche Volumina der Detektionsreagenzien 1 und 2 wurden dafür gemischt und auf die Membran gegeben ($0,08\text{ ml}/\text{cm}^2$). Hierbei wandelt die am sekundären Antikörper gebundene Peroxidase Luminol in seine oxidierte Form um, wobei es zu einer Lichtemission kommt. Nach 2 Minuten wurde die Flüssigkeit abgenommen und anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien gelegt. Die Exposition der Filme erfolgte je nach Bedarf für 10 Sekunden bis zu 15 Minuten auf ECL Hyperfilm. Nach der Entwicklung des Filmes wurde dieser eingescannt und die optische Dichte der Banden mit Hilfe des Alpha-Ease Messprogramms gemessen.

Auswertung:

Aus der Verdünnungsreihe wurde für jedes detektierte Protein eine Eichkurve für die jeweilige Membran erstellt. Mit Hilfe dieser wurde für jede Probe die relative Konzentration der Rezeptoren und Aktin ermittelt und danach der Quotient aus Rezeptor zu Aktin gebildet. Somit konnte man zwar nicht die reale Rezeptormenge bestimmen, aber die einzelnen Banden miteinander vergleichen und relative Änderungen der Rezeptorkonzentration ermitteln.

3.4.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 16.0 für Windows durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-H-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen untersucht. Wenn dieser Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, wurden die Kontrollgruppen und die TAA-behandelten Gruppen untereinander mit den Kruskal-Wallis-H-Tests verglichen. Zusätzlich wurden die TAA-behandelten Gruppen mit der dazugehörigen Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Wenn innerhalb der Kontroll- bzw. TAA-behandelten Gruppen mit dem genannten Test signifikante Unterschiede ermittelt wurden, wurden die einzelnen Gruppen paarweise mit dem Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Die Nullhypothese dieses Tests besagt, dass es keinen Unterschied zwischen der Verteilung der beiden Gruppen gibt. Bei einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wird diese Nullhypothese abgelehnt und die Verteilung der beiden Gruppen als signifikant unterschiedlich gewertet. Da es sich bei dieser Studie um ein Pilotprojekt handelte, wurde trotz der mehrfachen Tests auf eine alpha-Korrektur verzichtet, um nicht frühzeitig möglicherweise interessante Fragestellungen auszuschließen.

Die Sterbewahrscheinlichkeit der Tiere der verschiedenen Gruppen wurde mit den Kaplan-Meier-Verfahren geschätzt und mittels Logrank-Tests verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p kleiner oder gleich 0,05 wurden die Unterschiede als signifikant angesehen.

Die Körpergewichte zum Anfang und Ende des Versuches und die Gewichtsunterschiede vom Anfang des Versuches bis zu Beginn der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329 in der achten Woche, und die Gewichtsunterschiede von diesem Zeitpunkt bis zu Woche 18 wurden miteinander verglichen.

Zu Beginn des Versuches gab es keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tab.1).

Die Verabreichung von TAA führte zu einer Abnahme des Körpergewichtes, wohingegen die Kontrollgruppen eine stetige Zunahme zeigten (siehe Abb.3). Innerhalb der Kontrollgruppen und innerhalb der TAA-behandelten Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung bis zum Anfang der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329 in der achten Woche.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Gewicht Tag 0 (g)	358 ± 17	344 ± 28	356 ± 31	351 ± 17
Zunahme bis Woche 8 (g)	82 ± 21	89 ± 14	82 ± 17	89 ± 22
Zunahme Woche 8-16 (g)	57 ± 9#	51 ± 11#	75 ± 6	63 ± 17
Gewicht Woche 18 (g)	471 ± 40	455 ± 31	490 ± 51	476 ± 42
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9-14	9-13	10-12	10-14
Gewicht Tag 0 (g)	351 ± 23	354 ± 23	352 ± 18	357 ± 26
Zunahme bis Woche 8 (g)	-15 ± 20*	-9 ± 19*	-14 ± 14*	0 ± 20*
Zunahme Woche 8-16 (g)	-47 ± 40*§	-110 ± 89*	-17 ± 28*§	-84 ± 36*
Gewicht Woche 18 (g)	278 ± 37*	241 ± 36*	299 ± 34*§	250 ± 38*

Tab.1: Körpergewichte am Anfang des Versuches, Gewichtszunahme bis zur achten Woche (vor dem Stoffwechselversuch) und zwischen Woche acht (nach dem Stoffwechselversuch) und sechzehn und Gewichte am Ende des Versuches.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

*: $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe mit gleicher Behandlung;

#: $p < 0,01$ vs. Kontrolle + SLV;

§: $p < 0,05$ vs. TAA+Fur. und TAA+Fur.+ SLV;

§: $p < 0,01$ vs. TAA+Fur. und TAA+Fur.+ SLV

Die Behandlung mit SLV329 führte bei den Kontrollgruppen zu einer signifikant höheren Gewichtszunahme verglichen mit der unbehandelten Gruppe bzw. den mit Furosemid behandelten Kontrollgruppen. Dennoch bestanden am Ende des Versuches keine signifikanten Unterschiede der Körpergewichte zwischen den Kontrollgruppen.

Im Vergleich zur TAA-Gruppe und zur TAA+SLV-Gruppe hatten die TAA+Fur.-Gruppe und die TAA+Fur.+SLV-Gruppe eine signifikant größere Gewichtsabnahme. Am Ende des

Versuches hatten die TAA+SLV Tiere signifikant höhere Körpergewichte als die TAA+Fur.- bzw. TAA+Fur.+SLV-Tiere.

4.2 Organgewichte und makroskopische Beurteilung der Organe

Die absoluten Organgewichte von Leber, Nieren und Herz zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tab. 2). Die auf das Körpergewicht bezogenen Lebergewichte waren bei den TAA-behandelten Gruppen signifikant höher verglichen mit den Kontrollgruppen. Wegen der ausgeprägten Körpergewichtsreduktion durch TAA wurde auf den Vergleich von relativen Herz- und Nierengewichte zwischen Kontroll- und TAA-behandelten Tieren verzichtet.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Lebergewicht (g)	12,5 ± 1,3	11,9 ± 1,4	13,2 ± 2	12,6 ± 1,8
Nierengewicht (g)	3 ± 0,2	3 ± 0,4	3,2 ± 0,4	3 ± 0,2
Herzgewicht (g)	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0
rel. Lebergewicht (g/100g)	2,76 ± 0,1	2,72 ± 0,17	2,71 ± 0,37	2,78 ± 0,22
rel. Nierengewicht (g/100g)	0,66 ± 0,05	0,73 ± 0,05	0,67 ± 0,14	0,66 ± 0,03
rel. Herzgewicht (g/100g)	0,25 ± 0,1	0,3 ± 0,01	0,27 ± 0,13	0,26 ± 0,11
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9	6	10	10
Lebergewicht (g)	13,9 ± 1,4	13,4 ± 1,1	14,1 ± 1	13,4 ± 1,3
Nierengewicht (g)	3,1 ± 0,3	3 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,1
Herzgewicht (g)	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
rel. Lebergewicht (g/100g)	3,58 ± 0,37*	3,75 ± 0,35*	3,43 ± 0,38*	3,6 ± 0,22*
rel. Nierengewicht (g/100g)	0,79 ± 0,08	0,84 ± 0,07	0,7 ± 0,11	0,77 ± 0,06
rel. Herzgewicht (g/100g)	0,33 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,26 ± 0,14	0,34 ± 0,02

Tab.2 Absolute und relative Organgewichte

Die relativen Organgewichte ergaben sich aus dem Bezug der absoluten Organgewichte auf die Körpergewichte bei der Organentnahme.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

*: $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe

Makroskopisch konnten an den Nieren und Herzen keine Veränderungen festgestellt werden. Die Lebern von den TAA-behandelten Tieren wiesen zum größten Teil 2 bis 4mm große, derbe, knotige Veränderungen auf. Die Lebern ohne diese Veränderungen hatten eine feste Konsistenz mit einer feinhöckrigen Oberfläche. Bei keinem der Tiere konnte ein Aszites festgestellt werden.

Die Sichtung der anderen Bauchorgane, sowie Lunge und Gehirn ergab keinen besonderen Befund.

4.3 Futtermittelaufnahme

Die auf das Körpergewicht der Tiere bezogene Futtermittelaufnahme war bei den TAA+Fur., TAA+SLV- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen bis zur achten Woche signifikant höher als bei den Kontrolltieren mit der gleichen Behandlung (siehe Tab.3). Die Futtermittelaufnahme war bei der TAA+Fur.-Gruppe ab der neunten Woche bis zum Versuchsende niedriger als bei der Kont.+Fur.-Gruppe.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
rel. Futtermittelaufnahme (g/kg KG/Tag)- bis Woche 8	58 ± 6	56 ± 6	54 ± 4	60 ± 16
rel. Futtermittelaufnahme (g/kg KG/Tag) - Woche 9-18	50 ± 6	53 ± 3	53 ± 3	51 ± 4
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9-14	9-13	10-12	10-14
rel. Futtermittelaufnahme (g/kg KG/Tag)- bis Woche 8	66 ± 18	71 ± 12**	77 ± 20**	77 ± 24
rel. Futtermittelaufnahme (g/kg KG/Tag) - Woche 9-18	49 ± 7	42 ± 3**	51 ± 7	46 ± 8#

Tab.3: Durchschnittliche relative Futtermittelaufnahmen pro Tag bis zur achten Woche und ab der neunten Woche bis zum Versuchsende.

Die wöchentlich gemessenen Futtermittelmengen wurden auf die wöchentlich gemessene Körpergewichte der Tiere bezogen, von Versuchsanfang bis zur achten Woche bzw. von der achten Woche bis zu Versuchsende gemittelt und auf die tägliche Futtermittelaufnahme heruntergerechnet.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

** : $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe;

: $p < 0,05$ vs. TAA+SLV

4.4 Wasseraufnahme

Die TAA-Behandlung führte sowohl bis zur achten Woche als auch danach zu einer Minderung der Wasseraufnahme. Die Unterschiede zu den Kontrollgruppen waren signifikant von der achten Woche bis zum Versuchsende außer bei der TAA+Fur.+SLV-Gruppe (siehe Abb.4).

Die Behandlung der Kontrollgruppen mit Furosemid oder mit Furosemid und SLV329 führte zu einem signifikanten Anstieg der Wasseraufnahme dieser Tiere.

Innerhalb der TAA-behandelten Gruppen führten sowohl die Behandlung mit Furosemid als auch mit SLV329 zu einer Erhöhung der Wasseraufnahme. Die kombinierte Behandlung mit beiden Stoffen erhöhte die Wasseraufnahme nochmals.

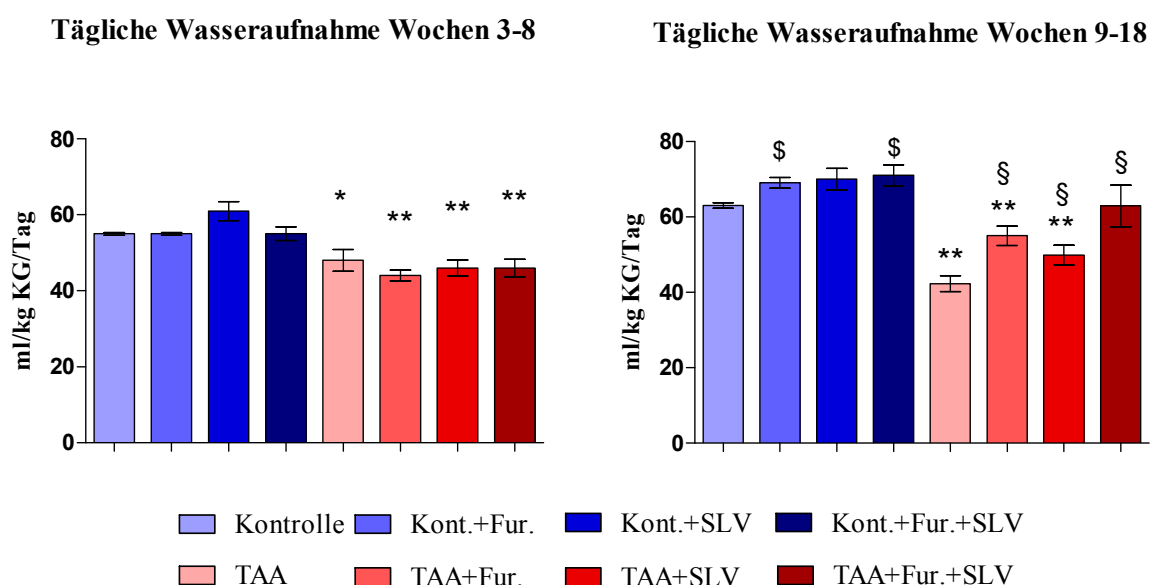


Abb.4: Durchschnittliche tägliche Wasseraufnahme in ml pro kg Körpergewicht. Die wöchentlich gemessene Wasseraufnahme wurde auf die wöchentlich gemessenen Körpergewichte der Tiere bezogen, von Versuchsbeginn bis zur achten Woche bzw. von der achten Woche bis zum Versuchsende gemittelt und auf die tägliche Wasseraufnahme heruntergerechnet.

Die TAA-Gabe bewirkte eine Minderung der Trinkmenge. Die Behandlung mit Furosemid oder SLV329 oder die Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen, steigerte die durchschnittliche tägliche Wasseraufnahme sowohl bei den Kontroll- als auch bei den TAA-Tieren.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

\$: $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle;

*** : $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;*

**: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;*

§: $p < 0,05$ vs. TAA

4.5 Ergebnisse der Serumuntersuchungen

4.5.1 Serumparameter zu Beginn des Versuches

Die Serumuntersuchung vor dem Beginn des Versuches zeigt keine relevanten Unterschiede der untersuchten Parameter zwischen den Gruppen (siehe Tab. 4). Jedoch hatten im Vergleich zu den künftigen Kontrollgruppen, die künftigen TAA- und TAA-Fur.-Tiere signifikant höhere Serum-Kreatininwerte und die TAA-Fur.+SLV-Gruppe eine signifikant niedrigere Kreatinkinase-Aktivität.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,87 \pm 0,35	2,08 \pm 0,57	1,71 \pm 0,54	2,46 \pm 1,21
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,55 \pm 0,25	0,48 \pm 0,19	0,53 \pm 0,17	0,54 \pm 0,13
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	2,4 \pm 1,8	1,4 \pm 1,3	2 \pm 1,7	2,2 \pm 1,4
Albumin (g/l)	29 \pm 1	29 \pm 1	29 \pm 2	30 \pm 1
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,97 \pm 0,34	1,78 \pm 0,41	1,95 \pm 0,29	1,95 \pm 0,47
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	49 \pm 6	46 \pm 6	49 \pm 7	47 \pm 5
Glukose (mmol/l)	5 \pm 1,2	4,5 \pm 0,9	4,6 \pm 1,3	5 \pm 0,8
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	37,4 \pm 5	35,3 \pm 3,3	39,1 \pm 10,9	35,3 \pm 4,2
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02	0,06 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	8 \pm 3,6	13,6 \pm 6,8	9,8 \pm 3,9	22,3 \pm 16,5
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	14	13	12	14
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,81 \pm 0,47	2,53 \pm 1,09	2,14 \pm 0,94	1,71 \pm 0,43
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,46 \pm 0,17	0,52 \pm 0,19	0,47 \pm 0,11	0,46 \pm 0,19
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	0,8 \pm 0,9	1,6 \pm 1,4	1,3 \pm 0,9	1,4 \pm 1,4
Albumin (g/l)	29 \pm 1	30 \pm 1	30 \pm 1	30 \pm 1
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	2,38 \pm 0,44	2,33 \pm 0,69	2,04 \pm 0,64	2,17 \pm 0,55
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	57 \pm 3*	53 \pm 5*	53 \pm 7	52 \pm 6
Glukose (mmol/l)	4,5 \pm 0,6	4,8 \pm 0,3	4,7 \pm 0,6	4,7 \pm 0,6
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	32,4 \pm 6,8	30,8 \pm 5,2	29,6 \pm 5,6	32,2 \pm 6,5
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,05 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,04	0,07 \pm 0,02
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	9,8 \pm 5,5	9,7 \pm 5,3	22,2 \pm 17,9	6,9 \pm 2,4*

Tab.4: Blutwerte zu Beginn des Versuches.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

*: $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe

4.5.2 Serumparameter in der achten Woche des Versuches

Zum Zeitpunkt des zweiten Stoffwechselfersuches, also nach achtwöchiger TAA-Gabe und vor dem Beginn der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329 gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gesamt-Bilirubin-, Cholinesterase-, Amylase- und Glukosekonzentrationen (siehe Tab. 5).

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,8 \pm 0,37	2,04 \pm 0,5	1,84 \pm 0,23	1,81 \pm 0,42
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,44 \pm 0,17	0,54 \pm 0,11	0,49 \pm 0,17	0,46 \pm 0,14
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	1,3 \pm 0,5	1,2 \pm 0,5	1,4 \pm 0,7	1,1 \pm 0,4
Albumin (g/l)	31 \pm 1	32 \pm 1	31 \pm 1	31 \pm 1
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,99 \pm 0,63	1,98 \pm 0,54	1,8 \pm 0,46	2,05 \pm 0,62
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	52 \pm 5	54 \pm 7	54 \pm 8	56 \pm 5
Glukose (mmol/l)	5,1 \pm 0,9	5,7 \pm 0,9#	4,3 \pm 0,6	5,4 \pm 0,7#
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	38,6 \pm 4,3	37,6 \pm 2,7	36 \pm 7,5	36 \pm 6,5
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	6,3 \pm 2,2	6,5 \pm 3,8	8 \pm 1,8	6,8 \pm 3,2
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	14	13	12	14
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	2,46 \pm 1,13	1,81 \pm 0,53	2,3 \pm 0,95	1,78 \pm 0,78
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,47 \pm 0,11	0,4 \pm 0,07	0,46 \pm 0,14	0,39 \pm 0,13
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	6,9 \pm 1,7**	5,9 \pm 3**	5 \pm 2,2*§	4,7 \pm 1,7**§
Albumin (g/l)	31 \pm 2	32 \pm 2	31 \pm 2	32 \pm 2
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	4,45 \pm 1,19**	3,85 \pm 1,37**	3,86 \pm 1,19*	3,85 \pm 1,31**
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	55 \pm 8	52 \pm 6	49 \pm 5	53 \pm 6
Glukose (mmol/l)	4,6 \pm 0,4	4,3 \pm 0,6**	4,6 \pm 0,6	4,5 \pm 0,8*
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	30,5 \pm 4,8**§	31,7 \pm 4,1**§	31,8 \pm 4,1	34,4 \pm 2,6
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	10 \pm 7,2	6,9 \pm 3,1	26,7 \pm 58	6,2 \pm 3,1

Tab.5: Blutwerte nach acht Wochen TAA-Gabe, vor dem Beginn der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

** $: p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

* $: p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

$: p < 0,05$ vs. künftigen Kont.+SLV-Gruppe;

§ $: p < 0,05$ vs. künftigen TAA-Gruppe;

§ $: p < 0,05$ vs. künftigen TAA+Fur.+SLV- Gruppe

Unter den Kontrollgruppen hatte die künftige Kont.+SLV-Gruppe niedrigere Glukoselevel verglichen mit den künftigen Kont.+Fur.- und Kont.+Fur.+SLV-Gruppen.

Bei allen TAA-behandelten Gruppen wurde eine signifikante Bilirubin-Konzentrationserhöhung und Cholinesterase-Aktivitätssteigerung gemessen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die Amylaseaktivität war signifikant vermindert bei der künftigen TAA+Fur.-Gruppe und die Glukosekonzentration bei der künftigen TAA+Fur. und TAA+Fur.+SLV-Gruppe verglichen mit den Kontrollgruppen.

Unter den TAA-behandelten Gruppen hatte die künftig unbehandelte TAA-Gruppe signifikant höhere Bilirubinwerte verglichen mit der künftigen TAA+Fur.- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen und die künftige TAA+Fur.+SLV-Gruppe signifikant höhere Amylaseaktivität verglichen mit der künftigen TAA- und TAA+Fur-Gruppe.

4.5.3 Serumparameter in Woche 16 des Versuches

Zum Zeitpunkt der dritten Stoffwechseluntersuchung, also nach sechzehn Wochen TAA-Behandlung und in der achten Woche von Behandlung mit Furosemid, SLV329 oder beidem gab es zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in ALT-, Gesamt-Bilirubin-, Albumin-, Cholinesterase-, Kreatinin-, Glukose-, Amylase- und CK-Werte (siehe Tab. 6).

Unter den Kontrollgruppen hatten die Kont.+SLV- und die Kont.+Fur.+SLV-Gruppen signifikant niedrigere Kreatininkonzentration, verglichen mit den anderen Kontrollgruppen. Die Kont.+Fur.-Gruppe hatte signifikant höhere Albuminspiegel verglichen mit den Kont.+SLV- und Kont.+Fur.+SLV-Gruppe.

Bei allen TAA-behandelten Gruppen wurden, verglichen mit den Kontrollgruppen, erhöhte Bilirubin-, Cholinesterasespiegel und verminderte Kreatininwerte und Amylaseaktivität gemessen. Außerdem war der Serum-Glukosespiegel in den TAA+Fur.- bzw. TAA+Fur.+SLV-Gruppen signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen. Die TAA+Fur.+SLV-Gruppe zeigte erhöhte ALT-Werte, verglichen mit der Kontrollgruppe.

Bei den TAA-behandelten Tieren führte die SLV329-Behandlung zur signifikanten Minderung der Serumkreatinin-Konzentration. Die TAA+Fur.+SLV-Gruppe zeigte im Vergleich mit der unbehandelten TAA-Gruppe höhere AST- und Bilirubinkonzentrationen und geringere Albuminspiegel und verglichen mit der TAA+SLV-Gruppe erhöhte ALT- und Bilirubinlevel und verminderte Albuminkonzentration bzw. Amylaseaktivität.

Die TAA+Fur.-Tiere hatten, im Vergleich zu TAA+SLV-Tiere, erhöhte Bilirubinspiegel und reduzierte Amylaseaktivität.

Ergebnisse				
	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	3,85 \pm 1,44	3,29 \pm 1,15	3,08 \pm 1,77	2,54 \pm 0,86
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,95 \pm 0,22	0,82 \pm 0,11	0,8 \pm 0,17	0,8 \pm 0,19
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	1,1 \pm 0,9	1,5 \pm 1,1	1,3 \pm 0,9	1,2 \pm 1,2
Albumin (g/l)	30 \pm 1	29 \pm 2	29 \pm 1§	28 \pm 0§
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	2,63 \pm 0,95	2,35 \pm 0,65	2,01 \pm 0,93	1,83 \pm 0,66
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	59 \pm 4	60 \pm 5	55 \pm 3#§	55 \pm 2#§
Glukose (mmol/l)	5,8 \pm 1	5,6 \pm 1,2	5,5 \pm 0,8	5,4 \pm 0,5
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	41,9 \pm 4,2	39,1 \pm 2,6	40,2 \pm 4,7	38,6 \pm 1,4
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,06 \pm 0,04	0,08 \pm 0,04	0,08 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	40,4 \pm 30,9	27,5 \pm 20	17,3 \pm 16,2	17,6 \pm 11,4
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9	6	10	10
AST ($\mu\text{mol/l*s}$)	2,77 \pm 0,52	3,28 \pm 1,4	3,2 \pm 0,72	4,4 \pm 1,63\$
ALT ($\mu\text{mol/l*s}$)	1,17 \pm 0,57	1,12 \pm 0,52	0,9 \pm 0,39	1,44 \pm 0,27&
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	15,1 \pm 6,3**	21,6 \pm 8,2**&	12,3 \pm 6,5**	33,7 \pm 24**\$
Albumin (g/l)	26 \pm 2**	25 \pm 3*	26 \pm 2**	22 \pm 3**\$&
Cholinesterase ($\mu\text{mol/l*s}$)	5,83 \pm 2,1**	5,02 \pm 2,04**	5,32 \pm 1,45**	4,15 \pm 1,48**
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	51 \pm 7*	47 \pm 7**	45 \pm 7**\$	44 \pm 14**
Glukose (mmol/l)	4,8 \pm 1,1	4,1 \pm 0,7	4,7 \pm 0,9*	4,5 \pm 0,7**
Amylase ($\mu\text{mol/l*s}$)	22,8 \pm 7,6**	17 \pm 5,6**&	23,3 \pm 3,3**	17,3 \pm 5,3**&
Lipase ($\mu\text{mol/l*s}$)	0,07 \pm 0,03	0,05 \pm 0,03	0,07 \pm 0,04	0,08 \pm 0,05&
CK ($\mu\text{mol/l*s}$)	18,5 \pm 13,5	12,5 \pm 10,5	17,1 \pm 15,6	10,1 \pm 7

Tab.6: Blutwerte in der sechzehnten Woche des Versuches, nach sechzehn Wochen TAA-Gabe und acht Wochen Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

** $: p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

* $: p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

$: p < 0,05$ vs. Kont.-Gruppe;

§ $: p < 0,05$ vs. Kont.+Fur.-Gruppe;

\$ $: p < 0,05$ vs. TAA-Gruppe; & $: p < 0,05$ vs. TAA+SLV-Gruppe

4.5.4 Ergebnisse der SLV329-Konzentrationsbestimmung

Bei allen sechs Tieren der Stichprobe lag die SLV329-Serumkonzentration sowohl zehn Tage als auch vier Wochen nach Behandlungsbeginn im therapeutisch wirksamen Bereich (EC_{50} bei Ratten für Diurese und Natriurese zwischen 33-38 ng/ml, gemessen im Plasma).

Tier	1	2	3	4	5	6
	Kontrolle	Kontrolle	TAA	TAA	TAA	TAA
Tag 10 (ng/ml)	32,5	27	61	49	45	80
Woche 4 (ng/ml)	24,9	18,3	49,2	90,9	49,2	90,9

Tab. 7: SLV329-Konzentration zehn Tage und vier Wochen nach Behandlungsbeginn.

4.6 Ergebnisse der Urinuntersuchungen

4.6.1 Urinparameter zu Beginn des Versuches

Bei der Untersuchung der Urinproben vom Beginn des Versuches wurden keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (siehe Tab. 8). Allerdings hatten im Vergleich zu den Kontrollgruppen die künftigen TAA+Fur.- und TAA+SLV-Tiere signifikant niedrigere Albuminausscheidungen. Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen hatte die künftige TAA+Fur.+SLV-Gruppe eine signifikant höhere Albuminausscheidung.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Urinvolumen (ml/24h)	54 ± 21	70 ± 16	56 ± 23	62 ± 16
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	160 ± 110	88 ± 27	131 ± 91	82 ± 21
Albuminausscheidung (g/24h)	0,48 ± 0,13	0,56 ± 0,12	0,55 ± 0,16	0,43 ± 0,23
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	9,7 ± 7,4	5,6 ± 1,1	5,7 ± 1,9	4,7 ± 1,1
Natriumausscheidung (mmol/24h)	8,9 ± 6,1	5,6 ± 1,2	7,6 ± 4,9	4,5 ± 1,3
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	14	13	12	14
Urinvolumen (ml/24h)	55 ± 4	58 ± 6	59 ± 12	55 ± 16
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	100 ± 26	101 ± 16	106 ± 20	114 ± 21
Albuminausscheidung (g/24h)	0,44 ± 0,1	0,33 ± 0,16*#	0,37 ± 0,14*#	0,72 ± 0,44
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	5,2 ± 0,7	4,8 ± 0,9	5 ± 0,9	5,8 ± 1,9
Natriumausscheidung (mmol/24h)	4,9 ± 1,1	4,7 ± 1,2	5,1 ± 0,9	5,6 ± 1,5

Tab.8: Urinwerte zu Beginn des Versuches

Dargestellt ist die in 24 Stunden ausgeschiedene Urinmenge und die mit Hilfe der Urinmenge kalkulierte Kreatinin-, Albumin-, Kalium- und Natriumausscheidung über 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

*: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

#: $p < 0,05$ vs. TAA+Fur.+SLV

4.6.2 Urinparameter in der achten Woche des Versuches

In der achten Woche des Versuches, also nach achtwöchiger TAA-Gabe und vor Beginn der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329, gab es zwischen den Urinparametern der Gruppen signifikante Unterschiede bei der Kreatinin- und Albuminausscheidung (siehe Tab. 9).

Bei drei der TAA-behandelten Gruppen wurden signifikant niedrigere Kreatininausscheidungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ermittelt. Die Albuminausscheidung war in den künftigen TAA+Fur.- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen verglichen mit den Kontrollen signifikant höher.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Urinvolumen (ml/24h)	43 ± 9	59 ± 12	52 ± 25	54 ± 14
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	90 ± 31	79 ± 31	94 ± 20	99 ± 15
Albuminausscheidung (g/24h)	0,85 ± 0,83	0,31 ± 0,19	1,21 ± 1,61	0,32 ± 0,1
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	3,7 ± 0,7	5 ± 1,5	4,4 ± 0,5	4,8 ± 1,2
Natriumausscheidung (mmol/24h)	3,4 ± 1,5	3,1 ± 0,7	2,9 ± 1,5	2,4 ± 0,7
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	14	13	12	14
Urinvolumen (ml/24h)	58 ± 11	61 ± 12	65 ± 14	58 ± 10
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	63 ± 21*	68 ± 18	68 ± 16*	77 ± 16**
Albuminausscheidung (g/24h)	0,96 ± 0,61	0,65 ± 0,36*	1 ± 0,63	1,1 ± 0,67*
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	3,9 ± 0,6	4,5 ± 1,1	4,3 ± 1,3	4,4 ± 0,9
Natriumausscheidung (mmol/24h)	3,7 ± 2,2	3,7 ± 1,5	2,9 ± 1	3,3 ± 1

Tab.9: Urinwerte in der achten Woche des Versuches

Dargestellt sind die in 24 Stunden ausgeschiedene Urinmenge und die mit Hilfe der Urinmenge kalkulierte Kreatinin-, Albumin-, Kalium- und Natriumausscheidung über 24 Stunden.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

***: p* < 0,05 vs. entsprechende Kontrollgruppe;

**: p* < 0,05 vs. entsprechende Kontrollgruppe

4.6.3 Urinparameter in Woche 16 des Versuches

Nach sechzehn Wochen TAA-Behandlung und in der achten Woche der Behandlung mit Furosemid, SLV329 oder beidem gab es zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede bei der Kreatinin-, Albumin- und Kaliumausscheidung (siehe Tab. 10).

Alle TAA-Gruppen zeigten hoch signifikante Verminderungen der Kreatininausscheidung. Die kombinierte Behandlung mit Furosemid und SLV329 verminderte die Kreatininausscheidung zusätzlich verglichen mit den TAA- und TAA+SLV-Gruppen.

Die Albuminausscheidung war bei der TAA+Fur.+SLV-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu der TAA+Fur.-Gruppe hatten die TAA- und TAA+SLV-Gruppen eine signifikant höhere Albuminausscheidung.

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Urinvolumen (ml/24h)	71 ± 20	75 ± 8	67 ± 24	60 ± 11
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	109 ± 29	107 ± 9	112 ± 31	100 ± 30
Albuminausscheidung (g/24h)	2,86 ± 2,39	1,44 ± 1,74	3,38 ± 3,06	1,57 ± 0,97
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	7,4 ± 2,1	7,8 ± 2,2	6,7 ± 1,9	5,7 ± 1,1
Natriumausscheidung (mmol/24h)	3,7 ± 0,8	5,5 ± 1,6	4,4 ± 1,8	3,3 ± 0,4
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9	6	10	10
Urinvolumen (ml/24h)	67 ± 18	58 ± 17	69 ± 23	48 ± 15
Kreatininausscheidung (µmol/24h)	66 ± 25**§	51 ± 16**	69 ± 22**§	43 ± 15**
Albuminausscheidung (g/24h)	3,8 ± 1,84#	1,91 ± 1,11	3,99 ± 0,27#	3,2 ± 1,43*
Kaliumausscheidung (mmol/24h)	6,1 ± 1,6	5 ± 1,9*	7 ± 1,2#§	4,7 ± 1,9
Natriumausscheidung (mmol/24h)	4,7 ± 2,2	3,8 ± 2,8	4,1 ± 1,1	3,7 ± 2,5

Tab.10: Urinwerte in der sechzehnten Woche des Versuches

Dargestellt sind die in 24 Stunden ausgeschiedene Urinmenge und die mit Hilfe der Urinmenge kalkulierte Kreatinin-, Albumin-, Kalium- und Natriumausscheidung über 24 Stunden.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

** : $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppen;

* : $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppen;

: $p < 0,05$ vs. TAA+Fur.;

§ : $p < 0,05$ vs. TAA+Fur.+SLV

4.7 Glomeruläre Filtrationsrate

Zu Versuchsbeginn gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der GFR (siehe Tab. 11).

Nach acht Wochen TAA-Behandlung zeigten alle TAA-Gruppen eine tendenziell verminderte GFR, jedoch war der Unterschied verglichen mit der entsprechend behandelten Kontrolle nur in der künftigen unbehandelten TAA-Gruppe signifikant.

In der sechzehnten Woche des Versuches war die GFR in den TAA-, TAA+Fur.- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen signifikant niedriger als in den entsprechend behandelten Kontrollen (siehe Abb. 5). Dies war bei der TAA+SLV-Gruppe nicht der Fall. Die TAA+SLV-Gruppe hatte eine signifikant höhere GFR verglichen mit der TAA+Fur.+SLV-Gruppe und eine grenzwertig signifikant höhere GFR verglichen mit der TAA+Fur.-Gruppe ($p=0,056$).

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
GFR -SW1 (ml/Min)	2,2 ± 1,33	1,3 ± 0,31	1,87 ± 1,26	1,18 ± 0,4
GFR -SW2 (ml/Min)	1,22 ± 0,48	1,02 ± 0,34	1,21 ± 0,27	1,25 ± 0,25
GFR -SW3 (ml/Min)	1,29 ± 0,38	1,31 ± 0,21	1,42 ± 0,38	1,27 ± 0,4
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9-14	9-13	10-12	10-14
GFR -SW1 (ml/Min)	1,29 ± 0,29	1,33 ± 0,26	1,42 ± 0,33	1,62 ± 0,3
GFR -SW2 (ml/Min)	0,83 ± 0,31*	0,92 ± 0,29	0,97 ± 0,23	1 ± 0,35
GFR -SW3 (ml/Min)	0,88 ± 0,3*	0,79 ± 0,13*§	1,09 ± 0,39	0,73 ± 0,36*#

Tab.11: Glomeruläre Filtrationsrate zu Versuchsbeginn, nach acht Wochen und in der Woche 16 des Versuches. SW1 steht für die Stoffwechseluntersuchung vor Versuchsbeginn, SW2 steht für die Stoffwechseluntersuchung vor Behandlungsbeginn mit Furosemid bzw. SLV329, SW3 steht für Stoffwechseluntersuchung in der Woche 16.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

*: $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppen;

#: $p < 0,05$ vs. TAA+SLV-Gruppe;

§: $p = 0,056$ vs. TAA+SLV-Gruppe

Glomeruläre Filtrationsrate - SW3

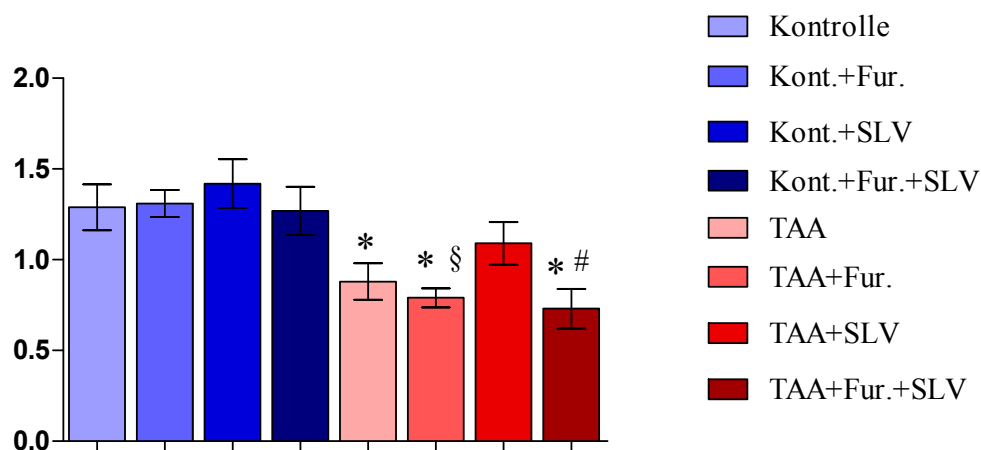


Abb.5: Glomeruläre Filtrationsrate zum Zeitpunkt des dritten Stoffwechselfersuches, nach sechzehn Wochen TAA-Behandlung und in der achten Woche der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329.

Die GFR war in allen TAA-behandelten Gruppen außer in der TAA+SLV-Gruppe signifikant vermindert. Die TAA+SLV-Gruppe hatte, verglichen mit der TAA+Fur.+SLV-Gruppe, eine signifikant höhere und verglichen mit der TAA+Fur.-Gruppe eine nahezu signifikant höhere GFR ($p = 0,056$).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

$N = 6-10$ Tiere pro Gruppe

*: $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

#: $p < 0,05$ vs. TAA+SLV-Gruppe;

§: $p = 0,056$ vs. TAA+SLV-Gruppe

4.8 Blutdruck

Zu Versuchsbeginn gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der systolischen Blutdrücke zwischen den Gruppen (siehe Abb. 6).

In der zwölften Woche des Versuches, also nach zwölf Wochen TAA-Behandlung und vier Wochen Behandlung mit Furosemid, SLV329 oder beidem, hatten die TAA- und TAA+SLV-Gruppen verglichen mit den Kontrollen einen signifikant niedrigeren systolischen Druck.

Die Furosemidbehandlung führte bei den Kontrolltieren zur Abnahme des systolischen Drucks, die SLV329-Behandlung bewirkte eine Steigerung des Blutdrucks.

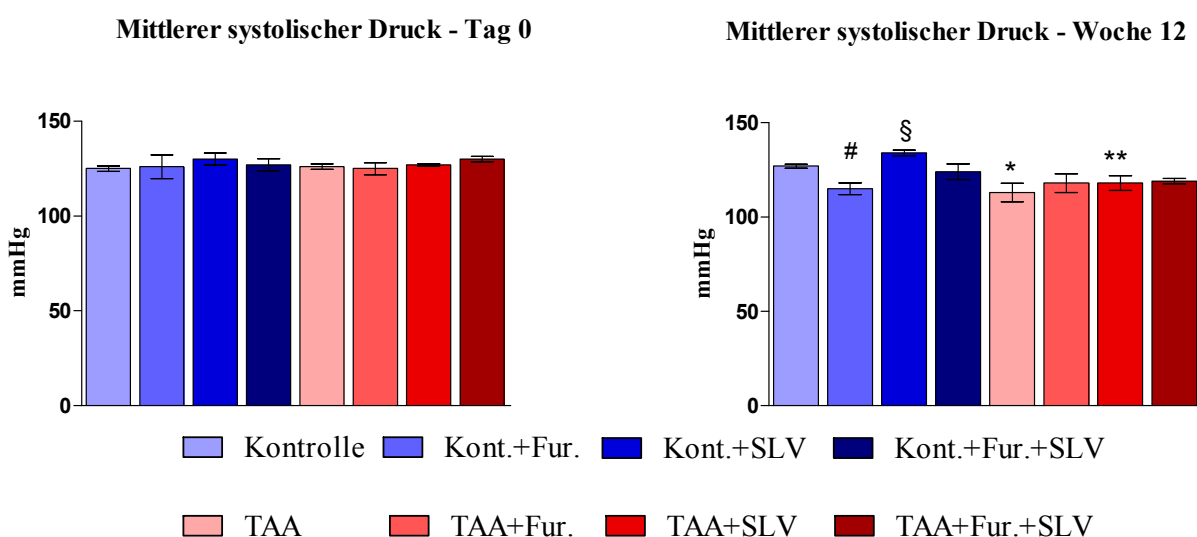


Abb.6: Mittlerer systolischer Blutdruck gemessen an den Schwanzarterien zu Versuchsbeginn und in der zwölften Woche des Versuches, nach zwölf Wochen TAA-Behandlung und in der vierten Woche der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329.

Zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Blutdruckwerte nicht. In der zwölften Woche des Versuches war der mittlere systolische Blutdruck der Kont.+Fur.-Tiere signifikant niedriger als der der unbehandelten und der SLV329-behandelten Kontrolltiere. Auch die unbehandelten und die SLV329-behandelten TAA-Tiere hatten, verglichen mit den Kontrollgruppen, niedrigere Blutdruckwerte.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

N=8-13 Tiere pro Gruppe

** $: p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

* $: p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe;

$: p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle und Kont.+SLV-Gruppe;

§ $: p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle

4.9 Herzfrequenz

Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Herzfrequenz zwischen den Gruppen (siehe Abb.7).

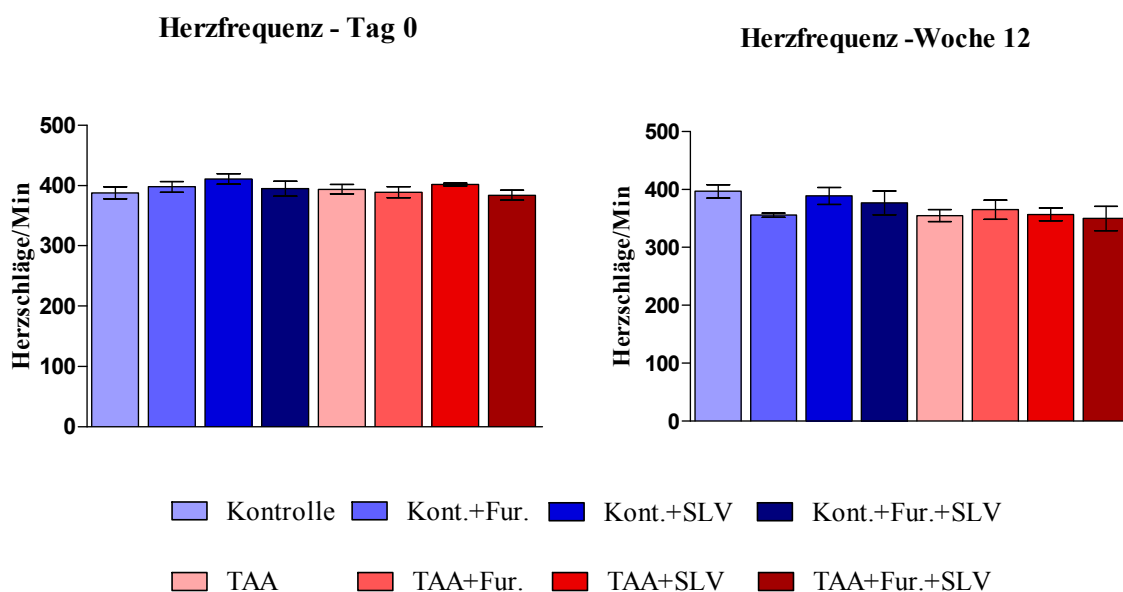


Abb.7: Herzfrequenz gemessen an den Schwanzarterien zu Versuchsbeginn und in der zwölften Woche des Versuches, nach zwölf Wochen TAA-Behandlung und in der vierten Woche der Behandlung mit Furosemid bzw. SLV329.

Die Werte für die Herzfrequenz unterschieden sich weder zur Versuchsbeginn noch in der zwölften Woche des Versuches signifikant.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

N= 8-13 Tiere pro Gruppe

Keine signifikante Unterschiede

4.10 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

4.10.1 Untersuchung der Leber

Bei den TAA-behandelten Tieren wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant mehr fibrotische Flächen gemessen, bezogen auf die Gesamtfläche der Organe (siehe Abb. 8).

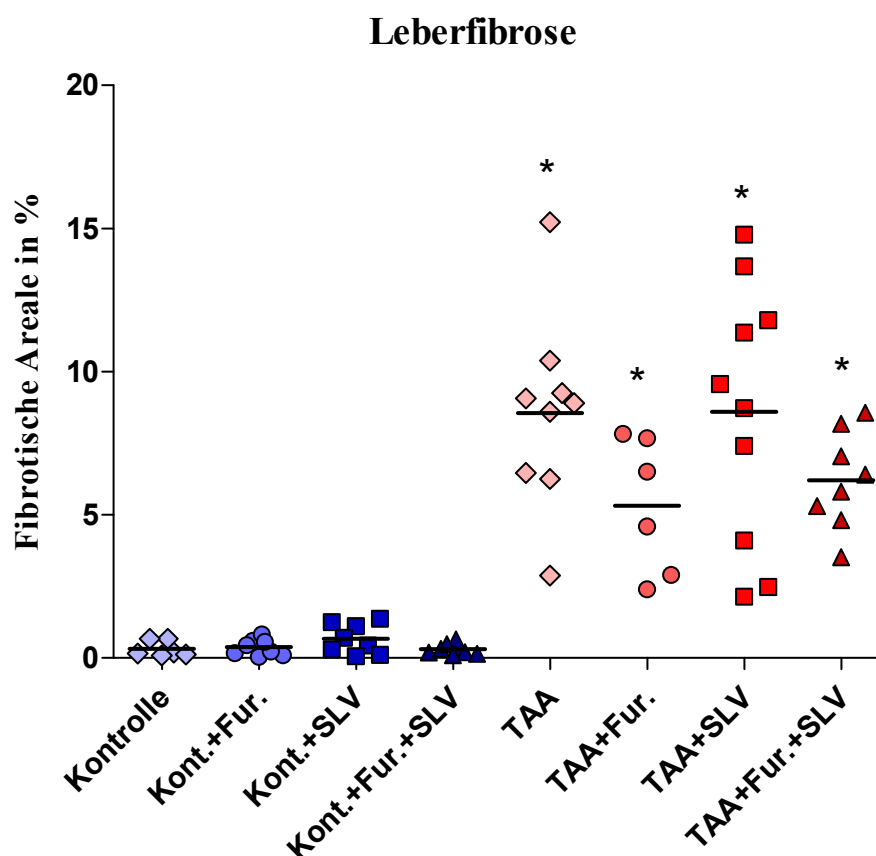


Abb.8: Anteil fibrotischer Areale in den Lebern, bezogen auf die Gesamtfläche der Leber
Die Symbole stehen für die einzelnen Messwerte der Organe, die Linien signalisieren den Mittelwert der Gruppe.

Die interstitielle Fibrose aller vier TAA-behandelten Gruppen war im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Innerhalb der Kontrollgruppen und TAA-behandelten Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

N= 6-10 Tiere pro Gruppe

*: $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe

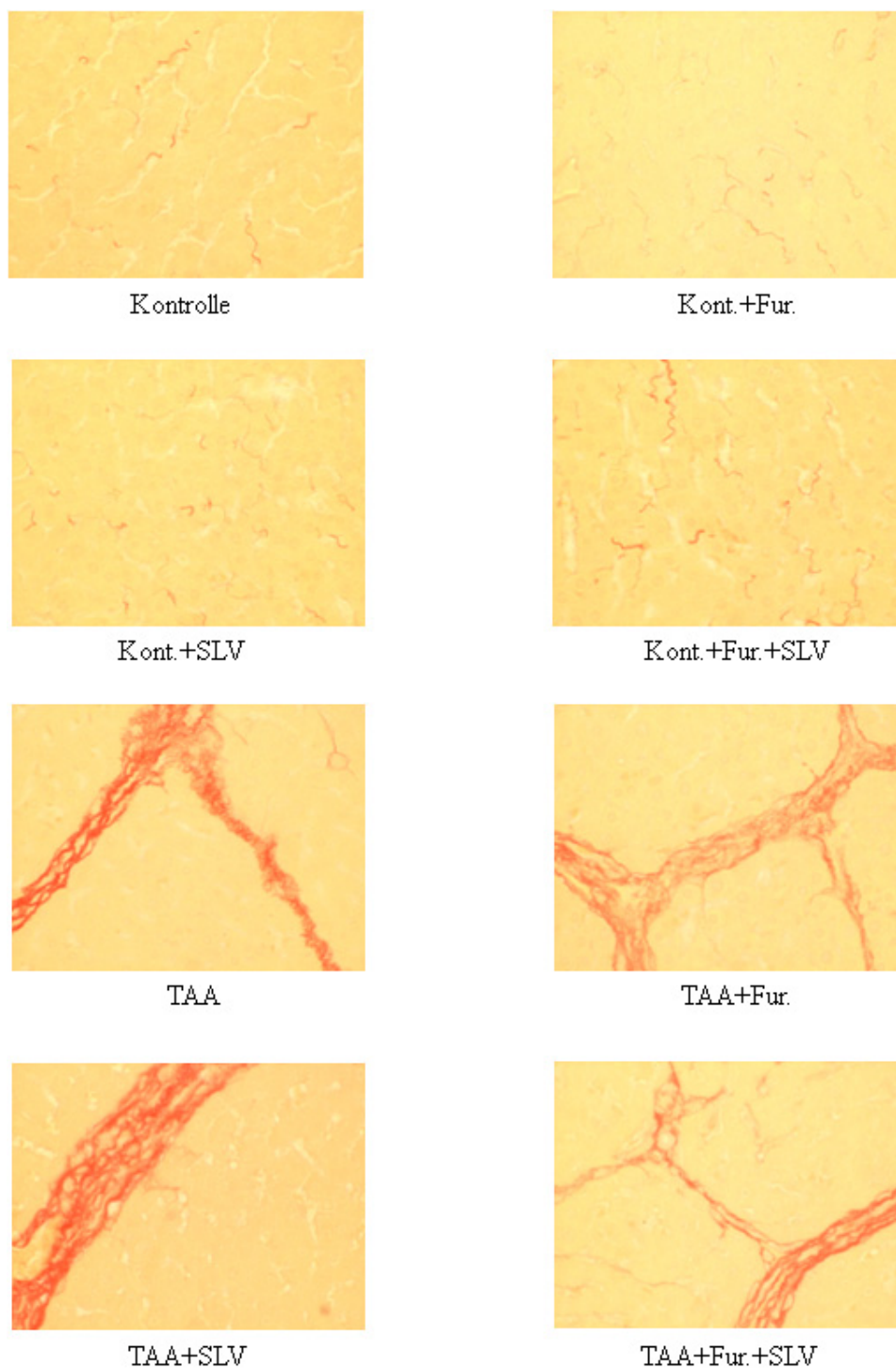


Abb.9: Typische Leberschnitte der Ratten dargestellt für die einzelnen Gruppen Sirius-Rot-Färbung, fotografiert bei 20-facher Vergrößerung. In dieser Färbung wird Kollagen rot, das restliche Gewebe gelb dargestellt. Die Bilder zeigen Ausschnitte von Leberparenchym, durchzogen von feinen Kollagenfasern bei den Kontrolltieren und von dickeren Kollagenbündeln bei den TAA-behandelten Tieren. Die interstitielle Fibrose aller vier TAA-behandelten Gruppen war, verglichen mit der Kontrollgruppen, signifikant erhöht. Innerhalb der Kontrollgruppen und TAA-behandelten Gruppen konnten keine signifikante Unterschiede festgestellt werden (siehe Abb.8).

4.10.2 Untersuchung der Nieren

Die Untersuchung der Fibrosefläche der Niere, der Media-Lumen-Verhältnisse der Nierengefäße und die Sklerose der Glomerula ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tab. 12).

	Kontrolle	Kont.+Fur.	Kont.+SLV	Kont.+Fur.+SLV
N	8	8	8	8
Nierenfibrose (%)	2,99 ± 0,91	3,36 ± 1,79	3,47 ± 1,56	2,86 ± 1,64
Media-Lumen-Ratio	3,28 ± 1	3,1 ± 0,64	2,64 ± 0,68	2,92 ± 0,5
Glomerulosklerose-Score	1,71 ± 0,28	1,44 ± 0,18	1,44 ± 0,1	1,44 ± 0,2
	TAA	TAA+Fur.	TAA+SLV	TAA+Fur.+SLV
N	9	6	10	9
Nierenfibrose (%)	2,95 ± 0,94	3,14 ± 1,59	3,15 ± 1,34	4,55 ± 1,68
Media-Lumen-Ratio	2,62 ± 0,72	2,77 ± 0,59	2,98 ± 0,96	3,07 ± 0,8
Glomerulosklerose-Score	1,67 ± 0,2	1,62 ± 0,29	1,44 ± 0,22	1,81 ± 0,43

Tab.12: Nierenfibrose in Prozent bezogen auf die Gesamtorganfläche, Media-Lumen-Ratio der Nierengefäße und Glomerulosklerose-Score.

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Keine signifikante Unterschiede.

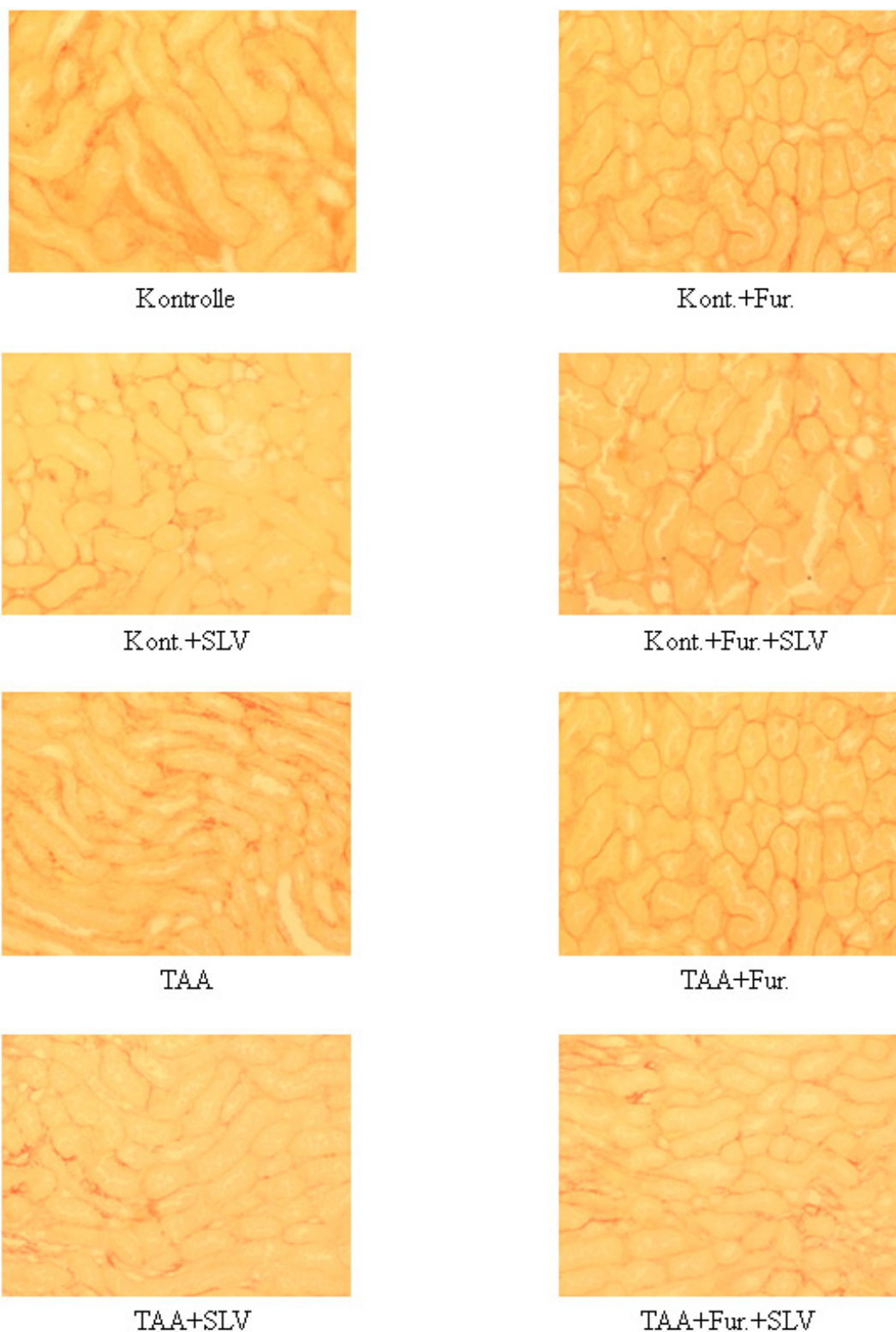


Abb.10: Typische Nierenschnitte der Ratten dargestellt für die einzelnen Gruppen Sirius-Rot-Färbung, fotografiert bei 20-fachen Vergrößerung. In dieser Färbung wird Kollagen rot, das restliche Gewebe gelb dargestellt. Hier zu sehen sind Ausschnitte des Nierenparenchyms mit feinen Kollagenfasern. Das Ausmaß der interstitielle Fibrose in den Nieren unter den Gruppen war nicht unterschiedlich (siehe Tab.12).

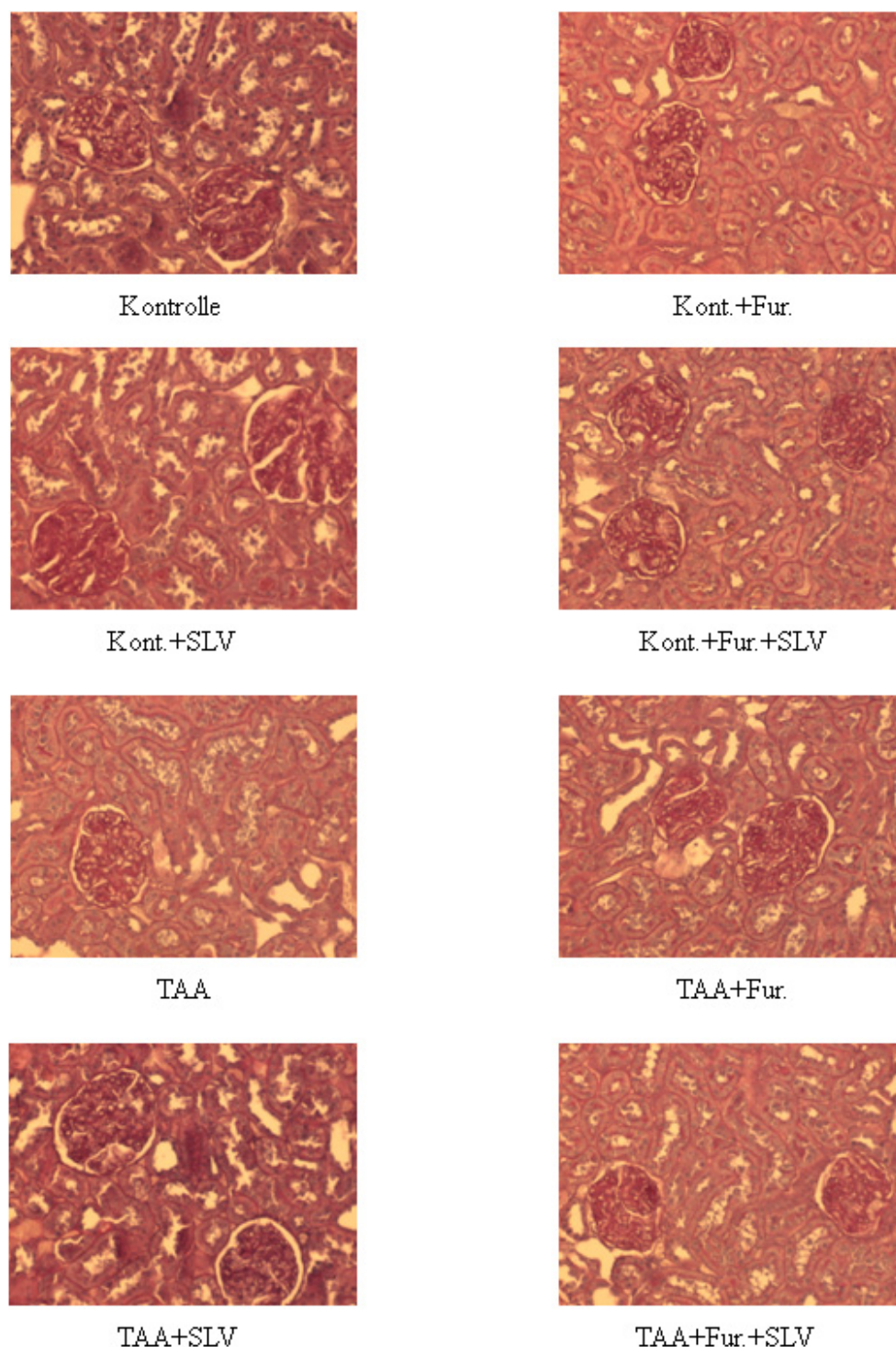


Abb.11: Typische Nierenschnitte der Ratten dargestellt für die einzelnen Gruppen Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung, fotografiert bei 20-fachen Vergrößerung. PAS-positive Materialien (z.B. Sklerose) stellen sich rosa bis rot dar, durch die Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Zellkerne blauviolett angefärbt. Zu sehen sind Ausschnitte aus der Nierenrinde mit Glomeruli und Tubuli. Beurteilt wurde der Anteil von PAS-positivem Material an der gesamten Glomerulumsfläche. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Ausmaßes der Glomerulosklerose nicht (siehe Tab.12).

4.11 Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen

4.11.1 Adenosin-Rezeptorexpression in der Leber

Die Untersuchungen der Rezeptorexpressionen in den Lebern zeigten eine Reduktion der $A_{2A}R$ -Dichte in den TAA-, TAA+Fur.- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen, verglichen mit den entsprechend behandelten Kontrollen (siehe Abb.11 und 12).

Die Dichte von den $A_{2B}R$ war in der unbehandelten TAA-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe.

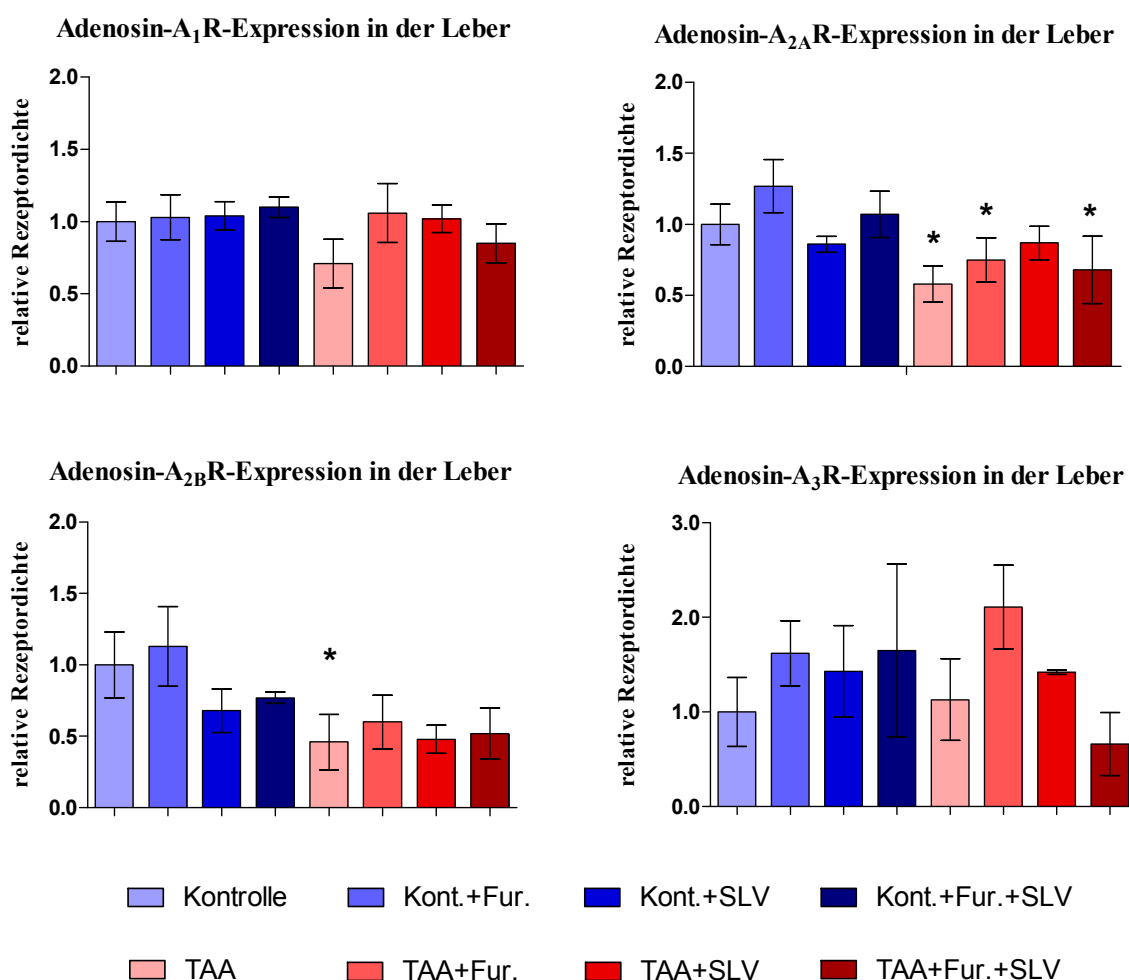


Abb.12: Relative Rezeptorexpression von A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ und A_3R in der Leber.

Die ermittelten relativen Rezeptorexpressionen wurden zur besseren Übersichtlichkeit auf Kontrollgruppe = 1 normalisiert.

Die $A_{2A}R$ -Expression in der Leber war, außer in den mit SLV329-behandelten Gruppe bei allen TAA-behandelten Gruppen vermindert. Die $A_{2B}R$ -Expression in den Lebern der unbehandelten TAA-Gruppe war, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, ebenfalls vermindert.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

N=6-10 Tiere pro Gruppe

*: $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe

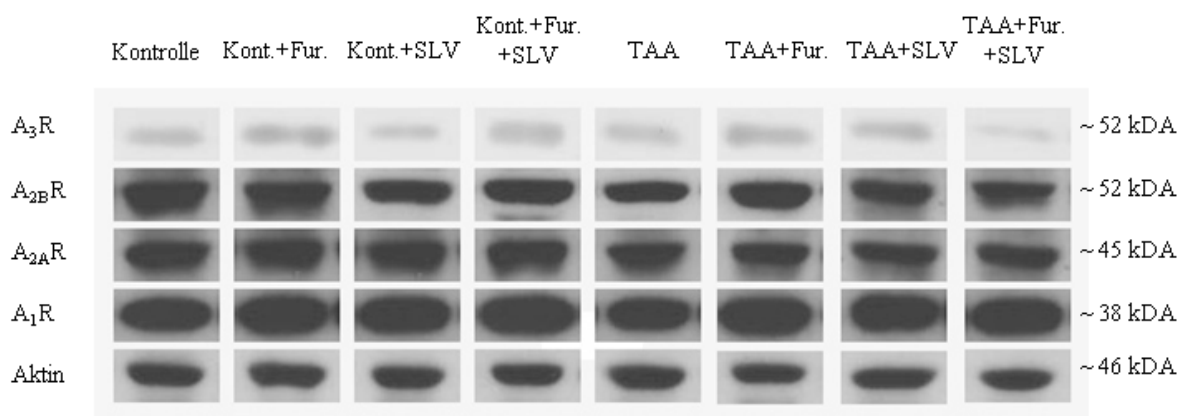


Abb.13: Exemplarische Darstellung der Proteinbanden von A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, A₃R und Aktin für die einzelnen Gruppen in der Western-Blot-Untersuchung der Lebergewebe.

Rechts sind die mit Hilfe der Markersubstanz geschätzten relativen Molekülmassen der einzelnen Proteine in Kilodalton aufgeführt.

Die A_{2A}R-Expression in der Leber, war, außer in den mit SLV329-behandelten Gruppe, bei allen TAA-behandelten Gruppen vermindert. Die A_{2B}R-Expression in den Lebern der unbehandelten TAA-Gruppe, war, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, ebenfalls vermindert (siehe Abb.12).

4.11.2 Adenosin-Rezeptorexpression in den Nieren

Die Untersuchungen der Adenosin-Rezeptorexpression in den Nieren ergaben für die Rezeptoren $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ und A_3R keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den Kontrollgruppen führte die Behandlung mit SLV329 zu einer signifikanten Reduktion der A_1R -Dichte, verglichen mit der unbehandelten bzw. mit Furosemid behandelten Kontrollgruppe.

Die TAA-Behandlung führte bei den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der A_1R -Dichte in den Nieren, verglichen mit der Kontrollgruppe.

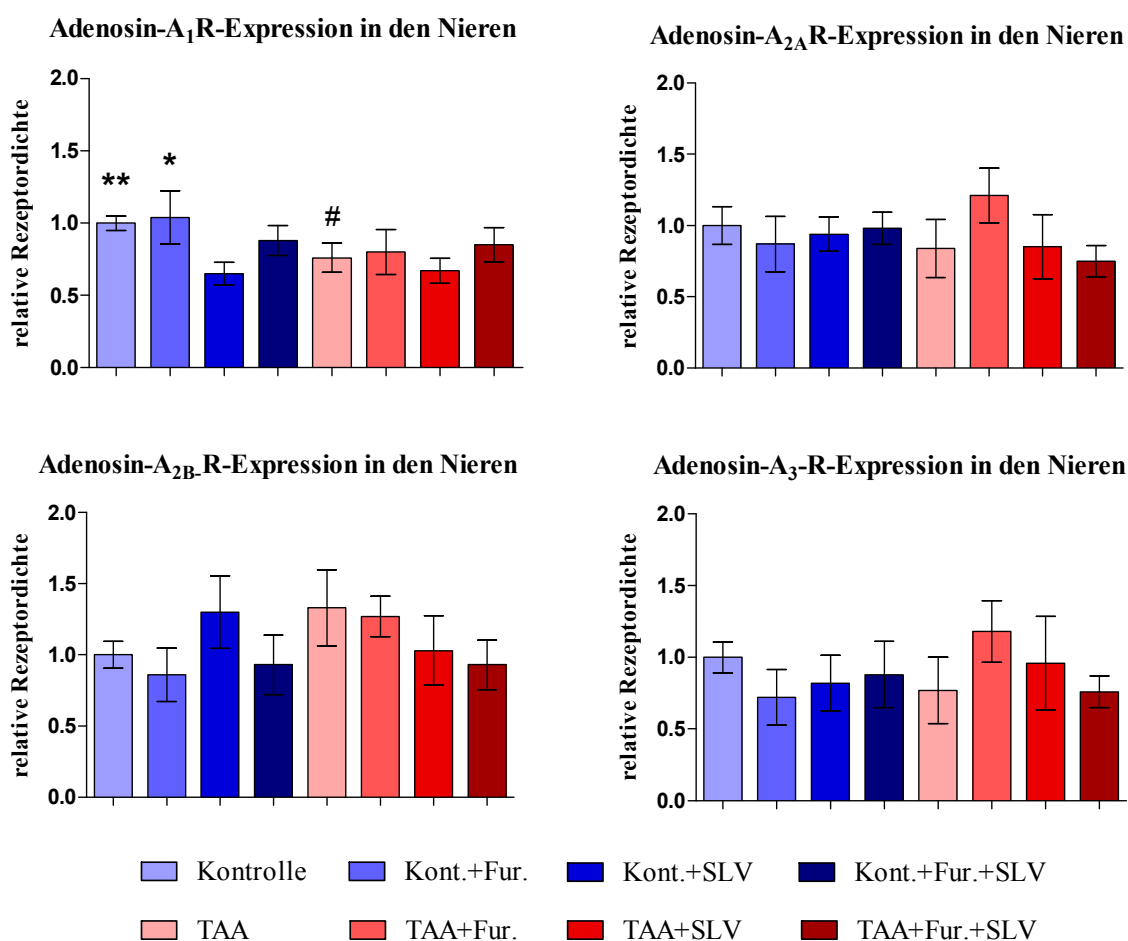


Abb.14: Relative Rezeptorexpression von A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ und A_3R in den Nieren

Die ermittelten relativen Rezeptorexpressionen wurden zur besseren Übersichtlichkeit auf Kontrollgruppe = 1 normalisiert.

Die A_1R -Dichte in den Nieren der mit SLV329-behandelten Kontrollgruppe war, verglichen mit den unbehandelten und mit Furosemid behandelten Kontrollgruppen, signifikant niedriger. Die A_1R -Expression in den Nieren der unbehandelten TAA-Gruppe war, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, ebenfalls vermindert.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

$N=6-10$ Tiere pro Gruppe

*: $p < 0,05$ vs. Kont.+SLV-Gruppe

** : $p < 0,01$ vs. Kont.+SLV-Gruppe; #: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrollgruppe

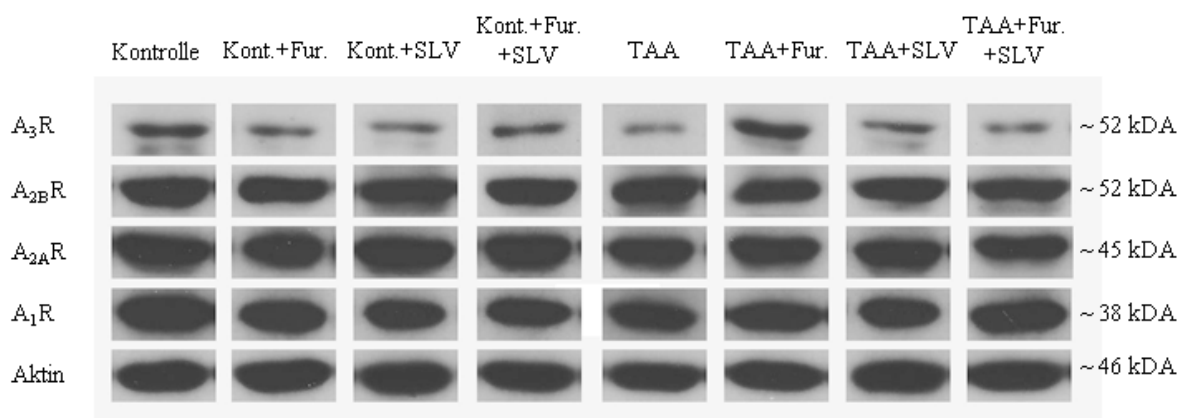


Abb.15: Exemplarische Darstellung der Proteinbanden von A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, A₃R und Aktin für die einzelnen Gruppen in der Western-Blot-Untersuchung der Nierengewebe.

Rechts sind die mit Hilfe der Markersubstanz geschätzten relativen Molekülmassen der einzelnen Proteine in Kilodalton aufgeführt.

Die A₁R-Dichte in den Nieren der mit SLV329-behandelten Kontrollgruppe war, verglichen mit den unbehandelten und mit Furosemid behandelten Kontrollgruppen, signifikant niedriger. Die A₁R-Expression in den Nieren der unbehandelten TAA-Gruppe war, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, ebenfalls vermindert (siehe Abb.14).

4.12 Mortalität

Während des Versuches verstarben in der TAA-Gruppe fünf von vierzehn, in der TAA+Fur.-Gruppe sieben von dreizehn, in der TAA+SLV-Gruppe zwei von zwölf und in der TAA+Fur.+SLV-Gruppe vier von vierzehn Tieren (siehe Abb. 14). In den Kontrollgruppen gab es keine Mortalität. Der Vergleich der Überlebenskurven der Kontrollgruppen mit den Überlebenskurven der TAA-, TAA+SLV- und TAA+Fur.+SLV-Gruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Allerdings führte die SLV329-Behandlung der TAA-Tiere zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit verglichen mit den Furosemid behandelten TAA-Tiere.

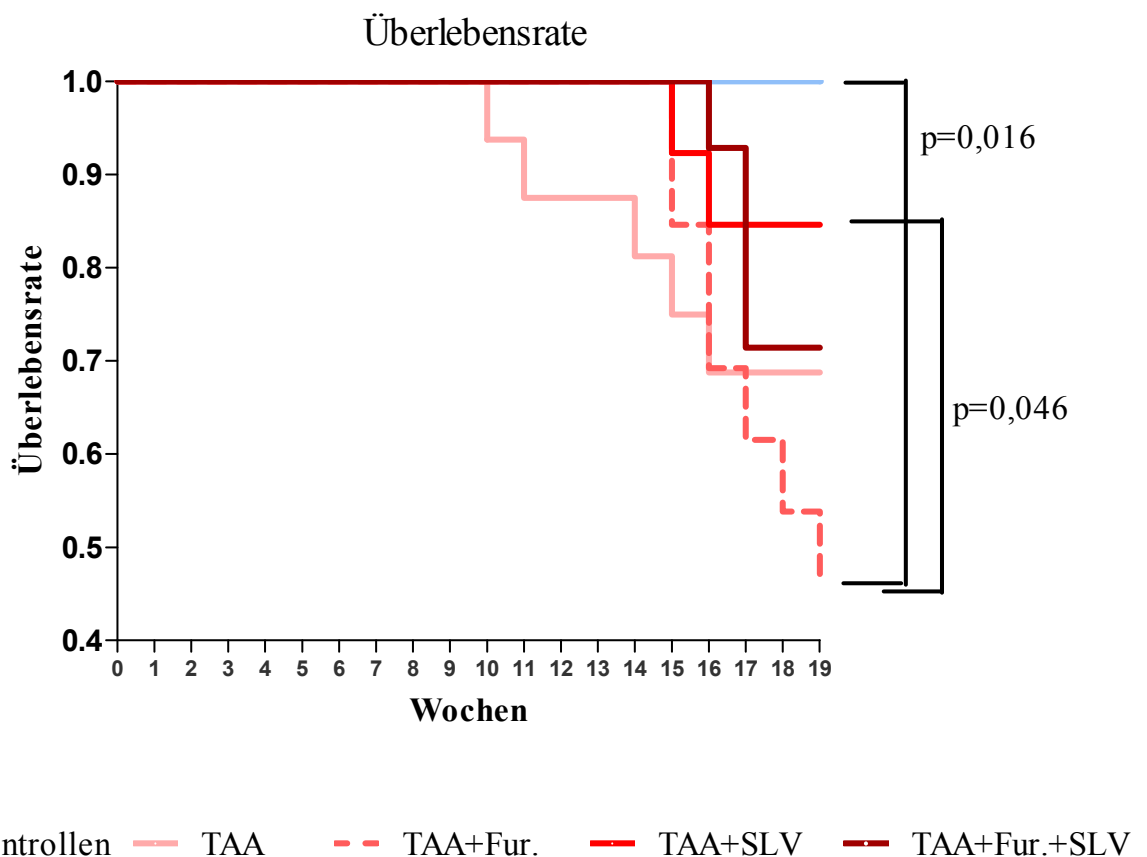


Abb.16: Kaplan-Meier-Kurven der Gruppen für das Überleben bis zu Woche 19

N= 8-14 Tiere pro Gruppe zur Versuchsbeginn

Während des Versuches verstarben in der TAA-Gruppe fünf von vierzehn, in der TAA+Fur.-Gruppe sieben von dreizehn, in der TAA+SLV-Gruppe zwei von zwölf und in der TAA+Fur.+SLV-Gruppe vier von vierzehn Tieren.

5 Diskussion

In dieser Studie wurden die Einflüsse einer Behandlung mit dem A₁-Adenosinrezeptor-Antagonisten, SLV329 auf die Nierenfunktion von Ratten mit Leberzirrhose untersucht. Verglichen wurde dieses Behandlungsmodell mit den Krankheitsverläufen bei unbehandelten bzw. nur mit Furosemid und mit SLV329 und Furosemid behandelten Ratten.

Das hepatorenale Syndrom (HRS) ist eine spezielle Form des Nierenversagens, die bei fulminanter Hepatitis und Leberzirrhose auftritt. Es kommt zu einer funktionellen Niereninsuffizienz ohne bedeutende Veränderung des histologischen Bildes in der Niere. Das HRS wird nach Intensität und Verlauf in zwei Typen eingeteilt. HRS Typ 1 ist durch ein rapid progressives Nierenversagen gekennzeichnet und HRS Typ 2 hat eine mildere Verlaufsform mit einem langsam progredienten Nierenversagen. Es kommt zur Erhöhung des Serumkreatinins auf über 1,5 mg/dl (133 µmol/l) oder zur Minderung der Kreatinin-Clearance auf Werte unter 40 ml/Min über einen längeren Zeitraum. HRS Typ 1 hat ein mittleres Überleben von weniger als zwei Wochen und eine Überlebensrate von 10% nach drei Monaten. Der HRS Typ 2 hat eine deutlich günstigere Prognose mit einer Überlebensrate von 70% nach drei Monaten.

Sowohl beim HRS als auch bei der vorangehenden Leberzirrhose wird die Behandlung von Asziten und Ödemen durch die Diuretika-bedingte Verschlechterung der Nierenfunktion und durch Einsetzen einer Diuretika-Resistenz erschwert. HRS wird oftmals durch eine zu „aggressive“ diuretische Therapie bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites verursacht (Laffi et al. 1994).

Als eine mögliche Alternative zum Einsatz der gebräuchlichen Diuretika wird eine pharmakologische Intervention über die Blockade der A₁Rezeptoren diskutiert (Moller et al. 2008).

Der positive Effekt einer A₁R-Blockade auf die Nierenfunktion wurde bereits in mehreren Studien bestätigt (Gottlieb et al. 2002;Nagashima et al. 1994;Nagashima et al. 1995;Yao et al. 2001;Dittrich et al. 2007).

In einer Phase II Studie wurde nach einer intravenösen Bolusinjektion des A₁R-Antagonisten FK352 bei Leberzirrhotikern eine Erhöhung des Urinflusses um 52% festgestellt (Stanley et al. 1998).

In Tierversuchen konnten außerdem A₁R-Antagonisten erfolgreich zur Prävention von Kontrastmittel-induzierter Nephropathie getestet werden, und zeigten bei Cisplatin- und Cephaloridin-induziertem akuten Nierenversagen eine Verbesserung der Nierenfunktion mit Verstärkung der Diurese (Yao et al. 2001;Nagashima et al. 1994;Nagashima et al. 1995).

In klinischen Untersuchungen an herzinsuffizienten Patienten mit verminderter Nierenfunktion konnte gezeigt werden, dass sowohl die Monotherapie mit A₁R-Antagonisten

als auch die Kombinationstherapie mit Furosemid zu einer Steigerung der Harnausscheidung führt und zwar ohne begleitende Verminderung der GFR bzw. sogar mit einer Verbesserung der GFR im Vergleich zur Furosemid-Monotherapie (Dittrich et al. 2007; Gottlieb et al. 2002). Auch bei Diuretika-resistenten herzinsuffizienten Patienten wurde durch die Behandlung mit einem A₁R-Antagonisten eine Verbesserung der Kreatinin-Clearance mit Verstärkung der Diurese beobachtet (Givertz et al. 2007).

In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob sich bei Leberzirrhose mit eingeschränkter Nierenfunktion die Diurese durch eine A₁R-Blockade mit SLV329, oder durch die Kombinationstherapie mit den A₁R-Antagonisten SLV329 und Furosemid, nierenschonend steigern lässt.

Die in oben genannten Studien gezeigte Steigerung der Diurese durch A₁R-Antagonisten ohne Abfall der GFR konnte in unserem Versuch mit TAA-behandelten Tieren bestätigt werden, und wir sahen sogar eine tendenzielle Verbesserung der Nierenfunktion. Die Behandlung mit Furosemid und die Kombinationstherapie mit Furosemid und SLV329 führten ebenfalls zu einem Anstieg des Flüssigkeitsumsatzes, allerdings hatten die Tiere in diesen beiden Gruppen schlechtere Nierenfunktionen, verglichen mit der SLV329-Monotherapie. Auch anhand der Sterblichkeit ist ein Vorteil der SLV329-Behandlung ersichtlich. Die SLV329-behandelte Gruppe hatte unter den TAA-Gruppen die niedrigste Mortalität. Im Vergleich zu den mit Furosemid behandelten Tieren konnte sogar ein signifikant besseres Überleben festgestellt werden.

Zusammenfassend wurde bei den TAA-behandelten Tieren mit allen Behandlungsformen eine Steigerung der Diurese erreicht, aber nur die SLV329-Monotherapie konnte gleichzeitig die Nierenfunktion verbessern und verglichen mit der Furosemidbehandlung, die Mortalität signifikant mindern.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch eine SLV329-Behandlung von Patienten mit Leberschädigung und Nierenfunktionsstörung, oder von Patienten mit HRS, wahrscheinlich eine Verstärkung der Diurese mit gleichzeitiger Verbesserung der glomerulären Filtrationsleistung erreicht werden könnte. Wenn die Steigerung der Diurese ausreichend für die Behandlung eines Aszites wäre, hätte die Behandlung mit SLV329 einen deutlichen Vorteil gegenüber der in der Klinik angewandten Diuretikatherapie.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Modell der Thioacetamid-induzierten Leberzirrhose der Ratte mit eingeschränkter Nierenfunktion

Das gewählte Tiermodell orientiert sich an dem von Li et al. etablierten Modell für eine experimentelle Leberzirrhose. In diesem Verfahren wurde, im Gegensatz zu vorherigen Versuchen mit demselben Gift, die individuelle Sensibilität der Ratten gegenüber TAA berücksichtigt. So konnte, verglichen mit vorherigen Experimenten, bezüglich des Ausmaßes der Zirrhose, einheitlichere Ergebnisse erzielt und die Mortalität gesenkt werden (Li et al. 2002). Die bei diesem Modell beschriebenen Druckerhöhungen in der Milz und in der Pfortader und der arterielle Druckabfall sind Zeichen einer portalen Hypertonie mit Auswirkungen auf den systemischen Gefäßwiderstand (Mendez-Lopez et al. 2007).

Die portale Hypertonie steht im Fokus der Pathophysiologie des HRS bei den Menschen. Aus ihr resultiert eine vermehrte Stickstoffsynthese mit peripherer Vasodilatation und einer Aktivierung der neurohumoralen volumenregulatorischen Systeme (sympathisches Nervensystem, RAAS, Vasopressin) und des hepatorenalen Reflexes. Diese führen zu einer erheblichen Flüssigkeitsretention, zu starker Vasokonstriktion im renalen Cortex und beeinflussen die Synthese von weiteren vasoaktiven Stoffen, z.B. Adenosin.

In den Experimenten von Ming wurde nach 90-tägiger oraler TAA-Gabe bei Ratten außer der deutlichen Fibrose der Leber mit erhöhtem portalen Druck und vermindertem arteriellen Druck, auch eine geringere Natriumausscheidung und verminderter Urinfluss festgestellt. Außerdem hatten die Tiere tendenziell niedrigere glomeruläre Filtrationsraten und zeigten nach Volumenbelastung mit Salzlösung eine geringere Urinflusssteigerung als die Kontrollen (Ming et al. 2005). Die Erhöhung der metabolischen Aktivität im Nebennierenmark deutet auf die Aktivierung des neurohumoralen Systemes, welches ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des HRS ist (Mendez-Lopez et al. 2005). Nach der Behandlung mit einem Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, Captopril, wurde bei zirrhotischen Ratten die Verbesserung der Nierendurchblutung und die Erhöhung der GFR festgestellt, während bei den Kontrolltieren kein Effekt gesehen wurde. Diese Beobachtung weist auf die Aktivierung des RAAS hin (Ibarra et al. 1998).

All dies deutet darauf hin, dass bei der TAA-induzierten Leberzirrhose der Ratte und bei der Leberzirrhose des Menschen zum großen Teil die gleichen Pathomechanismen ablaufen. Folglich ist die TAA-induzierte Leberzirrhose der Ratte ein geeignetes Modell zur Prüfung von neuen Therapieansätzen bei Leberzirrhose bzw. HRS.

In unserem Versuch wurde Wistar-Ratten TAA über das Trinkwasser verabreicht und die Dosis wie von Li beschrieben angepasst. Um die individuell unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Gift zu berücksichtigen, wurden die Tiere wöchentlich gewogen und auf Basis der Gewichtsentwicklung wurde die TAA-Konzentration des Trinkwassers geändert. Da

die Tiere ab der achten Woche behandelt wurden, musste ab diesem Zeitpunkt auf die Anpassung verzichtet werden, da man nicht zwischen dem Einfluss von TAA und dem Einfluss der Behandlung (mit Furosemid bzw. SLV329) auf die Körpergewichte der Tiere differenzieren konnte. Deshalb wurde ab diesem Zeitpunkt die Dosis, bis auf eine einmalige Erhöhung bei allen TAA-Tieren, nicht mehr verändert, sondern die Konzentration von der achten Woche an beibehalten. Die einmalige Dosiserhöhung bei allen Tieren wurde in der zwölften Woche vorgenommen, weil ein großer Teil der Tiere sich an die Giftdosis adaptiert hatte und deutliche Gewichtszunahmen zeigte (siehe Abb.3).

5.1.2 Vergleich der relativen Organgewichte

Der Vergleich der relativen Organgewichte bei unterschiedlich schweren Ratten setzt eine Korrelation zwischen Organgewicht und Körpergewicht voraus, welche bei den von uns untersuchten Organen nur bei der Leber gegeben ist (Bailey et al. 2004). Da zwischen den Kontrolltieren und den TAA-behandelten Tieren Körpergewichtsunterschiede um die 200g bestanden, wurden zwischen Kontroll- und TAA-Tieren nur die relativen Lebergewichte verglichen.

5.1.3 Blutdruckmessung

Die Genauigkeit der Blutdruckmessung bei wachen Ratten, wie wir sie in unserem Experiment durchgeführt haben, ist kritisch zu betrachten. Obwohl die Tiere vor der eigentlichen Messung dreimal mit dem Verfahren konfrontiert wurden und versucht wurde, die Aufregung der Tiere möglichst gering zu halten, ist eine Blutdruckerhöhung aufgrund der Nervosität der Tiere wahrscheinlich (Irvine et al. 1997). So kann diese Messmethode falsch hohe Werte für die systemischen arteriellen Blutdrücke liefern. Da wir aber die Messungen immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt haben, handelt es sich um einen systemischen Fehler. Die Aussage über die Änderungen des systemisch arteriellen Blutdruckes sollte dadurch nicht beeinträchtigt sein.

5.1.4 Untersuchung im Stoffwechselkäfig

Um die Kontamination der Käfige zu verringern, wurde den Tieren während der 24-stündigen Stoffwechselkäfigversuche kein TAA verabreicht. So wurde der 24-Stunden-Harn in einer Periode ohne TAA-Exposition gesammelt und die Blutentnahme am Ende des Stoffwechselversuches erfolgte nach diesem 24-stündigen TAA-freien Zeitintervall. Da es sich wiederum um einen systemischen Fehler handelt, sollte dies im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen keine Rolle spielen. Dennoch müssen bei der Bewertung

der Urin- und Serumuntersuchungen diese Gegebenheiten der Probengewinnung beachtet werden.

Serum- und Urinuntersuchungen

Transaminasen

Die Bestimmung der Asparat-Aminotransferasen (AST) und der Alanin-Aminotransferasen (ALT) gehört zur Leberrouinediagnostik, da sie hauptsächlich im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Leberzellen vorkommen. Allerdings zeigen sich auch im Myokard und in der Skelettmuskulatur vergleichsweise hohe Enzymkonzentrationen, sodass die Messung der AST und ALT nicht als leberspezifisch einzustufen ist. AST und ALT sind typische Indikatoren für Leberzellschädigung, bei akuten Ereignissen korreliert das Ausmaß des Anstieges mit dem Ausmaß der Schädigung. Die Halbwertszeit beträgt bei Menschen für ALT ca. 47 Stunden und für AST ca. 17 Stunden (Neumeister B. et al. 2008).

Bei der inaktiven oder langsam progredienten Zirrhose können AST und ALT im Referenzbereich liegen (Gerok and Blum 1995). Auch bei der TAA-induzierten Leberzirrhose der Ratte wurde keine Erhöhung der AST- bzw. ALT-Aktivitäten beschrieben (Kundiger et al. 1983).

Gesamt-Bilirubin

Bilirubin entsteht als hydrophobes Abbauprodukt des Häm-Anteil des Hämoglobins und wird an Albumin gebunden in die Leber transportiert (indirektes Bilirubin). Dort wird es zu wasserlöslichem, konjugiertem Bilirubin (direktes Bilirubin) verestert und kann dann über die Gallenwege in dem Darm sezerniert werden. Im Darm findet der weitere Abbau statt, dessen Metabolite entweder mit den Fäzes ausgeschieden werden oder durch den enterohepatischen Kreislauf wieder der Leber zugeführt werden. Bei Störungen der Bilirubinausscheidung wird das konjugierte Bilirubin glomerulär filtriert und verursacht eine Bilirubinurie mit Braunfärbung des Harns. Die Messung der einzelnen Fraktionen des Gesamt-Bilirubins und des konjugierten Bilirubins im Urin hilft, die Ebene der Störung der Bilirubinausscheidung einzugrenzen. Prähepatische Hyperbilirubinämie (vermehrte Hämolyse oder Myolyse) und hepatozelluläre Hyperbilirubinämie (Störung des Bilirubinmetabolismus in den Hepatozyten) führen zur vorwiegend unkonjugierten Hyperbilirubinämie, wohingegen die posthepatische Hyperbilirubinämie (Abflussstörungen der ableitende Gallenwege) zur Erhöhung des direkten Bilirubins und zur Bilirubinurie führt (Gerok and Blum 1995).

Wenn, wie in unserem Fall, das Gesamt-Bilirubin gemessen wurde, muss die Ursache für die Hyperbilirubinämie mit Hilfe der Anamnese und weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Albumin

Albumin ist das wichtigste Bindungs- und Transportprotein im Organismus und das wichtigste Protein für die Aufrechthaltung des kolloidosmotischen Druckes. Da die Synthese

des Albumins ausschließlich in der Leber geschieht, kommt es bei verminderter Synthesekapazität der Hepatozyten zu Hypalbuminämie. Wegen der langen Serumhalbwertszeit von 18-20 Tagen sinkt die Serumkonzentration erst ab, wenn die Synthese über lange Zeit eingeschränkt ist. Differenzialdiagnostisch sind enterale und renale Verluste des Albumins und Verluste durch Ödeme oder Aszites zu berücksichtigen (Neumeister B. et al. 2008).

Cholinesterasen

Die Cholinesterasen im Serum stellen eine Gruppe von mehreren genetisch bedingten Varianten dar. Aufgrund der ausschließlichen Synthese in der Leber, ist die Aktivität der Cholinesterasen ein geeigneter Parameter zur Abschätzung der Synthesekapazität der Leber und gilt, auch wegen der Verknüpfung von der Cholinesterasensynthese an die Albuminsynthese, als Indikator der Proteinsynthese des Leberparenchyms. Ein deutliches Absinken der Aktivität ist aufgrund der recht langen Halbwertszeit des Enzyms von 10-14 Tagen erst nach länger anhaltenden Synthesedefekten zu erwarten. Die Regulation der Synthese der Cholinesterasen ist mit der Albuminsynthese gekoppelt. Bei Absinken des kolloidosmotischen Druckes als Folge einer erniedrigten Serumalbuminkonzentration wird die Synthese von Albumin und Cholinesterasen kompensatorisch gesteigert. So kann es bei Erkrankungen mit Proteinverlust (z.B. nephrotisches Syndrom, exsudative Enteropathien) zu erhöhter Cholinesteraseaktivität im Serum kommen (Neumeister B. et al. 2008).

Kreatinin

Zur Einschätzung der Nierenfunktion wurde in diesem Versuch durch die Berechnung der endogenen Kreatinin-Clearance die glomeruläre Filtrationsrate ermittelt. Kreatinin entsteht aus dem muskulären Kreatin und ist abhängig von der Muskelmasse. Bei normaler Nierenfunktion wird Kreatinin fast vollständig gefiltert. Erst die Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung auf unter 50% bewirkt einen Anstieg der Serumkreatininkonzentration, davor nennt man es das Stadium der vollen Kompensation. Die erhöhte Serumkreatininkonzentration ohne klinische Symptome wird als kompensierte Retention bezeichnet. Nach der Entwicklung von Organsymptomen spricht man von der dekompenzierten Retention und beim Einsetzen der typischen Symptome der Harnvergiftung (z.B. Schwäche, Puritus, Ödem, Koma) von einer Urämie (Herold 2007).

5.1.5 Histologie

Sirius-Rot-Färbung

In der Sirius-Rot-Färbung wurden die Kollagenanteile in Leber und Nieren rot angefärbt und mit einer computergestützten Analyse vermessen. Areale, in welchen schon unter physiologischen Umständen größere Kollagen-haltige Strukturen, wie z.B. größere Gefäße und Glomeruli, zu sehen sind, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Bei der Leberzirrhose nimmt während der Fibrogenese die extrazelluläre Matrix zu, welche größtenteils aus Kollagen besteht. Durch die Bestimmung des Fibrosierungsgrades der Leber wurde das Gelingen des Tiermodells überprüft und die TAA-Gruppen auf Quantität der Fibrose miteinander verglichen.

In den Nieren kann die fortschreitende Expansion extrazellulärer Matrix als Gewebsantwort auf eine Vielzahl verschiedener Schädigungsreize, wie erhöhter Blutdruck, Hyperglykämie oder inflammatorische Reaktionen, vorgefunden werden. Der Grad der Schädigung hängt hierbei von der Häufigkeit, der Dauer und der Schwere des Schädigungsreizes ab. Beim HRS handelt es sich um eine rein funktionelle Störung der Niere ohne bedeutende Veränderungen des histologischen Bildes. Die vermehrte Ansammlung extrazellulärer Matrixproteine im Interstitium wäre ein Zeichen für eine chronisch progressive Nierenerkrankung.

In unserem Versuch sollte durch die Untersuchung der Nieren ausgeschlossen werden, dass die Minderung der Nierenfunktion mit einer morphologischen Veränderung des Nierengewebes einhergeht. So soll gezeigt werden, dass es sich um eine rein funktionelle Nierenfunktionsminderung handelt, die der Pathogenese des humanen HRS entspricht.

Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung

Die PAS-Färbung ermöglicht die Beurteilung der Glomeruli hinsichtlich dem Anteils von glukosehaltigen Ablagerungen an der glomerulären Gesamtfläche und wurde in unserem Versuch zur Beurteilung des Glomerulosklerosegrades der Nieren herangezogen. Die Ursachen für die Entwicklung einer Glomerulosklerose sind vielfältig. Zum Einen werden in der glomerulären Basalmembran im Rahmen des Filtrationsprozesses häufig Antigen-Antikörper-Komplexe (z.B. bei einer HIV-Infektion) abgelagert und zum Anderen ist die glomeruläre Basalmembran der direkte Angriffspunkt für antikörpervermittelte Immunreaktionen (z.B. bei Lupus erythematodes). Die Glomerulosklerosen bei der diabetischen Nephropathie und bei Hypertonie beruhen primär auf dem erhöhten intraglomerulären Druck und der damit verbundenen Hyperfiltration. Des Weiteren führen direkte Schädigungen der Basalmembran durch Toxine (z.B. Heroin) zu sklerotischen Veränderungen der Glomeruli.

Wie auch bei der Untersuchung der interstitiellen Fibrose, sollte auch bei dieser Analyse die morphologische Veränderung der Nieren ausgeschlossen werden.

Elastica van Gieson-Färbung

In den Elastica van Gieson gefärbten Nierenschnitten wurde die Dicke der Tunicae medii der Arterien untersucht. Um verschieden dicke Arterien miteinander vergleichen zu können, wurde ein Quotient aus der Fläche der Media und der Fläche des Gefäßlumens gebildet. Dieser Quotient wird größer bei der Verdickung und kleiner bei der Verdünnung der Media. Die Ursache einer Hypertrophie der Media kann der dauerhaft erhöhte intravasale Druck oder die dauerhafte Leistungssteigerung, z.B. durch das RAAS, der glatten Muskulatur sein.

5.1.6 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots wurden die relativen Mengen der Adenosinrezeptoren in den Lysaten aus Leber- und Nierengewebe bestimmt. Die Western-Blot-Untersuchung eignet sich lediglich zur semiquantitativen Analyse, erbringt aber keine Aussage über die Lokalisation der Rezeptoren.

Da für die Analyse der Nieren jeweils eine Probe, die sowohl Anteile aus Mark und Rinde enthielt, verwendet wurde, kann über die lokalen Veränderungen der Rezeptorendichte in diesen sehr unterschiedlichen Regionen der Niere keine Aussage gemacht werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind vorsichtig zu beurteilen, da gegenläufige Regulationen der Rezeptorexpressionen in den beiden Bereichen der Niere möglicherweise durch die gemeinsame Untersuchung verborgen blieben.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Modell der Thioacetamid-induzierten Leberzirrhose mit eingeschränkter Nierenfunktion

Patienten mit Leberzirrhose sind häufig in einem Zustand der kalorischen Unterernährung, aus welchem langfristig eine Gewichtsabnahme mit Schwund der Muskulatur resultiert.

In unserem Versuch nahmen die Kontrolltiere im Durchschnitt 113g zu, wohingegen die TAA-Tiere 73g an Gewicht verloren. Diese starke Abnahme lässt sich zum Teil auf die Konzentrationserhöhung in der zwölften Woche zurückführen. In den Gewichtskurven ist zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Knick nach unten festzustellen (siehe Abb.3, Tab.1).

Die in unserem Experiment beobachtete starke Gewichtsreduktion der TAA-Tiere trotz normaler Futteraufnahme wurde auch im Experiment von Fernández festgestellt (Fernandez et al. 2005) (siehe Tab.3).

Die Ursachen für Unterernährung bei Patienten mit Leberzirrhose sind vielfältig und die pathophysiologischen Vorgänge komplex. Die Patienten leiden unter Anorexie und Nausea und haben deshalb oft eine reduzierte Nahrungsaufnahme. Zudem kommt es durch die auftretende Maldigestion und Malabsorption (durch die portale Hypertonie bedingte Enteropathie, Pankreasinsuffizienz und Gallensäurenmangel im Darm) zum Rückgang der Nährstoffverwertung (McCullough and Tavill 1991). Zusätzlich zu der verminderten Nahrungsaufnahme und der Störung der Digestion und Absorption, besteht ein erhöhter Nährstoff- und Energiebedarf. So muss aufgrund der Verminderung der Glykogenreserven in der Leber, Glukose durch den energieverbrauchenden Prozess der Gluconeogenese bereitgestellt werden. Bei der aktiven Zirrhose ist auch der Proteinumsatz erhöht, wobei die gesteigerte Proteolyse nicht adäquat durch die Proteinsynthese kompensiert werden kann, so dass die Gesamtmasse der Körperproteine abnimmt (Cabre et al. 1990). Auch die hormonelle Dysregulation erhöht den Energiebedarf. Die eingeschränkte Bildung der Somatomedine, besonders insuline-like growth factor 1 in der Leber, bewirkt eine katabole Stoffwechselreaktion und auch der erhöhte Katecholaminspiegel induziert einen Stress-Stoffwechsel mit gesteigerter Proteolyse (Gerok and Blum 1995; Vyzantiadis et al. 2003).

Da in unserer Studie keine Minderung der Futteraufnahme beobachtet wurde, sondern in der ersten Hälfte des Versuches die TAA-behandelten Tiere sogar eine vermehrte Nahrungsaufnahme zeigten, kann die unzureichende Nahrungszufuhr als Ursache der Gewichtsreduktion ausgeschlossen werden.

Die Ausbildung von portal-hypertensiven Enteropathien wurde auch bei Ratten beschrieben, allerdings wurde die Auswirkung auf die Verdauung nicht untersucht (Sanchez-Patan et al. 2006). In unserem Versuch wurden bei der Beschauung der Bauchhöhle keine Zeichen, wie z.B. verdickte oder gerötete Darmschlingen entdeckt, die auf Enteropathien hinweisen

würden. Bei Ratten mit Kohlenstofftetrachlorid-induzierter Leberzirrhose wurden keine morphologische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse gefunden, dennoch war der Gehalt an Verdauungsenzymen niedriger als bei Kontrolltieren (Ogasawara et al. 1999; Ariosto et al. 1989). Bei der TAA-induzierten Zirrhose ist die Erhöhung der Gallensäurekonzentration im Urin beschrieben (Kawai et al. 2009). Die Gallensäuren werden bei ihrer enterohepatischen Zirkulation aus dem Pfortaderblut durch die zirrhotische Leber vermindert extrahiert. Sie treten deshalb vermehrt in die periphere Zirkulation über und werden über den Urin ausgeschieden. Die Folge des gestörten Gallensäuremetabolismus ist eine verminderte Resorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen.

Bei früheren Untersuchungen der isolierten Lebern von TAA-behandelten Ratten wurde keine Verminderung der Glykogenreserven festgestellt und bei nervale Stimulation wurde annähernd gleichviel Glukose freigesetzt, wie aus den Lebern der Kontrolltiere (Zimmermann et al. 1992). Durch die Bestimmung der Elongationsfaktoren der Proteinsynthese wurde in den Lebern mit TAA-induzierter Zirrhose ein Rückgang der Proteinsynthese um 50% festgestellt (Gressner and Greiling 1977). Unter anderem ist auch die Produktion von insuline-like growth factor 1 vermindert (Novosyadlyy et al. 2005). Die Katecholaminspiegel wurden in dem Modell der TAA-induzierten Leberzirrhose bislang nicht direkt gemessen. Allerdings wurde im Nebennierenmark eine erhöhte metabolische Aktivität festgestellt, was die verstärkte Synthese von Adrenalin und Noradrenalin nahelegt (Mendez-Lopez et al. 2005).

Diese Befunde und Studien deuten darauf hin, dass die starke Gewichtsabnahme bei der TAA-induzierten Leberzirrhose auf die Störung der Fettresorption, auf die Rückgang der Proteinsynthese und auf der hormonellen Dysregulation beruhen. Unterschiede zur humanen Zirrhose sind, dass die Nahrungsaufnahme nicht reduziert ist und der Glykogen- und Glukosemetabolismus nicht verändert ist.

Die TAA-Behandlung führte zur Minderung der Wasseraufnahme, die sich im Laufe des Versuches verstärkte. Wahrscheinlich ist die Änderung des Trinkverhaltens zum Teil durch den veränderten Geruch und den vermutlich veränderten Geschmack des Tränkewassers bedingt. Dafür spricht, dass die verminderte Wasseraufnahme schon ab den ersten Tagen zu beobachten war.

Der weitere Rückgang der Wasseraufnahme im Verlauf des Versuches wird als ein Zeichen der beeinträchtigten glomerulären Filtrationsleistung gewertet (siehe Abb.4). Da bei den Tieren kein Aszites und keine Ödeme beobachtet wurden, gehen wir davon aus, dass die aufgenommene Wassermenge mit dem Harnvolumen korreliert. Diese Hypothese wird durch die Steigerung der Wasseraufnahme bei der Furosemidbehandlung bestätigt.

Am Ende der achtzehnwöchigen TAA-Behandlung wiesen die Tiere eine ausgeprägte Fibrose der Leber mit signifikanter Erhöhung des relativen Lebergewichts auf (siehe Abb.8). In Versuchen, in denen ebenfalls das Modell der TAA-induzierten Leberzirrhose verwendet wurde, wurden ähnliche Befunde aufgezeichnet (Lukivskaya et al. 2008; Kinoshita et al. 2007).

Die Beobachtung, dass sich die Bilirubinwerte bis zur achten Woche erhöhten und dann bis zur sechzehnten Woche weiter stiegen, deutet auf eine kontinuierliche Verschlechterung der Leberfunktion hin (siehe Tab.9, Tab.10). Bei der Beschauung der Tierkörper und bei der regelmäßigen Beobachtung der Kotbeschaffenheit wurden keine Hinweise auf prähepatische oder posthepatische Ursachen für die Erhöhung des Bilirubinspiegels gefunden. Bei erworbenen Leberkrankheiten beruht der Ikterus überwiegend auf einer Störung der Bilirubinsekretion aus den Hepatozyten in die Gallenkanalikuli, während Bilirubinaufnahme, -speicherung und -konjugation in der Regel nicht eingeschränkt sind. Die Ausscheidung aus der Leberzelle erfolgt gegen einen hohen Konzentrationsgradienten und wird hauptsächlich über aktive Transportmechanismen bewerkstelligt. Es ist nicht geklärt, ob die Herabsetzung der Ausscheidung auf der Aktivitätsminderung der Transportsysteme oder auf der verminderten Energiebereitstellung für den Transport beruht (Gerok and Blum 1995).

Im Experiment von Nakatani et al. wurde nach einer zwölfmonatigen oralen TAA-Applikation an CD-Ratten eine dreifache Erhöhung des Bilirubinspiegels verglichen mit den Kontrolltieren festgestellt, und im Versuch von Ma et al. wurde nach einer 60-tägigen TAA-Gabe ebenfalls an CD-Ratten der sechsfache Bilirubinspiegel verglichen mit den Kontrolltieren gemessen (Ma et al. 1999; Nakatani et al. 2001). Die in unserem Versuch gesehene dreizehnfache Erhöhung der Bilirubinkonzentration lässt sich auf die vergleichsweise lange Versuchsperiode und die hohe TAA-Konzentration zurückführen.

Analog zur Leberzirrhose des Menschen und zu Untersuchungsergebnissen bei Ratten mit TAA-induzierten Leberzirrhose wurde in unseren Versuch eine Abnahme der Serumalbumin-Konzentration festgestellt (Fontana et al. 1996) (siehe Tab.10). Eine vermehrte Albuminausscheidung über den Urin konnte durch die Urinuntersuchung ausgeschlossen werden. Es wurden auch keine weiteren Ursachen für einen Albuminverlust oder eine Umverteilung festgestellt, wie es bei einer akuten Entzündung oder Aszites der Fall wäre. Auch eine Proteinmangelernährung ist unwahrscheinlich als Ursache, da die TAA-behandelten Tiere, verglichen mit den Kontrollen, ähnliche Mengen Futter aufnahmen und trotzdem niedrigere Serumalbuminspiegel hatten. Demnach kann man feststellen, dass die Abnahme der Serumalbumin-Konzentration ein Zeichen der verminderten Syntheseleistung der Leber ist.

Die Erhöhung der Cholinesteraseaktivität ist ein unerwarteter Befund in unserem Modell, da Cholinesterasen in den Parenchymzellen der Leber synthetisiert werden und deshalb bei der Schädigung des Lebergewebes ein erniedrigter Serumspiegel zu erwarten ist (Schmidt 1967)

(siehe Tab.10). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass die Blutentnahme nach einer TAA-freien Periode von 24 Stunden in den Stoffwechselläufigen erfolgte, und deshalb zu diesem Zeitpunkt die Leber nicht unter Gift-Exposition stand. Für ein schnelles, überschießendes Wiedereinsetzen der Cholinesterasesynthese sprechen die Veröffentlichungen von Li und Milcheva (Milcheva and Khubenova 1988;Li et al. 2004). In der Arbeit von Li et al. wurde vier Stunden nach der intravenösen Alkoholapplikation bei Ratten ein Anstieg des Serum-Cholinesterase-Spiegels gemessen, Milcheva et al. haben bei Patienten mit einer Knollenblätterpilz-Vergiftung nach einem primären Cholinesterase-Abfall eine Erhöhung des Cholinesterase-Spiegels über das durchschnittliche Niveau hinaus festgestellt (Li et al. 2004;Milcheva and Khubenova 1988).

Die verminderte Kreatininkonzentration im Serum lässt sich mit der Abnahme der Muskelmasse bei Leberzirrhose erklären (siehe Tab.10). In der Studie von Baxmann et al. wurde eine Korrelation zwischen Serumkreatinin und Muskelmasse bzw. zwischen Urinkreatinin und Muskelmasse festgestellt (Baxmann et al. 2008). Deshalb kann allein aufgrund der verminderten Kreatininausscheidung keine Aussage über die Nierenfunktion gemacht werden. Die GFR, ermittelt anhand der Kreatinin-Clearance, in der die Kreatininkonzentrationen von Serum und Urin eingerechnet sind, zeigte in der unbehandelten TAA-Gruppe, verglichen mit den Kontrollen, einen Rückgang von 31%. Bei einer GFR-Minderung bis zu 50% ist keine Erhöhung der Retentionswerte zu erwarten und man spricht von einer Funktionseinschränkung der Niere mit voller Kompensation. Ming et al., die als einzige die Nierenfunktion bei der TAA-induzierten Leberzirrhose der Ratte untersuchten, stellten basierend auf den Kreatinin-Clearance eine geringere Funktionseinschränkung fest (Ming et al. 2005). Sie ging mit vermindertem Urinfluss und einer Abnahme der Natriumausscheidung einher.

Der gemessene Blutdruckabfall ist ebenfalls ein für Zirrhose- und HRS-Patienten typischer Befund und wurde auch bei zirrhatischen Ratten mit verminderter Nierenfunktion beobachtet (siehe Abb.6)(Schrier et al. 1988;Ming et al. 2005).

In den Versuchen von Ming et al. und Hori et al. wurden, neben dem verminderten systemischen Blutdruck, auch die Verminderung des systemischen Gefäßwiderstandes, der Anstieg des Pfortaderdruckes und die Dilatation der Gefäße im Splanchnikusgebiet festgestellt (Hori et al. 1993;Ming et al. 2005). Der in unserem Modell gemessene Blutdruckabfall beruht somit wahrscheinlich auch auf den für die TAA-induzierte Leberzirrhose typischen, hämodynamischen Veränderungen.

Bei der histologischen Untersuchung der Nieren wurden keine morphologischen Veränderungen gefunden, was auf eine, für das HRS typische, rein funktionelle Niereninsuffizienz schließen lässt (Arroyo et al. 2008) (siehe Tab.12, Abb.10, Abb.11).

5.2.2 Vergleich der Gruppen ohne TAA unter Behandlung mit Furosemid und/oder SLV329

Die unterschiedlichen Behandlungsarten hatten lediglich geringe Auswirkungen auf die Gruppen ohne TAA-Behandlung.

Die Wasseraufnahme als Surrogat für die Diurese wurde durch alle Behandlungsarten gesteigert, allerdings nur um ca. 10%. Eine statistischen Signifikanz konnte nur mit der Furosemidbehandlung und mit der kombinierten Behandlung mit Furosemid und SLV329 erreicht werden (siehe Abb.4).

Außer der diuretischen Wirkung hatten die verschiedenen Behandlungen einen signifikanten Einfluss auf den systolischen Blutdruck (siehe Abb.6). Die Senkung des Blutdrucks durch die Furosemidapplikation ist eine typische unerwünschte Wirkung dieser Substanz. Dieser Effekt beruht auf der erhöhten Diurese und auf direkten Einflüssen auf das kardiovaskuläre System, wie z.B. die Hemmung der vaskulären α -Carbonanhydrasen (Sechi et al. 1990; Puscas et al. 1999).

Aus Solvay-internen Vorversuchen mit SLV329 ist ein positiv chronotoper und blutdrucksteigernder Effekt dieser Substanz bei Ratten bekannt. Ein tendenzielle Blutdrucksteigerung wurde auch bei unseren SLV329-behandelten Tieren beobachtet (Solvay Pharmaceuticals 2005). Da A_1R nur in der Niere an der direkten Regelung der Gefäßspannung beteiligt ist, ist vermutlich dieser leichte blutdrucksteigernde Effekt auf die verbesserte Herzleistung zurückzuführen (Gao et al. 2001). Bei der kombinierten Behandlung mit Furosemid und SLV329 wurden die blutdruckmindernden Effekte von Furosemid durch die blutdrucksteigernde Wirkung von SLV329 kompensiert.

5.2.3 Vergleich der Gruppen mit TAA unter Behandlung mit Furosemid und/oder SLV329

Die herausragenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsformen der TAA-Gruppen bestanden in der Mortalität, im Flüssigkeitsumsatz und in der GFR.

Die Sterblichkeit lag in der TAA+Fur.-Gruppe mit 53% am höchsten und war signifikant höher als in der TAA+SLV-Gruppe (16%), der Gruppe mit der geringsten Mortalität innerhalb der TAA-behandelten Tiere (siehe Abb.16).

Die Behandlung mit Furosemid und die Kombinationstherapie mit Furosemid und SLV329 führte bei den TAA-Tieren zu einer verstärkten Gewichtsreduktion, während die SLV329-behandelten Tiere eine geringere Abnahme des Körpergewichtes zeigten (siehe Abb.3). Dieser Effekte waren so stark, dass die Tiere der TAA+SLV-Gruppe trotz ebenfalls erhöhtem Flüssigkeitsumsatzes am Ende des Versuches 18% mehr wogen als die Tiere der TAA+Fur.-

Gruppe und verglichen mit der TAA+Fur.+SLV-Gruppe im Durchschnitt 10% höhere Körpergewichte aufwiesen (siehe Tab.1). Vermutlich beruhen diese Unterschiede auf der höheren Futteraufnahme und dem geringer gesteigerten Flüssigkeitsumsatz der SLV329-behandelten Tiere (siehe Tab.3, Abb.4). Aber aufgrund der Komplexität der Pathomechanismen der metabolischen Störungen bei der Leberzirrhose kann keine genaue Aussage über die Ursachen der unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen gemacht werden.

Sowohl die Furosemid- als auch die SLV329-Behandlung steigerten den Flüssigkeitsumsatz als Surrogat für die Diurese, Furosemid jedoch stärker als SLV329 (siehe Abb.4). Die Kombination beider Substanzen erbrachte eine noch deutlichere Steigerung. Allerdings bewirkte die Behandlung mit Furosemid und mit Furosemid+SLV329 eine tendenzielle Verschlechterung der GFR, verglichen mit der unbehandelten TAA-Gruppe. Nur die SLV329-Behandlung ohne Furosemid hatte einen positiven Effekt auf die GFR. Zwar war die Verbesserung gegenüber der unbehandelten TAA-Gruppe statistisch nicht signifikant, aber verglichen mit den Furosemid- bzw. Furosemid und SLV329-behandelten Gruppen war eine deutliche Steigerung der GFR durch die SLV329-Monotherapie feststellbar ($p < 0,05$ vs. TAA+Fur.+SLV; $p = 0,056$ vs. TAA+Fur.) Dies unterstützt die These eines renoprotektiven Effektes des A₁R-Antagonismus.

Die Ergebnisse der Blutuntersuchung in der sechzehnten Woche deuten auf eine stärkere Leberschädigung in den TAA+Fur.+SLV- und TAA+Fur.-Gruppen im Vergleich zu den anderen TAA-behandelten Gruppen an. Da bei Ratten, die chronisch mit TAA behandelt wurden, mit steigenden Bilirubinspiegeln ein höheres Ausmaß der Fibrose beschrieben ist, steht die tendenziell milder ausgeprägte Leberfibrose in diesen Gruppen scheinbar im Gegensatz zu den Ergebnissen der Blutuntersuchung (siehe Tab.6, Abb.8)(Assy et al. 2007; Mitra et al. 2000). Diese Diskrepanz der Befunde lässt sich dadurch erklären, dass die Lebern der Tiere, die zwischen der Serumuntersuchung und der Organentnahme gestorben sind, nicht histologisch untersucht wurden. So ergab sich bei der histologischen Untersuchung eine Selektion zu Gunsten der „gesünderen“ Tiere. Diese ist auch erkennbar, wenn man die Verteilung der Tiere hinsichtlich der Leberfibrose beobachtet (siehe Abb.8). Während in der TAA- und in der TAA+SLV-Gruppe auch Tiere mit über 10% Fibrosefläche vertreten sind, gab es in der TAA+Fur.- und in der TAA+Fur.+SLV-Gruppe zum Zeitpunkt der Organentnahme nur Tiere mit milder ausgeprägten Fibrose. Aus der TAA+Fur.-Gruppe sind zwei und aus der TAA+Fur.+SLV-Gruppe drei Tiere nach der Blutentnahme in der 16. Woche verstorben und wurden nicht histologisch ausgewertet. Alle zwischen der sechzehnten Woche und Versuchsende verstorbenen Tiere hatten Bilirubinwerte über 20 $\mu\text{mol/l}$. Wenn man diese „kränkeren“ Tiere aus der Auswertung der GFR in der sechzehnten Woche ausschließt, bleibt immer noch eine starke Tendenz ($p = 0,068$) für eine Verbesserung der Nierenfunktion durch SLV329 verglichen mit der Furosemidbehandlung, trotz stärker entwickelter Fibrose der Leber in der TAA+SLV-Gruppe.

Eine weitere Erklärung für die höheren Bilirubinspiegel bei den Furosemid-behandelten Tieren ist, dass Furosemid zur Verdrängung des Bilirubins aus der Albuminbindung führen kann. Die Bindung an Albumin verhindert den Abstrom von Bilirubin in das Gewebe und ist auch von Bedeutung für den gerichteten Transport (Gerok and Blum 1995).

Da bei TAA-behandelten Ratten gezeigt wurde, dass in diesem Modell kein portaler Kollateralkreislauf ausgebildet wird, steigt mit höherem Fibrosegrad der Leber auch der Pfortaderblutdruck (Mendez-Lopez et al. 2007). Angesichts der Tatsache, dass die Pathomechanismen des hepatorenalen Syndroms zum großen Teil auf der portalen Hypertonie beruhen (Arroyo et al. 2008;Jalan et al. 1997), kann man davon ausgehen, dass die TAA+SLV-Gruppe trotz stärker ausgeprägter Fibrose und damit stärker aktiviertem HRS-Pathomechanismus eine bessere Nierenfunktion hatte als die TAA+Fur.-Gruppe.

5.2.4 Regulation der Adenosinrezeptoren

5.2.4.1 Regulation der Adenosinrezeptoren in der Leber

Die Western-Blot-Untersuchungen zeigten in den Lebern der TAA-behandelten Tiere verminderte $A_{2A}R$ - und $A_{2B}R$ -Dichten (siehe Abb.12, Abb.13). Aus Versuchen mit Knockout-Mäusen ist die fundamentale Rolle von $A_{2A}R$ in der Entwicklung der Leberzirrhose bekannt (Chan et al. 2006). Bei Versuchen mit $A_{2A}R$ -defizienten Mäusen entwickelte sich trotz der Applikation von Lebergiften keine Leberfibrose und auch durch die Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit $A_{2A}R$ -Antagonisten wurde die Fibrosierung reduziert. Die Behandlung mit $A_{2B}R$ -Antagonisten verringerte hingegen nicht die Leberfibrose.

Es gibt nur zwei Studien, die sich mit der Adenosinrezeptor-Regulation in der zirrhotischen Leber beschäftigt haben (Chan et al. 2006;Peng et al. 2008). In den Lebern von Mäusen mit Kohlenstofftetrachlorid-induzierter Zirrhose wurde die zwei bis vierfache Erhöhung der mRNA-Expression aller vier Adenosinrezeptortypen gemessen (Peng et al. 2009). Die Real-time RT-PCR-Analyse im murinen Modell des TAA-induzierten Leberzirrhose erbrachte ebenfalls eine erhöhte mRNA-Expression in der Leber (Chan et al. 2006). Diese Befunde stehen scheinbar im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, da in beiden Studien die Hochregulierung der Rezeptoren auf der mRNA-Ebene beobachtet wurde. Die Proteinsynthese wird allerdings sowohl über die transkriptionelle als auch über post-transkriptionelle Mechanismen reguliert. Die Mechanismen der post-transkriptionellen Regelung sind z.B. der vermehrte Abbau der mRNA, das Binden der RNA durch Proteine oder die Verlangsamung der Translation durch verschiedenste Signalübermittlungsketten. Entsprechend führt die verstärkte Transkription der Gene auf mRNA nicht definitiv zu vermehrter Proteinsynthese.

5.2.4.2 Regulation der Adenosinrezeptoren in der Niere

In den Nieren der SLV329-behandelten Kontrolltiere war eine geringere A₁R-Dichte festzustellen als bei den unbehandelten bzw. bei den mit Furosemid behandelten Kontrollen (siehe Abb.14, Abb.15). Dies spricht für eine Downregulation der Rezeptordichte entweder durch verminderte Synthese oder durch Internalisierung und anschließende Degradation der Rezeptoren. Die Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Reaktion auf Antagonisten wurde oftmals beschrieben (Roettger et al. 1997; Bhowmick et al. 1998; Pfeiffer et al. 1998). Da bei diesen Studien die Aktivierung der Rezeptoren durch den Antagonisten ausgeschlossen wurde, wird vermutet, dass die Internalisierung der Rezeptoren aufgrund der Veränderung der Rezeptorkonformation durch den Antagonisten eingeleitet wird. Unklar bleibt, wieso dieser Effekt von SLV329 nicht bei der gleichzeitigen Gabe von Furosemid zu beobachten war.

Auch in den Nieren der TAA-behandelten Tiere war eine verminderte A₁R-Expression festzustellen (siehe Abb.14, Abb.15). Beim HRS kommt es wegen der verminderten Nierendurchblutung zur Akkumulation von Adenosin und durch die verstärkte Stimulation der renalen A₁R zur Verstärkung der Vasokonstriktion in kortikalen Gefäßen der Niere (Llach et al. 1993). Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der renalen A₁R-Dichte ist, dass die A₁R-Expression gemindert wird, um eine zusätzliche Verschlechterung der Versorgung der ischämischen Niere zu verhindern. Ein auslösendes Signal für die Downregulation ist vermutlich die Anhäufung von Adenosin, zu der es aufgrund der katabolen Stoffwechsellage infolge verminderter Blutversorgung kommt. Eine ligandenbedingte Downregulation der renalen A₁R wurde auch nach chronischer Hochsalzdiät bei Ratten festgestellt (Zou et al. 1999b).

5.2.5 Schwachpunkte der Studie

5.2.5.1 Natriumausscheidung

Nach der Diskussion der Ergebnisse ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass wir keine verminderte Natriumausscheidung feststellen konnten. Diese Veränderung ist ein häufiges Zeichen für die Nierenfunktionsminderung bei Aszitespatienten und ein typisches Symptom des HRS, sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen (Pereira et al. 2008; Rincon et al. 1999; Laffi et al. 1994; Rivera-Huizar et al. 2006) (siehe Tab.9, Tab.10). Es ist überraschend, dass in dem unseren sehr ähnlichen Versuch von Ming et al., nach 90-tägiger TAA-Gabe an

Ratten ebenfalls eine verminderte Natriumausscheidung festgestellt werden konnte (Ming et al. 2005). Die Unterschiede zu unserem Experiment sind, dass in dem Versuch von Ming et al. kleinere weibliche Ratten verwendet wurden und die TAA-Dosis nicht an die Gewichtsentwicklung der Tiere angepasst wurde. Alter und Geschlecht der Tiere dürften keine Rolle in der Entwicklung der Natriumretention spielen, aber die nicht angepasste TAA-Dosen führten, im Vergleich zu unserem Modell, zu einer stärker ausgeprägten Zirrhose. Eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit der Natriumretention könnte also eine im Vergleich milder ausgeprägte Zirrhose sein, die dann zu einer schwächeren Aktivierung der bei Leberzirrhose und HRS für die Natriumretention verantwortlichen Systeme (RAAS, SNS, Vasopressin) geführt hat.

5.2.5.2 Limitationen bei der Abschätzung der Diurese

Vergleicht man die in den zweiten und dritten Stoffwechselversuchen gewonnenen 24-Stunden-Urinvolumina zwischen den Gruppen, sind weder ein antidiuretischer Effekt von TAA noch diuretische Effekte der Furosemid- und SLV329-Behandlung zu erkennen (siehe Tab.9, Tab.10). Vergleicht man dagegen die aufgenommenen Trinkwassermengen zwischen der dritten und achten Woche sowie zwischen der neunten und achtzehnten Woche, so ist eine deutliche Reduktion durch TAA-Applikation und ein klarer Anstieg durch Furosemid- und SLV329-Gabe feststellbar (siehe Abb.4).

Im ersten Stoffwechselversuch, also noch vor dem Beginn der TAA-Applikation und der Behandlung mit Furosemid oder SLV329, wurden Harnvolumina zwischen 26 und 96 ml pro 24 Stunden gemessen. Die individuell sehr unterschiedlichen Reaktionen der Tiere auf die Versuchsbedingungen in den Stoffwechselkäfigen führten zu einer sehr großen Schwankungsbreite der Urinvolumina. Unter anderem kann dies an einer Stimulation des Sympathikus im Rahmen der Stresssituation (Isolation, unbequeme Unterbringung) mit konsekutiv verminderter Harnproduktion gelegen haben (Koepke et al. 1988). Da bei den Tieren kein Aszites, keine Ödeme und keine Unterschiede in der Kotbeschaffenheit festgestellt wurden, gehen wir davon aus, dass die aufgenommenen Wassermengen im Sinne des Gesamtwasserumsatzes mit den Harnvolumina und somit mit der Diurese korrelieren. Deshalb haben wir zur Einschätzung der Diurese die Wasseraufnahme der Tiere miteinander verglichen.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Behandlung mit dem A₁R-Antagonisten SLV329 bei der Leberzirrhose der Ratte gegenüber der Furosemidbehandlung bei ähnlicher Steigerung des Flüssigkeitsumsatzes bzw. der Diurese für die Nierenfunktion Vorteile bringt. Wenn ähnliche Effekte bei Menschen erzielbar wären, könnte die SLV329-Behandlung von Asziten und Ödemen bei Patienten mit Leberzirrhose möglicherweise die Entwicklung eines HRS verhindern oder verzögern, und bei Patienten mit HRS das Überleben verlängern.

Um den Vorteil des Einsatzes von SLV329 eindeutig unter Beweis zu stellen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Zunächst bleibt zu untersuchen, ob die diuretische Wirkung von SLV329 für die Verbesserung eines Aszites ausreicht. So wäre es sinnvoll, SLV329 in einem Modell der dekompensierten Leberzirrhose mit Beeinträchtigung der Nierenfunktion zu prüfen. Dafür wäre unter den Leberzirrhosemodellen der Ratte die Erzeugung der Zirrhose durch Ligatur der Gallenwege geeignet (Pereira et al. 2008; Assimakopoulos and Vagianos 2009). Es ist bekannt, dass der Einsatz von Diuretika zur Bewältigung des Aszites bei Patienten mit dekompensierter Zirrhose die Verschlechterung der Nierenfunktion verursacht (Laffi et al. 1994). Die Verbesserung des Aszites ohne weitere Verschlechterung oder gar mit Verbesserung der Nierenfunktion wäre für die HRS-Prophylaxe von besonderem Interesse.

Überdies wäre ein Vergleich der SLV329- mit einer Spironolacton-Behandlung interessant, da Spironolacton die erste Wahl unter den Diuretika zur Aszitestherapie ist (Hou and Sanyal 2009). In der Klinik wird bei der Aszitesbehandlung von Leberzirrhosepatienten mit Spironolacton begonnen. Wenn mit der empfohlenen Höchstdosis nicht der gewünschte Effekt erreicht wird, wird zusätzlich Furosemid appliziert (Moore and Aithal 2006). Auch die Intensivierung der diuretischen Wirkung von Spironolacton durch die Kombination mit einem A₁R-Antagonisten wäre denkbar. Es bleibt zu untersuchen, ob die Verknüpfung dieser Therapien zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt bzw. die Diurese soweit verstärkt, dass auf den Einsatz von Furosemid verzichtet werden kann.

Die renale Expression der Adenosinrezeptoren bei einer Nierenfunktionsminderung, hervorgerufen durch eine Leberzirrhose, wurde in dieser Studie erstmalig untersucht.

Die Western-Blot-Untersuchungen der Nierenproben, bestehend aus Mark und Rinde, zeigten verminderte renale A₁R-Expressionen bei den zirrhosepatientischen Tieren und auch die SLV329-Behandlung der Kontrolltiere führte zur Abnahme der A₁R-Dichte. Um Aussagen über die regionale Rezeptorexpressionen machen zu können, sind Antikörperfärbungen für die einzelnen Rezeptoren geplant.

6 Zusammenfassung

Einfluss des A₁-Adenosin-Rezeptorantagonisten SLV329 auf die Nierenfunktion im Modell der Thioacetamid-induzierten Leberzirrhose der Ratte

Hintergrund - Das hepatorenale Syndrom (HRS) ist primär eine funktionelle Niereninsuffizienz bei einer fortgeschrittenen Lebererkrankung. Die jährliche Inzidenz des HRS beträgt bei Patienten mit dekompensierter Zirrhose 8%. Häufig kommt es bei Zirrhotikern aufgrund der Aszitestherapie mit Diuretika zur Verschlechterung der Nierenfunktion und zur Entstehung von HRS.

Adenosin-A₁-Rezeptoren (A₁R) sind an der Pathogenese des HRS über mehrere Mechanismen beteiligt. Die A₁R-Aktivierung ist essenziell für die Auslösung des Adenosinakkumulation-bedingten hepatorenen Reflexes, wirkt stark vasokonstriktiv an den kortikalen Nierengefäßen und steigert die Natrium- und Wasserresorption in der Niere. Die Hemmung der A₁R führt zu einem Anstieg der Diurese ohne Minderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR).

Bei Herzinsuffizienz-Patienten wurde durch die kombinierte Therapie mit Furosemid und einen A₁R-Antagonisten eine Steigerung der Harnausscheidung ohne Verminderung der GFR erreicht.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden die Auswirkungen des A₁R-Antagonisten SLV329 auf die Nierenfunktion und auf die Diurese in der experimentell erzeugten Leberzirrhose der Ratte untersucht.

Methoden – Für die Untersuchungen wurde das Modell der Thioacetamid-induzierten (TAA) Leberzirrhose der Ratte gewählt. Ähnlich wie beim Menschen, kommt es in diesem Modell durch Entwicklung einer portalen Hypertonie und einer systemischen Hypotonie zur Verschlechterung der Nierenfunktion.

Männlichen Wistar-Ratten (N=53) wurde über achtzehn Wochen TAA verabreicht. Ab der achten Woche wurden die Tiere mit Furosemid, SLV329 oder mit beiden Substanzen behandelt. Eine Gruppe wurde nicht behandelt, um den Verlauf der unbehandelten Leberzirrhose zu beobachten. Als Kontrolle dienten Gruppen mit gesunden Ratten und entsprechender Behandlung (N=32). Die Entstehung der Leberzirrhose wurde durch die Messung der Leberenzyme und durch die histologische Untersuchung der Leber überprüft. Die Nierenfunktion wurde anhand der GFR beurteilt und die Diurese wurde mittels der Wasseraufnahmen geschätzt.

Die Expression der Adenosinrezeptoren wurde in Leber und Niere mittels Western-Blot untersucht.

Ergebnisse – Die TAA-Behandlung führte zu einer hohen Mortalität (36%), welche durch die Furosemidbehandlung gesteigert (53%) und durch die SLV329-Behandlung vermindert (16%, $p = 0,046$ vs. Furosemid-behandelte TAA-Ratten) wurde.

TAA führte zur Entwicklung einer ausgeprägten Leberzirrhose mit signifikanter Minderung der Diurese und Verschlechterung der Nierenfunktion (GFR).

Sowohl die Furosemidbehandlung als auch die SLV-Behandlung führte bei den TAA-behandelten Tieren zur Erhöhung der Diurese, jedoch bewirkte die Furosemidbehandlung zugleich eine tendenzielle Verminderung der GFR. Dagegen zeigten die SLV329-behandelten Tiere eine starke Tendenz zur Verbesserung der Nierenleistung.

Die kombinierte Therapie mit Furosemid und SLV329 führte zu einem stärkeren diuretischen Effekt als die Monotherapien, war aber, ähnlich wie die Furosemidbehandlung, nachteilig für die GFR.

Die unterschiedlichen Behandlungen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Leberzirrhose. In keiner der Gruppen konnten histologisch sichtbare Veränderungen in den Nieren festgestellt werden.

In der Leber der TAA-behandelten Tiere wurde eine Verminderung der Adenosin- A_{2A} - und Adenosin- A_{2B} -Rezeptorexpression festgestellt, während in der Niere eine Minderung der A_1R -Dichte zu beobachten war.

Schlussfolgerung – Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die Behandlung mit dem A_1R -Antagonisten SLV329 bei der Leberzirrhose der Ratte zu einer Steigerung der Diurese mit einer tendenziellen Verbesserung der Nierenfunktion führt. Die kombinierte Behandlung mit Furosemid und SLV329 hatte eine noch stärkere diuretische Wirkung, allerdings mit einer gleichzeitigen Verschlechterung der Nierenleistung.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SLV329-Monotherapie eine neue Vorgehensweise für die Aszitesbehandlung von Zirrhosepatienten bieten könnte und auch für Prophylaxe und Therapie des HRS eingesetzt werden könnte.

7 Summary

Effect of SLV329, an Adenosine A₁-Receptor Antagonist, on Renal Function in Thioacetamide-Induced Rat Model of Liver Cirrhosis.

Background and Purpose - Hepatorenal syndrome (HRS) is initially a functional renal failure that develops in patients with severe liver disease. Incidence of HRS in patients with decompensated cirrhosis is 8%. In cirrhotic patients with ascites, diuretic therapy is frequently followed by renal function disturbance, which can result in HRS.

Adenosine A₁ receptors (A₁R) are involved in the pathogenesis of HRS due to several mechanisms. Intrahepatic A₁R are responsible for the adenosine-mediated hepatorenal reflex. Activation of renal A₁R results in cortical vasoconstriction and stimulates reabsorption of sodium and fluid. Inhibition of renal A₁R increases urine output without deterioration in glomerular filtration rate (GFR).

In patients with congestive heart failure, urine volume increases and there is no deterioration in GFR when A₁R antagonist are given in addition to furosemide.

In the present study we analyzed the influence of the treatment with SLV329, an A₁R antagonist, on renal function and diuresis in a rat model of cirrhosis.

Methods – We tested the effect of SLV329 in thioacetamide (TAA) induced rat liver cirrhosis. This model mimics clinical conditions of liver cirrhosis characterized by portal hypertension and systemic hypotension. Cirrhosis was induced in male Wistar rats by TAA administration for eighteen weeks (N=53). After eight weeks, treatment with SLV329 or furosemide or both began. For the purpose of investigation of untreated cirrhosis, one group did not receive any therapy. The control groups consisted in healthy rats with equal treatment as TAA groups (N=32).

Development of liver cirrhosis was confirmed by measurements of liver enzymes activity and histological analyses of liver tissue. We estimated kidney function by calculation of GFR. Diuresis was assessed on the basis of water intake.

The expression of adenosine receptors was determined by Western blot analysis in liver and kidney.

Results – TAA treatment was associated with a high mortality (36%) and this was increased by furosemide (53%), whereas SLV329 reduced the mortality (16%, $p = 0.046$ vs. furosemide treated rats).

TAA caused distinctive liver cirrhosis with significant deterioration of diuresis and impairment of renal function (GFR).

Furosemide and SLV329 treatment enhanced diuresis significantly in TAA treated rats. However, furosemide led to further reduction of GFR. In contrast SLV329 treatment showed a strong trend towards improvement of renal function.

The dual therapy with furosemide and SLV329 produced a stronger diuretic effect than monotherapies with furosemide or SLV329 but affected renal function adversely.

Neither furosemide, nor SLV329 influenced the development of liver cirrhosis. No histologically detectable changes in renal tissue could be demonstrated in any treated group.

In TAA treated rats expression of adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors was lower in liver tissue and A_1R density was reduced in renal tissue.

Conclusion - The present study demonstrates that treatment with SLV329, an A_1R antagonist, produces a diuretic effect and tends to improve renal function in rats with liver cirrhosis.

Combined furosemide and SLV329 treatment additionally increase diuresis but with a decline in GFR.

SLV329 monotherapy thus may offer a novel approach to the management of cirrhotic ascites, and could be used for prophylaxis and therapy of HRS as well.

8 Zitierte Literatur

- Agarwal KC, Clarke E, Rounds S, Parks RE, Jr., Huzoor A. 1994. Platelet-activating factor (PAF)-induced platelet aggregation. Modulation by plasma adenosine and methylxanthines. *Biochem Pharmacol* 48:1909-1916.
- Aki Y, Tomohiro A, Nishiyama A, Kiyomoto K, Kimura S, Abe Y. 1997. Effects of KW-3902, a selective and potent adenosine A1 receptor antagonist, on renal hemodynamics and urine formation in anesthetized dogs. *Pharmacology* 55:193-201.
- Alessandria C, Ozdogan O, Guevara M, Restuccia T, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J, Gines P. 2005. MELD score and clinical type predict prognosis in hepatorenal syndrome: relevance to liver transplantation. *Hepatology* 41:1282-1289.
- Andrews WH, Palmer JF. 1967. Afferent nervous discharge from the canine liver. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 52:269-276.
- Arend LJ, Haramati A, Thompson CI, Spielman WS. 1984. Adenosine-induced decrease in renin release: dissociation from hemodynamic effects. *Am J Physiol* 247:F447-F452.
- Ariosto F, Riggio O, Cantafora A, Colucci S, Gaudio E, Mechelli C, Merli M, Seri S, Capocaccia L. 1989. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. *Eur Surg Res* 21:280-286.
- Arroyo V, Fernandez J, Gines P. 2008. Pathogenesis and treatment of hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis* 28:81-95.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. 2009. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 15:121-123.
- Assy N, Hussein O, Khalil A, Luder A, Szvalb S, Paizi M, Spira G. 2007. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci* 52:1187-1193.
- Bailey SA, Zidell RH, Perry RW. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol Pathol* 32:448-466.
- Balakrishnan VS, Coles GA, Williams JD. 1993. A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function. *Am J Physiol* 265:F504-F510.
- Bartrons R, Van Schaftingen E, Hers HG. 1984. The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect. *Biochem J* 218:157-163.
- Baxmann AC, Ahmed MS, Marques NC, Menon VB, Pereira AB, Kirsztajn GM, Heilberg IP. 2008. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:348-354.
- Beach RE, Good DW. 1992. Effects of adenosine on ion transport in rat medullary thick ascending limb. *Am J Physiol* 263:F482-F487.

- Beach RE, Watts BA, III, Good DW, Benedict CR, DuBose TD, Jr. 1991. Effects of graded oxygen tension on adenosine release by renal medullary and thick ascending limb suspensions. *Kidney Int* 39:836-842.
- Belardinelli L, Linden J, Berne RM. 1989. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis* 32:73-97.
- Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R. 1983. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 42:3136-3142.
- Betrosian AP, Agarwal B, Douzinas EE. 2007. Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J Gastroenterol* 13:5552-5559.
- Bhowmick N, Narayan P, Puett D. 1998. The endothelin subtype A receptor undergoes agonist- and antagonist-mediated internalization in the absence of signaling. *Endocrinology* 139:3185-3192.
- Bichet D, Szatalowicz V, Chaimovitz C, Schrier RW. 1982. Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients. *Ann Intern Med* 96:413-417.
- Blendis LM, Orrego H, Crossley IR, Blake JE, Medline A, Isreal Y. 1982. The role of hepatocyte enlargement in hepatic pressure in cirrhotic and noncirrhotic alcoholic liver disease. *Hepatology* 2:539-546.
- Brater DC. 1985. Resistance to loop diuretics. Why it happens and what to do about it. *Drugs* 30:427-443.
- Breising KA, Textor J, Perz J, Schiedermaier P, Raab P, Strunk H, Klehr HU, Kramer HJ, Spengler U, Schild H, Sauerbruch T. 2000. Long term outcome after transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt in non-transplant cirrhotics with hepatorenal syndrome: a phase II study. *Gut* 47:288-295.
- Brodehl J. 1961. [Thioacetamide in experimental liver research.]. *Klin Wochenschr* 39:956-962.
- Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, Persson AE. 2001. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1362-R1367.
- Buxton DB, Robertson SM, Olson MS. 1986. Stimulation of glycogenolysis by adenine nucleotides in the perfused rat liver. *Biochem J* 237:773-780.
- Cabre E, Gonzalez-Huix F, Abad-Lacruz A, Esteve M, Acero D, Fernandez-Banares F, Xiol X, Gassull MA. 1990. Effect of total enteral nutrition on the short-term outcome of severely malnourished cirrhotics. A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 98:715-720.
- Cardenas A, Gines P, Uriz J, Bessa X, Salmeron JM, Mas A, Ortega R, Calahorra B, De Las HD, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. 2001. Renal failure after upper gastrointestinal bleeding in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors, and short-term prognosis. *Hepatology* 34:671-676.

- Cardenas A, Lowe R, Oh S, Bodkin S, Kenney T, Lamorte WW, Afdhal NH. 2008. Hemodynamic effects of substance P and its receptor antagonist RP67580 in anesthetized rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 43:328-333.
- Chan ES, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, Yee H, Reiss AB, Pillinger MH, Chen JF, Schwarzschild MA, Friedman SL, Cronstein BN. 2006. Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol* 148:1144-1155.
- Chiandussi L, Bartoli E, Arras S. 1978. Reabsorption of sodium in the proximal renal tubule in cirrhosis of the liver. *Gut* 19:497-503.
- Churchill PC, Bidani A. 1987. Renal effects of selective adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am J Physiol* 252:F299-F303.
- Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. 1990. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* 85:1150-1157.
- Di Sole F. 2008. Adenosine and renal tubular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:399-407.
- Di Sole F, Cerull R, Petzke S, Casavola V, Burckhardt G, Helmle-Kolb C. 2003. Bimodal acute effects of A1 adenosine receptor activation on Na⁺/H⁺ exchanger 3 in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 14:1720-1730.
- DiBona GF, Kopp UC. 1997. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77:75-197.
- DiBona GF, Sawin LL. 1995. Hepatorenal baroreflex in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 269:G29-G33.
- Dietrich MS, Steinhausen M. 1993. Differential reactivity of cortical and juxtamedullary glomeruli to adenosine-1 and adenosine-2 receptor stimulation and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Microvasc Res* 45:122-133.
- Dittrich HC, Gupta DK, Hack TC, Dowling T, Callahan J, Thomson S. 2007. The effect of KW-3902, an adenosine A1 receptor antagonist, on renal function and renal plasma flow in ambulatory patients with heart failure and renal impairment. *J Card Fail* 13:609-617.
- Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. 1996. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118:1461-1468.
- Dunwiddie TV, Masino SA. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Epstein M, Berk DP, Hollenberg NK, Adams DF, Chalmers TC, Abrams HL, Merrill JP. 1970. Renal failure in the patient with cirrhosis. The role of active vasoconstriction. *Am J Med* 49:175-185.
- Epstein M, Levinson R, Sancho J, Haber E, Re R. 1977. Characterization of the renin-aldosterone system in decompensated cirrhosis. *Circ Res* 41:818-829.

- Fernandez I, Fontana L, Gil A, Riosc A, Torres MI. 2005. Dietary supplementation with monounsaturated and long-chain polyunsaturated fatty acids influences the liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in female Wistar rats in experimental cirrhosis induced by thioacetamide. *Exp Toxicol Pathol* 57:65-75.
- Fernandez J, Navasa M, Planas R, Montoliu S, Monfort D, Soriano G, Vila C, Pardo A, Quintero E, Vargas V, Such J, Gines P, Arroyo V. 2007. Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis. *Gastroenterology* 133:818-824.
- Fernandez-Rodriguez CM, Prieto J, Quiroga J, Zozoya JM, Andrade A, Nunez M, Sangro B, Penas J. 1995. Plasma levels of substance P in liver cirrhosis: relationship to the activation of vasopressor systems and urinary sodium excretion. *Hepatology* 21:35-40.
- Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J, Zozaya JM, Cobos MA, Rodriguez-Eire JL, Garcia-Plaza A, Leal J. 1989. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology* 97:1304-1312.
- Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forns X, Francitorra A, Rimola A, Gassull MA, Arroyo V, Rodes J. 1994. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 20:1495-1501.
- Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernandez MI, Rios A, Sanchez dM, Gil A. 1996. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology* 106:197-206.
- Forns X, Gines A, Gines P, Arroyo V. 1994. Management of ascites and renal failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 14:82-96.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skott O. 2002. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res* 90:996-1003.
- Gao E, Kaplan JL, Shi Y, Victain M, Dalsey WC, de Garavilla L. 2001. Adenosine A1 receptor antagonist prolongs survival in the hypoxic rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:384-394.
- Gerok W, Blum HE. 1995. Leberzirrhose. *Hepatology*.p 322-375.
- Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. 2002. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity--its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 30:365-372.
- Gines A, Escorsell A, Gines P, Salo J, Jimenez W, Inglada L, Navasa M, Claria J, Rimola A, Arroyo V, . 1993. Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology* 105:229-236.

- Givertz MM, Massie BM, Fields TK, Pearson LL, Dittrich HC. 2007. The effects of KW-3902, an adenosine A1-receptor antagonist, on diuresis and renal function in patients with acute decompensated heart failure and renal impairment or diuretic resistance. *J Am Coll Cardiol* 50:1551-1560.
- Gonzalez-Benitez E, Guinzberg R, Diaz-Cruz A, Pina E. 2002. Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca²⁺ and cAMP. *Eur J Pharmacol* 437:105-111.
- Gottlieb SS, Brater DC, Thomas I, Havranek E, Bourge R, Goldman S, Dyer F, Gomez M, Bennett D, Ticho B, Beckman E, Abraham WT. 2002. BG9719 (CVT-124), an A1 adenosine receptor antagonist, protects against the decline in renal function observed with diuretic therapy. *Circulation* 105:1348-1353.
- Grant BF, Dufour MC, Harford TC. 1988. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 8:12-25.
- Grden M, Podgorska M, Szutowicz A, Pawelczyk T. 2007. Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver. *Exp Mol Pathol* 83:392-398.
- Gressner AM, Greiling H. 1977. Determination of protein synthesis elongation factor activity in liver biopsy specimens from normal and cirrhotic rats. *Digestion* 15:348-352.
- Guarner F, Guarner C, Prieto J, Colina I, Quiroga J, Casas J, Freixa R, Rosello J, Gelpi E, Balanzo J. 1986. Increased synthesis of systemic prostacyclin in cirrhotic patients. *Gastroenterology* 90:687-694.
- Guevara M, Bru C, Gines P, Fernandez-Esparrach G, Sort P, Bataller R, Jimenez W, Arroyo V, Rodes. 1998a. Increased cerebrovascular resistance in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology* 28:39-44.
- Guevara M, Gines P, Bandi JC, Gilabert R, Sort P, Jimenez W, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. 1998b. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in hepatorenal syndrome: effects on renal function and vasoactive systems. *Hepatology* 28:416-422.
- Gulberg V, Gerbes AL. 1998. [Diagnosis and therapy of ascites in liver cirrhosis]. *Internist (Berl)* 39:254-262.
- Gulberg V, Gerbes AL. 2002. TIPS or vasoconstrictors for the treatment of hepatorenal syndrome type 1--effect on survival? *Z Gastroenterol* 40:823-826.
- Gupta S, Morgan TR, Gordan GS. 1992. Calcitonin gene-related peptide in hepatorenal syndrome. A possible mediator of peripheral vasodilation? *J Clin Gastroenterol* 14:122-126.
- Haider S, Saleem S, Shameem S, Ahmed SP, Parveen T, Haleem DJ. 2004. Is anorexia in thioacetamide-induced cirrhosis related to an altered brain serotonin concentration? *Pol J Pharmacol* 56:73-78.
- Harada H, Asano O, Hoshino Y, Yoshikawa S, Matsukura M, Kabasawa Y, Nijima J, Kotake Y, Watanabe N, Kawata T, Inoue T, Horizoe T, Yasuda N, Minami H, Nagata K, Murakami M, Nagaoka J, Kobayashi S, Tanaka I, Abe S. 2001. 2-Alkynyl-8-aryl-9-methyladenines as novel adenosine receptor antagonists: their synthesis and structure-activity relationships

- toward hepatic glucose production induced via agonism of the A(2B) receptor. *J Med Chem* 44:170-179.
- Herold G. 2007. Leberzirrhose. *Innere Medizin*.p 495-497.
- Hoenderop JG, Hartog A, Willems PH, Bindels RJ. 1998. Adenosine-stimulated Ca²⁺ reabsorption is mediated by apical A1 receptors in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol* 274:F736-F743.
- Hoffer LJ, Lowenstein JM. 1986. Effects of adenosine and adenosine analogues on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 35:4529-4536.
- Hori N, Okanou T, Sawa Y, Mori T, Kashima K. 1993. Hemodynamic characterization in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide administration. *Dig Dis Sci* 38:2195-2202.
- Hou W, Sanyal AJ. 2009. Ascites: diagnosis and management. *Med Clin North Am* 93:801-17, vii.
- Ibarra FR, Galceran T, Oddo E, Arrizurieta E. 1998. Changes in glomerular filtration rate and renal plasma flow in cirrhotic rats during converting enzyme inhibition. *Ren Fail* 20:65-74.
- Irvine RJ, White J, Chan R. 1997. The influence of restraint on blood pressure in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 38:157-162.
- Iwatsuki S, Popovtzer MM, Corman JL, Ishikawa M, Putnam CW, Katz FH, Starzl TE. 1973. Recovery from "hepatorenal syndrome" after orthotopic liver transplantation. *N Engl J Med* 289:1155-1159.
- Jackson EK. 1991. Adenosine: a physiological brake on renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31:1-35.
- Jackson EK, Dubey RK. 2001. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F597-F612.
- Jackson EK, Zhu C, Tofovic SP. 2002. Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F41-F51.
- Jalan R, Forrest EH, Redhead DN, Dillon JF, Hayes PC. 1997. Reduction in renal blood flow following acute increase in the portal pressure: evidence for the existence of a hepatorenal reflex in man? *Gut* 40:664-670.
- Kalambokis G, Economou M, Fotopoulos A, Bokharhii JA, Katsaraki A, Tsianos EV. 2005. Renal effects of treatment with diuretics, octreotide or both, in non-azotemic cirrhotic patients with ascites. *Nephrol Dial Transplant* 20:1623-1629.
- Kang HS, Kerstan D, Dai LJ, Ritchie G, Quamme GA. 2001. Adenosine modulates Mg(2+) uptake in distal convoluted tubule cells via A(1) and A(2) purinoceptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F1141-F1147.
- Kawabata M, Haneda M, Wang T, Imai M, Takabatake T. 2002. Effects of a nucleoside transporter inhibitor, dilazep, on renal microcirculation in rats. *Hypertens Res* 25:615-621.

- Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A. 2009. Efficacy of urine bile acid as a non-invasive indicator of liver damage in rats. *J Toxicol Sci* 34:27-38.
- Keller F, Heinze H, Jochimsen F, Passfall J, Schuppan D, Buttner P. 1995. Risk factors and outcome of 107 patients with decompensated liver disease and acute renal failure (including 26 patients with hepatorenal syndrome): the role of hemodialysis. *Ren Fail* 17:135-146.
- Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K. 2007. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 56:706-714.
- Koepke JP, Jones S, DiBona GF. 1988. Stress increases renal nerve activity and decreases sodium excretion in Dahl rats. *Hypertension* 11:334-338.
- Koppel MH, Coburn JW, Mims MM, Goldstein H, Boyle JD, Rubini ME. 1969. Transplantation of cadaveric kidneys from patients with hepatorenal syndrome. Evidence for the functional nature of renal failure in advanced liver disease. *N Engl J Med* 280:1367-1371.
- Kuan CJ, Wells JN, Jackson EK. 1989. Endogenous adenosine restrains renin release during sodium restriction. *J Pharmacol Exp Ther* 249:110-116.
- Kuan CJ, Wells JN, Jackson EK. 1990. Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. *Circ Res* 66:637-646.
- Kundiger R, Muller R, Bien E, Gohlke R. 1983. [Enzyme activities in the blood serum from rats with chronic liver damage. part 3: Effect of thioacetamide]. *Pharmazie* 38:257-261.
- Laffi G, La Villa G, Gentilini P. 1994. Pathogenesis and management of the hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis* 14:71-81.
- Laffi G, La Villa G, Pinzani M, Ciabattini G, Patrignani P, Mannelli M, Cominelli F, Gentilini P. 1986. Altered renal and platelet arachidonic acid metabolism in cirrhosis. *Gastroenterology* 90:274-282.
- Laleman W, Vander E, I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, Fevery J, Nevens F. 2006. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest* 36:242-249.
- Lang F, Gerok W, Haussinger D. 1993. New clues to the pathophysiology of hepatorenal failure. *Clin Invest* 71:93-97.
- Lang F, Tschernko E, Schulze E, Ottl I, Ritter M, Volkl H, Hallbrucker C, Haussinger D. 1991. Hepatorenal reflex regulating kidney function. *Hepatology* 14:590-594.
- Lenz K, Hortnagl H, Druml W, Reither H, Schmid R, Schneeweiss B, Laggner A, Grimm G, Gerbes AL. 1991. Ornipressin in the treatment of functional renal failure in decompensated liver cirrhosis. Effects on renal hemodynamics and atrial natriuretic factor. *Gastroenterology* 101:1060-1067.
- Li X, Benjamin IS, Alexander B. 2002. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 36:488-493.

- Li YM, Chen SH, Yu CH, Zhang Y, Xu GY. 2004. Effect of acute alcoholism on hepatic enzymes and oxidation/antioxidation in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:241-244.
- Light DB, Schwiebert EM, Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A, Karlson KH, McCann FV, Stanton BA. 1990. Chloride channels in the apical membrane of cortical collecting duct cells. *Am J Physiol* 258:F273-F280.
- Llach J, Gines P, Arroyo V, Salmeron JM, Gines A, Jimenez W, Gaya J, Rivera F, Rodes J. 1993. Effect of dipyridamole on kidney function in cirrhosis. *Hepatology* 17:59-64.
- Lukivskaya O, Patsenker E, Lis R, Buko VU. 2008. Inhibition of inducible nitric oxide synthase activity prevents liver recovery in rat thioacetamide-induced fibrosis reversal. *Eur J Clin Invest* 38:317-325.
- Ma Z, Zhang Y, Huet PM, Lee SS. 1999. Differential effects of jaundice and cirrhosis on beta-adrenoceptor signaling in three rat models of cirrhotic cardiomyopathy. *J Hepatol* 30:485-491.
- Mann HJ, Fuhs DW, Hemstrom CA. 1986. Acute renal failure. *Drug Intell Clin Pharm* 20:421-438.
- Margeli AP, Papadimitriou L, Ninos S, Manolis E, Mykoniatis MG, Theocharis SE. 2003. Hepatic stimulator substance administration ameliorates liver regeneration in an animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Liver Int* 23:171-178.
- Marik PE, Wood K, Starzl TE. 2006. The course of type 1 hepato-renal syndrome post liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 21:478-482.
- Maroto A, Gines A, Salo J, Claria J, Gines P, Anibarro L, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. 1994. Diagnosis of functional kidney failure of cirrhosis with Doppler sonography: prognostic value of resistive index. *Hepatology* 20:839-844.
- Maroto A, Gines P, Arroyo V, Gines A, Salo J, Claria J, Jimenez W, Bru C, Rivera F, Rodes J. 1993. Brachial and femoral artery blood flow in cirrhosis: relationship to kidney dysfunction. *Hepatology* 17:788-793.
- Martin PY, Gines P, Schrier RW. 1998. Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med* 339:533-541.
- Matsushashi T, Otaka M, Odashima M, Jin M, Komatsu K, Konishi N, Wada I, Sato T, Horikawa Y, Ohba R, Oyake J, Hatakeyama N, Watanabe S. 2005. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates thioacetamide-induced liver injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 20:135-140.
- McCormick PA, Donnelly C. 2008. Management of hepatorenal syndrome. *Pharmacol Ther* 119:1-6.
- McCormick PA, Greenslade L, Kibbler CC, Chin JK, Burroughs AK, McIntyre N. 1997. A prospective randomized trial of ceftazidime versus netilmicin plus mezlocillin in the empirical therapy of presumed sepsis in cirrhotic patients. *Hepatology* 25:833-836.

- McCullough AJ, Tavill AS. 1991. Disordered energy and protein metabolism in liver disease. *Semin Liver Dis* 11:265-277.
- Mendez-Lopez M, Mendez M, Lopez L, Aller MA, Gonzalez-Pardo H, Nava MP, Sanchez-Patan F, Arias J, Arias JL. 2005. Increased cytochrome oxidase activity in adrenal glands of thioacetamide-cirrhotic rats. *Neuro Endocrinol Lett* 26:719-723.
- Mendez-Lopez M, Mendez M, Sanchez-Patan F, Casado I, Aller MA, Lopez L, Corcuera MT, Alonso MJ, Nava MP, Arias J, Arias JL. 2007. Partial portal vein ligation plus thioacetamide: a method to obtain a new model of cirrhosis and chronic portal hypertension in the rat. *J Gastrointest Surg* 11:187-194.
- Milcheva V, Khubenova A. 1988. [Cholinesterase activity as a prognostic test in phalloidine mushroom poisoning]. *Vutr Boles* 27:59-63.
- Ming Z, Fan YJ, Yang X, Lauth WW. 2005. Blockade of intrahepatic adenosine receptors improves urine excretion in cirrhotic rats induced by thioacetamide. *J Hepatol* 42:680-686.
- Ming Z, Lauth WW. 2006. Intrahepatic adenosine-mediated activation of hepatorenal reflex is via A1 receptors in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1177-1184.
- Ming Z, Smyth DD, Lauth WW. 2002. Decreases in portal flow trigger a hepatorenal reflex to inhibit renal sodium and water excretion in rats: role of adenosine. *Hepatology* 35:167-175.
- Mitra SK, Udupa UV, Sheshadri SJ, Venkataranganna MV, Gopumadhavan S, Anturlikar SD. 2000. Inhibition of experimental cirrhosis in rats by HD-03. *Acta Pharmacol Sin* 21:777-781.
- Mitzner SR, Klammt S, Peszynski P, Hickstein H, Korten G, Stange J, Schmidt R. 2001a. Improvement of multiple organ functions in hepatorenal syndrome during albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system. *Ther Apher* 5:417-422.
- Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R. 2001b. Albumin dialysis using the molecular adsorbent recirculating system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:777-783.
- Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Noldge-Schomburg G. 2001c. Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephrol* 12 Suppl 17:S75-S82.
- Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Loock J, Lohr JM, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R. 2000. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 6:277-286.
- Mizumoto H, Karasawa A, Kubo K. 1993. Diuretic and renal protective effects of 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902), a novel adenosine A1-receptor antagonist, via pertussis toxin insensitive mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 266:200-206.
- Moller S, Emmeluth C, Henriksen JH. 1993. Elevated circulating plasma endothelin-1 concentrations in cirrhosis. *J Hepatol* 19:285-290.

- Moller S, Henriksen JH, Bendtsen F. 2008. Pathogenetic background for treatment of ascites and hepatorenal syndrome. *Hepatol Int* 2:416-428.
- Moore K, Wendon J, Frazer M, Karani J, Williams R, Badr K. 1992. Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome. *N Engl J Med* 327:1774-1778.
- Moore KP, Aithal GP. 2006. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut* 55 Suppl 6:vi1-12.
- Moore KP, Taylor GW, Maltby NH, Siegers D, Fuller RW, Dollery CT, Williams R. 1990. Increased production of cysteinyl leukotrienes in hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 11:263-271.
- Morita H, Nishida Y, Hosomi H. 1991. Neural control of urinary sodium excretion during hypertonic NaCl load in conscious rabbits: role of renal and hepatic nerves and baroreceptors. *J Auton Nerv Syst* 34:157-169.
- Morrow JD, Moore KP, Awad JA, Ravenscraft MD, Marini G, Badr KF, Williams R, Roberts LJ. 1993. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediat* 6:417-420.
- Moser GH, Schrader J, Deussen A. 1989. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 256:C799-C806.
- Mozaffari MS, Abebe W, Warren BK. 2000. Renal adenosine A3 receptors in the rat: assessment of functional role. *Can J Physiol Pharmacol* 78:428-432.
- Mullen KD. 2002. Treatment of hepatorenal syndrome: lessons from the MARS trial. *Hepatology* 35:492-493.
- Muller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. 1988. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34:229-236.
- Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Tsunekawa S, Nagata A. 2007. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats. *Clin Chim Acta* 375:63-68.
- Nagashima K, Kusaka H, Karasawa A. 1995. Protective effects of KW-3902, an adenosine A1-receptor antagonist, against cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Jpn J Pharmacol* 67:349-357.
- Nagashima K, Kusaka H, Sato K, Karasawa A. 1994. Effects of KW-3902, a novel adenosine A1-receptor antagonist, on cephaloridine-induced acute renal failure in rats. *Jpn J Pharmacol* 64:9-17.
- Nakatani Y, Fukui H, Kitano H, Nagamoto I, Tsujimoto T, Kuriyama S, Kikuchi E, Hoppou K, Tsujii T. 2001. Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rats with liver cirrhosis. *Liver* 21:64-70.
- Neumeister B., Besenthal I., Böhm B.O. 2008. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*.

- Nijijima A. 1969. Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science* 166:1519-1520.
- Nishiyama A, Inscho EW, Navar LG. 2001. Interactions of adenosine A1 and A2a receptors on renal microvascular reactivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F406-F414.
- Novosyadlyy R, Dargel R, Scharf JG. 2005. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins during thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Growth Horm IGF Res* 15:313-323.
- Ogasawara T, Inagaki T, Yamada T, Ohara H, Nakazawa T, Itoh M. 1999. Impaired pancreatic exocrine function in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Int J Pancreatol* 26:59-67.
- Olivera A, Lamas S, Rodriguez-Puyol D, Lopez-Novoa JM. 1989. Adenosine induces mesangial cell contraction by an A1-type receptor. *Kidney Int* 35:1300-1305.
- Ortega R, Gines P, Uriz J, Cardenas A, Calahorra B, De Las HD, Guevara M, Bataller R, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. 2002. Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: results of a prospective, nonrandomized study. *Hepatology* 36:941-948.
- Osswald H. 1975. Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 288:79-86.
- Osswald H, Nabakowski G, Hermes H. 1980. Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int J Biochem* 12:263-267.
- Osswald H, Spielman WS, Knox FG. 1978. Mechanism of adenosine-mediated decreases in glomerular filtration rate in dogs. *Circ Res* 43:465-469.
- Passo SS, Thornborough JR, Rothballer AB. 1973. Hepatic receptors in control of sodium excretion in anesthetized cats. *Am J Physiol* 224:373-375.
- Paul S, Jackson EK, Robertson D, Branch RA, Biaggioni I. 1989. Caffeine potentiates the renin response to furosemide in rats. Evidence for a regulatory role of endogenous adenosine. *J Pharmacol Exp Ther* 251:183-187.
- Pawelczyk T, Grden M, Rzepko R, Sakowicz M, Szutowicz A. 2005. Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat. *Am J Pathol* 167:315-325.
- Pawelczyk T, Podgorska M, Sakowicz M. 2003. The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol Pharmacol* 63:81-88.
- Peak AS, Sheller A. 2007. Risk factors for developing gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis. *Ann Pharmacother* 41:1481-1485.
- Peng Z, Borea PA, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Blackburn MR, Azzena G, Resta G, Cronstein BN. 2009. Adenosine signaling contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *J Clin Invest* 119:582-594.

- Peng Z, Fernandez P, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Chan ES, Cronstein BN. 2008. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *FASEB J* 22:2263-2272.
- Pereira RM, dos Santos RA, Oliveira EA, Leite VH, Dias FL, Rezende AS, Costa LP, Barcelos LS, Teixeira MM, Simoes e Silva AC. 2008. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 14:4505-4511.
- Perez TR. 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3:112-120.
- Peti-Peterdi J, Bebok Z, Lapointe JY, Bell PD. 2002. Novel regulation of cell [Na(+)] in macula densa cells: apical Na(+) recycling by H-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F324-F329.
- Pfeiffer R, Kirsch J, Fahrenholz F. 1998. Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp Cell Res* 244:327-339.
- Preisig PA, Rector FC, Jr. 1988. Role of Na⁺-H⁺ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol* 255:F461-F465.
- Puscas I, Coltau M, Baican M, Domuta G, Hecht A. 1999. Vasodilatory effect of diuretics is dependent on inhibition of vascular smooth muscle carbonic anhydrase by a direct mechanism of action. *Drugs Exp Clin Res* 25:271-279.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Ren Y, Carretero OA, Garvin JL. 2002. Role of mesangial cells and gap junctions in tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 62:525-531.
- Restuccia T, Ortega R, Guevara M, Gines P, Alessandria C, Ozdogan O, Navasa M, Rimola A, Garcia-Valdecasas JC, Arroyo V, Rodes J. 2004. Effects of treatment of hepatorenal syndrome before transplantation on posttransplantation outcome. A case-control study. *J Hepatol* 40:140-146.
- Rimola A, Gines P, Arroyo V, Camps J, Perez-Ayuso RM, Quintero E, Gaya J, Rivera F, Rodes J. 1986. Urinary excretion of 6-keto-prostaglandin F1 alpha, thromboxane B2 and prostaglandin E2 in cirrhosis with ascites. Relationship to functional renal failure (hepatorenal syndrome). *J Hepatol* 3:111-117.
- Rincon AR, Covarrubias A, Pedraza-Chaverri J, Poo JL, Armendariz-Borunda J, Panduro A. 1999. Differential effect of CCl₄ on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp Toxicol Pathol* 51:199-205.
- Ring-Larsen H, Hesse B, Henriksen JH, Christensen NJ. 1982. Sympathetic nervous activity and renal and systemic hemodynamics in cirrhosis: plasma norepinephrine concentration, hepatic extraction, and renal release. *Hepatology* 2:304-310.
- Rivera-Huizar S, Rincon-Sanchez AR, Covarrubias-Pinedo A, Islas-Carbajal MC, Gabriel-Ortiz G, Pedraza-Chaverri J, Alvarez-Rodriguez A, Meza-Garcia E, Armendariz-Borunda J.

2006. Renal dysfunction as a consequence of acute liver damage by bile duct ligation in cirrhotic rats. *Exp Toxicol Pathol* 58:185-195.
- Roberts LJ, Morrow JD. 1994. Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Ann N Y Acad Sci* 744:237-242.
- Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D, Miller LJ. 1997. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* 51:357-362.
- Ros J, Claria J, Jimenez W, Bosch-Marce M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. 1995. Role of nitric oxide and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. *Hepatology* 22:915-920.
- Rubera I, Barriere H, Tauc M, Bidet M, Verheecke-Mauze C, Poujeol C, Cuiller B, Poujeol P. 2001. Extracellular adenosine modulates a volume-sensitive-like chloride conductance in immortalized rabbit DC1 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F126-F145.
- Ruiz R, Barri YM, Jennings LW, Chinnakotla S, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, Randall HB, Sanchez EQ, Klintmalm GB. 2007. Hepatorenal syndrome: a proposal for kidney after liver transplantation (KALT). *Liver Transpl* 13:838-843.
- Ruiz R, Kunitake H, Wilkinson AH, Danovitch GM, Farmer DG, Ghobrial RM, Yersiz H, Hiatt JR, Busuttil RW. 2006. Long-term analysis of combined liver and kidney transplantation at a single center. *Arch Surg* 141:735-741.
- Ruiz-del-Arbol L, Monescillo A, Arocena C, Valer P, Gines P, Moreira V, Milicua JM, Jimenez W, Arroyo V. 2005. Circulatory function and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology* 42:439-447.
- Ruiz-del-Arbol L, Urman J, Fernandez J, Gonzalez M, Navasa M, Monescillo A, Albillos A, Jimenez W, Arroyo V. 2003. Systemic, renal, and hepatic hemodynamic derangement in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 38:1210-1218.
- Sanchez-Patan F, Aller MA, Corcuera MT, Vara E, Casado I, Gomez F, Garcia C, Alonso MJ, Arias J. 2006. [Chronic inflammatory portal hypertensive enteropathy in the rat]. *Cir Esp* 80:162-167.
- Saracyn M, Kozlowski W, Wanikowicz Z. 2004. [Description of an experimental model of hepatorenal syndrome in Wistar rats]. *Pol Merkur Lekarski* 17:119-122.
- Schmidt FW. 1967. Enzymes in diagnosis of liver disease. *Proc R Soc Med* 60:1247.
- Schmitt M. 1973. Influences of hepatic portal receptors on hypothalamic feeding and satiety centers. *Am J Physiol* 225:1089-1095.
- Schnermann J, Osswald H, Hermle M. 1977. Inhibitory effect of methylxanthines on feedback control of glomerular filtration rate in the rat kidney. *Pflugers Arch* 369:39-48.
- Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. 1988. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8:1151-1157.

- Schuppan D, Afdhal NH. 2008. Liver cirrhosis. *Lancet* 371:838-851.
- Sechi LA, Tedde R, Melis A. 1990. Effects of furosemide on blood pressure in anephric rats. *Boll Soc Ital Biol Sper* 66:693-700.
- Sherlock S, Walker JG, Senewiratne B, Scott A. 1966. The complications of diuretic therapy in patients with cirrhosis. *Ann N Y Acad Sci* 139:497-505.
- Silldorff EP, Kreisberg MS, Pallone TL. 1996. Adenosine modulates vasomotor tone in outer medullary descending vasa recta of the rat. *J Clin Invest* 98:18-23.
- Silva G, Navasa M, Bosch J, Chesta J, Pilar PM, Casamitjana R, Rivera F, Rodes J. 1990. Hemodynamic effects of glucagon in portal hypertension. *Hepatology* 11:668-673.
- Siragy HM, Linden J. 1996. Sodium intake markedly alters renal interstitial fluid adenosine. *Hypertension* 27:404-407.
- Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22:657-682.
- Sitzmann JV, Bulkley GB, Mitchell MC, Campbell K. 1989. Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. *Ann Surg* 209:322-327.
- Solis-Herruzo JA, Duran A, Favela V, Castellano G, Madrid JL, Munoz-Yague MT, Morillas JD, Estenez J. 1987. Effects of lumbar sympathetic block on kidney function in cirrhotic patients with hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 5:167-173.
- Solvay Pharmaceuticals. Investigators Brochure/Investigational Medicinal Product Dossier (Nonclinical CTD) SLV329. 2005.
Ref Type: Report
- Sorensen SS, Madsen JK, Pedersen EB. 1994. Systemic and renal effect of intravenous infusion of endothelin-1 in healthy human volunteers. *Am J Physiol* 266:F411-F418.
- Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, Vargas V, Soriano G, Guevara M, Gines P, Rodes J. 1999. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 341:403-409.
- Stanley AJ, Forrest EH, Dabos K, Bouchier IA, Hayes PC. 1998. Natriuretic effect of an adenosine-1 receptor antagonist in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 115:406-411.
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J. 2001. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9983-9988.
- Tachiyama G, Sakon M, Kambayashi J, Iijima S, Tsujinaka T, Mori T. 1988. Endogenous endotoxemia in patients with liver cirrhosis--a quantitative analysis of endotoxin in portal and peripheral blood. *Jpn J Surg* 18:403-408.

- Tagawa H, Vander AJ. 1970. Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ Res* 26:327-338.
- Terra C, Guevara M, Torre A, Gilabert R, Fernandez J, Martin-Llahi M, Baccaro ME, Navasa M, Bru C, Arroyo V, Rodes J, Gines P. 2005. Renal failure in patients with cirrhosis and sepsis unrelated to spontaneous bacterial peritonitis: value of MELD score. *Gastroenterology* 129:1944-1953.
- Thomson S, Bao D, Deng A, Vallon V. 2000. Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest* 106:289-298.
- Thorn JA, Jarvis SM. 1996. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27:613-620.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Toya Y, Umemura S, Iwamoto T, Hirawa N, Kihara M, Takagi N, Ishii M. 1993. Identification and characterization of adenosine A1 receptor-cAMP system in human glomeruli. *Kidney Int* 43:928-932.
- Traynor T, Yang T, Huang YG, Arend L, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP, Schnermann J. 1998. Inhibition of adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 275:F922-F927.
- Vallon V, Muhlbauer B, Osswald H. 2006. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 86:901-940.
- van Buren M, Bijlsma JA, Boer P, van Rijn HJ, Koomans HA. 1993. Natriuretic and hypotensive effect of adenosine-1 blockade in essential hypertension. *Hypertension* 22:728-734.
- Vyzantiadis T, Theodoridou S, Giouleme O, Harsoulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. 2003. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 37:814-816.
- Wei Y, Sun P, Wang Z, Yang B, Carroll MA, Wang WH. 2006. Adenosine inhibits ENaC via cytochrome P-450 epoxygenase-dependent metabolites of arachidonic acid. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1163-F1168.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J. 1992. Vasomotor effects of purinergic agonists in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol* 263:F1026-F1033.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. 1990. Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 85:1622-1628.
- Westphal JF, Brogard JM. 1997. Drug administration in chronic liver disease. *Drug Saf* 17:47-73.

- Wilken-Jensen C, Ring-Larsen H, Henriksen JH, Clausen J, Pals H, Christensen NJ. 1989. [Effect of posture on the diuretic treatment of decompensated cirrhosis and heart failure]. *Ugeskr Laeger* 151:13-15.
- Wilkinson SP, Moodie H, Stamatakis JD, Kakkar VV, Williams R. 1976. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 2:1415-1418.
- Wong F. 2006. The use of TIPS in chronic liver disease. *Ann Hepatol* 5:5-15.
- Wong F, Sniderman K, Liu P, Allidina Y, Sherman M, Blendis L. 1995. Transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt: effects on hemodynamics and sodium homeostasis in cirrhosis and refractory ascites. *Ann Intern Med* 122:816-822.
- Yagil C, Katni G, Yagil Y. 1994. The effects of adenosine on transepithelial resistance and sodium uptake in the inner medullary collecting duct. *Pflugers Arch* 427:225-232.
- Yao K, Heyne N, Erley CM, Risler T, Osswald H. 2001. The selective adenosine A1 receptor antagonist KW-3902 prevents radiocontrast media-induced nephropathy in rats with chronic nitric oxide deficiency. *Eur J Pharmacol* 414:99-104.
- Zimmermann H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 (Pt 2):345-365.
- Zimmermann T, Gardemann A, Machnik G, Dargel R, Jungermann K. 1992. Metabolic and hemodynamic responses of bivascularly perfused rat liver to nerve stimulation, noradrenaline, acetylcholine and glucagon in thioacetamide-induced micronodular cirrhosis. *Hepatology* 15:464-470.
- Zipser RD, Radvan GH, Kronborg IJ, Duke R, Little TE. 1983. Urinary thromboxane B2 and prostaglandin E2 in the hepatorenal syndrome: evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology* 84:697-703.
- Zou AP, Nithipatikom K, Li PL, Cowley AW, Jr. 1999a. Role of renal medullary adenosine in the control of blood flow and sodium excretion. *Am J Physiol* 276:R790-R798.
- Zou AP, Wu F, Li PL, Cowley AW, Jr. 1999b. Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension* 33:511-516.

9 Abkürzungsverzeichnis

A ₁ R	A1 Adenosinrezeptor
A _{2A} R	A2A Adenosinrezeptor
A _{2B} R	A2B Adenosinrezeptor
A ₂ R	A2 Adenosinrezeptor
A ₃ R	A3 Adenosinrezeptor
Abb.	Abbildung
A.dem.	Aqua demineralisata
ADH	antidiuretisches Hormon
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AST	Asparat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CK	Kreatinkinase
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ET-1	Endothelin-1
HCl	Salzsäure
HRS	hepatorenales Syndrom
M	molar
MARS	Molecular Absorbent Recirculation System
N	Anzahl der Tiere / Messungen
NaCl	Natriumchlorid
NHA3	Natrium/Protonen-Austauscher 3
NO	Nitric Oxide (Stickoxid)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
PAS	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung
pKi	negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstante
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel
SNGFR	Single Nephron GFR
SNS	sympathisches Nervensystem
TAA	Thioacetamid
Tab.	Tabelle
TGF	tubuloglomerulärer Feedback
TIPS	trasjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
vs.	versus

10 Anhang

Geräte

Gerät	Firma
Stoffwechselkäfige für Ratten ab 300g	Tecniplast
Nicht-invasives Blutdruckmessgerät NIBP Controller mit Druckmanschette und Pulsaufnehmer	ADInstruments
4-Kanal Analog-Digital Umsetzer Powerlab 4/25	ADInstruments
Kompaktwaage CS 2000	Ohaus
Adventurer Pro AV412 Präzisionswaage	Ohaus
Gefrierschrank G2713	Liebherr
Einbettvorrichtung Shandon Citadel 1000	Thermo Electron Corp.
Ausbettvorrichtung Microm EC-350	Thermo Scientific
Kühlplatte Midrom EC-351	Thermo Scientific
Mikrotom RM2025	Leica
Streckbadkombination Typ 16800	Medax
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskop BH-2	Olympus
Digitalkamera CFW-1310C	Scion Corporation
Digitalkamera EC3	Leica
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Autoanalyser	Cobas Integra 800
Plattenphotometer Benchmark Plus	BioRad
Thermostat TCR 100	Roth
Semi-dry Blot-Apparatur	BioRad
Elektrophorese-Netzgerät, Power Pack P25	Biometra
Elektrophorese-System TV200	Biostep
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Einbettkassetten	Histosette
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Carl-Roth
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Brand
96 Loch Mikrotiter-Platten	Greiner
Transfermembran Nitrocellulose – Protran BA 83	Whatman
Gel Blotting Papier – GB005	Whatman
Hyperfilm ECL	GE Healthcare

Chemikalien

Substanz	Firma
A ₁ R-Antagonist, SLV329	Solvay Pharmaceuticals
Haltungsdiät 1320 für Ratten und Mäuse	Altromin
Isofluran - Forene [®]	Abbott AG
Furosemid – Furosemid-ratiopharm [®] 250	Ratiopharm
Thioacetamid	Merck
Formaldehydlösung 37%	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Ethanol 100%	Herbeta Arzneimittel
Aceton	J.T.Baker
Paraffin Typ 6	Richard-Allan-Scienfitic
Paraffin Typ 9	Richard-Allan-Scienfitic
Xylol	Carl-Roth
Pikrinsäure-Lösung	Fluka
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Waldeck GmbH
Salzsäure 37%	Merck
Eisenhämaetoxylin nach Weigert	Carl-Roth
Pikro-Fuchsin van Gieson	Waldeck GmbH

Periodsäure	Merck
SCHIFFS Reagenz	Merck
Mayers Hämalanlösung	Merck
DePex	SERVA Electrophoresis
Aminomethan	Carl-Roth
Glycine	Carl-Roth
Natriumdodcylsulfat	Carl-Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka
Tetramethylethylendiamin	Merck
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl-Roth
Tween 20	Carl-Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl-Roth
Benzamidin	Fluka
Leupeptin	Sigma
Harnstoff	Biorad
Thioharnstoff	Carl-Roth
Dithiotheritol	Sigma
Coomassie Brilliant Bluo G-250	Merck
Phosphorsäure	Carl-Roth
Bovines Serumalbumin	Carl-Roth
Milchpulver Blotting Grade	Carl-Roth
PageRuler Proteinleader	Fermentas
Methanol	J.T. Baker
Luminol	Fluka
Cumarsäure	Fluka
H ₂ O ₂ 30%	Merck
Entwickler G153	Agfa
Fixierer G354	Agfa

Lösungen

Lösung	Bestandteile	Konzentration
PBS-Puffer	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
	KH ₂ PO ₄	9,2 g/l
Formalinlösung 4%	Formalin	40 g/l
	PBS-Puffer	
Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäurelösung	Sirius Rot ges. Pikrinsäurelösung	1 g/l
1%ige Periodsäure	Periodsäure	10 g/l
	70% Ethanol	
Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue	20 mg/l
	Ethanol	95 ml/l
	Phosphorsäure	190 g/l
Lysepuffer	Tris-Aminomethan	2,31 g/l
	KCl	2,07 g/l
	EDTA	490 mg/l
	Benzamidin	200 mg/l
	Leupeptin	0,5 mg/l
	Harnstoff	470 g/l
	Thioharnstoff	130 g/l
	Dithiothreitol	560 mg/l
1,5M Tris-Puffer pH 8,8	Tris-Aminomethan	181,71 g/l
1M Tris-Puffer pH 6,8	Tris-Aminomethan	121,14 g/l
Trenngel 10%	Rotiphorese® Gel 30	334 ml/l
	1,5 M Tris Puffer pH 8,8	250 ml/l
	Natriumdodcylsulfat	1 g/l
	Ammoniumperoxodisulfat	1 g/l
	Tetramethylethyldiamin	0,4 ml/ml
Sammelgel 10%	Rotiphorese® Gel 30	680 ml/l
	1 M Tris Puffer pH 6,8	170 ml/l
	Natriumdodcylsulfat	1 g/l
	Ammoniumperoxodisulfat	1 g/l
	Tetramethylethyldiamin	1 ml/l
Elektrophorese-Puffer	Tris-Aminomethan	3,05 g/l
	Glycin	18,8 g/l
	Natriumdodcylsulfat	1 g/l

TBS-Tween-Puffer	Tris-Aminomethan	2,42 g/l
	NaCl	8 g/l
	Tween 20	1 ml/l
Transferpuffer	Glycin	27,68 g/l
	Tris-Aminomethan	5,8 g/l
	Methanol	250 ml/l
ECL-Detektionslösung 1	Luminol	10 ml/l
	Cumarsäure	4,4 ml/l
	1M Tris Puffer pH 8,5	100 ml/l
ECL-Detektionslösung 2	H ₂ O ₂ 30%	0,64 ml/l
	1M Tris Puffer pH 8,5	100 ml/l

Software

Software	Firma
Powerlab	AdInstruments
ImageJ 1.36b	National Institutes of Health
Microplate Manager 5.2	BioRad
AlphaEaseFC	Alpha Innotech Corporation
Las EZ	Leica Microsystems
SPSS 16.0	SPSS Inc.

Färbeprotokolle der histologischen Schnitte

Sirius-Rot-Färbung:

Entparaffinieren

Bewässern

1 Stunde in 0,1%ig gelöstem Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäure-Lösung

Kurz spülen in 0,01M HCl im Ethanol

Entwässern

Eindecken

Elastica van Gieson-Färbung:

Entparaffinieren

Bewässern

10 Minuten in Resorcin-Fuchsin nach Weigert

3 Minuten spülen unter Leitungswasser

Kurz in 1%ige HCL-Ethanol-Lösung eintauchen

7 Minuten spülen unter fließendem Leitungswasser

Kurz spülen mit A.dem.

1 Minute in 70%igen Ethanol

2 Minuten in 80%igen Ethanol

3 Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert

3 Minuten spülen unter fließendem Leitungswasser

Kurz in 1%ige HCl-Ethanol-Lösung eintauchen

7 Minuten spülen unter fließendem Leitungswasser

Kurz spülen mit A.dem.

Kurz in van Gieson-Gemisch eintauchen

Entwässern

Eindecken

Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS):

Entparaffinieren

Bewässern

2 Minuten in 50%igen Ethanol

Kurz Spülen mit A.dem.

6 Minuten in 1%ige Periodsäure

Spülen mit Leitungswasser

Spülen mit A.dem.

7 Minuten in Schiff'schem Reagenz

5 Minuten spülen unter fließendem Leitungswasser

1,5 Minuten in Hämalaun nach Mayer

10 Minuten spülen unter fließendem Leitungswasser

Entwässern

Eindecken

11 Publikationen

Pathophysiology of the endothelin system - lessons from genetically manipulated animal models.

von Websky,K., Heiden,S., Pfab,T., Hocher,B.
Eur. J. Med Res. **14**, 1-6 (2009).

Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system.

Kalk,P., Mach,A., Thone-Reineke,C., Godes,M., Heiden,S., Sharkovska,Y., von Websky,K., Relle,K., Hocher,B.
Can. J. Physiol Pharmacol. **86**, 541-545 (2008).

Tissue specific activation of the endothelin system in severe acute liver failure.

Heiden,S., Pfab,T., von Websky,K., Vignon-Zellweger,N., Godes,M., Relle,K., Kalk,P., Theuring,F., Zidek,W., Hocher,B.
Eur. J. Med Res. **13**, 327-329 (2008).

The adenosine A1 receptor antagonist SLV320 reduces myocardial fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy without affecting blood pressure.

Kalk,P., Eggert,B., Relle,K., Godes,M., Heiden,S., Sharkovska,Y., Fischer,Y., Ziegler,D., Bielenberg,G.W., Hocher,B.
Br. J. Pharmacol. **151**, 1025-1032 (2007).

12 Danksagung

Prof. Dr. Berthold Hoher danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die gute Betreuung und für die Möglichkeit diese Arbeit am Center for Cardiovascular Research durchführen zu können. Dr. Thiemo Pfab und Dr. Philipp Kalk danke ich für die zurückhaltende aber immer zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Helmut Hartmann für die freundliche Bereitschaft, die vorliegende Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin zu begutachten und zu vertreten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Karoline von Websky, Katharina Relle, Dr. Michael Godes, Dr. Yulia Sharkovska und Jan Rahnenführer für die immer ausgesprochen angenehme Atmosphäre, die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Hannah-Marie Haumann und meinem Bruder, Oliver Heiden möchte ich für das Korrekturlesen danken.

Und natürlich danke ich meinem Freund Nicolas, meiner Familie und allen anderen Freunden für die Geduld und den Rückhalt, den sie mir während der ganzen Arbeit immer wieder gegeben haben.

13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 07.12.2009

Susi Heiden