

**Die Bedeutung des NO-cGMP Signalweges und der
löslichen Guanylatzyklase in der Leberfibrose**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg- Essen

vorgelegt von

Janina Nowatzky

aus Haan

September 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Zeit von Oktober 2009 bis September 2012 im Rahmen einer Forschungskooperation zwischen der Universität Witten-Herdecke (Fakultät für Medizin) und der Firma Bayer Pharma AG (Abteilung *Common Mechanisms Research*) unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Claudia Hirth-Dietrich und Herr Dr. rer. nat. Peter Sandner angefertigt.

Gutachter/Innen:

- 1.: Prof. Dr. Peter Bayer, Fachbereich Strukturelle und medizinische Biochemie der Universität Duisburg-Essen, Essen
- 2.: PD Dr. Kirsten Leineweber, Cardiovascular Research/Heart Diseases Bayer Pharma AG, Wuppertal
- 3.: Prof. Dr. Markus Kaiser, Fachbereich Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen, Essen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. Perihan Nalbant, Fachbereich Molekulare Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen, Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2012

Für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abkürzungsverzeichnis	IV-VIII
Abbildungsverzeichnis	IX-X
Tabellenverzeichnis/Anhang	X
1. Einleitung	1
1.1. Physiologie der Leber	1
1.1.1. Anatomischer Aufbau der Leber	1
1.1.2. Die Leber: ein multifunktionales Organ	2
1.2. Die Erkrankung Leberfibrose	3
1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie der Leberfibrose	3
1.2.2. Klinische Symptome einer Leberfibrose	4
1.2.3. Diagnose und Klassifizierung einer Leberfibrose	5
1.2.3.1. Invasive Diagnostik	5
1.2.3.2. Nicht-invasive Diagnostik	5
1.2.4. Derzeitige klinische Therapie der Leberfibrose	7
1.2.5. Pathophysiologie der Leberfibrose	8
1.2.6. Beteiligung des NO-cGMP Signalweges in der Erkrankung Leberfibrose	11
1.2.6.1. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen	11
1.2.6.2. Guanylatzyklen	12
1.2.6.3. Intrazelluläre cGMP-Effektorsysteme	14
1.2.6.4. Pharmakologische Aktivierung des NO-cGMP Signalweges	16
▪ NO-Donoren	16
▪ sGC Stimulatoren und Aktivatoren	16
1.2.6.5. NO und cGMP in der Pathogenese der Leberfibrose	18
1.3. Zielsetzung der Doktorarbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Geräte, Operationsbesteck, Software	22
2.1.2. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien	24
2.1.3. Puffer und Lösungen	27
2.1.4. Zelllinien und Kulturmedien	30
2.1.5. Antikörper und Substanzen	30
2.2. Methoden	34
2.2.1. Zellbiologische Methoden	34
2.2.1.1. Kultivierung von primären adhärenen Zellen	34

2.2.2.	Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	34
2.2.2.1.	RNA-Isolierung aus Zellen	34
2.2.2.2.	cDNA-Synthese	35
2.2.2.3.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	35
2.2.2.4.	cGMP-Detektion	37
2.2.2.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Methode)	38
2.2.2.6.	Extraktion von Zellproteinen.....	38
2.2.2.7.	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page)	38
2.2.2.8.	Western Blot	39
2.2.2.9.	Immundetektion	39
2.2.3.	Tierexperimentelle Methoden	40
2.2.3.1.	Induktion einer Leberfibrose.....	41
	▪ Operationstechnik für eine Gallengangsligatur induzierte Leberfibrose	41
	▪ Die Schweinserum induzierte Leberfibrose	42
2.2.3.2.	Messung des Blut- und Portalvenendruckes	43
2.2.3.3.	Quantitative Bestimmung von Blutparametern mittels VetScan™ Analyse.....	44
2.2.3.4.	Anfertigung und Färbung von histologischen Lebergewebeschnitten .45	
	▪ Kollagenfärbung von Lebergewebeschnitten.....	45
	▪ Immunhistochemische Färbung von α -SMA	46
2.2.3.5.	Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes im Lebergewebe	46
2.2.3.6.	RNA-Isolierung aus Lebergewebe mit anschließender Gen- expressionsanalyse	47
2.3.	Statistik	48
3.	Ergebnisse.....	49
3.1.	Untersuchung der <i>in vitro</i> Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272	49
3.1.1.	Wirkung des Zytokins TGF β auf HSCs.....	49
3.1.2.	Einfluss von verschiedenen Komponenten des NO-cGMP Signal- weges auf die Entstehung einer Leberfibrose.....	51
3.1.2.1.	Stickstoffmonoxid und dessen Wirkung auf TGF β stimulierte HSCs ..51	
3.1.2.2.	<i>In vitro</i> Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf aktivierte HSCs	53
3.1.3.	Die Wirkung des sGC Stimulators auf aktivierte HSCs	55
3.1.4.	Überprüfung der Wirkung des sGC Stimulators durch Inhibition der sGC mittels ODQ.....	58
3.1.5.	Wirkung des sGC Stimulators im Vergleich zu einem spezifischen PDE 5 Inhibitor	60

3.1.6.	Der <i>in vitro</i> Wirkmechanismus des sGC Stimulators und die Beteiligung der Proteinkinase G	62
3.1.7.	Bestimmung der cGMP-Konzentration von TGF β stimulierte HSCs	64
3.1.8.	Regulation der Proteinexpression des Transdifferenzierungsmarkers α -SMA in TGF β stimulierten HSCs.....	65
3.2.	Untersuchung der Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 in zwei verschiedenen Leberfibrosietiermodellen	66
3.2.1.	Auswirkung der Leberfibrogenese auf verschiedene Diagnostikparameter	66
3.2.1.1.	Finale Tier- und Lebergewichte.....	66
3.2.1.2.	Untersuchung von spezifischen Plasmaparametern in der Erkrankung Leberfibrose.....	68
3.2.2.	Histologische Veränderungen des Lebergewebes.....	70
3.2.2.1.	Darstellung der Fibrosierung des Lebergewebes (Kollagenfärbung)	70
3.2.2.2.	Darstellung der Transdifferenzierung von aktivierten HSCs zu Myofibroblasten (α -SMA Färbung).....	73
3.2.3.	Quantifizierung des Kollagenanteils im Lebergewebe anhand der α -Aminosäure Hydroxyprolin	76
3.2.4.	Genexpressionsanalysen von fibrotischem Lebergewebe	77
3.2.5.	Wirkung des sGC Stimulators auf den Blut- und Portalvenendruck von leberfibrotischen Tieren	81
4.	Diskussion	83
4.1.	Die antifibrotische Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 in der Leberfibrose	85
4.2.	Vergleich der cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung der pharmakologischen sGC Stimulation mit bereits klinisch angewendeten Substanzen.....	95
4.3.	Limitationen der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Modelle für die Untersuchung der Erkrankung Leberfibrose	98
4.3.1.	Limitationen der <i>in vitro</i> Untersuchungen an HSCs	98
4.3.2.	Einschränkungen der Tiermodelle für die Erkrankung Leberfibrose.....	99
5.	Zusammenfassung	100
	Summary.....	101
6.	Literaturverzeichnis	102
7.	Datenanhang	122
	Danksagung	125
	Lebenslauf.....	126
	Publikationsliste und Konferenzbeiträge	127
	Eidesstattliche Erklärung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
8-Bromo-cGMP	stabiles Analogon von cGMP (<i>8-Bromo-cyclic guanosine mono-phosphate</i>)
α-SMA	glattmuskuläres alpha-Aktin (<i>alpha smooth muscle actin</i>)
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (<i>angiotensin converting enzyme</i>)
<i>ad</i> (lat.)	hinzufügen
ALP	Alkalische Phosphatase (<i>alkaline phosphatase</i>)
ALT	Alanin-Aminotransferase (<i>alanine aminotransferase</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ANP	atriales natriuretisches Peptid (<i>atrial natriuretic peptide</i>)
APRI Score	AST/Thrombozyten Ratio Index (<i>AST to Platelet Ratio Index</i>)
<i>Aqua dest.</i> (lat.)	destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase (<i>aspartate aminotransferase</i>)
AU	frei gewählte Einheit(en) (<i>arbitrary unit(s)</i>)
β-Aktin	beta-Aktin (<i>beta-actin</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BDL	Gallengangsligatur (<i>bile duct ligation</i>)
BG	Bindegewebe
bid	zweimal täglich (lat. <i>bis in die</i>)
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid (<i>B-type natriuretic peptide</i>)
BPM	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
BSA	bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Kalzium (<i>calcium</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosin monophosphate</i>)
CCL ₄	Tetrachlorkohlenstoff (<i>carbon tetrachloride</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase(n) (<i>cGMP-dependent protein kinase(s)</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic guanosid monophosphate</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CNG	cGMP-gesteuerter Kationenkanal (<i>cyclic nucleotid-gated cation channel</i>)
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid (<i>C-type natriuretic peptide</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (<i>carbon dioxide</i>)
Col1α1	Kollagen Typ 1α1 (<i>collagene type 1α1</i>)

CT-Wert	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle treshold values</i>)
Cu ^{2+/1+}	Kupfer (<i>copper</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (<i>3,3' Diaminobenzidine</i>)
DETA NONOate	NO-Donor
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease (<i>desoxyribonuclease</i>)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration (<i>half maximal effective concentration</i>)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
eNOS	endotheliale NO-Synthase (<i>endothelial NO-synthase</i>)
<i>et al.</i> (lat.)	und andere
EtOH	Ethanol (<i>ethanol</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fe ^{2+/3+}	Eisen (<i>ferrous/ferric</i>)
fmol	Femtomol
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GC(s)	Guanylatzyklase(n) (<i>guanylat cyclase(s)</i>)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/ Synonym für AST (<i>glutamic oxaloacetic transaminase</i>)
GTP	Guanosintriphosphat (<i>guanosine triphosphate</i>)
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid (<i>hydrogen peroxide</i>)
HCl	Salzsäure (<i>hydrochloric acid</i>)
HCN	cGMP-gesteuerter Kationkanal (<i>hyperpolarization activated cyclic nucleotid-gated cation channel</i>)
hHSCs	humane leberspezifische Fibroblasten (<i>human hepatic stellate cells</i>)
HP	Hydroxyprolin (<i>hydroxyproline</i>)
HSCs	leberspezifische Fibroblasten (<i>hepatic stellate cells</i>)
Hz	Hertz
i.p.	in die Bauchhöhle (lat. <i>intraperitoneal</i>)
IgG	Immunglobulin G (<i>immunoglobulin G</i>)
iNOS	induzierbare NO-Synthase (<i>inducible NO-synthase</i>)
Kat.-Nr.	Katalognummer
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
KT 5823	PKG Inhibitor
L	Liter
L32	ribosomales Protein L32 (<i>housekeeping Gen</i>)
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
Li-Hep	Lithium-Heparin
LSECs	Sinusoidendothelzellen (<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>)
LTBP2	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 2</i>
LVP _{sys}	linksventrikulärer systolischer Druck (<i>left ventriculare systolic pressure</i>)
M	Molar
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magensium (<i>magnesium</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MMP 1	Matrixmetalloproteinase 1 (<i>matrix metalloproteinase 1</i>)
MMP 2	Matrixmetalloproteinase 2 (<i>matrix metalloproteinase 2</i>)
MMP 13	Matrixmetalloproteinase 13 (<i>matrix metalloproteinase 13</i>)
MMPs	Matrixmetalloproteinasen (<i>matrix metalloproteinases</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mittelwert (<i>mean</i>)
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat (<i>sodium orthovanadate</i>)
NaCl	Natriumchlorid (<i>sodium chloride</i>)
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NaOH	Natriumhydroxid (<i>sodium hydroxid</i>)
ng	Nanogramm
nm	Wellenlänge
nM	Nanomolar
nNOS	neuronale NO-Synthase (<i>neuronal NO-synthase</i>)
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
NOS	NO-Synthase (<i>NO-synthase</i>)
O ₂	Sauerstoff (<i>oxygen</i>)
ODQ	sGC Inhibitor
OP	Operation
p.o.	orale Gabe (lat. <i>per os</i>)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie (<i>pulmonary arterial hypertension</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase (<i>phosphodiesterase</i>)
PDE 5	Phosphodiesterase 5 (<i>phosphodiesterase 5</i>)
PDGF	thrombozytärer Wachstumsfaktor (<i>platelet derived growth factor</i>)
pGC	membrangebundenen oder partikuläre Guanylatzyklase (<i>particular guanylat cyclase</i>)
PIC	Proteaseinhibitorcocktail (<i>protease inhibitor cocktail</i>)
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase(n) (<i>cAMP-dependent protein kinase(s)</i>)
PKG (I/II)	cGMP-abhängige Proteinkinase G (I/II) (<i>cGMP-dependent protein kinase G(I/II)</i>)
PPi	Diphosphat (<i>diphosphate</i>)
PTH	portale Hypertension (<i>portal hypertension</i>)
PVD	Portalvenendruck (<i>portal venous pressure</i>)
rHSCs	leberspezifische Rattenfibroblasten (<i>rat hepatic stellate cells</i>)
RIPA-Puffer	Lyse Puffer (<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease (<i>ribonuclease</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen sepcies</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur = 22 °C (<i>room temperature</i>)
RT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>real time-PCR</i>)
s	Sekunde(n) (<i>second(s)</i>)
S.	Seite(n)
s.a.	siehe auch
SD	Sprague Dawley (Rattenstamm)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>Standard error of mean</i>)
sGC	lösliche Guanylatzyklase (<i>soluble guanylat cyclase</i>)
SNAC	NO-Donor
Tabl.	Tabletten
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
T-BIL	Gesamtbilirubin (<i>total bilirubin</i>)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>)
TBST	
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TIMP1	Inhibitor der Metalloproteinase 1 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>)
TIMP3	Inhibitor der Metalloproteinase 3 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>)

TIMPs	Inhibitoren von Metalloproteinasen (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
TIPS(S)	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer (Stent-)Shunt
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethane</i>)
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (<i>polysorbate 20</i>)
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase (<i>gamma-glutamyltransferase</i>)
Δ	Delta

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau der Leber mit ihrer funktionellen Einheit dem Leberläppchen	2
Abbildung 2:	Repräsentative Darstellung der nicht-invasiven Diagnostikscores	6
Abbildung 3:	Darstellung der Pathogenese der Leberfibrose	9
Abbildung 4:	Aktivierung von HSCs und der daran beteiligten Zellen und Zytokine.....	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des intrazellulären NO-cGMP Signalweges.....	12
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des α_1/β_1 -sGC Heterodimers.....	14
Abbildung 7:	Pharmakologische Wirkung der sGC Stimulatoren und sGC Aktivatoren in der Übersicht	17
Abbildung 8:	Die chemische Strukturformel des sGC Stimulators BAY 41-2272	30
Abbildung 9:	Die chemische Strukturformel von DETA NONOate	31
Abbildung 10:	Die chemische Strukturformel von 8-Bromo-cGMP	31
Abbildung 11:	Die chemische Strukturformel von Vardenafil	32
Abbildung 12:	Die chemische Strukturformel des selektiven PKG Inhibitors KT 5823 ...	32
Abbildung 13:	Die chemische Strukturformel des sGC Inhibitors ODQ.....	33
Abbildung 14:	Schematische Übersicht der pharmakologischen Wirkungen der verschiedenen Substanzen auf den NO-cGMP Signalweg	33
Abbildung 15.1.:	Wirkung von TGF β auf HSCs in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit (Col1 α 1 und α -SMA).....	50
Abbildung 15.2.:	Wirkung von TGF β auf HSCs in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit (LTBP 2)	51
Abbildung 16:	Wirkung des NO-Donors DETA NONOate auf aktivierte HSCs nach 48 h	52
Abbildung 17:	Wirkung von verschiedenen 8-Bromo-cGMP-Konzentrationen auf HSCs nach 48 h	54
Abbildung 18:	Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs nach 48h	57
Abbildung 19:	Wirkung von BAY 41-2272 \pm ODQ auf TGF β stimulierte HSCs nach 48 h	59
Abbildung 20:	Wirkung des PDE 5 Inhibitors Vardenafil \pm BAY 41-2272 auf aktivierte HSCs nach 48 h	61
Abbildung 21:	Wirkung von BAY 41-2272 \pm KT 5823 auf TGF β stimulierte HSCs nach 48 h	63
Abbildung 22:	Detektion des cGMP-Gehaltes in HSCs nach 48 h.....	65
Abbildung 23:	Einfluss des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Proteinexpression von α -SMA in HSCs nach 48 h.....	66

Abbildung 24:	Repräsentative Darstellung von Sirius Rot gefärbten Leberschnitten	71
Abbildung 25:	Morphometrische Analyse von Sirius Rot gefärbten Leberschnitten	72
Abbildung 26:	Repräsentative Darstellung von immunhistochemisch α -SMA gefärbten Leberschnitten.....	74
Abbildung 27:	Prozentualer Flächenanteil an α -SMA positiven Zellen im Lebergewebe	75
Abbildung 28:	Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin im Lebergewebe	76
Abbildung 29.1.:	TaqMan Analyse der relativen mRNA Expressionen von verschieden- en profibrotischen Markergenen im Lebergewebe (Col1 α 1 und α -SMA).....	77
Abbildung 29.2.:	TaqMan Analyse der relativen mRNA Expressionen von verschieden- en profibrotischen Markergenen im Lebergewebe (MMP 2, TGF β , TIMP 3).....	78
Abbildung 30:	Messungen des Portalvenendruckes.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	DNA-Sequenzen der genspezifischen PCR-Primer und der jeweiligen TaqMan-Sonden.....	36
Tabelle 2:	Darstellung der finalen Tier- und Lebergewichte.....	67
Tabelle 3:	Physiologische Leberparameter gemessen mittels VetScan TM Analyse in heparinisiertem Vollblut	69
Tabelle 4:	Hämodynamikparameter der verschiedenen Tierstudien.....	81

Anhang

Anhang 1:	Repräsentative Vitalitätsbilder von rHSCs und hHSCs nach 48 h.....	122
Anhang 2:	Wirkung von 8-Bromo-cGMP \pm KT 5823 auf TGF β stimulierte HSCs nach 48 h.	123
Anhang 3:	Darstellung der Relation von PVD zu LVP _{sys}	124

1. Einleitung

1.1. Physiologie der Leber

1.1.1. Anatomischer Aufbau der Leber

Die vielfältigen Funktionen der Leber werden durch den sehr komplexen makro- wie mikroskopischen Aufbau unter der Bildung einer anatomischen und funktionellen Einheit mit den Gallenwegen und der Gallenblase ermöglicht. Das Organ besteht aus vier unterschiedlich großen Leberlappen (= *Lobus dexter*, *Lobus sinister*, *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*). Die Blutversorgung der Leber wird über zwei unterschiedliche Gefäßsysteme gewährleistet: 1.) dem systemischen Kreislauf über die Aorta, dem *Truncus coeliacus* und der *Ateria hepatica* und 2.) über den portalen Kreislauf bestehend aus venösen Splanchnikusgefäßen und der Pfortader (Renz-Polster und Krautzig, 2008). Die anatomische Untereinheit der Leber ist das Leberläppchen. In den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen befinden sich jeweils die Periportalfelder mit dem so genannten Glissonschen-Dreieck (Abb. 1). Das Glissonsche-Dreieck besteht aus einem Portalvenenast (= *Vena porta*), einem Ast der *Ateria hepatica* und einem Gallengang (= *ductus interlobulares*) (Abb. 1). Das Zentrum der Leberläppchen bilden die Zentralvenen, in denen das Blut über die Lebervenen in die *Vena cava inferior* (= untere Hohlvene) zum rechten Herzen geführt wird (Renz-Polster und Krautzig, 2008). Strahlenförmig von der Zentralvene ausgehend befinden sich in Balken angeordnet die parenchymalen Leberzellen (= Hepatozyten). In den Sinusoiden, den natürlich vorkommenden Hohlräumen zwischen diesen Hepatozytenbalken, vereinigt sich das von der *Ateria hepatica* und *Vena porta* zugeführte Blut. Die basale Oberfläche der Hepatozyten ist von Sinusoidendothelzellen (= *liver sinusoidal endothelial cells*; LSECs) durch den Disse-Raum getrennt. In diesem Zwischenraum findet ein Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten statt (Siegenthaler und Blum, 2006). Im Zentrum der Leberläppchen beginnen außerdem die Gallenkapillaren, in denen die von den Hepatozyten produzierte Galle nach außen in die Gallengänge strömt (Deetjen und Speckmann, 1999). Neben den Hepatozyten und Endothelzellen sind noch zwei weitere Zellarten maßgeblich an der Funktion und dem Aufbau der Leber beteiligt (Racanelli und Rehmann, 2006). Die so genannten Kupfferzellen sind die leberspezifischen Makrophagen, die sich gewebständig im Inneren der sinusoiden Leberkapillaren befinden. Ihre Hauptfunk-

tionen ist die Filterung des Pfortaderblutes von z.B. geschädigten roten Blutkörperchen, Bakterien oder Schadstoffen durch Phagozytose (Siegenthaler und Blum, 2006). Die *hepatic stellate cells* (= Stern- oder Itozellen; HSCs) sind Vitamin A speichernde Zellen, die im *Disse*-Raum lokalisiert sind (s.a. Abb. 3; S. 9) und eine Vielzahl an Funktionen übernehmen, die im Rahmen der Pathogenese der Leberfibrose (Abschnitt 1.2.5.) näher erörtert werden.

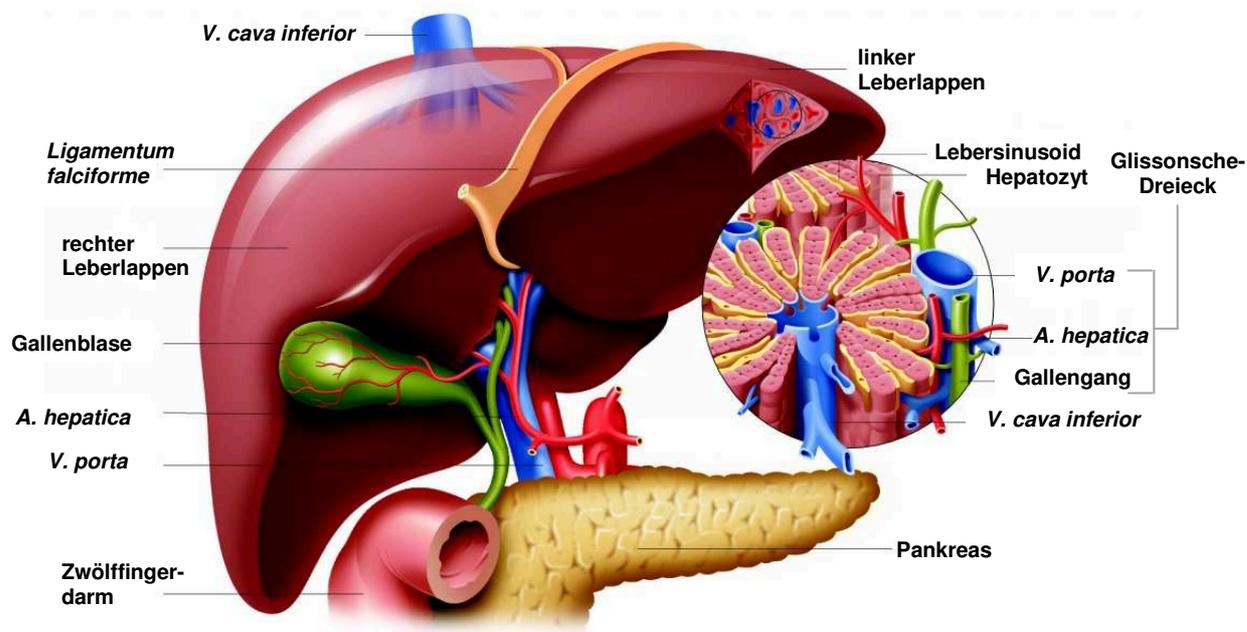


Abb. 1: Aufbau der Leber mit ihrer funktionellen Einheit dem Leberläppchen [modifiziert nach wissenmedia GmbH, Gütersloh; www.hepatitis-bw.de]

1.1.2. Die Leber: ein multifunktionales Organ

Die komplexe Leberlappenstruktur des Organs zeugt von zahlreichen physiologischen Aufgaben im Intermediärstoffwechsel des Körpers. Hierzu zählen u.a. (Siegenthaler und Blum, 2006):

- Regulation der Glykogensynthese, Glykogenolyse und Glukoneogenese,
- Synthese aller im Blut zirkulierenden Proteine (Bsp. Albumin, Gerinnungsfaktoren; Ausnahme: γ -Globuline),
- Fettsynthese und -abbau,
- Speicherung von Glykogen und Triglyzeriden zur Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes des Körpers,
- Biotransformation von lipophilen Xenobiotika in hydrophile, ausscheidbare Stoffe,
- Exkretionsfunktion von verschiedenen Stoffen über die Galle (Bsp. Bilirubin, Steroidhormone, Medikamente),

- Verdauungsfunktion durch die Produktion der Gallensäuren,
- Harnstoffsynthese und Säure-Base-Regulation,
- Immunologische Funktion durch die Kupfferzellen, der Synthese von Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteinen (Racanelli und Rehermann, 2006).

1.2. Die Erkrankung Leberfibrose

Das Krankheitsbild der Fibrose ist eine „(...) häufig auch als Sklerose bezeichnete Vermehrung des Bindegewebes“ (Zink und Ostrach, 1998), die in dem jeweiligen Organ zu dem Verlust der Elastizität, dessen Verhärtung und letztendlich zu Funktionseinschränkungen führt. Die Fibrosierung der Leber ist ein unspezifisches Reaktionsmuster auf eine chronische Schädigung des Parenchyms (= Zellnekrosen), welche unterschiedliche pathologische Ursachen (= Ätiologien) haben kann (Abschnitt 1.2.1.).

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie der Leberfibrose

Lebererkrankungen stehen als Todesursachen in Deutschland an fünfthäufigster Stelle (Tacke und Weiskirchen, 2010). Die genaue Inzidenz ist unsicher, da viele leberfibrotische Erkrankungen und ihr gemeinsames Endstadium, die Leberzirrhose, weitestgehend symptomlos verlaufen. In Europa und in den USA rechnet man mit etwa 250 Erwachsenen/Jahr auf 100000 Einwohner, wobei das Verhältnis erkrankter Männer zu Frauen bei 2:1 liegt (Herold, 2011).

Zu den Ursachen der Entstehung einer Leberfibrose zählen u.a. Entzündungen (Virushepatiden, alkoholisch bedingte Fettleber, Cholangitis), die Intoxikation mit hepatotoxischen Substanzen (z.B. Paracetamol, Pilzgifte, Tetrachlorkohlenstoff (= CCL₄)), eine Organverfettung (= metabolisches Syndrom) sowie eine Einschränkung oder gänzliche Unterbrechung des Gallensäureabflusses (= Cholestase) (Mormone *et al.*, 2011). Auch können zahlreiche, auf angeborene Stoffwechselerkrankungen beruhende Speicherkrankheiten häufig zu einer Leberfibrose führen. Hierzu gehören z.B. Fettstoffwechselstörungen (= Morbus Gaucher), Glykogenspeicherkrankheiten, α 1-Antitrypsinmangel oder Kupferspeicherkrankheiten (= Morbus Wilson) (Mormone *et al.*, 2011).

1.2.2. Klinische Symptome einer Leberfibrose

Schädigungen der Leber können bis zu einem gewissen Grad aufgrund ihrer enormen Kapazität zur Regenerationsfähigkeit kompensiert werden (Greenbaum und Wells, 2011; Baddour *et al.*, 2012). Daher treten die klinischen Symptome eines leberfibrotischen Patienten erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Leberschädigung auf. Die für die Leberfibrose bzw. -zirrhose charakteristischen Symptome lassen sich wie folgt gliedern in (Herold, 2011):

- Allgemeine Symptome wie Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Völlegefühl, Übelkeit und Gewichtsabnahme (Newton und Jones, 2012),
- Veränderungen der Lederhaut (Bsp. *Spider naevi* (= Lebersternchen; Udell *et al.*, 2012), *Palmarerytheme* (= gerötete Handflächen), *Caput medusae* (= vermehrte Venenzeichnung der Bauchhaut)),
- Entstehung von Juckreiz durch die Ablagerung von Gallensäuren in der Haut (= *Prurigo simplex*; Kremer *et al.*, 2011),
- Hormonstörungen (Bsp. Verlust der Sekundärbehaarung (= Bauchglatze), Potenzstörungen, Gynäkomastie (Udell *et al.*, 2012)),
- regulatorische physiologische Anzeichen (Bsp. *Ikterus* (= Gelbfärbung der Schleimhäute/Sklern durch eine Störung des Bilirubinstoffwechsels), eine erhöhte Blutungsneigung (Albornoz *et al.*, 1999)),
- Entstehung einer portalen Hypertension (= PTH) mit einem erhöhtem Risiko der Ödem- bzw. Aszitesbildung und der Blutung von Ösophagus- und Fundusvarizen (Castera *et al.*, 2012; Wong, 2012), sowie der Entwicklung eines hepatorenenalen (Robic *et al.*, 2011) oder hepatopulmonalen Syndroms (Machicao und Fallon, 2012),
- Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie (= Retention von neurotoxischen Substanzen im Körper; García-Martínez *et al.*, 2011),
- Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms meistens als Spätfolge der Leberzirrhose (= hepatozelluläres Karzinom; Hanish und Knechtle, 2011).

1.2.3. Diagnose und Klassifizierung einer Leberfibrose

1.2.3.1. Invasive Diagnostik

Für die Diagnose einer Leberfibrose/-zirrhose sowie für die Bestimmung des Leberfibrosegrades gilt bis heute als „Goldstandardmethode“ die Durchführung einer Leberbiopsie mit anschließender histologischer Auswertung (Guha und Rosenberg, 2008; Han und Yoon, 2008). Die Probenentnahme stellt jedoch einen invasiven Eingriff dar, bei dem es in etwa bei 0,6 % bis 5 % der Fälle zu Komplikationen kommen kann. Nachteile der Goldstandardmethode sind die nicht repräsentative Darstellung der Leberfibrose anhand der Biopsie, da die Erkrankung bei mindestens einem Drittel der Patienten nicht heterogen im Gewebe verläuft, sowie die Verwendung von verschiedenen Scoring-Systemen zur Klassifizierung des Fibrosestadiums (Bsp. Metavir-Score; Stauber, 2009), die histopathologisch nur semiquantitativ ausgewertet werden können.

1.2.3.2. Nicht-invasive Diagnostik

Alternativ zu der invasiven Diagnostik wurden in den letzten Jahren vermehrt nicht-invasive Testverfahren, wie die Bestimmung von verschiedenen Serumlaborparametern, evaluiert. Bei einer akuten Leberschädigung steigen u.a. die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (= ALT) und Aspartat-Aminotransferase (= AST) im Serum von leberfibrotischen Patienten an. Die ALT ist in löslicher Form im Zytoplasma von periportalen Hepatozyten enthalten und steigt durch eine Störung der Zellmembranpermeabilität im Blut an (Renz-Polster und Krautzig, 2008). In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass ein AST/ALT Ratio > 1 positiv mit dem Fibrosegrad der Leber korreliert (Park *et al.*, 2000; Parise *et al.*, 2006). Ein weiterer leberspezifischer Serumparameter ist das Ektoenzym Alkalische Phosphatase (= ALP). Die ALP wird in Leberzellen und Gallengangsepithelien gebildet und über die Gallensäuren ausgeschieden. Eine Erhöhung der ALP ist u.a. auf einen Gallensäurestau zurückzuführen, der besonders in Rahmen einer cholestatischen Erkrankung entsteht (Renz-Polster und Krautzig, 2008). Bei einer schweren und chronischen Erkrankung der Leber kommt es zu deutlichen Einschränkungen der Synthese- und Stoffwechsellleistung des Organs, so dass z.B. ein verminderter Albuminwert zu messen ist.

<p>Einzelwerte:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thrombozyten • Prokollagen-III-Peptid • Kollagen Typ IV • Hyaluronsäure • TGFβ
<p>Kombinierte Serumfibrosemarker:</p> <p>• Pohl-Score AST/ALT und Anzahl der Thrombozyten <u>Beurteilung:</u> Fortgeschrittene Fibrose (F3/F4 nach Metavir): AST/ALT > 1 und Thrombozyten < 150000/μl, Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose (F3/F4): AST/ALT < 1 und Thrombozyten > 150000/μl</p> <p>• APRI-Index Verhältnis von gemessener GOT [U/L] zu Referenzwert [U/L] geteilt durch Thrombozyten [10⁹/L] x 100 <u>Beurteilung:</u> Fortgeschrittene Fibrose: Score > 1,5 Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose: Score < 0,5</p> <p>• Fibrotest $F = 4,467 \times \log [\alpha 2 \text{ Makroglobulin (g/dl)}] - 1,375 \times \log [\text{Haptoglobulin (g/dl)}] + 1,017 \times \log [\gamma\text{-GT (U/L)}] + 0,281 \times [\text{Alter (Jahre)}] + 1,737 \times \log [\text{Bilirubin } (\mu\text{M})] - 1,184 [\text{Apolipoprotein A1 (g/L)}] + 0,301 \times \text{Geschlecht (0 für weibl., 1 für männl.)} - 5,540$ <u>Beurteilung:</u> Fortgeschrittene Fibrose (F2,F3,F4 nach Metavir): Score 0,60 bis 1,00 Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose: Score 0 bis 0,10</p>

Abb. 2: Repräsentative Darstellung der nicht-invasiven Diagnostikscores [modifiziert nach Lörke *et al.*, 2007]

ALT= Alanin-Aminotransferase; AST= Aspartat-Aminotransferase; GOT= AST; log= Logarithmus; TGFβ= *transforming growth factor beta*; γ-GT= Gamma-Glutamyltransferase

Da jedoch die Messungen einzelner Laborparameter nur einen ungenügenden Aufschluss über die Progression der Leberschädigung liefern, wurde in den letzten Jahren vermehrt an der Entwicklung von nicht-invasiven Fibrosescores gearbeitet (Abb. 2). Diese Scores „basieren auf einer Kombination von Routinelaborparametern, die verschiedene Aspekte der Leberfunktion reflektieren (...)“ (Stauber, 2009) und eine bessere Einschätzung des Fibrosestadiums ermöglichen sollen. Verschiedene Patientenangaben und Laborparameter werden hierfür in einen mathematischen Bezug zueinander gesetzt (Loaeza-del-Castillo *et al.*, 2008). Eine positive Korrelation zwischen den anhand des APRI-Scores (= *AST to Platelet Ratio Index*) berechneten Schwellenwerten für Fibrose (> 1,5)/Zirrhose (> 2,0) und dem histologischen Fibrosegrad konnte in mehreren Validierungsstudien bestätigt werden (Castéra *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2011). Mittels der Durchführung einer Sonographie, einer Computer- oder Magnetresonanztomographie des Abdomens besteht die zusätzliche Möglichkeit eines nicht-invasiven, bildgebenden Verfahrens anhand dessen eine Leberfibrose/-zirrhose, sowie deren möglichen Komplikationen, identifiziert werden können. Durch die Einführung eines neueren Verfahrens, der transienten Elastographie, kann die Festigkeit des Lebergewebes bestimmt werden (Lörke *et al.*, 2007),

die wiederum mit dem jeweiligen Leberfibrosestadium korreliert (de Lédinghen *et al.*, 2010; Robic *et al.*, 2011; Al-Dahshan, 2012).

1.2.4. Derzeitige klinische Therapie der Leberfibrose

Die derzeitigen Möglichkeiten einer direkten antifibrotischen Therapie für die Erkrankung Leberfibrose sind eher gering (Schuppan und Pinzani, 2012). Viel mehr werden die Symptome und die jeweiligen Begleiterscheinungen dieser Erkrankung behandelt (Ginès *et al.*, 2012).

Zu den allgemeinen Therapien zählen die Substitution von Vitaminen und Gerinnungsfaktoren, sowie die ausreichende Kalorien- und Eiweißzufuhr. Alkohol und lebertoxische Medikamente, wie z.B. Paracetamol in höheren Dosierungen, sind für Leberfibrosepatienten kontraindiziert. Ebenfalls wird eine Behandlung der Ursache für die Entstehung der Erkrankung eingeleitet. Als Beispiel ist eine Entzugstherapie des Patienten bei einer alkoholinduzierten Leberfibrose zu nennen. Die Entstehung der PTH ist eine der schwersten Komplikationen dieser Erkrankung. Ihre Pathogenese hat in der Regel weitere Symptome, wie eine Aszitesbildung, Ösophagus- und Fundusvarizenblutungen, sowie das hepatorenale und das hepatopulmonale Syndrom zur Folge (Abschnitt 1.2.2.). Die PTH und die durch sie induzierten Folgeerscheinungen sind die Hauptursache an denen Leberfibrosepatienten versterben (de Geode *et al.*, 2012). Daher konzentriert sich die derzeitige Therapie in erster Linie auf die Senkung des Portalvenendruckes (= PVD) und die Behandlung von abdominalen Varizenblutungen. Hierfür stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung (Sass und Chopra, 2009; Herold, 2011; Ginès *et al.*, 2012):

1. Behandlung und Prophylaxe der Varizenblutungen:

- akute Blutstillung der Varizen: a) medikamentös durch Somatostatin oder Analoga und b) endoskopisch durch Setzen einer Ligatur, einer Ballontamponade, Metallstents oder TIPS(S) (= transjugulärer intrahepatischer portosystemischer (Stent-) Shunt),
- nach akuten, massiven Blutungen: Kreislaufstabilisierung durch Volumensubstitution und Verabreichung von Gerinnungsfaktoren,
- nach einem hohen Blutverlust: Beginn einer Prophylaxe gegen ein mögliches Leberkoma (z.B. Laktoseverabreichung, Absaugen des Blutes aus dem Magen etc.),

- Beginn einer Infektionsprophylaxe durch Verabreichung eines Antibiotikums (z.B. Ciprofloxacin), da ein erhöhtes Risiko für eine bakterielle Entzündung nach intraabdominellen Blutungen besteht,
- gleichzeitige Einleitung der Prophylaxe gegen eine Rezidivblutung durch Verabreichen von nicht-selektiven β -Blockern (z.B. Propranolol).

2. Behandlung einer Aszites:

durch Schleifendiuretika (z.B. Furosemid), Aldosteronantagonisten (z.B. Spironolacton), Natriumrestriktion und durch Zufuhr einer ausreichenden Menge an Elektrolyten.

Trotz dieser vorhandenen Therapiemöglichkeiten liegt die Sterberate leberfibrotischer Patienten aufgrund von Varizenblutungen heutzutage immer noch bei über 45 % (de Goede *et al.*, 2012). Das Risiko, nach Überleben der Erstblutung eine Rezidivblutung in den folgenden zwei Jahren zu erleiden, beträgt 70 % (Dagher *et al.*, 2000). Langzeittherapien mit nicht-selektiven β -Blockern in Kombination mit hepatischen Ligaturen (García-Pagán *et al.*, 2008) zeigen derzeit noch keinen ausreichenden Erfolg zur Senkung der Mortalität von Leberfibrosepatienten. Gleiches gilt auch für weitere klinische Studien mit anderen therapeutischen Ansatzpunkten (Dagher *et al.*, 2000; Laleman und Nevens, 2006). Letztendlich ist die beste Therapie eines leberfibrotischen Patienten eine Lebertransplantation (MacQuillan und Neuberger, 2003). Aufgrund dieser klinischen Situation ist der Bedarf einer neuen effektiven, antifibrotischen Therapie sehr hoch. Um mögliche neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können, muss die Pathophysiologie der Leberfibrose weiter untersucht und verstanden werden. Ziel hierbei ist es neue, an der Entstehung der Leberfibrose beteiligte, Signaltransduktionswege zu identifizieren und eine pharmakologische Modulation dieser als neuen Therapieansatz zu überdenken.

1.2.5. Pathophysiologie der Leberfibrose

Abzugrenzen von der Leberfibrose, bei der die Leberlappenstrukturen weitestgehend erhalten bleiben, ist das Endstadium, die so genannte Leberzirrhose. Hierbei findet zusätzlich zu der Entstehung von Zellnekrosen eine Zerstörung der regulären Leberlappenstruktur statt. Durch jeden chronischen leberschädigenden Einfluss „(...) kann ein fibrotischer Umbau der Leber mit einer nachfolgenden Zirrhose entstehen“ (Renz-Polster und Krautzig, 2008). Obwohl Lebererkrankungen durch verschiedene Ätiologien induziert werden können (Abschnitt 1.2.1.), ist der Verlauf der Pathogenese,

die Fibrosierung des Gewebes, einheitlich. Zu Beginn der Leberschädigung entsteht zunächst als Reaktion ein entzündlicher Prozess, bei dem Zellen des Leberparenchyms (z.B. Hepatozyten, Endothel- und Kupfferzellen) durch die Induktion einer Zellnekrose oder -apoptose absterben (Guo und Friedman, 2007; Malhi und Gores, 2008). Dieser Zelltod führt zur Freisetzung von intrazellulären Botenstoffen und Zellbestandteilen, die eine Aktivierung mit anschließender Infiltration von Immunzellen in das geschädigte Gewebe zur Folge hat (McCrudden und Iredale, 2000; Mormone *et al.*, 2011). Zusätzlich zu den Immunzellen werden die leberspezifischen Fibroblasten, die HSCs, durch diese verschiedenen freigesetzten Zytokine, wie z.B. *platelet derived growth factor* (= PDGF), *transforming growth factor beta* (= TGF β) und *epidermal growth factor* (= EGF), aktiviert (Friedman, 2008b).

HSCs zählen zu den nicht-parenchymalen Zellen der Leber und weisen eine charakteristische sternförmige Morphologie auf, die durch lange zytoplasmatische Ausläufer gekennzeichnet ist (Friedman, 2008a und b). Ihre Lokalisation in der Leber ist entlang eines Lebersinusoids im Disse-Raum mit einem engen Kontakt zu den LSECs (Abb. 3; Rockey, 2001). Ein weiteres Merkmal der HSCs sind die zytoplasmatischen Lipidtröpfchen, die der lebenswichtigen Speicherung von Vitamin A in der Leber dienen (Henderson und Iredale, 2007; Friedman, 2008b).

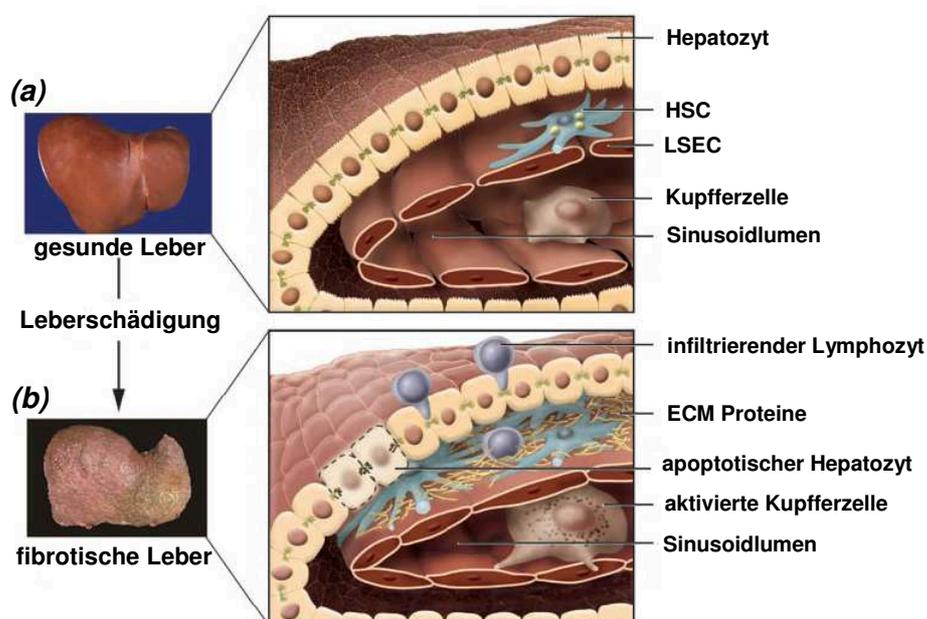


Abb. 3: Darstellung der Pathogenese der Leberfibrose

(a) Anatomie einer gesunden Leber (b) pathologische Veränderung einer fibrotischen Leber

[modifiziert nach Bataller und Brenner, 2005]

ECM= extrazelluläre Matrix; HSC= *hepatic stellate cell*; LSEC= Sinusoidendothelzelle

Unter pathophysiologischen Bedingungen einer Lebererkrankung vollziehen HSCs eine Transdifferenzierung von ruhenden Zellen zu aktivierten Myofibroblasten und sind u.a. für die exzessive Ablagerung und Modulierung der extrazellulären Matrix

(= *extracellular matrix*, ECM) im Rahmen der Gewebefibrosierung von Bedeutung (Abb. 3 und 4; Albanis und Friedman, 2001; Malhi und Gores, 2008).

Der Vorgang der Transdifferenzierung dieser Zellen lässt sich in zwei Phasen unterteilen (Li und Friedman, 1999). Die primäre Aktivierungsphase der HSCs durch parakrine Stimuli wird auch als Initiationsphase bezeichnet (Friedman, 2008a-c). In der nachfolgenden „Aufrechterhaltungsphase“ (= *perpetuation phase*) werden die HSCs angeregt, ihren ruhenden Phänotyp morphologisch zu verändern und zu Myofibroblasten zu differenzieren (Abb. 4).

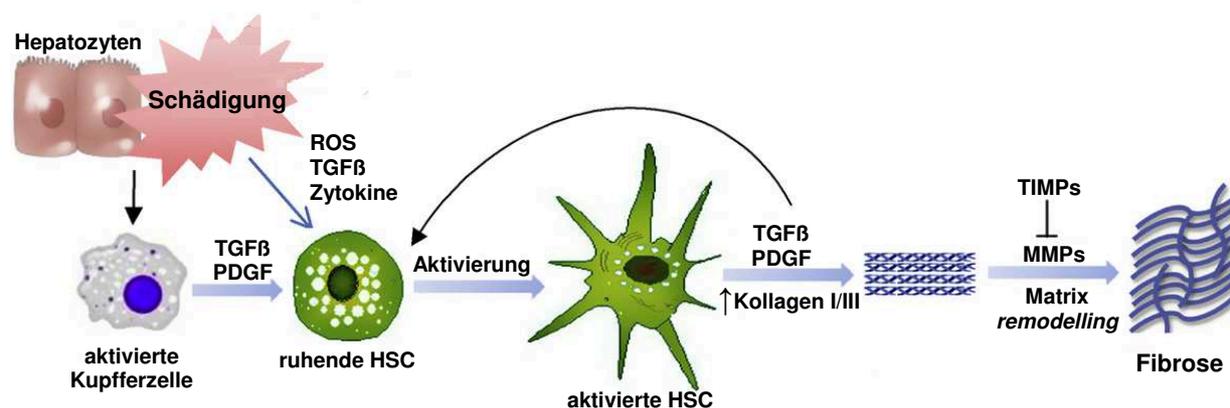


Abb. 4: Aktivierung von HSCs und der daran beteiligten Zellen und Zytokine [modifiziert nach Mormone *et al.*, 2011]

HSC= *hepatic stellate cell*; MMPs= Matrixmetalloproteinasen; PDGF= *platelet derived growth factor*; ROS= reaktive Sauerstoffspezies; TGFβ= *transforming growth factor beta*; TIMPs= Inhibitoren der MMPs

Diese Transdifferenzierung ist u.a. gekennzeichnet durch eine erhöhte Proliferation der Zellen, eine Steigerung der Kontraktilität, den Verlust der Vitamin A speichernden Lipidtröpfchen und der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Li und Friedman, 1999). Autokrine und parakrine Signalfunktionen vermitteln dabei eine Dysregulation im ECM-Aufbau- und -Abbau. Dies führt zu einer gesteigerten Akkumulation von fibrillärem Kollagen und von Bindegewebe im Bereich des *Disse*-Raumes (Abb. 3; Guo und Friedman, 2007; Mormone *et al.*, 2011). Immunologisch lassen sich Myofibroblasten über die gesteigerte Expression des glattmuskulären alpha-Aktins (= *alpha smooth muscle actin*; α -SMA) nachweisen und von anderen Zellarten spezifisch unterscheiden (Sohara *et al.*, 2002; Friedman, 2008a und b). Aufgrund der Expression von weiteren Markern der glatten Muskulatur, wie z.B. von Vimentin und Desmin (Geerts *et al.*, 2001), werden den HSCs perizytenähnliche Aufgaben, d.h. eine funktionelle Rolle bei der Regulation der Gefäßweite, zugeschrieben (Pinzani, 1995). In der Pathogenese der Leberfibrose sind u.a. die Kombinationen einer endothelialen Dysfunktion mit einer geringen NO-Bioverfügbarkeit (Wiest und Groszmann, 2002; Loureiro-Silva *et al.*, 2006)

und einer gesteigerten Kontraktilität der HSCs im Rahmen ihrer Aktivierung verantwortlich für eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes. Dies führt zu der Entstehung der PTH (Bosch *et al.*, 1992; Shah, 2001). Die fibrotischen Veränderungen im Leberparenchym können somit u.a. auf eine Dysregulation des NO Signalweges zurückgeführt werden (Abschnitt 1.2.6.).

1.2.6. Beteiligung des NO-cGMP Signalweges in der Erkrankung Leberfibrose

Der NO-cGMP Signalweg ist verantwortlich für verschiedene physiologische Funktionen in nahezu allen Organen. In den letzten Jahrzehnten war dieser Signaltransduktionsweg Ziel intensiver Forschung, vor allem in Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die nach wie vor in den westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache darstellen (Santos *et al.*, 2008).

1.2.6.1. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid (= NO) ist ein wichtiges inter- und intrazelluläres Signalmolekül in biologischen Systemen, dessen physiologisches Wirkprinzip erst in den letzten 20 Jahren entdeckt wurde. Die enzymatische NO-Produktion erfolgt über so genannte NO-Synthasen (= NOS). Diese Enzyme katalysieren die Redoxreaktion aus reduziertem NADPH, L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu NO und L-Zitrullin (Abb. 5; Knowles und Moncada, 1994). In Säugetieren konnten bisher drei verschiedene Isoformen der NOS nachgewiesen werden, die sich nicht nur aufgrund ihrer Verteilung im Organismus, sondern auch durch ihre unterschiedliche Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration und in ihrem Expressionsprofil unterscheiden (Förstermann *et al.*, 1991). Die NOS werden gegliedert in die neuronale NOS (= nNOS), die induzierbare NOS (= iNOS) und die endotheliale NOS (= eNOS). Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv im Gewebe exprimiert, während die iNOS über transkriptionelle Induktion durch Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (= Endotoxine) z.B. im Rahmen einer entzündlichen Reaktion induziert wird. Die eNOS ist hauptsächlich in Endothelzellen lokalisiert und wird in der Regel durch rezeptorabhängige Agonisten, wie z.B. Bradykinin und Acetylcholin, oder durch physikalische Stimulation (z.B. Scherstress), aktiviert. Hauptfunktionen der eNOS sind u.a. die lokale Gefäßtonusregulation, die Gewährleistung der ausreichenden Organdurchblutung, sowie die Regulation der Endothelpermeabilität

(Mungrue *et al.*, 2003; Durán *et al.*, 2010). Neben einer indirekten Wirkung über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (= *soluble guanylat cyclase*, sGC; Arnold *et al.*, 1977; Schultz *et al.*, 1977) hat NO auch einen direkten Einfluss auf die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, die Metallionen beinhalten (Gunther *et al.*, 1997).

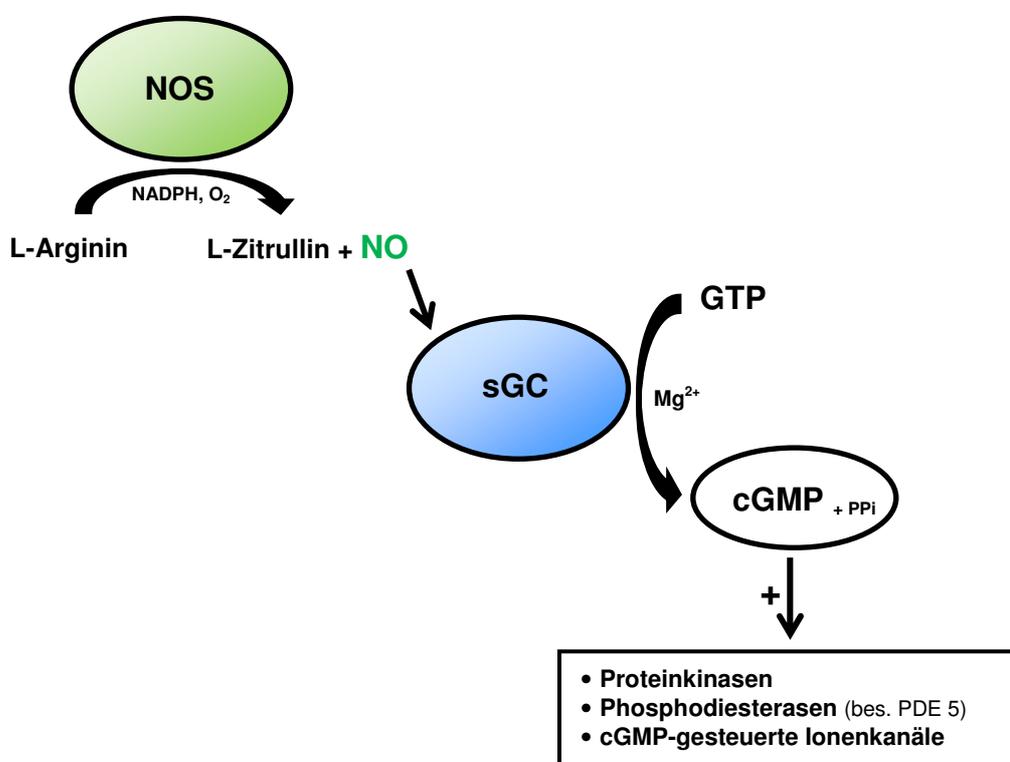


Abb. 5: Schematische Darstellung des intrazellulären NO-cGMP Signalweges
[modifiziert nach Denninger und Marletta, 1999]

cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat; GTP= Guanostriphosphat; Mg²⁺= Magnesium; NADPH= Nicotinamadenindinukleotidphosphat; NO= Stickstoffmonoxid; NOS= NO-Synthase; O₂= Sauerstoff; PDE 5= Phosphodiesterase 5; PP_i= Diphosphat; sGC= lösliche Guanylatzyklase

1.2.6.2. Guanylatzyklasen

Guanylatzyklasen (= *guanylat cyclases*, GCs) gehören zusammen mit den Adenylatzyklasen zu der Gruppe der Nukleotidzyklasen. Die Aufgabe der GC stellt die chemische Umwandlung von Guanostriphosphat (= GTP) zu zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (= *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) dar (Abb. 5). Ashman *et al.* entdeckte 1963 cGMP als Botenmolekül bei der Regulation vieler Zellfunktionen und in Folge wurde die GC Aktivität in verschiedenen Zellextrakten aufgezeigt (Goldberg *et al.*, 1969). Der Nachweis der unterschiedlichen intrazellulären GC-Lokalisationen führte zu der Einteilung der Guanylatzyklasen in die membrangebundene oder partikuläre GC (= pGC) und in die sGC.

Die pGC ist ein membranständiges Enzym und besteht aus einer peptidbindenden extrazellulären Domäne am N-Terminus, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Bisher wurden sieben verschiedene Subtypen der pGC (GC-A bis GC-G) identifiziert. Bisweilen gut charakterisiert sind die GC-A und GC-B, da diese natriuretische Peptide, das so genannte ANP (= atriales natriuretisches Peptid), das BNP (= B-Typ natriuretisches Peptid) und das CNP (= C-Typ natriuretisches Peptid) binden und somit eine zentrale Funktion in der Regulation des arteriellen Blutdruckes, der Volumenhomöostase und in lokalen antihypertrophen und antifibrotischen Prozessen im kardiovaskulären System haben (Kuhn, 2009).

Die sGC ist im Zytoplasma fast aller Säugetierzellen lokalisiert und reguliert wichtige physiologische Prozesse, wie z.B. die Inhibition der Plättchenaggregation (Buechler *et al.*, 1994), die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Waldman und Murad, 1988), die neuronale Signaltransduktion und die Immunmodulation (Jaffrey und Snyder, 1995; Grochot-Przeczek *et al.*, 2012). sGCs sind Heterodimere aus einer α - und β -Untereinheit mit vier bekannten Isoformen α_1 , α_2 , β_1 und β_2 (Nakane *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 2000). Die physiologisch relevanteste sGC ist die α_1/β_1 -sGC, da sie im menschlichen Organismus das am häufigsten gebildete Heterodimer ist (Budworth *et al.*, 1999). Jede Untereinheit der sGC kann in drei funktionelle Bereiche aufgeteilt werden: in eine N-terminale Hämbindungsdomäne und in eine Dimerisierungsdomäne, sowie in einen C-terminalen katalytischen Bereich (Abb. 6; Lucas *et al.*, 2006). Obwohl beide Untereinheiten der sGC eine katalytische Domäne besitzen, ist die Bildung eines Heterodimers in Kombination mit der Koordination der Hämgruppe für eine Aktivierung notwendig (Ma *et al.*, 2007; Rothkegel *et al.*, 2007). Bindet NO an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe, wird die Bindung der Hämgruppe an das Histidin 105 der β_1 -Untereinheit gelöst. Es bildet sich ein Nitrosyl-Eisen-Übergangskomplex mit einer Konformationsänderung des Enzyms und einer 100- bis 400-fachen beschleunigten Umsetzung von GTP zu cGMP (Stone und Marletta, 1994; Koesling und Friebe, 1999). Die Hämgruppe spielt nicht nur eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der sGC, sondern unterliegt auch einer Redoxregulation. Dadurch kann die sGC zum einen in der nativen reduzierten NO-aktivierbaren Fe^{2+} -Form und zum anderen in der NO-insensitiven oxidierten Fe^{3+} -Form vorliegen (s.a. Abb. 7; S. 17). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen reduzierter und oxidiertem sGC-Form (Stasch *et al.*, 2006). Jedoch kann u.a. oxidativer Stress zu einer Oxidation der Hämgruppe führen und somit dieses Gleichgewicht verschieben (Gladwin, 2006; Stasch *et al.*, 2006).

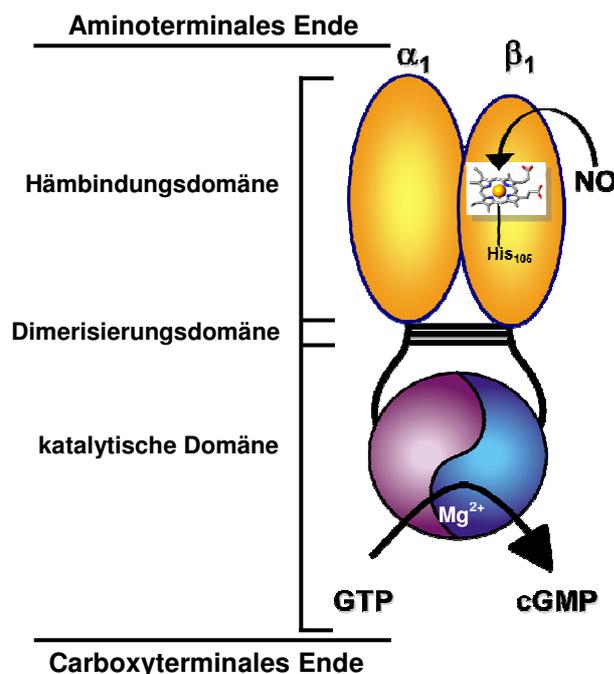


Abb. 6: Schematischer Aufbau des α_1/β_1 -sGC Heterodimers [modifiziert nach Lucas *et al.*, 2000]
 cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat; GTP= Guanosintriphosphat; Mg^{2+} = Magnesium; NO= Stickstoffmonoxid

Eine weitere notwendige Voraussetzung für eine funktionelle sGC Aktivität ist, wie bei allen Nukleotidzyklen, die Komplexierung der Nukleotidtriphosphate mit zweiwertigen Ionen. Diese ist notwendig für die Bindung der Substrate an die katalytische Region der Zyklen (Waldman und Murad, 1988). Die basale Aktivität der sGC wird in der Regel durch die Anwesenheit des zweiwertigen Ions Magnesium (= Mg^{2+}) moduliert (Abb. 5 und 6; Lucas *et al.*, 2000). Ein weiterer Regulationsmechanismus der sGC durch zweiwertige Ionen wurden bei Kalzium (= Ca^{2+}) beobachtet. Hier bewirkt Ca^{2+} eine direkte allosterische Hemmung der NO stimulierten sGC (Parkinson *et al.*, 1999; Kazerounian *et al.*, 2002). Eine Aktivierung der sGC führt zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration, welche die Aktivierung weiterer Signalkaskaden zur Folge hat (Lucas *et al.*, 2000).

1.2.6.3. Intrazelluläre cGMP-Effektorsysteme

cGMP ist als ein so genannter „*second messenger*“ an physiologischen Prozessen im gesamten Organismus beteiligt. Zu den Zielproteintypen von cGMP zählen die cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen, Phosphodiesterasen (= *phosphodiesterases*; PDE) (Francis *et al.*, 2010) und zyklische Nukleotid-regulierte Ionenkanäle (Lucas *et al.*, 2000). Durch diese Interaktionen reguliert cGMP neben der Relaxation und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen auch Entzündungsprozesse, die Throm-

bozytenadhäsion und -aggregation, die neuronale Signaltransduktion und Neurotransmission, sowie Teile des Sehprozesses.

cGMP-abhängige Proteinkinasen (= *cGMP-dependent protein kinase(s)*; cGK) werden in die cGKI und cGKII eingeteilt. Die Expressionen der Isoformen cGKI α und cGKI β erfolgen vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen, Thrombozyten und verschiedenen neuronalen Bereichen des Kleinhirns. Zu ihren Funktionen zählen die Relaxation der Gefäße und die Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Die cGKII wird hingegen in sekretorischen Epithelien der Niere (= juxtaglomeruläre Zellen) exprimiert und inhibiert die Reninsekretion (Hofmann *et al.*, 2009).

Obwohl die cAMP-abhängige Proteinkinasen (= *cAMP-dependent protein kinase(s)*; PKA) nicht ein klassisches Ziel des cGMPs sind, kann dieses in besonders hohen Konzentrationen dennoch die PKA aktivieren (Lucas *et al.*, 2000; Pilz und Casteel, 2003). Diese cGMP-vermittelte Aktivierung der PKA ist in ihrer Selektivität aber um den Faktor 50 niedriger als durch cAMP (Pfeifer *et al.*, 1999).

Die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle stellen spannungsregulierte Kationenkanäle dar. Durch die Bindung von cGMP oder cAMP werden diese geöffnet und bewirken durch den Einstrom von Natrium- und Ca²⁺-Ionen Änderungen des Membranpotentials (Frings, 1997). Aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus werden sie gegliedert in *cyclic nucleotide-gated* (= CNG) und *hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated* (= HCN) Ionenkanäle. CNG sind an der Signalübertragung im sensorischem System beteiligt, während HCN die Schrittmacherzellen im Herzen beeinflussen (Biel und Michalakis, 2009).

Die cGMP-regulierten PDEs katalysieren spezifisch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung von cAMP bzw. cGMP und stellen somit den natürlichen Gegenspieler der Nukleotidzyklasen dar (Lugnier, 2006; Francis *et al.*, 2010). In den letzten Jahren waren die PDEs Gegenstand intensiver Forschungen besonders die cGMP-spezifisch abbauende PDE 5 im Bereich der erektilen Dysfunktion (Albersen *et al.*, 2010) und der pulmonalen arteriellen Hypertonie (= PAH; Hernández-Rivera *et al.*, 2011).

1.2.6.4. Pharmakologische Aktivierung des NO-cGMP Signalweges

Derzeitig stehen verschiedene Substanzen für eine pharmakologische Modulation des NO-cGMP Signalweges zur Verfügung. Eine der schon seit längerem in vielen verschiedenen Erkrankungen bisher angewandten Modulatoren ist die Gruppe der NO-Donoren.

▪ NO-Donoren

NO-Donoren sind Substanzen, die spontan oder infolge biochemischer Prozesse NO freisetzen. Glyceroltrinitrat ist das älteste NO-freisetzende Pharmakon und wurde erstmals 1847 von Sobrero synthetisiert (Marsh und Marsh, 2000). NO-Donoren werden seit Jahren bei der Behandlung von *Angina pectoris* eingesetzt mit der Wirkung einer schnellen Dilatation der großen venösen Kapazitätsgefäße und einer damit verbundenen Senkung der kardialen Vorlast des Herzens (Al-Sa'doni und Ferro, 2000; Boden *et al.*, 2012). Das Phänomen der Entwicklung der Nitrattoleranz bei einer Therapie mit organischen Nitraten (Chirkov und Horowitz, 2007; Mayer und Beretta, 2008) limitiert jedoch den pharmakologischen Einsatz von NO-Donoren in chronischen Erkrankungen.

▪ sGC Stimulatoren und Aktivatoren

Nicht nur durch eine pharmakologisch induzierte Erhöhung der NO-Konzentration kann der NO-cGMP Signaltransduktionsweg beeinflusst werden, sondern auch durch die Verwendung von spezifischen Stimulatoren und Aktivatoren der sGC (Abb. 7).

sGC Stimulatoren und Aktivatoren sind zwei neuartige Medikamentengruppen, die eine NO-unabhängige Aktivierung der sGC bewirken. Diese Substanzen stimulieren das Enzym auf direktem Wege und erhöhen zudem die Sensitivität für bereits geringe Konzentrationen des natürlichen Stimulus NO (Schmidt *et al.*, 2009; Stasch und Hobbs, 2009). Neben der klinischen Bedeutung bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen haben sich sowohl die sGC Stimulatoren als auch die sGC Aktivatoren als wertvolle pharmakologische Substanzen bei der Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des NO-cGMP Signalweges herauskristallisiert (Evgenov *et al.*, 2006).

Im Jahre 1994 wurde erstmalig ein Derivat des 5-substituierten-2-Furaldehyd-Hydrazon als direkter NO-unabhängiger Stimulatoren der sGC entdeckt. Ko *et al.* (1994) beschrieb eine durch das Indazolderivat YC-1 hervorgerufene cGMP-vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation. Später konnte gezeigt werden,

dass diese antiaggregatorische Wirkung auf einer direkten und NO-unabhängigen Aktivierung der sGC beruht (Friebe *et al.*, 1996; Hoenicka *et al.*, 1999). Ebenfalls zeigte der sGC Stimulator mit NO einen stark synergistischen Effekt hinsichtlich der Enzymaktivierung, so dass auch geringe NO-Konzentrationen in ihrer Wirkung potenziert wurden (Friebe *et al.*, 1998; Hoenicka *et al.*, 1999). Sowohl NO als auch YC-1 benötigen für ihre enzymaktivierende Wirkung eine reduzierte Hämgruppe in der Bindungsdomäne der sGC (Friebe und Koesling, 1998; Friebe *et al.*, 1999). In den folgenden Jahren wurden weitere Derivate synthetisiert, die die gleichen Charakteristika wie YC-1 aufweisen, aber z.T. um den Faktor 1000 wirkstärker sind (Straub *et al.*, 2001 und 2002). Einer dieser potenteren Derivate ist der sGC Stimulator BAY 41-2272 (Stasch *et al.*, 2001). Auch dieser Substanz werden die Eigenschaften der cGMP-vermittelten Gefäßrelaxation, der Inhibition der Thrombozytenaggregation und eine antiproliferative Wirkung zugeschrieben (Evgenov *et al.*, 2006; Stasch und Hobbs, 2009; Roger *et al.*, 2010).

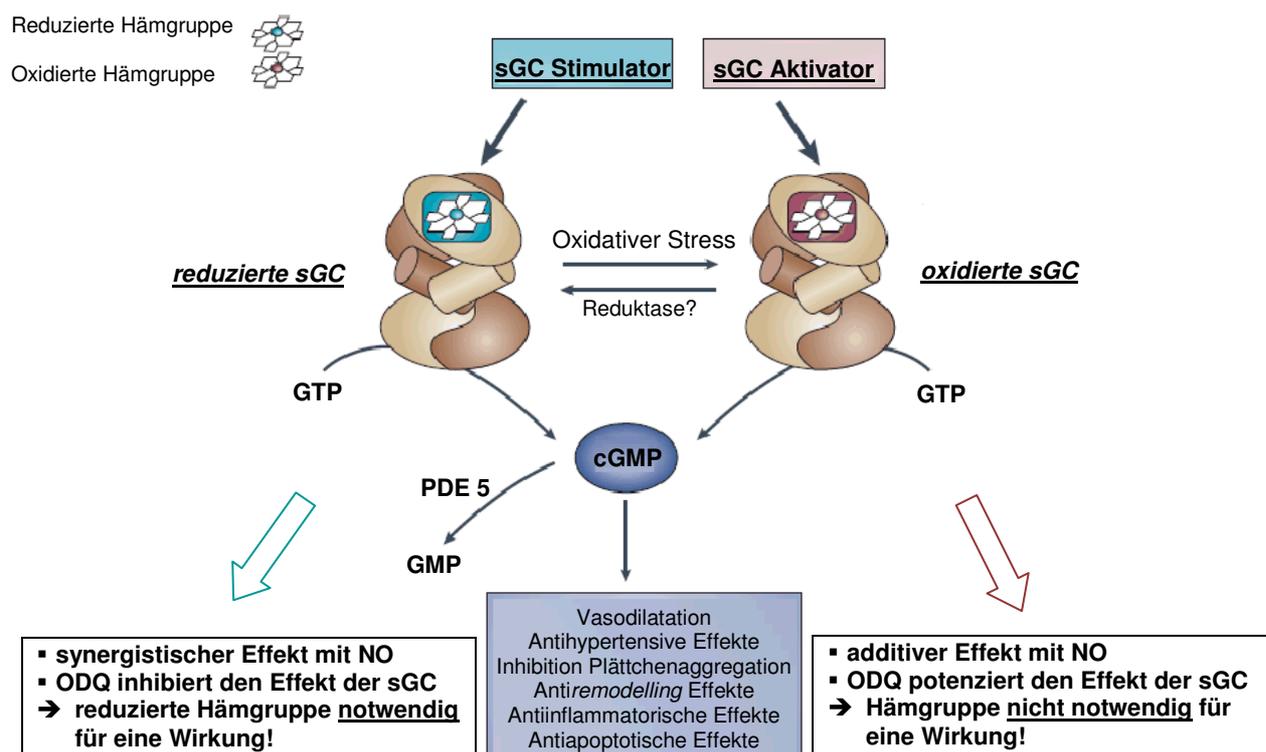


Abb. 7: Pharmakologische Wirkung der sGC Stimulatoren und sGC Aktivatoren in der Übersicht [modifiziert nach Evgenov *et al.*, 2006]

cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat; GMP= Guanosinmonophosphat; GTP= Guanosintriphosphat; NO= Stickstoffmonoxid; ODQ= sGC Inhibitor; PDE 5= Phosphodiesterase 5; sGC= lösliche Guanylatzyklase

Im Gegensatz zu den sGC Stimulatoren weisen sGC Aktivatoren andere wirkungsbezogene Eigenschaften auf (Abb. 7). sGC Aktivatoren, wie z.B. BAY 60-2770, zeigten an der nativen sGC zunächst eine geringere Enzymaktivierung, die durch die Zu-

gabe des sGC Inhibitors ODC jedoch zu einer starken Potenzierung der Aktivatorvermittelten sGC Aktivierung führte (Stasch *et al.*, 2002c). Demnach potenziert die Oxidation der Hämgruppe den Effekt des sGC Aktivators auf die Enzymaktivität. Die Aktivierung der sGC durch diese Substanzklasse erfolgt somit nicht nur NO-unabhängig, sondern gleichzeitig auch Häm-unabhängig (Stasch *et al.*, 2002c; Schmidt *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sGC Aktivatoren in Kombination mit NO einen additiven, keinen synergistischen Effekt aufweisen (Schmidt *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2009). Eine Anwendung von sGC Aktivatoren zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen konnten bereits für Atherosklerose (Stasch *et al.*, 2006), der pulmonalen Hypertension (Dumitrascu *et al.*, 2006; Dunkern *et al.*, 2007), sowie für die Herzinsuffizienz (Boerrigter und Burnett, 2007) dargestellt werden.

1.2.6.5. NO und cGMP in der Pathogenese der Leberfibrose

Die Rolle des NO-cGMP Signaltransduktionsweges in der Leberfibrose ist schon seit langem Ziel intensiver Forschungen (Wiest und Groszmann, 2002). Rockey und Chung wiesen 1998 erstmalig eine endotheliale Dysfunktion in zirrhotischen Rattenlebern nach, die zu einer reduzierten Aktivität der eNOS mit einer verminderten NO-Synthese führt. Diese Befunde wurden von Gupta *et al.* (1998) bestätigt. Im folgenden Jahr konnte Shah *et al.* eine erhöhte Bindung von Calveolin-1, einem Hüllprotein von intrazellulären Transportvesikeln, an die eNOS nachweisen, die für die reduzierte Enzymaktivität in fibrotischen Rattenlebern verantwortlich sein könnte. Andere Forschungsgruppen hingegen führten die herabgesenkte eNOS Aktivität auf eine gesteigerte Aktivierung der Rho-Kinase zurück, die durch eine Interaktion mit Akt die Bindung zwischen Akt und der eNOS inhibiert und somit die Aktivität der eNOS negativ reguliert (Anegawa *et al.*, 2008; Uehara *et al.*, 2012). Die in der Pathogenese der Leberfibrose verminderte NO-Konzentration führt zu einer Erhöhung des hepatischen Gefäßwiderstandes, die durch die Transdifferenzierung der HSCs zu kontraktilen Myofibroblasten (Friedmann, 2008b) und durch die gesteigerte Ausschüttung von vasokonstriktiven Substanzen, wie z.B. von Endothelin-1 begünstigt wird (Housset *et al.*, 1995; Rockey, 1997; Uehara *et al.*, 2012). Des Weiteren wies Perri *et al.* (2006) in aktivierten, aus fibrotischen Rattenlebern isolierten HSCs nach, dass nicht nur eine verminderte Sensitivität gegenüber vasodilatativen Substanzen in der Leberfibrose entsteht, sondern auch ein Defekt im cGMP-Proteinkinase G (= PKG)

Signaltransduktionsweg vorliegt, der in eine cGMP-Mangelsituation resultiert. Loureiro-Silva *et al.* (2006) konnte diese Befunde bestätigen und ergänzend aufzeigen, dass fibrotisches Rattenlebergewebe eine erhöhte PDE 5 Aktivität und somit einen gesteigerten Abbau von cGMP aufweist. In der fibrotischen Leber führen also sowohl die verringerte cGMP-Synthese als auch der verstärkte -Abbau zu einem herabgesenkten, endogenen cGMP-Spiegel. Diese Forschungsergebnisse über die Pathomechanismen der Leberfibrose dienten als Grundlage für weitere präklinische und klinische Untersuchungen, die den NO-cGMP Signaltransduktionsweg und dessen Dysregulation in den Vordergrund einer Behandlung der Leberfibrose gestellt haben. Der Ausgleich des NO-Mangelzustandes durch die pharmakologische Gabe von Nitratverbindungen zeigte zunächst sowohl in Tierversuchen (Stefano *et al.*, 2011) als auch in klinischen Studien erste Erfolge (Bellis *et al.*, 2003; García-Pagán *et al.*, 2003). Stefano *et al.* (2011) zeigte z.B., dass durch die Zugabe des NO-Donors *S-Nitroso-N-acetyl-cysteine* (= SNAC) die Transdifferenzierung der HSCs zu kontraktile Myofibroblasten inhibiert werden konnte. In leberfibrotischen Patienten konnte durch die Behandlung mit dem NO-Donor Isosorbid-5-Mononitrat eine Abmilderung der Leberfibrogenese mit einer Senkung des PVDs aufgezeigt werden (Bellis *et al.*, 2003). Jedoch waren sowohl die systemischen, vasodilatativen Eigenschaften der NO-Donoren (Al-Sa'doni und Ferro, 2000; Boden *et al.*, 2012) als auch die Entwicklung einer Nitrattoleranz (Chirkov und Horowitz, 2007; Mayer und Beretta, 2008) für eine langfristige und effektive Behandlung der Leberfibrose limitierend. Auch der Versuch, die NO-Freisetzung lokal auf das Lebergewebe durch eine chemische Kopplung von Gallensäuren an die Nitratverbindungen zu begrenzen, brachte trotz positiver Befunde aus *in vivo* Behandlungsstudien (Fiorucci *et al.*, 2003; Moal *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2008) nicht die gewünschten therapeutischen Erfolge in der Klinik (Berzigotti *et al.*, 2010). Ein weiterer klinischer Ansatzpunkt für die Behandlung der Leberfibrose, war die Hemmung der PDE 5. Durch eine pharmakologische Inhibition der gesteigerten PDE 5 Aktivität konnte in verschiedenen Rattenleberfibrosemodellen gezeigt werden, dass der endogene cGMP-Spiegel erhöht wird. Dies führt zu einer cGMP-vermittelten Gefäßvasorelaxation, die eine Senkung des PVDs zur Folge hat (Choi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch klinische Studien mit den spezifischen PDE 5 Inhibitoren Sildenafil und Vardenafil (Deibert *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008), die jedoch aufgrund der nicht ausreichenden PVD-senkenden Wirkung und der systemischen, vasodilatativen Eigenschaften kontrovers für eine Behandlung der Leberfibrose diskutiert wurden (Clemmesen

et al., 2008; Tandon *et al.*, 2010). Folglich zeigten beide Substanzklassen, die pharmakologisch der Dysregulation des NO-cGMP Signalweges in der Leberfibrose entgegenwirken, keinen ausreichenden und langfristigen Erfolg in der klinischen Anwendung, so dass dringend neue antifibrotische Therapien entwickelt werden müssen. Erste deskriptive *in vivo* Befunde für einen weiteren, den NO-cGMP Signalweg modulierenden, therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Leberfibrose konnte Knorr *et al.* (2008) aufzeigen. Eine spezifische Stimulation der sGC durch den sGC Aktivator BAY 60-2770 konnte die Leberfibrose in zwei verschiedenen Rattenmodellen abmildern. Neueste Untersuchungen von Xie *et al.* (2012) bestätigen die antifibrotische Wirkung von BAY 60-2770 in einem weiteren Tiermodell der Leberfibrose und bringen diesen Effekt in Zusammenhang mit der Wirkung von cGMP auf den Differenzierungsgrad der LSECs. Insgesamt liefern diese Literaturbefunde erste Anhaltspunkte für eine neue antifibrotische Therapie der Leberfibrose durch eine pharmakologische Modulation der Aktivität der sGC.

1.3. Zielsetzung der Dissertationsarbeit

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es das antifibrotische Potential einer pharmakologischen Stimulation des NO-cGMP Signaltransduktionsweges bei fibrotischen Erkrankungen der Leber präklinisch zu untersuchen. Für die Aufklärung einer Beteiligung von NO bzw. cGMP in der Leberfibrose sollten verschiedene, den NO-cGMP Signalweg pharmakologisch modulierende Substanzen *in vitro* verwendet werden. Darüberhinaus sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Wirkung des spezifischen sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Leberfibrose untersucht werden. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass in der Pathogenese der Leberfibrose eine Dysregulation des NO-cGMP Signalweges entsteht, die zu einer NO- und cGMP-Mangelsituation führt (Wiest und Groszmann, 2002; Perri *et al.*, 2006). Zur pharmakologischen Korrektur der pathologischen cGMP-Mangelsituation kommen daher sGC Stimulatoren und sGC Aktivatoren in Frage, da sie bei der spezifischen Bindung an die sGC die zelluläre cGMP-Produktion steigern (Evgenov *et al.*, 2006; Stasch und Hobbs, 2009). Für den sGC Aktivator BAY 60-2770 wurden bereits erste *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse einer antifibrotischen Wirkung in der Leberfibrose publiziert (Knorr *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012). Da im Gegensatz zu den sGC Aktivatoren die sGC Stimulatoren andere pharmakologische Charakteristika aufweisen, wie z.B. die Wirkungspotenzierung geringer NO-Konzentrationen (Friebe und Koesling, 1998;

Stasch *et al.*, 2001), stand erstmalig die Untersuchung der Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 als effiziente, antifibrotische Therapie im zentralen Fokus dieser Dissertation.

Es sollten anhand von Genexpressionsprofilen relevanter Fibrosemarker sowohl *in vitro* in leberspezifischen Fibroblasten (= HSCs) als auch *in vivo* in zwei verschiedenen Tiermodellen die Wirkung der pharmakologische Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 aufgezeigt und die Beteiligung des NO-cGMP Signalweges an der Pathogenese der Leberfibrose untersucht werden. Um mögliche Speziesunterschiede zu erfassen und die Relevanz des Signalweges in menschlichen Zellen zu validieren, sollten in den *in vitro* Versuchen parallel zu Rattenzellen auch Zellen humanen Ursprungs verwendet werden. Die Evaluierung der *in vivo* Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC sollte in zwei verschiedenen Tiermodellen der Leberfibrose durchgeführt werden, um mögliche Effekte ausschließen zu können, die mit der modellspezifischen Noxe zusammenhängen. Durch die Verwendung von biochemischen Verfahren, wie z.B. Western Blot und ELISA, sollte die Wirkung von BAY 41-2272 auf zellulärer Ebene aufgezeigt werden. Des Weiteren umfasste die Aufgabe den Einfluss des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Transdifferenzierung der HSCs zu Myofibroblasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu evaluieren. Im Fokus der *in vivo* Untersuchungen standen biochemische Kollagenmessungen, die die Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Fibroseentstehung darstellen sollten. Dabei sollte die klassische biochemische Kollagenbestimmung durch eine quantitative histologische Auswertung ergänzt werden. Darüber hinaus war es ebenso die Aufgabe zu untersuchen, ob sich der Portalvenendruckanstieg auch in dem jeweiligen Tiermodell darstellen lässt und wie die Behandlung mit BAY 41-2272 diesen klinisch entscheidenden Parameter im Verhältnis zur systemischen Kreislafsituation beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte, Operationsbesteck, Software

Gerät	Bezeichnung, Kat.-Nr.	Hersteller
abgerundete Schere	TK 8523-12	Tekno, Tuttlingen
Analysenwaage	Modell AT261	Mettler Toledo, Albstadt
anatomisch gebogene Pinzette	BD312R, stainless	Aesculap, Tuttlingen
anatomische Pinzette	BD311R, stainless	Aesculap, Tuttlingen
Augenschere	TK 9282-08S, stainless	Tekno, Tuttlingen
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus, Düsseldorf
Digitalkamera	Nikon CF-DC1	ARP DATAcon GmbH, Dietzenbach
Druckaufnehmer	Physiological Pressure Transducer Kat.-Nr. MLT844	ADInstruments GmbH, Spechbach
Einbettautomat		Sakura Finetek Inc., Torrance (USA)
Fasspinzette	HSC 701-96, stainless	Hammacher Instrumente, Solingen
FastPrep [®] -Anlage	FP120 Savant BI0/101	Thermo Scientific, Carlsbad (USA)
Feuchte Kammer	Polysterene Dish Kat.-Nr. 43110	Fisher Scientific, Schwerte
Fotofilmentwickler	AGFA Curix 60 TM	AGFA, Köln
Gelelektrophorese-kammer	XCell TM Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Glastrichter	Kat.-Nr. 9251003	Fisher Scientific, Schwerte
Hämodynamikmess-einrichtung	Power Lab System	ADInstruments GmbH, Spechbach
Heizplatte	eigene Herstellung	Bayer Pharma AG, Wuppertal
Hydroxyprolinapparatur	DigiPREP MS	SCP Science, Courtaboeuf (Frankreich)
iBlot [®] Gerät	iBlot [®] Gel Transfer Device	Invitrogen, Karlsruhe
Isoflurananlage	Modell VET-MED. Vapor	Drägerwerk AG, Lübeck
Kalibriergerät für Millar Tip-Katheter	DELTA-CAL TM Modell 650-950	Utah Medical Products Inc., (USA)
Knüpfpinzette	FD218R, stainless	Aesculap, Tuttlingen
Küvetten	Einmalküvetten Kat.-Nr. P948.1	Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Axiovert	Zeiss, Oberkochen
Millar Tip-Katheter	Mikro-Tip [®] Catheter Transducers Size 2F	Millar Instruments Inc., Texas (USA)

Miniaturstaubsauger	Wet & Dry	Severin Elektro GmbH, Sundern
Nadelhalter	Mathieu BM360R	Aesculap, Tuttlingen
Narkosekasten	eigene Herstellung	Bayer Pharma AG, Wuppertal
Paraffinausgießstation		Sakura Finetek Inc., Torrance (USA)
PCR Zykler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer	BioPhotometer®	Eppendorf, Hamburg
	Tecan Safire R	Tecan Group, Crailsheim
Pipetten	verschiedene Modelle	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Multipette	Eppendorf, Hamburg
Präparierschere	BD150, stainless	Aesculap, Tuttlingen
Probenkonzentrator	Modell 5301	Eppendorf, Hamburg
Reinraumwerkbank	HERAsafe	Thermo Scientific, Langenselbold
Rollmischer	Modell 10	Greiner Sussex Labortechnik, (England)
Rotationsmikrotom	Leica RM 2255	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Schwanenhalslampe	KL5125	A.Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Software für TaqMan Auswertung	ABI PRISM 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, (USA)
Software für statistische Auswertungen	GraphPad Prism Version 5.03	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Software für morphometrische Analysen	Cell P Version 2007	Olympus GmbH, Hamburg
Software zum Primer- design	Primer Express Version 3.0	Applied Biosystems, (USA)
Software zur Hämo- dynamikauswertung	LabChart Version 6.0	ADInstruments GmbH, Spechbach
Spektrophotometer	NanoDropR ND 100	Thermo Scientific, Carlsbad (USA)
spitze Schere	TK8652-09, stainless	Tekno, Tuttlingen
Stromwandler	Power PAC 300	BioRad, München
TaqMan Gerät	ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, (USA)
Thermoschüttler	Modell 5436	Eppendorf, Hamburg
Tierwaage	Modell PG5001-S	Mettler Toledo, Albstadt
Trockenrasierer	Contura	Wella Internationals, Darmstadt
Trockenschrank	Modell 400	Memmert, (Deutschland)
VetScan VS2™ Analysegerät		Scil Vet GmbH, Viernheim
Wasserbad	Julabo 19A	Julabo, Selbach
Wundspretzer	17006-05 Blade Retractor	Fine Science, Heidelberg
Zentrifuge	Modell 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

Gerät	Bezeichnung, Kat.-Nr.	Hersteller
4-Dimethylaminobenzaldehyd	Kat.-Nr. 15,647-7	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>Aqua dest.</i>	Kat.-Nr. W3500	Sigma Aldrich, Deisenhofen
β-Merkaptoethanol	Kat.-Nr. M3148	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Blauspray	Kat.-Nr. 900-3273	Henry Schein Inc., (USA)
Bromphenolblau	Kat.-Nr. 114391	Sigma Aldrich, Deisenhofen
BSA	Bovines Serumalbumin Kat.-Nr. B-4287	Sigma Aldrich, Deisenhofen
cGMP-Detektionskit	cGMP Direct Biotrak EIA System Kat.-Nr. RPN225	GE Healthcare, Freiburg
Chloramin-T Hydrat	Kat.-Nr. 857319	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Kat.-Nr. 1.02445.1000	Merck, Darmstadt
cOmpete PIC Tabletten	Kat.-Nr. 11 836 170 001	Roche Diagnostics, Mannheim
DAB Chromogen	3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets Kat.-Nr. D4293	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Deckgläser	24 x 50 mm Kat.-Nr. 9161050	Fisher Scientific, Schwerte
DMSO	Dimethyl sulfoxide Kat.-Nr. D 2560	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DNase I	Kat.-Nr. 18068-015	Invitrogen, Karlsruhe
DNase/RNase freies Wasser	DNase/RNase free distilled water Kat.-Nr. 10977	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
ECL Reagenz	ECL TM Western Blotting Detection Reagents Kat.-Nr. RPN2209	GE Healthcare, Freiburg
Eindeckmedium	Pertex [®] Kat.-Nr. 41-4010-22	Medite GmbH, Burgdorf
Eisessig	Kat.-Nr. A6283	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Kat.-Nr. 1.00983.5000	Merck, Darmstadt
Falcongefäße	BD Falcon High-Clarity Polypropylene Tube	Becton Dickinson, Heidelberg
Fast Green Farbstoff	Kat.-Nr. F7252	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Filter	Melitta Kaffeefilter 1 x 6	Melitta, Minden
Filterpapier	Faltenfilter D = 12,5 mm	Fisher Scientific, Schwerte
Formaldehyd	Kat.-Nr. 104003	Merck, Darmstadt
Fotofilm	BioMAX XAR Kodak Kat.-Nr. Z358487-50EA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glyzerol	Kat.-Nr. G5516	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hautdesinfektionsspray	Cutasept F Ch.B. 277119	Bode Chemie, Hamburg
Hydroxyprolinkochgefäße	DigiTUBES Kat.-Nr. 010-500-261	SCP Science, Courtaboeuf (Frankreich)
Hydroxyprolinstandard	Trans-4-Hydroxy-L-Proline Kat.-Nr. H5,440-9	Sigma Aldrich, Deisenhofen

iBlot [®] Gel Transfer Stack	Kat.-Nr. IB3010-01	Invitrogen, Karlsruhe
ImProm-II [™] -Reverse Transcription System Kit	Kat.-Nr. A 3800	Promega, Mannheim
Injektionskanüle	BD Microlance Nr. 20 27Gx ^{3/4"} Kat.-Nr. 302200	BD Pharmingen, (Deutschland)
Isofluran [®]	Ch.B. 11109A14	CP Pharma, Burgdorf
Isopropanol	Kat.-Nr. 1.09634.1011	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung	physiologisch (= 0,9 %ig) Kat.-Nr. WE 3156	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ligationsfaden	Ethibond Excel Kat.-Nr. EH6371H	Johnson & Johnson, (Deutschland)
Lithium-Heparin Monovetten	Li-Hep 7,5 ml Kat.-Nr. 01.1634	Sarstedt, Nümbrecht
Mayer's Hämalan	Kat.-Nr. 1.09249.1000	Merck, Darmstadt
Methanol	Kat.-Nr. 1.06009.2511	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten für TaqMan Analysen	384-well Clear Optical Reaction Plate Kat.-Nr. 4309849	Applied Biosystems, (USA)
Mikrotiterplattenfolie	MicroAmp Optical Adhesive Film Kat.-Nr. 4311971	Applied Biosystems, (USA)
Milchpulver	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk Kat.-Nr. 170-6404	BioRad, München
Nahtmaterial	Ethicon Vicryl Polyglatin 4-0 Kat.-Nr. V994H	Johnson & Johnson, (Deutschland)
Natriumhydroxid	Kat.-Nr. 35256	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Kat.-Nr. S 2889	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Kat.-Nr. S 7653	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Kat.-Nr. S 6508	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Novalgin [®] Injektionslösung	PZN 0731465	Sanofi Aventis, Deutschland
NuPage [®] MOPS SDS Running Buffer (20x)	Kat.-Nr. NP0001	Invitrogen, Karlsruhe
Objekträger	SuperFrost Plus Kat.-Nr. J1800AMNZ	Menzel Gläser, Braunschweig
PapPen	Kat.-Nr. PL002R015	DCS Innovative Diagnostik, Hamburg
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Kat.-Nr. D8537	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PhosStop Tabletten	Kat.-Nr. 04906837001	Roche Diagnostics, Mannheim
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Kat.-Nr. 23225	Thermo Scientific, (USA)
Pikrinsäure	Kat.-Nr. 80452	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Pipettenspitzen	0,1 µl bis 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen	Polysterene Round Bottom Kat.-Nr. 352063	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

Polyacrylamidgele	NuPage [®] 4-12% Bis-Tris Gel Kat.-Nr. NP0323BOX	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Kat.-Nr. #0413	ScienCell, Carlsbad (USA)
Polypropylen Faden	Seraflex Kat.-Nr. IC10-8000	Serag Wiessner, (Deutschland)
Primer	eigenes Design	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Proteinstandard für SDS Gele	Precision Plus Protein [™] Western C [™] Standards Kat.-Nr. 161-0376	BioRad, München
qPCR MasterMix Plus	Kat.-Nr. RT-QP2X-03-075	Eurogentec, Köln
Rasierklingen	Wilkinson Sword Classic Kat.-Nr. 115	Wilkinson, Solingen
Reaktionsgefäße	0,5 ml bis 2 ml	Eppendorf, Hamburg
RIPA-Puffer (10x)	Kat.-Nr. 9806	CellSignaling, (USA)
RNeasy [®] Mini Kit	Kat.-Nr. 74106	Qiagen, Hilden
Salzsäure	Kat.-Nr. 1.10164.2500	Merck, Darmstadt
Schredder-Röhrchen	Lysin Matrix Tubes Kat.-Nr. 6913-100	MP Biomedicals, (USA)
Schwefelsäure	Kat.-Nr. 339741	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Schweineserum	Kat.-Nr. P9783	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat Kat.-Nr. 05030	Fluka, Steinheim
Sirius Rot Farbstoff	Direkt Red 80 Kat.-Nr. 60700	Sigma Aldrich, Deisenhofen
S-Monovetten Adapter (gelb)	20Gx1 ^{1/2"} Kat.-Nr. 85.1160	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten Adapter (schwarz)	22Gx1 ^{1/2"} Kat.-Nr. 85.1440	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Omnifix 1 ml	Braun, Melsungen
Sensitive [™] Wash Buffer	Kat.-Nr. HK583-5KE	BioGenex Laboratories, USA
TGFβ	Kat.-Nr. H8541	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trinatriumcitrat	Kat.-Nr. S1804	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl	Trizma hydrochloride buffer solution (1M) Kat.-Nr. T2194	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TRIzol [®] Reagenz	Kat.-Nr. 15596-018	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Kat.-Nr. 25300	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Kat.-Nr. P9416	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tylose	MH 300 Kat.-Nr. 93800	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Vectastain ABC Kit	Peroxidase Mouse IgG Kat.-Nr. PK4002	Vectorlabs, Wiesbaden
Venofix A	0.65 mm x 20 mm Kat.-Nr. 4056353	Braun, Melsungen
VetScan [™] Reagenzdisk	Comprehensive Diagnostic Profile Kat.-Nr. 8133	Scil Vet GmbH, Viernheim
Wasserstoffperoxid	30 %ig Kat.-Nr. 386790	Calbiochem, Darmstadt
Wattestäbchen	Bel Premium	Hartmann AG, Heidenheim
Xylol	Kat.-Nr. 8187541000	Merck, Darmstadt

Zellkulturflaschen	T175 cm ² ; 750 ml	BD Pharmingen, (Deutschland)
Zellkulturplatten	verschiedene Größen	Fisher Scientific, Schwerte
Zellschaber	Kat.-Nr. 353086	BD Pharmingen, (Deutschland)
Zellstofftupfer	Pur-Zellin Kat.-Nr. 143212	Hartmann AG, Heidenheim
Zitronensäure	Kat.-Nr. C1857	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.1.3. Puffer und Lösungen

Acetat-Citrat Puffer

5,7 g Natriumacetat
 3,75 g Trinatriumcitrat
 0,55 g Zitronensäure
ad 50 ml *Aqua dest.*
 38,5 ml Ethanol abs.
ad 100 ml *Aqua dest.*

Blockpuffer

15 g Milchpulver
 3 g BSA
ad 300 ml PBS

Chloraminlösung

7 g Chloramin-T Hydrat
ad 100 ml Lewatitwasser

Ehrlich's Reagenz Lösung

Lösung A:

12 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd
ad 20 ml Ethanol abs.

Lösung B:

2,74 ml Schwefelsäure

→ Lösung B wurde mit Lösung A gemischt!

Fast Green Färbelösung

1 g Fast Green Farbstoff
ad 1 L gesättigte wässrige Pikrinsäure

→ vor Gebrauch wurden 5 ml Eisessig auf 100 ml Färbelösung geben!

Gesättigte wässrige Pikrinsäure

15 g Pikrinsäure
ad 500 ml heißes Lewatitwasser
15 g Pikrinsäure
ad 500 ml kaltes Lewatitwasser

→ beide Ansätze wurden gemischt und vor Gebrauch 24 h bei RT gelagert!

Laufpuffer (Western Blot)

50 ml NuPage[®] MOPS SDS Running Buffer (20x)
ad 1 L *Aqua dest.*

Lämmli-puffer (4x)

205 mM Tris-HCl
40 % Glyzerol
6 % SDS
5 % β-Merkaptoethanol
0,04 % Bromphenolblau

Mayer's Hämalaun Gebrauchslösung

50 ml Mayer's Hamaläun
ad 150 ml Lewatitwasser

Oxidationslösung

1 Teil Chloraminlösung
4 Teile Acetat-Citrat Puffer

Poly-L-Lysin Lösung

15 µl Poly-L-Lysin (Stocklösung= 10 mg/ml)
ad 10 ml steriles Wasser

Proteinwaschpuffer

100 µM Natriumorthovanadat (Na₃VO₄)
1 L PBS

RIPA-Gebrauchspuffer

50 ml RIPA-Stocklösung
1 Tabl. cOmpete PIC (= Protease Inhibitor Cocktail)
5 Tabl. PhosStop (= Phosphatase Inhibitor Cocktail)

RIPA-Stocklösung

1 ml RIPA-Puffer

9 ml *Aqua dest.*

Saures Lewatitwasser (~ pH 2,5)

300 ml Eisessig

660 ml Lewatitwasser

Sirius Rot Färbelösung

1 g Sirius Rot Farbstoff

ad 1 L gesättigte wässrige Pirkinsäure

Stripping-Puffer

10 ml SDS-Lösung (10 %)

3,125 ml Tris-HCl

300 µl β-Merkaptoethanol

ad 50 ml *Aqua dest.*

TBS-Puffer (pH 7,4)

10 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

TBST-Blockpuffer

50 ml TBST-Puffer

2,5 g Milchpulver

TBST-Puffer

49,95 ml TBS-Puffer

0,05 ml Tween 20

Tylozelösung

5 g Tylose

ad 100 ml Leitungswasser

Waschpuffer

50 ml Sensitive™ Wash Buffer

ad 1 L Lewatitwasser

2.1.4. Zelllinien und Kulturmedien

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Hersteller
<i>Human hepatic stellate cells</i> (= hHSCs)	5300	ScienCell, Carlsbad (USA)
<i>Rat hepatic stellate cells</i> (= rHSCs)	R 5300	ScienCell, Carlsbad (USA)
Stellate cell medium	5301	ScienCell, Carlsbad (USA)

2.1.5. Antikörper und Substanzen

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Hersteller
anti-glattmuskuläres alpha-Aktin (α -SMA; Wirt: Maus (monoklonal) Klon 1A4)	A 2547	Sigma Aldrich, Deisenhofen
anti- β -Aktin (Wirt: Maus (monoklonal) Klon AC-15)	A3854	Sigma Aldrich, Deisenhofen
anti-Maus IgG (Peroxidase gekoppelt)	NIF825	GE Healthcare, Freiburg

sGC Stimulator BAY 41-2272

Für die pharmakologische Stimulation der sGC wurde die Substanz BAY 41-2272 (= 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridin-4-ylamin) der Bayer Pharma AG (Wuppertal, eigene Synthese; Abb. 8) verwendet (Boerrigter und Burnett, 2007; Stasch und Hobbs, 2009). Die mittlere effektive Konzentration (= EC₅₀) von BAY 41-2272 liegt bei ca. 0,3 μ M (Evgenov *et al.*, 2006). Die Substanz wurde für die *in vitro* Versuche in DMSO in einer Konzentration von 10 mM angesetzt und entsprechend mit Medium auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt.

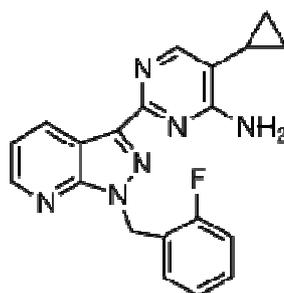


Abb. 8: Die chemische Strukturformel des sGC Stimulators BAY 41-2272 (Evgenov *et al.*, 2006)

DETA NONOate

Für die *in vitro* Versuche wurde der kommerziell erhältliche NO-Donor DETA NONOate (= (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniummethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolate; Cayman Chemical (USA), Kat.-Nr. 82120; Abb. 9) ausgewählt, da dieser die längste Halbwertszeit (ca. 20 h) bei physiologischen Bedingungen

(~ 37 °C) aufweist (Hrabie und Klose, 1993; Jiang *et al.*, 2006). DETA NONOate wurde in einer Stocklösung von 10 mM in 0,01 M NaOH angesetzt und in einer Endkonzentration von 100 μ M in den jeweiligen *in vitro* Experimenten verwendet (Muzaffer *et al.*, 2005; Selemidis *et al.*, 2007).

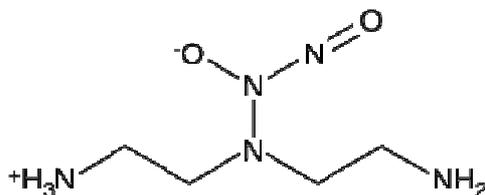


Abb. 9: Die chemische Strukturformel von DETA NONOate (www.caymanchem.com)

8-Bromo-cGMP

8-Bromo-cGMP (= *8-Bromo-cyclic guanosine monophosphate*; Sigma Aldrich (Deisenhofen), Kat.-Nr. B1381; Abb. 10) ist ein in Lösung stabiles, membranpermeables Analogon des natürlich vorkommenden Signalmoleküls cGMP (Chu und Prasad, 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das Analogon besonders für die Verwendung in Zellkulturversuchen. Die Substanz wurde in sterilem Wasser in einer Konzentration von 25 mM gelöst und für die *in vitro* Experimenten entsprechend mit Zellmedium verdünnt.

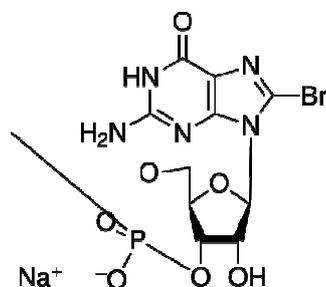


Abb. 10: Die chemische Strukturformel von 8-Bromo-cGMP (www.sigmaaldrich.com)

Vardenafil

Vardenafil (= 1-[[3-(5-Methyl-4-oxo-7-propyl-3,4-dihydroimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-ethylpiperazin; Bayer Pharma AG (Wuppertal), eigene Synthese; Abb. 11) ist ein selektiver Inhibitor der PDE 5 (Kouvelas *et al.*, 2009). Vardenafil wurde ebenfalls in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM gelöst und *in vitro* in Anlehnung an die Ergebnisse von Teixeira *et al.* (2006) und Al-Aown *et al.* (2011) in einer Endkonzentration von 1 μ M verwendet.

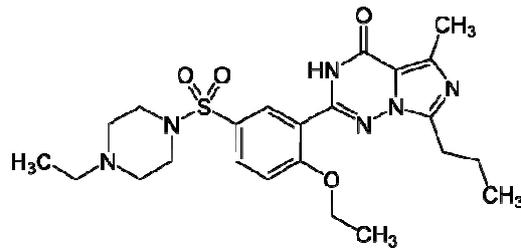


Abb. 11: Die chemische Strukturformel von Vardenafil (Bayer Pharma AG, Wuppertal)

KT 5823

Die Substanz KT 5823 (= (9*S*,10*R*,12*R*)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9,12-epoxy-1*H*-diindolo[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*k*]pyrrolo[3,4-*l*][1,6]-benzodiazocine-10-carboxylic acid, methyl ester; Tocris Biosciences (UK), Kat.-Nr. 1289; Abb. 12) ist ein selektiver PKG Inhibitor (Bellocq *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010) der in DMSO zu einer Konzentration von 1 mM gelöst wurde. Die Endkonzentration in den *in vitro* Versuchen betrug jeweils 1 μ M (basierend auf den Ergebnissen von Burkhardt *et al.*, 2000).

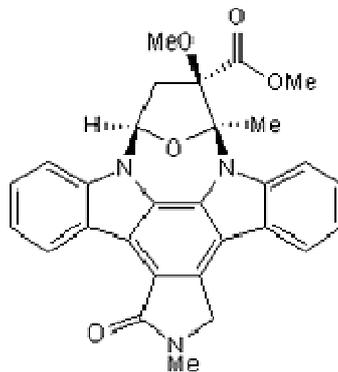


Abb. 12: Die chemische Strukturformel des selektiven PKG Inhibitors KT 5823 (www.tocris.com)

sGC Inhibitor ODQ

Als Inhibitor der sGC wurde ODQ (= 1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one; Tocris Biosciences (UK), Kat.-Nr. 0880, Abb. 13) verwendet, welcher das Fe²⁺-Zentrum der prosthetischen Hämgruppe der sGC oxidiert und damit eine Aktivierung durch NO oder sGC Stimulatoren unterbindet (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996). Der sGC Inhibitor ODQ wurde in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM gelöst und in einer Endkonzentration von 10 μ M *in vitro* eingesetzt (basierend auf den Ergebnissen von Feelisch *et al.* (1999) und Hoenicka *et al.* (1999)).

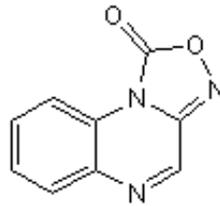


Abb. 13: Die chemische Strukturformel des sGC Inhibitors ODQ (www.tocris.com)

Zur Übersicht wurden die pharmakologischen Wirkungen der verwendeten Substanzen auf den NO-cGMP Signaltransduktionsweg in Abb. 14 dargestellt.

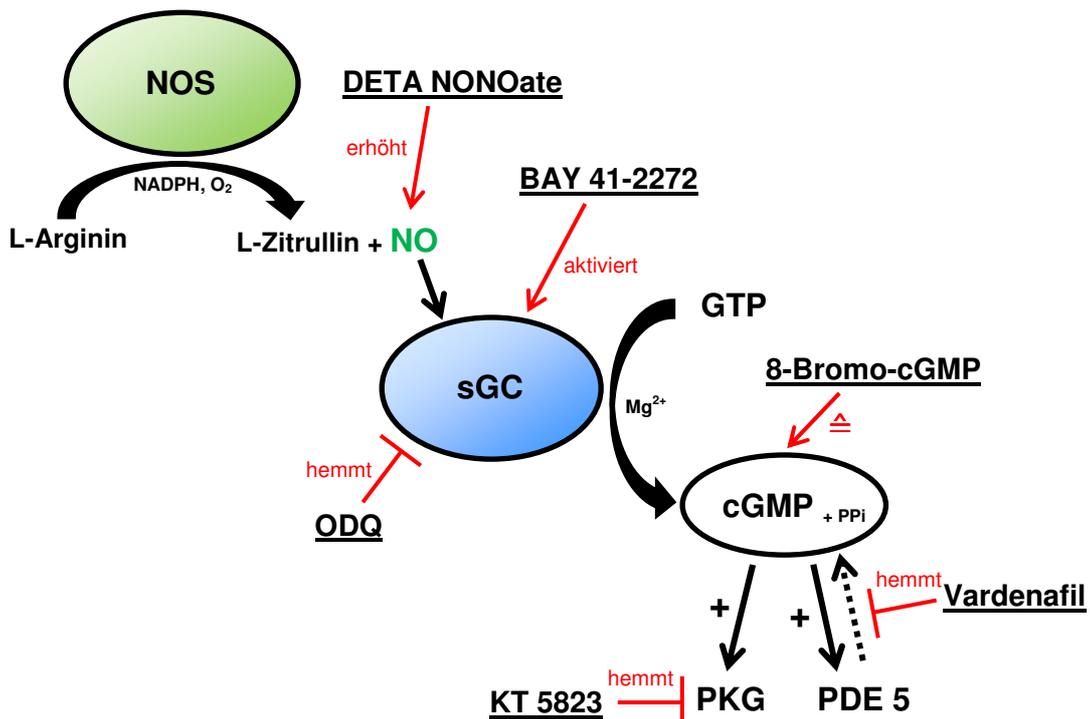


Abb. 14: Schematische Übersicht der pharmakologischen Wirkungen der verschiedenen Substanzen auf den NO-cGMP Signalweg [modifiziert nach Denninger und Marletta, 1999]

8-Bromo-cGMP= stabiles cGMP Analogon; BAY 41-2272= sGC Stimulator; cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat; DETA NONOate= NO-Donor; GTP= Guanosintri-phosphat; KT 5823= PKG Inhibitor; Mg^{2+} = Magnesium; NADPH= Nicotin-amidadenindinukleotidphosphat; NO= Stickstoffmonoxid; NOS= NO-Synthase; O_2 = Sauerstoff; ODQ= sGC Inhibitor; PDE 5= Phosphodiesterase 5; PKG= Proteinkinase G; PP_i = Diphosphat; sGC= lösliche Guanylatzyklase; Vardenafil= PDE 5 Inhibitor

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

Die Arbeiten mit zellbiologischem Material erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank der Sicherheitsstufe S1.

2.2.1.1. Kultivierung von primären adhärennten Zelllinien

Primäre Ratten (= rHSCs) und humane HSCs (= hHSCs) wurden käuflich erworben. Die Zellkulturflaschen (T175 cm²) wurden über Nacht mit einer Poly-L-Lysin Lösung beschichtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 50 ml des entsprechenden Herstellermediums bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden diese passagiert. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 10 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt. Für die durchgeführten *in vitro* Studien wurden ausschließlich Zellen der dritten Passage verwendet.

2.2.2. Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.2.1. RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA (= *ribonucleic acid*, RNA) aus primären Zellen wurden diese in Poly-L-Lysin beschichteten 12-Loch-Platten kultiviert (30000 Zellen/well), anschließend mit PBS gewaschen und je nach Versuchsansatz mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit und einer Vitalitätskontrolle der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer (enthalten im RNeasy[®] Mini Kit) lysiert. Die weitere Aufarbeitung der Gesamt-RNA erfolgte nun im Anschluss mit dem RNeasy[®] Mini Kit nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde zum Ende der Aufarbeitung mit 35 µl DNase/RNase freiem Wasser eluiert, mittels Spektrophotometer quantifiziert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2. cDNA-Synthese

Die extrahierte Gesamt-RNA (Abschnitt 2.2.2.1.) ist häufig mit genomischer DNA (= *desoxyribonucleic acid*) verunreinigt. Daher wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau mit Hilfe der RNase freien DNase I entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte, DNA freie RNA kann im Rahmen der RT-PCR (= *Real-Time TaqManTM polymerase chain reaction*; Abschnitt 2.2.2.3.) nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für das Enzym Polymerase ist. In einem Zwischenschritt musste daher unter Verwendung des Enzyms Reverse-Transkriptase (= RNA abhängige DNA-Polymerase) eine zur RNA komplementäre cDNA (= *complementary desoxyribonucleic acid*) synthetisiert werden. Hierzu wurde das ImProm-IITM-Reverse Transcription System Kit nach Herstellerangaben verwendet. Bis zur weiteren Verwendung der cDNA wurde diese bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time TaqManTM PCR*)

Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Diese Methode basiert auf einen Fluoreszenz-Energietransfer (= *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) bei dem sequenzspezifische TaqMan-Sonden eingesetzt werden. Eine Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, welches am 5'-Ende mit einem 6-Carboxyfluorescein (= FAM) als Reporterfarbstoff markiert ist und am 3'-Ende ein 6-Carboxytetramethylrhodamin (= TAMRA) als Quencherfarbstoff trägt und durch einen Phosphatrest blockiert ist. Durch Hydrolyse der TaqMan-Sonde, herbeigeführt durch die 5'-3' Exonuclease Aktivität der Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges, wird der Reporterfarbstoff freigesetzt. Voraussetzung hierfür ist eine sequenzspezifische Hybridisierung zwischen TaqMan-Sonde und cDNA (= Template). Da der Fluoreszenzanstieg direkt proportional zu der Anreicherung des Amplifikats ist, nimmt das Reportersignal in Abhängigkeit der Zeit zu. Je höher die gemessene relative Expression eines Genes ist, desto mehr PCR Produkte werden amplifiziert. Dies macht eine Quantifizierung der Genexpression möglich (Livak *et al.*, 1995). Für die Durchführung der RT-PCR wurden 4 µl der cDNA mit qPCR MasterMix Plus, dem genspezifischen Primerpaar (Endkonzentration: 300 nM) und der TaqMan-Sonde (Endkonzentration: 150 nM) gemischt (Tabelle 1; S. 36).

Tabelle 1: DNA-Sequenzen der genspezifischen PCR-Primer und der jeweiligen TaqMan-Sonden für die Spezies (a) Ratte und (b) Human

(a) Ratte			
Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')	Sonde (5'-FAM, 3'-TAMRA)
ribosomales L32	GAAAGAGCAGCACAGCTGGC	TCATTCTCTTCGCTGCGTAGC	TCAGAGTCACCAATCCCAACGCCA
Col1 α 1	GAAGCATGTCTGGTTTGGAGAGA	ATCGGAACCTTCGCTTCCAT	TGACCGATGGATTCCAGTTCGA
α -SMA	GCATAAAGACACCGGCATTT	GGTCCTTGGTGTGAGGATGG	CAACGCTGGCATGCTTGAGGTTTCTAC
LTBP2	TGAACACAATGGTGGTCCTCC	TGGCACCCCTGGGTCTGA	TCTCAAATCTTGGGCCAGAACTCCACA
MMP2	GTTTATTTGGCGGACAGTGACA	GGGAGCTCAGGCCAGAATG	CCCACAGGTCCCTTGCTGGTGG
TIMP3	ATCCCCAGGATGCCTTCTG	CCAGCTTCTTTCCACCACTT	AACTCCGACATCGTGATCCGGGC
TGF β	CTCCCAACGTCGAGGTG	GGCCATGAGGAGCAGGAAG	CTAGGGCACCATCCATGACATGAACC
(b) Human			
Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')	Sonde (5'-FAM, 3'-TAMRA)
ribosomales L32	AAGTTCATCCGGCACCAGTC	TGGCCCTTGAATCTTCTACGA	CCCAGAGGCATTGACAACAGGG
Col1 α 1	CAGTGTGGCCCAGAAGAACTG	AACTGGAATCCATCGGTCATG	CAAGGACAAGAGGCATGTCTGGTTC
α -SMA	ATCCTCCCTTGAGAAGAGTTACGA	CTGGGCAGCGGAAACGT	TGCCTGATGGGCAAGTGATCA
LTBP2	CGAGATCTGCCCTAGTGGAAA	GGCCCGAATATCACACACTCA	AGCCTGGACGTTTGGACAGACCA

α -SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; Col1 α 1= fibrilläres Kollagen 1 α 1; LTBP2= *latent transforming growth factor beta binding protein 2*; MMP 2= Matrixmetalloproteinase 2; ribosomales L32= *housekeeping* Gen; TGF β = *transforming growth factor beta*; TIMP 3= Inhibitor der Matrixmetalloproteinase 3

Die PCR wurde in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einem Temperaturprogramm von 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 15 s 95 °C und 1 min 60 °C, in einer 384-Loch-Platte im TaqMan Gerät von Applied Biosystems durchgeführt. Die Genexpression wurde mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Zu Beginn der PCR ist die Templatmenge reaktionslimitierend. Unter idealen Reaktionsbedingungen nehmen in der nachfolgenden Phase die PCR Amplifikate bis zum Erreichen einer Plateauphase exponentiell zu. Der CT-Wert (= *cycle threshold value*) gibt den Zyklus an, bei dem die detektierte Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz angestiegen ist. Die relative Genexpression lässt sich im Anschluss nach folgender Formel berechnen:

$$\text{relative Genexpression} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}} \text{ mit } \Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} [\text{CT}_{35} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}] - \Delta\text{CT} [\text{CT}_{\text{Probe}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}].$$

Als Referenzgen wurde das ribosomale Protein L32 (Thellin *et al.*, 1999; Janovick-Guretzky *et al.*, 2007) herangezogen und die Berechnungen der relativen Genexpression erfolgte nach dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems. Ein CT-Wert von 35 entsprach hierbei dem höchsten anzunehmenden CT-Wert und diente bei der Berechnung als interne Referenz.

2.2.2.4. cGMP-Detektion

Für die quantitative Bestimmung des cGMPs wurden die Zellen in einer 12-Loch-Platte (30000 Zellen/*well*) 24 h kultiviert und im Anschluss je nach Versuchsaufbau mit den verschiedenen Substanzen stimuliert. Nach 48 h erfolgte zunächst eine Vitalitätskontrolle der Zellen bevor die Zellkulturplatten auf Eis gestellt, das Medium entfernt und die Zellen mit 300 μl eiskalten 70 %igem Ethanol (= EtOH) beschichtet wurden. Die cGMP-Extraktion aus den Zellen erfolgte über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag konnten die Extrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit Hilfe eines Probenkonzentrators über Nacht bei 30 °C lyophilisiert und anschließend der Gehalt an cGMP unter Verwendung des cGMP-Detektionskits nach Herstellerangaben bestimmt werden. Die Zellrückstände in den 12-Loch-Platten wurden in 150 μl 0,1 M NaOH aufgenommen, um den jeweiligen Proteingehalt mit der BCA-Methode (= Bicinchoninsäure-Methode) zu messen (Smith *et al.*, 1985; Abschnitt 2.2.2.5.). Die Berechnung des cGMP-Gehaltes der Proben erfolgte in fmol/mg Protein.

2.2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Methode)

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellen erfolgte nach der BCA-Methode. Diese Messung beruht auf der Bildung eines Komplexes zwischen Peptiden, mindestens drei Aminosäureresten und Kupfer (= Cu^{2+}) Ionen in wässrig alkalischer Lösung (= Biuret-Reaktion). Bei dieser Reaktion wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert und bildet mit zwei Molekülen BCA einen dunkelvioletten Farbkomplex, der kolorimetrisch detektiert und quantifiziert werden kann. Für die Messung der Proteinkonzentration wurde das Pierce[®] BCA Protein Assay Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Anhand einer BSA-Standardkurve wurden die Werte der zu messenden Proben berechnet.

2.2.2.6. Extraktion von Zellproteinen

Für die Bestimmung der Proteinexpression in HSCs wurden diese in 6-Loch-Platten ausgesät (60000 Zellen/well), 24 h kultiviert und im Anschluss mit verschiedenen Konzentrationen des sGC Stimulators BAY 41-2272 (= 1 und 10 μM) 48 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Vitalitätskontrolle der Zellen (s.a. Anhang 1; S. 122). Im Anschluss daran wurde das Medium abgesaugt, die 6-Loch-Platten auf Eis gestellt und die Zellen mit Proteinwaschpuffer dreimal gewaschen. Nach diesem Waschschrift erfolgte die Zelllyse sowohl durch Zugabe von 120 μl RIPA-Gebrauchspuffer als auch durch Abschaben bzw. mechanischem Auf- und Abpipettieren der Zellen. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate 20 min, bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert, um die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Gesamtproteine wurde mittels BCA-Methode (Abschnitt 2.2.2.5.) bestimmt, so dass im weiteren Verlauf 10 μg Protein pro Geltasche aufgetragen und mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.7.) aufgetrennt werden konnten.

2.2.2.7. Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der in den Zelllysaten vorhandenen Proteine wurden diskontinuierliche, vertikale 4-12 %ige Polyacrylamidgele verwendet, welche auf dem von Laemmli 1970 entwickeltem SDS-PAGE System basieren. Bei dieser Methode enthält der Laufpuffer das SDS, welches die Entfaltung und Maskierung der Eigenla-

dung der Proteine unterstützt. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von ihrer nativen Faltung und Ladung ermöglicht. Nachdem das Gel in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt wurde, konnte diese vollständig mit Laufpuffer befüllt werden. Die zu trennenden Proteinproben (10 µg pro Geltasche) wurden mit vierfach konzentrierten Lämmli-puffer versetzt, 5 min bei 99 °C im Thermoschüttler erhitzt und nach dem Auftragen in die Geltaschen bei 150 V für ca. 1 h aufgetrennt.

2.2.2.8. Western Blot

Die im SDS-PAGE Verfahren elektrophoretisch aufgetrennten Proteinproben wurden im weiteren Verlauf, basierend auf der von Towbin *et al.* (1979) entwickelten Western Blot-Methode, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (= *Blotting*). Für diesen Schritt wurde das iBlot[®] Gerät mit den zugehörigen iBlot[®] Gel Transfer Stack verwendet. Das Gel wurde hierbei auf die Nitrozellulosemembran (= unterer *Stack*) gelegt und mit einem angefeuchteten Filterpapier bzw. dem oberen *Stack* abgedeckt. Mit Hilfe des iBlot[®] Gerätes wurden die im Gel enthaltenen Proteine innerhalb von 7 min auf die Membran transferiert und dann im Anschluss mittels spezifischer Antikörper detektiert (= Immundetektion; Abschnitt 2.2.2.9.).

2.2.2.9. Immundetektion

Die Immundetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion entwickelt 1988 von Harlow und Lane (= Immunosandwich assay). Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in TBST-Blockpuffer unter ständigem Schütteln bei 4 °C über Nacht geblockt. Im Anschluss folgte die einstündige Inkubationszeit bei RT mit dem primären Antikörper gegen α-SMA (1:500 verdünnt in TBST-Blockpuffer). Für die Detektion des gebundenen monoklonalen Antikörpers gegen α-SMA erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer eine einstündige Inkubation bei RT mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (anti-Maus-IgG: 1:10000 verdünnt in TBST-Blockpuffer). Nach dieser Inkubation wurde die Membran erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Durch die Zugabe des ECL Reagenz (1 min bei RT) wurde in Anwesenheit des Enzyms Peroxidase Chemilumineszenz erzeugt. Diese wurde unter Verwendung eines Fotofilms detektiert.

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung der Geltaschen wurde das konstitutiv exprimierte *housekeeping* Protein *beta-actin* (= β -Aktin) auf der Membran nachgewiesen. Hierfür wurde diese zunächst in TBST-Puffer gewaschen, um danach die Antikörperbindungen mit dem *Stripping*-Puffer (Inkubation 30 min bei 56 °C) von der Membran zu entfernen. Nun folgte erneut die Absättigung der unspezifischen Bindungen der Membran über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln mit TBST-Blockpuffer. Am nächsten Tag wurde die Membran 1 h bei RT mit dem Antikörper gegen β -Aktin (1:100000 verdünnt in TBST-Blockpuffer) inkubiert und danach dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG gekoppelt mit Peroxidase (1:10000 verdünnt in TBST-Blockpuffer) fand ebenfalls 1 h bei RT statt. Auf diesen Inkubationsschritt folgte ein dreimaliger Waschschritt mit TBST-Puffer bevor das ECL Reagenz für 1 min bei RT hinzugegeben wurde. Mittels eines Fotofilms wurde die Chemilumineszenz detektiert.

2.2.3. Tierexperimentelle Methoden

Für alle *in vivo* Versuche wurden weibliche Ratten (= *Rattus norvegicus*) des Auszuchtstammes Sprague Dawley (Bezeichnung: *HSD:SpragueDawley SD*) des Zucht- und Lieferbetriebes Harlan Laboratories, Deutschland verwendet. Alle durchgeführten Tierstudien entsprachen der Bestimmung des deutschen Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 und waren von der zuständigen Behörde (LANUV NRW: Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz) genehmigt (Aktenzeichen: 87-51.04.2010.A264 vom 31.01.2011) bzw. angezeigt unter dem Aktenzeichen: 8.87-50.10.44.09.122 (vom 26.10.2009). Die Haltung der Tiere erfolgte in dafür vorgesehene Ställen des Forschungszentrums der Bayer Pharma AG in Wuppertal nach den Richtlinien der zentralen Versuchstierhaltung und unter standardisierten Bedingungen. Die RT betrug durchschnittlich 22 °C, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 45 % mit wechselnder Tag-Nacht-Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus. In allen durchgeführten Tierstudien erhielten die Tiere Standardfutter (= ssniff® Alleinfuttermittel) und Trinkwasser (= Leitungswasser) *ad libitum*. Vor jeder Tierstudie wurde eine einwöchige Anpassungs-/ Erholungsphase der Tiere nach der Lieferung mit einbezogen.

2.2.3.1. Induktion einer Leberfibrose

Für die *in vivo* Induktion einer Leberfibrose werden verschiedene Tiermodelle derzeit in der Leberfibrosenforschung angewendet. Die anerkanntesten Methoden sind: a) die Gallengangsligatur (= *bile duct ligation*, BDL), b) die Schweineserum (= *pig serum*) induzierte und c) die toxisch induzierte Leberfibrose (Tsukamoto *et al.*, 1990; Starkel und Leclerq, 2011). Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten *in vivo* Untersuchungen erfolgten anhand des BDL Modells und des Schweineserum Modells.

Das BDL Modell ist ein *in vivo* Modell bei dem es durch einen chirurgisch induzierten Gallensäurenrückstau zu einer Schädigung der Leberzellen kommt. Besonders Ratten eignen sich für dieses Tiermodell, dass sie anatomisch keine Gallenblase besitzen (Starkel und Leclerq, 2011). Vorteil des BDL Modells ist der schnelle progressive Krankheitsverlauf, so dass innerhalb von wenigen Tagen/Wochen eine Leberfibrose entsteht (Georgiev *et al.*, 2008; Vanheule *et al.*, 2008). Gleichzeitig bedingt dies aber auch die Hauptnachteile einer hohen Mortalitätsrate und einem geringen therapeutischen Fenster. Die Pathogenese der Leberfibrose dieses Tiermodells verläuft ähnlich wie die der sekundären biliären Fibrose im Menschen (Starkel und Leclerq, 2011). Ergänzend wurde ein zweites *in vivo* Modell mit gänzlich anderer Ätiologie ausgewählt: das so genannte Schweineserum Modell. Durch wiederholte Injektion von Schweineserum entwickeln die Tiere ähnliche Pathomechanismen wie Patienten mit einer durch Alkohol induzierten Leberfibrose, einer Autoimmun- oder akuten Hepatitis (Baba *et al.*, 2005). Vorteil dieses Tiermodells ist der schonende, aber äußerst lange Induktionszeitraum der Leberfibrose (= über mehrere Wochen), der zu einer geringen Mortalitätsrate der Tiere führt.

▪ Operationstechnik für eine Gallengangsligatur induzierte Leberfibrose

Weibliche SD-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 g und 250 g wurden je nach Studiengröße über einen Zeitraum von 3 bis 4 Tagen versetzt operiert. Als Narkose wurde das Inhalationsnarkotikum Isofluran[®] (2 %ig) in Kombination mit Lachgas und Sauerstoff verwendet (Verhältnis 2:1). Zu Beginn der Operation (= OP) wurde der Bauch der Tiere enthaart und mit Hautdesinfektionsspray desinfiziert.

In ausreichend tiefer Narkose (= Reflexfreiheit) erfolgte die mediane Laparotomie. Mit Hilfe eines Wundspretzers wurde die Bauchdecke zunächst fixiert, der linke Seiten-

und Mittellappen der Leber vorsichtig mit einer Pinzette angehoben, so dass der Gallengang zugänglich gemacht wurde. Nun erfolgte die Freipräparation des Gallenganges von umgebendem Fettgewebe, um diesen im Anschluss vorsichtig mit einem nicht absorbierbaren Faden (Ethibond Excel) sowohl nach kranial als auch nach kaudal jeweils zweifach zu ligieren. In der Mitte der Ligationen wurde der Gallengang zusätzlich mittels Augenschere durchtrennt. Nach Entfernung des Wundspreiters wurde die Muskelschicht und die Bauchdecke durch eine fortlaufende Naht mit einem Vicryl Faden der Stärke 4-0 vernäht und mit einem Sprühverband versorgt. Zur postoperativen Schmerzkontrolle erhielten die Tiere i.p. (= *intraperitoneal*) eine Novalgin® Injektionslösung (Stocklösung: 100 mg/ml) in einer Konzentration von 25 mg/ml/kg. Bei Tieren der Shamgruppe (= scheinoperierte Tiere) erfolgte lediglich eine Freipräparation des Gallenganges. Die gesamte OP fand auf einer Heizplatte mit einer durchschnittlichen Temperatur von 38 °C statt, um die Körpertemperatur der Tiere während der OP-Zeit konstant zu halten. Im Anschluss der OP kamen die Tiere nach Versicherung eines stabilen Allgemeinbefindens zurück in ihre Käfige. In den Behandlungsstudien erfolgte die erste p.o. (= *per os*) Applikation direkt nach dem Wiedererwachen der Tiere aus der Narkose. Jede weitere p.o. Placebo- (= 0,5 %ige Tyloselösung) bzw. Substanzapplikation erfolgte zweimal täglich (= bid; 12 h-Rhythmus). Die Dauer einer Behandlungsstudie betrug mit Bezug auf frühere Veröffentlichungen insgesamt 23 Tage (Georgiev *et al.*, 2008; Vanheule *et al.*, 2008).

▪ Die Schweineserum induzierte Leberfibrose

Für die Schweineserum induzierte Leberfibrose wurden ebenfalls weibliche SD-Ratten mit einem Körpergewicht von 200 g bis 250 g randomisiert. Zur Induktion der Leberfibrose erhielten die Tiere zweimal wöchentlich eine i.p.-Injektion von 0,5 ml Schweineserum pro Tier über einen Zeitraum von insgesamt 8 Wochen (Paronetto und Popper, 1966; Baba *et al.*, 2005). Kontrolltiere erhielten i.p. 0,5 ml/ Tier einer physiologischen Kochsalzlösung (= 0,9 %ige NaCl-Lösung). In der Behandlungsstudie erfolgte zusätzlich eine p.o. Placebo- (= 0,5 %ige Tyloselösung) bzw. Substanzapplikation der Tiere im 12 h-Rhythmus.

2.2.3.2. Messung des Blut- und Portalvenendruckes

Die Hämodynamikmessungen erfolgten mit einem Power Lab System unter der Verwendung der Lab Chart 6.0 Software. Am Tag der planmäßigen Versuchsbeendigung wurde die Ratten mittels Isofluran[®] Narkose (2 %ig) in Kombination mit Lachgas und Sauerstoff (Verhältnis 2:1) narkotisiert. Anschließend wurde der Zwischenzehreflextest zur Überprüfung der Narkosetiefe durchgeführt. Mit einer stumpfen Schere wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt nach kaudal in die Oberhaut des Tierhalses geschnitten. Mit einer anatomisch gebogenen Pinzette wurde ein Teil der *Arteria carotis sinister* freipräpariert, um im Anschluss drei Fäden von ca. 10 cm Länge unter das Gefäß zu legen. Mit Hilfe eines Fadens wurde die Arterie nach kranial durch Verknoten gestaut. Ein weiterer Faden wurde genutzt um unter der Verwendung eines Nadelhalters die *Arteria carotis sinister* nach kaudal unter Zug zu stauen. Eine am Ende leicht gebogene Injektionskanüle diente der Eröffnung der Arterie, in die durch die Verwendung einer Pinzette ein Millar Tip-Katheter (Größe 2 F) eingeführt wurde. Die Fixierung des Katheters an das Gefäß erfolgte durch den dritten, vorgelegten Faden. Durch Lösung der Stauung konnte der Katheter in die Arterie bzw. bis in den linken Ventrikel des Herzens vorgeschoben werden. Die Messung des linksventrikulären Druckes (= *left ventricular systolic pressure*, LVP_{sys}) im Herzen erfolgte jeweils über die Dauer von 2 min. Die Herzfrequenz der Tiere wurde anhand der linksventrikulären Druckkurve mittels der Lab Chart 6.0 Software berechnet.

Für die Messung des PVDs wurde bei den herzkatherisierten Tieren eine mediane Laparotomie durchgeführt und die Darmschlingen vorsichtig unter der Verwendung von Wattestäbchen aus der Bauchhöhle beiseitegelegt. Dies ermöglichte eine freie Sicht auf die Portalvene (= *Vena portae*). Über einen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Venofix A (Schlauchlänge: 30 cm, -durchmesser: 0,65 mm), der an einen Druckaufnehmer für Flüssigkeiten angeschlossen war, konnte der PVD über einen Zeitraum von 1 min gemessen werden. Für diese Messung wurde der Venofix A in die Portalvene eingeführt und vorsichtig fixiert.

Nach den jeweiligen Messungen wurde den Tieren über die Bauchvene (= *Vena cava caudalis*) Blut in Lithium Heparin (Li-Hep)-Monovetten entnommen, um verschiedene physiologische Parameter im Anschluss bestimmen zu können. Zur weiteren Diagnostik wurde den Versuchstieren die Leber entfernt, mit PBS gewa-

schen, in die einzelnen Leberlappen unterteilt und entweder mit 10 %igem Formalin fixiert oder auf einer vorgekühlten Metallplatte schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gefrorenen Leberlappen bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3. Quantitative Bestimmung von Blutparametern mittels VetScan™

Analyse

Für die quantitative Bestimmung der verschiedenen physiologischen Leberparameter/-enzyme wurde das VetScan VS2™ Analysesystem verwendet. Hierfür wurden 100 µl des Li-Hep Vollblutes blasenfrei in die VetScan™ Volldiagnostikprofil-Reagenzdisk des Typs *Comprehensive Diagnostic Profile* pipettiert und analysiert. Das Messprinzip beruht auf einer chemischen Reaktion zwischen Probe und den jeweiligen Reagenzien in der Reagenzdisk. Diese ist je nach Konzentration des zu messenden Parameters in der Probe proportional zu einem Farbumschlag mit entsprechender Extinktionsänderungsgeschwindigkeit bei einer für die Reaktion spezifischen Wellenlänge.

Zur Bestimmung der ALT wurde eine Abwandlung des Verfahrens nach Wróblewski und LaDue von 1956 verwendet (Bergmeyer und Horder, 1980). Bei dieser chemischen Reaktion katalysiert das Enzym den Transfer einer Aminogruppe von L-Alanin zu α -Ketoglutarat und damit die Bildung von L-Glutamat und Pyruvat. Das Enzym Lactat-Dehydrogenase katalysiert in einem weiteren Schritt die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, wobei gleichzeitig NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Diese Oxidation ist direkt proportional zur ALT-Konzentration in der Probe und kann bei einer Extinktion von 340 nm und 405 nm gemessen werden.

Das Enzym ALP konnte in der Probe durch die Reaktion mit *p*-Nitrophenylphosphat zu *p*-Nitrophenol und Phosphat bestimmt werden (PetitClerc *et al.*, 1975; Tietz *et al.*, 1983). Die Menge an ALP in der Blutprobe verhält sich proportional zur Anstiegsgeschwindigkeit der Extinktionsdifferenz zwischen 405 nm und 500 nm.

Die Albuminkonzentration der Li-Hep Vollblutprobe wurde mittels einer Farbstoffbindungsmethode mit Bromkresolgrün analysiert (Webster *et al.*, 1974). Hierbei handelt es sich um eine Endpunktreaktion mit biochromatischer Bestimmung bei 630 nm und 405 nm. Das gebundene Albumin verhält sich proportional zur Albuminkonzentration in der Probe.

Der Gesamtbilirubinspiegel (= T-BIL) wurde in der Vergangenheit unter der Verwendung von diazotierter Sulfanilsäure gemessen (Doumas *et al.*, 1985). Eine neu-

ere, spezifischere Methode wurde mit dem Enzym Bilirubinoxidase entwickelt (Perry *et al.*, 1986). In diesem Verfahren wird Bilirubin durch Bilirubinoxidase zu Biliverdin oxidiert. Die Konzentration von Bilirubin wird als Extinktionsdifferenz zwischen 467 nm und 550 nm quantitativ bestimmt.

2.2.3.4. Anfertigung und Färbungen von histologischen Lebergewebeschnitten

Der am Sektionstag entnommene rechte Leberlappen (= *Lobus hepatis dexter*) wurde für die histologischen Analysen des Lebergewebes verwendet und zunächst 24 h in 10 %igem Formalin fixiert. Mit Hilfe eines Einbettautomatens wurden die Gewebeproben über Nacht entwässert und mit Paraffin durchtränkt. Anschließend wurden einzelne Leberstücke in Paraffin unter Verwendung einer Paraffinausgießstation eingebettet, um 5 µm dicke Gewebeschnitte mit einem Rotationsmikrotom anfertigen zu können. Diese Schnitte wurden für die verschiedenen Färbungen auf Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht in einem Trockenschrank bei ca. 45 °C getrocknet. Im weiteren Verlauf wurden vor allen durchgeführten Färbungen diese Gewebeschnitte zunächst durch eine drei x dreiminütige Behandlung mit Xylol entparaffiniert, über eine absteigende EtOH-Reihe (100 %-, 90 %-, 80 %- und 70 %iger EtOH) rehydriert und zum Schluss in Lewatitwasser gelagert. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach Art der jeweiligen durchgeführten Färbung.

▪ Kollagenfärbung von Lebergewebeschnitten

Um den Anteil an Kollagenfasern im Gewebe darstellen und quantifizieren zu können, wurde eine Sirius Rot/ Fast Green Färbung der Gewebeschnitte angefertigt. Sirius Rot ist ein anionischer Farbstoff, der aufgrund seiner enthaltenen Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül rot anfärbt.

Nach der absteigenden EtOH-Reihe und der Lagerung der Schnitte in Lewatitwasser erfolgte eine zehnmündige Inkubation mit der Sirius Rot Färbelösung bei RT. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte ca. 10 s in saures Lewatitwasser getaucht, um danach 3 min in der Fast Green Färbelösung grün gegengefärbt zu werden. Durch erneutes Tränken der Schnitte in saures Lewatitwasser (10 s) konnten die Schnitte abschließend nach einer aufsteigenden EtOH-Reihe (je 1 min bei RT in Lewatitwasser, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %igem EtOH) und Xylolbehandlung (3 x 3 min) mittels Pertex[®] Eindeckmedium luftdicht eingedeckt werden. Als Abschluss

folgte eine mikroskopische Auswertung der Schnitte mit fotografischer Dokumentation der Ergebnisse und anschließender morphometrischer Analyse mittels der Cell P Software von Olympus.

▪ Immunhistochemische Färbung von α -SMA

Für die Untersuchung der Transdifferenzierung der HSCs zu Myofibroblasten im Rahmen einer Fibrosierung des Lebergewebes wurde eine immunhistochemische α -SMA-Färbung der Leberlappen durchgeführt. Für diese Detektion wurde die indirekte Avidin-Biotin-Peroxidase Färbemethode verwendet. Nachdem die Schnitte in Lewatitwasser gelagert wurden, erfolgte die Inhibierung endogener Peroxidasen für 10 min bei RT mit 3 %igem Wasserstoffperoxid (= H_2O_2 ; verdünnt in Methanol). Im Anschluss daran wurden unspezifische Bindungen für 1 h bei RT mit Blockpuffer geblockt, die Schnitte 2 x 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und mit dem primären Antikörper gegen α -SMA (Klon 1A1, 1:400 verdünnt in PBS + 1 % BSA) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Inkubation und einem erneuten Waschschrift erfolgte die Detektion des gebundenen primären Antikörpers mit Hilfe des Avidin-Biotin-Peroxidase ABC Kits nach Herstellerangaben. Für die Visualisierung der an den sekundären Antikörper gebundenen Peroxidase wurde das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (= DAB; Falini und Tayer, 1983) nach Herstellerangaben verwendet. Dies resultierte in eine braune Färbung der Bindungsstellen. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Gegenfärbung mit der Mayer's Hämalaun Gebrauchslösung für 1 min bei RT. Unter fließendem Leitungswasser (5 min bei RT) wurde die überschüssige Färbelösung abgewaschen. Abschließend wurden die gefärbten Leberschnitte nach einer aufsteigenden EtOH-Reihe (je 1 min bei RT Lewatitwasser, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %igem EtOH) und Xylolbehandlung (3 x 3 min) mittels Pertex[®] Eindeckmedium luftdicht eingedeckt. Als Abschluss folgte eine mikroskopische Auswertung der Schnitte mit fotografischer Dokumentation der Ergebnisse und anschließender morphometrischer Analyse mittels der Cell P Software von Olympus.

2.2.3.5. Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes im Lebergewebe

Durch Säurehydrolyse ist es möglich den Hydroxyprolinegehalt (= HP-Gehalt) von organischen Gewebeproben zu bestimmen und somit die Gesamtkollagenkonzentration zu ermitteln.

tration zu berechnen. Der HP-Gehalt wurde nach einem Verfahren von Woessner (1961) in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stadler (1967) ermittelt. Für diese Bestimmung wurde der geschwänzte Leberlappen (= *Lobus hepatis caudatus*) verwendet und zunächst in gleichmäßige Stücke von ca. 5 mm Dicke geschnitten. Für die Bestimmung des HPs wurde nur ein Teil der Leber (ca. 50 mg bis 100 mg) eingewogen (= Feuchtgewicht) und 24 h bei 70 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung des Trockengewichtes. Im Anschluss daran wurden die Leberproben in 6 ml halbkonzentrierter Salzsäure (6 M HCl) für ca. 17 h bei 110 °C gekocht. In diesem Schritt werden die Peptidbindungen hydrolytisch gespalten. Nach Abschluss der Hydrolyse wurde die überschüssige HCl durch Eröffnung des Kochgefäßes weitere 8 h bei 110 °C abgedampft. In einem nächsten Schritt erfolgte die Resuspension der eingedampften Leberproben in 5 ml *Aqua dest.* für ca. 30 min bei RT mit Hilfe eines Rollmischers. Nach einem Filtrations- und Zentrifugationsschritt (20 min, 5000 rpm bei RT) zur Entfernung von möglichen Schwebstoffen, konnte der HP-Gehalt bestimmt werden. 200 µl der Probenlösung wurden mit 200 µl EtOH vermischt. Gleiches wurde mit 200 µl des HP-Standards in den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg/ml (gelöst und verdünnt in *Aqua dest.*) für die Erstellung einer Eichkurve durchgeführt. Im Anschluss wurden zu den Proben bzw. dem Standard 200 µl Oxidationslösung pipettiert, um nach einer Inkubationszeit von 25 min bei RT mit 400 µl Ehrlich's Reagenz Lösung vermischt zu werden. Es folgte eine dreistündige Inkubationszeit bei 35 °C im Trockenschrank. Im Anschluss konnte die optische Dichte der jeweiligen Proben an einem Photometer bei einer Wellenlänge von 563 nm bestimmt werden. Als Leerwert diente Wasser. Die aus der Eichkurve bestimmten Werte wurden für die Berechnung der Gesamtkonzentration an Kollagen in der Probe verwendet, auf das Lebertrockengewicht bezogen und in mg/g Lebergewicht angegeben.

2.2.3.6. RNA-Isolierung aus Lebergewebe mit anschließender Genexpressionsanalyse

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem linken Leberlappen (= *Lobus hepatis sinister*) erfolgte für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen anhand der TRIzol[®]-DNA/RNA-Extraktionsmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Ein Teil des Leberlappens wurde zunächst mechanisch in einem Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff zerkleinert und in vorgekühlte Schredder-Röhrchen mit 900 µl TRIzol[®]

Reagenz gegeben. Diese Röhren mussten in einer FastPrep[®]-Anlage eingespannt, in Schwingung und Rotation (25 s mit einer Frequenz von 4,5 Hz) gebracht werden, so dass das Gewebe weiter aufgeschlossen werden konnte. Anschließend wurden die Proben mit 150 µl Chloroform versetzt, gevortext und 20 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (= 14000 g). Das Homogenat trennte sich bei diesem Zentrifugationsschritt in eine wässrige, RNA-haltige und in eine organische Phase auf. Die obige, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 300 µl Isopropanol versetzt. Durch die Zugabe von Isopropanol zu dem klaren Überstand wurde die RNA nach 10 min Inkubation auf Eis und 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 16000 g gefällt. Das entstandene RNA-Pellet musste zweimal mit 700 µl EtOH (70 %ig) gewaschen werden. Daraufhin wurde der EtOH-Anteil quantitativ entfernt und das Pellet für ca. 5 min bei RT getrocknet. Je nach Größe des RNA-Pellets erfolgte dessen Resuspension in 100 µl bis 150 µl DNase/RNase freiem Wasser, um dann mittels Spektrophotometer quantifiziert zu werden. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die weitere Vorgehensweise für die cDNA-Synthese, die RT-PCR und die Bestimmung der relativen Genexpression ist in den Abschnitten 2.2.2.2. und 2.2.2.3. aufgeführt.

2.3. Statistik

Die statistischen Berechnungen und Auswertungen, sowie die Darstellung der Graphen erfolgte mittels GraphPad Prism 5.03 Software. Je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen wurden die Unterschiede durch eine einfaktorische (one-way) oder durch eine multifaktorische (two-way) Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einer Newman-Keuls bzw. Bonferroni *post-hoc* Analyse zum multiplen Vergleich bestimmt. Als Schwelle für die Signifikanz wurde ein Signifikanzniveau (p-Wert) von < 0,05 angesetzt und im Folgenden mit „*“ gekennzeichnet. Weitere Signifikanzniveaus von < 0,01 wurden mit „**“ und von < 0,001 mit „***“ kenntlich gemacht. Statistische Ausreißer wurden mittels Nalimov-Test ermittelt und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Alle Daten sind unabhängig von der Anzahl der Versuche und der Versuchstiere als MW ± SEM dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der *in vitro* Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272

3.1.1. Wirkung des Zytokins TGF β auf HSCs

Da HSCs in der Entstehung einer leberfibrotischen Erkrankung eine zentrale Funktion übernehmen, wurde für die *in vitro* Untersuchungen zunächst die Stimulation dieser Zellen und ihre anschließende Aktivierung und Transdifferenzierung zu Myofibroblasten etabliert. Es ist bekannt, dass verschiedene Stimuli, wie z.B. PDGF, EGF und vor allem TGF β , die HSCs aktivieren und die Transdifferenzierung induzieren (Friedman, 2008b). Zu Beginn der *in vitro* Versuche wurde daher eine Konzentrationswirkungskurve des Stimulus TGF β mit Bezug zur zeitlichen Induktion sowohl für rHSCs als auch für hHSCs durchgeführt. Die Ziele waren hierbei, die optimale Stimuluskonzentration sowie den besten Zeitpunkt für eine maximale Aktivierung der HSCs festlegen zu können. Als fibrotische Marker für die *in vitro* Experimente wurden einerseits das Kollagen Typ I (= Col1 α 1) als Vertreter der fibrillären Kollagene (Uemura *et al.*, 2005; Hrkova *et al.*, 2010), das *latent transforming growth factor beta binding protein 2* (= LTBP 2) als ECM *remodelling* Marker (Morén *et al.*, 1994; Hyytiäinen *et al.*, 1998; Hyytiäinen und Keski-Oja, 2003) und andererseits die mRNA Genexpression von α -SMA als Transdifferenzierungsmarker zu Myofibroblasten (Lindert *et al.*, 2005; De Minicis *et al.*, 2007) herangezogen.

In den Abbildungen 15.1. und 15.2. sind die Ergebnisse der mRNA Genexpressionen für die TGF β -Konzentrationen 0, 1, 5 und 10 ng/ml und für die jeweiligen Inkubationszeiträume von 2, 6, 24, 48 und 96 h mit Bezug auf den 0 h Wert (= 100 %) dargestellt. Für beide HSCs Spezies wurde zunächst ein deutlicher Anstieg der mRNA Genexpressionen aller untersuchten profibrotischen Marker über die Zeit ohne die Zugabe des Stimulus TGF β festgestellt (= 0 ng/ml TGF β). Durch die Zugabe verschiedener TGF β -Konzentrationen konnte ab einem Zeitraum von 24 h ein Anstieg in den prozentualen mRNA Genexpressionen der drei untersuchten Gene detektiert werden. Dies entsprach mit Bezug auf den 0 h Wert (= 100 %) im Durchschnitt einem Anstieg auf ca. 200 % sowohl für hHSCs als auch für rHSCs. Der 96 h Wert zeigte z.T. eine hohe Grundaktivierung der Zellen (= 0 ng/ml TGF β), so dass durch die Zugabe des Stimulus TGF β keine Erhöhung der verschiedenen Genexpressionen

hervorgerufen werden konnte (Bsp. Abb. 15.1.; (d) α -SMA hHSCs). Die HSCs beider Spezies zeigten nach 48 h den deutlichsten TGF β induzierten Anstieg der mRNA Genexpressionen mit Bezug zu dem 0 h Wert der verschiedenen Marker. Ein Konzentrationswirkungsbezug ließ sich jedoch nicht eindeutig aufzeigen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden *in vitro* Versuche eine TGF β -Konzentration von 1 ng/ml mit einer Inkubationszeit von 48 h festgelegt und als Standardbedingung verwendet. Wie in der Literatur beschrieben, kommt es bei HSCs in der Zellkultur zu einer Selbstaktivierung (Xu *et al.*, 2005; De Minicis *et al.*, 2007), die die Zellen gegen extern zugeführtes TGF β unempfindlich machen kann. Für die Auswertung wurden daher nur Experimente herangezogen, in denen die Zellen eine deutliche Stimulierbarkeit durch TGF β zeigten. Als erweiterte Kontrolle bezüglich des Aktivierungszustandes der Zellen vor Versuchsbeginn diente der 0 h Wert, der in den folgenden Abbildungen ergänzend dargestellt wurde.

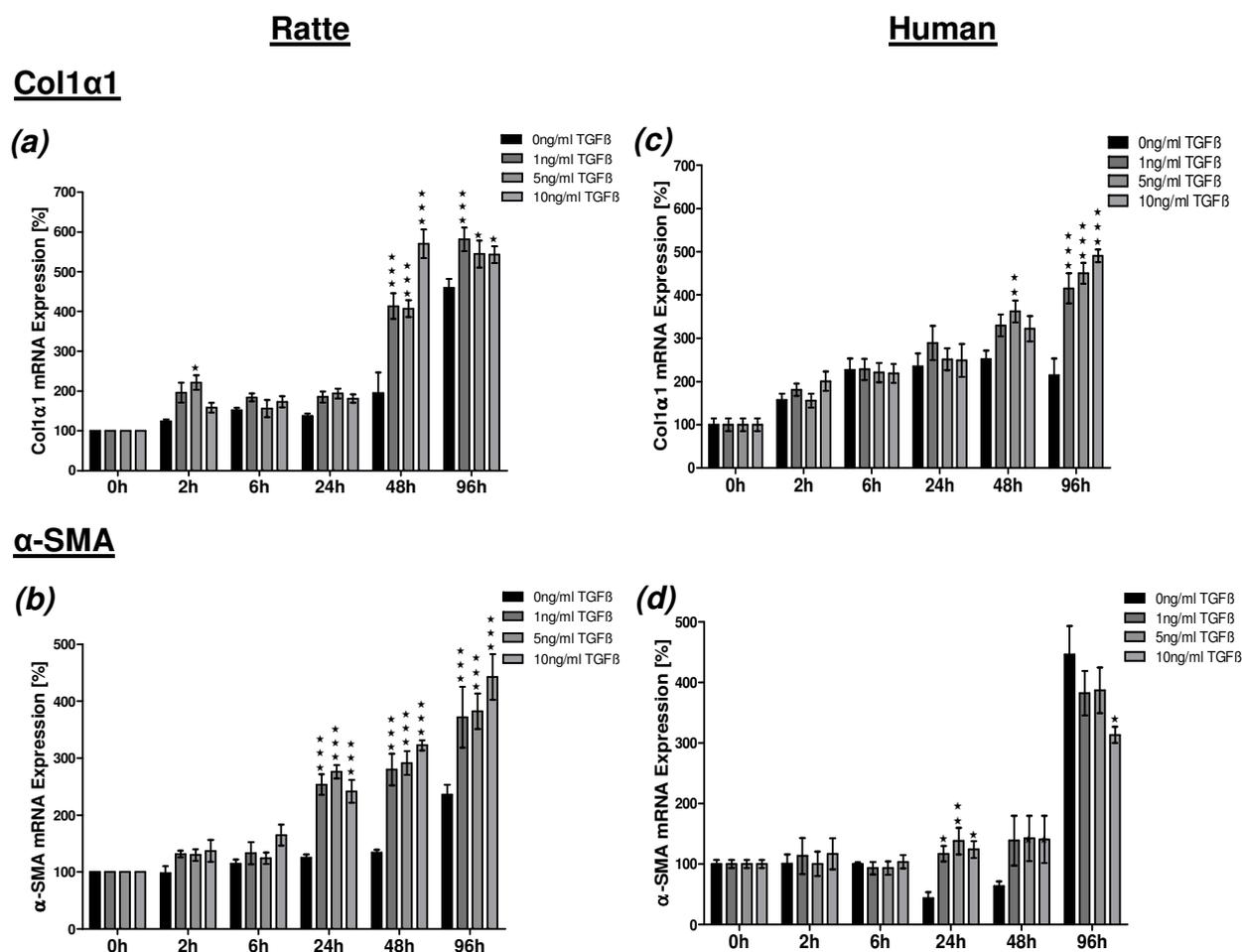


Abb. 15.1.: Wirkung von TGF β auf HSCs in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit
Prozentuale mRNA Genexpressionen der profibrotischen Marker Col1 α 1 ((a) + (c)) und α -SMA ((b) + (d))

((a) + (b) Ratte n= 5 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (c) + (d) Human n= 17 Versuche (Duplikate) á 2 Spender; MW \pm SEM
Signifikanz vs. 0h Wert (= 100 %); two-way ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und
*** p < 0,001)

α -SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; Col1 α 1= fibrilläres Kollagen 1 α 1; TGF β = *transforming growth factor beta*

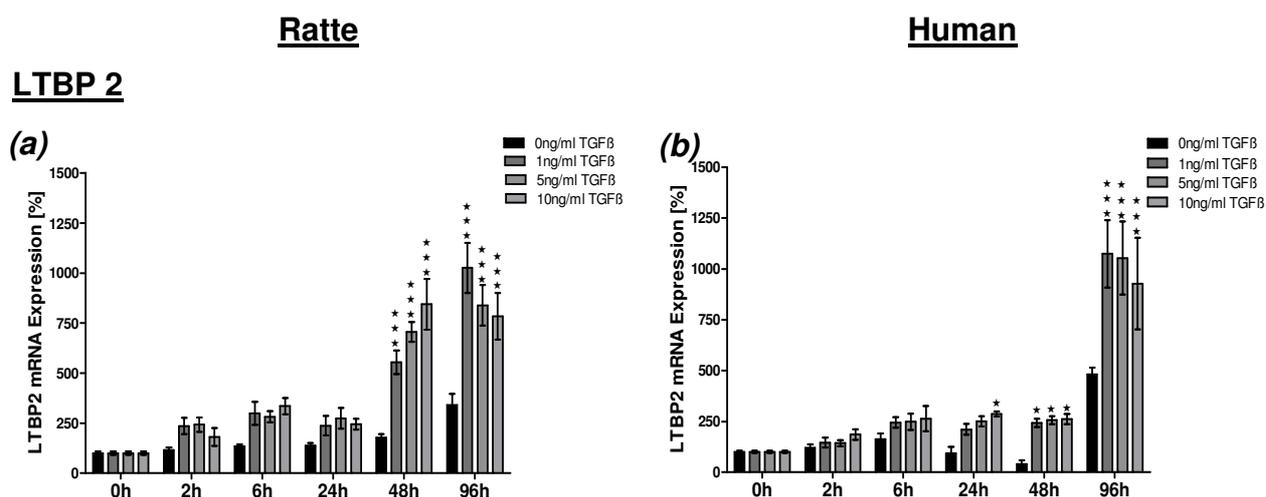


Abb. 15.2.: Wirkung von TGFβ auf HSCs in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit
 Prozentuale mRNA Genexpression von LTBP 2

((a) Ratte n= 5 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (b) Human n= 17 Versuche (Duplikate) á 2 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. 0h Wert (= 100 %); two-way ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Analyse; * p < 0,05 und *** p < 0,001)
 LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; TGFβ= *transforming growth factor beta*

3.1.2. Einfluss von verschiedenen Komponenten des NO-cGMP Signalweges auf die Entstehung einer Leberfibrose

3.1.2.1. Stickstoffmonoxid und dessen Wirkung auf TGFβ stimulierte HSCs

Es ist bekannt, dass eine Organfibrose mit einem Mangel an NO und einer verringerten Aktivität der NO-cGMP Signaltransduktion einhergeht (Wiest und Groszmann, 2002). Ein NO-Mangelzustand konnte auch in fibrotischem Lebergewebe nachgewiesen werden, so dass eine NO-Substitution als ein möglicher therapeutischer Ansatz für leberfibrotische Patienten in Betracht gezogen wurde (Bellis *et al.*, 2003; Fiorucci *et al.*, 2004).

Um die Bedeutung des NO-cGMP Signalweges und um ein mögliches therapeutisches Potential des sGC Stimulators BAY 41-2272 in der Leberfibrose abschätzen zu können, wurde zunächst die *in vitro* Wirkung von DETA NONOate, einem NO-Donor, auf TGFβ stimulierte HSCs untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt. Die mRNA Ausgangsexpressionen der profibrotischen Markergene (= unstimuliert) lagen zwischen 40 % (α -SMA und LTBP 2) bzw. 60 % (Col1 α 1) bei rHSCs. Bei hHSCs betragen die Expressionen der unstimulierten Kontrollen bei allen untersuchten Markergenen ca. 40 %. Die Zugabe von 1 ng/ml TGFβ erzielte je nach Gen eine Expressionsanstieg um das ca. 1,6-fache bis maximal das 2,7-fache.

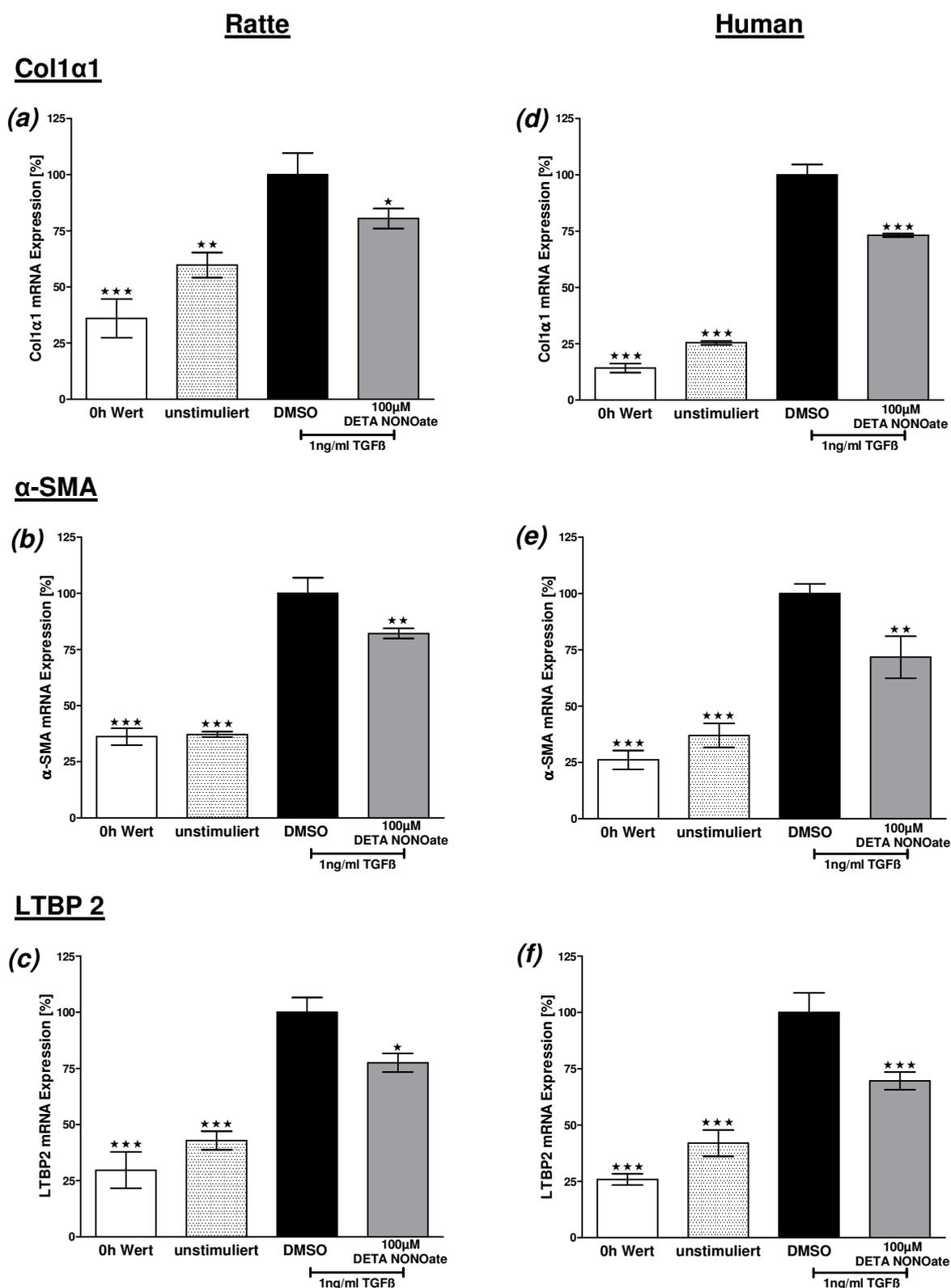


Abb. 16: Wirkung des NO-Donors DETA NONOate auf aktivierte HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (d) – (f) Human n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und
 *** p < 0,001)

α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1; DETA NONOate= NO-Donor; DMSO= Dimethylsulf-
 oxid; LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; TGFβ = *transforming growth factor beta*

Durch die Zugabe von 100 μM DETA NONOate konnten die prozentualen mRNA Genexpressionen von Col1 α 1, α -SMA und LTBP 2 in Bezug auf die DMSO Kontrolle (= 100 %) gesenkt werden. Dies war unabhängig von der jeweiligen HSCs Spezies. Für die Col1 α 1 Genexpression zeigte sich eine signifikante Senkung gegenüber der DMSO Kontrolle um 26,8 % bei hHSCs und um 19,5 % bei rHSCs, was mit Bezug zu dem TGF β induzierten Messfenster (= Differenz zwischen unstimuliert und DMSO Kontrolle) in etwa einer 50 %igen Senkung entsprach. Für den Transdifferenzierungsmarker α -SMA konnte ebenfalls durch die indirekte Zugabe von NO mittels DETA NONOate eine signifikante Genexpressionssenkung um 28,3 % (hHSCs) bzw. um 17,9 % (rHSCs) vs. DMSO Kontrolle (= 100 %) detektiert werden. Durch die Zugabe des NO-Donors wurde im Bereich des TGF β induzierten Messfensters eine 28 %ige (rHSCs) bzw. 45 %ige (hHSCs) Senkung für die α -SMA Genexpression erreicht. Die mRNA Expression des LTBP 2 Gens konnte um 30,4 % in hHSCs und um 22,5 % in rHSCs signifikant durch die Zugabe von DETA NONOate mit Bezug zur DMSO Kontrolle gesenkt werden. Dies entsprach einer 39 %igen (rHSCs) bzw. 52 %igen (hHSCs) Senkung des TGF β induzierten Messfensters. Zusammenfassend ließ sich aufzeigen, dass durch die Zugabe des NO-Donors DETA NONOate eine signifikante Senkung der profibrotischen Markergenexpressionen sowohl in rHSCs als auch in hHSCs erzielt werden konnte.

3.1.2.2. *In vitro* Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf aktivierte HSCs

Um die Beteiligung des NO-cGMP Signalweges an der Fibrosierung der Leber zu untersuchen, wurde nach der Zugabe von DETA NONOate die Wirkung von 8-Bromo-cGMP, einem stabilen Analogon des *second messengers* cGMP, auf TGF β stimulierte HSCs untersucht und in Abbildung 17 dargestellt. In der Vergangenheit wurden in der Literatur uneinheitliche Konzentrationen von 8-Bromo-cGMP für Zellkulturversuche verwendet (Chu und Prasad, 1999; Horio *et al.*, 2003; Majumder *et al.*, 2007), so dass die jeweilige Wirkung der 8-Bromo-cGMP-Konzentrationen 3, 30, 300 und 600 μM auf TGF β stimulierte HSCs nach 48 h untersucht wurde. Die mRNA Expressionen der unstimulierten Zellen betragen je nach Gen und Spezies zwischen 30 % und 60 %. Die durch den Stimulus TGF β induzierten Genexpressionssteigerungen lagen zwischen einem Faktor von 1,7 bis maximal 3,4.

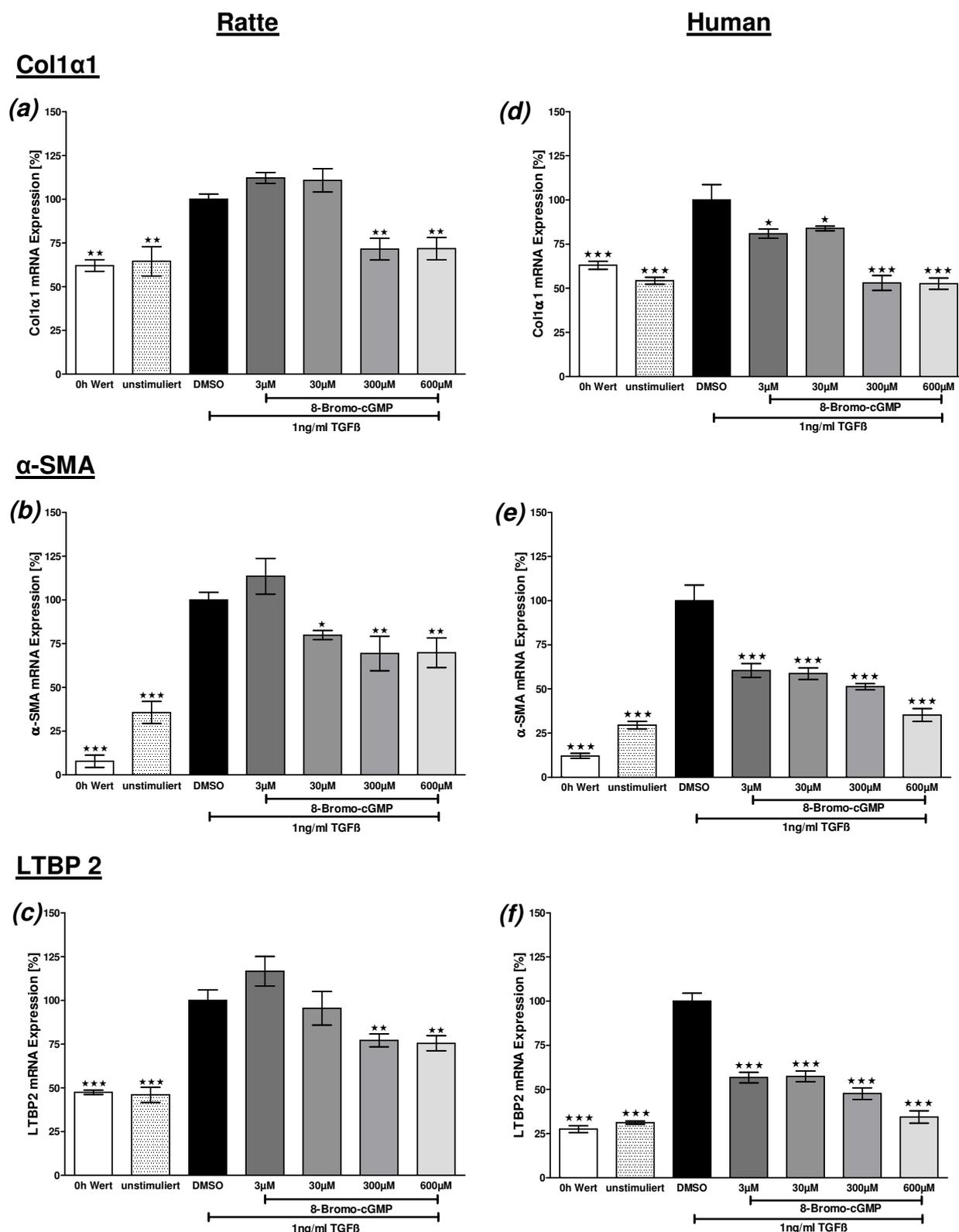


Abb. 17: Wirkung von verschiedenen 8-Bromo-cGMP-Konzentrationen auf HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (d) – (f) Human n= 5 Versuche (Duplikate) á 2 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und
 *** p < 0,001)

8-Bromo-cGMP= stabiles cGMP Analogon; α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1; DMSO= Dimethylsulfoxid; LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; TGFβ= *transforming growth factor beta*

Durch die Zugabe verschiedener 8-Bromo-cGMP-Konzentrationen wurde bei allen untersuchten profibrotischen Markern die mRNA Genexpression konzentrationsabhängig gesenkt. In hHSCs konnte ab einer Konzentration von 300 μ M die Col1 α 1 Expression signifikant um bis zu 47 % gesenkt werden (vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Dies entsprach in etwa dem Col1 α 1 Genexpressionsausgangswert der unstimulierten hHSCs. Für die rHSCs erfolgte eine signifikante, maximale Senkung der Genexpression um 28,4 %, was eine ca. 68 %ige Senkung des TGF β induzierten Messfensters bedeutete. Während bei rHSCs eine signifikante Senkung der α -SMA Genexpression um 20 % ab einer Konzentration von 30 μ M 8-Bromo-cGMP auftrat, zeigte sich im Gegensatz dazu bei hHSCs bereits in der niedrigsten 8-Bromo-cGMP-Konzentration (= 3 μ M) eine signifikante Genexpressionssenkung um ca. 43 % (vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Durch die Zugabe von 600 μ M 8-Bromo-cGMP konnte die α -SMA Genexpression in hHSCs in etwa auf den Genexpressionsmittelwert der unstimulierten Kontrolle herabgesenkt werden. In rHSCs wurde die α -SMA Genexpression innerhalb des TGF β induzierten Messfensters um 50 % reduziert. Ein ähnliches Genexpressionsprofil wies das LTBP 2 Gen auf. In hHSCs zeigte sich eine signifikante Genexpressionssenkung des ECM Markers um 64,7% (vs. DMSO Kontrolle = 100 %), was in etwa dem Ausgangsexpressionswert der unstimulierten Zellen entsprach. Bei rHSCs erfolgte eine signifikante Senkung der mRNA Genexpression ab einer Konzentration von 300 μ M 8-Bromo-cGMP um 43 % innerhalb des TGF β induzierten Messfensters. Zudem konnte bei rHSCs kein Genexpressionsunterschied der Markergene zwischen der Zugabe von 300 μ M oder 600 μ M 8-Bromo-cGMP erzielt werden. Die maximale Expressionssenkung wurde bei allen profibrotischen Genen bei 300 μ M 8-Bromo-cGMP detektiert.

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass durch die Zugabe von 8-Bromo-cGMP konzentrationsabhängig und z.T. signifikant die Genexpression der profibrotischen Markergene in beiden HSCs Spezies gesenkt wurde.

3.1.3. Die Wirkung des sGC Stimulators auf aktivierte HSCs

Nachdem in den vorherigen *in vitro* Versuchen die Beteiligung des NO-cGMP Signalweges durch die Zugabe von DETA NONOate und 8-Bromo-cGMP an der Leberfibrosierung gezeigt werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs untersucht. Die pharmakologische Wirkung von sGC Stimulatoren ist die weitgehend NO-unab-

hängig Erhöhung der intrazelluläre cGMP-Konzentration durch eine direkte Stimulation der sGC (Evgenov *et al.*, 2006; Stasch und Hobbs, 2009).

In Abbildung 18 ist eine Konzentrationswirkungskurve von BAY 41-2272 (0,01, 0,1, 1 und 10 μM) nach einer Inkubationszeit von 48 h und die Wirkung auf die mRNA Genexpressionen der verschiedenen profibrotischen Marker dargestellt. Die Genexpressionen der unstimulierten HSCs beider Spezies lagen je nach Marker zwischen 30 % und 60 %. Die Stimulation mit 1 ng/ml TGF β konnte eine Genexpressionssteigerung um das 1,5-fache bzw. das zwei- bis dreifache induzieren. Durch die Zugabe von BAY 41-2272 wurde in beiden HSCs Spezies eine konzentrationsabhängige Senkung der prozentualen mRNA Genexpressionen nach 48 h detektiert. Für die Col1 α 1 Genexpression bedeutete dies bei einer Konzentration von 10 μM eine signifikante Senkung der Genexpression um 39 % in hHSCs, was dem Ausgangsexpressionswert der Zellen ohne TGF β Stimulation entsprach. Die Col1 α 1 Genexpression in rHSCs konnte durch die Zugabe von 10 μM des sGC Stimulators innerhalb des TGF β induzierten Messfensters um 67 % gesenkt werden. Die Genexpression des Transdifferenzierungsmarkers α -SMA von TGF β stimulierten HSCs wurde ebenfalls durch die Zugabe von BAY 41-2272 signifikant und konzentrationsabhängig gesenkt. Während sich bei den hHSCs eine signifikante Genexpressionssenkung ab einer Konzentration von 0,01 μM zeigte, konnte dies bei rHSCs erst ab 10 μM erreicht werden. Innerhalb des jeweiligen TGF β induzierten Messfensters wurde durch die Zugabe von 10 μM des sGC Stimulators eine maximale Senkung der α -SMA Genexpression um 71 % in hHSCs und 79 % in rHSCs detektiert. Vergleichbare Ergebnisse erzielte diese Konzentration bei der Expression des LTBP 2 Gens. Hier senkte sich die prozentuale mRNA Genexpression innerhalb des TGF β induzierten Messfensters signifikant um 59 % (rHSCs) bzw. 73 % (hHSCs).

Zusammenfassend wurde eine maximale Senkung der mRNA Genexpressionen der profibrotischen Marker bei einer Konzentration von 10 μM BAY 41-2272 in beiden HSCs Spezies detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine sGC Stimulator-Konzentration von 10 μM für die weiteren *in vitro* Versuche verwendet.

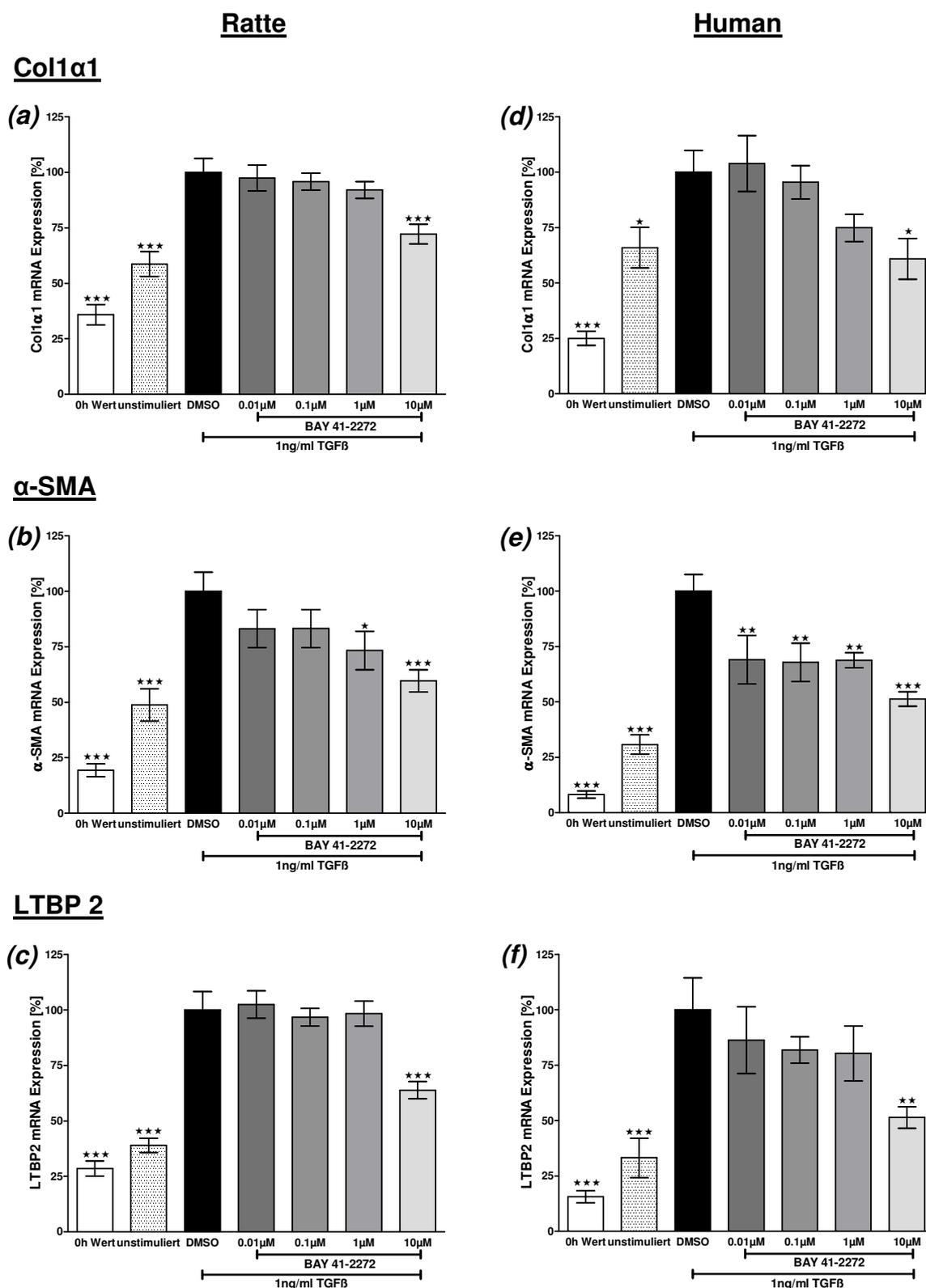


Abb. 18: Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGFβ stimulierte HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n= 7 Versuche (Duplikate) á 2 LOT; (d) – (f) Human n= 13 Versuche (Duplikate) á 2 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01
 und *** p < 0,001)

α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; BAY 41-2272= sGC Stimulator; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1; DMSO= Dimethylsulfoxid; LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; TGFβ= *transforming growth factor beta*

3.1.4. Überprüfung der Wirkung des sGC Stimulators durch Inhibition der sGC mittels ODQ

Um die Spezifität der in Abschnitt 3.1.3. beschriebenen Effekte des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Genexpressionen von TGF β stimulierten HSCs abzusichern, wurde die sGC durch den Inhibitor ODQ gehemmt. ODQ inhibiert die Wirkung von sGC Stimulatoren durch die Oxidation der Hämgruppe der sGC, so dass keine cGMP-Bildung erfolgt (Moro *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 1997).

In Abbildung 19 sind die prozentualen mRNA Genexpressionen der profibrotischen Marker nach Zugabe von 10 μ M BAY 41-2272 \pm 10 μ M ODQ als MW \pm SEM dargestellt. Im Vergleich zu den bisherigen *in vitro* Experimenten waren die verschiedenen Genexpressionen der unstimulierten HSCs etwas geringer und lagen zwischen 30 % und 40 % je nach Gen und HSCs Spezies. Somit betrug das TGF β induzierte Messfenster zwischen 60 % und 70 %. Durch die Zugabe von 10 μ M BAY 41-2272 konnte in beiden HSCs Spezies eine, die vorherigen Ergebnisse bestätigende, signifikante Genexpressionssenkung aller profibrotischen Marker erzielt werden (s.a. Abschnitt 3.1.3.). Im Einzelnen bedeutete dies eine signifikante Senkung der Col1 α 1 Genexpression von ca. 65 % innerhalb des TGF β induzierten Messfensters in beiden HSCs Spezies. Die mRNA Expression von α -SMA konnte um 61 % (hHSCs) und 53,4 % (rHSCs) gesenkt werden (vs. DMSO Kontrolle = 100 %), was einer ca. 80 %igen Senkung des TGF β induzierten Messfensters entsprach. Ebenso konnte eine signifikante Genexpressionssenkung für den ECM *remodelling* Marker LTBP 2 gemessen werden (Expressionswert: hHSCs = 86 % und rHSCs = 60 % innerhalb des TGF β induzierten Messfensters). Durch die Kombination von BAY 41-2272 und ODQ konnte die genexpressionssenkende Wirkung des sGC Stimulators vollständig in beiden HSCs Spezies inhibiert werden. Durchschnittlich erhöhten sich die Expressionen der einzelne Gene durch die kombinierte Zugabe leicht über das DMSO Kontrollniveau hinaus. Als zusätzliche Kontrolle wurde in diesen *in vitro* Versuchen die alleinige Wirkung von 10 μ M ODQ auf die mRNA Genexpressionen von TGF β stimulierten HSCs gemessen. Hier zeigte sich für alle repräsentativen profibrotischen Gene keine expressionssenkende Wirkung des sGC Inhibitors; tendenziell stiegen die mRNA Genexpressionen im Bezug zur DMSO Kontrolle leicht an.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der genexpressionssenkende Effekt des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die profibrotischen Marker durch die kombinierte Zugabe von ODQ aufgehoben wurde.

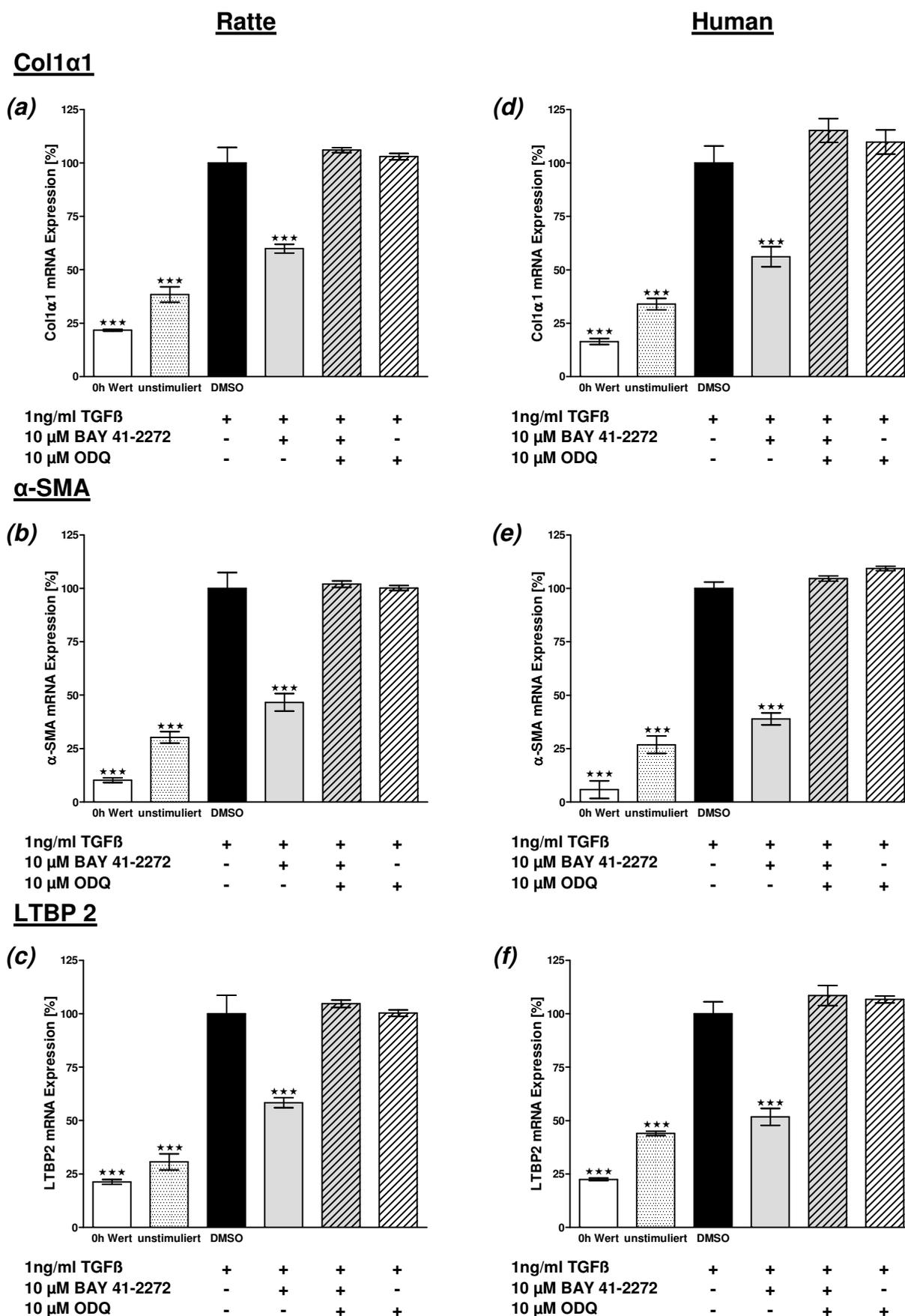


Abb. 19: Wirkung von BAY 41-2272 ± ODQ auf TGFβ stimulierte HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (d) – (f) Human n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; *** p < 0,001)
 α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; BAY 41-2272= sGC Stimulator; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1; DMSO= Di-
 methylsulfoxid; LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; ODQ= sGC Inhibitor; TGFβ= *transforming growth factor beta*

3.1.5. Wirkung des sGC Stimulators im Vergleich zu einem spezifischen PDE 5 Inhibitor

Eine Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 führt zu einer erhöhten Umsetzung von GTP zu cGMP (Boerrigter und Burnett, 2007). Dieser Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration erhöht u.a. die Aktivität von PDEs, besonders der PDE 5, die spezifisch cGMP abbaut (Lugnier, 2006; Francis *et al.*, 2010 und 2011). Da in der Pathogenese der Leberfibrose zusätzlich zu einem NO-cGMP-Mangelzustand auch eine erhöhte PDE 5 Aktivität nachgewiesen wurde (Loureiro-Silva *et al.*, 2006), könnte der daraus resultierende, gesteigerte cGMP-Abbau zu einer Einschränkung der Wirksamkeit des sGC Stimulators führen. Um die Bedeutung sowohl der konstitutiven PDE 5 Wirkung, wie auch der natürlich vorkommenden positiven Rückkopplung zu untersuchen, wurde die Wirkung des spezifischen PDE 5 Inhibitors Vardenafil alleine und in Kombination mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 untersucht.

In Abbildung 20 sind die prozentualen mRNA Expressionen der verschiedenen profibrotischen Gene mit Bezug zur DMSO Kontrolle (= 100 %) als $MW \pm SEM$ dargestellt. Die Ausgangsexpressionen der untersuchten Gene lagen in den rHSCs bei ca. 30 % und in den hHSCs bei ca. 40 %. Durch die Stimulation der Zellen mit 1 ng/ml TGF β konnte eine Genexpressionssteigerung erzielt werden, die je nach Gen und HSCs Spezies zwischen einem Faktor von 2,1 und maximal 3,1 schwankte. Daraus ergab sich ein TGF β induziertes Messfenster von ca. 60 % in hHSCs und ca. 65 % in rHSCs. Auch in diesen *in vitro* Versuchen konnte erneut aufgezeigt werden, dass BAY 41-2272 die Expressionen der profibrotischen Markergene signifikant innerhalb des TGF β induzierten Messfensters um durchschnittlich 70 % senkte. Dies bestätigte die vorherigen Befunde (s.a. Abschnitte 3.1.3. und 3.1.4.). Nach der kombinierten Zugabe von BAY 41-2272 und Vardenafil zeigte sich in der Col1 α 1 Genexpression ein z.T. leicht additiver, expressionssenkender Effekt in beiden HSCs Spezies. Die alleinige Zugabe des PDE 5 Inhibitors führte bei hHSCs zu einer tendenziellen Senkung der mittleren prozentualen Genexpression (ca. 10 % vs. DMSO Kontrolle = 100 %), während bei rHSCs eine leichte, tendenzielle Genexpressionssteigerung ersichtlich war. Ähnliches wurde für die Genexpression des Transdifferenzierungsmarkers α -SMA detektiert. Die Kombination von BAY 41-2272 und Vardenafil zeigte in beiden HSCs Spezies eine signifikante, leicht additive Senkung der mRNA Genexpression.

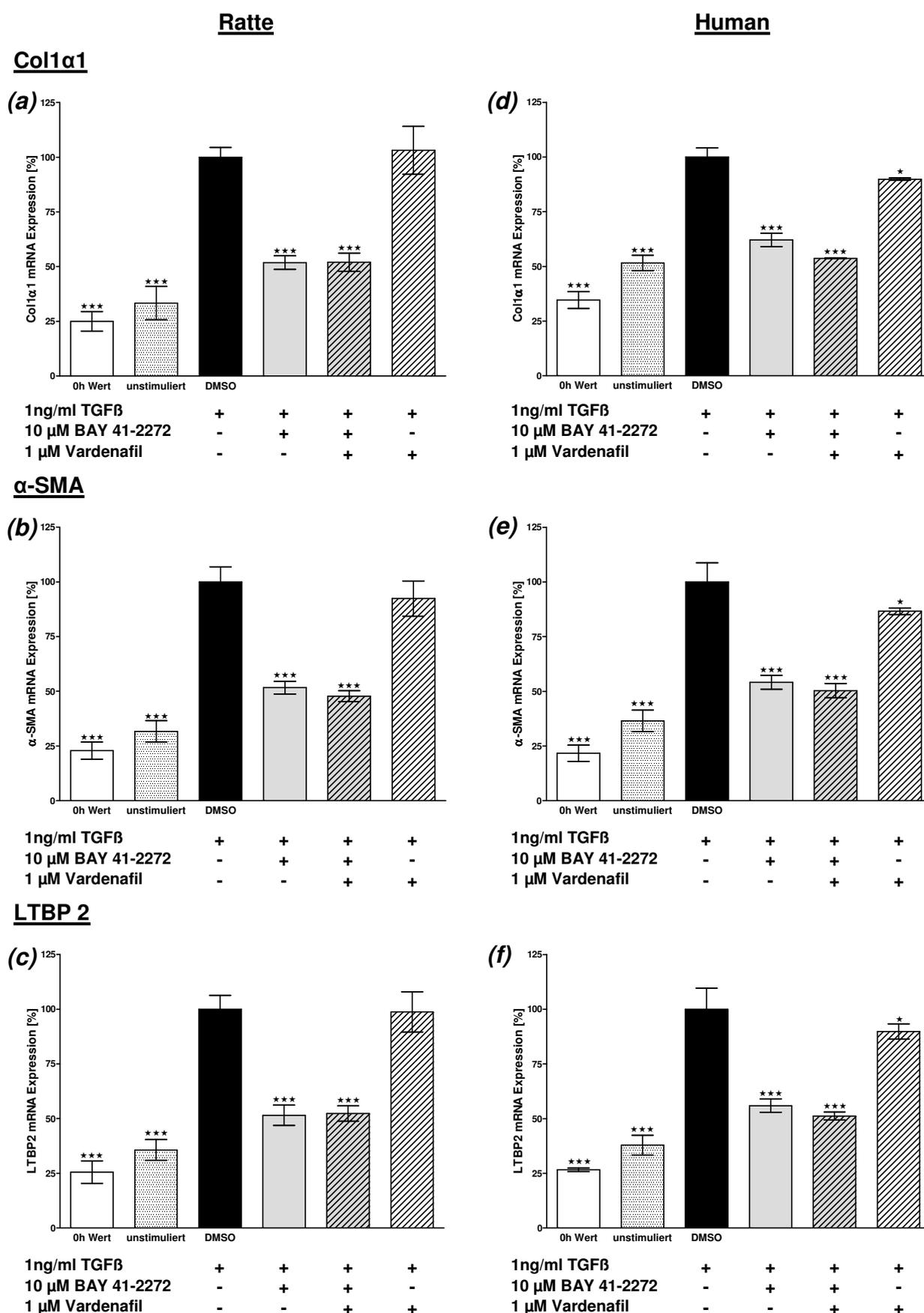


Abb. 20: Wirkung des PDE 5 Inhibitors Vardenafil ± BAY 41-2272 auf aktivierte HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n= 3-6 Versuche (Duplikate) á 1 LOT; (d) – (f) Human n= 3-6 Versuche (Duplikate) á 1 Spender; MW ± SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, und *** p < 0,001)
 α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; BAY 41-2272= sGC Stimulator; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1; DMSO= Dimethyl-
 sulfoxid; LTBP 2= *latent TGFβ binding protein 2*; TGFβ= *transforming growth factor beta*; Vardenafil= PDE 5 Inhibitor

Dies entsprach einer in etwa 74 %igen Genexpressionssenkung innerhalb des TGF β induzierten Messfensters. Eine alleinige Zugabe des PDE 5 Inhibitors senkte die α -SMA Genexpression in hHSCs und rHSCs nur geringfügig (rHSCs: 8 %; hHSCs: 13 % vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Die mRNA Genexpression von LTBP 2 zeigte vergleichbare Ergebnisse. Durch die Kombination von sGC Stimulator und Vardenafil wurden z.T. leicht additive, genexpressionssenkende Effekte erzielt, die jedoch bei der alleinigen Zugabe des PDE 5 Inhibitors nur zu einer leichten Senkung der mittleren prozentualen LTBP 2 Genexpression führten (rHSCs: 2 %; hHSCs: 10 % vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Die alleinige Zugabe von BAY 41-2272 oder in der Kombination mit Vardenafil senkte im Durchschnitt die Genexpression innerhalb des TGF β induzierten Messfensters um ca. 70 % in beiden HSCs Spezies.

Zusammenfassend zeigte sich zum einen, dass die alleinige Zugabe von Vardenafil einen geringeren, expressionssenkenden Effekt als BAY 41-2272 aufwies. Zum anderen konnte hauptsächlich in TGF β stimulierten hHSCs eine leicht additive, genexpressionssenkende Wirkung in der kombinierten Zugabe von Vardenafil und BAY 41-2272 erzielt werden.

3.1.6. Der *in vitro* Wirkmechanismus des sGC Stimulators und die Beteiligung der Proteinkinase G

Ein wichtiges intrazelluläres Zielmolekül in der Signaltransduktion sind die cGMP-regulierten Proteinkinasen. Es gibt bereits erste Hinweise, dass cGMP über die Aktivierung der PKG eine Reduktion der Kollagenexpression/-bildung hervorrufen kann (Saura *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Um eine möglicherweise PKG-vermittelte *in vitro* Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs zu untersuchen, wurde der PKG Inhibitor KT 5823 verwendet (Abb. 21).

Die Genexpressionen der unstimulierten Zellen schwankten je nach HSCs Spezies zwischen ca. 40 % und 60 %. Somit betrug das TGF β induzierte Messfenster je nach Markergen und HSCs Spezies 40 % bis maximal 60 %. Eine Zugabe von 10 μ M des sGC Stimulators BAY 41-2272 senkte die Genexpressionen der profibrotischen Marker im Durchschnitt um ca. 30 % bis 40 % (vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Dies entsprach einer ca. 80 %igen Senkung des TGF β induzierten Messfensters in beiden HSCs Spezies. Für die Col1 α 1 Genexpression in hHSCs konnte sowohl in der Kombination mit KT 5823 als auch in der alleinigen Zugabe des PKG Inhibitors keine signifikante Senkung gemessen werden.

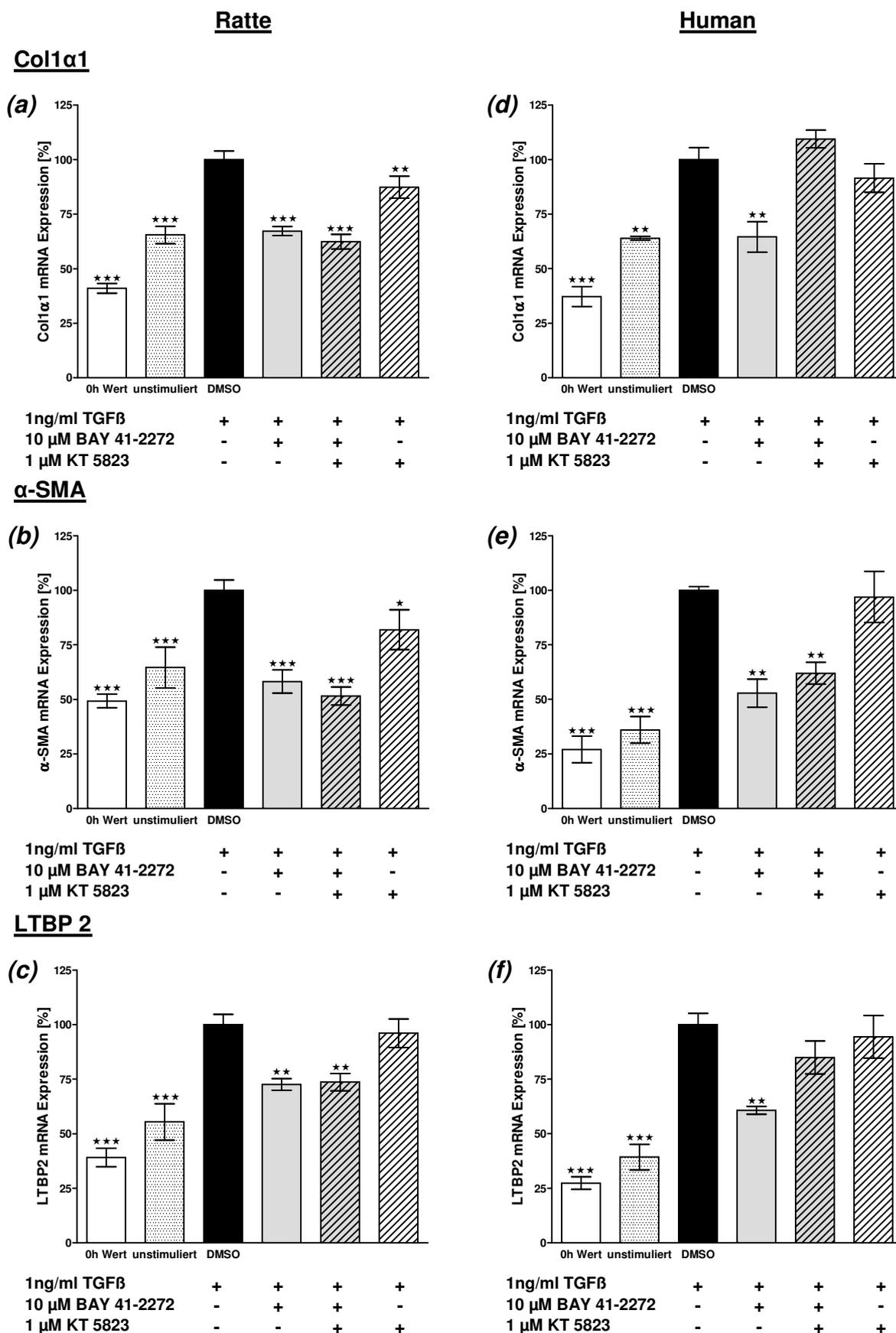


Abb. 21: Wirkung von BAY 41-2272 \pm KT 5823 auf TGF β stimulierte HSCs nach 48 h
 Prozentuale mRNA Genexpressionen von Col1 α 1 ((a) + (d)), α -SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))
 ((a) – (c) Ratte n = 4-6 Versuche (Duplikate) \acute{a} 2 LOT; (d) – (f) Human n = 3 Versuche (Duplikate) \acute{a} 1 Spender; MW \pm SEM
 Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und
 *** p < 0,001) α -SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; BAY 41-2272= sGC Stimulator; Col1 α 1= fibrilläres Kollagen 1 α 1; DMSO=
 Dimethylsulfoxid; KT 5823= PKG Inhibitor; LTBP 2= *latent TGF β binding protein 2*; TGF β = *transforming growth factor beta*

In rHSCs senkte die Kombination von BAY 41-2272 mit KT 5823 die Genexpression auf einen MW von 62,4 % (vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Die alleinige Zugabe von KT 5823 zeigte bei den rHSCs eine leichte, tendenzielle Senkung der Col1 α 1 Genexpression um 13 % (vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Hinsichtlich der Analyse der α -SMA Genexpression konnte für beide HSCs Spezies in den Kombinationsversuchen eine signifikante Expressionssenkung detektiert werden (hHSCs: um 38 %; rHSCs: um 48 % vs. DMSO Kontrolle = 100 %). Eine alleinige Zugabe des PKG Inhibitors senkte geringfügig die Genexpression des Transdifferenzierungsmarkers in beiden HSCs Spezies. Wie auch in den vorherigen *in vitro* Versuchen gezeigt, war das Genexpressionsprofil von LTBP 2 vergleichbar mit dem der anderen profibrotischen Marker. Hier senkte sich in der Kombination BAY 41-2272 mit KT 5823 z.T. signifikant die mRNA Genexpression um 15 % in hHSCs und um 26 % in rHSCs. Bei der alleinigen Zugabe des PKG Inhibitors stieg die LTBP 2 Genexpression an und näherte sich dem DMSO Kontrollniveau (Genexpressionsmittelwert: hHSCs = 94,4 %; rHSCs = 96,1 %).

Zusammenfassend wurde der genexpressionssenkende Effekt von BAY 41-2272 durch den PKG Inhibitor KT 5823 nur z.T. in hHSCs und gar nicht in rHSCs aufgehoben.

3.1.7. Bestimmung der cGMP-Konzentration von TGF β stimulierten HSCs

Um die vorherigen *in vitro* Ergebnisse abzusichern und um die Spezifität des Effektes von BAY 41-2272 bezüglich einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration durch die Stimulation der sGC zu untersuchen, wurde der cGMP-Gehalt in HSCs bestimmt. Dazu wurde vor und nach der sGC Stimulation mit BAY 41-2272 die zelluläre cGMP-Konzentration in den TGF β stimulierten HSCs mittels ELISA gemessen und in Abbildung 22 mit Bezug auf die unstimulierte Kontrolle (= 100 %) dargestellt.

Durch die TGF β Stimulation der Zellen senkte sich der prozentuale, zelluläre cGMP-Gehalt um 60 % in hHSCs (Faktor: 3,7) und um 73 % in rHSCs (Faktor: 2,5) (vs. unstimulierter Kontrolle = 100 %). Durch die Zugabe des sGC Stimulators BAY 41-2272 zeigte sich nach 48 h konzentrationsabhängig ein signifikanter Anstieg der cGMP-Konzentration in beiden HSCs Spezies. Der cGMP-Gehalt lag in hHSCs bei einer Konzentration von 10 μ M BAY 41-2272 20 % über der cGMP-Konzentration der unstimulierten Kontrolle (= 100 %). Dies bedeutete einen Anstieg des zellulären cGMP-

Gehaltes durch die Zugabe von BAY 41-2272 um 80 % (Faktor: 3). Bei rHSCs erzielte diese Konzentration des sGC Stimulators einen mittleren prozentualen Wert von ca. 73 % (vs. unstimulierter Kontrolle = 100 %), was einem cGMP-Anstieg von 46 % vs. der DMSO Kontrolle entsprach.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe des sGC Stimulators BAY 41-2272 konzentrationsabhängig und signifikant den cGMP-Gehalt in TGF β stimulierten HSCs erhöhte.

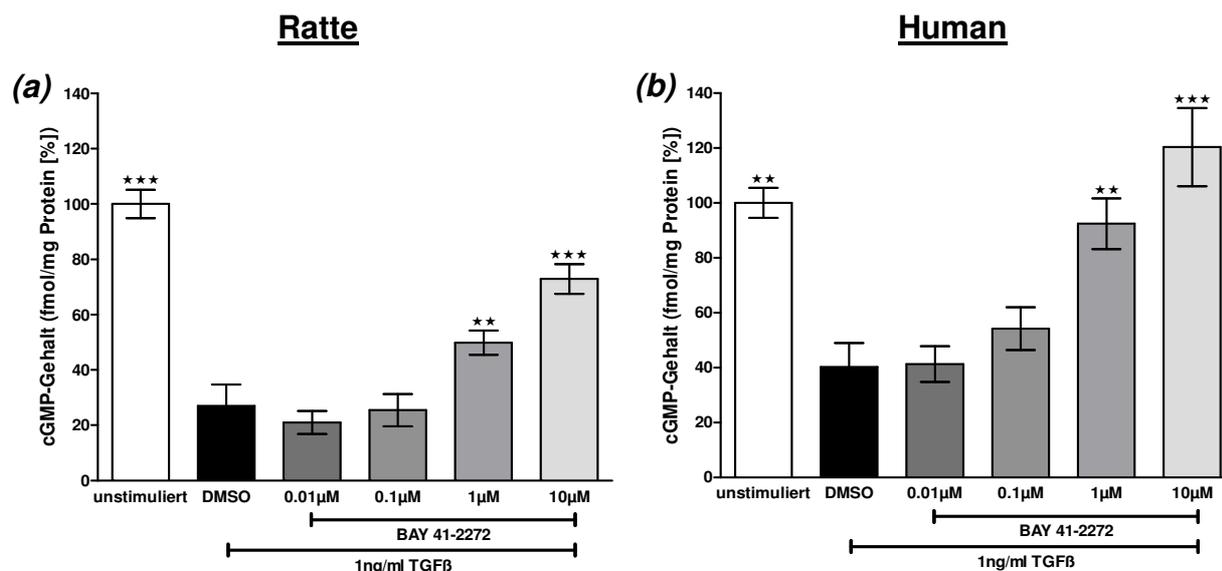


Abb. 22: Detektion des cGMP-Gehaltes in HSCs nach 48 h

((a) Ratte n= 3 Versuche (Duplikate) á 2 LOT; (b) Human n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 Spender; MW \pm SEM
Signifikanz vs. unstimuliert (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; ** p < 0,01 und *** p < 0,001)
BAY 41-2272= sGC Stimulator; DMSO= Dimethylsulfoxid; TGF β = *transforming growth factor beta*

3.1.8. Regulation der Proteinexpression des Transdifferenzierungsmarkers α -SMA in TGF β stimulierten HSCs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der sGC Stimulator BAY 41-2272 die Genexpression des Transdifferenzierungsmarkers α -SMA in TGF β stimulierten HSCs signifikant und konzentrationsabhängig senkte, sollte dieser Effekt auf Proteinebene untersucht werden. Die in Abbildung 23 dargestellten Western Blots der α -SMA Proteindetektion zeigten für beide HSCs Spezies eine deutliche Zunahme des α -SMA Proteins nach 48 h TGF β Stimulation. Diese Zunahme von α -SMA auf Proteinebene konnte konzentrationsabhängig durch den sGC Stimulator BAY 41-2272 gesenkt werden. Als Kontrolle für diese Ergebnisse diente die konstitutive Proteinexpression von β -Aktin. In beiden HSCs Spezies wurde β -Aktin gleichmäßig auf Proteinebene exprimiert.

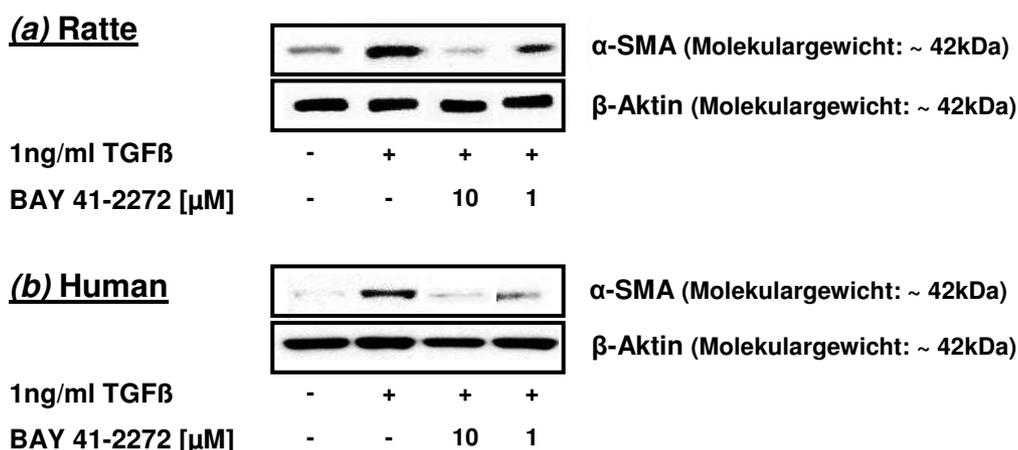


Abb. 23: Einfluss des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Proteinexpression von α -SMA in HSCs nach 48 h (repräsentative Western Blot Darstellung von (a) rHSCs und (b) hHSCs)
 α -SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; β -Aktin= Ladungskontrolle; BAY 41-2272= sGC Stimulator; TGF β = *transforming growth factor beta*

3.2. Untersuchung der Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 in zwei verschiedenen Leberfibrosistiermodellen

Für die Untersuchung der *in vivo* Wirkung der Stimulation der sGC mittels BAY 41-2272 in der Leberfibrose wurden zwei verschiedene, in der Leberfibrosenforschung anerkannte Tiermodelle, das so genannte BDL Modell und das Schweineserum Modell, angewendet. Beide Tiermodelle unterscheiden sich hinsichtlich der Induktion der Erkrankung, haben jedoch die Endstrecke der Erkrankung, die Fibrosierung des Lebergewebes, gemeinsam.

3.2.1. Auswirkung der Leberfibrogenese auf verschiedene Diagnostikparameter

3.2.1.1. Finale Tier- und Lebergewichte

Zur Bestimmung des Allgemeinzustandes der Tiere und als erster Hinweis auf hepatische Veränderungen wurden die finalen Tier- und Lebergewichte bestimmt und in Tabelle 2 (S. 67) als Gruppenmittelwerte \pm SEM dargestellt. Da im BDL Modell die Leberfibrose durch einen chirurgisch induzierten Gallensäurestau im Gewebe hervorgerufen wird, wurde eine Tiergruppe „scheinoperiert“ (= Shamtiere ohne Gallengangsligation). Dies diente dazu mögliche OP-bedingte, physiologische Veränderungen des Tieres ausschließen zu können. Da Shamtiere sich erfahrungsgemäß

nicht von unbehandelten bzw. nicht-operierten Tieren unterscheiden, wurden für das BDL Modell in den folgenden *in vivo* Abbildungen/ Tabellen ausschließlich die Ergebnisse der Shamgruppe abgebildet/ angegeben und als Kontrollgruppe bezeichnet.

Da im Rahmen einer Leberfibrose Fettstoffwechselstörungen auftreten können und Tiere bei einem schlechten Allgemeinzustand weniger Nahrung zu sich nehmen, wurde das finale Körpergewicht der Tiere bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl bei dem BDL Modell als auch bei dem Schweineserum induzierten Leberfibrosemodell keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Tiergruppen zu erkennen waren. Der durchschnittliche, finale MW der Tiergewichte lag zwischen 250 g (Kontrollgruppe BDL Modell) und maximal 268 g (1mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppe Schweineserum Modell).

Tabelle 2: Darstellung der finalen Tier- und Lebergewichte

BDL Modell			Schweineserum Modell		
Gruppe	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]	Gruppe	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]
Kontrolle (n= 10)	250 ± 3,2	7,6 ± 0,2 ^{***}	Kontrolle (n= 5)	272 ± 4,2	7,9 ± 0,2 ^{**}
Placebo (0,5 % Tylose; n= 25)	257 ± 2,3	20,6 ± 0,4	Placebo (0,5 % Tylose; n= 16)	266 ± 6,9	10,3 ± 0,3
0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 14)	266 ± 3,2	21,3 ± 0,5	0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 14)	251 ± 3,3	9,6 ± 0,2
1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 24)	261 ± 2,0	22,0 ± 0,3	1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 16)	268 ± 4,1	10,9 ± 0,4

(MW ± SEM Signifikanz vs. Placebogruppe; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

Für das BDL Modell war die Bestimmung des finalen Lebergewichtes als diagnostischen Parameter besonders wichtig, da aufgrund des kontinuierlichen Gallensäurestatus in dem Lebergewebe ein Gewichtsanstieg gegenüber den Kontrolltieren entstehen sollte. Dieser Messparameter gewährleistet erfahrungsgemäß bei Gewichtszunahme eine einwandfreie Lokalisation der Ligaturfäden am Gallengang und somit den Rückstau von Gallensäuren über die gesamte Studiendauer von 23 Tagen. Beim BDL Modell lag das durchschnittliche finale Lebergewicht in der Kontrollgruppe bei 7,9 g. In der Placebogruppe stieg das Lebergewicht im Gewebe auf das ca. 2,6-fache an (= 20,6 g; Tabelle 2, S. 67). Durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator war keine Reduktion der finalen Lebergewichte zu bestimmen, tendenziell stieg das Gewicht leicht an. Bei Tieren des Schweineserum Modells hingegen erhöhte sich das Lebergewicht signifikant von 7,9 g (Kontrollgruppe) auf 10,3 g (Placebogruppe).

Unter der Behandlung mit der Substanz BAY 41-2272 konnte eine tendenzielle Senkung auf 9,6 g in der 0,3 mg/kg bid behandelten Tiergruppe gemessen werden. Die Tiere der 1 mg/kg bid Behandlungsgruppe zeigten keine Veränderung des Lebergewichtes im Vergleich zur Placebogruppe.

3.2.1.2. Untersuchung von spezifischen Plasmaparametern in der Erkrankung Leberfibrose

Eine Schädigung der Leber geht einher mit physiologischen Anomalitäten, wie z.B. einem Plasmakonzentrationsanstieg von leberspezifischen Enzymen und Bilirubin, dem Abbauprodukt des Hämoglobins. In der Tabelle 3 (S. 69) wurde anhand von verschiedenen Plasmaparametern, die Schädigung der Leber in den beiden Leberfibrosenmodellen aufgezeigt.

Ein Anstieg der Plasmakonzentration des Leberenzym ALT erfolgt bei Störungen der Membranpermeabilität der Leberzellen. Es konnte ein signifikanter Anstieg des mittleren Plasma ALT-Wertes im BDL Modell von 49,8 U/L (Kontrollgruppe) auf 66,0 U/L (Placebogruppe) und im Schweineserum Modell von 39,6 U/L (Kontrollgruppe) auf 53,9 U/L (Placebogruppe; Tabelle 3, S. 69) gemessen werden. Unter der Behandlung mit dem sGC Stimulator zeigte sich im BDL Modell bei einer Konzentration von 0,3 mg/kg bid ein tendenziell leichter Anstieg des ALT-Mittelwertes auf 71,8 U/L, während im Schweineserum Modell eine signifikante Senkung auf ca. 50 U/L zu erkennen war (mit Bezug zur jeweiligen Placebogruppe). In den Behandlungsgruppen mit 1 mg/kg bid der Substanz BAY 41-2272 konnte für beide *in vivo* Modelle im Mittel eine z.T. signifikante Reduktion des ALT-Wertes gemessen werden (BDL Modell: 63,6 U/L; Schweineserum Modell: 51,4 U/L).

Eine Erhöhung der ALP-Konzentration im Plasma erfolgt, sobald ein Gallensäurestau auftritt. Sowohl im BDL Modell als auch im Schweineserum Modell konnte ein ca. 1,7-facher bzw. zweifacher signifikanter Anstieg des ALP-Mittelwertes in den Placebogruppen vs. den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt werden (Tabelle 3, S. 69). In den 0,3 mg/kg bid Behandlungsgruppen der Tiermodelle zeigte sich keine signifikante Veränderung vs. den Placebogruppen. Unter der Behandlung mit 1 mg/kg bid des sGC Stimulators BAY 41-2272 konnte im Schweineserum Modell eine signifikante Senkung von ca. 23 % (Placebogruppe = 100 %) auf einen MW von 187,7 U/L gemessen werden. Im BDL Modell ist der mittlere ALP-Wert der behandelten Tiergruppen unverändert geblieben.

Tabelle 3: Physiologische Leberparameter gemessen mittels VetScan™ Analyse in heparinisiertem Vollblut

BDL Modell				
Gruppe	ALT [U/L]	ALP [U/L]	Albumin [g/dl]	T-BIL [mg/dl]
Kontrolle (n= 10)	49,8 ± 1,4 *	202,2 ± 11,2 ***	4,5 ± 0,0 ***	0,2 ± 0,0 ***
Placebo (0,5 % Tylose; n= 25)	66,0 ± 3,9	457,1 ± 12,4	2,8 ± 0,0	11,9 ± 0,8
0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 14)	71,8 ± 4,9	440,6 ± 14,7	2,7 ± 0,1	9,7 ± 0,3
1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 26)	63,6 ± 3,7	458,2 ± 13,0	2,5 ± 0,1	11,5 ± 0,7
Schweineserum Modell				
Gruppe	ALT [U/L]	ALP [U/L]	Albumin [g/dl]	T-BIL [mg/dl]
Kontrolle (n= 5)	39,6 ± 2,4 **	144,7 ± 13,3 **	1,2 ± 0,1 ***	0,3 ± 0,0
Placebo (0,5 % Tylose; n= 16)	53,9 ± 1,9	244,5 ± 13,1	2,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0
0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 14)	49,9 ± 1,9 *	240,6 ± 18,6	1,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0
1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 16)	51,4 ± 1,7 *	187,7 ± 11,0 *	2,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0
(MW ± SEM Signifikanz vs. Placebogruppe; one-way ANOVA mit Newman-Keuls <i>post-hoc</i> Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)				

Da die Leber der Hauptsyntheseort für alle zirkulierenden Proteine ist, stellt die Bestimmung von Albumin einen diagnostischen Parameter für die Syntheseleistung der Leber dar. Im BDL Modell konnte eine signifikante Senkung der mittleren Albuminkonzentration im Plasma um das ca. 1,6-fache sowohl in der Placebogruppe als auch in den Behandlungsgruppen gemessen werden (Tabelle 3, S. 69). Die Albuminkonzentration betrug in der Kontrollgruppe 4,5 g/dl und senkte sich maximal auf 2,5 g/dl (1 mg/kg bid Behandlungsgruppe). In der Kontrollgruppe des Schweineserum Modells lag der Albuminmittelwert bei 1,2 g/dl, der in der Placebogruppe signifikant auf 2,0 g/dl anstieg. In beiden Behandlungsgruppen veränderte sich diese Albuminkonzentration jedoch nicht.

Die Funktionsleistung der Leber lässt sich zusätzlich durch die Messung des Bilirubingehaltes im Plasma manifestieren. Kommt es aufgrund von Leberfunktionsstörungen zu einem Missverhältnis zwischen Abbau und Bildung von Bilirubin, steigt die Konzentration im Plasma kontinuierlich an. Im BDL Modell erhöhte sich die mittlere Bilirubinkonzentration im Plasma der Tiere um das 60-fache (Kontrollgruppe: 0,2 mg/dl; Placebogruppe: 11,9 mg/dl; Tabelle 3, S. 69). Unter der Behandlung mit

der Substanz BAY 41-2272 konnte eine leichte tendenzielle Senkung auf 9,7 mg/dl (0,3 mg/kg bid) bzw. auf eine konstante mittlere Bilirubinkonzentration von 11,5 mg/dl in der 1 mg/kg bid Behandlungsgruppe bestimmt werden. Im Schweineserum Modell waren keine signifikanten Veränderungen des Bilirubingehaltes zwischen den einzelnen Tiergruppen zu erkennen. Hier lag die mittlere Bilirubinkonzentration im Plasma bei 0,3 mg/dl.

3.2.2. Histologische Veränderungen des Lebergewebes

3.2.2.1. Darstellung der Fibrosierung des Lebergewebes (Kollagenfärbung)

Eine Fibrosierung von Lebergewebe resultiert in spezifischen Veränderungen der physiologischen Struktur, wie z.B. in der Zunahme des fibrillären Kollagenanteils. Zur Darstellung dieses Prozesses und des daraus resultierenden Funktionsverlustes des Organs, eignet sich die Färbung der Kollagenfasern mittels der Sirius Rot Färbemethode (Abb. 24).

Im BDL Modell (Abb. 24; (a) bis (d)) konnte histologisch die durch den Gallensäurestau verursachte Schädigung des Lebergewebes dargestellt werden. Diese geht mit einer deutlichen diffusen Hyperplasie der Gallengänge, einer Aktivierung von HSCs, Leberzellnekrosen und der daraus resultierenden Zunahme an Kollagenfasern im Lebergewebe einher. Während in der Kontrollgruppe lediglich die natürlich vorkommenden Kollagenfasern im Bereich des Gallengangs, der Lebervene und –arterie (= Periportalfeld; Abb. 24; (a)) durch den Farbstoff Sirius Rot leicht angefärbt wurden, konnte in der Placebogruppe (Abb. 24; (b)) deutlich die Zunahme an Kollagenfasern histologisch kenntlich gemacht werden. Der Kollagenanstieg im Lebergewebe zeigte sich in den Sirius Rot gefärbten Schnitten ausgehend von den Periportalfeldern bis weit ins Leberparenchym übergreifend (Abb. 24; (b)). Durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 (Abb. 24; (c) und (d)) konnte in den histologischen Präparaten sowohl eine Reduktion der Kollagenfasern als auch eine Reduktion der Gallengangshyperplasien beobachtet werden. Im Schweineserum Modell zeigte sich eine mikroskopisch anders erscheinende Schädigung des Lebergewebes (Abb. 24; (e) bis (h)). In der Progression der Leberfibrose erfolgten eine weniger hepatozelluläre Schädigung und nur eine geringe fokale Gallengangshyperplasie. Auffällig ist jedoch die Ausbildung einer perilobulären Fibrose (Abb. 24; (f)). Durch die Be-

handlung mit BAY 41-2272 in beiden Dosierungen konnten diese beschriebenen Schädigungen abgemildert werden (Abb. 24; (g) und (h)).

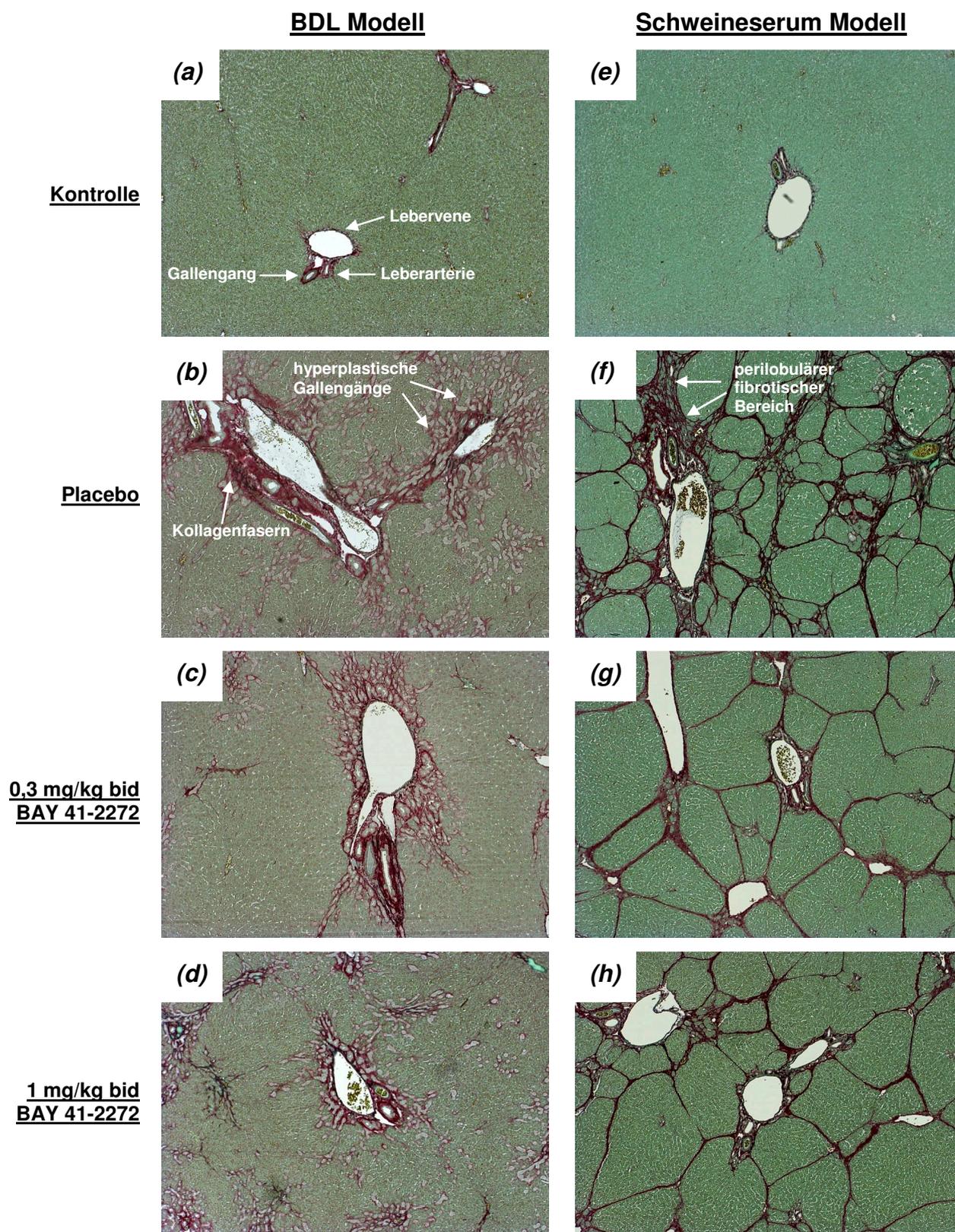


Abb. 24: Repräsentative Darstellung von Sirius Rot gefärbten Leberschnitten
(a) - (d) BDL Modell und (e) - (h) Schweineserum Modell

((a) + (e) Kontrollgruppen; (b) + (f) Placebogruppen; (c) + (g) 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppen; (d) + (h) 1 mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppen; 50-fache Vergrößerung)

Zur Quantifizierung der Sirius Rot angefärbten Kollagenfasern wurde eine morphometrische Analyse der Gewebeschnitte mittels der Cell P Software von Olympus durchgeführt und in der Abbildung 25 als MW \pm SEM dargestellt.

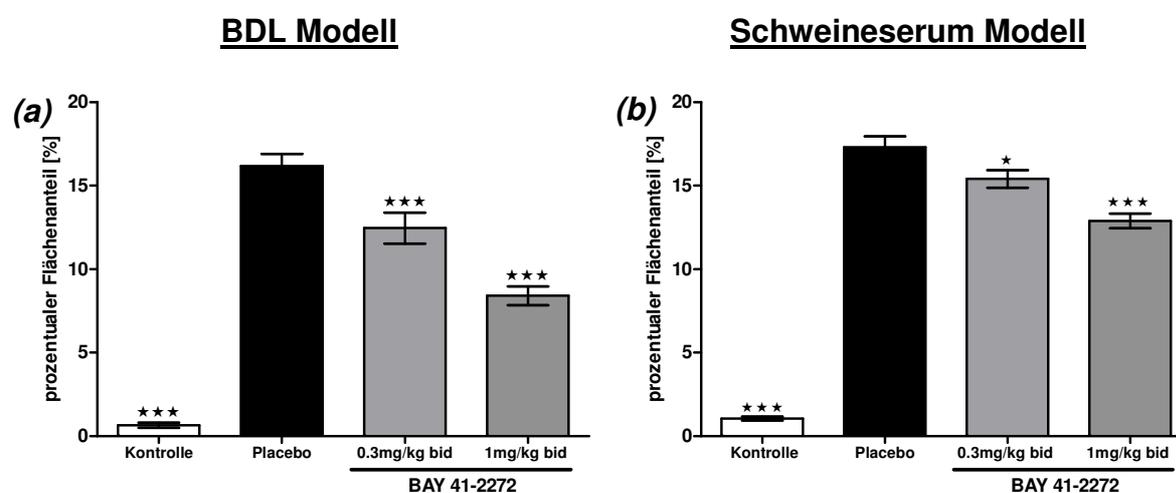


Abb. 25: Morphometrische Analyse von Sirius Rot gefärbten Leberschnitten

(a) BDL Modell und (b) Schweineserum Modell

(n = 3 Fotos pro Schnitt/Tier; Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n = 5, Placebo n = 15-16, 0,3mg/kg bid BAY 41-2272 n = 14 und 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n = 16 ; MW \pm SEM; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; Signifikanz vs. Placebogruppe; * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$)

Im Vergleich zu den Placebogruppen zeigte sich in den Kontrollgruppen beider Leberfibrosiermodelle eine signifikante Zunahme des prozentualen Flächenanteils an Sirius Rot angefärbten Kollagenfasern (BDL Modell: um 15,5 %; Schweineserum Modell: um 16,2 %). Durch die Behandlung der Tiere mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 konnte in dem BDL Modell eine signifikante Senkung des prozentualen Flächenanteils um 23 % (0,3 mg/kg bid) und um 48 % (1 mg/kg bid) mit Bezug zur Placebogruppe (= 100%) erzielt werden (Abb. 25; (a)). Dies entsprach innerhalb des therapeutischen Messfensters (= Differenz zwischen Kontroll- und Placebogruppe) einer Senkung des Sirius Rot gefärbten Flächenanteils von maximal 50 % (1 mg/kg bid Behandlungsgruppe). Im Schweineserum Modell konnte der prozentuale Flächenanteil ebenfalls signifikant um 11 % in der 0,3 mg/kg bid behandelten Tiergruppe und um 25,5 % in der 1 mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppe verringert werden (Abb. 25; (b); vs. Placebogruppe = 100 %). Dies entsprach einer Senkung des therapeutischen Messfensters um 11 % (0,3 mg/kg bid) bzw. um 27 % (1 mg/kg bid).

3.2.2.2. Darstellung der Transdifferenzierung von aktivierten HSCs zu Myofibroblasten (α -SMA Färbung)

Während des Prozesses der Leberfibrosierung findet eine Aktivierung und Transdifferenzierung von HSCs zu Myofibroblasten statt (Friedman, 2008a-c). Im Rahmen dieser Zellaktivierung nimmt die Expression des α -SMA Antigens kontinuierlich zu (Snowdon und Fallowfield, 2011) und dient somit als sensibler Marker für den Grad der Gewebeschädigung im Organ. Durch die Anwendung einer immunhistochemischen Färbung lässt sich diese Transdifferenzierung von HSCs zu Myofibroblasten visualisieren (Abb. 26) und anschließend morphometrisch quantifizieren (Abb. 27).

Während in den histologischen Leberpräparaten der Kontrollgruppen der jeweiligen Tiermodelle lediglich die glatten Muskelzellen von Blutgefäßen und Gallengängen α -SMA positiv waren (Abb. 26; (a) und (e)), stieg in den Placebogruppen der Anteil an Myofibroblasten im Lebergewebe deutlich an (Abb. 26; (b) und (f)). Im BDL Modell befanden sich α -SMA positive Zellen sowohl im Bereich der Periportalfelder als auch um die hyperplastischen Gallengänge (Abb. 26; (b)). In den Behandlungsgruppen (Abb. 26; (c) und (d)) konnte besonders in der 1 mg/kg bid Tiergruppe eine Senkung der α -SMA positiven Zellen mikroskopisch aufgezeigt werden. Im Schweineserum Modell lagen die α -SMA positiven Zellen ebenfalls in den Periportalfeldern und in dem Leberläppchen umgebenden, perilobulären Bindegewebe (= BG; Abb. 26; (f)). Durch die Behandlung mit BAY 41-2272 konnte in den histologischen Präparaten eine deutliche Reduktion der α -SMA positiv angefärbten Zellen dargestellt werden (Abb. 26; (g) und (h)).

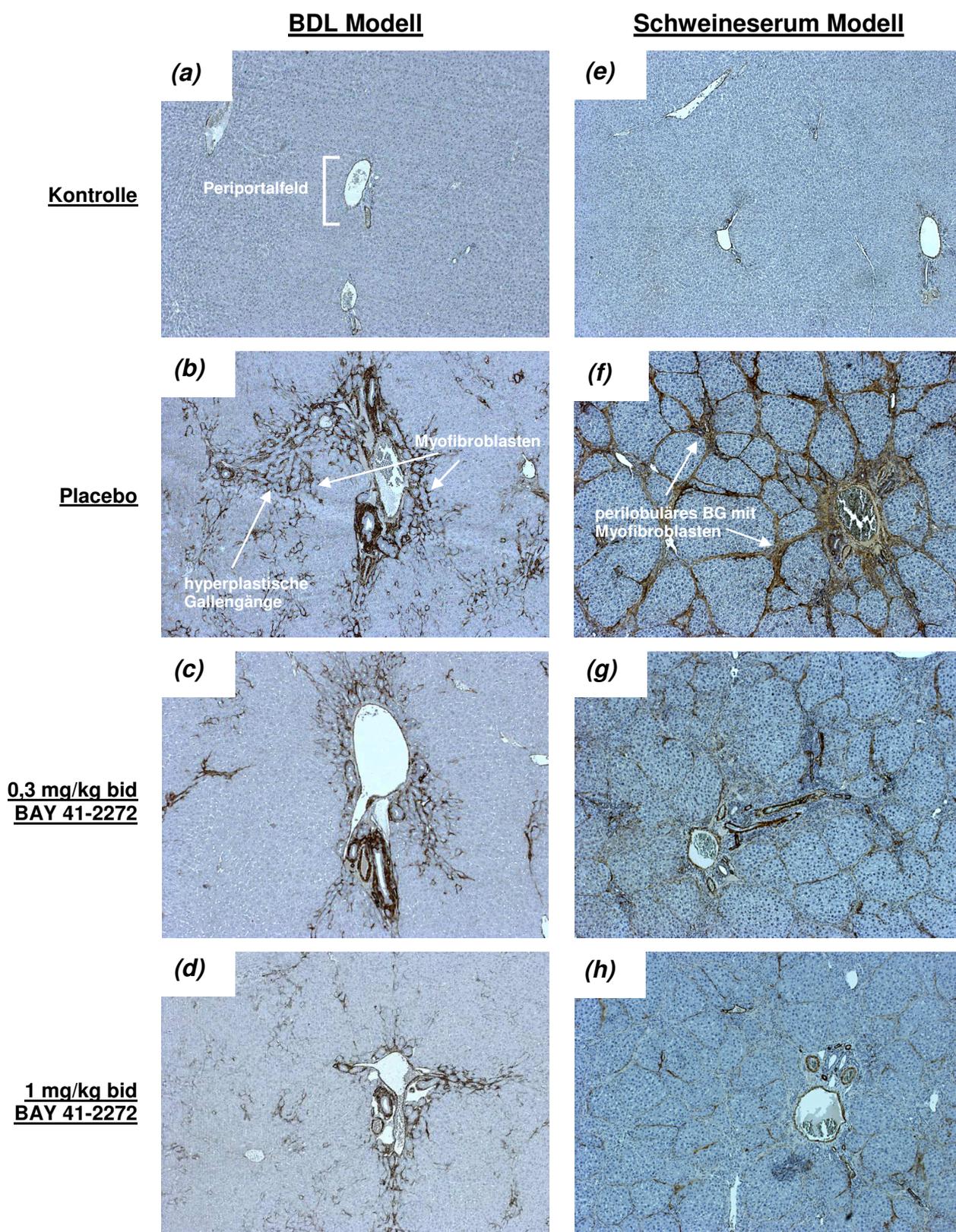


Abb. 26: Repräsentative Darstellung von immunohistochemisch α -SMA gefärbten Leberschnitten (a) - (d) BDL Modell und (e) - (h) Schweineserum Modell

((a) + (e) Kontrollgruppen; (b) + (f) Placebogruppen; (c) + (g) 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppen; (d) + (h) 1 mg/kg bid BAY 41-2272 Behandlungsgruppen; 50-fache Vergrößerung)
BG= Bindegewebe

Zur Quantifizierung der α -SMA positiven Zellen in den histologischen Leberpräparaten wurde eine morphometrische Analyse mit Hilfe der Cell P Software von Olympus durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Flächenanteil in der Abbildung 27 als MW \pm SEM dargestellt.

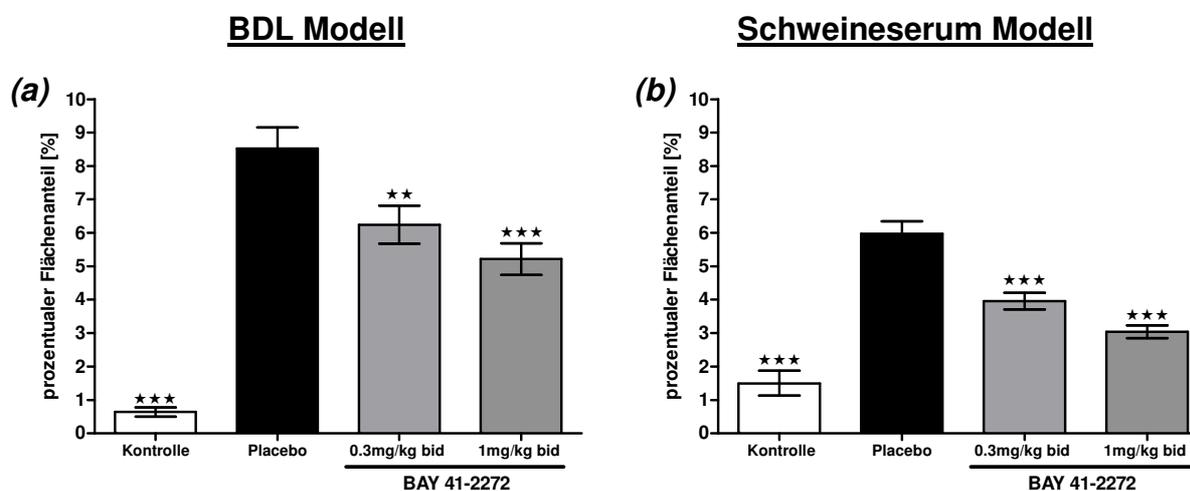


Abb. 27: Prozentualer Flächenanteil an α -SMA positiven Zellen im Lebergewebe

(a) BDL Modell und (b) Schweineserum Modell

(n= 3 Fotos pro Schnitt/Tier; Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-16, 0,3mg/kg bid BAY 41-2272 n= 14 und 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 16; MW \pm SEM; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; Signifikanz vs. Placebogruppe; ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

Im BDL Modell (Abb. 27; (a)) zeigte sich eine Zunahme des prozentualen Flächenanteils an α -SMA positiven Zellen von 0,6 % (Kontrollgruppe) auf 8,5 % (Placebogruppe). Dies entsprach einer Zunahme an Myofibroblasten im Lebergewebe von ca. 93 % (Placebogruppe = 100 %). In dem Schweineserum Modell (Abb. 27; (b)) wurde ein prozentualer Anstieg von 1,5 % (Kontrollgruppe) auf 6,0 % in der Placebogruppe gemessen. Mit Bezug zu der Placebogruppe (= 100 %) war dies eine 75 %ige Steigerung des Myofibroblastenanteils. Durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 konnte in beiden Tiermodellen eine signifikante Senkung des Anteils an α -SMA positiven Zellen im Gewebe erzielt werden. Im BDL Modell bedeutete dies eine signifikante Senkung des prozentualen Flächenanteils um 29 % (0,3 mg/kg bid) bzw. um 42 % (1 mg/kg bid) innerhalb des therapeutischen Messfensters (Abb. 27; (a)). Durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 konnte im Schweineserum Modell der prozentuale Flächenanteil an α -SMA positiven Zellen um 45 % (0,3 mg/kg bid) und um 65 % (1 mg/kg bid) innerhalb des therapeutischen Messfensters gesenkt werden (Abb. 27; (b)).

3.2.3. Quantifizierung des Kollagenanteils im Lebergewebe anhand der α -Aminosäure Hydroxyprolin

HP ist eine α -Aminosäure, die als Strukturprotein die Kollagenfasern stabilisiert und somit die mechanischen Eigenschaften u.a. vom BG beeinflusst (Hinz *et al.*, 1997). Damit ist die HP-Konzentration ein quantitatives Maß für den Kollagengehalt im Gewebe und somit für den Grad der Fibrosierung. In der Abbildung 28 ist die quantitative Messung des HP-Gehaltes des Lebergewebes in mg/g (bezogen auf das Trockengewicht) als MW \pm SEM dargestellt.

Sowohl im BDL Modell als auch im Schweineserum Modell konnte eine signifikante Zunahme der HP-Konzentration im Lebergewebe gemessen werden. Mit Bezug zu der jeweiligen Placebogruppe (= 100 %) betrug diese Zunahme 73 % im Schweineserum Modell und 65 % im BDL Modell. Durch die Behandlung der BDL-Tiere (Abb. 28; (a)) mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 senkte sich der HP-Gehalt signifikant um 11,1 % (0,3 mg/kg bid) und um 18,6 % (1 mg/kg bid) (vs. Placebogruppe = 100 %). Dies entsprach einer HP-Konzentrationsenkung um 17 % bzw. um 29 % innerhalb des therapeutischen Messfensters. Im Gegensatz zu dem BDL Modell konnte im Schweineserum Modell keine HP-Senkung durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator erzielt werden (Abb. 28; (b)). Der HP-Gehalt stieg tendenziell in den Behandlungsgruppen um ca. 20 % an (vs. Placebogruppe = 100 %).

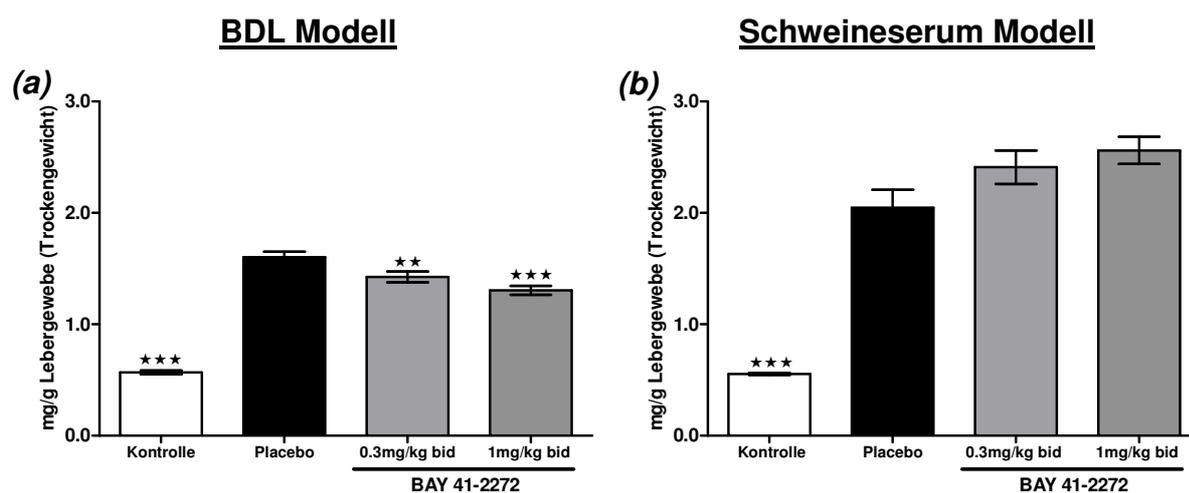


Abb. 28: Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin im Lebergewebe
(a) BDL Modell und (b) Schweineserum Modell

(Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-25, 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 13-14 und 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 15-23 ; MW \pm SEM; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; Signifikanz vs. Placebogruppe; ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

3.2.4. Genexpressionsanalysen von fibrotischem Lebergewebe

Durch die pathologischen Veränderungen des Lebergewebes im Rahmen einer Fibrosierung kommt es u.a. zu einer vermehrten Bildung von fibrillärem Kollagen und einem Anstieg an Myofibroblasten im Gewebe. Zudem findet eine Dysregulation von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (= *matrix metalloproteinases*; MMPs) und ihren natürlichen Inhibitoren (= *tissue inhibitors of metalloproteinases*; TIMPs) im Gewebe statt (Kossakowaska *et al.*, 1998; Roderfeld *et al.*, 2007). Die während einer Leberfibrose stattfindenden pathologischen Prozesse lassen sich daher u.a. anhand der relativen mRNA Genexpressionen von Kollagen, MMPs und TIMPs im Organewebe aufzeigen (Abb. 29.1. und 29.2.).

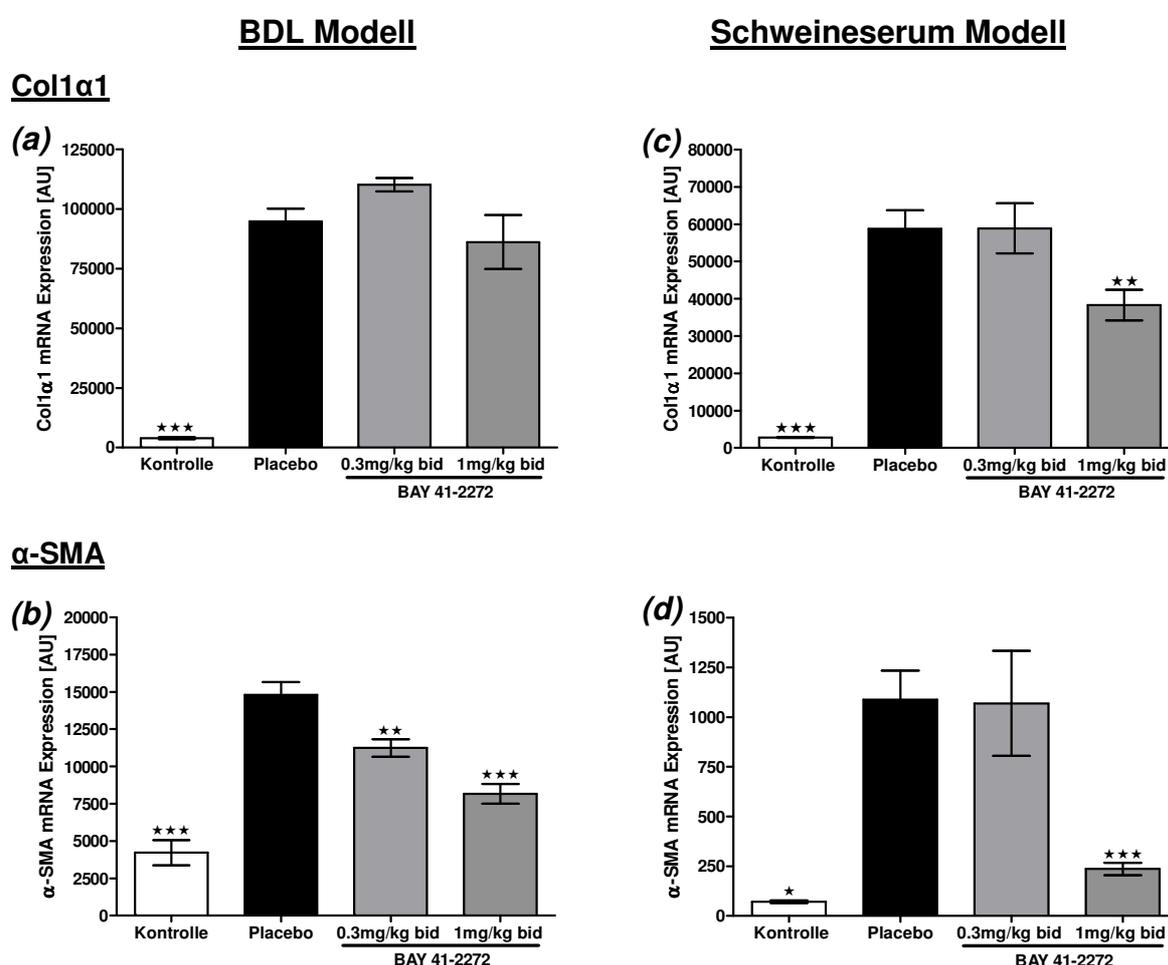


Abb. 29.1.: TaqMan Analyse der relative mRNA Expressionen von verschiedenen profibrotischen Markergenen im Lebergewebe
Darstellung der mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (c)) und α-SMA ((b) + (d))
(a) + (b) BDL Modell und (c) + (d) Schweineserum Modell

(Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-16, 0,3mg/kg bid BAY 41-2272 n= 14 und 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 16; MW ± SEM Signifikanz vs. Placebogruppe; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

α-SMA= glattmuskuläres alpha-Aktin; Col1α1= fibrilläres Kollagen 1α1

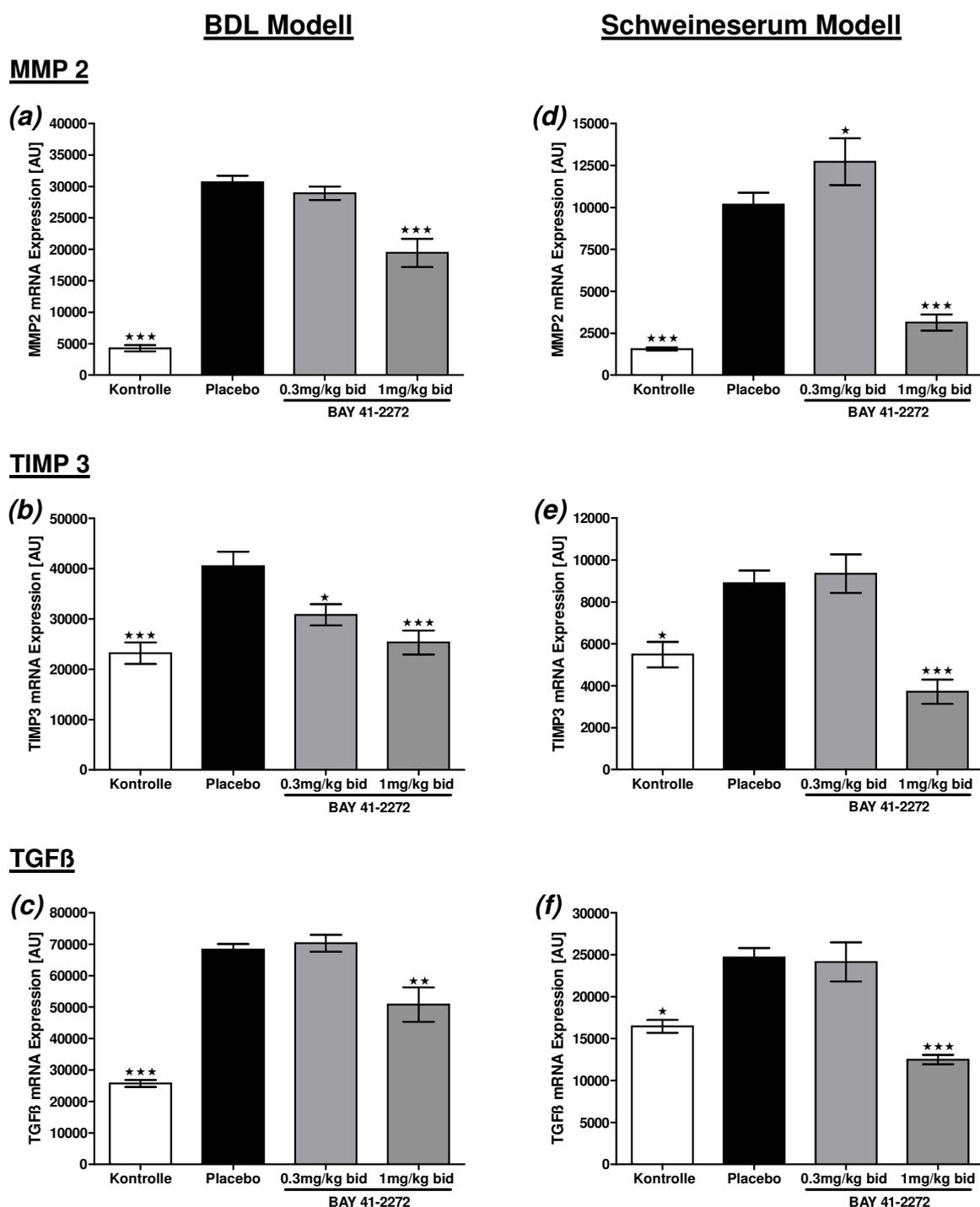


Abb. 29.2.: TaqMan Analyse der relativen mRNA Expressionen von verschiedenen profibrotischen Markergenen im Lebergewebe
Darstellung der mRNA Genexpressionen von MMP 2 ((a) + (d)), TIMP 3 ((b) + (e)) und TGFβ ((c) + (f))
(a) – (c) BDL Modell und (d) – (f) Schweineserum Modell

(Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-16, 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 14 und 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 16; MW ± SEM Signifikanz vs. Placebogruppe; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

MMP 2= Matrixmetalloproteinase 2; TGFβ= *transforming growth factor beta*; TIMP 3= Inhibitor der MMP 3

Nicht nur anhand der histologischen Anfärbung von Kollagenfasern, sondern auch durch die Messung der relativen mRNA Genexpression ließ sich ein signifikanter Kollagenanstieg von ca. 95 % in den Leberfibrosiermodellen aufzeigen (= thera-

peutisches Messfenster; Abb. 29.1.; (a) + (c)). Im BDL Modell zeigte sich unter der Behandlung mit BAY 41-2272 eine tendenzielle Genexpressionssenkung um 9 % (1mg/kg bid Tiergruppe) auf ca. 86000 AU (= *arbitrary units*). Im Schweineserum Modell konnte durch die Behandlung mit 1 mg/kg bid BAY 41-2272 eine signifikante Senkung der Col1 α 1 Expression um ca. 35 % (vs. Placebogruppe = 100 %) auf ca. 38000 AU gemessen werden. Eine Behandlung mit 0,3 mg/kg bid des sGC Stimulators zeigte im BDL Modell einen leichten, nicht signifikanten Genexpressionsanstieg um 16,3 % auf 110119 AU, während im Schweineserum Modell diese Dosierung keinen Effekt aufwies.

Aufgrund der Transdifferenzierung von HSCs zu Myofibroblasten während der Fibrosierung des Lebergewebes, wurde die mRNA Genexpression von α -SMA in beiden Tiermodellen gemessen (Abb. 29.1.; (b) + (d)). Im BDL Modell konnte ein 72 %iger α -SMA Genexpressionsanstieg detektiert werden (= therapeutisches Messfenster). Im Schweineserum Modell betrug diese Differenz zwischen Kontroll- und Placebogruppe 93,5 %. Durch eine Behandlung mit BAY 41-2272 konnte eine signifikante Genexpressionssenkung in den 1 mg/kg bid Gruppen beider Tiermodelle gemessen werden (BDL Modell: 45 %; Schweineserum Modell: 78 % vs. der jeweiligen Placebogruppe = 100 %). Dies entsprach einer maximalen α -SMA Genexpressionssenkung innerhalb des therapeutischen Messfensters von 63 % im BDL Modell bzw. 84 % im Schweineserum Modell. Während im BDL Modell unter der Behandlung mit 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 eine Genexpressionssenkung von 24 % (vs. der Placebogruppe = 100 %) zu erkennen war, konnte dies für das Schweineserum Modell nicht bestätigt werden.

Die relative MMP 2 (= *matrix metalloproteinase 2*) Genexpression wurde ebenfalls für beide Leberfibrosiertiermodelle bestimmt (Abb. 29.2.; (a) + (d)). Die Hauptwirkung des Enzyms MMP 2 ist die Spaltung von denaturierten Kollagenfasern. Somit ist die MMP 2 maßgeblich am ECM-Abbau im Lebergewebe beteiligt und zählt zu den so genannten ECM *remodelling* Markern (Herbst *et al.*, 1997; Préaux *et al.*, 1999). Bei einer Gewebefibrosierung kommt es zu einer Überproduktion an Kollagen, wodurch die MMP 2 Genexpression kontinuierlich ansteigt (Benyon *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2005). In beiden Tiermodellen steigerte sich die MMP 2 Genexpression auf das ca. 6,5-fache (therapeutisches Messfenster: BDL Modell = 86 %; Schweineserum Modell = 85 %). Während im BDL Modell keine MMP 2 Genexpressionssenkung unter der Therapie mit 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 erzielt wurde, stieg diese im Schweineserum Modell signifikant um 25 % auf ca. 12000 AU an (vs. Placebogruppe = 100 %).

Eine Behandlung der Tiere mit 1 mg/kg bid des sGC Stimulators zeigte in beiden *in vivo* Modellen eine signifikante Senkung der MMP 2 Genexpression (BDL Modell: um 37 %; Schweineserum Modell: um 69 % vs. der jeweiligen Placebogruppe (= 100 %)). Dies entsprach mit Bezug zum therapeutischen Messfenster einer maximalen Genexpressionssenkung von 43 % (BDL Modell) bzw. 82 % (Schweineserum Modell).

Als Vertreter der natürlich vorkommenden Inhibitoren der MMPs wurde die mRNA Genexpression von TIMP 3 im Lebergewebe (= *tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) gemessen (Abb. 29.2.; (b) + (e)). Hier konnte eine signifikante Genexpressionszunahme um das ca. 1,5-fache in beiden Leberfibrosistiermodellen gemessen werden (therapeutisches Messfenster: BDL Modell = 43 %; Schweineserum Modell = 38 %). Die Substanzdosierung von 0,3 mg/kg bid BAY 41-2272 senkte die TIMP 3 Genexpression um 24 % auf ca. 30000 AU im BDL Modell, während kein genexpressions-senkender Effekt für diese Konzentration im Schweineserum Modell erzielt wurde. Durch die Behandlung der Tiere mit 1 mg/kg bid des sGC Stimulators konnte eine signifikante TIMP 3 mRNA Genexpressionssenkung um 37 % auf 25319 AU im BDL Modell und um 58 % auf 3717 AU im Schweineserum Modell detektiert werden (vs. der jeweiligen Placebogruppe = 100 %). Dies bedeutete für das BDL Modell eine 86 %ige Genexpressionssenkung innerhalb des therapeutischen Messfensters. Im Schweineserum Modell erzielte eine Behandlung mit 1 mg/kg bid des sGC Stimulator einen TIMP 3 Genexpressionsmittelwert entsprechend der Kontrollgruppe.

Da die Fibrosierung des Lebergewebes u.a. mit einer erhöhten TGF β Expression einhergeht (Yang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006), wurde diese relative mRNA Genexpression ergänzend im Lebergewebe bestimmt (Abb. 29.2.; (c) + (f)). Die Zunahme der TGF β Genexpression in fibrosierendem Lebergewebe ließ sich in beiden Tiermodellen signifikant aufzeigen (therapeutisches Messfenster: BDL Modell = 62 %; Schweineserum Modell = 33 %). Es konnte eine signifikante Genexpressionssenkung durch die Behandlung mit 1 mg/kg bid BAY 41-2272 um 26 % im BDL Modell bzw. um 49 % im Schweineserum Modell (vs. Placebogruppe = 100 %) gemessen werden. Keine Veränderungen der relativen TGF β Genexpression im Lebergewebe zeigten sich in den 0,3 mg/kg bid Behandlungsgruppen beider Tiermodelle. Innerhalb des therapeutischen Messfensters konnten durch die Behandlung mit BAY 41-2272 die TGF β Genexpressionen im BDL Modell maximal um 42 % und im Schweineserum Modell sogar bis auf den Genexpressionsmittelwert der Kontrolltiere gesenkt werden.

3.2.5. Wirkung des sGC Stimulators auf den Blut- und Portalvenendruck von leberfibrotischen Tieren

Eine der Hauptwirkungen des NO-Systems ist eine cGMP-vermittelte Vasorelaxation (Gewaltig und Kojda, 2002). Daher liegen die Hauptanwendungsgebiete von organischen Nitraten bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Es wurde schon relativ früh gezeigt, dass sGC Stimulatoren eine blutdrucksenkende Wirkung aufweisen (Stasch *et al.*, 2002b; Zanfolin *et al.*, 2006). Um hämodynamische Parameter von unbehandelten und von BAY 41-2272 behandelten Tieren miteinander vergleichen zu können, wurde zum einen der LVP_{sys} als Maß für den Effekt des sGC Stimulators auf den systemischen Kreislauf und zum anderen die Herzfrequenz der Tiere gemessen. Da in den bisherigen *in vivo* Experimenten die 1 mg/kg bid behandelten Tiere eine bessere Senkung von profibrotischen Parametern aufwiesen, wurden die invasiven Hämodynamikmessungen nur für diese Dosierung des sGC Stimulators (bzw. für die jeweiligen Kontroll- und Placebogruppen) durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 4 (S. 81) als $MW \pm SEM$ dargestellt. Bei der Messung des LVP_{sys} und der Herzfrequenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Tiergruppen als auch zwischen den unterschiedlichen Leberfibrosistiermodellen. Der durchschnittliche mittlere LVP_{sys} betrug ca. 120 mmHg in beiden Tiermodellen. Die durchschnittliche Herzfrequenz der Tiere lag zwischen 324 BPM (BDL Modell) und 371 BPM (Schweineserum Modell).

Tabelle 4: Hämodynamikparameter der verschiedenen Tierstudien

BDL Modell		
Gruppe	LVP_{sys} [mmHg]	Herzfrequenz [BPM]
Kontrolle (n= 5)	125,3 ± 4,1	320,1 ± 14,0
Placebo (0,5 % Tylose; n= 15)	119,6 ± 2,8	310,9 ± 5,5
1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 14)	114,6 ± 1,5	314,0 ± 7,2
Schweineserum Modell		
Gruppe	LVP_{sys} [mmHg]	Herzfrequenz [BPM]
Kontrolle (n= 5)	125,4 ± 3,5	369,5 ± 11,2
Placebo (0,5 % Tylose; n= 16)	122,2 ± 1,6	371,7 ± 15,7
1 mg/kg bid BAY 41-2272 (n= 16)	119,7 ± 3,0	371,5 ± 5,8
(MW ± SEM vs. Placebogruppe; one- way ANOVA mit Newman-Keuls <i>post-hoc</i> Analyse) LVP_{sys} = linksventrikulärer Druck		

Um eine weitere Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf spezifische leberfibrotische Pathologien zu zeigen, wurde der PVD der Tiere gemessen und in Abbildung 30 als MW \pm SEM dargestellt.

In den jeweiligen Kontrollgruppen wurde ein mittlerer PVD von 7,6 mmHg (Schweineserum Modell) bzw. 8,2 mmHg (BDL Modell) gemessen. Dieser stieg durch die Induktion der Leberfibrose signifikant in den Placebogruppen beider Tiermodelle an (Schweineserum Modell: Faktor 1,6; BDL Modell: Faktor 2,0). Im BDL Modell konnte durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator (1 mg/kg bid) eine signifikante PVD Senkung um 18 % erreicht werden (vs. Placebogruppe = 100 %). Dies entsprach einer prozentualen PVD Senkung von 34,6 % innerhalb des therapeutischen Messfensters. Im Schweineserum Modell erfolgte ein tendenzielle Senkung des PVDs um 9,1 % (= 10,81 mmHg; vs. Placebogruppe = 100 %).

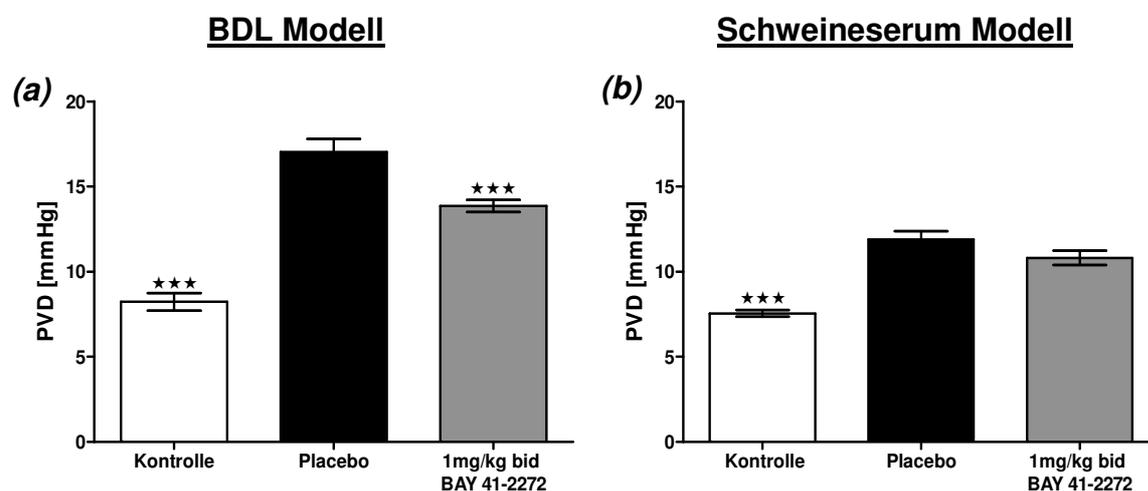


Abb. 30: Messungen des Portalvenendruckes
(a) BDL Modell und (b) Schweineserum Modell

(Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-16, 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 14-16; MW \pm SEM; Signifikanz vs. Placebogruppe; one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post-hoc* Analyse; *** p < 0,001)

4. Diskussion

Die Leberfibrose ist in Deutschland mit einer Inzidenz von 250 Fällen/100000 Einwohner/Jahr eine weitverbreitete Erkrankung (Herold, 2011). Etwa 45 % der Leberfibrosepatienten versterben pro Jahr an den Folgen dieser Erkrankung (de Goede *et al.*, 2012). Trotz unterschiedlicher Ätiologien haben alle Leberschädigungen eine gemeinsame Endstrecke: die Fibrosierung des Leberparenchyms. Obwohl die wirkungsvolle Bekämpfung der Leberfibrose Ziel intensiver Forschungen ist, gibt es derzeit noch keine ausreichend effiziente Therapie, wodurch die hohe Mortalitätsrate bedingt wird.

In der Pathogenese der Leberfibrose wird der Aktivierung von HSCs eine zentrale Funktion zugeordnet (Hendersen und Iredale, 2007; Friedman, 2008a-c). Gressner und Bachem zeigten im Jahre 1990 das vor allem der Stimulus TGF β HSCs aktiviert und die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten induziert, was durch Reynaert *et al.* (2002) und De Minicis *et al.* (2007) bestätigt wurde. Dieses, in der Leberfibroseforschung anerkanntes, *in vitro* Verfahren spiegelt den Pathomechanismus der Entwicklung einer Leberfibrose im Menschen wieder und eignet sich daher zur Erforschung dieser Erkrankung und Erschließung möglicher therapeutischer Ansätze (Friedman, 2008b).

Fan *et al.* (1999) konnte anhand von TGF β stimulierten Tubulusepithelzellen der Rattennieren eine zelluläre Aktivierung mit einem Anstieg der Expression von fibrillärem Col1 α 1 und dem Transdifferenzierungsmarker α -SMA aufzeigen. Der Befund, dass im Rahmen der Fibrosierung der Leber zum einen die Konzentration des profibrotischen Zytokins TGF β und zum anderen die mRNA Genexpressionen von Col1 α 1 und α -SMA ansteigen, konnte auf die Genexpressionen in HSCs übertragen werden (Lindert *et al.*, 2005). Breitkopf *et al.* (2001) zeigte das eine erhöhte TGF β -Konzentration in hHSCs eine gesteigerte Expression des ECM *remodelling* Markers LTBP 2 zur Folge hat. Diese, in der Literatur beschriebenen, profibrotischen Markergene wurden für die Untersuchung einer antifibrotischen Wirkung durch die pharmakologische Stimulation der sGC und für die Aufklärung der Beteiligung des NO-cGMP Signalweges in der Leberfibrogenese herangezogen. Da jedoch verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten mit TGF β für die Aktivierung von HSCs in der Literatur verwendet wurden (Saile *et al.*, 1999; Dooley *et al.*, 2000), musste zunächst ein auf diese profibrotische Markergene ausgelegtes, von der TGF β -Konzentration-

abhängiges Genexpressionsprofil von hHSCs und rHSCs erstellt werden (Abschnitt 3.1.1., Abb. 15). Mit Bezug auf die Ausgangsexpressionswerte (= 0h Wert) der repräsentativ ausgewählten Markergene zeigte sich spezies- und konzentrationsunabhängig nach 48 h ein deutlicher TGF β Stimuluseffekt, der mit den in der Literatur beschriebenen *in vitro* TGF β induzierten Genexpressionen korrelierte (Sohara *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Durch diese Vorversuche gelang es ein mit der Literatur übereinstimmendes *in vitro* Modell für leberfibrotische Veränderungen zu etablieren, so dass eine zelluläre, antifibrotische Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs untersucht werden konnte.

Neben der Möglichkeit antifibrotische Substanzwirkungen an TGF β stimulierten HSCs zu untersuchen, stehen für die *in vivo* Induktion einer Leberfibrose derzeit verschiedene Tiermodelle zur Verfügung (Snowdon und Fallowfield, 2011). Die in der Leberfibroseforschung am häufigsten angewendeten *in vivo* Modelle sind: a) das BDL Modell, b) das Schweineserum Modell und c) toxisch induzierte Tiermodelle (Tsukamoto *et al.*, 1990; Starkel und Leclercq, 2011). Die antifibrotischen *in vivo* Effekte des sGC Stimulators BAY 41-2272 in der Leberfibrose wurden unter der Verwendung des BDL Modells und des immunologisch induzierten Schweineserum Modells untersucht. Beide Tiermodelle unterscheiden sich grundlegend in ihrer Induktion und Progression der Leberschädigung, während die Leberfibrose bzw. – zirrrose ihren gemeinsamen Endpunkt darstellt. Die Pathogenese des durch die BDL induzierten Leberschadens gleicht der sekundären biliären Fibrose im Menschen (Starkel und Leclercq, 2011), bei der es durch einen chronischen Rückstau von Galle zu einer Schädigung der Leberzellen kommt. Das Schweineserum Modell zeichnet sich durch eine immunologisch induzierte, minimale hepatozelluläre Leberschädigung aus (Starkel und Leclercq, 2011), die sich in einer gesteigerten MHC-Klasse-II Genexpression bzw. einer Erhöhung von Immunglobulinen im Blut widerspiegelt (Baba *et al.*, 2005). Ähnliche Pathomechanismen wurden in Patienten mit einer durch Alkohol induzierten Leberfibrose, einer Autoimmun- oder akuten Hepatitis beobachtet (Baba *et al.*, 2005). Beide Tiermodelle werden in der Literatur herangezogen, um *in vivo* eine antifibrotische Substanzwirkung zu untersuchen (Knorr *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Tandon *et al.*, 2010). In der vorliegenden Dissertation wurden zwei in der Leberfibrose anerkannte, unterschiedlich induzierte Tiermodelle verwendet, um die direkte zelluläre, antifibrotische und vor allem induktionsunabhängige *in vivo* Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 aufzuzeigen.

4.1. Die antifibrotische Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 in der Leberfibrose

Eine pharmakologische Modulation des NO-cGMP Signalweges zur Erhöhung des cGMP-Spiegels mittels sGC Stimulatoren, wie z.B. YC-1, BAY 41-2272 oder Riociguat, hat sich bereits präklinisch und klinisch als einer der wichtigsten Therapieansätze für Patienten mit PAH etabliert (Schermlay *et al.*, 2008 und 2011; Mittendorf *et al.*, 2011). Hier zeigte sich, dass pathophysiologische, PAH-bedingte Veränderungen dieses Signaltransduktionsweges durch die spezifische pharmakologische Stimulation der sGC abgemildert werden (Mergia *et al.*, 2006; Boerrigter und Burnett, 2007). Eine mögliche Übertragbarkeit einer erhöhten Vasokonstriktion, sowie einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit resultierend in einer cGMP-Mangelsituation, wie bei der PAH, stellt sich ebenfalls in der Leberfibrose dar (Wiest und Groszmann, 2002; Perri *et al.*, 2006). Diese Literaturbefunde weisen somit nicht nur auf die Übertragbarkeit der Pathomechanismen von anderen fibrotischen Erkrankungen auf die der Leberfibrose hin, sondern auch auf eine möglicherweise organübergreifende, antifibrotische Wirkung von sGC Stimulatoren.

Perri *et al.* brachte 2006 die NO-unabhängige Stimulation der sGC in direkten Zusammenhang mit einer Reduktion der Aktivierung von HSCs. Basierend auf diesen Ergebnissen zeigte Knorr *et al.* (2008) erstmalig eine sGC-vermittelte, induktionsunabhängige, antifibrotische Wirkung in zwei verschiedenen Leberfibrosesetiermodellen (Schweineserum Modell und CCL₄ Modell (= toxisch induzierte Leberfibrose)) durch eine Behandlung mit dem sGC Aktivator BAY 60-2770. Diese Daten waren jedoch deskriptiv und ließen nur sehr bedingt Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu. Auch die von Xie *et al.* (2012) veröffentlichten Ergebnisse der *in vitro* Wirkung des sGC Aktivators BAY 60-2272 auf LSECs klären nicht eindeutig den antifibrotischen Wirkmechanismus einer pharmakologischen Erhöhung der sGC Aktivität in der Leberfibrose. Dadurch, dass sGC Aktivatoren und sGC Stimulatoren andere pharmakologische Charakteristika aufweisen (Schmidt *et al.*, 2009; Stasch und Hobbs, 2009), sollte erstmalig die *in vitro* und die *in vivo* Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 in der Leberfibrose aufgezeigt werden. Daher wurde zunächst mit der Untersuchung der zellulären Wirkung auf die Genexpression von profibrotischen Markern begonnen (Abschnitt 3.1.3., Abb. 18). Es konnte gezeigt werden, dass der sGC Stimulator BAY 41-2272 konzentrationsabhängig und speziesunabhängig zum

einen die Kollagenproduktion und das ECM *remodelling* und zum anderen die Transdifferenzierung der HSCs signifikant um durchschnittlich 75 % senkte (Abschnitt 3.1.3., Abb. 18). Ergänzend zu diesem Befund wurde ein geringerer, konzentrationsabhängiger α -SMA Proteinanteil der TGF β aktivierten Zellen nach Zugabe des sGC Stimulators detektiert (Abschnitt 3.1.8., Abb. 23). Diese Ergebnisse bestätigten die von Kawada *et al.* (1996) erhobenen *in vitro* Daten in rHSCs, die einen direkten Zusammenhang der α -SMA Proteinexpressionssenkung in aktivierten HSCs mit einer NO-abhängigen Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration aufzeigten.

Darüber hinaus konnten Pfeilschifter und Vosbeck (1991) in renalen Mesangialzellen aufzeigen, dass durch die Stimulation mit TGF β der intrazelluläre cGMP-Gehalt gesenkt wird und ein cGMP-Mangelzustand entsteht. Dieses Ergebnis einer TGF β -vermittelten Senkung der intrazellulären cGMP-Konzentration ließ sich in beiden HSCs Spezies reproduzieren (Abschnitt 3.1.7., Abb. 22). Der cGMP-Gehalt in TGF β stimulierten HSCs wurde im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant um 73 % (rHSCs) bzw. 60 % (hHSCs) gesenkt, was sich in etwa auf die von Perri *et al.* (2006) erhobenen Daten bezüglich der reduzierten cGMP-Konzentration von aktivierten, aus Lebern von BDL-Ratten isolierten HSCs übertragen ließ.

Chu und Prasad (1999) konnten des Weiteren anhand von TGF β stimulierten dermalen Fibroblasten demonstrieren, dass die Zugabe von 8-Bromo-cGMP, einem stabilen Analogon des *second messenger* Moleküls cGMP, die *in vitro* HP-Konzentration signifikant senkte und damit eine direkte zelluläre, antifibrotische Wirkung zeigte. In beiden HSCs Spezies konnte diese 8-Bromo-cGMP-vermittelte, expressionssenkende *in vitro* Wirkung auf die profibrotischen Markergene bestätigt werden (Abschnitt 3.1.2.2., Abb. 17). Qualitativ und quantitativ ließen sich die von Chu und Prasad (1999) erhobene Befunde auf die TGF β stimulierten HSCs übertragen. Die durchschnittliche Genexpressionssenkung um ca. 30 % (rHSCs) bzw. um ca. 50 % (hHSCs) stimmte ebenfalls mit der von Horio *et al.* (2003) dargestellten HP-senkenden Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf kardiale Fibroblasten überein.

Dadurch, dass in Aortenendothelzellen (Stasch *et al.*, 2002a) und in glomerulären Mesangialzellen (Peters *et al.*, 2004) gezeigt werden konnte, dass sGC Stimulatoren den zellulären cGMP-Gehalt konzentrationsabhängig erhöhen, lag die Vermutung nahe, dass die sGC-vermittelte, antifibrotische Wirkung von BAY 41-2272 in TGF β stimulierten HSCs (Abschnitt 3.1.3., Abb. 18) auf eine Erhöhung des cGMP-Spiegels zurückzuführen ist. Dies konnte durch die pharmakologische Stimulation der sGC mit BAY 41-2272 in HSCs bestätigt werden. Der reduzierte, zelluläre cGMP-Gehalt in

TGF β stimulierten HSCs konnte durch den sGC Stimulator signifikant und konzentrationsabhängig um 46 % (rHSCs) bzw. um 80 % (hHSCs) erhöht werden (vs. TGF β stimulierte, unbehandelte HSCs; Abschnitt 3.1.7., Abb. 22). Dies zeigte zum einen, dass durch eine spezifische pharmakologische Stimulation der sGC der TGF β -vermittelte, cGMP-reduzierende Effekt konzentrationsabhängig aufgehoben werden konnte. Zum anderen legen die vergleichbaren, expressionssenkenden Wirkungen des sGC Stimulators BAY 41-2272 (Abschnitt 3.1.3., Abb. 18) und des cGMP Analogs 8-Bromo-cGMP (Abschnitt 3.1.2.2., Abb. 17) auf profibrotische Markergene nahe, dass eine pharmakologisch bedingte Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels eine antifibrotische Wirkung auf fibrosierende Zellen hat.

Für den Nachweis, dass die zellulären, cGMP-vermittelten, antifibrotischen Effekte auf die spezifische, pharmakologische Stimulation der sGC mit BAY 41-2272 zurückzuführen sind, wurde ODQ, ein sGC Inhibitor, verwendet (Abschnitt 3.1.4., Abb. 19). ODQ bewirkt eine Oxidation der Hämgruppe der sGC, so dass sGC Stimulatoren keine Enzymaktivierung mit einhergehender, intrazellulärer cGMP-Erhöhung induzieren können (Moro *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 1997). Stasch *et al.* (2001) zeigte bereits, dass eine ODQ-Konzentration von 10 μ M eine durch BAY 41-2272 ausgelöste sGC Stimulation vollständig inhibiert. Durch die Verwendung von ODQ konnte die direkte zelluläre, antifibrotische Wirkung von BAY 41-2272 in beiden HSCs Spezies ebenfalls vollständig aufgehoben werden. Unter der Berücksichtigung der proliferationsreduzierenden Eigenschaften von TGF β (Date *et al.*, 2000; Dolley *et al.*, 2000) und von BAY 41-2272 (Hohenstein *et al.*, 2005; Joshi *et al.*, 2011) konnte des Weiteren die Möglichkeit einer zytotoxischen Wirkung von BAY 41-2272 in der verwendeten, antifibrotisch wirkenden Konzentration von 10 μ M anhand von Vitalitätsbilder von TGF β stimulierten und BAY 41-2272 behandelten HSCs ausgeschlossen werden (Anhang 1; S. 122).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die erhobenen *in vitro* Daten auf die spezifische, pharmakologische Stimulation der sGC zurückzuführen sind und BAY 41-2272 durch die Steigerung der sGC Aktivität eine cGMP-vermittelte, antifibrotische Wirkung auf TGF β aktivierte HSCs hat.

Zur Aufklärung der weiteren Signaltransduktion der cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 wurden erste präliminäre Daten einer möglichen Beteiligung der PKG erhoben. In verschiedenen Studien der Organfibrogenese führte eine Zunahme der intrazellulären cGMP-Konzentration nach-

weislich u.a. zu der Aktivierung der Proteinkinase G I (= PKG I) (Hewitson *et al.*, 2002; Dunkern *et al.*, 2007). Diese cGMP-vermittelte Aktivierung führte zu einer Reduktion von Kollagen (Chen *et al.*, 2010). Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung der PKG an der cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung des sGC Stimulators in der Leberfibrose, wurde ein spezifischer PKG Inhibitor KT 5823 verwendet und an TGF β stimulierten und mit BAY 41-2272 behandelten HSCs getestet (Abschnitt 3.1.6., Abb. 21). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die zelluläre, cGMP-vermittelte, antifibrotische Wirkung von BAY 41-2272 je nach HSCs Spezies PKG-abhängig aber auch –unabhängig war. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Befunden von Chen *et al.* (2010). Er konnte eindeutig durch die Verwendung des PKG Inhibitors KT 5823 zeigen, dass die antifibrotische, cGMP-vermittelte Wirkung von Vasonatin, einem natriuretischen Peptid, in einem toxisch induzierten Leberfibrosenratte Modell ausschließlich PKG-vermittelt war. Die Überprüfung dieser von ihm beschriebenen PKG-vermittelten Senkung des HP-Gehaltes und die weitere Aufklärung der cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung von BAY 41-2272 erfolgte *in vitro* durch die Zugabe von 8-Bromo-cGMP in Kombination mit KT 5823 (Anhang 2, S.123). Tatsächlich wurde die genexpressionssenkende Wirkung von 8-Bromo-cGMP vollständig durch die Kombination mit dem PKG Inhibitor KT 5823 in beiden HSCs Spezies aufgehoben. Dies bedeutete zum einen, dass die antifibrotische Wirkung von 8-Bromo-cGMP in TGF β stimulierten HSCs PKG-abhängig war. Zum anderen zeigten diese *in vitro* Experimente aber auch, dass im Gegensatz zu 8-Bromo-cGMP die pharmakologische, spezifische Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 in TGF β aktivierten HSCs nicht ausschließlich PKG-vermittelt ist. Alternative cGMP-vermittelte Aktivierungen weiterer PKG-unabhängiger Signalkaskaden werden in diesem Zusammenhang in der Literatur diskutiert. Pilz und Casteel beschrieben 2003, dass sehr hohe cGMP-Konzentrationen cAMP-abhängige Proteinkinasen (= PKA) aktivieren können. Dies kann u.a. durch die cGMP-abhängige Hemmung von cAMP-abbauenden PDEs erklärt werden, die zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führt (Maurice und Haslam, 1990; Kirstein *et al.*, 1994; Sandner *et al.*, 1999). Die Aktivierung eines weiteren Signalweges im Rahmen der Fibrosierung konnte Zenzmaier *et al.* (2010) zeigen. Er bewies, dass die Transdifferenzierung von Prostatastromazellen (= Fibroblasten) zu Myofibroblasten cGMP-vermittelt und PKG-unabhängig über die Aktivierung von MEK1 bzw. dem MAP-Kinase-Signalweg inhibiert werden kann. Folglich gibt es mehrere Signalwege die durch eine Erhöhung der intrazelluläre cGMP-Konzentration zusätzlich zu dem PKG-

vermittelten Signalweg aktiviert werden können (Pilz und Casteel, 2003; Zhou *et al.*, 2008; Zenzmaier *et al.*, 2010). Diese scheinbar speziesabhängige, nicht ausschließlich PKG-vermittelte, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs sollte daher hinsichtlich der Beteiligung anderer Signalkaskaden detaillierter untersucht und überprüft werden.

Da die Entstehung einer Leberfibrose/-zirrhose unterschiedliche Ursachen haben kann, ist es wichtig eine von der Ätiologie unabhängige, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 *in vivo* aufzuzeigen. Dies ist eine Voraussetzung für die Etablierung einer effizienten, antifibrotischen Therapie für die Leberfibrose und bedingt die Untersuchung der *in vivo* Wirkung von BAY 41-2272 in zwei verschiedenen Leberfibroses Tiermodellen. Zur Darstellung der cGMP-vermittelten, antifibrotischen *in vivo* Wirkung von BAY 41-2272 wurden verschiedene diagnostische Parameter erhoben, um das Stadium der Leberfibrose und eine mögliche Abmilderung der Pathogenese unter der Therapie mit dem sGC Stimulator bewerten zu können.

Als „Goldstandard“ in der Klinik gilt immer noch die Leberbiopsie, die für eine histologische Beurteilung des Fibrosestadiums unabdinglich ist. Histopathologische, für das jeweilige Tiermodell charakteristische Veränderungen der Leber werden in der Literatur beschrieben und eine Abmilderung dieser durch eine Substanzbehandlung als Nachweis einer antifibrotischen *in vivo* Wirkung diskutiert. Kountouras *et al.* (1984) und Hinz *et al.* (1997) beschrieben die histologischen Lebergewebeänderungen bei BDL-Tieren, die durch eine starke Proliferation der Gallengangsepithelien, einer Zunahme an fibrillärem Kollagen im Bereich der Periportalfelder und einer massiven entzündlichen Reaktion im geschädigten Leberparenchym charakterisiert sind. Bei dem immunologisch induzierten Tiermodell (= Schweineserum Modell) zeigt sich im histologischen Leberschädigungsbild hingegen keine starke entzündliche Reaktion (Baba *et al.*, 2005). Der Hauptanteil an pathologischen Veränderungen wird durch die Zunahme an Kollagenfasern im Bereich der septalen Bindegewebeeingrenzungen bestimmt (Nakano, 1986; Gotardo *et al.*, 2003). Diese in der Literatur beschriebenen, histopathologischen Veränderungen während der Leberfibrogenese, konnten in beiden *in vivo* Modellen reproduziert und histologisch dargestellt werden (Abschnitt 3.2.2.).

Durch die Behandlung mit dem sGC Aktivator BAY 60-2770 konnte bereits 2008 durch Knorr *et al.* eine dosisabhängige Senkung des morphometrisch quantifizierten Kollagenanteils im Lebergewebe sowohl im Schweineserum Modell als auch im CCL₄

Modell nachgewiesen werden. Xie *et al.* (2012) bestätigte diese antifibrotische Wirkung des sGC Aktivators BAY 60-2770 anhand eines anderen toxisch induzierten Rattenleberfibrosemodells. Vergleichbare Ergebnisse durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 wurden sowohl im BDL Modell als auch im Schweineserum Modell erzielt. Durch eine morphometrische Quantifizierung des Kollagen- (Abschnitt 3.2.2.1., Abb. 25) und des Myofibroblastenanteils (Abschnitt 3.2.2.2., Abb. 27) im Lebergewebe der Tiere, konnte ein direkter zellulärer, antifibrotischer *in vivo* Effekt des sGC Stimulators aufgezeigt werden. Somit erfolgte durch die Behandlung von leberfibrotischen Tieren mit BAY 41-2272 eine signifikante und induktionsunabhängige Senkung des Kollagenanteils im Lebergewebe einhergehend mit einer reduzierten Transdifferenzierung der HSCs zu Myofibroblasten (Abschnitt 3.2.2.).

Die Zunahme an Kollagenfasern im Leberparenchym während der Leberfibrogenese lässt sich ebenfalls anhand des Rattenlebergewichtes aufzeigen (Kountouras *et al.*, 1984). In beiden Tiermodellen konnte bestätigend ein signifikanter Anstieg des Lebergewichtes gemessen werden, der im BDL Modell aufgrund der aufgestauten Gallensäuren (Tsukamoto *et al.*, 1990) und der gesteigerten Proliferation der Gallengangsepithelien (Starkel und Leclercq, 2011) fast doppelt so hoch war (Schweineserum Modell: 10,3 g, BDL Modell: 20,6 g; Abschnitt 3.2.1.1., Tabelle 2; S. 67).

Die Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 erzielte in beiden Tiermodellen keine Senkung der finalen Lebergewichte. Eine unter der Behandlung mit einer antifibrotischen Therapie verringerte Lebergewichtszunahme wird in diesen Leberfibros tiermodellen allerdings nur selten aufgezeigt. Abraldes *et al.* (2007) konnte keine Veränderungen der Lebergewichte von CCL₄-Ratten durch die Behandlung von Simvastatin erzielen, obwohl Statine in der Therapie von Leberfibrosepatienten eingesetzt werden. Eine mögliche Erklärung für diesen fehlenden Effekt könnte der chirurgisch induzierte Gallensäurestau sein, der das Lebergewicht im BDL Modell mechanisch beeinflusst und somit eine Lebergewichtssenkung durch die pharmakologische Behandlung mit BAY 41-2272 verhindert. Im Falle des Schweineserum Modells ist bisher nicht ausreichend bekannt, welche Komponenten an der Lebergewichtszunahme beteiligt sind. Inwiefern die Infiltration und Proliferation von Zellen (Starkel und Leclercq, 2011) bezogen auf das Lebergewicht eine Rolle spielen, müsste in weiteren Versuchen hinsichtlich einer anderen Fragestellung näher untersucht werden.

Ein weiterer Standardparameter zur Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes, der sowohl in *in vitro* Versuchen als auch in *in vivo* Studien herangezogen wird, ist die im Kollagen vorkommende α -Aminosäure HP (McAnulty, 2005). Knorr *et al.* (2008) zeigte, dass die Behandlung mit dem sGC Aktivator BAY 60-2770 zu einem reduzierten HP-Gehalt im Lebergewebe führte. Durch die Behandlung der BDL-Tiere mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 konnte der Gesamtgehalt an HP im Gewebe signifikant gesenkt werden. Dies entsprach in etwa der induktionsunabhängigen, antifibrotischen Wirkung des sGC Aktivators im Schweineserum- und im CCL₄ Modell (Knorr *et al.*, 2008). Interessanterweise ließ sich eine Senkung des HP-Gehaltes durch die Behandlung mit BAY 41-2272 für das Schweineserum Modell nicht bestätigen. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Tiermodellen könnte eventuell durch die erhöhte Aktivität der iNOS im BDL Modell erklärt werden. Aufgrund der entzündlichen Reaktionen im Lebergewebe der BDL-Tiere steigt die Expression der iNOS an (Gadano *et al.*, 1999; del Mar Arriero *et al.*, 2001), die von Wei *et al.* (2002 und 2005) auf den induzierten Gallensäurestau zurückgeführt wurde. Da sGC Stimulatoren im Gegensatz zu den sGC Aktivatoren einen synergistischen Effekt mit bereits geringen NO-Konzentrationen zeigen (Evgenov *et al.*, 2006; Stasch und Hobbs, 2009), könnte dies die ausschließlich im BDL Modell auftretende HP-senkende Wirkung durch BAY 41-2272 erklären. Obwohl die cGMP-vermittelte, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators bei den meisten bestimmten Parameter induktionsunabhängig war, ergab sich bei der Bestimmung des HP-Gehaltes ein modellspezifischer Unterschied. Wie sich dieser Effekt innerhalb einer klinischen Studie mit leberfibrotischen Patienten darstellt, ließ sich nicht ausreichend verifizieren.

Zur weiteren Darstellung der *in vivo* induzierten Lebergewebeschädigung wurden verschiedene nicht-invasive Plasmaparameter bestimmt (Abschnitt 3.2.1.2., Tabelle 3; S. 69), die auch in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden.

In beiden *in vivo* Modellen waren die AST und die ALP, sowie Funktionsleistungsparameter der Leber, wie z.B. die Plasmakonzentration von Albumin und Bilirubin, signifikant erhöht. Ähnlich dem Krankheitsbild von leberfibrotischen Patienten (Guha und Rosenberg, 2008; Udell *et al.*, 2012) geht die Erhöhung dieser Parameter mit einer Gewebeschädigung und dem Funktionsverlust der Leber einher. Im BDL Modell war die Schädigung des Organs stärker ausgeprägt als im Schweineserum Modell, so dass eine Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 im BDL Modell keinen Einfluss auf diese Leberparameter zeigte. Allerdings ist eine therapeutische Senkung der Plasmaparameter in diesem Tiermodell durch eine kontinuierliche Ein-

wirkung einer lebertoxischen Noxe (= Gallensäuren) schwierig. Dies wurde bereits in verschiedenen BDL-Tierstudien gezeigt (Croquet *et al.*, 2002; Trebicka *et al.*, 2010). Nur im Schweineserum Modell konnte durch die Behandlung mit dem sGC Stimulator der ALP-Wert gesenkt werden. Unter der Berücksichtigung dieser Ergebnisse muss die Übertragbarkeit der anerkannten *in vivo* Leberfibrosemodelle auf die Patientensituation geprüft werden (Iredale, 2007; Starkel und Leclercq, 2011). Die erhobenen Daten zeigen deutlich die Diskrepanz zwischen histologisch und serologisch aufgezeigten antifibrotischen Wirkungen und stellen den Ersatz der diagnostischen Leberbiopsie durch nicht-invasive, weniger Risiko behaftete Verfahren in Frage. Eine Senkung der Plasmaparameter bei einem leberfibrotischen Patienten kann erst im Verlauf einer Langzeittherapie mit einsetzender Leberregeneration erwartet werden (Chen *et al.*, 2005; Muntaner *et al.*, 2010). Diese benötigte Behandlungsdauer lässt sich durch die zeitliche Limitation der Versuchsdauer in den *in vivo* Modellen nicht vollständig darstellen, was die translationale Bedeutung dieser Experimente für die Situation im Patienten einschränkt (s.a. Abschnitt 4.3.).

Ein möglicher weiterer Ansatzpunkt für einen Rückschluss von der *in vivo* Wirkung des sGC Stimulators auf die Pathogenese und Signaltransduktion der Leberfibrose im Menschen ist die Analyse der mRNA Genexpressionen von profibrotischen Markern im Lebergewebe (Gressner *et al.*, 2007; Roderfeld *et al.*, 2007). Herbst *et al.* (1997) stellte fest, dass die Genexpressionsmuster in Tierorganen, wie z.B. von TGF β und von MMP 2, mit Patientenleberproben vergleichbar sind. Zudem ist es bekannt, dass in fibrotischen Erkrankungen der Gewebeanteil an fibrillärem Kollagen (= Typ I und III) und der Anteil an α -SMA positiven Myofibroblasten zunimmt. Dies lässt sich auf die Pathogenese der Leberfibrose übertragen (Georgiev *et al.*, 2008; Snowden und Fallowfield, 2011) und durch die bereits diskutierten *in vitro* Ergebnisse bestätigen. Nicht nur histologisch, sondern auch durch die Analyse der Genexpressionen von Col1 α 1 und α -SMA konnte *in vivo* der cGMP-vermittelte, antifibrotische Effekt der spezifischen, pharmakologischen Stimulation der sGC bestätigt werden (Abschnitt 3.2.4., Abb. 29.1. und 29.2.). In der Literatur werden vorrangig diese beiden Genexpressionen herangezogen, um eine antifibrotische *in vivo* Wirkung zu bestätigen. Salazar-Montes *et al.* (2008) bewies anhand der reduzierten Col1 α 1 Genexpression in CCL₄-Ratten die antifibrotische Wirkung von Pirfenidone, einer Substanz, die sich derzeit für die Behandlung der idiopathischen Lungenfibrose in der klinischen Forschung befindet (Azuma, 2012; Hilberg *et al.*, 2012). Kanter konnte

2010 anhand der reduzierten α -SMA Genexpression eine Fibrose abmildernde Wirkung von Quercetin, einem Flavonoid, bei BDL-Tieren aufweisen.

Des Weiteren gewinnt die Untersuchung der Beteiligung von MMPs und ihren natürlich vorkommenden Inhibitoren (= TIMPs), in der Progression verschiedenster Erkrankungen (Lagente *et al.*, 2005; Amălinei *et al.*, 2010) bis hin zur Leberfibrose (Arthur, 2000; Roderfeld *et al.*, 2007) zunehmend an Bedeutung. Im Rahmen einer Gewebefibrosierung kommt es zu einer Dysregulation zwischen Matrixauf- und abbau bzw. zu einem ECM *remodelling* (Knittel *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2004), an dem MMPs und TIMPs maßgeblich beteiligt sind (Chakraborti *et al.*, 2003). Hierbei ist die Expression von Matrix-abbauenden Kollagenasen (= MMP 1 und MMP 13) reduziert, während die Aktivität z.B. der Gelatinase A (= MMP 2) erhöht ist (Kossakowska *et al.*, 1998). Dies hat einen gesteigerten Abbau von nicht-fibrillärem Kollagen (= Typ II und Typ IV) und einem gesenkten Abbau von fibrillärem Kollagen (= Typ I und Typ III) zur Folge (Benett *et al.*, 2003). Préaux *et al.* (1999) konnte im Rahmen der Fibrosierung des Lebergewebes des Menschen nachweisen, dass die erhöhte MMP 2 Aktivität durch die Interaktion mit Kollagen und anderen Zellmatrixproteinen hervorgerufen wird und ein Hauptbestandteil des strukturellen Umbaus der ECM ist. Eine gesteigerte mRNA Genexpression von MMP 2 konnte ebenfalls im Lebergewebe beider Tiermodelle dargestellt (Abschnitt 3.2.4., Abb. 29.2.) und durch die Behandlung mit BAY 41-2272 signifikant gesenkt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielte Bennett *et al.* (2003), der die antifibrotische Wirkung des Hormons Relaxin auf aktivierte HSCs durch eine Genexpressionssenkung von Col1 α 1, α -SMA und MMP 2 nachwies. Der cGMP-vermittelte, antifibrotische *in vivo* Effekt des sGC Stimulators auf die MMP 2 Genexpressionssenkung konnte anhand der Befunde von Gurjar *et al.* (1999) bestätigt werden. Er setzte eine Erhöhung der intrazellulären NO- bzw. cGMP-Konzentration in Gefäßmuskelzellen mit einer daraus resultierenden Reduktion der MMP 2 Aktivität gleich. Da der sGC Stimulator BAY 41-2272 in TGF β stimulierten HSCs den cGMP-Gehalt konzentrationsabhängig erhöhte (Abschnitt 3.1.7., Abb. 22), konnte daher die *in vivo* Expressionssenkung der verschiedenen profibrotischen Markergene auf die Erhöhung des cGMP-Spiegels zurückgeführt werden.

Anhand von neonatalen Kardiomyozyten zeigte Hammoud *et al.* (2007) den direkten Zusammenhang zwischen fibrosierenden Zellen, die sich in einem NO-Mangelzustand befinden und der dadurch resultierenden Stimulation der TIMP 3 Genexpression. In beiden Tiermodellen konnte diese, in der Literatur beschriebene, gesteigerte TIMP 3 Genexpression aufgezeigt werden (Abschnitt 3.2.4., Abb. 29.2.), die unter

der Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 dosisabhängig und signifikant gesenkt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Arbeit von Geschka *et al.* (2011), die anhand der TIMP 1 Genexpression in fibrotischem Nierengewebe von Ratten gezeigt hat, dass der sGC Stimulator Riociguat (BAY 63-2521) einen dosisabhängigen, antifibrotischen Effekt auf das ECM *remodelling* der Niere hat.

Des Weiteren wurde in verschiedenen Publikationen die für die Pathologie der Leberfibrose charakteristische Genexpressionserhöhung von TGF β nachgewiesen und in direkten Zusammenhang mit der Entstehung und Progression dieser Erkrankung gebracht werden (Dooley *et al.*, 2000; Meindl-Beinker und Dooley, 2008). Die immunologisch und die durch eine BDL induzierte Leberfibrose waren durch eine erhöhte TGF β Genexpression gezeichnet, die durch eine Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 signifikant gesenkt werden konnte. Folglich vermindert eine cGMP-vermittelte, pharmakologische Stimulation der sGC durch BAY 41-2272 nicht nur die Progression der Leberfibrose, sondern beeinflusst bereits die Entstehung der Erkrankung durch eine Genexpressionssenkung des Fibroestimulus TGF β im Lebergewebe. Die Idee der Entwicklung einer antifibrotischen Therapie, die direkt auf den Stimulus TGF β und dessen Signaltransduktionsweg wirkt, ist derzeit noch Bestandteil intensiver Forschungen (Liu *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2012).

Ein wichtiges Ziel einer geeigneten antifibrotischen Therapie ist es, die Entstehung und Progression der Organfibrogenese so zu beeinflussen, dass Folgeerkrankungen, wie die PTH, abgemildert werden oder nicht entstehen. Nachdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte, dass der sGC Stimulator BAY 41-2272 eine cGMP-vermittelte, induktionsunabhängige, antifibrotische Wirkung in der Leberfibrose hatte, wurde ergänzend zu den bisherigen *in vivo* Befunden der PVD der unbehandelten und behandelten Tiere gemessen (Abschnitt 3.2.5., Abb. 30). In beiden *in vivo* Modellen konnte eine Senkung des PVDs zwischen 10 % und 20 % erzielt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Yang *et al.* (2002) nach einer Behandlung mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan in BDL-Ratten erzielt. Moal *et al.* (2006) konnte den Pfortaderdruck in BDL-Ratten durch die Gabe des leberspezifischen NO-Donors V-PYRRO/NO um ca. 25 % senken. Dadurch, dass beide Substanzklassen aufgrund ihrer PVD-senkenden Wirkung bereits in der klinischen Behandlung von leberfibrotischen Patienten eingesetzt wurden und die *in vivo* Wirkung des sGC Stimulators auf den PVD in etwa vergleichbar ist, bieten diese Daten eine

Grundlage für eine weiterführende Diskussion über die therapeutische Anwendung von sGC Stimulatoren in der Leberfibrose.

Der derzeitige Einsatz der sGC Stimulatoren bei der Therapie von hypertensiven Erkrankungen zeigt allerdings die vasodilatativen Eigenschaften dieser Substanzklasse (Mittendorf *et al.*, 2009; Schermuly *et al.*, 2011; Stasch *et al.*, 2011). Da aber bei der Leberfibrose keine systemische Hypertension, sondern eine lokale Erhöhung des PVDs vorliegt, sollte die antifibrotische Dosierung von BAY 41-2272 zur Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen in einem nicht blutdrucksenkenden Rahmen liegen. Dies ist für eine therapeutische Anwendung bei leberfibrotischen Patienten wichtig, um das mögliche Risiko einer systemischen Hypotension während einer Behandlungsperiode zu minimieren. Durch die Erhebung der notwendigen hämodynamischen Parameter konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der sGC in der verwendeten Dosierung keinen signifikanten Einfluss auf die systemische Herz-Kreislaufsituation hatte (Abschnitt 3.2.5., Tabelle 4; S. 81). Des Weiteren konnte keine Korrelation (Anhang 3; S. 124) zwischen dem LVP_{sys} und dem PVD nachgewiesen werden, so dass der PVD-senkende Effekt des sGC Stimulators als blutdruckunabhängig zu erachten ist. Da die Hauptursachen der hohen Sterberate von leberfibrotischen Patienten, die durch eine PTH entstandenen Varizenblutungen sind (Ready und Rector, 1989; de Goede *et al.*, 2012), spricht der PVD-senkende und blutdruckunabhängige Effekt des sGC Stimulators BAY 41-2272 für eine optimale, antifibrotische Therapie der Leberfibrose.

4.2. Vergleich der cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung der pharmakologischen sGC Stimulation mit bereits klinisch angewendeten Substanzen

Die Beteiligung des NO-cGMP Signalweges bei der Entstehung und Progression von fibrotischen Veränderungen von inneren Organen (Wang-Rosenke *et al.*, 2008; Stasch und Hobbs, 2009), wie auch bei der Leberfibrose (Gupta *et al.*, 1998; Perri *et al.*, 2006), ist schon seit Jahren bekannt und Ziel intensiver Forschungen. Diese Erkenntnisse über die pathomechanistischen Veränderungen des NO-cGMP Signaltransduktionsweges in der Leberfibrose führten dazu, dass NO-Donoren und organische Nitrate als möglichen therapeutischen Ansatz bei der Erkrankung Leberfibrose verwendet wurden (Merkel *et al.*, 2000; Bellis *et al.*, 2003). Die Hauptnebenwirkung der Toleranzentwicklung bei einer Langzeittherapie mit organischen Nitrat-

verbindungen (Sage *et al.*, 2000; Chirkov und Horowitz, 2007; Mayer und Beretta, 2008), limitierte jedoch den therapeutischen Einsatz und Erfolg. Auch die Versuche die Nebenwirkungen einer systemische Gabe von NO-Donoren durch eine chemische Kopplung von leberspezifischen Gallensäuren an NO zu unterbinden, brachte nur kurzzeitig einen therapeutischen Erfolg (Berzigotti *et al.*, 2010).

Um jedoch die zelluläre und druckunabhängige, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators bewerten zu können, wurde diese mit der *in vitro* Wirkung des NO-Donors DETA NONOate auf TGF β stimulierte HSCs verglichen. Durch die Zugabe von DETA NONOate konnte eine durchschnittliche Genexpressionssenkung der profibrotischen Marker zwischen 35 % und 48 % je nach HSCs Spezies gemessen werden (Abschnitt 3.1.2.1., Abb. 16). Diese mRNA Genexpressionssenkung stimmte in etwa mit den Untersuchungen in kardialen Fibroblasten von Kim *et al.* (1999) überein, der durch die Zugabe von DETA NONOate eine 14 %ige bis 21 %ige Senkung der Genexpressionen von ECM *remodelling* Markern (Col1 α 1, Fibronectin) erzielte. Anhand eines Vergleiches der genexpressionssenkenden Wirkung zwischen DETA NONOate (Abschnitt 3.1.2.1., Abb. 16) und dem sGC Stimulator BAY 41-2272 (Abschnitt 3.1.3., Abb. 18), lässt sich deutlich erkennen, dass die cGMP-vermittelte, druckunabhängige, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators auf TGF β stimulierte HSCs eindeutig stärker ausgeprägt ist. Dies legt den Rückschluss nahe, dass eine Behandlung mit dem sGC Stimulator womöglich eine höhere Wirksamkeit bei der Leberfibrose zeigt. Folglich könnte eine Therapie mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 die Limitationen der Nitrattherapie überwinden und eine effiziente Behandlung für die Leberfibrose darstellen.

In klinischen Studien wurde allerdings nicht nur die antifibrotische Wirkung von NO-Donoren zur Behandlung der Leberfibrose untersucht, sondern auch die von spezifischen PDE 5 Inhibitoren. Die PDE 5 Inhibitoren erhöhen, wie auch Nitratverbindungen, den intrazellulären cGMP-Gehalt durch Hemmung der cGMP-abbauenden PDE 5. Präklinische Forschungsergebnisse zeigten eine Beteiligung der PDE 5 bzw. des NO-cGMP Signalweges in der Leberfibrose. Loureiro-Silva *et al.* (2006) und Choi *et al.* (2009) wiesen in zirrhotischen Lebergewebe von Ratten eine erhöhte PDE 5 Aktivität nach. Demnach führte nicht nur die reduzierte cGMP-Bildung, induziert durch eine NO-Mangelsituation bzw. durch eine herabgesetzte eNOS Aktivität (Rockey *et al.*, 1998; Anegawa *et al.*, 2008; Theodorakis *et al.*, 2009) zu einer Leberfibrose, sondern auch der gesteigerte cGMP-Abbau durch die PDE 5. Beide Mechanismen führen zu der bereits diskutierten cGMP-Mangelsituation im fibrotischen

Lebergewebe (Perri *et al.*, 2006; Gracia-Sancho *et al.*, 2008; Abschnitt 3.1.7., Abb. 22). Anhand dieser Forschungsergebnisse wurden neben NO-Donoren, spezifische PDE 5 Inhibitoren als mögliche klinische Therapie bei Leberfibrosepatienten untersucht. Ziel der Therapie mit PDE 5 Inhibitoren ist es den endogenen cGMP-Spiegel durch eine Hemmung des Abbaus anzuheben (Deibert *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Um einen weiteren Vergleich zwischen bereits klinisch angewendeten Substanzen und dem sGC Stimulator BAY 41-2272 ziehen zu können, wurde die Wirkung des spezifischen PDE 5 Inhibitors Vardenafil auf TGF β stimulierte HSCs untersucht (Abschnitt 3.1.5., Abb. 20). Vardenafil zeigte nur in hHSCs eine leichte genexpressionsenkende Wirkung der profibrotischen Marker. Dieser Effekt stand jedoch in keiner Relation zu der deutlich stärkeren cGMP-vermittelten, druckunabhängigen, antifibrotischen Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272. Auch die Kombination von sGC Stimulator und Vardenafil wies nur eine geringfügig additive, antifibrotische Wirkung auf. Diese *in vitro* Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen von klinischen Studien mit leberfibrotischen Patienten. Hier konnte gezeigt werden, dass Vardenafil oder auch Sildenafil die Progression der Leberfibrose zwar abmildern (Deibert *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008), aber nur eine geringfügige bis keine Wirkung auf den PVD bzw. der daraus resultierenden abdominalen Varizenblutungen haben (Clemmesen *et al.*, 2008; Tandon *et al.*, 2010).

Zusammenfassend lässt sich aufzeigen, dass durch diese Dissertationsarbeit erstmalig sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf die Leberfibrogenese dargestellt werden konnte. Anhand der erhobenen *in vitro* Befunde mit TGF β stimulierten HSCs konnte nicht nur ein direkter zellulärer, cGMP-vermittelter, antifibrotischer Effekt der Substanz, sondern auch die Beteiligung des NO-cGMP Signaltransduktionsweges in der Entstehung der Leberfibrose aufgezeigt werden. Erste *in vitro* Daten weisen auf einen cGMP-vermittelten, PKG-abhängigen, antifibrotischen Wirkmechanismus von BAY 41-2272 in der Leberfibrose des Menschen hin. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der sGC Stimulator BAY 41-2272 in zwei verschiedenen Rattenmodellen nicht nur einen direkten zellulären, antifibrotischen Effekt hatte, sondern dieser auch blutdruck- und induktionsunabhängig war. Erstmals wurde auch die klinisch bedeutsame, PVD-senkende Wirkung der pharmakologischen Stimulation der sGC nachgewiesen. Die präklinisch gezeigten, deutlich stärkeren, antifibrotischen Effekte des sGC Stimulators BAY 41-2272 im Vergleich zu NO-Donoren und PDE 5 Inhibitoren, legen in der klinischen Situation eine mögliche höhere Wirksamkeit in der Behandlung der Leberfibrose

nahe. Somit ist eine Therapie mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 möglicherweise sowohl der Nitrattherapie als auch der Therapie mit spezifischen PDE 5 Inhibitoren in der Leberfibrose überlegen. Durch die Erhebung von *in vitro* Experimenten mit hHSCs und der übertragbaren antifibrotischen *in vivo* Wirkung, sollte daher eine mögliche Behandlung von leberfibrotischen Patienten mit dem sGC Stimulator überdacht und in der Zukunft entsprechend diskutiert werden.

4.3. Limitationen der *in vitro* und *in vivo* Modelle für die Untersuchung der Erkrankung Leberfibrose

4.3.1. Limitationen der *in vitro* Untersuchungen an HSCs

Im Jahre 2005 zeigte Sancho-Bru *et al.* bereits, dass eine Limitation der Zellkulturversuche mit HSCs besteht, da isolierte Fibroblasten von leberfibrotischen Patienten z.T. ein anderes Genexpressionsprofil als isolierte HSCs von *in vivo* Modellen zeigten. Dies könnte z.B. auch den unterschiedlichen Signaltransduktionsweg der scheinbar spezieabhängigen, cGMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 auf TGF β stimulierte HSCs erklären (Abschnitt 3.1.6.). Des Weiteren stellte Sancho-Bru *et al.* (2005) fest, dass keine 100 %ige Übertragbarkeit zur Leberfibrogenese im Menschen zu gewährleisten ist. Im gleichen Jahr wurde von Xu *et al.* diskutiert, dass isolierte HSCs oft durch andere Leberzellen verunreinigt sind und dadurch Forschungsergebnisse stark zwischen den einzelnen Aufarbeitungen schwanken können. Ebenfalls erwähnte er noch einmal explizit die Problematik der Selbstaktivierung der HSCs in Kultur. Diese Selbstaktivierung limitiert die Verwendung aller durchgeführten *in vitro* Experimente für eine graphische Darstellung und bedingt strikte Ausschlusskriterien für Versuche mit vollständig voraktivierten HSCs. Dies hatte zur Folge, dass teilweise eine hohe Anzahl an *in vitro* Experimenten durchgeführt werden musste und die aufgezeigte cGMP-vermittelte, Wirkung des sGC Stimulators zwischen den einzelnen durchgeführten Experimenten leicht schwankte. De Minicis *et al.* (2007) diskutierte zudem, dass die Kultivierung und Untersuchung von isolierten HSCs niemals die pathophysiologische Situation in einem Zellverband widerspiegeln kann. Eine weitere Einschränkung ist die geringe Verfügbarkeit von Zellen verschiedener Spender, so dass eine Aussage über die Prädiktivität dieses *in vitro* Modells nur eingeschränkt getroffen werden kann. Demnach ist grundsätzlich eine Limitation bei der Frage nach der Übertragbarkeit von *in*

in vitro Befunden auf die humane Patientensituation gegeben und die Durchführungen von *in vivo* Studien unabdingbar. Derzeitig steht jedoch kein anderes *in vitro* Verfahren für die Untersuchung einer antifibrotischen Substanzwirkung in der Leberfibrose zur Verfügung, so dass Forschungsergebnisse unter der Berücksichtigung der beschriebenen Limitationen begutachtet werden sollten.

4.3.2. Einschränkungen der Tiermodelle für die Erkrankung Leberfibrose

Durch die Anwendung von verschiedenen, bereits gut charakterisierten und mit der humanen Patientensituation verglichenen Tiermodellen ist es möglich erste Anhaltspunkte über eine antifibrotische Wirkung einer Substanz gewinnen zu können. Dies lässt auch erste Hinweise über klinische Therapieerfolge bei der Erkrankung Leberfibrose zu. Alle derzeitigen zur Therapie von leberfibrotischen Patienten verwendeten Substanzen, wie z.B. nicht-selektive β -Blocker (Muntaner *et al.*, 2010; Sersté *et al.*, 2010), Hemmer des Angiotensin konvertierenden Enzyms (= ACE-Hemmer; Töx und Steffen, 2006; Yoshiji *et al.*, 2007) und Statine (Abralde *et al.*, 2009; Stojakovic *et al.*, 2010) zeigten in den verschiedenen *in vivo* Modellen eine antifibrotische Wirkung und Verbesserung der Leberpathogenese. Dennoch stellt die Prädiktivität der Tiermodelle für den Bereich der Leberfibrose weiterhin ein Problem dar. Nicht nur anatomische Unterschiede, wie z.B. das Fehlen der Gallenblase bei Ratten, sondern auch speziesabhängige Substanzwirkungen erschweren z.T. die Evaluierung von neuen antifibrotischen Therapien. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss daher berücksichtigt werden, dass die *in vivo* Leberfibrosemodelle, auch aufgrund der unterschiedlichen Ätiologien, nur erste Hinweise auf neue wirkungsvolle Therapieansätze liefern können, diese aber in klinischen Studien überprüft und bestätigt werden müssen.

5. Zusammenfassung

Leberfibrose, die gemeinsame Endstrecke aller chronischen Lebererkrankungen, ist weltweit ein großes Problem der öffentlichen Gesundheit. Der schwere Krankheitsverlauf und die Tatsache, dass es bis heute keine effiziente Therapie für eine erfolgreiche Behandlung gibt, spiegelt die dringende Notwendigkeit der weiteren Erforschung dieser Erkrankung für die Entwicklung von neuen antifibrotischen Therapien wieder. Da es erste Hinweise für eine antifibrotische Wirkung durch eine pharmakologische Modulation des NO-cGMP-Signalweges gibt, war das Ziel die therapeutische Relevanz einer spezifischen Intervention mit dem cGMP-erhöhenden sGC Stimulator BAY 41-2272 in der Leberfibrose zu überprüfen. Des Weiteren sollten die Beteiligung von NO und cGMP an den molekularen Pathomechanismen der Leberfibrose weiterführend untersucht werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden TGF β -aktivierte, leberspezifische Fibroblasten vom Menschen und von Ratten (= *hepatic stellate cells*) und zwei verschiedene *in vivo* Modelle (Gallengangsligatur- und Schweineserum Modell) verwendet. *In vitro* konnte eine konzentrationsabhängige Expressionssenkung von profibrotischen Markergenen unter der Behandlung mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 in beiden Fibroblastenspezies beobachtet werden. Diese direkte zelluläre, antifibrotische und speziesunabhängige Wirkung basierte auf den spezifischen sGC-vermittelten Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration. Erste Daten weisen darauf hin, dass dieser cGMP-vermittelte, antifibrotische Mechanismus von BAY 41-2272 in der Leberfibrose z.T. PKG-abhängig sein kann. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Tiermodellen, sollte die direkte zelluläre, antifibrotische *in vitro* Wirkung von BAY 41-2272 hinsichtlich einer Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation untersucht werden. In beiden Leberfibrosietiermodellen senkte der sGC Stimulator BAY 41-2272 signifikant die pathologische Ansammlung von Kollagen und die Expression von profibrotischen Markergenen in der Leber. Darüber hinaus zeigten BAY 41-2272 behandelte Tiere eine signifikante Senkung des Portalvenendruckes ohne Veränderungen des systemischen Blutdruckes, was anhand von hämodynamischen Parametern aufgezeigt wurde. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine direkte, antifibrotische Wirkung des sGC Stimulators BAY 41-2272 sowohl auf zellulärer Ebene als auch in Tiermodellen mit unterschiedlichen Ätiologien. Zusätzlich konnte die Beteiligung des NO-cGMP Signalweges in der Pathogenese der Leberfibrose bestätigt werden. Die vorteilhafte, drucksenkende Wirkung von BAY 41-2272 auf die portale Hypertension in den *in vivo*

Experimenten zeigt, dass eine spezifische pharmakologische Stimulation der sGC das Potential einer neuen Behandlungsoption von leberfibrotischen Patienten haben könnte.

Summary

Liver fibrosis, the final common pathway of all chronic liver diseases, is a major public health problem worldwide. The severity and progression of this disease and the fact that there is still no efficacious treatment available reflects the urgent need for further research to find new direct anti-fibrotic treatment options. Since there is a preliminary evidence for anti-fibrotic effects by the pharmacological modulation of the NO-cGMP pathway, the aim was to investigate the relevance of a specific therapeutic intervention with the cGMP-enhancing sGC stimulator BAY 41-2272 within liver fibrosis. Furthermore, the involvement of NO and cGMP during the molecular pathogenesis of liver fibrosis should be examined. To address these questions rat and human TGF β -activated, liver specific fibroblasts (= hepatic stellate cells) and two different *in vivo* models (bile duct ligation- and pig serum model) were used. *In vitro*, a concentration-dependent reduction of pro-fibrotic marker genes expressions was observed under the treatment with the sGC stimulator BAY 41-2272 in both fibroblasts species. This direct cellular, anti-fibrotic, species-independent effect was based on the specific sGC-mediated increase in intracellular cGMP concentration. First data suggested that the cGMP-mediated, anti-fibrotic mechanism of BAY 41-2272 in part can be PKG-dependent. By the use of two different animal models, we wanted to investigate whether the direct cellular, anti-fibrotic effect of BAY 41-2272 could be translated to the *in vivo* situation. In both animal models of liver fibrosis, the sGC stimulator BAY 41-2272 significantly reduced the collagen accumulation and the expression of pro-fibrotic marker genes in the liver tissue. Moreover, BAY 41-2272 treated animals showed a significant reduction of portal venous pressure without effects on systemic blood pressure as demonstrated by the measurement of hemodynamic parameters. In conclusion, these findings demonstrated a direct anti-fibrotic effect of the sGC stimulator BAY 41-2272 on the cellular level and in animal models of different etiology. Additionally the involvement of the NO-cGMP pathway in the pathogenesis of liver fibrosis was confirmed. The beneficial effect on portal hypertension in the *in vivo* experiments suggests that a specific pharmacological stimulation of the sGC might have the potential to become a new treatment option for liver fibrosis patients.

6. Literaturverzeichnis

- Abraldes, J.; Rodríguez-Vilaarupla, A.; Graupera, M.; Zafra, C.; García-Calderó, H.; García-Pagán, J.; Bosch, J. (2007): Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCL₄ cirrhotic rats. *J Hepatol* 46(6), 1040-1046.
- Abraldes, J.; Albillos, A.; Bañares, R.; Turnes, J.; González, R.; García-Pagán, J.; Bosch, J. (2009): Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 136(5), 1651-1658.
- Al-Aown, A.; Kyriasis, I.; Kallidonis, P.; Sakellaropoulos, G.; Vrettos, T.; Perimenis, P.; Filos, K.; Liatsikos, E. (2011): Vardenafil effect on ureteric smooth muscle: *in vitro* study in porcine model. *J Endourol* 25(3), 505-509.
- Albanis, E.; Friedman, S. (2001): Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 5(2), 315-334.
- Albersen, M.; Shindel, A.; Mwamukonda, K.; Lue, T. (2010): The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Emerg Drugs* 15(3), 467-480.
- Albornoz, L.; Bandi, J.; Otaso, J.; Laudanno, O.; Mastai, R. (1999): Prolonged bleeding time in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *J Hepatol* 30(3), 456-460.
- Al-Dahshan, M. (2012): Clinical application of transient elastography in prediction of portal hypertension related complication in patients with chronic liver diseases. *J Egypt Soc Parasitol* 42(1), 79-88.
- Al-Sa'doni, H.; Ferro, A. (2000): S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 98(5), 507-520.
- Amălinei, C.; Căruntu, I.; Giușcă, S.; Bălan, R. (2010): Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 51(2), 215-228.
- Anegawa, G.; Kawanaka, H.; Yoshida, D.; Konishi, K.; Yamaguchi, S.; Kinjo, N.; Taketomi, A.; Hashizume, M.; Shimokawa, H.; Maehara, Y. (2008): Defective endothelial nitric oxide synthase signaling is mediated by Rho-Kinase activation in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 47(3), 966-977.
- Arnold, W.; Mittal, C.; Katsuki, S.; Murad, F. (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8), 3203-3207.
- Arthur, M. (2000): Fibrogenesis: II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2), G245-G249.
- Ashman, D.; Lipton, R.; Melicow, M.; Price, T. (1963): Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11, 330-334.
- Azuma, M. (2012): Pirfenidone treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis* 6(2), 107-114.

- Baba, Y.; Saeki, K.; Onodera, T.; Doi, K. (2005): Serological and immunohistochemical studies on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 79(3), 229-235.
- Baddour, J.; Sousounis, K.; Panagiotis, A. (2012): Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res C Embry Today* 96(1), 1-29.
- Bataller, R.; Brenner, D. (2005): Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2), 209-218.
- Bellis, L.; Berzigotti, A.; Abraldes, J.; Moitinho, E.; García-Pagán, J.; Bosch, J.; Rodés, J. (2003): Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis. *Hepatology* 37(2), 378-384.
- Belloq, A.; Azoulay, E.; Marullo, S.; Flahault, A.; Fouqueray, B.; Philippe, C.; Cadranet, J.; Baud, L. (1999): Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor- β 1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(1), 128-136.
- Benett, R.; Kharbanda, K.; Tuma, D. (2003): Inhibition of markers of hepatic stellate cell activation by hormone relaxin. *Biochem Pharmacol* 66(5), 867-874.
- Benyon, C.; Hovell, C.; Da Gac, M.; Jones, E.; Iredale, J.; Arthur, M. (1999): Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 30(4), 977-986.
- Bergmeyer, H.; Horder, M. (1980): IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes: Part 3 IFCC Method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 18(8), 521-534.
- Berzigotti, A.; Bellot, P.; De Gottardi, A.; Garcia-Pagan, J.; Gagnon, C.; Spénard, J.; Bosch, J. (2010): NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of UDCA, does not decrease portal pressure in patients with cirrhosis: results of a randomized, double-blind, dose-escalating study. *Am J Gastroenterol* 105(5), 1094-1101.
- Biel, M.; Michalakis, S. (2009): Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol* 191, 111-136.
- Boden, W.; Finn, A.; Patel, D.; Peacock, F.; Thandani, U.; Zimmermann, F. (2012): Nitrates as an integral part of optimal medical therapy and cardiac rehabilitation for stable angina: review of current concepts and therapeutics. *Clin Cardiol* 35(5), 263-271.
- Boerrigter, G.; Burnett, J. (2007): Nitric oxide. Independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* 25(1), 30-45.
- Bosch, J.; Pizcueta, P.; Feu, F.; Fernández, M.; García-Pagán, J. (1992): Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 21(1), 1-14.
- Breitkopf, K.; Lahme, B.; Tag, C.; Gressner, A. (2001): Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor beta binding proteins in normal and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. *Hepatology* 33(2), 387-396.
- Budworth, J.; Meillerais, S.; Charles, I.; Powell, K. (1999): Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 263(3), 696-701.

Buechler, W.; Ivanova, K.; Wolfram, G.; Drummer, C.; Heim, J.; Gerzer, R. (1994): Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 714, 151-157.

Burkhardt, M.; Glazova, M.; Gambaryan, S.; Vollkommer, T.; Butt, E.; Bader, B.; Heermeier, K.; Lincoln, T.; Walter, U.; Palmetshofer, A. (2000): KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity *in vitro* but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem* 275(43), 33536-33541.

Castera, L.; Pinzani, M.; Bosch, J. (2012): Non invasive evaluation of portal hypertension using transient elastography. *J Hepatol* 56(3), 696-703.

Castéra, L.; Vergniol, J.; Foucher, J.; Le Bail, B.; Chanteloup, E.; Haaser, M.; Darriet, M.; Couzigou, P.; De Lédinghen, V. (2005): Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128(2), 343-350.

Chakraborti, S.; Mandal, M.; Das, S.; Mandal, A.; Chakraborti, T. (2003): Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2), 269-285.

Chen, B.; Qu, P.; Tie, R.; Zhu, M.; Zhu, X.; Yu, J. (2010): Protecting effects of vasonatin peptide against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Regul Pep* 164(2-3), 139-143.

Chen, H.; Zhou, G.; Yin, L.; Peng, C.; Li, H. (2005): Liver regeneration after split liver transplantation. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int* 4(4), 519-523.

Chirkov, Y.; Horowitz, J. (2007): Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther* 116(2), 287-305.

Choi, S.; Shin, J.; Kim, J.; Lee, C.; Kang, K.; Ahn, B.; Yoo, M. (2009): Effect of udenafil on portal venous pressure and hepatic fibrosis in rats. *Arzneimittelforschung* 59(12), 641-646.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1), 156-159.

Chu, A.; Prasad, J. (1999): Up-Regulation by human recombinant transforming growth factor β -1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *J Am Coll Surg* 188(3), 271-280.

Clemmesen, J.; Giraldi, A.; Ott, P.; Dalhoff, K.; Hansen, B.; Larsen, F. (2008): Sildenafil does not influence hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 14(40), 6208-6212.

Croquet, V.; Moal, F.; Veal, N.; Wang, J.; Oberti, F.; Roux, J.; Vuillemin, E.; Gallois, Y.; Douay, O.; Chappard, D.; Calès, P. (2002): Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol* 37(6), 773-780.

Dagher, L.; Patch, D.; Burroughs, A. (2000): Drug treatment for bleeding oesophageal varices. *Baillières Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14(3), 365-390.

Date, M.; Matsuzaki, K.; Matsushita, M.; Tahashi, Y.; Furukawa, F.; Inoue, K. (2000): Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury. *Gut* 46(5), 719-724.

- Deetjen, P.; Speckmann, E. (1999): Physiologie. 3. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München. ISBN 3-437-41316-3.
- de Goede, B.; Klitsie, P.; Lange, J.; Metselaar, H.; Kazemier, G. (2012): Morbidity and mortality related to non-hepatic surgery in patients with liver cirrhosis: a systematic review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26(1), 47-59.
- de Lédinghen, V.; Vergniol, J.; Foucher, J.; Merrouche, W.; le Bail, B. (2012): Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int* 32(6), 911-918.
- De Minicis, S.; Seki, E.; Uchinami, H.; Kluwe, J.; Zhang, Brenner, D.; Schwabe, R. (2007): Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*. *Gastroenterology* 132(5), 1937-1946.
- Deibert, P.; Schumacher, Y.; Ruecker, G.; Opitz, O.; Blum, H.; Rössle, M.; Kreisel, W. (2006): Effect of vardenafil, an inhibitor of phosphodiesterase-5, on portal haemodynamics in normal and cirrhotic liver-results of a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 23(1), 121-128.
- del Mar Arriero, M.; López-Farré, A.; Fryeiro, O.; Rodriguez-Feo, J.; Velasco, S.; Garcia-Durán, M.; Fortes, J.; de la Pinta, J.; Munoz, L.; Celdrán, Á. (2001): Expression of inducible nitric oxide synthase in the liver of bile duct-ligated Wistar rats with modulation by lymphomononuclear cells. *Surgery* 129(3), 255-66.
- Denninger, J.; Marletta, M. (1999): Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411(2), 334-350.
- Dooley, S.; Delvoux, B.; Lahme, B.; Mangasser-Stephan, K.; Gressner, A. (2000): Modulation of transforming growth factor β response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 31(5), 1094-1106.
- Doumas, B.; Kwok-Cheung, P.; Perry, B.; Jendrzyczak, B.; McComb, R.; Schaffer, R.; Hause, L. (1985): Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation. *Clin Chem* 31(11), 1779-1789.
- Dumitrascu, R.; Weissmann, N.; Ghofrani, H.; Dony, E.; Beuerlein, K.; Schmidt, H.; Stasch, J.; Gnoth, M.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. (2006): Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 113(2), 286-295.
- Dunkern, T.; Feurstein, D.; Rossi, G.; Sabatini, F.; Hatzelmann, A. (2007): Inhibition of TGF- β induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Euro J Pharmacol* 572(1), 12-22.
- Durán, W.; Breslin, J.; Sánchez, F. (2010): The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res* 87(2), 254-261.
- Edwards, C.; Feng, H.; Reynolds, C.; Mao, L.; Rockey, D. (2008): Effect of the nitric oxide donor V-PYRRO/NO on portal pressure and sinusoidal dynamics in normal and cirrhotic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(6), G1311-G1317.

- Evgenov, O.; Pacher, P.; Schmidt, P.; Haskó, G.; Schmidt, H.; Stasch, J. (2006): NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 5(9), 755-768.
- Falini, B.; Taylor, C. (1983): New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. *Arch Pathol Lab Med* 107(3), 105-117.
- Fan, J.; Ng, Y.; Hill, P.; Nikolic-Paterson, D.; Mu, W.; Atkins, R.; Lan, H. (1999): Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*. *Kidney Int* 56(4), 1455-1467.
- Feelisch, M.; Kotsonis, P.; Siebe, J.; Clement, B.; Schmidt, H. (1999): The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol* 56(2), 243-253.
- Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Brancaleone, V.; Sanpaolo, L.; Orlandi, S.; Distrutti, E.; Acuto, G.; Clerici, C.; Baldoni, M.; Del Soldato, P.; Morelli, A. (2003): NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 39(6), 932-939.
- Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Tocchetti, P.; Morelli, A. (2004): Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO-donor. A review of its current status. *Cardiovasc Drug Rev* 22(2), 135-146.
- Förstermann, U.; Schmidt, H.; Pollock, J.; Sheng, H.; Mitchell, J.; Warner, T.; Nakane, M.; Murad, F. (1991): Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42(10), 1849-1857.
- Francis, S.; Busch, J.; Corbin, J.; Sibley, D. (2010): cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62(3), 525-563.
- Francis, S.; Blount, M.; Corbin, J. (2011): Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91(2), 651-690.
- Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. (1996): Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15(24), 6863-6868.
- Friebe, A.; Koesling, D. (1998): Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53(1), 123-127.
- Friebe, A.; Müllershausen, F.; Smolenski, A.; Walter, U.; Schultz, G.; Koesling, D. (1998): YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol* 54(6), 962-967.
- Friebe, A.; Russwurm, M.; Mergia, E.; Koesling, D. (1999): A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 38(46), 15253-15257.
- Friedman, S. (2008a): Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 254(3), 120-129.
- Friedman, S. (2008b): Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88(1), 125-172.

- Friedman, S. (2008c): Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134(6), 1655-1669.
- Frings, S. (1997): Cyclic nucleotide-gated channels and calcium: an intimate relation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31, 75-82.
- Gadano, A.; Sogni, P.; Heller, J.; Moreau, R.; Bories, P.; Lebrec, D. (1999): Vascular nitric oxide production during the development of two experimental models of portal hypertension. *J Hepatol* 30(5), 896-903.
- García-Pagán, J.; Morillas, R.; Bañares, R.; Albillos, A.; Villanueva, C.; Vila, C.; Genescà, J.; Jimenez, M.; Rodriguez, M.; Calleja, J.; Balanzó, J.; García-Durán, F.; Plasna, R.; Bosch, J. (2003): Propranolol plus placebo versus propranolol plus isosorbide-5-momonitrate in the prevention of a first variceal bleed: a double-blind RCT. *Hepatology* 37(6), 1260-1266.
- García-Pagán, J.; de Gottardi, A.; Bosch, J. (2008): Review article: the modern management of portal hypertension-primary and secondary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 28(2), 178-186.
- García-Martínez, R.; Simón-Talero, M.; Córdoba, J. (2011): Prognostic assessment in patients with hepatic encephalopathy. *Dis Markers* 31(3), 171-179.
- Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C.; Nielsen, E.; Schmidt, K.; Mayer, B. (1995): Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48(2), 184-188.
- Geerts, A.; Eliasson, C.; Niki, T.; Wielant, A.; Vaeyens, F.; Pekny, M. (2001): Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology* 33(1), 177-188.
- Georgiev, P.; Jochum, W.; Heinrich, S.; Jang, J.; Nocito, A.; Dahm, F.; Clavien, P. (2008): Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 95(5), 646-656.
- Geschka, S.; Kretschmer, A.; Sharkovska, Y.; Evgenov, O.; Lawrenz, B.; Hucke, A.; Hocher, B.; Stasch, J. (2011): Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive dahl rats. *PLoS ONE* 6(7), e21853.
- Gewaltig, M.; Kojda, G. (2002): Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 55(2), 250-260.
- Ginès, P.; Fernández, J.; Durand, F.; Saliba, F. (2012): Management of critically-ill cirrhotic patients. *J Hepatol* 56(1), S13-S24.
- Gladwin, M. (2006): Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest* 116(9), 2330-2332.
- Goldberg, N.; Dietz, S.; O'Toole, A. (1969): Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem* 244(16), 4458-4466.
- Gotardo, B.; Andrade, R.; Oliveira, L.; Andrade, Z. (2003): Production of septal fibrosis of the liver by means of foreign protein injections into rats. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(5), 577-580.

- Gracia-Sancho, J.; Laviña, B.; Rodríguez-Vilarrupla, A.; García-Calderó, H.; Fernández, M.; Bosch, J.; García-Pagán, J. (2008): Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 47(4), 1248-1256.
- Greenbaum, L.; Wells, R. (2011): The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 43(2), 222-229.
- Gressner, A.; Bachem, M. (1990): Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 10(1), 30-46.
- Gressner, O.; Weiskirchen, R.; Gressner, A. (2007): Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic predisposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 11(5), 1031-1051.
- Grochot-Przeczek, A.; Dulak, J.; Jozkowicz, A. (2012): Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin Sci (Lond.)* 122(3), 93-103.
- Guha, I.; Rosenberg, W. (2008): Noninvasive assessment of liver fibrosis: serum markers, imaging, and other modalities. *Clin Liver Dis* 12(4), 883-890.
- Gunther, M.; His, L.; Curtis, J.; Gierse, J.; Marnett, L.; Eling, T.; Mason, R. (1997): Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem* 272(27), 17086-17090.
- Guo, J.; Friedman, S. (2007): Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 27(4), 413-426.
- Gupta, T.; Toruner, M.; Chung, M.; Groszmann, R. (1998): Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 28(4), 926-931.
- Gurjar, M.; Sharma, R.; Bhalla, R. (1999): eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12), 2871-2877.
- Hammoud, L.; Xiang, F.; Lu, X.; Brunner, F.; Leco, K.; Feng, Q. (2007): Endothelial nitric oxide synthase promotes neonatal cardiomyocyte proliferation by inhibiting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression. *Cardiovasc Res* 75(2), 359-368.
- Han, K.; Yoon, K. (2008): New diagnostic method for liver fibrosis and cirrhosis. *Intervirolgy* 51(1), 11-16.
- Hanish, S.; Knechtle, S. (2011): Liver transplantation for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 25(8), 752-757.
- Harlow, E.; Lane, D. (1988): Antibodies: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press New York*.
- Henderson, N.; Iredale, J. (2007): Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 112(5), 265-280.
- Herbst, H.; Wege, T.; Milani, S.; Pellegrini, G.; Orzechowski, H.; Bechstein, W.; Neuhaus, P.; Gressner, A.; Schuppan, D. (1997): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150(5), 1647-1659.

- Hernández-Rivera, H.; Martínez-González, H.; Casal, J.; Rodríguez-Ospina, L. (2011): Pulmonary arterial hypertension: from pathophysiology to management. *Bol Asoc Med P R* 103(1), 34-40.
- Herold, G. (2011): Innere Medizin. Gerd Herold Köln. ISBN 3-981-46601-2
- Hewitson, T.; Tait, M.; Kelynack, K.; Martic, M.; Becker, G. (2002): Dipyridamole inhibits *in vitro* renal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Lab Clin Med* 140(3), 199-208.
- Hilberg, O.; Simonsen, U.; du Bois, R.; Bendstrup, E. (2012): Pirfenidone: significant treatment effects in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J* 6(3), 131-143.
- Hinz, S.; Franke, H.; Machnik, G.; Müller, A.; Dargel, R. (1997): Histological and biochemical changes induced by total bile duct ligation in rats. *Exp Toxic Pathol* 49(3-4), 281-288.
- Hoenicka, M.; Becker, E.; Apeler, H.; Sirichoke, T.; Schröder, H.; Gerzer, R.; Stasch, J. (1999): Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med* 77(1), 14-23.
- Hofmann, F.; Bernhard, D.; Lukowski, R.; Weinmeister, P. (2009): cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol* 191, 137-162.
- Hohenstein, B.; Daniel, C.; Wagner, A.; Stasch, J.; Hugo, C. (2005): Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(4), F685-F693.
- Horio, T.; Tokudome, T.; Maki, T.; Yoshihara, F.; Suga, S.; Nishikimi, T.; Kojima, M.; Kawano, Y.; Kangawa, K. (2003): Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* 144(6), 2279-2284.
- Housset, C.; Rockey, D.; Friedman, S.; Bissel, D. (1995): Hepatic lipocytes: a major target for endothelin-1. *J Hepatol* 22(2), 55-60.
- Hrabie, J.; Klose, J.; Wink, D. (1993): New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 58, 1472-1476.
- Hrčková, G.; Velebný, S.; Solár, P. (2010): Dynamics of hepatic stellate cells, collagen types I and III synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis following *Mesocostoides vogae* (Cestoda) infection in mice. *Int J Parasitol* 40(2), 163-174.
- Hussain, A.; Marks, G.; Brien, J.; Nakatsu, K. (1997): The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) inhibits relaxation of rabbit aortic rings induced by carbon monoxide, nitric oxide, and glyceryl trinitrate. *Can J Physiol Pharmacol* 75(8), 1034-1037.
- Hyytiäinen, M.; Taipale, J.; Heldin, C.; Keski-Oja, J. (1998): Recombinant latent transforming growth factor β -binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release. *J Biol Chem* 273(7), 20669-20676.

- Hyytiäinen, M.; Keski-Oja, J. (2003): Latent TGF- β binding protein LTBP-2 decreases fibroblast adhesion to fibronectin. *J Cell Biol* 163(6), 1363-1374.
- Iredale, J. (2007): Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117(3), 539-548.
- Inagaki, Y.; Higashiyama, R.; Higashi, K. (2012): Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27(2), 85-88.
- Jaffrey, S.; Snyder, S. (1995): Nitric Oxide: a neural messenger. *Annu Rev Dev Biol* 11, 417-440.
- Janovick-Guretzky, N.; Dann, H.; Carlson, D.; Murphy, M.; Loor, J.; Drackley, J. (2007): Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake and dietary treatment. *J Dairy Sci* 90(5), 2246-2252.
- Jiang, F.; Roberts, S.; Datla, S.; Dusting, G. (2006): NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Hypertension* 48(5), 950-957.
- Joshi, C.; Martin, D.; Fox, J.; Mendeleev, N.; Brown, T.; Tulis, D. (2011): The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 339(2), 394-402.
- Kanter, M. (2010): Protective effect of quercetin on liver damage induced by biliary obstruction in rats. *J Mol Histol* 41(6), 395-402.
- Kawada, N.; Kuroki, T.; Uoya, M.; Inoue, M.; Kobayashi, K. (1996): Smooth muscle alpha-actin expression in rat hepatic stellate cell is regulated by nitric oxide and cGMP production. *Biochem Biophys Res Commun* 229(1), 238-242.
- Kazerounian, S.; Pitari, G.; Ruiz-Stewart, I.; Schulz, S.; Waldman, S. (2002): Nitric oxide activation of soluble guanylyl cyclase reveals high and low affinity sites that mediate allosteric inhibition by calcium. *Biochemistry* 41(10), 3396-3340.
- Kim, N.; Villegas, S.; Summerour, S.; Villarreal, F. (1999): Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 31(2), 457-466.
- Kirstein, M.; Langenfeld, H.; Katzer, A.; Kochsiek, K. (1994): Dissimilar action of two cyclic adenosine-mono-phosphate analogues on the sodium current in intact rat papillary muscle. *Pacing Clin Electrophysiol* 17(2), 2063-2073.
- Knittel, T.; Mehde, M.; Grundmann, A.; Saile, B.; Charf, J.; Ramadori, G. (2000): Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 113(16), 443-453.
- Knorr, A.; Hirth-Dietrich, C.; Alonso-Alija, C.; Härter, M.; Hahn, M.; Keim, Y.; Wunder, F.; Stasch, J. (2008): Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arznei-mittel-Forschung (Drug Research)* 58(2), 71-80.
- Knowles, R.; Moncada, S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298(Pt 2), 249-258.

- Ko, F.; Wu, C.; Kuo, S.; Lee, F.; Teng, C. (1994): YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84(12), 4226-4233.
- Koesling, D.; Friebe, A. (1999): Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 41-65.
- Kossakowska, A.; Edwards, D.; Lee, S.; Urbanski, L.; Stabbler, A.; Zhang, C.; Phillips, B.; Zhang, Y.; Urbanski, S. (1998): Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 153(6), 1895-1902.
- Kountouras, J.; Billing, B.; Scheuer, P. (1984): Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 65(3), 305-311.
- Kouvelas, D.; Goulas, A.; Papazisis, G.; Sardeli, C.; Pourzitaki, C. (2009): PDE5 inhibitors: *in vitro* and *in vivo* pharmacological profile. *Curr Pharm Des* 15(30), 3464-3475.
- Kremer, A.; Elferink, R.; Beuers, U. (2011): Pathophysiology and current management of pruritus in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35(2), 89-97.
- Kuhn, M. (2009): Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handb Exp Pharmacol* 191, 47-69.
- Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- Lagente, V.; Manoury, B.; Nénan, S.; Le Quément, C.; Martin-Chouly, C.; Boicot, E. (2005): Role of matrix metalloproteinases in the development of airway and inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 38(10), 1521-1530.
- Laleman, W.; Nevens, F. (2006): Cirrhotic portal hypertension: current and future medical therapy for primary and secondary prevention of variceal bleeding. *Minerva Med* 97(4), 325-345.
- Lee, K.; Yang, Y.; Wang, Y.; Hou, M.; Lee, F.; Lin, H.; Lee, S. (2008): Acute administration of sildenafil enhances hepatic cyclic guanosine monophosphate production and reduces hepatic sinusoid resistance in cirrhotic patients. *Hepatol Res* 38(12), 1186-1193.
- Lee, K.; Yang, Y.; Huang, Y.; Lee, F.; Hou, M.; Lin, H.; Lee, S. (2010): Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci (Lond)* 119(1), 45-55.
- Li, D.; Friedman, S. (1999): Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 14(7), 618-633.
- Li, Z.; Dranoff, J.; Chan, E.; Uemura, M.; Sévigny, J.; Wells, R. (2007): Transforming growth factor- β and substrates stiffness regulate portal fibroblasts activation in culture. *Hepatology* 46(4), 1246-1256.

- Lindert, S.; Wickert, L.; Sawitza, I.; Wiercinska, E.; Gressner, A.; Dooley, S.; Breitkopf, K. (2005): Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathway leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biol* 24(3), 198-207.
- Liu, X.; Hu, H.; Yin, J. (2006): Therapeutic strategies against TGF- β signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 26(1), 8-22.
- Livak, K.; Flood, S.; Marnaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6), 357-362.
- Livak, K.; Schmittgen, T. (2001): Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Lloaeza-del-Castillo, A.; Paz-Pineda, F.; Oviedo-Cárdenas, E.; Sánchez-Avila, F.; Vargas-Vorácková, F. (2008): AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 7(4), 350-357.
- Lörke, J.; Erhardt, A.; Vogt, C.; Hässinger, D. (2007): Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 24, A1752-A1757.
- Loureiro-Silva, M.; Iwakiri, Y.; Abraldes, J.; Haq, O.; Groszmann, R. (2006): Increased phosphodiesterase-5 expression is involved in the decreased vasodilator response to nitric oxide in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 44(5), 886-893.
- Lucas, K.; Pitari, G.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K.; Waldman, S. (2000): Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52(3), 375-409.
- Lugnier, C. (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109(3), 366-398.
- Ma, X.; Sayed, N.; Beuve, A.; van den Akker, F. (2007): NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J* 26(2), 578-588.
- Machicao, V.; Fallon, M. (2012): Hepatopulmonary syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 33(1), 11-16.
- MacQuillan, G.; Neuberger, J. (2003): Liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 7(4), 941-956.
- Majumder, S.; Tamilarasan, K.; Kolluru, G.; Muley, A.; Nair, C.; Omanakuttan, A.; Murty, K.; Chatterjee, S. (2007): Activated pericyte attenuates endothelial functions: nitric oxide-cGMP rescues activated pericyte-associated endothelial dysfunctions. *Biochem Cell Biol* 85(6), 709-720.
- Malhi, H.; Gores, G. (2008): Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134(6), 1641-1654.
- Marsh, N.; Marsh, A. (2000): A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27(4), 313-319.

- Maurice, D.; Haslam, R. (1990): Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol* 37(5), 671-681.
- Mayer, B.; Beretta, M. (2008): The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *Br J Pharmacol* 155(2), 170-184.
- McAnulty, R. (2005): Methods for measuring hydroxyproline and estimating *in vivo* rates of collagen synthesis and degradation. *Methods Mol Med* 117, 189-207.
- McCrudden, R.; Iredale, J. (2000): Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 15(4), 1159-1168.
- Meindl-Beinker, N.; Dooley, S. (2008): Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 23(1), S122-S127.
- Mergia, E.; Friebe, A.; Dangel, O.; Russwurm, M.; Koesling, D. (2006): Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 116(6), 1731-1737.
- Merkel, C.; Bolognesi, M.; Sacerdoti, D.; Bombonato, G.; Bellini, B.; Bighin, R.; Gatta, A. (2000): The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 32(5), 930-934.
- Mittendorf, J.; Weigand, S.; Alonso-Alija, C.; Bischoff, E.; Feurer, A.; Gerisch, M.; Kern, A.; Knorr, A.; Lang, D.; Muenter, K.; Radtke, M.; Schirok, H.; Schlemmer, K.; Stahl, E.; Straub, A.; Wunder, F.; Stasch, J. (2009): Discovery of Riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *Chem Med Chem* 4(5), 853-865.
- Moal, F.; Veal, N.; Vuillemin, E.; Barrière, E.; Wang, J.; Fizanne, L.; Oberti, F.; Douay, O.; Gallois, Y.; Bonnefont-Rousselot, D.; Rousselet, M.; Calès, P. (2006): Hemodynamic and anti-fibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 12(41), 6639-6645.
- Morén, A.; Olofsson, A.; Stenman, G.; Sahlin, P.; Kanzaki, T.; Claesson-Welsh, L.; ten Dijke, P.; Miyazono, K.; Heldin, C. (1994): Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor- β -binding protein. *J Biol Chem* 269(51), 32469-32478.
- Mormone, E.; George, J.; Nieto, N. (2011): Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 193(3), 225-231.
- Moro, M.; Russel, R.; Cellek, S.; Lizasoain, I.; Su, Y.; Darley-Usmar, V.; Radomski, M.; Moncada, S. (1996): cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4), 1480-1485.
- Mungrue, I.; Bredt, D.; Stewart, D.; Husian, M. (2003): From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 179(2), 123-135.

- Muntaner, L.; Altamirano, J.; Augustin, S.; González, A.; Esteban, R.; Guardia, J.; Genescà, J. (2010): High doses of β -blockers and alcohol abstinence improve long-term rebleeding and mortality in cirrhotic patients after an acute variceal bleeding. *Liver Int* 30(8), 1123-30.
- Muzaffer, S.; Shukla, N.; Srivastava, A.; Angelini, G.; Jeremy, J. (2005): Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91^{phox} expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 146(1), 109-117.
- Nakane, M.; Arai, K.; Saheki, S.; Kuno, T.; Buechler, W.; Murad, F. (1990): Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265(28), 16841-16845.
- Nakano, M. (1986): Early morphological changes of porcine serum-induced hepatic fibrosis. *Acta Pathol Jpn* 36(3), 415-422.
- Newton, J.; Jones, D. (2012): Managing systemic symptoms in chronic liver disease. *J Hepatol* 56(1), S46-S55.
- Parise, E.; Oliveira, A.; Figueiredo-Mendes, C.; Lanzoni, V.; Martins, J.; Nader, H.; Ferraz, M. (2006): Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 26(9), 1095-1099.
- Park, G.; Lin, B.; Ngu, M.; Jones, D.; Katelaris, P. (2000): Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? *J Gastroenterol Hepatol* 15(4), 386-390.
- Parkinson, S.; Jovanovic, A.; Jovanovic, S.; Wagner, F.; Terzic, A.; Waldman, S. (1999): Regulation of nitric oxide-responsive recombinant soluble guanylyl cyclase by calcium. *Biochemistry* 38(20), 6441-6448.
- Paronetto, F.; Popper, H. (1966): Chronic liver injury induced by immunologic reactions. *Am J Pathol* 49(6), 1087-1101.
- Perri, R.; Langer, D.; Chatterjee, S.; Gibbons, S.; Gadgil, J.; Cao, S.; Farrugia, G.; Shah, V. (2006): Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(3), G535-G542.
- Perry, B.; Doumas, B.; Buffone, G.; Glick, M.; Ou, C.; Ryder, K. (1986): Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. *Clin Chem* 32(2), 329-332.
- Peters, H.; Wang, Y.; Loof, T.; Martini, S.; Kron, S.; Krämer, S.; Neumayer H. (2004): Expression and activity of soluble guanylate cyclase in injury and repair of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int* 66(6), 2224-2236.
- PetitClerc, C.; Delisle, M.; Martel, M.; Fecteau, C.; Brière, N. (1975): Mechanism of action of Mg²⁺ and Zn²⁺ on rat placental alkaline phosphatase. I. Studies on the soluble Zn²⁺ and Mg²⁺ alkaline phosphatase. *Can J Biochem* 53(10), 1089-1100.
- Pfeifer, A.; Ruth, P.; Dostmann, W.; Suasbier, M.; Klatt, P.; Hofmann, F. (1999): Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 105-149.
- Pfeilschifter, J.; Vosbeck, K. (1991): Transforming growth factor β 2 inhibits interleukin 1 β - and tumor necrosis factor-induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175(2), 372-379.

- Pilz, R.; Casteel, D. (2003): Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93(11), 1034-1046.
- Pinzani, M. (1995): Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 22(6), 700-706.
- Préaux, A.; Mallat, A.; Van Nhieu, J.; D'Ortho, M.; Hembry, R.; Mavier, P. (1999): Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology* 30(4), 944-950.
- Racanelli, V.; Rehermann, B. (2006): The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43(2), S54-S62.
- Ready, J.; Rector, W. (1989): Morbidity and mortality of portal hypertension. *Drugs* 37(2), 13-24.
- Renz-Polster, H.; Krautzig, S. (2008): Basislehrbuch Innere Medizin. 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München. ISBN 978-3-437-41053-6.
- Reynaert, H.; Thompson, M.; Thomas, T.; Geerts, A. (2002): Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 50(4), 571-581.
- Robic, M.; Procopet, B.; Métivier, S.; Péron, J.; Selves, J.; Vinel, J.; Bureau, C. (2011): Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: a prospective study. *J Hepatol* 55(5), 1017-1024.
- Rockey, D. (1997): The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 25(1), 2-5.
- Rockey, D.; Chung, J. (1998): Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 114(2), 344-351.
- Rockey, D. (2001): Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 21(3), 337-349.
- Roderfeld, M.; Hemmann, S.; Roeb, E. (2007): Mechanisms of fibrolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 45(1), 25-33.
- Roger, S.; Badier-Commander, C.; Paysant, J.; Cordi, A.; Verbeuren, T.; Félétou, M. (2010): The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 161(5), 1044-1058.
- Rothkegel, C.; Schmidt, P.; Atkins, D.; Hoffmann, L.; Schmidt, H.; Schröder, H.; Stasch, J. (2007): Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation *in vivo*. *Mol Pharmacol* 72(5), 1181-1190.
- Sage, P.; de la Lande, I.; Stafford, I.; Bennett, C.; Phillipov, G.; Stubberfield, J.; Horowitz, J. (2000): Nitroglycerin tolerance in human vessels. *Circulation* 102(23), 2810-2815.
- Saile, B.; Matthes, N.; Knittel, T.; Ramadori, G. (1999): Transforming growth factor β and tumor necrosis factor α inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 30(1), 192-202.

- Salazar-Montez, A.; Riuz-Corro, L.; López-Reyes, A.; Casterjón-Gómez, E.; Armendáriz-Borunda, J. (2008): Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis. *Eur J Pharmacol* 595(1-3), 69-77.
- Sancho-Bru, P.; Bataller, R.; Gasull, X.; Colmenero, J.; Khurdayan, V.; Gual, A.; Nicolás, J.; Arroyo, V.; Ginès, P. (2005): Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J Hepatol* 43(2), 272-282.
- Sandner, P.; Kornfeld, M.; Ruan, X.; Arendshorst, W.; Kurtz, A. (1999): Nitric oxide/cAMP interactions in the control rat renal vascular resistance. *Circ Res* 84(2), 186-192.
- Santos, M.; Pegoraro, M.; Sandrini, F.; Macuco, E. (2008): Risk factors for the development of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Arq Bras Cardiol* 90(4), 276-283.
- Sass, D.; Chopra, K. (2009): Portal hypertension and variceal hemorrhage. *Med Clin N Am* 93(4), 837-853.
- Saura, M.; Zaragoza, C.; Herranz, B.; Griera, M.; Diez-Marqués, L.; Rodríguez-Puyol, D.; Rodríguez-Puyol, M. (2005): Nitric oxide regulates transforming growth factor- β signaling in endothelial cells. *Circ Res* 97(11), 1115-1123.
- Schermuly, R.; Stasch, J.; Pullamsetti, S.; Middendorff, R.; Müller, D.; Schlüter, K.; Dingendorf, A.; Hackemack, S.; Kolosionek, E.; Kaulen, C.; Dumitrascum, R.; Weissmann, N.; Mittendorf, J.; Klepetko, W.; Seeger, W.; Ghofrani, H.; Grimminger, F. (2008): Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 32(4), 881-891.
- Schermuly, R.; Janssen, W.; Weissmann, N.; Stasch, J.; Grimminger, F.; Ghofrani, A. (2011): Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* 20(4), 567-576.
- Schmidt, H.; Schmidt, P.; Stasch, J. (2009): NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 191, 309-339.
- Schmidt, P.; Schramm, M.; Schröder, H.; Stasch, J. (2003): Receptor binding assay for nitric oxide- and heme-independent activators of soluble guanylate cyclase. *Anal Biochem* 314(1), 162-165.
- Schrammel, A.; Behrends, S.; Schmidt, K.; Koesling, D.; Mayer, B. (1996): Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50(1), 1-5.
- Schultz, K.; Schultz, K.; Schultz, G. (1977): Sodium nitroprusside and other smooth musclerelaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265(5596), 750-751.
- Schuppan, D.; Pinzani, M. (2012): Anti-fibrotic therapy: lost in translation? *J Hepatol* 56(1), S66-S74.
- Selemedis, S.; Dusting, G.; Peshavariya, H.; Kemp-Harper, B.; Drummond, G. (2007): Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovas Res* 75(2), 349-358.
- Sersté, T.; Melot, C.; Francoz, C.; Durand, F.; Rautou, P.; Valla, D.; Moreau, R.; Lebrec, D. (2010): Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 52(3), 1017-1022.

- Shah, V.; Toruner, M.; Haddad, F.; Cadelina, G.; Papapetropoulos, A.; Choo, K.; Sessa, W.; Groszmann, R. (1999): Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117(5), 1222-1228.
- Shah, V. (2001): Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 5(3), 629-644.
- Siegenthaler, W.; Blum, H. (2006): *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. ISBN 3-13-449609-7.
- Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B.; Klenk, D. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1), 76-85.
- Snowdon, V.; Fallowfield, J. (2011): Models and mechanisms of fibrosis resolution. *Alcohol Clin Exp Res* 35(5), 794-799.
- Sohara, N.; Znoyko, I.; Levy, M.; Trojanowska, M.; Reuben, A. (2002): Reversal of activation of human myofibroblasts-like cells by culture on basement membrane-like substrate. *J Hepatol* 37(2), 214-221.
- Starkel, P.; Leclercq, I. (2011): Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(2), 319-333.
- Stasch, J.; Becker, E.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Feurer, A.; Gerzer, R.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Pleiss, U.; Schröder, H.; Schroeder, W.; Stahl, E.; Steinke, W.; Straub, A.; Schramm, M. (2001): NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410(6825), 212-215.
- Stasch, J.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Feurer, A.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Schramm, M.; Straub, A. (2002a): Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vitro* studies. *Br J Pharmacol* 135(2), 333-343.
- Stasch, J.; Dembowski, K.; Perzborn, E.; Stahl, E.; Schramm, M. (2002b): Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vivo* studies. *Br J Pharmacol* 135(2), 344-355.
- Stasch, J.; Schmidt, P.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Haerter, M.; Heil, M.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Pleiss, U.; Schramm, M.; Schroeder, W.; Schröder, H.; Stahl, E.; Steinke, W.; Wunder, F. (2002c): NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 163(5), 773-783.
- Stasch, J.; Schmidt, P.; Nedvetsky, P.; Nedvetskaya, T.; H.S., A.; Meurer, S.; Deile, M.; Taye, A.; Knorr, A.; Lapp, H.; Müller, H.; Turgay, Y.; Rothkegel, C.; Tersteegen, A.; Kemp-Harper, B.; Müller-Esterl, W.; Schmidt, H. (2006): Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 116(9), 2552-2561.
- Stasch, L.; Hobbs, A. (2009): NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol* 191, 277-308.
- Stasch, J.; Pacher, P.; Evgenov, O. (2011): Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* 123(20), 2263-2273.

- Stauber, R. (2009): Nichtinvasive Diagnose der Leberfibrose bei chronischen Hepatopathien. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 7(4), 12-17.
- Stefano, J.; Cogliati, B.; Santos, F.; Lima, V.; Mazo, D.; Matte, U.; Alvares-da-Silva, M.; Silveira, T.; Carrilho, F.; Oliveira, C. (2011): S-Nitroso-N-acetylcysteine induces de-differentiation of activated hepatic stellate cells and promotes antifibrotic effects *in vitro*. *Nitric Oxide* 25(3), 360-365.
- Stegemann, H.; Stadler, K. (1967): Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 18(2), 267-273.
- Stojakovic, T.; Claudel, T.; Putz-Bankuti, C.; Fauler, G.; Scharnagl, H.; Wagner, M.; Sourij, H.; Stauber, R.; Winkler, K.; März, W.; Wascher, T.; Trauner, M. (2010): Low-dose atorvastatin improves dyslipidemia and vascular function in patients with primary biliary cirrhosis after one year of treatment. *Atherosclerosis* 209(1), 178-183.
- Stone, J.; Marletta, M. (1994): Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33(18), 5636-5640.
- Straub, A.; Stasch, J.; Alonso-Alija, C.; Benet-Buckholz, J.; Ducke, B.; Feurer, A.; Fürstner, C. (2001): NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 11(6), 781-784.
- Straub, A.; Benet-Buckholz, J.; Fröde, R.; Kern, A.; Kohlsdorfer, C.; Schmitt, P.; Schwarz, T.; Siefert, H.; Stasch, J. (2002): Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem* 10(6), 1711-1717.
- Tacke, F.; Weiskirchen, R. (2010): Pathophysiologie der Leberfibrose. *Internist* 51, 21-29.
- Tandon, P.; Inayat, I.; Tal, M.; Spectir, M.; Shea, M.; Groszmann, R.; Garcia-Tsao, G. (2010): Sildenafil has no effect on portal pressure but lowers arterial pressure in patients with compensated cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(6), 546-549.
- Teixeira, C.; Priviero, F.; Webb, R. (2006): Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 316(2), 654-661.
- Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakaye, B.; De Borman, B.; Coumas, B.; Hennen, G.; Grisar, T.; Igout, A.; Heinen, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75(2-3), 291-295.
- Theodorakis, N.; Wang, Y.; Wu, J.; Maluccio, M.; Sitzmann, J.; Skill, N. (2009): Role of endothelial nitric oxide synthase in the development of portal hypertension in the carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 29(4), G792-G799.
- Tietz, N.; Burtis, C.; Duncan, P.; Ervin, K.; PetitClerc, C.; Rinker, A.; Shuey, D.; Zygowicz, E. (1983): A reference method for the measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 29(5), 751-761.
- 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(9), 4350-4354.
- Töx, U.; Steffen, H. (2006): Impact of inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system on liver fibrosis and portal hypertension. *Curr Med Chem* 13(30), 3649-3661.

- Trebicka, J.; Hennenberg, M.; Odenthal, M.; Shir, K.; Klein, S.; Granzow, M.; Vogt, A.; Dienes, H.; Lammert, F.; Reichen, J.; Heller, J.; Sauerbruch, T. (2010): Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 53(4), 702-712.
- Tsukamoto, H.; Matsuoka, M.; French, S. (1990): Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Sem Liver Dis* 10(1), 56-65.
- Udell, J.; Wang, C.; Tinmouth, J.; FitzGerald, J.; Ayas, N.; Simel, D.; Schulzer, M.; Mak, E.; Yoshida, E. (2012): Does this patient with liver disease have cirrhosis? *JAMA* 307(8), 832-842.
- Uehara, H.; Akahoshi, T.; Kawanaka, H.; Hashimoto, N.; Nagao, Y.; Tomikawa, M.; Taketomi, A.; Shirabe, K.; Hasizume, M.; Maehara, Y. (2012): Endothelin-1 derived from spleen-activated Rho-kinase pathway in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* [Epub ahead of print]
- Uemura, M.; Swenson, E.; Gaça, M.; Giordano, F.; Reiss, M.; Wells, R. (2005): Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and α -smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 16(9), 4214-4224.
- Vanheule, E.; Geerts, A.; Van Huysse, J.; Schelfhout, D.; Praet, M.; Van Vlierberghe, H.; De Vos, M.; Colle, I. (2008): An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Path* 89(6), 419-432.
- Waldman, S.; Murad, F. (1988): Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 12(5), S115-S118.
- Wang-Rosenke, Y.; Neumayer H.; Peters, H. (2008): NO signaling through cGMP in renal tissue fibrosis and beyond: key pathway and novel therapeutic target. *Curr Med Chem* 15(14), 1396-1406.
- Webster, D.; Bignell, A.; Attwood, E. (1974): An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 53(1), 101-108.
- Wei, C.; Khoo, H.; Lee, K.; Hon, W. (2002): Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide* 7(2), 91-102.
- Wei, C.; Hon, W.; Lee, K.; Khoo, H. (2005): Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 11(3), 362-367.
- Wiest, R.; Groszmann, R. (2002): The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much is not enough. *Hepatology* 35(2), 478-491.
- Woessner, J. (1961): The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93, 440-447.
- Wong, F. (2012): Management of ascites in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 27(1), 11-20.
- Wróblewski, F.; LaDue, J. (1956): Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 91(4), 569-571.

- Xie, G.; Wang, X.; Wang, L.; Wang, L.; Atkinson, R.; Kanel, G.; Gaarde, W.; Deleve, L. (2012): Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology* 142(4), 918-927.
- Xu, G.; Li, P.; Wang, X.; Jia, X.; Tian, D.; Jiang, L.; Yang, J. (2004): Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol rats. *World J Gastroenterol* 10(24), 3621-3627.
- Xu, L.; Hui, A.; Arthur, M.; O'Byrne, S.; Blaner, W.; Mukherjee, P.; Friedman, S.; Eng, F. (2005): Human hepatic stellate cells lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54(1), 142-151.
- Yang, C.; Zeisberg, M.; Mosterman, B.; Sudhakar, A.; Yerramalla, U.; Holthaus, K.; Xu, L.; Eng, F.; Afdahl, N.; Kalluri, R. (2003): Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 124(1), 147-159.
- Yang, Y.; Lin, H.; Huang, Y.; Lee, T.; Hou, M.; Lee, F.; Liu, R.; Chang, F.; Lee, S. (2002): Effect of 1-week losartan administration on bile duct-ligated cirrhotic rats with portal hypertension. *J Hepatol* 36(5), 600-606.
- Yilmaz, Y.; Yonal, O.; Kurt, R.; Bayrak, M.; Aktas, B.; Ozdogan, O. (2011): Noninvasive assessment of liver fibrosis with the aspartate transaminase to platelet ratio index (APRI): usefulness in patients with chronic liver disease: APRI in chronic liver disease. *Hepat Mon* 11(2), 103-106.
- Yoshiji, H.; Noguchi, R.; Ikenaka, Y.; Kitade, M.; Kaji, K.; Tsujimoto, T.; Uemura, M.; Fukui, H. (2007): Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases. *Curr Med Chem* 14(26), 2749-2754.
- Zanfolin, M.; Faro, R.; Araujo, E.; Guaraldo, A.; Antunes, E.; De Nucci, G. (2006): Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 47(3), 391-395.
- Zenzmaier, C.; Sampson, N.; Pernkopf, D.; Plas, E.; Untergasser, G.; Berger, P. (2010): Attenuated proliferation and trans-differentiation of prostatic stromal cells indicate suitability of phosphodiesterase type 5 inhibitors for prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 151(8), 3975-3984.
- Zheng, W.; Zhang, L.; Sih, M.; Chen, Z.; Chen, Y.; Huang, Y.; Wang, X. (2005): Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 11(12), 1753-1758.
- Zhou, H.; Chen, W.; Zhu, D.; Wu, L.; Zhang, J.; Han, W.; Li, J.; Yan, C.; Gao, P. (2008): The PDE1A-PKC α signaling pathway is involved in the upregulation of α -smooth muscle actin by TGF- β ₁ in adventitial fibroblasts. *J Vasc Res* 47(1), 9-15.
- Zink, W.; Ostrach, S. (1998): Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 258. Auflage. de Gruyter Verlag, Berlin. ISBN 3-11-015676-8.

Internetadressen

www.caymanchem.com

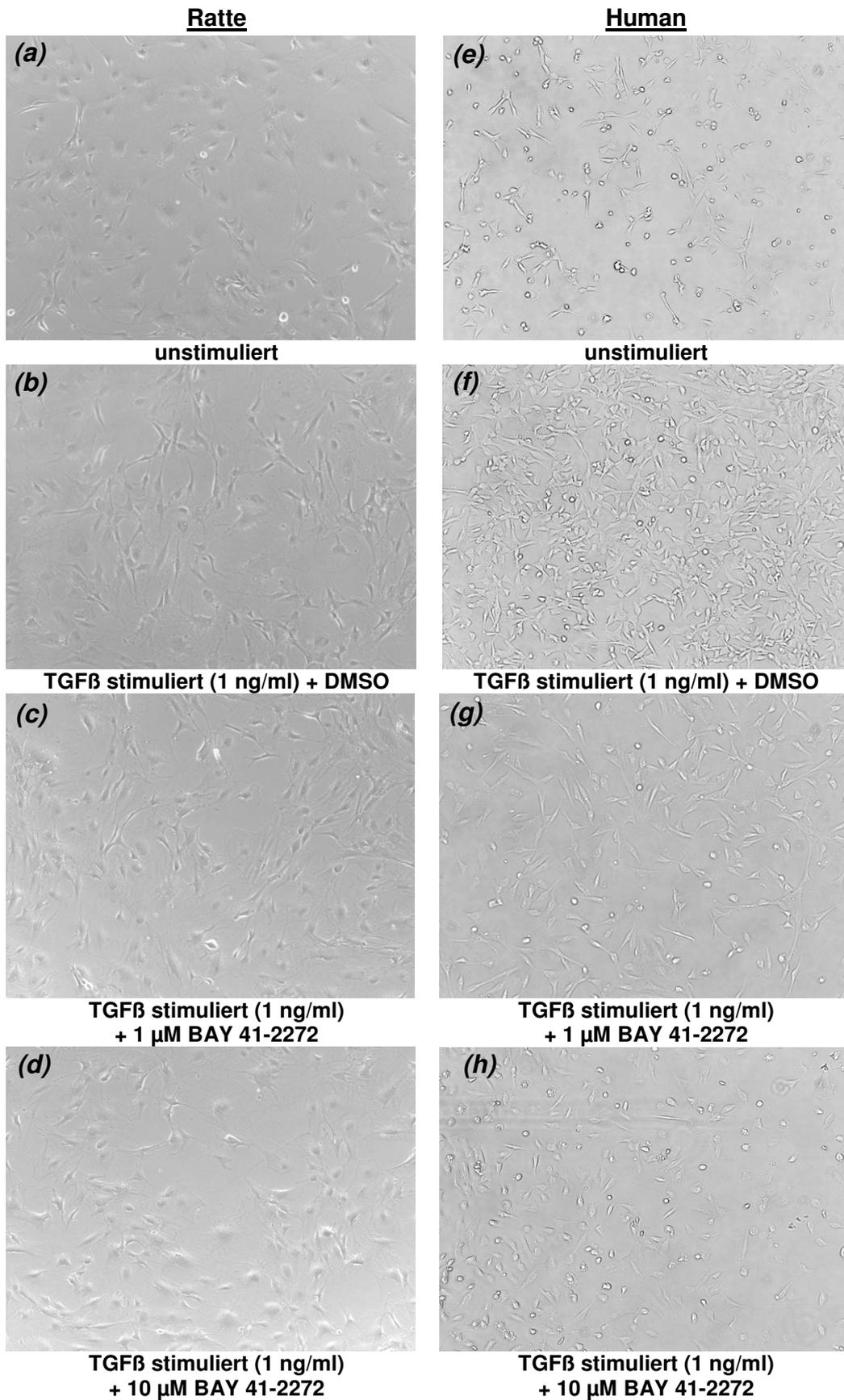
www.hepatitis-bw.de

www.sigmaaldrich.com

www.tocris.com

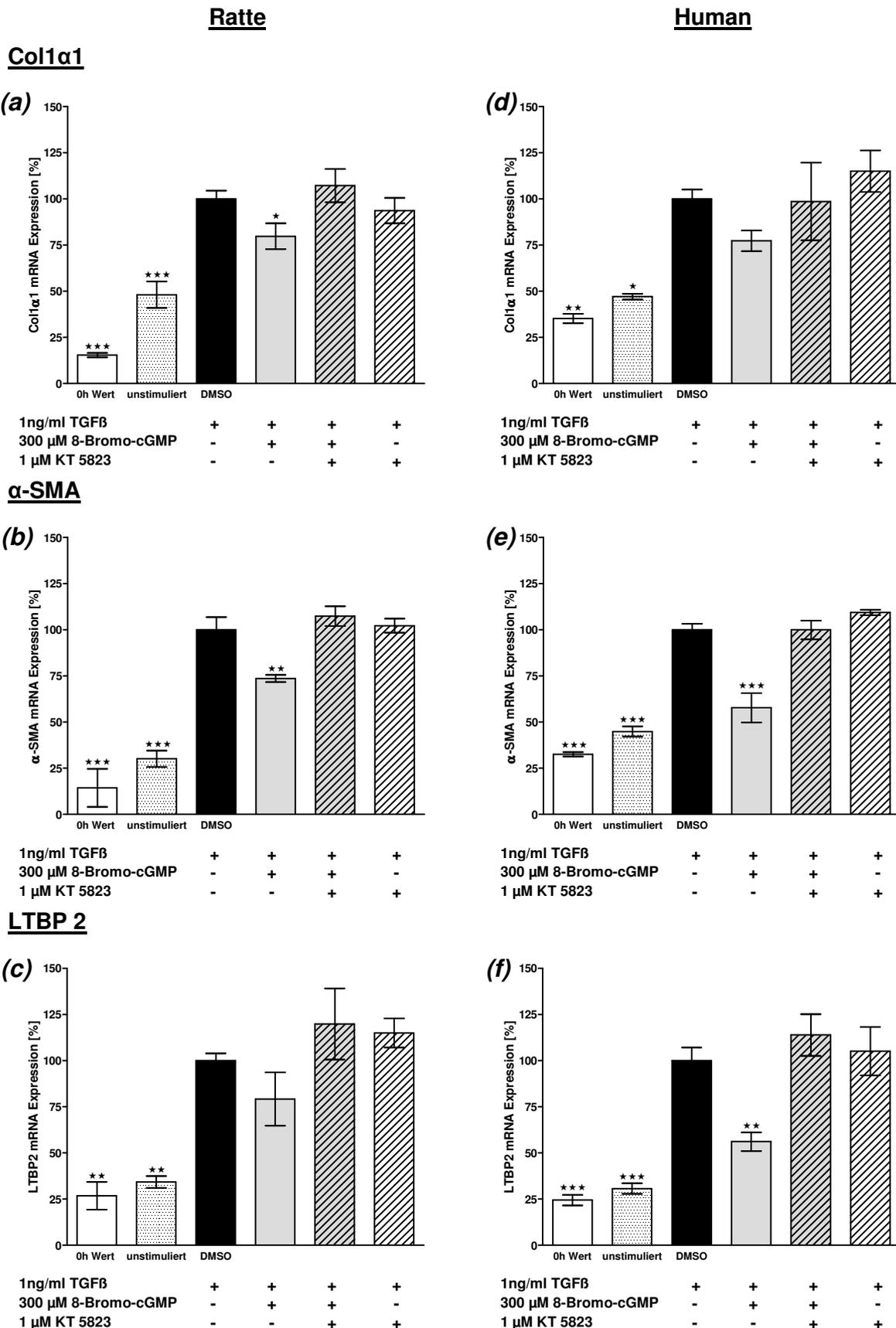
7. Datenanhang

Anhang 1: Repräsentative Vitalitätsbilder von rHSCs ((a) bis (d)) und hHSCs ((e) bis (h)) nach 48 h (100-fache Vergrößerung; BAY 41-2272= sGC Stimulator; DMSO= Dimethylsulfoxid; TGFβ= transforming growth factor beta)



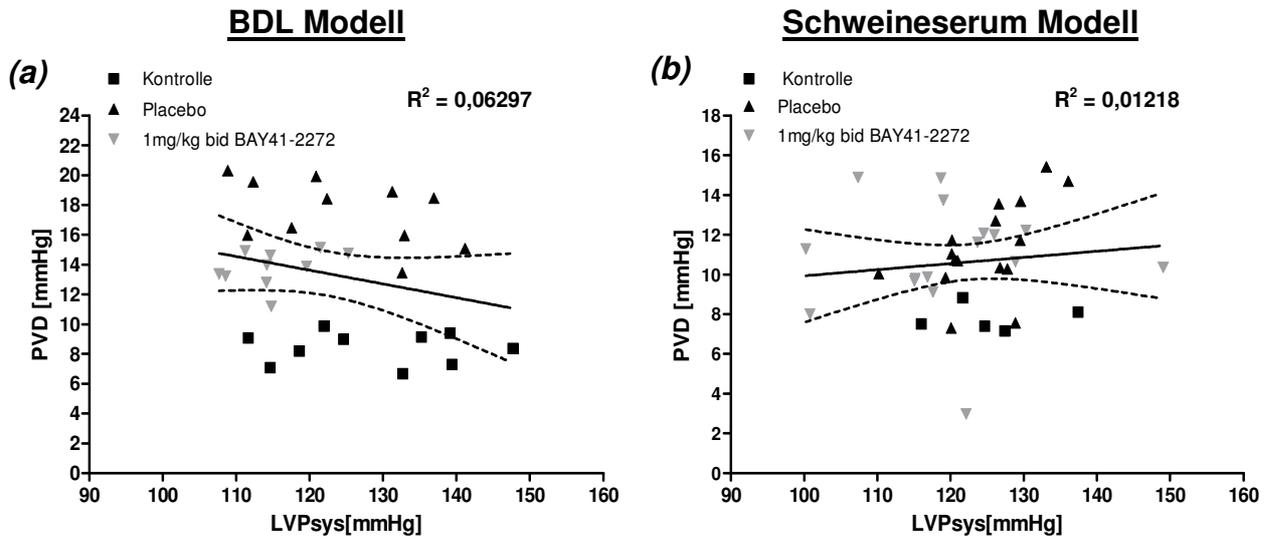
Anhang 2: Wirkung von 8-Bromo-cGMP ± KT 5823 auf TGFβ stimulierte HSCs nach 48 h
Darstellung der prozentualen mRNA Genexpressionen von Col1α1 ((a) + (d)), α-SMA ((b) + (e)) und LTBP 2 ((c) + (f))

((a) – (c) Ratte n= 3 Versuche (Duplikate) á 2 LOT; (d) – (f) Human n= 3 Versuche (Duplikate) á 1 Spender; MW ± SEM Signifikanz vs. DMSO Kontrolle (= 100 %); one-way ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Analyse; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001) 8-Bromo-cGMP= stabiles cGMP Analogon; DMSO= Dimethylsulfoxid; KT 5823= PKG Inhibitor; TGFβ= *transforming growth factor beta*



Anhang 3: Darstellung der Relation von PVD zu LVP_{sys}

(a) BDL Modell und (b) Schweineserum Modell

(Tieranzahl pro Gruppe: Kontrolle n= 5, Placebo n= 15-16, 1 mg/kg bid BAY 41-2272 n= 14-16; MW \pm SEM)BAY 41-2272= sGC Stimulator; LVP_{sys} = linksventrikulärer Druck; PVD= Portalvenendruck; R^2 = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen engsten Freunden, die mich während der Promotionszeit immer unterstützt haben und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne euch wäre das alles niemals möglich gewesen!

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Dr. Peter Sandner und Frau Dr. Claudia Hirth-Dietrich für ihre Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die Betreuung dieser Dissertation. Dank der fachlichen Diskussionen und Anmerkungen wurde ich von euch tatkräftig bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt. Ich konnte sehr viel dazu lernen und dafür danke ich euch. Explizit möchte ich dir Claudia danken, dass du dich trotz deines Ruhestandes weiterhin um mich gekümmert hast. Ich danke dir sehr dafür!

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Peter Bayer und Frau Dr. Kirsten Leineweber für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation an der Universität Duisburg-Essen und der guten Zusammenarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Georges von Degenfeld, Herrn Dr. Ulrich Gottwald und Herrn Dr. Philip Wintermeyer für die Ermöglichung der Forschungskooperation zwischen der Universität Witten-Herdecke und der Bayer Pharma AG ohne die meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen lieben Dank auch an Herrn Dr. Christoph Gerdes und Herrn Dr. Stefan Golz, die mir stets einen Arbeitsplatz in ihren Laboren zur Verfügung gestellt haben.

Danke auch an Frau Dr. Elke Hartmann und ihrer Laborantin Brigitte Poschmann für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und der anschließenden fachlichen Beurteilung!

Ebenfalls bedanke ich mich bei Silke Poschmann für ihre Unterstützung bei den Hämodynamikmessungen, bei Jutta Hauenschild und Gundula Giesen für ihre Bereitschaft ihren Arbeitsplatz mit mir zu teilen. Danke auch an Svenja Kinne, die mich oftmals in praktischen Belangen unterstützt hat und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank auch an Frau Dr. Janine Swifka, Frau Dr. Katrin Nickel, Andrea Siepmann und an alle anderen Arbeitskollegen des Gebäudes 500 für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima; es war eine unvergessliche Zeit!

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karoline Dröbner, die stets für fachliche Diskussionen zur Verfügung stand und meine Dissertation Korrektur gelesen hat. Ich danke dir dafür, dass du so viel Geduld gerade in der Endphase mit mir hattest und du mich immer unterstützt hast. Danke für die schöne Zeit, die wir miteinander verbracht haben!

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlichst bei Herrn Ralf Vetter bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Was hätte ich bloß ohne dich in all den Jahren gemacht? Ich danke dir einfach für alles!

Lebenslauf

**In der Online-Version ist der Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten!**

**In der Online-Version ist der Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten!**

Erklärung (1)

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Erklärung (2)

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Erklärung (3)

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Bedeutung des NO-cGMP Signalweges und der löslichen Guanylatzyklase in der Leberfibrose“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Janina Nowatzky befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.