

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Komm. Direktor: PD Dr. med. B. Schmidt)

**Bedeutung und Mediatoren  
von Neoangiogenese und Remodeling in der Leberarterie  
während Entstehung und bei etablierter Zirrhose im Tiermodell**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Miriam Möller, geb. Engelhardt  
geboren am 27.06.1987 in Halle(Saale)

Betreuer: PD Dr. med. Alexander Zipprich

Gutachter:

1. PD Dr. med. Alexander Zipprich
2. PD Dr. med. Lutz P. Müller
3. Prof. Dr. med. Elke Roeb (Gießen)

Datum der Verteidigung: 06.07.2015

## Referat

Die Leber hat eine duale Blutversorgung über die Pfortader und die Leberarterie. Frühere Studien konnten eine Vasodilatation der Leberarterie bei fortgeschrittener Zirrhose mit portalem Hypertonus und Aszites zeigen. Ob diese Veränderungen im Zusammenhang mit dem portalen Hypertonus stehen oder durch unabhängige Mechanismen verursacht sind, ist nicht bekannt. Ziele der Versuchsdurchführungen waren Veränderungen und Anpassungen der Leberarterie zum Zeitpunkt der Zirrhose ohne portale Hypertension und bei bereits etablierter Zirrhose mit portaler Hypertension und Aszites zu untersuchen. Während der Zirrhoseentstehung wurde in An- und Abwesenheit vom Angiogenesehemmer Sorafenib das Remodeling, sowie die Neoangiogenese der Leberarterie untersucht.

Wistar Ratten, wurden über 8 Wochen und 12 Wochen mittels CCl<sub>4</sub>-Inhalation eine Zirrhose induziert. Die Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib wurde weiterhin über verschiedene Zeiträume (8 Wochen, 12 Wochen, 8-12 Woche) durchgeführt. Zu den verschiedenen Zeiten der Zirrhoseentstehung wurden mittels isolierter bivaskulärer Perfusion der Leber die Gefäßwiderstände der Leberarterie, der Portalvene und im sinusoidalen Gefäßbett gemessen und die Kontraktion der Leberarterie hervorgerufen durch Gabe des Vasokonstriktors Methoxamin mit und ohne Blockung von Stickstoffmonoxid gemessen. Mittels Western Blot wurden die Konzentrationen der verschiedenen Mediatoren von Neoangiogenese und Remodeling gemessen.

Die Leberarterie der zirrhotischen Tiere zeigte bereits nach 8 Wochen eine Dilatation, unabhängig von einem normalen Portaldruck und sinusoidalen Druck. Diese Dilatation der Leberarterie konnte durch Sorafenibgabe verhindert werden, ein Effekt, der auf einer verminderten Expression von Stickstoffmonoxid beruht. Ebenso konnte eine Sorafenibgabe nach Entstehung der Zirrhose bis zur Ausbildung einer portalen Hypertension (8-12 Woche) eine verminderte Expression von Stickstoffmonoxid in der Leberarterie zeigen.

Demgegenüber gelang im Spätstadium der Zirrhose mit portaler Hypertension die Blockung der vermehrten Stickstoffmonoxidproduktion durch Gabe von Sorafenib über 12 Wochen nicht. Die Dilatation der Leberarterie bei Zirrhose ist unabhängig vom portalen Druck und ist bereits im Frühstadium der Zirrhose ohne portalen Hypertonus vorhanden. Eine kurzfristige Gabe des Angiogenesehemmers Sorafenib kann die Dilatation der Leberarterie durch verminderte Stickstoffmonoxidkonzentration verhindern.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1 Einleitung	1
1.1 Definition und Pathophysiologie der portalen Hypertension	1
1.2 Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes	1
1.3 Hepatic arterial buffer response	4
1.4 Neoangiogenese	5
1.5 Vascular Remodeling	6
1.6 Veränderungen der Leberarterie bei Zirrhose	7
1.7 Der Multikinaseinhibitor Sorafenib	8
2 Ziele	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Versuchstiere	11
3.2 Induktion der Zirrhose und Behandlung mit Angiogenesehemmern	11
3.3 Bivaskuläre Leberperfusion mit Messung des sinusoidalen Drucks	12
3.4 Messung der Vasokonstriktion der Leberarterie mit Blockung von Stickstoffmonoxid	14
3.5 Berechnungen der Gefäßwiderstände	14
3.6 Messung des Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweges und von Angiogenesemarkern in der Leberarterie und der Leber mittels Western Blot	15
3.6.1 Probengewinnung	15
3.6.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode	15
3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	16
3.6.4 Western Blot	17
3.6.5 Antikörperdetektion	18
3.7 Messung der Fibrose und des Remodelings	18
3.8 Statistische Analyse	19
4 Ergebnisse	20
4.1 Basale Gefäßwiderstände	20
4.2 Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin	22
4.3 Western Blot	29
4.3.1 ERK Expression in der Leberarterie und im Lebergewebe	29
4.3.2 ENOS Expression in der Leberarterie und im Lebergewebe	29
4.3.3 VEGF R2 und VEGF Expression im Lebergewebe	30
4.3.4 PDGF A und PDGFR $\beta$ Expression im Lebergewebe	30
4.4 Messung von Fibrose und Remodeling	36

5	Diskussion	39
5.1	Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension	39
5.2	Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension	41
5.3	Therapiemöglichkeiten der Zirrhose/portalen Hypertension	42
5.4	Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension nach Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib	43
5.5	Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension nach Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib	43
6	Zusammenfassung	46
7	Literaturverzeichnis	47
8	Thesen	54

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ADH	Antidiuretisches Hormon
Akt	Protein Kinase B
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	Activator Protein-1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinonic Acid Solution
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kreisumfang
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
CYP2	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase 2
CYP3	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase 3
C8	Gruppe mit Zirrhoseinduktion über 8 Wochen
C12	Gruppe mit Zirrhoseinduktion über 12 Wochen
ddH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ERK1/2	Mitogen activated protein kinase
et al.	und andere
ET-1	Endothelin-1
Flk-1	Fetal Liver Kinase 1/ VEGF R2
Flt-1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
g	Gramm
GI	Gastrointestinal
GTP	Guanosintriphosphat

HABR	Hepatic arterial buffer response
HAR	Widerstand der Leberarterie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HRE	Hypoxia responsive elements
Hsp 90	Hitzeschockprotein 90
HSZs	Hepatische Sternzellen
HVPG	Hepatisch venöser Druckgradient
i.m.	Intramuscular
inf.	inferior
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KDR	Kinase insert domain receptor/ VEGF R2
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
L-NMMA	NG-Methyl-L-Arginin
LD	Gefäßdurchmesser
M	Mol pro Liter
mA	Mikroampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP13	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
µg	Mykrogramm
µl	Mykroliter
N	Anzahl der kleinen Gefäßmuskelzellen
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen

n.s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
PDGF A	Platelet-derived growth factor Untereinheit A
PDGFRβ	Platelet-derived growth factor Rezeptor β
PE	Probeexzision
phospho_eNOS	Phosphorylierte endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
phospho_MAPK	Phosphorylierte mitogen aktivierte Proteinkinase
phospho-ERK1/2	phospho_MAPK
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC α	Protein Kinase C alpha
PKC δ	Protein Kinase C delta
PKG	Proteinkinase G
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	Portalvenenwiderstand
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
rel.	relativ
Rho	Ras homolog gene family
Rho A	Ras homolog gene family, member A
ROS	Reactive Oxygen Species
RSH	Thiol
SDS	sodium dodecyl sulfat
sGC	Soluble guanylate cyclase
sup.	superior
SVR	Sinusoidaler Widerstand
S8	Gruppe mit Zirrhoseinduktion über 8 Wochen und Sorafenibgabe
S12	Gruppe mit Zirrhoseinduktion über 12 Wochen und Sorafenibgabe
S8-12	Gruppe mit Zirrhoseinduktion über 12 Wochen und Gabe von Sorafenib in den Wochen 8-12
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming Growth Factor β
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF R2	Vascular endothelial growth factor Rezeptor 2

vs.

versus

WT

Gefäßwandstärke

z.B.

zum Beispiel

ZMG

Zentrum für medizinische Grundlagenforschung

## **1 Einleitung**

Die Leberzirrhose ist eine Erkrankung mit hoher Inzidenz (250/100.000/Jahr) und ist gekennzeichnet durch knötchenförmige Regeneration und fibrotische Septen [1]. Die fibrotischen Septen entstehen durch eine abnormale Akkumulation von extrazellulärer Matrix in der Leber [2]. Die Fibrose kann dabei als Wundheilungsprozess nach Schädigung der Leber angesehen werden [2, 3]. Eine Schädigung der Leber wird in diesem Zusammenhang hauptsächlich durch chronischen Alkoholabusus, virale Hepatitiden (chronische Hepatitis B und -C), Medikamente, metabolische Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) oder autoimmune Zerstörung von Hepatozyten oder Gallengangsepithel hervorgerufen [4], wobei der chronische Alkoholabusus mit ca. 50% und die viralen Hepatitiden mit ca. 45% in der westlichen Welt die Hauptursachen für Leberzirrhose darstellen [5].

### **1.1 Definition und Pathophysiologie der portalen Hypertension**

Wesentliche Komplikation der Zirrhose ist die portale Hypertension, die für die Entstehung von Aszites und die Ausbildung von porto-systemischen Kollateralkreisläufen mit Ausbildung von Ösophagusvarizen, Ösophagusvarizenblutungen und hepatischer Enzephalopathie verantwortlich ist [6-9]. Ursache der portalen Hypertension ist einerseits der erhöhte intrahepatische Widerstand und andererseits der erhöhte Bluteinstrom in die Portalvene [10]. Der erhöhte Bluteinstrom über die Portalvene ist durch Vasodilatation im Splanchnikusgebiet bedingt [11].

### **1.2 Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes**

Ursachen für die Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes sind strukturelle, sowie funktionelle Veränderungen [10]. Strukturelle Veränderungen sind unter anderem Defenestration der Sinusoide, Einlagerung fibrotischen Materials in den Disse'schen Raum und Entwicklung von Regeneratknoten. Dadurch kommt es zur mechanischen Verengung der Sinusoide und entsprechender Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstands [12]. Die funktionelle Ursache des erhöhten intrahepatischen Widerstandes stellt die vermehrte intrahepatische Vasokonstriktion dar [13]. Der erhöhte intrahepatische Gefäßtonus ist einerseits Folge einer vermehrten Produktion von Vasokonstriktoren (hauptsächlich Endothelin-1) und andererseits einer verminderten Produktion von Vasodilatoren (hauptsächlich NO) [14, 15]. Der potenteste Vasokonstriktor des Gefäßsystems der Leber ist Endothelin-1 (ET-

1). Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von ET-1 bei Zirrhose um das vierfache ansteigt und die Dichte der Endothelinrezeptoren ebenfalls um 65% erhöht ist. Des Weiteren ist die Metabolisierung der Leber von ET-1 bei Zirrhose deutlich eingeschränkt. Es kommt weiterhin zu erhöhten Konzentrationen von TGF- $\beta$ , die in vitro humane HSZ's zur vermehrten Synthese von ET-1 stimulieren [16, 17]. All diese Mechanismen führen schlussendlich zu einer erhöhten Konzentration an ET-1.

Neben der erhöhten Expression von vasokonstriktorisches Mediatoren führt weiterhin eine Abnahme von Vasodilatoren zu einem erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstand. Der wichtigste Mediator der Vasodilatation ist Stickstoffmonoxid (NO). NO wird von den NO-Synthasen (NOS) produziert. Es gibt drei verschiedene Isoformen der NOS, wobei zwei in Gefäßen identifiziert wurden: die endotheliale NOS (eNOS), die ständig vorhanden ist und die induzierbare NOS (iNOS), welche eine de novo Synthese erfordert [18]. Vor allem durch eine verminderte Produktion von NO im sinusoidalen und postsinusoidalen Gefäßbett wird der erhöhte intrahepatische Widerstand bedingt. Der genaue Stoffwechselweg ist in Abbildung 1 dargestellt. Zusammenfassend kommt es zu einer verminderten Produktion bzw. vermehrten Inaktivierung von NO [19].

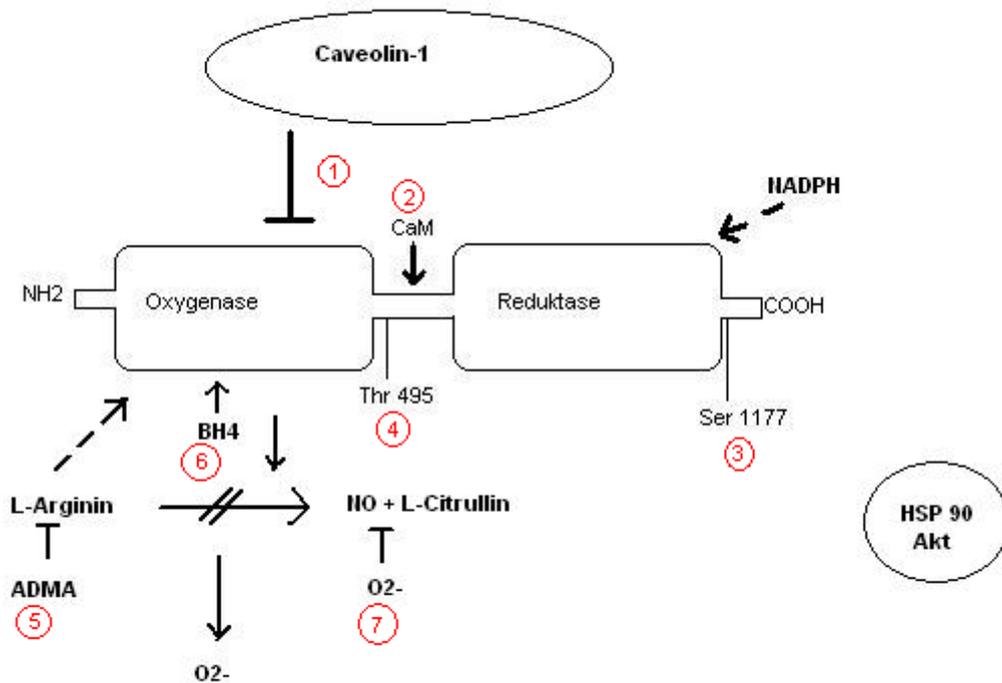


Abbildung 1: NO-Signalweg

Die endotheliale NO-Synthase besteht aus zwei Domänen, die Oxygenase und die Reduktase, diese sind über einen flexiblen Proteinstrang miteinander verbunden. Mit Hilfe der Reduktase werden Elektronen die für die NO-Synthese benötigt werden bereitgestellt, diese entstehen durch die Reduktion von NADPH und werden anschließend über den flexiblen Proteinstrang zur Oxygenasedomäne übertragen.

Die Lokalisierung der eNOS zu den Caveolae (Mikrodomänen der Plasmamembran) ist für eine optimale NO-Synthese erforderlich. (1) Caveolin-1 ein Haupthüllprotein der Caveolae interagiert mit der eNOS was zu einer Hemmung führt.

(2) Calmodulin (CaM) ist ein wesentlicher Aktivator der eNOS. Bindung von CaM an seinen spezifischen Bindungsort führt zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne.

(3) Weiterhin wird die eNOS Aktivität durch die Phosphorylierung am Serinrest 1177 reguliert. Die aktivierende Phosphorylierung erfordert die Rekrutierung der Kinase Akt und von Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90). Hsp 90 dient als ein Gerüst für eNOS und Akt.

(4) Die Phosphorylierung an Threonin 495 inaktiviert die eNOS.

(5) Die Bindung des Substrates L-Arginin an das katalytische Zentrum von eNOS kann durch den kompetitiven Antagonisten ADMA gehemmt werden.

(6) BH<sub>4</sub> ist ein erforderlicher Cofaktor für die NO-Synthese. Mangel an BH<sub>4</sub> kann zur Entkopplung der eNOS und und Produktion von Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) führen.

(7) Selbst wenn es zur Produktion von NO kommt, kann dieses durch O<sub>2</sub><sup>-</sup> schnell wieder inaktiviert werden.

(Mod. American Heart Association)

### 1.3 Hepatic arterial buffer response

Ein konstanter hepatischer Blutfluss sichert zum einen die Sauerstoffversorgung der Leber und zum anderen die blutflussabhängige Elimination von Stoffwechselprodukten und ist somit auch entscheidend für die richtige Konzentration an Nährstoffen und Hormonen [19]. Die Leber hat eine doppelte Blutversorgung durch die Portalvene und die Leberarterie. Insgesamt erhält sie 25% des gesamten Herzminutenvolumens, wobei 70-80% dieses Blutvolumens über die Portalvene erfolgen. Trotz des niedrigeren Sauerstoffpartialdruckes (40 mmHg) ist die Portalvene damit für etwa 50% des Sauerstoffangebotes der Leber mitverantwortlich. Demgegenüber wird über die Leberarterie mit den restlichen 20-30% des Gesamtleberblutflusses auf Grund der höheren Oxygenierung (Sauerstoffpartialdruck 100 mmHg) ebenfalls 50% des Sauerstoffangebotes an die Leber erreicht [20]. Die wesentliche Versorgung der Leber mit Blut erfolgt also über die Portalvene. Die Leber ist allerdings nicht in der Lage den portalen Blutfluss direkt zu kontrollieren. Die Äste der V. portae und die terminalen hepatischen Venolen sind funktionell nicht mit glatter Muskulatur ausgestattet. Die Sinusoide der gesunden Leber werden lediglich passiv durch das durchströmende Blut offen gehalten und enthalten keine glatte Gefäßwandmuskulatur [21]. Trotzdem hat die Leber verschiedene sehr effektive Mechanismen den Gesamtblutfluss der Leber relativ konstant zu halten. Durch einen verminderten Bluteinstrom in die Leber, über die Portalvene, kommt es zu einer kompensatorischen Zunahme der Leberdurchblutung über die Leberarterie (hepatic arterial buffer response (HABR)) [22-24]. Diese Zunahme der Durchblutung der Leberarterie ist unabhängig vom hepatischen Metabolismus, vielmehr ist es eine direkte Antwort auf den verminderten Blutfluss der Portalvene und somit auf das mangelnde Sauerstoffangebot. Dadurch werden Fluktuationen des Gesamtsauerstoffangebots und des Gesamtblutflusses der Leber minimiert. Dies ist vor allem wichtig, um bei kurzzeitigen Änderungen des portalen Blutflusses die Sauerstoffversorgung der Leber konstant zu erhalten und somit auch die hepatische Clearance von Medikamenten und Hormonen [23]. Die Regulation der Gefäßweite der Leberarterie scheint u.a. vom lokalen Adenosinspiegel abhängig zu sein. Adenosin, ein potenter Vasodilatator, wird kontinuierlich in den periarteriolären Raum der Leber ausgeschüttet. Es kann über das Portalblut abdiffundieren. Je geringer der portale Blutfluss ist, desto höhere Konzentrationen an Adenosin kumulieren im Bereich der Leberarterie und bewirken deren Dilatation (Washout-Hypothese) [23]. Die HABR konnte bereits bei Katzen, Hunden, Ratten, Schweinen und Menschen nachgewiesen werden [26-28]. Er kann eine 22 – 100 %ige Reduktion des portalen Blutflusses ausgleichen, je nach untersuchter Spezies [23, 27, 29-31].

## 1.4 Neoangiogenese

Hypoxie ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der Zirrhose. Sie initiiert einen intrazellulären Signalweg der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxia inducible factor- 1 (HIF-1) führt. HIF-1 bindet anschließend an regulierende Sequenzen, bekannt als hypoxia-responsive elements (HRE), in der Promotorregion einiger Gene, einschließlich VEGF. Er kontrolliert die Expression dieser Gene, als Reaktion auf die Hypoxie, was zur Adaptation der Zellen an das niedrige Sauerstoffangebot führt. Die HIF-1 Expression in der normalen Leber konnte mit 2-8% ermittelt werden, wobei sie bei Fibrose bereits 23,1% betrug und bei Zirrhose 60.9% [32]. HIF-1 wird bei Normoxie sehr schnell abgebaut und bei Hypoxie stabilisiert [32].

Die VEGF Expression ist durch Hypoxie induzierbar [33]. VEGF stellt ein potentes Mitogen für vaskuläre Endothelzellen dar [33, 34] und ist in vivo ein starker angiogenetischer Induktor [35]. VEGF aktiviert die Proliferation der Endothelzellen und die nachfolgende Formation eines endothelialen Tubulus [36, 37]. Es gibt zwei verschiedene Tyrosinkinaserzeptoren von VEGF: den KDR/Flk-1 Rezeptor, auch genannt VEGF R2 und den Flt-1 Rezeptor, auch genannt VEGF R1 [38]. VEGF Rezeptoren werden von allen Endothelien der Ratten exprimiert, fehlen jedoch auf allen nicht-endothelialen Zellen [34]. Die VEGF Ausschüttung wird bei Hypoxie erhöht, um durch die Bildung neuer Kapillaren die Sauerstoffversorgung zu erhöhen [1]. Die Neoangiogenese spielt bei der Pathogenese der Zirrhose eine entscheidende Rolle. Hierbei kommt es zur Bildung neuer Gefäße aus bereits existierenden Stromgebieten, wobei der VEGF-Rezeptor vermittelte Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 2) [39]. Die Effekte von VEGF werden bei Neoangiogenese primär über den VEGF R2 Rezeptor vermittelt [34, 40, 41]. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF und VEGF R2 bei Zirrhose in portosystemischen Kollateralen stärker exprimiert sind [42, 43]. Die VEGF vermittelten Effekte auf Permeabilität und Gefäßtonus sind an die Produktion von NO gekoppelt [44-46] und Ziche et al. konnten zeigen, dass die endotheliale NO-Synthase der Bindung von VEGF an seinem Rezeptor nachgeschaltet ist. Durch Unterbindung der NO-Produktion durch L-NMMA konnte so die angiogenetische Wirkung von VEGF geblockt werden [35]. NO spielt also auch bei der Angiogenese eine essentielle Rolle.

Bei Zirrhose liegt jedoch nicht nur eine Überexpression von VEGF und VEGF R2 vor, sondern auch von PDGF [47]. Während VEGF vor allem involviert ist in die Bildung neuer Blutgefäße, ist PDGF vor allem verantwortlich für die Reifung der neu gebildeten Blutgefäße (Rekrutierung von stützenden Wandzellen und Perizyten) und deren Stabilisation [48]. Durch die Kombination eines PDGF- und VEGF- Inhibitors konnte die portale Hypertension bei Ratten mit partieller Portalvenenligatur um 40% gesenkt werden. Hierbei war die Kombination der zwei Inhibitoren wirkungsvoller, als die Addition der Effekte bei Gabe jeder

einzelnen Substanz. Daraus kann man schließen, dass die VEGF- und PDGF-Signalwege einer synergistischen Regulation unterliegen. Auch die Bildung von porto-systemischen Kollateralen verringerte sich signifikant bei gemeinsamer Inhibition von VEGF und PDGF [47].

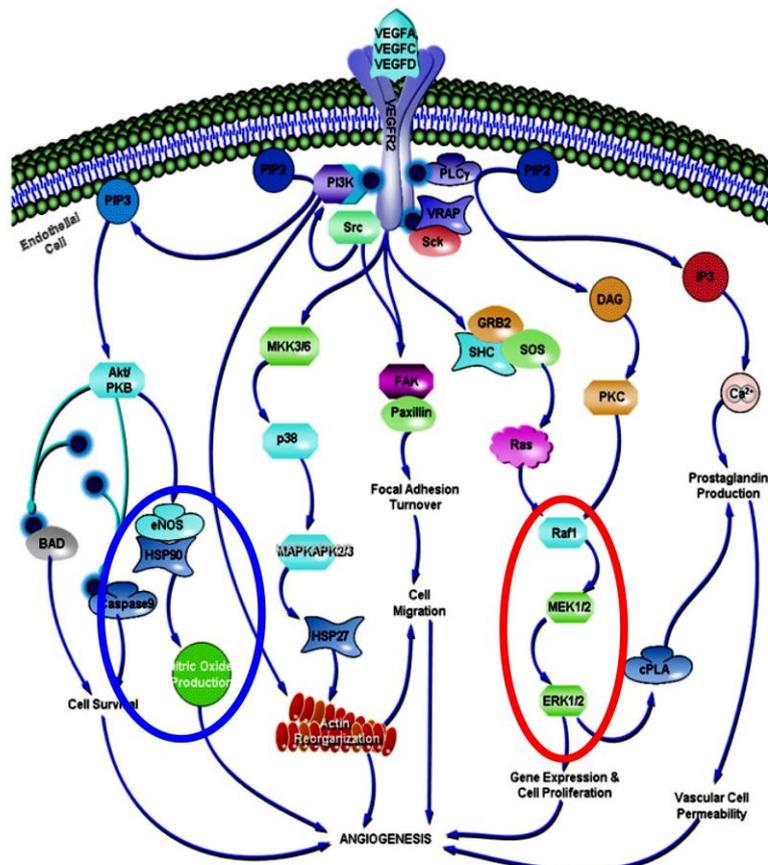


Abbildung 2: VEGF-Rezeptor mit Darstellung des RAF/MEK-Signalwegs (rote Markierung) sowie des Stickstoffmonoxid (NO)-Signalwegs (blaue Markierung) (mod. von SABiosciences)

## 1.5 Vascular Remodeling

Chronische Veränderungen des Blutflusses in Gefäßen verursacht Veränderungen der Gefäßarchitektur, um die auf die Gefäßwand einwirkenden Scherkräfte des Blutes zu normalisieren. Die Endothelzellen, zwischen Blut und glatter Muskulatur gelegen, sind in der Lage, die mechanischen Kräfte, durch Druck und Blutfluss hervorgerufen, wahrzunehmen und diese in biochemische Signale umzuwandeln, um Gefäßtonus und Gefäßstruktur zu

regulieren [49, 50]. Kommt es nun dauerhaft zu einem erhöhten Blutfluss mit entsprechender Dilatation des arteriellen Gefäßes und Reduktion des Gefäßwiderstandes, erfolgt eine strukturelle Adaptation und Umformung des Gefäßes. In diesem Sinne kommt es indirekt zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers durch Abnahme der Gefäßwanddicke und glatter Gefäßwandmuskulatur. Diese Effekte sind umso ausgeprägter, je stärker die Dilatation im arteriellen Gefäß ist [51]. Essentieller Mediator des Gefäßremodelings ist NO [52]. Durch die mechanischen Kräfte (shear stress) kommt es zur vermehrten Ausschüttung von NO. Bei verlängerter Aktivierung von NO kommt es zur vermehrten Expression des Genes der endothelialen NO-Synthase in vitro und in vivo und somit zur erhöhten NO-Produktion [53-55]. NO inhibiert die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen [56, 57], ist verantwortlich für eine neue Formation der Intima nach Verletzung [58] und bewirkt eine Endothelzellbewegung und deren Anordnung in neuen Gefäßen [59], sowie einen Extrazellulärmatrixumsatz [60]. All diese Ereignisse sind notwendig für Gefäßremodeling. In der Studie von Rudic et al. konnte gezeigt werden, dass NO einen Hauptregulator der Reorganisation von Gefäßen, als Reaktion auf einen Stimulus des Remodelings, darstellt. Beim Fehlen der eNOS blieb nicht nur der Gefäßdurchmesser normal, sondern die Stärke der Gefäßwand verdoppelte sich, entsprechend der Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand.[52].

## **1.6 Veränderungen der Leberarterie bei Zirrhose**

Die Leberarterie spielt bei Zirrhose eine besonders wichtige Rolle, da sie durch Zunahme des Blutflusses den verminderten Bluteinstrom über die Portalvene kompensiert. Bei einer relativ kurzfristigen Änderung des portalen Blutflusses kommt es entsprechend dem hepatic arterial buffer response zu einer Erhöhung des Blutflusses über die Leberarterie u.a. durch erhöhte lokale Adenosinpiegel [23]. Dass die HABR auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine große Rolle spielt, konnte bereits gezeigt werden. Richter et al. zeigten, dass es auch in zirrhatischen Lebern eine funktionell wirksame HABR gibt, der genau wie in der Normalleber über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann. Hierfür senkten sie den portalen Blutfluss über 6 Stunden - ohne eine signifikante Verschlechterung des HABR sowohl bei zirrhatischen als auch bei Normallebern festzustellen [61]. Bei einer chronischen Veränderung des Blutflusses kommt es entsprechend dem Gefäßremodeling zur strukturellen Adaptation und Umformung des Gefäßes mit indirekter Zunahme des Gefäßdurchmessers [51]. So hält die Leberarterie nicht nur den Gesamtblutfluss der Leber, sondern auch die Sauerstoffversorgung der Leber, relativ konstant [23]. Der erhöhte Bluteinstrom über die Leberarterie entsteht durch Vasodilatation

und einen somit gesenkten Gefäßwiderstand, was in Ratten mit CCl<sub>4</sub> induzierter Zirrhose gezeigt werden konnte [51, 62]. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Produktion von NO in der Leberarterie festgestellt [51]. Neben NO ist auch Adenosin an der Dilatation der Leberarterie beteiligt. Beide Mediatoren sind über eine Überexpression des Adenosin A1- Rezeptors verbunden. Der Adenosin A1- Rezeptor vermittelt eine Vasodilatation durch Erhöhung von NO nur unter hypoxischen Bedingungen [51, 63].

NO spielt ebenso eine entscheidende Rolle bei der Neoangiogenese, da eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase der Bindung von VEGF an seinem Rezeptor nachgeschaltet ist [35]. Tatsächlich konnte in der Leberarterie eine Neoangiogenese in der Zirrhose nachgewiesen werden [51].

Der erhöhte Blutfluss der Leberarterie entsteht demzufolge durch vermehrte Expression von Vasodilatoren (vor allem NO) und durch daraufhin folgende strukturelle Veränderungen der Gefäßwand, wie Abnahme der Gefäßwanddicke und glatter Gefäßwandmuskulatur, sowie Neoangiogenese [51].

## **1.7 Der Multikinaseinhibitor Sorafenib**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch antiangiogenetische Therapien der portale Druck bei portaler Hypertension gesenkt werden kann. In der Studie von Mejias et al. wurde dazu der Multikinaseinhibitor Sorafenib erfolgreich eingesetzt. Es konnten die splanchnische Neovaskularisation, die Bildung porto-systemischer Kollateralkreisläufe und der Grad der Fibrose gesenkt werden [39]. Auch bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC konnte bereits ein positiver Effekt von Sorafenib, durch Senkung des portalen Widerstandes, gezeigt werden [64]. Sorafenib blockt die Tyrosinkinase von VEGF R2 und PDGFR $\beta$ , genau wie die Raf/Threonin Kinase entlang des MEK/ERK Signalweges [65]. Sorafenib wird bereits erfolgreich an Patienten eingesetzt, zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms [66] und Hepatozellulären Karzinoms (HCC) [67]. Da Neoangiogenese hauptsächlich an arteriellen Gefäßen auftritt, könnte die Senkung des portalen Druckes bei Einsatz antiangiogenetischer Therapien auch zum Teil durch Veränderungen der Leberarterie bedingt sein. Die verschiedenen Mediatoren der Angiogenese könnten auch zu verschiedenen Zeitpunkten während der Zirrhoseentstehung in den verschiedenen Gefäßsystemen in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden sein. Die beobachtete Diskrepanz von vermehrter Angiogenese und erhöhter Expression des VEGF-Rezeptors, bei gleichzeitig erniedrigter VEGF Konzentration, ist beispielsweise bis jetzt noch ungeklärt [45]. VEGF ist möglicherweise in der initialen Phase der Angiogenese heraufreguliert, wofür deutlich erhöhte Konzentrationen von VEGF in den ersten Tagen nach Gallengangsligatur sprechen könnten [45].

Allerdings ist unklar, wann Dilatation, Neoangiogenese und Remodeling der Leberarterie in der Entwicklung der Zirrhose entstehen.

## **2 Ziele**

Ziele der Versuchsdurchführungen sind, Veränderungen und Anpassungen der Leberarterie während der Entwicklung der Zirrhose, bei Zirrhose ohne portaler Hypertonie und bei bereits etablierter Zirrhose mit portaler Hypertonie und Aszites zu untersuchen. Es sollen neue Erkenntnisse über die Rolle der arteriellen Leberperfusion bei Zirrhose und portaler Hypertension gewonnen werden. Während der Zirrhoseentstehung soll in An- und Abwesenheit vom Angiogenesehemmer Sorafenib das Remodeling, sowie die Neoangiogenese der Leberarterie untersucht werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Senkung des portalen Druckes bei antiangiogenetischer Therapie auch auf eine Blockung der Neoangiogenese der Leberarterie zurückzuführen ist.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten aus dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität. Zu Beginn der Zirrhoseinduktion waren die Tiere etwa vier Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 75-100 g.

Eine behördliche Genehmigung lag unter der Tierversuchsnummer 42502-843 MLU an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor.

Die Ratten wurden zu jeweils zwei Tieren in normierten Käfigen mit Standardeinstreu für Labortiere gehalten. Das Futter bestand standardisiert aus industriell hergestelltem Pelletfutter. Die Haltung erfolgte in klimatisierten Räumen (23°C, rel. Luftfeuchte 65%), mit einem 12 Stunden Hell-/Dunkel-Rhythmus.

#### **3.2 Induktion der Zirrhose und Behandlung mit Angiogenesehemmern**

Die Ratten wurden drei Mal pro Woche einer Inhalation von  $\text{CCl}_4$  ausgesetzt.

Dem Trinkwasser wurde 0,35g/l Phenobarbital zugesetzt, das über eine Enzyminduktion (Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen der Genfamilien 2 und 3 → CYP2, CYP3), zu einer schnelleren Zirrhoseentstehung beitragen soll.

Ab dem Zeitpunkt der ersten Inhalation, bis zum Tag der letzten Inhalation wurde dem Trinkwasser der Multikinase-Inhibitor Sorafenib (5mg/kg KG) zur Hemmung der Angiogenese zugesetzt. Zur Lösung des Sorafenibs wurden Methylmethansulfonate (99%) verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich den Trägerstoff (Methylmethansulfonate).

Die Induktion der Zirrhose erfolgte über 8 Wochen (C8 Gruppe) bzw. über 12-14 Wochen (C12 Gruppe) ohne Sorafenib bzw. über 8 Wochen (S8 Gruppe) bzw. über 12-14 Wochen (S12 Gruppe) mit Sorafenib, bis zum Vorliegen einer etablierten Zirrhose mit Aszites. In der dritten Gruppe der mit Sorafenib behandelten Ratten, erfolgte die Gabe nach Entwicklung der Zirrhose. Nach 8 wöchiger Zirrhoseinduktion mittels  $\text{CCl}_4$  und wurde bis zur vollendeten 12. Woche Sorafenib gegeben (S8-12 Gruppe) (Abbildung 3). Altersgleiche Ratten wurden als Kontrollratten (Gruppe N) benutzt. Die Durchführung der Perfusionen erfolgte 6- 10 Tage nach der letzten Behandlung mit  $\text{CCl}_4$  und der letzten Gabe von Sorafenib bzw. dem Trägerstoff.

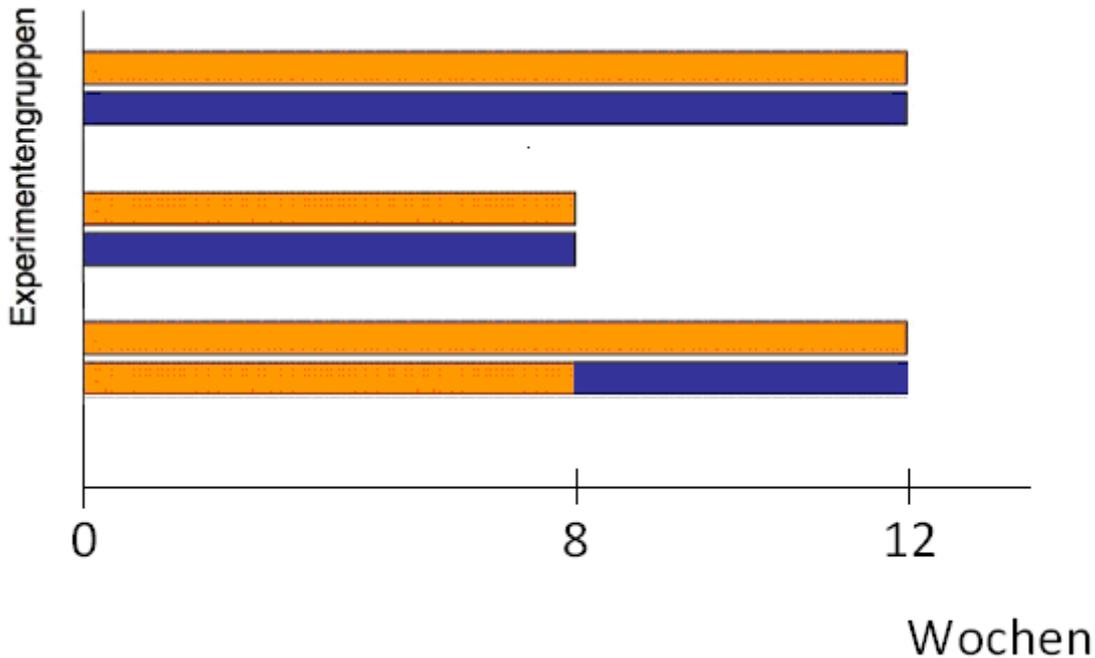


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Dauer der Induktion der Zirrhose. Behandlung jeweils einer Gruppe mit Sorafenib (blauer Balken) und einer Gruppe nur mit dem Trägerstoff (gelber Balken) bzw. einer Gruppe für 8 Wochen mit dem Trägerstoff und von Woche 8-12 mit Sorafenib.

### 3.3 Bivaskuläre Leberperfusion mit Messung des sinusoidalen Drucks

Die Ratten wurden mittels intramuskulärer Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (40 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Das Abdomen wurde eröffnet. Um die A. mesenterica sup. wurden, direkt nach ihrem Abgang aus der Aorta, offene Ligaturen platziert.

Im nächsten Schritt wurden Ligaturen um die Aorta, cranial des Abgangs des Truncus coeliacus und caudal des Abgangs der A. mesenterica superior gelegt. Zwei Äste des Truncus coeliacus, die A. gastrica sinistra und die A. lienalis, sowie die A. gastroduodenalis, ein Ast der A. hepatica communis wurden verschlossen. Anschließend wurde eine offene Ligatur um den Oesophagus gelegt. Weiterhin wurden die Aa. renales beidseits, nach Abgang aus der Aorta verschlossen. Es erfolgte nun die Kanülierung des Gallenganges (PE 10), um die Galleproduktion während des gesamten Experimentes zu messen.

Als nächster Schritt wurden offene Ligaturen um die Portalvene und die V. cava inf. platziert. Die Portalvene wurde nun mittels eines 14-Gauge Teflonkatheters kanüliert und die Perfusion mit einer Flussrate von 30 ml/min mit oxygenierter (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs-Henseleit Lösung, in einem nichtrezirkulierendem Modus gestartet.

Um die V. cava inf. mit einem 14-Gauge Teflonkatheter zu kanülieren, wurde diese eröffnet und anschließend die vorher gelegten offenen Ligaturen um die Portalvene und die V. cava inf. geschlossen. Anschließend erfolgte die Kanülierung der Aorta unterhalb des Abganges der A. mesenterica sup. mit einem 18-Gauge Teflonkatheter und es wurde die Perfusion mit 10 ml/min mit oxygenierter (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs-Henseleit-Lösung in nichtrezirkulierendem Modus begonnen. Um eine alleinige Perfusion der Leberarterie zu erreichen, wurden nun die offenen Ligaturen um den Oesophagus und die Aorta geschlossen. Da alle Äste der Aorta und des Truncus coeliacus, sowie der A. hepatica communis verschlossen wurden, erfolgte nun die alleinige Perfusion der Leberarterie durch den in die Aorta eingeführten Katheter (Abbildung 4).

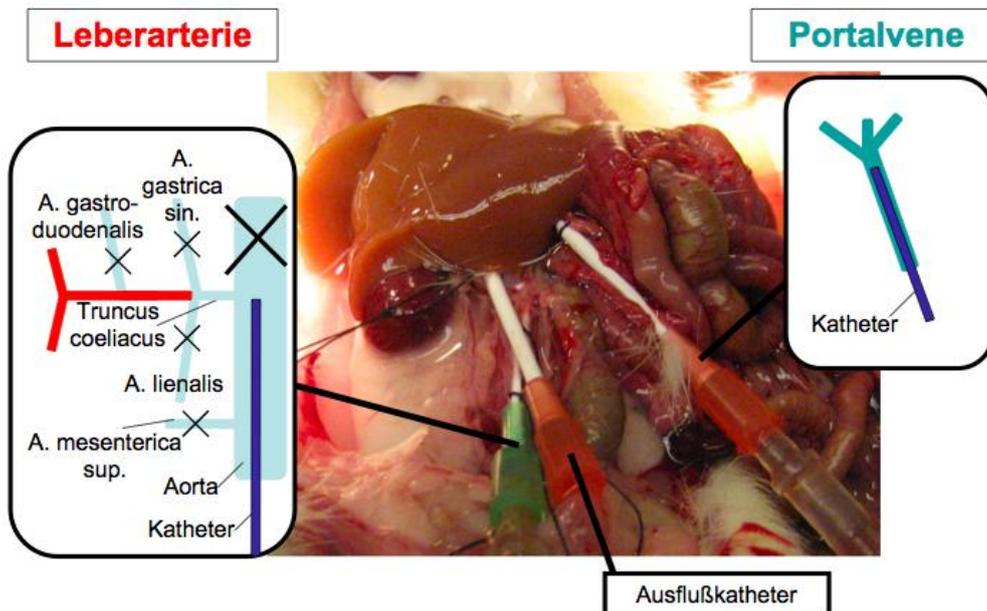


Abbildung 4: Schema zur Darstellung der bivaskulären Leberperfusion, mit Perfusion der Leberarterie und Portalvene. Nicht abgebildet ist die Messung des sinusoidalen Druckes.

Nach Beginn der bivaskulären Leberperfusion wurde die Eröffnung des Abdomens erweitert und der Thorax geöffnet. Es folgte die Öffnung des rechten Atriums. Nun wurde ein Katheter (PE 50) vom rechten Atrium aus über V. cava inf. so weit in die Lebervene vorgeschoben, bis eine geblockte (wegde) Position erreicht wurde. Diese diente als Voraussetzung für die Messung des sinusoidalen Druckes. Zur Sicherung der Position des Katheters wurde eine Ligatur um die V. cava inf. oberhalb des Zwerchfells gelegt und verschlossen. Es wurde eine 5-minütige Stabilisierungsperiode gestartet. Der Portalvenendruck, der Druck der Leberarterie und der Wedge-Druck wurden kontinuierlich von drei separaten Transducern (MLT 844, AD Instruments, USA) gemessen. Vor jedem Experiment wurden die Transducer

auf Höhe des rechten Atriums mit einer Zweipunktkalibrierung geeicht. Mittels eines PowerLab 8/30-Geräts (AD Instruments, USA), das mit den Transducern verbunden wurde, erfolgte die digitale Aufzeichnung der Druckkurven mittels Chart 5-Software (AD Instruments, USA).

### **3.4 Messung der Vasokonstriktion der Leberarterie mit Blockung von Stickstoffmonoxid**

Nach Beendigung der 5-minütigen Stabilisationsperiode, wurde die Versuchsanordnung auf einen rezirkulierenden Modus umgestellt, indem der Perfusionskreis geschlossen wurde. Während der Stabilisations- und der experimentellen Periode erfolgte eine Oxygenierung über eine zwischen dem Perfusionsreservoir und der Pumpe geschalteten künstlichen Lunge. Für die Dauer des gesamten Experiments wurde der Stickstoffmonoxidsynthetaseblocker L-NMMA-bzw. Pufferlösung (Krebs-Henseleit-Lösung) gegeben. Es wurde nun eine 21-minütige Inkubationszeit mit dem selektiven Stickstoffmonoxidsynthetaseblocker L-NMMA ( $10^{-4}$  M) bzw. mit dem Lösungsmittel (Krebs-Henseleit-Lösung) begonnen. Nach 19 Minuten wurde der Wedge-Katheter geschlossen und mit einer kontinuierlichen Messung des Wedge-Druckes begonnen. Um eine selektive Perfusion von Portalvene und Leberarterie sicher zu stellen, wurde der Perfusionskreis nun geöffnet. Ab der 21. Minute wurde kontinuierlich eine Dosis-Druck-Kurve der Leberarterie erstellt. Dabei erfolgte in einem Intervall von 2 Minuten die Gabe von Methoxamin (selektiver  $\alpha$ 1-Rezeptorblocker). Es wurden sechs verschiedene Dosen von Methoxamin in die Leberarterie infundiert, mit Konzentrationen von  $10^{-6}$  M bis  $3 \times 10^{-4}$  M. Am Ende jedes Experimentes wurden Leber und Milz entfernt und gewogen.

### **3.5 Berechnungen der Gefäßwiderstände**

Der Gefäßwiderstand der Leberarterie und der Portalvene wurden aus den entsprechenden Flussgeschwindigkeiten der Perfusionslösung und den gemessenen Drücken der Leberarterie bzw. der Portalvene nach dem Ohmschen Gesetz berechnet. Der sinusoidale Widerstand wurde aus der Gesamtleberperfusion und dem gemessenen sinusoidalen Druck (Wedge-Druck) ermittelt.

### **3.6 Messung des Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweges und von Angiogenesemarkern in der Leberarterie und der Leber mittels Western-Blot**

#### **3.6.1 Probengewinnung**

Die Tiere wurden mit Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (40 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert, das Abdomen eröffnet und die Leberarterie freipräpariert. Die Portalvene wurde mit Hilfe eines 14-Gauge Teflonkatheters kanüliert und die Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung begonnen. Als nächstes erfolgten die Eröffnung der Vena cava inferior und die Perfusion. Diese wurde 2-3 min. durchgeführt, bis das Perfusat klar war. Sofort wurden Leber und Leberarterie entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren. Die Proben wurden aufgetaut und das erhaltene Gewebe homogenisiert mit einer Lösung von 2% Triton-x-100, NaCl, EDTA, EGTA und Proteaseinhibitor. Die erhaltenen Lysate wurden 10 min. bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert und das Pellet verworfen.

#### **3.6.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode**

Mittels BCA-Methode (Bicinchoninsäure - Bicinchoninic acid) wurde die genaue Proteinlösungsmenge jeder Probe ermittelt. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit aus. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ - Ionen werden zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonon-Säure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Durch die Stärke der Absorption, kann man in Beziehung zur Absorption des Proteinstandards mit bekannter Konzentration, die Proteinlösungsmenge der Proben ermitteln. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA). Es wurden folgende Verdünnungen des Standards eingesetzt: 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Von den Proben wurde eine 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl hergestellt. Je 10  $\mu\text{l}$  der Probenverdünnung und der Standardreihe wurden untereinander in eine 96-Well Platte pipettiert, alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Zu jeder Probe und jedem Standard wurden nun 200  $\mu\text{l}$  BCA- Reagenzlösung (1 Teil Cooper 2 enthält die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und 49 Teile BCA) gegeben und die Proben bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 20 min. im Wärmeschrank mit Rüttler inkubiert. Anschließend erfolgten die Messung im Mikroplattenreader bei 655 nm und die Erstellung der Eichgerade, sowie die Ermittlung der genauen Proteinlösungsmengen jeder Probe, durch das Programm Microplate Manager. Die Menge jeder Probe, die 20  $\mu\text{g}$  gelöstes Protein enthielt, wurde in ein extra Gefäß pipettiert.

### 3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine (20µg) wurden mit 15 µl SDS Probenpuffer gemischt (SDS, β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, pH 6,8). Dies ermöglicht die Auftrennung der Proteine der Größe nach. Die Proteine werden vollständig denaturiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zur gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS und es entsteht ein konstantes Ladungs-/Masse Verhältnis. Die negative Proteinlösung ist proportional zum Molekulargewicht der Proteine, somit ist die Laufstrecke proportional zur Größe der Proteine. β- Mercaptoethanol ist für die Trennung der Disulfidbrücken verantwortlich und ermöglicht so die Wanderung der einzelnen Monomere. Bromphenolblau dient dem sichtbar machen der Lauffront während der Elektrophorese. Die Proben wurden kurz im Vortexer gemischt und für 5 min. im Thermomixer bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für wenige Sekunden zentrifugiert.

Die Lösungen für die Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

<u>10% Trenngel</u>	<u>30ml</u>
Polyacrylamid	10,00 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,50 ml
Aqua dest.	12,04 ml
10% SDS	300 µl
TEMED	15 µl
10% APS	150 µl

<u>9% Sammelgel</u>	<u>10 ml</u>
Polyacrylamid	3,00 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,50 ml
Aqua dest.	4,35 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	5 µl
10% APS	50 µl

<u>Tris-HCl, pH 8,8</u>	<u>1,5 M</u>
Tris	27,23 g
ddH <sub>2</sub> O	150 ml

<u>Tris-HCl, pH 6,8</u>	<u>0,5 M</u>
Tris	6 g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

Die Polymerisation entsteht durch Wechselwirkung von APS und TEMED, durch die Bildung freier Radikale. Das Trenngel wurde in die Kammer gefüllt und bis zum oberen Rand mit Ethanol aufgefüllt. Dadurch entsteht eine glatte Geloberfläche und das Trenngel kann unter Luftabschluss auspolymerisieren. Nach der Auspolymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert, anschließend wurde ein Kamm eingesetzt. Durch das Vorhandensein des Kamms im Sammelgel, während dessen Auspolymerisation, entstehen die einzelnen Taschen (Slots), in die später die Proben gefüllt werden. Nach Auspolymerisation des Sammelgels wurde die Gelkammer mit 1x Laufpuffer (Tris, Glycine, 10% SDS) aufgefüllt und der Kamm herausgezogen. In den ersten Slot wurde ein Molekulargewichtsmarker gefüllt. Mit Hilfe des Markers ist eine spätere Zuordnung der aufgetrennten Proteine zu einem Molekulargewicht möglich. Anschließend wurden die einzelnen Proben der Reihe nach in die Slots pipettiert. Die Elektrophoreseapparatur wurde an den Strom angeschlossen und auf 30 mA gestellt. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde der Strom auf 65 mA gestellt. Die Abschaltung des Stromes erfolgte, als die Bromphenolblaufront die Gelunterkante erreicht hatte. Anschließend wurde die Elektrophoreseapparatur auseinander gebaut. Das Sammelgel wurde nun vom Trenngel getrennt und das Trenngel 2x 10 min. in 1x Transferpuffer (Tris, Glycin, 10% SDS) gewaschen.

### **3.6.4 Western Blot**

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine, in einer Transferkammer, vom Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) übertragen, da diese in der Lage ist, Proteine zu binden. Die Grundmaterialien für PVDF sind Fluorwasserstoff und Methylchloroform, die zu Chlordifluorethan und weiter zu Vinylidenfluorid umgesetzt werden. Auf Grund der guten chemischen und thermischen Beständigkeit, sowie Stabilität, eignen sich diese Membranen besonders gut. Als erster Schritt wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol aktiviert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann wurde sie für mindestens 2 min. in 1x Transferpuffer gelegt. Zwei Filterpapiere wurden zugeschnitten und zusammen mit zwei Schwämmen ebenfalls in 1x Transferpuffer überführt.

Ein Schwamm wurde auf die Anodenseite des Blotgerätes platziert, darauf ein Filterpapier und als nächstes das Trenngel. Über das Trenngel wurde die PVDF-Membran gelegt und mit einem Filterpapier und einem Schwamm überschichtet. Luftblasen wurden mit Hilfe einer Glaspipette eliminiert. Die Transferkassette wurde nun in der Blotanlage befestigt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Die Kammer wurde nun für 3 Stunden bei 250 mA und anschließend für 30 min. bei 500 mA an den Strom angeschlossen. Nun wurde die Kammer auseinander gebaut und der Marker mit Kugelschreiber markiert.

### **3.6.5 Antikörperdetektion**

Zur Antikörperdetektion wurde die PVDF-Membran zunächst mit 5% Blotto (Milchpulver, Tris, NaCl, Tween 20) geblockt, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern für 2 Stunden. Hierbei wurden Antikörper gegen eNOS Type 3, phospho-eNOS, VEGF, VEGFR-2, PDGFR- $\beta$ , PDGF A, MAPK, phospho-MAPK in der Leberarterie und in der Leber verwendet. Als Referenz wurden Antikörper gegen  $\beta$ -Actin (Teil des Cytoskelettes jeder Zelle, sollte daher in jeder Probe gleich exprimiert sein) eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die PVDF-Membran 3 mal für 5 min. in 1% Blotto gespült. Anschließend wurden die Blots für eine Stunde mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran für 3x 10 min. mit 1x Blotto gewaschen. Die durch Immunreaktionen entstandenen Banden wurden anschließend mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht und auf einen Röntgenfilm entwickelt. Hierfür wurde die Membran für 2 min. in 8 ml ECL-Lösung (Lösung A und B, 1:1) inkubiert, mit Haushaltsfolie eingewickelt und mit der Proteinseite nach oben in eine Photokassette überführt. Der Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und die Kassette geschlossen. Die Entwicklungszeiten waren an die jeweiligen Primärantikörper angepasst. Die Entwicklung wurde im Labor Molekulare Hepatologie der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I durchgeführt.

### **3.7 Messung der Leberfibrose und des Remodelings**

Aus dem rechten Leberlappen wurden sorgfältig Gewebeproben entnommen und mittels Hämatoxylin - Eosin (HE) und Sirius red angefärbt. Mit Hilfe der Video - Mikroskopie wurden die morphometrischen Analysen der arteriellen Gefäße der gesamten Probe durchgeführt. Die Abbildung der Probe wurde auf einem Computer erfasst und angezeigt, wobei ein Imageanalyseprogramm verwendet wurde. Die Fibrose, sowie die rot angefärbte Fläche, in

Bezug zur Gesamtfläche, wurden mittels Image J Software gemessen. Für die morphometrischen Analysen wurde der Umfang des Gefäßlumens in jedem Gefäß doppelt gemessen und der Mittelwert als Kreisumfang genommen. Der Gefäßdurchmesser wurde aus der Gleichung  $LD=C/\pi$  ( $LD$ =Gefäßdurchmesser;  $C$ =Kreisumfang) berechnet, in Annahme, dass der Gefäßquerschnitt in vivo rund war. Jeweils doppelt, als linearer Abstand zwischen Endothel und Adventitia, wurde die Wandstärke in jedem Gefäß achtmal gemessen (alle  $45^\circ$ ) und die Werte gemittelt. Die Hämatoxylin positiven Nuclei wurden in jedem Gefäß ausgezählt. Um verschiedene Gefäße miteinander vergleichen zu können, wurde das Verhältnis von Wandstärke zu Gefäßdurchmesser und die Anzahl Hämatoxylin positiven Nuclei pro Gefäßdurchmesser berechnet. Diese Werte wurden anschließend benutzt, um die verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen. Die morphometrischen Analysen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, wobei einer zu den Perfusionsergebnissen verblindet war.

### **3.8 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse werden dargelegt, als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Für Vergleiche zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurde der Mann – Whitney Test verwendet, sowie die One-Way-ANOVA für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen. Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festzustellen, wurde der Bonferroni Test angewendet. Der Vergleich für wiederholte Messungen wurde mittels multivariater Analyse von wiederholten Messungen bewertet, gefolgt vom Bonferroni Test, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festzustellen,  $p$ -Werte  $\leq 0.05$  wurden als signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

Von allen untersuchten Tieren, die während der gesamten Zirrhoseinduktion Sorafenib über ihr Trinkwasser erhielten, wurde es gut toleriert. Es waren keine Zeichen der Toxizität, wie Diarrhö, Hämorrhagien oder reduziertes Körpergewicht feststellbar und es kam zu keiner Medikamenten induzierten Übersterblichkeit.

### 4.1 Basale Gefäßwiderstände

Die Werte der basalen Gefäßwiderstände der Leberarterie, der Portalvene und der sinusoidale Gefäßwiderstand sind in Tabelle 1 dargestellt. Die erste Teilfragestellung beschäftigte sich mit dem Zeitpunkt der Dilatation der Leberarterie. Zirrhotische Tiere mit einer portalen Hypertension (C12) und Aszites hatten, wie bereits in einer früheren Arbeit unserer Gruppe gezeigt, einen signifikant niedrigeren Gefäßwiderstand in der Leberarterie, verglichen mit der Kontrollgruppe (N; Abbildung 5). Interessanterweise zeigten auch zirrhotische Ratten ohne portale Hypertension (C8) einen signifikant niedrigeren basalen Gefäßwiderstand in der Leberarterie, verglichen mit der Kontrollgruppe (N). Die basalen Gefäßwiderstände zwischen den beiden Zirrhosegruppen (C8 vs. C12) unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Nach Gabe von Sorafenib war der Widerstand der Leberarterie im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe (N) zu keinem Zeitpunkt signifikant erniedrigt. In den Gruppen S8 und S12 entsprach der Widerstand dem der Normaltiere und selbst nach Gabe von Sorafenib bei bereits entwickelter Zirrhose (S8-12) war der Widerstand nicht signifikant verschieden zur Kontrollgruppe. Vergleicht man die Zirrhosegruppen miteinander, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erniedrigung des Widerstandes der Leberarterie der beiden Zirrhosegruppen (C8 und C12) im Vergleich mit der frühen und etablierten Zirrhose mit Sorafenibbehandlung (S8 und S12).

Der Widerstand der Portalvene (PVR), sowie der sinusoidale Widerstand (SVR) waren nach 12 wöchiger Behandlung mit  $\text{CCl}_4$  signifikant erhöht im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls bei zirrhotischen Tieren als auch bei den mit Sorafenib behandelten Tieren. Es gab weiterhin keine Unterschiede zwischen den beiden Zirrhosegruppen mit und ohne Behandlung von Sorafenib (C12 vs. S12).

Nach 8 wöchiger Behandlung mit  $\text{CCl}_4$  gab es keine signifikanten Unterschiede der beiden Zirrhosegruppen verglichen mit den Normaltieren.

Interessanterweise gab es ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Tieren nach 8 wöchiger Behandlung mit CCl<sub>4</sub> und den Tieren mit etablierter Zirrhose, die erst zwischen 8. und 12. Woche mit Sorafenib behandelt wurden (C8 vs. S8-12). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem basalen Leberarterienwiderstand und dem portalvenösen, sowie dem sinusoidalen Gefäßwiderstand in den Zirrhoseratten.

Tabelle 1: basale Gefäßwiderstände der verschiedenen Gruppen

	Kontrollgruppe (N)	Zirrhose Woche 8 (frühe Zirrhose C8)	Zirrhose Woche 12 (späte Zirrhose C12)	Sorafenib Woche 8 (frühe Zirrhose S8)	Sorafenib Woche 12 (späte Zirrhose S12)	Sorafenib Woche 8 bis Woche 12 (S8-12)
<b>Widerstand der Leberarterie (HAR;</b>	8.9± 0.9	5.6± 0.7*	5.9± 0.9 <sup>§</sup>	8.8± 1.2 <sup>#</sup>	9.4± 1.1 <sup>#</sup>	7.7± 1.9
<b>Widerstand der Portalvene (PVR;</b>	0.25± 0.03	0.26± 0.03	0.63± 0.14*	0.36± 0.08	0.55± 0.10*	0.27± 0.06
<b>Sinusoidaler Widerstand (SVR;</b>	0.09± 0.01	0.12± 0.01	0.21± 0.04*	0.12± 0.02	0.25± 0.04*	0.14± 0.07

\*p≥0.02 in Bezug zur Kontrollgruppe (N)

§p=0.08 in Bezug zur Kontrollgruppe (N)

#p>0.05 in Bezug zu den Zirrhosegruppen (C8 und C12)

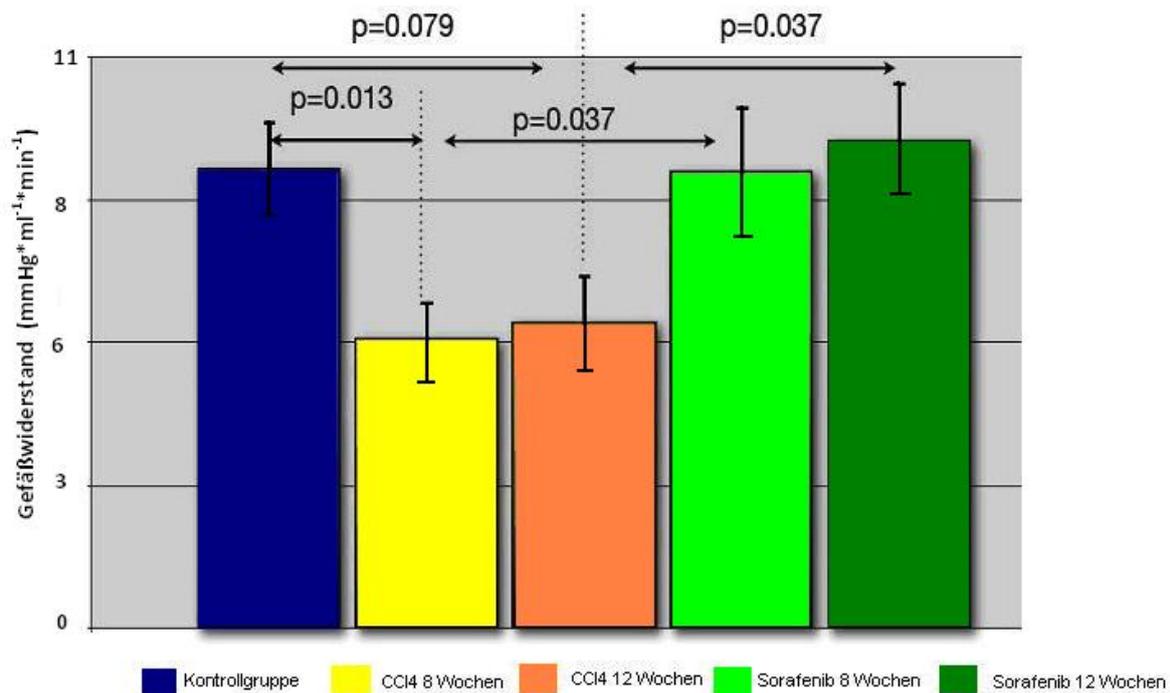


Abbildung 5: Widerstand der Leberarterie bei Kontrollen (Gruppe N), Zirrhosetieren nach 8 und 12 wöchiger CCl<sub>4</sub> Behandlung (Gruppe C8 und C12) ohne und mit Sorafenibgabe (Gruppe S8 und S12)

#### 4.2 Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin

Die Dosis-Wirkungskurven der Leberarterie mit Methoxamin der Ratten im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension (C8 und S8) sind in der Abbildung 6 und 7 dargestellt. Die Zirrhosegruppe (C8) zeigte ein deutlich geringeres Ansprechen auf Methoxamin im Vergleich zur Kontrollgruppe (N). Die Sorafenibgruppe (S8) zeigte demgegenüber keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (N). Zudem zeigte sich ein Unterschied zwischen den zirrhosischen Gruppen mit und ohne Sorafenib, mit höheren Gefäßwiderständen in der Sorafenibgruppe. Nach Inkubation mit dem NO-Synthaseblocker L-NMMA erhöhte sich das Ansprechen lediglich in der Zirrhosegruppe (C8; Abbildung 7), so dass sich nun nach Gabe von L-NMMA keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen mehr aufzeigen ließen. Die Dosis-Wirkungskurven der Leberarterie mit Methoxamin der Ratten mit Zirrhose und portaler Hypertension (C12 und S12) sind in der Abbildung 8 und 9 dargestellt. Zirrhosische Ratten mit portaler Hypertension (C12) zeigten ein deutlich geringeres Ansprechen auf Methoxamin im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe (N).

Nach Gabe von Sorafenib (S12) konnte hier im Gegensatz zu den Tieren mit beginnender Zirrhose eine geringere Kontraktion jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den anderen beiden Gruppen festgestellt werden. Die Sorafenibgruppe lag zwischen Zirrhosegruppe (C12) und Kontrollgruppe (N). Der maximale Gefäßwiderstand der Leberarterie war in den Kontrolltieren (N) signifikant höher als in den Zirrhosetieren (C12;  $25.2 \pm 0.7$  vs.  $17.3 \pm 2.0$  mmHg\*min<sup>-1</sup>\*ml<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ). Dies zeigte sich ebenfalls bei Tieren nach Sorafenibgabe (S12) verglichen mit den Kontrolltieren ( $19.5 \pm 1.4$  mmHg\*min<sup>-1</sup>\*ml<sup>-1</sup>;  $p = 0.001$ ). Zwischen beiden Zirrhosegruppen (C12 und S12) bestand hingegen kein Unterschied ( $p = 0.25$ ).

Nach Inkubation mit L-NMMA ließen sich keinerlei Unterschiede mehr zwischen den drei Gruppen mehr feststellen (Abbildung 9). Der maximale Gefäßwiderstand in Anwesenheit von L-NMMA hingegen war weiterhin erniedrigt in beiden Zirrhosegruppen (C12:  $19.89 \pm 4.38$  mmHg\*min<sup>-1</sup>\*ml<sup>-1</sup>; S12:  $20.88 \pm 3.27$  mmHg\*min<sup>-1</sup>\*ml<sup>-1</sup>) im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe (N:  $25.71 \pm 1.72$  mmHg\*min<sup>-1</sup>\*ml<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ).

In der Dosis-Wirkungskurve der Leberarterie mit Methoxamin der zirrhatischen Ratten nach Sorafenibgabe zwischen der 8. und 12. Woche (S8-12) zeigte sich ein höheres Ansprechen im Vergleich mit den zirrhatischen Ratten (C12). Nach Gabe von L-NMMA zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Ansprechens. Die Dosis-Wirkungskurve war vergleichbar mit der Kurve nach längerfristiger Gabe von Sorafenib (S12) (Abbildung 10).

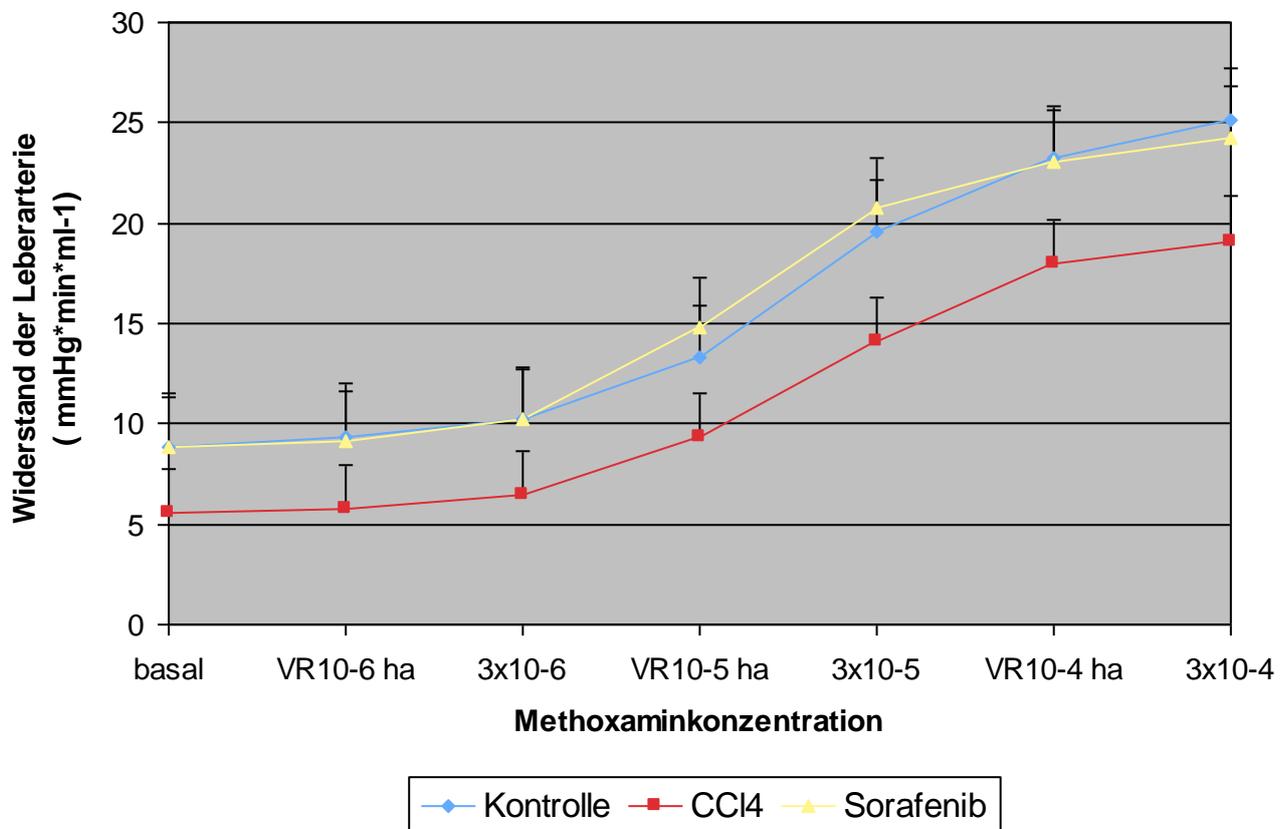


Abbildung 6: Dosis- Wirkungskurven mit Metoxamin bei Zirrhosetieren mit 8 wöchiger CCl<sub>4</sub> Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie; Kontrolle vs. CCl<sub>4</sub> p=0.046; Kontrolle vs. Sorafenib p=1.00; CCl<sub>4</sub> vs. Sorafenib p=0.068

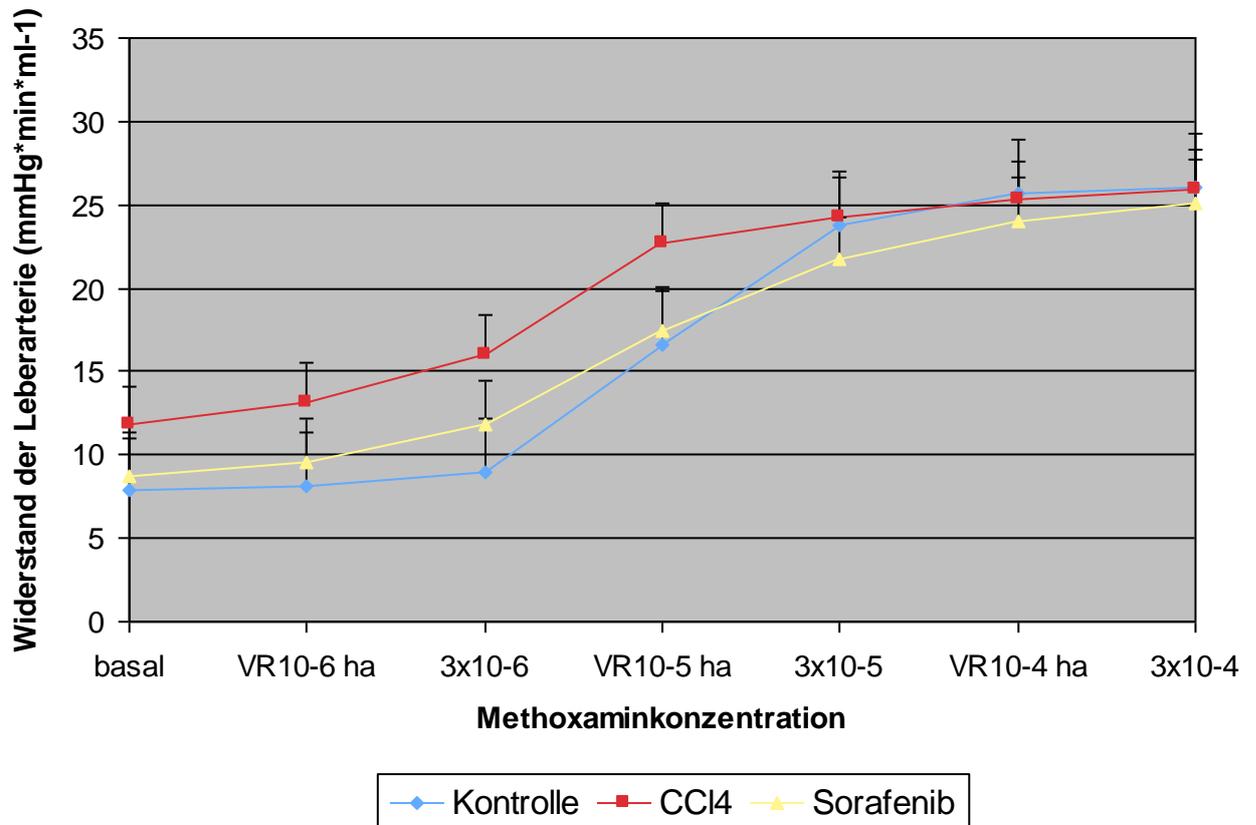


Abbildung 7: Dosis- Wirkungskurven mit Metoxamin bei Zirrhosetieren mit 8 wöchiger  $\text{CCl}_4$  Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie in Anwesenheit des NO Synthase Blockers L-NMMA; Kontrolle vs.  $\text{CCl}_4$   $p=0.013$ ; Kontrolle vs. Sorafenib  $p=1.00$ ;  $\text{CCl}_4$  vs. Sorafenib  $p=0.038$

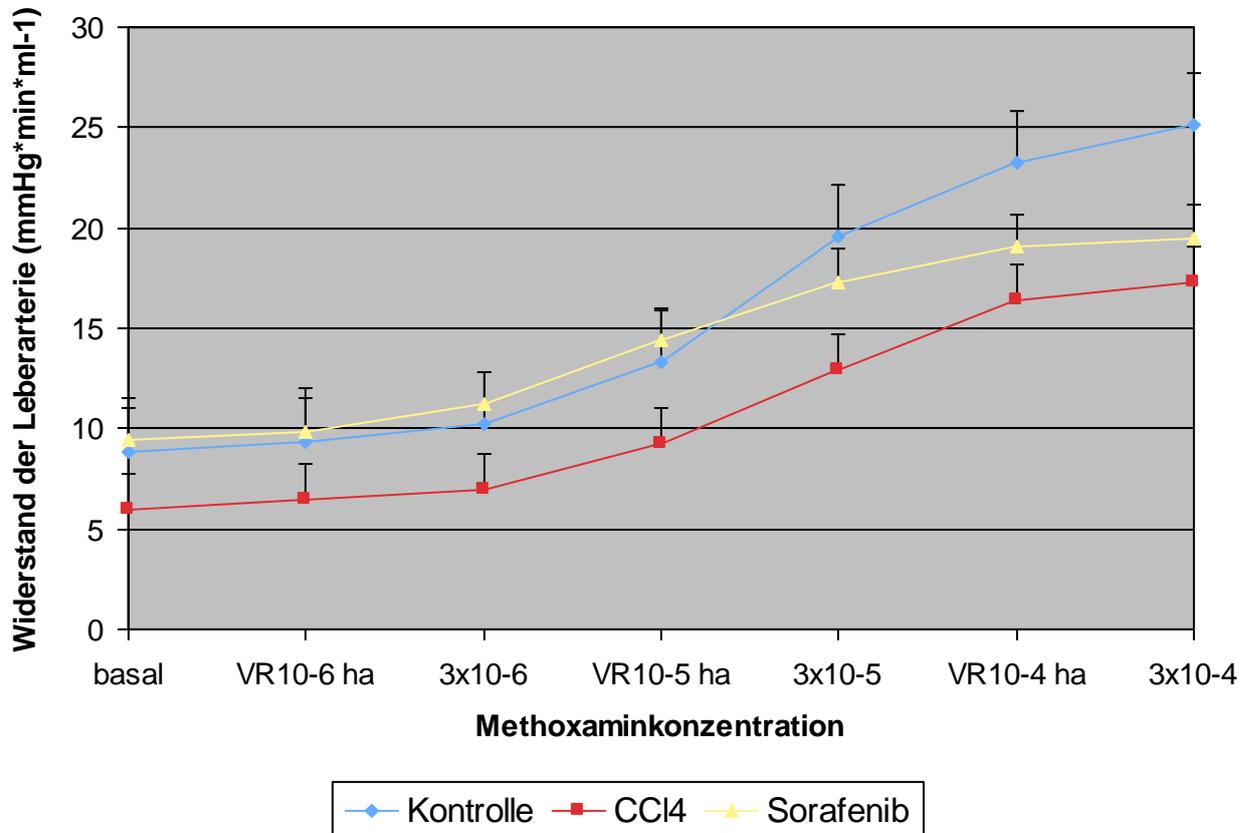


Abbildung 8: Dosis- Wirkungskurven mit Methoxamin bei Zirrhosetieren mit 12 wöchiger CCl<sub>4</sub> Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie; Kontrolle vs. CCl<sub>4</sub> p=0.162; Kontrolle vs. Sorafenib p=0.206; CCl<sub>4</sub> vs. Sorafenib p=1.00

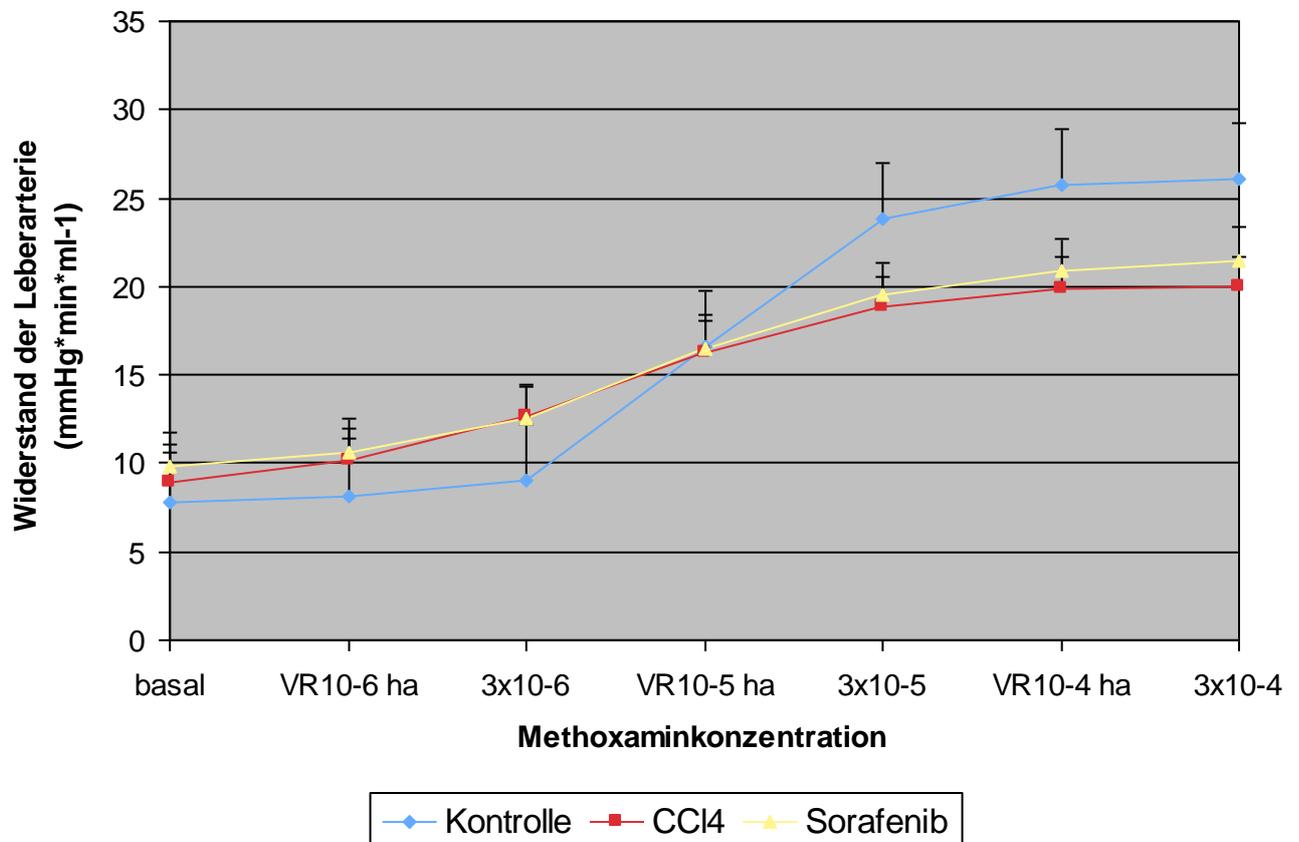


Abbildung 9: Dosis- Wirkungskurven mit Methoxamin bei Zirrhosetieren mit 12 wöchiger  $\text{CCl}_4$  Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie, in Anwesenheit des NO-Synthase Blockers L-NMMA; Kontrolle vs.  $\text{CCl}_4$   $p= 0.047$ ; Kontrolle vs. Sorafenib  $p= 0.034$ ;  $\text{CCl}_4$  vs. Sorafenib  $p= 1.00$

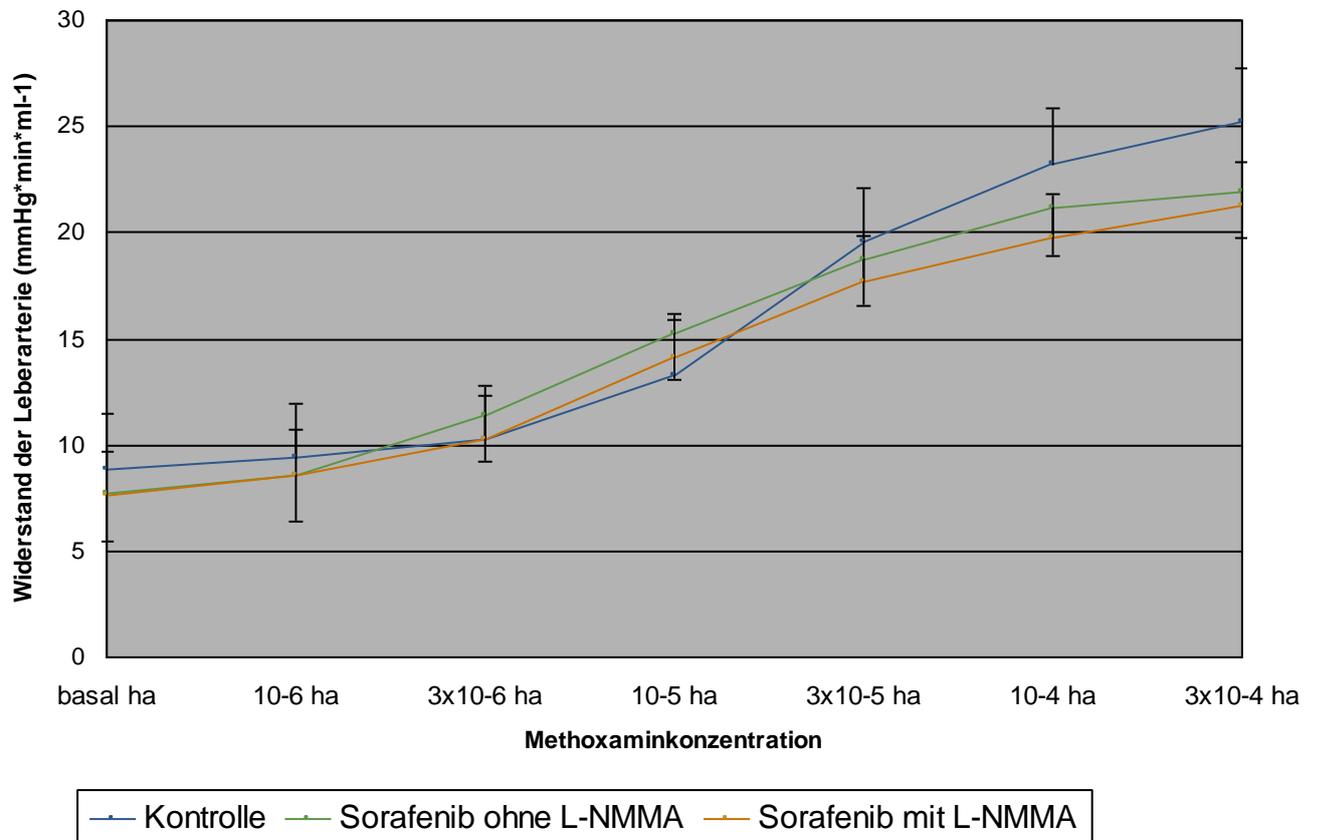


Abbildung 10: Dosis- Wirkungskurven mit Methoxamin bei Zirrhosetieren nach Zirrhoseentwicklung (S8-12) und Kontrolltieren in der Leberarterie.

## 4.3 Western Blot

### 4.3.1 ERK Expression in der Leberarterie und der Leber

Die Expression von ERK1/2 und phospho-ERK1/2, in der Leberarterie, waren signifikant unterschiedlich zwischen den drei Versuchsgruppen ( $p=0.003$  und  $p=0.023$ ; Abbildung 11). Die Expression von ERK1/2 und phospho-ERK1/2 war signifikant erhöht in der Arterie der zirrhotischen Tiere ohne portale Hypertension (C8) verglichen mit den Kontrolltieren (N;  $p=0.002$  und  $p=0.02$ ). Im Gegensatz dazu lagen die Werte der entsprechenden Sorafenibgruppe (S8) für ERK1/2 und phospho-ERK1/2 unterhalb der Zirrhosegruppe (C8) und oberhalb der Kontrollgruppe (N).

Im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension, entsprechend einer 12 wöchigen  $\text{CCl}_4$  Behandlung waren keine signifikanten Unterschiede in der ERK1/2 und phospho-ERK1/2 Expression mehr feststellbar (Abbildung 12).

Im Lebergewebe zeigte sich ein vergleichbares Bild. Die ERK1/2 Expression war signifikant unterschiedlich in der Gruppe ohne portale Hypertension ( $p=0.002$ ), wobei in der Zirrhosegruppe (C8) eine erhöhte Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe (N) zu verzeichnen war ( $p=0.002$ ). In der Sorafenibgruppe (S8) befand sich die Expression wie bei der Leberarterie unterhalb der Zirrhosegruppe (C8) und oberhalb der Kontrollgruppe (N; Abbildung 13).

Die Expression von ERK1/2 in der Gruppe mit portaler Hypertension zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p=0.014$ ), wobei es in der Zirrhosegruppe (C12) zu einer erhöhten Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe (N) kam ( $p=0.014$ ). In der Sorafenibgruppe (S12) war, ähnlich der Gruppe ohne portale Hypertension eine erniedrigte Expression im Gegensatz zur Zirrhosegruppe (C12) und eine erhöhte Expression im Gegensatz zur Kontrollgruppe (N) darstellbar (Abbildung 14).

Phospho-ERK1/2 war nicht signifikant unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen mit und ohne portaler Hypertension (Abbildung 13 und 14).

### 4.3.2 eNOS Expression in der Leberarterie und der Leber

Die eNOS Expression der verschiedenen Gruppen in der Leberarterie war signifikant unterschiedlich in den Tieren ohne portale Hypertension ( $p=0.036$ ). Wie in der Abbildung 11 ersichtlich, zeigten die Western Blots der Leberarterien eine höhere eNOS Expression der Zirrhosegruppe ohne portale Hypertension (C8) verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe, welche grenzwertig signifikant war (N;  $p=0.06$ ). Durch Sorafenibgabe

verringerte sich die Expression von eNOS bei den zirrhotischen Tieren ohne portale Hypertension (S8), wobei sich die Werte der Expression der Kontrollgruppe annäherten ( $p=n.s.$ ; Abbildung 11).

Im Gegensatz dazu, zeigte sich die eNOS Expression nicht signifikant verschieden in den Leberarterien der Tiere mit portaler Hypertension (Abbildung 12).

In der Leber zeigte sich keine unterschiedliche eNOS Expression für die verschiedenen Gruppen, sowohl nach 8 wöchiger, als auch nach 12 wöchiger Behandlung mit  $CCl_4$  (Abbildung 13/14).

#### **4.3.3 VEGF R2 und VEGF Expression in der Leber**

Die Expression von VEGF R2 war in den Gruppen ohne portale Hypertension signifikant unterschiedlich ( $p=0.015$ ). In den zirrhotischen Lebern ohne portale Hypertension (C8), gab es eine höhere Expression von VEGF R2 im Vergleich zu den Lebern mit zusätzlicher Sorafenibgabe (S8;  $p=0.015$ ; Abbildung 13).

Bei den Tieren mit portaler Hypertension konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Abbildung 14).

Die VEGF Expression war nicht signifikant verschieden in den Lebern der drei Gruppen mit und ohne portaler Hypertension (Abbildung 13/14).

#### **4.3.4 PDGF A und PDGFR $\beta$ Expression in der Leber**

Die Expression von PDGF A und PDGF R $\beta$  in der Leber zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p=0,001$  und  $p=0,001$ ). Die Tiere aus der Zirrhosegruppe ohne portale Hypertension (C8) zeigten eine signifikant höhere Expression von PDGF A in der Leber, verglichen mit den Tieren aus der Sorafenibgruppe (S8;  $p=0,007$ ) und den Tieren aus der Kontrollgruppe (N;  $p=0,001$ ).

PDGFR $\beta$  zeigte eine signifikant höhere Expression in den Lebern der Zirrhosetiere (C8), im Vergleich mit den Kontrolltieren (N;  $p=0,001$ ). Ebenfalls höher war die Expression bei den Tieren aus der Sorafenibgruppe (S8), verglichen mit der Kontrollgruppe (N;  $p=0,026$ ; Abbildung 13).

Gleichmaßen unterschieden sich auch in der Gruppe der portalen Hypertension die drei Gruppen in ihrer PDGF A und PDGFR $\beta$  Expression in der Leber ( $p=0,002$  und  $p=0,05$ ). Die Zirrhosegruppe (C12) zeigte eine für PDGF A signifikant höhere Expression und für PDGFR $\beta$  eine grenzwertig signifikant höhere Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe

(N;  $p=0,02$  und  $p=0,08$ ). Die Sorafenibgruppe (S12) konnte keine Unterschiede in der Expression im Vergleich mit beiden anderen Gruppen zeigen und lag erneut oberhalb der Kontrollgruppe (N) und unterhalb der korrespondierenden Zirrhosegruppe (C12; Abbildung 14).

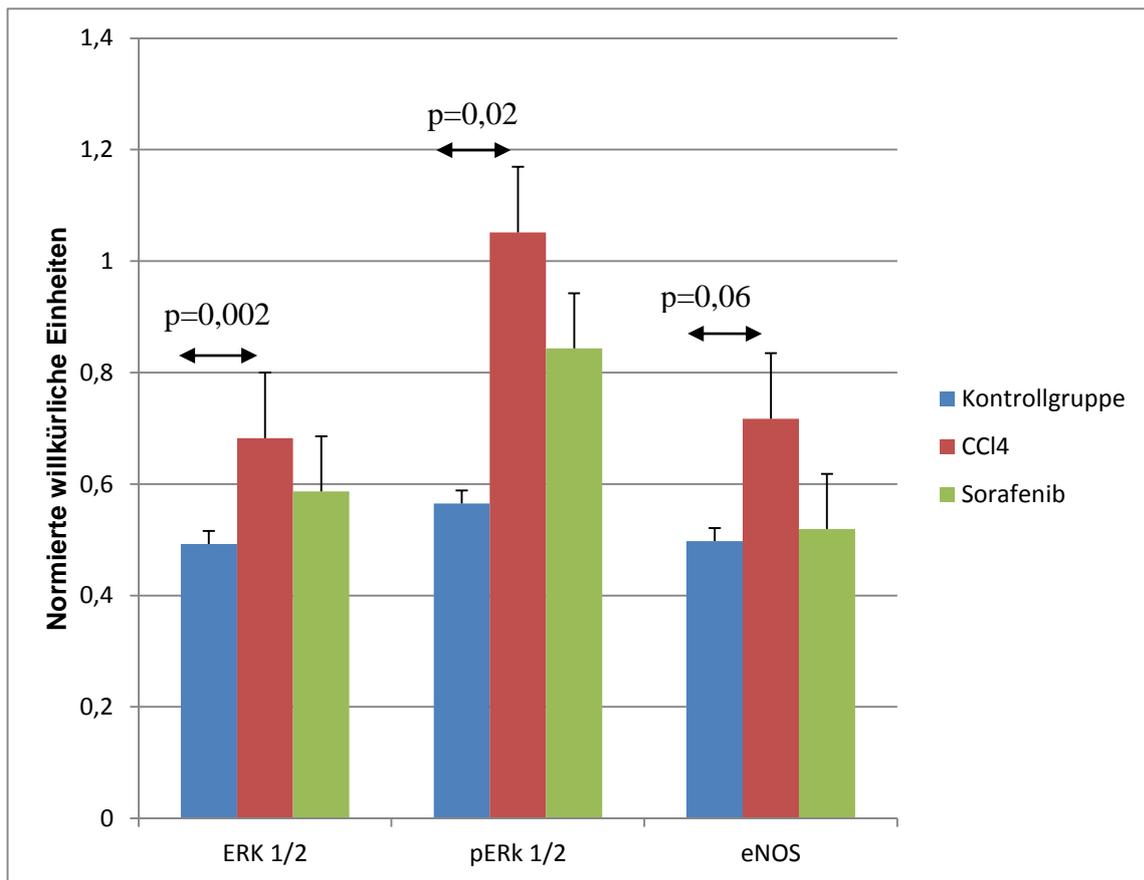


Abbildung 11: Ergebnisse der Western Blots, ERK 1/2, pERK 1/2 und eNOS Expression bei den Zirrhosetieren nach 8 wöchiger CCl<sub>4</sub>-Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie; eNOS p=0.036, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.06; ERK1/2 p=0.003, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.002; phospho-ERK1/2 p=0.023, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.02

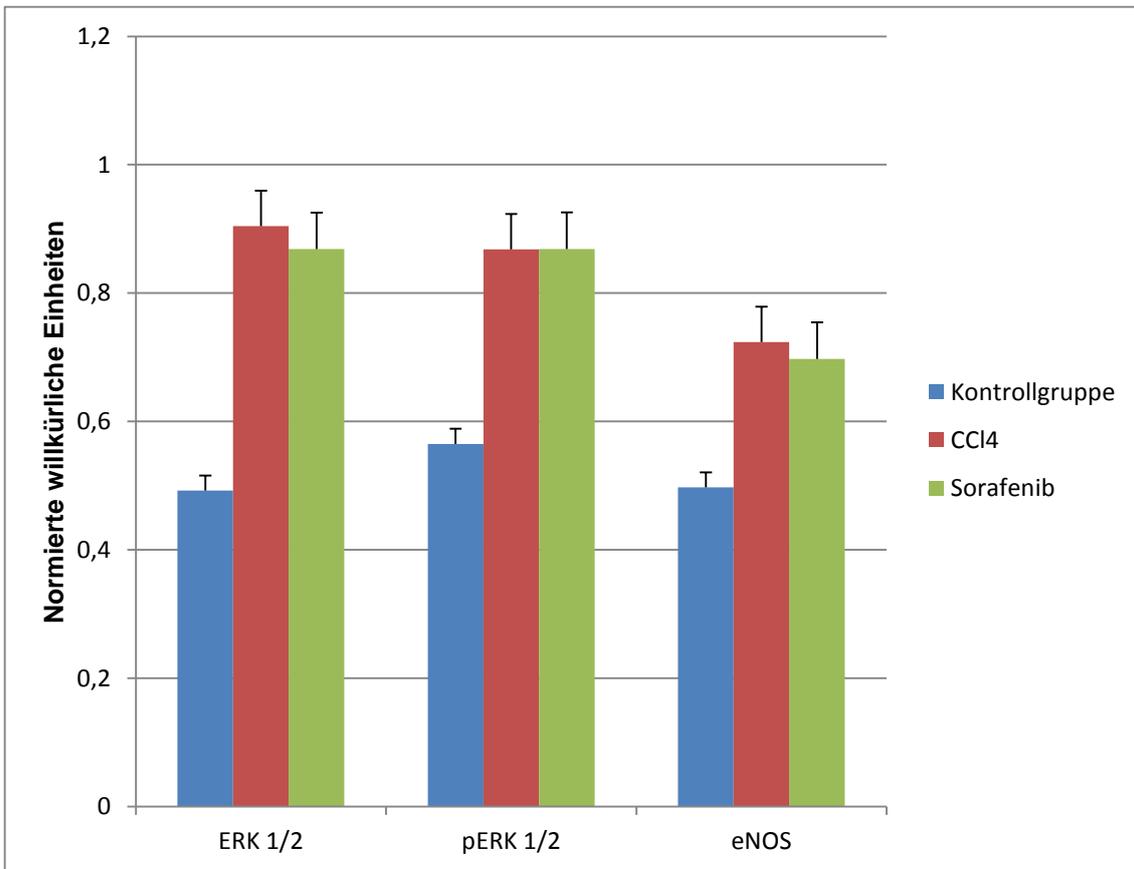


Abbildung 12: Ergebnisse der Western Blots, ERK 1/2, pERK 1/2 und eNOS Expression bei den Zirrhosetieren nach 12 wöchiger CCl<sub>4</sub>-Gabe mit und ohne Sorafenib und Kontrolltieren in der Leberarterie

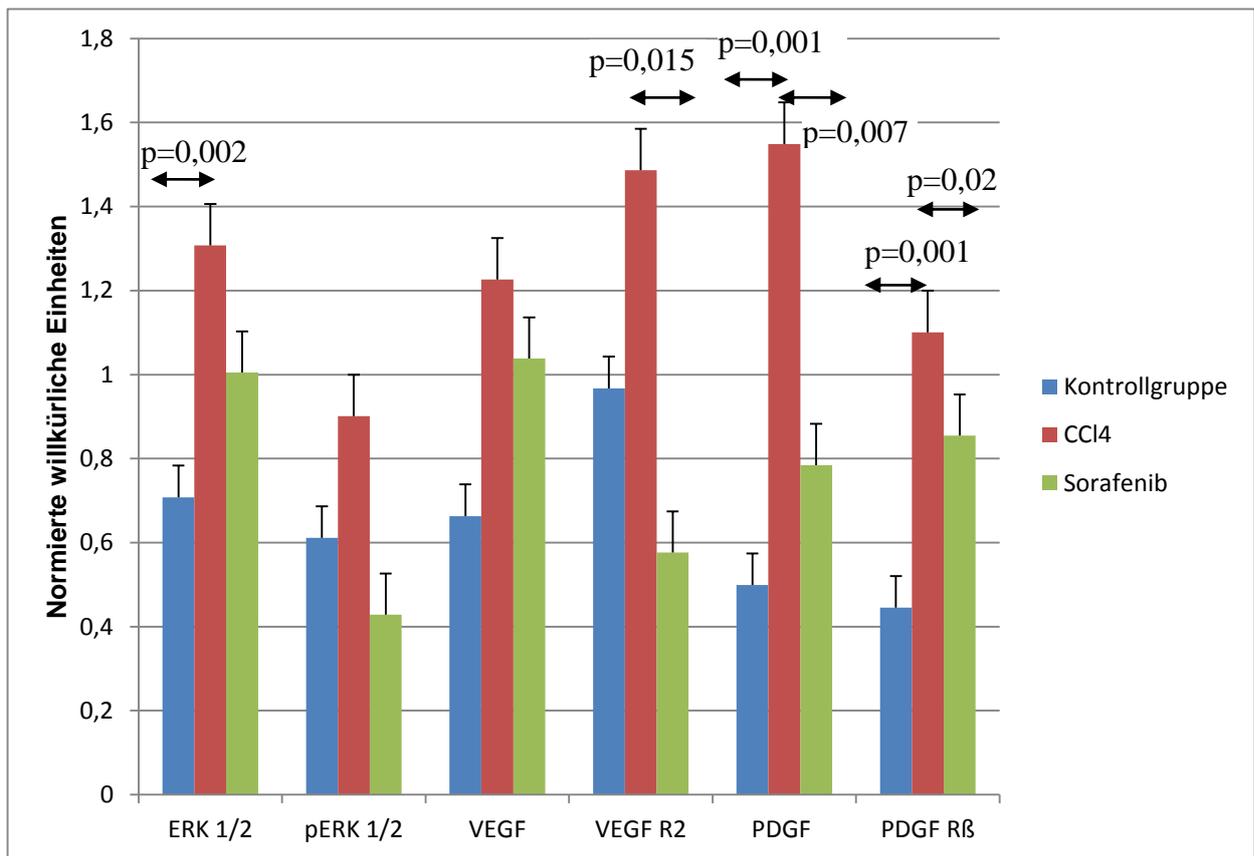


Abbildung 13: Ergebnisse der Western Blots von VEGF, VEGF R2, PDGF A, PDGFR $\beta$ , ERK1/2 und phospho-ERK1/2 Expression in den Lebern nach 8 wöchiger CCl<sub>4</sub> Behandlung; ERK 1/2 p=0.002; CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.002; VEGF R2 p=0.015, CCl<sub>4</sub> vs. Sorafenib p=0.015; PDGF A p=0.001, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.001, Sorafenib vs. CCl<sub>4</sub> p=0.007; PDGFR $\beta$  p=0.001; CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.001, Sorafenib vs. Kontrollgruppe p=0.02

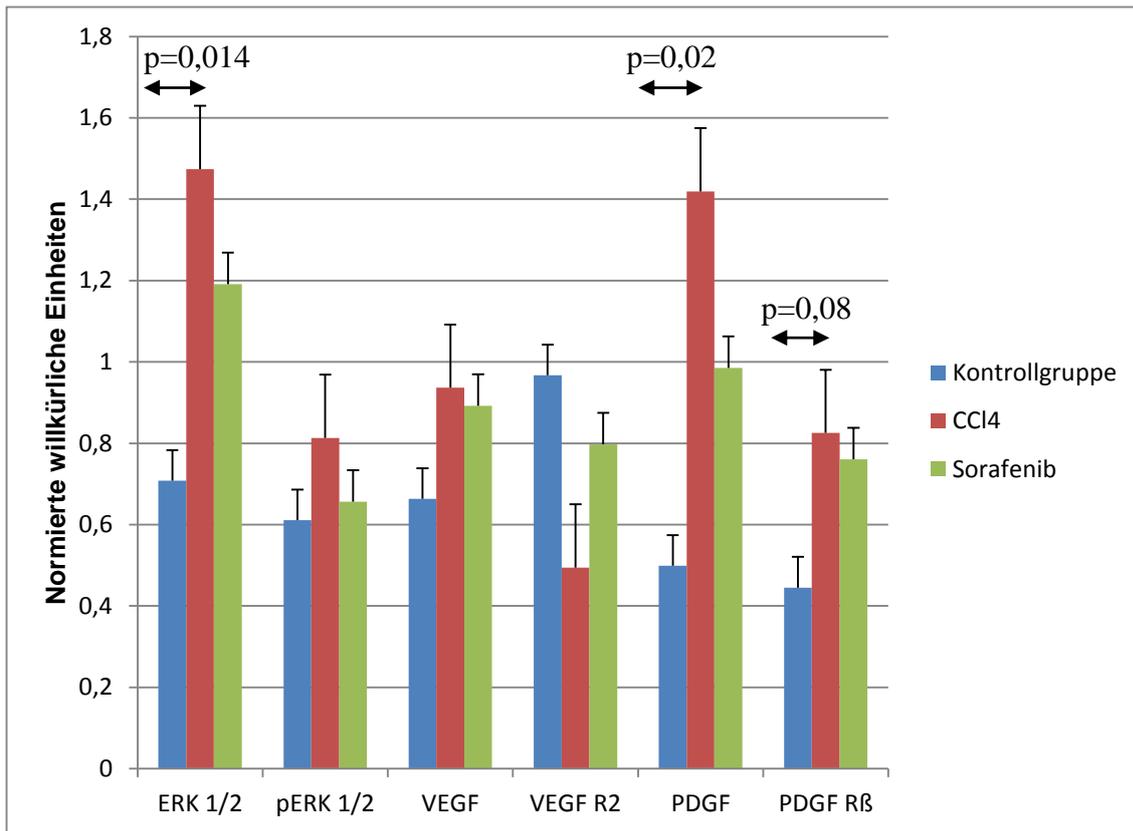


Abbildung 14: Ergebnisse der Western Blots von VEGF, VEGF R2, PDGF A, PDGFRβ, ERK1/2 und phospho-ERK1/2 Expression in den Lebern 12 wöchiger CCl<sub>4</sub> Behandlung; ERK 1/2 p=0.014, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.014; PDGF A p=0.02, CCl<sub>4</sub> vs Kontrollgruppe p=0.02; PDGFRβ p=0.05, CCl<sub>4</sub> vs. Kontrollgruppe p=0.08

#### 4.4 Messung von Fibrose und Remodeling

Das Ausmaß der Fibrose wurde in Tieren mit portaler Hypertension untersucht. Es zeigte sich, dass in Tieren, die mit Sorafenib behandelt wurden (S12;  $23.7 \pm 2.6\%$ ), im Vergleich zu Tieren ohne Sorafenibbehandlung (C12;  $32.9 \pm 3.9\%$ ;  $p=0.05$ ) der Grad der Fibrose geringer war.

Der Gefäßdurchmesser (LD) der Leberarterien betrug  $57,6 \pm 17,7 \mu\text{m}$  in den Normaltieren,  $91.3 \pm 52.8 \mu\text{m}$  in Ratten ohne portale Hypertension (C8) und  $106.0 \pm 78.1 \mu\text{m}$  in den Arterien der Zirrhosetiere mit portaler Hypertension (C12).

Die Wandstärke (WT) in Bezug auf den Gefäßdurchmesser der Leberarterien der Kontrollgruppe betrug  $0,18 \pm 0,05$  ( $p=n.s.$  vs. C8;  $p=0,002.$  vs. C12 und S12;  $p=0,04$  vs. S8-12), in der Zirrhosegruppe ohne portale Hypertension (C8)  $0,10 \pm 0,05$  und in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung ohne portale Hypertension (S8)  $0,18 \pm 0,07$  ( $p= n.s.$  vs. C8;  $p=0,001$  vs. C12 und S12,  $p= 0,031$  vs. S8-12) (Tabelle 2, Abbildung 15) .

Weiterhin betrug die Anzahl der kleinen Gefäßmuskelzellen (N/LD) in der Zirrhosegruppe mit portaler Hypertension (C12)  $0,07 \pm 0,04$ , in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung und portaler Hypertension (S12)  $0,06 \pm 0,02$  und in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung von Woche 8-12 (S8-12)  $0,09 \pm 0,03$ . Die Anzahl der kleinen Gefäßmuskelzellen (N) in Bezug zum Gefäßdurchmesser war in den Leberarterien der Kontrollgruppe  $0.47 \pm 0.08$  ( $p= 0,028$  vs. C8;  $p= <0,001$  vs. C12 und S12;  $p= 0,002$  vs. S8-12), in der Zirrhosegruppe ohne portale Hypertension (C8)  $0,29 \pm 0,11$  und in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung ohne portale Hypertension (S8)  $0,51 \pm 0,17$  ( $p= 0,001$  vs. C8;  $p<0,001$  vs. C12 und S12, S8-12). Weiterhin betrug N/LD in der Zirrhosegruppe mit portaler Hypertension (C12)  $0,17 \pm 0,06$ , in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung und portaler Hypertension (S12)  $0,16 \pm 0,05$  und in der Zirrhosegruppe mit Sorafenibbehandlung von Woche 8-12 (S8-12)  $0,24 \pm 0,07$  (Tabelle 2, Abbildung 16).

Tabelle 2: WT/LD und N/LD der verschiedenen Gruppen

	Kontrolle	C8	S8	C12	S12	S8-12
WT/LD	$0,18 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,04^*$	$0,06 \pm 0,02^*$	$0,09 \pm 0,03^{\$}$
N/LD	$0,47 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,11^{\#}$	$0,51 \pm 0,17$	$0,17 \pm 0,06^+$	$0,16 \pm 0,05^+$	$0,24 \pm 0,07^*$

\* $p= 0,002$  in Bezug zur Kontrollgruppe

$^{\$}p= 0,04$  in Bezug zur Kontrollgruppe

$^{\#}p=0,028$  in Bezug zur Kontrollgruppe

$^+p<0,001$  in Bezug zur Kontrollgruppe

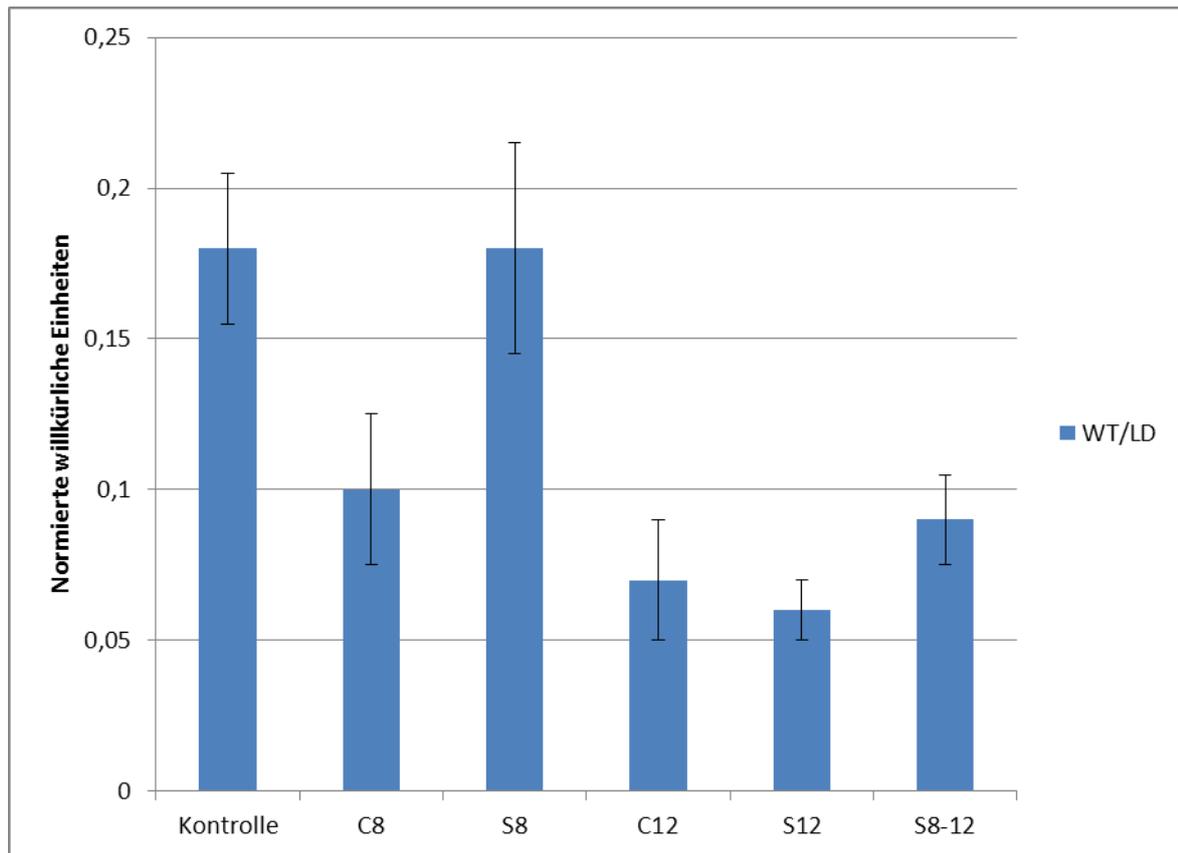


Abbildung 15: Wandstärke/Gefäßdurchmesser in den verschiedenen Zirrhosegruppen, nach 8 wöchiger und 12 wöchiger Gabe von  $\text{CCl}_4$  mit und ohne Sorafenibgabe und Sorafenibgabe von Woche 8-12 und Kontrolltieren; Kontrolle vs. C8  $p=0,072$ ; Kontrolle vs. C12  $p=0,002$ ; Kontrolle vs. S12  $p=0,002$ ; Kontrolle vs. S8-12  $p=0,04$ ; S8 vs. C8  $p=0,056$ ; S8 vs. C12  $p=0,001$ ; S8 vs. S12  $p=0,001$ ; S8 vs. S8-12  $p=0,031$

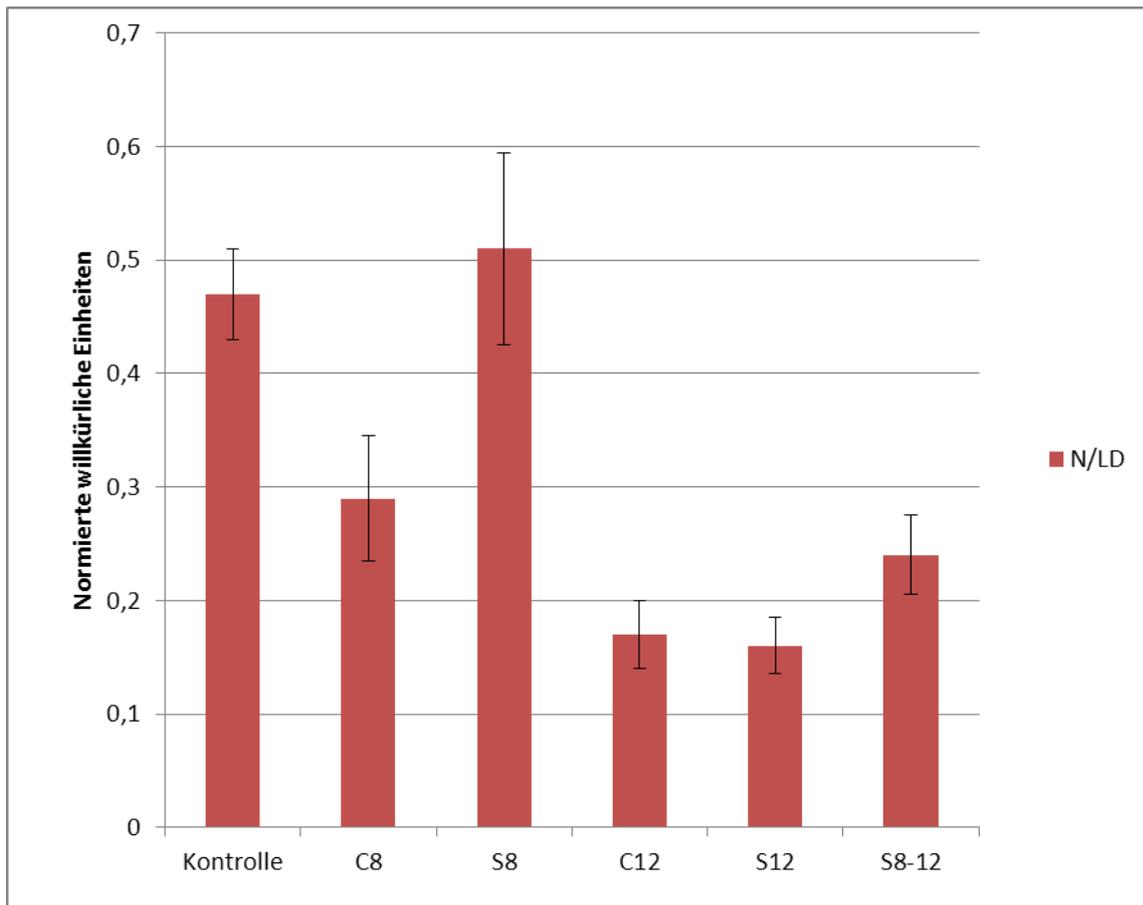


Abbildung 16: Anzahl der kleinen Gefäßmuskelzellen/Gefäßdurchmesser in den verschiedenen Zirrhosegruppen, nach 8 wöchiger und 12 wöchiger Gabe von  $\text{CCl}_4$  mit und ohne Sorafenibgabe und Sorafenibgabe von Woche 8-12 und Kontrolltieren; Kontrolle vs. C8  $p=0,028$ ; Kontrolle vs. C12  $p<0,001$ ; Kontrolle vs. S12  $p<0,001$ ; Kontrolle vs. S8-12  $p=0,002$  S8 vs. C8  $p=0,001$ ; S8 vs. C12  $p<0,001$ ; S8 vs. S12  $p<0,001$ ; S8 vs.  $\text{ccl}_4$  S8-12  $p<0,001$

## 5 Diskussion

### 5.1 Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension

Die Hauptkomplikation der Zirrhose, die portale Hypertension, wird im Wesentlichen verursacht durch den erhöhten intrahepatischen Widerstand und den vermehrten Bluteinstrom über die Portalvene [10]. Diese Veränderungen sind einerseits Folge einer vermehrten intrahepatischen Bildung von Vasokonstriktoren (hauptsächlich Endothelin-1) und verminderter Bildung von Vasodilatoren (hauptsächlich NO) [14, 15] und andererseits Folge einer vermehrten Vasodilatation im Splanchnikusgebiet [13].

In dieser Arbeit konnten das erste Mal die verschiedenen Stadien der Funktion und Struktur der Leberarterie während der Zirrhoseentstehung aufgezeigt werden.

Interessanterweise war der Widerstand der Leberarterie bereits nach 8 wöchiger Behandlung mit CCl<sub>4</sub> erniedrigt. Da der gewählte Zeitpunkt einem Zeitpunkt in der Zirrhoseentstehung entspricht, an dem eine kompensierte Zirrhose (Zirrhose ohne Aszites) vorliegt und der portale Druck noch nicht erhöht ist, scheint die hepatisch-arterielle Durchblutungssteigerung nicht von der verminderten portal-venösen Durchblutung anhängig zu sein. Ursächlich könnte vielmehr ein gesteigerter Sauerstoffbedarf der Leber während der Entstehung der Zirrhose sein. Dabei wurde bereits in einer vorherigen Studie die vermehrte Expression des Adenosin A1-Rezeptors nachgewiesen. Dieser Rezeptor wird vor allem unter hypoxischen Bedingungen exprimiert. Die Vermittlung der Dilatation durch den Adenosin-A1-Rezeptor erfolgt dabei über Stickstoffmonoxid [63]. Tatsächlich fanden wir in der vorliegenden Arbeit, dass die Vasodilatation der Leberarterie in diesem Stadium der Zirrhose hauptsächlich durch erhöhte Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) hervorgerufen wird. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl anhand der Western Blots, als auch anhand der Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin, da es bei den Zirrhosetieren in den Gefäßen nach Blockung von NO durch L-NMMA in gleichem Ausmaß wie bei den Kontrolltieren zu einer Vasokonstriktion kam. Über den NO-vermittelten Signalweg kommt es zur Erhöhung der Konzentration an ERK 1/2 (Abbildung 17) [68]. Dies zeigen die Ergebnisse der Western Blots, hier waren die Konzentrationen an ERK 1/2, sowie auch seiner aktiven Form pERK 1/2 signifikant erhöht in der Zirrhosegruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

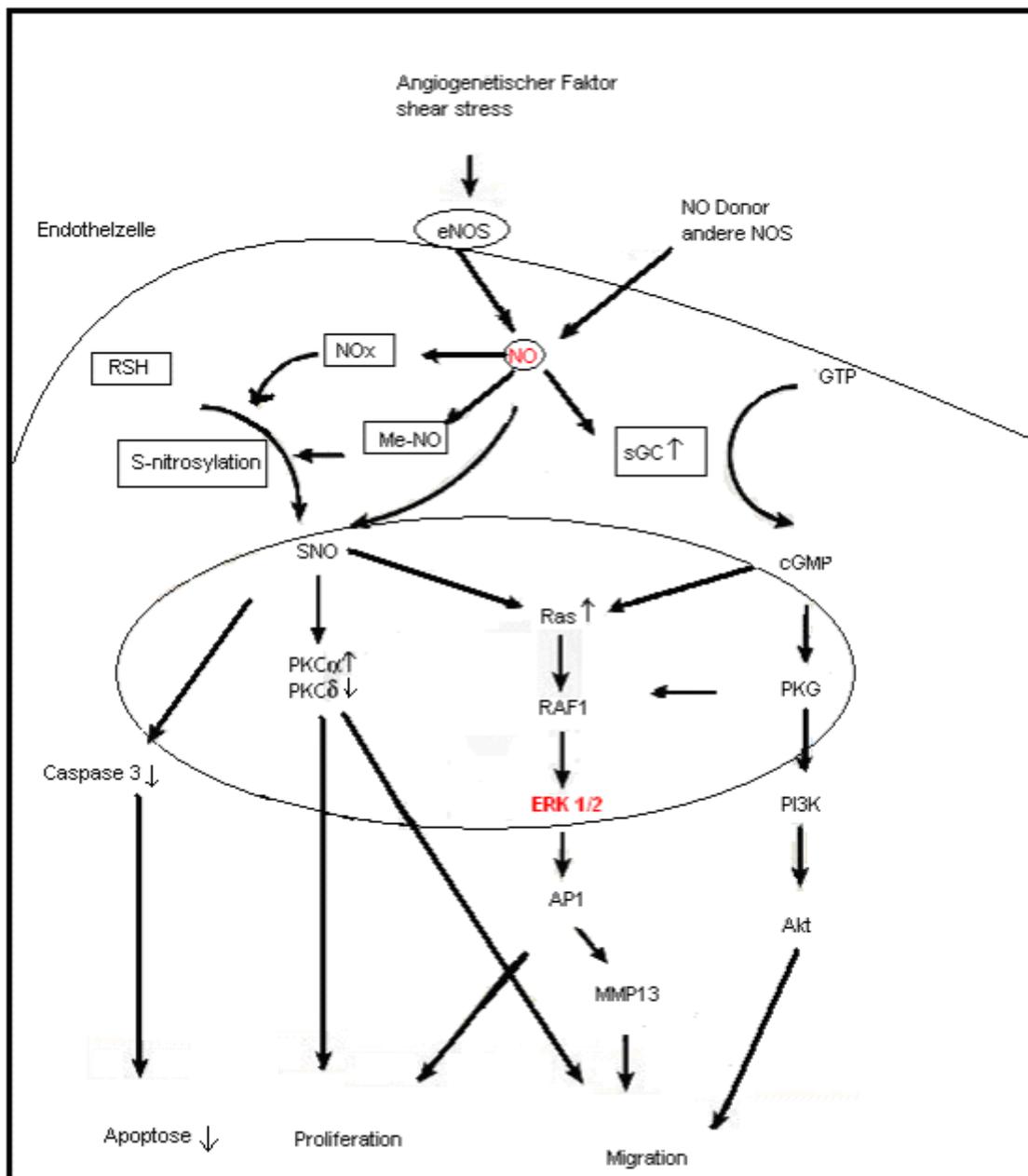


Abbildung 17: Darstellung des endothelialen NO-vermittelten Signalweges der Angiogenese (Mod. Nature Publishing Group)

Die erhöhte Produktion von NO und somit vermehrte hepatisch-arterielle Durchblutung könnte durch die bei der Entwicklung der Zirrhose entstehenden Hypoxie andererseits aber auch über den vermehrten shear stress verursacht sein, wobei Hypoxie einer der initialen Faktoren der Zirrhoseentstehung darstellt [69-71].

Der von der hypoxischen Leber vermehrt benötigte Sauerstoff kann u.a. durch eine vermehrte Durchblutung der Leberarterie bereitgestellt werden. Vermutlich gibt es dafür verschiedene Mediatoren, u.a. Adenosin und NO [63, 72]. Für diese Theorie würde das

Ergebnis sprechen, dass in Zirrhosetieren nach Blockung von NO ein Ansprechen in der Leberarterie auf den Vasokonstriktor Methoxamin erreicht werden konnte, welches dem der Normaltiere entsprach. Demnach wäre die erhöhte hepatisch-arterielle Durchblutung unabhängig von der portalen Durchblutung und keine Folge, der in diesem Stadium noch nicht verminderten portal-venösen Durchblutung. Dieses Ergebnis würde auch gegen eine reine gegensinnige Reaktion der Regulation der Leberarteriendurchblutung auf eine Veränderung der portal-venösen Durchblutung, wie es in der hepatic arterial buffer response angenommen wird, sprechen.

## **5.2 Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension**

Im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension zeigte sich, genau wie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension, ein signifikant erniedrigter Gefäßwiderstand der Leberarterie. In diesem Stadium war, im Gegensatz zur frühen Phase der Zirrhose, als Unterschied ein signifikant erhöhter Portaldruck zu messen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass NO nicht mehr alleinige Hauptursache für die arterielle Vasodilatation zu sein scheint, dies zeigt sich sowohl in den Western Blots, als auch in den Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin. Auffällig ist in der Phase der portalen Hypertension, dass es im Gegensatz zur Zirrhose ohne portale Hypertension durch Blockung von NO mittels L-NMMA nicht mehr zu einem kompletten Angleichen der Kurven von Zirrhosetieren und Normaltieren kommt. Als indirekter Parameter für eine niedrigere NO-Produktion wiesen ERK 1/2 und pERK 1/2 in diesem Stadium keine signifikanten Unterschiede mehr auf. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede wäre, dass es im Stadium mit portaler Hypertension, ein Zustand der über einen längeren Zeitraum besteht, bereits zu strukturellen Veränderungen der Leberarterie durch Remodeling und Angiogenese gekommen ist. Diese scheinen im Stadium ohne portale Hypertension noch nicht so stark ausgeprägt zu sein. Tatsächlich fanden wir signifikante Unterschiede in der Anzahl der kleinen Gefäßmuskelzellen der Leberarterie zwischen zirrhosischen Tieren ohne und mit portaler Hypertension. Dies würde auch die Unterschiede in der Kontraktionsfähigkeit der Leberarterie zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erklären können. Dafür könnten weiterhin die erhöhten Konzentrationen von Angiogenesemarkern, wie VEGF, VEGF R2, PDGF und PDGF R $\beta$ , im Stadium ohne portale Hypertension der Zirrhose sprechen. Unsere Hypothese besteht aus der Überlegung, dass auf Grund der vorhandenen Hypoxie es zur vermehrten Induktion von VEGF, sowie dessen Rezeptor kommen könnte.

Im Spätstadium der Zirrhose haben wir vor allem eine Erhöhung von PDGF gefunden. Dies könnte dafür sprechen, dass sich in diesem Stadium die durch vorherige Angiogenese neu

gebildeten Blutgefäße stabilisieren, sich allerdings wohl nicht mehr so viele neue Blutgefäße bilden wie im Frühstadium der Zirrhose (VEGF Konzentration entspricht im Wesentlichen dem der Normaltiere).

Als dritten Mechanismus nach Vasodilatation, Neoangiogenese sind weiterhin strukturelle Veränderungen der Leberarteriengefäßwand vorhanden. Die anfangs vor allem durch NO und Adenosin dilatierte Leberarterie erfährt zunehmend durch die dauerhafte Senkung ihres Widerstandes im Endstadium der Zirrhose eine Veränderung ihrer Gefäßwandarchitektur, entsprechend einem Gefäßremodeling [51, 73]. Dabei wird eine Abnahme der Gefäßwanddicke und eine Abnahme der Gefäßwandmuskulatur beobachtet. Dies führt letztendlich zu einer Abnahme der Kontraktionsfähigkeit der Leberarterie.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Veränderungen der Leberarterie bei Zirrhose ohne portale Hypertension mit einer durch NO-vermittelten Vasodilatation einhergehen. Neoangiogenese und strukturelle Veränderungen scheinen eher Phänomene der fortgeschrittenen Zirrhose zu sein.

### **5.3 Therapiemöglichkeiten der Zirrhose/portalen Hypertension**

Die im Moment eingesetzten Therapieverfahren bei Leberzirrhose sind begrenzt. Viele medikamentöse Therapien zielen auf eine Reduktion des Portaldruckes ab und der hepatisch-venöse Druckgradient (ein Maß für den portalen Druck) wird benutzt, um die Effizienz der Medikamentenwirkung zu beurteilen [6, 9, 74, 75].

Vor allem unselektive  $\beta$ -Blocker werden zur Reduktion des Portaldruckes eingesetzt, der Wirkmechanismus beruht dabei auf einer direkten Reduktion des intrahepatischen Gefäßwiderstandes und auf Reduzierung des Bluteinstroms in die Portalvene [76].

Doch der Therapie mit  $\beta$ -Blockern sind auf Grund von Nebenwirkungen [77] und Kontraindikationen Grenzen gesetzt. Zudem gibt es einen nicht zu vernachlässigbaren Teil von Patienten, die nicht auf die Therapie mit  $\beta$ -Blockern im Sinne einer ausreichenden Portaldrucksenkung anspricht [78-80]. Weitere Therapiemöglichkeiten bei Zirrhose bieten Nitrate [13]. Sie sind allerdings nicht als alleinige Therapie etabliert [81].

Alle diese Therapien haben jedoch ihre Grenzen, vor allem in der Langzeitanwendung bestehen auf Grund von hohen Nebenwirkungsraten erhebliche Complianceprobleme. Daher ist es besonders wichtig, neue Therapien und Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. In diesem Zusammenhang konnten Mejias et al. bereits erste Erfolge durch antiangiogenetische Therapie zeigen. Durch Einsatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib konnte u.a. der Portaldruck und der Grad der Fibrose gesenkt werden [39]. Die Wirkung der Sorafenibgabe auf die Leberarterie ist in diesem Zusammenhang nicht untersucht worden

und war Teil der hier vorgestellten Arbeit. Die Fragestellung beschäftigt sich einerseits mit der Frage der Wirkung von Sorafenib als Angiogenesehemmer auf die Neoangiogenese der Leberarterie und andererseits mit der Wirkung auf die hepatisch-arterielle Durchblutung.

#### **5.4 Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension nach Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib**

Sorafenib wurde während der Entstehung der Zirrhose kontinuierlich gegeben.

Die Gabe von Sorafenib verhindert die Vasodilatation der Leberarterie im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension. Ursächlich fanden wir für die Vasodilatation in diesem Stadium eine überhöhte Produktion von NO. Als erstes Ergebnis fanden wir, dass die Leberarterie bei den Tieren die mit Sorafenib behandelt wurden, im Gegensatz zu den Zirrhosetieren, noch nicht dilatiert ist. Ihr Gefäßwiderstand entspricht dem der Normaltiere. Die Dosis-Wirkungskurve mit Methoxamin zeigte keinen Unterschied zu Normaltieren und eine Blockung von NO bewirkt im Gegensatz zur Zirrhosegruppe kein besseres Ansprechen auf Methoxamin. Es ist also in diesem Stadium durch Gabe von Sorafenib noch zu keiner übermäßigen Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) gekommen. Diese Aussage wird ebenfalls von den Ergebnissen der Western Blots gestützt. Es finden sich in der Sorafenibgruppe keine signifikanten Unterschiede zu den Normaltieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Sorafenib im Frühstadium der Zirrhose in der Lage ist die erhöhte NO-Produktion nahezu vollständig zu unterbinden.

#### **5.5 Veränderungen der Leberarterie im Stadium der Zirrhose mit portaler Hypertension nach Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib**

Interessanterweise fanden wir einen nur gering veränderten Ruhewiderstand in der Leberarterie, verglichen mit Tieren mit unbehandelter Zirrhose. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich eine Kombination der Blockung verschiedener Mechanismen durch Sorafenib, im Sinne von Beeinflussung sowohl dynamischer als auch struktureller Veränderungen. In späteren Stadien der Zirrhose mit portaler Hypertension war Sorafenib in unseren Experimenten nicht mehr in der Lage, die erhöhte Produktion von NO vollständig zu unterbinden. Dies zeigen sowohl die Ergebnisse der Western Blots, als auch die Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin. Nach Blockung von NO durch L-NMMA (einem unselektiven NO-Produktionshemmer) zeigten sowohl die Zirrhosegruppe, als auch die mit Sorafenib behandelte Gruppe ein signifikant geringeres Ansprechen auf Methoxamin,

verglichen mit der Kontrollgruppe. Dies könnte weiterhin zeigen, dass es in beiden Zirrhosegruppen bereits zu irreversiblen strukturellen Veränderungen wie Remodeling und Neoangiogenese gekommen ist.

Die Hypothese wird weiterhin von den Ergebnissen der Western Blot- Untersuchungen gestützt. Diese zeigen in beiden Zirrhosegruppen fast gleiche Werte und bekräftigen, dass es in beiden Zirrhosegruppen zu einer ähnlichen NO- Produktion im Stadium der portalen Hypertension gekommen ist.

Demgegenüber konnte eine verkürzte Gabe von Sorafenib, begonnen nach Etablierung einer Zirrhose ohne portale Hypertension bis zum Zeitpunkt der Entwicklung einer portalen Hypertension positive Effekte zeigen. Diese Tiere hatten trotz einer 12 wöchigen Behandlung mit CCl<sub>4</sub> sowohl einen normalen Gefäßwiderstand der Leberarterie, als auch normale Drücke der Portalvene und des sinusoidalen Gefäßbettes. Sorafenib scheint bei diesen Tieren sowohl die Veränderungen in der Leberarterie als auch den portalen Hypertonus zu beeinflussen. Bei den Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin zeigten die Tiere mit Sorafenibbehandlung von Woche 8 bis Woche 12 ein höheres Ansprechen auf Methoxamin. Die Gabe des NO-Blockers L-NMMA veränderte das Ansprechen auf Methoxamin, im Gegensatz zur Zirrhosegruppe, nicht signifikant. Sorafenib konnte bei diesen Tieren also die erhöhte NO- Produktion zumindest teilweise unterbinden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die ab Beginn über die gesamte Zeit der Induktion einer Zirrhose eine Behandlung mit Sorafenib erhielten.

Eine mögliche Erklärung für das bessere Ansprechen auf die Sorafenibbehandlung könnte die Dauer und der Zeitpunkt der Behandlung sein. Dass die Tiere ein anderes Verhalten nach einer kürzeren Behandlung (4 Wochen) mit Sorafenib haben, könnte bedeuten, dass Sorafenib vor allem bei Kurzzeitbehandlungen wirksam ist und bei Langzeittherapien andere Stoffwechselwege für Veränderungen der hepatisch-arteriellen Durchblutung aktiviert werden bzw. es zu einer Resistenzentwicklung kommt. Besonders interessant für mögliche spätere Therapien ist, dass Sorafenib auch nach Entstehung der Zirrhose noch Wirksamkeit zeigt und somit scheinbar geeignet ist, den Komplikationen der etablierten Zirrhose, vor allem der portalen Hypertension, wirksam entgegen zu wirken. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass Gewebe, die mit antiangiogenetischen Substanzen behandelt wurden, verschiedene Arten der Resistenzentwicklung zeigen. Dies konnte bei Behandlungen mit verschiedenen antioangiogenetisch wirksamen Substanzen, u.a. auch Sorafenib, in der Tumorbehandlung gezeigt werden [82]. Für die Resistenzentwicklung gibt es verschiedene mögliche Mechanismen. Es gibt die so genannten klassischen Mechanismen, wie Genmutationen und Veränderungen in der Medikamentenaufnahme und Medikamentenausscheidung [83, 84] und als weiteren Mechanismus die vermehrte Aktivierung alternativer Signalwege in der Angiogenese, denn Sorafenib blockt VEGF zwar

selektiv, aber nicht spezifisch [85, 86]. Unsere Ergebnisse könnten in diesem Zusammenhang interpretiert werden und dadurch möglicherweise die Abnahme der Wirksamkeit der Sorafenibgabe über einen längeren Zeitraum erklären.

In Studien, die eine Senkung des Portaldruckes nach Gabe von Sorafenib zeigen konnten, wurde Sorafenib im Allgemeinen über eine kurze Zeitspanne gegeben. In der Studie von Coriat et al. wurden Patienten mit fortgeschrittenen Stadien eines HCCs und portaler Hypertension, Sorafenib über eine Zeit von 30 Tagen gegeben. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des portalen Druckes, welche nach weiteren 30 Tagen vollständig reversibel war [64]. In der Studie von Reiberger et al. kam es ebenfalls zur signifikanten Reduktion des Portaldruckes, bei nicht zirrhatischen Tieren mit prähepatischer portaler Hypertension, nach 7 tägiger Gabe von Sorafenib ( $10\text{mg kg}^{-1}/\text{d}^{-1}$ ) [87].

Auch die Studie von Henneberg et al. zeigte eine signifikante Reduktion des Portaldruckes in Ratten mit Gallengangsligatur und Zirrhose, nach 7 tägiger Sorafenibgabe, allerdings in sehr hoher Dosis ( $60\text{ mg/kg}^{-1}/\text{d}^{-1}$ ). Die Sorafenibgabe fand fünf Wochen nach Gallengangsligatur statt. In diesem Stadium lag bereits eine etablierte Zirrhose mit Aszites vor [88]. Dass Sorafenib auch in diesem Stadium noch in der Lage war, den Portaldruck zu senken, lässt wie auch durch unsere Studie vermuten, dass Sorafenib auch bei bereits entwickelter Zirrhose, sowohl in Frühstadien, als auch in Spätstadien wirksam ist. In all diesen Studien wurde Sorafenib für sehr kurze Zeit gegeben (7-30 Tage). Das es nach 12 wöchiger Gabe, wie in unserem Experiment nicht mehr dieselbe Wirkung verglichen mit kürzerer Behandlungszeit hat, lässt vermuten, dass sich nach längerer Behandlung Resistenzen bilden. Dies könnte u.a. dadurch bedingt sein, dass Sorafenib nur einen Teil im Signalweg der Angiogenese blockt und nach längerer Anwendung andere proangiogenetische Faktoren heraufreguliert werden. Auch bekannt ist die anti-apoptotische/pro-survival Funktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF, die besagt, dass hohe lokale Konzentrationen von VEGF die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren der Angiogenese antagonisieren können [89]. Diese Erkenntnisse könnten eine kombinierte antiangiogenetische Therapie in Zukunft erstrebenswert machen. Durch die Kombination von Angiogenesehemmern, die verschiedene Stellen der Angiogenese blocken, könnte eine Resistenzentwicklung in Zukunft vielleicht vermieden oder zumindest minimiert werden. Alternativ kann Sorafenib zur kurzfristigen Behandlung der portalen Hypertension auch bei bereits etablierter Zirrhose eingesetzt werden.

## 6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Vorliegen einer Zirrhose die Leberarterie unabhängig vom portalen Druck dilatiert ist. Dafür ursächlich könnte ein gesteigerter Sauerstoffbedarf der Leber während der Entstehung der Zirrhose sein. Die Dilatation der Leberarterie wird vor allem über Stickstoffmonoxid vermittelt. Strukturelle Veränderungen, wie Neoangiogenese oder Remodeling, scheinen in diesem Stadium ohne portale Hypertension noch keine funktionelle Rolle zu spielen.

Dementsprechend konnten wir durch Blockung von Stickstoffmonoxid eine vollständige Angleichung der Dosis-Wirkungskurven auf einen Vasokonstriktor in der Leberarterie erreichen. Im Stadium mit portaler Hypertension kommt es neben der Erhöhung der Stickstoffmonoxid-vermittelten Vasodilatation der Leberarterie auch zu strukturellen Veränderungen (Neoangiogenese und Remodeling), die eine vollständige Korrektur der Vasodilatation mit einem Stickstoffmonoxidblocker nicht mehr ermöglicht.

Durch Gabe des Angiogenesehemmers Sorafenib lässt sich im Stadium ohne portale Hypertension der Zirrhose die erhöhte Bildung von NO vollständig unterbinden. Im Stadium mit portaler Hypertension der Zirrhose ist Sorafenib nach langfristiger Anwendung nicht in der Lage, die erhöhte Stickstoffmonoxidproduktion zu senken. Different dazu ist bei kurzfristiger Anwendung, auch bei bereits etablierter Zirrhose, die Therapie mit Sorafenib in der Lage, der hepatisch-arteriellen Vasodilatation teilweise entgegenzuwirken.

Sorafenib könnte auf Grund unserer Ergebnisse als therapeutische Option im Stadium ohne portale Hypertension möglicherweise das Spektrum der medikamentösen Therapie in Zukunft erweitern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Onori, P., Morini, S., Franchitto, A., Sferra, R., Alvaro, D. und Gaudio, E., Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *J Hepatol*, 2000. 33(4): p. 555-63.
2. Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. und Desmouliere, A., Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. 38(2): p. 135-51.
3. Friedman, S.L., Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 2000. 275(4): p. 2247-50.
4. Bataller, R. und D.A. Brenner, Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2005. 115(2): p. 209-18.
5. Herold, G., *Innere Medizin*. 2009. S. 518.
6. Feu, F., Garcia-Pagan, J. C., Bosch, J., Luca, A., Teres, J., Escorsell, A. und Rodes, J., Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis. *Lancet*, 1995. 346(8982): p. 1056-9.
7. Garcia-Tsao, G., Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005. 21(3): p. 313-22.
8. Garcia-Tsao, G., Groszmann, R. J., Fisher, R. L., Conn, H. O., Atterbury, C. E. und Glickman, M., Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology*, 1985. 5(3): p. 419-24.
9. Groszmann, R.J., Bosch, J., Grace, N. D., Conn, H. O., Garcia-Tsao, G., Navasa, M., Alberts, J., Rodes, J., Fischer, R. und Bermann, M., Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage. *Gastroenterology*, 1990. 99(5): p. 1401-7.
10. Wiest, R. und R.J. Groszmann, The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology*, 2002. 35(2): p. 478-91.
11. Iwakiri, Y. und R.J. Groszmann, The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S121-31.
12. Popper, H. und G. Kent, Fibrosis in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol*, 1975. 4(2): p. 315-32.
13. Loureiro-Silva, M.R., G.W. Cadelina, und R.J. Groszmann, Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. 284(4): p. G567-74.
14. Rockey, D.C. und J.J. Chung, Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology*, 1998. 114(2): p. 344-51.

15. Gupta, T.K., Toruner, M., Chung, M. K. und Groszmann, R. J., Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology*, 1998. 28(4): p. 926-31.
16. Gandhi, C.R., L.A. Sproat, und V.M. Subbotin, Increased hepatic endothelin-1 levels and endothelin receptor density in cirrhotic rats. *Life Sci*, 1996. 58(1): p. 55-62.
17. Pinzani, Milani, S., De Franco, R., Grappone, C., Caligiuri, A., Gentilini, A., Tosti-Guerra, C., Maggi, M., Failli, P., Ruocco, C. und Gentilini, P., Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 1996. 110(2): p. 534-48.
18. Moncada, S., R.M. Palmer, und E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42.
19. Lutt, W.W., Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatol Res*, 2007. 37(11): p. 891-903.
20. Lutt, W.W., Method for measuring hepatic uptake of oxygen or other blood-borne substances in situ. *J Appl Physiol*, 1976. 40(2): p. 269-74.
21. Dancygier, H., *Klinische Hepatologie*. 2003. S. 40-43.
22. Zipprich, A., Loureiro-Silva, M. R., D'Silva, I. und Groszmann, R. J., The role of hepatic arterial flow on portal venous and hepatic venous wedged pressure in the isolated perfused CCl4-cirrhotic liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. 295(1): p. G197-G202.
23. Lutt, W.W., Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol*, 1985. 249(5 Pt 1): p. G549-56.
24. Kleber, Steudel, N., Behrmann, C., Zipprich, A., Hubner, G., Lotterer, E. und Fleig, W. E., Hepatic arterial flow volume and reserve in patients with cirrhosis: use of intra-arterial Doppler and adenosine infusion. *Gastroenterology*, 1999. 116(4): p. 906-14.
25. Zipprich, A., Steudel, N., Behrmann, C., Meiss, F., Sziegoleit, U., Fleig, W. E. und Kleber, G., Functional significance of hepatic arterial flow reserve in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2003. 37(2): p. 385-92.
26. Lutt, W.W. und C.V. Greenway, Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*, 1987. 7(5): p. 952-63.
27. Ayuse, T., Brienza, N., O'Donnell, CP. und Robotham, JL., Pressure-flow analysis of portal vein and hepatic artery interactions in porcine liver. *Am J Physiol*, 1994. 267(4 Pt 2): p. H1233-42.
28. Jakob, S.M., Tenhunen, JJ., Laitinen, S., Heino, A., Alhava, E. und Takala, J., Effects of systemic arterial hypoperfusion on splanchnic hemodynamics and hepatic arterial buffer response in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 280(5): p. G819-27.
29. Lutt, W.W., Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc*, 1983. 42(6): p. 1662-6.

30. Mathie, R.T. und L.H. Blumgart, The hepatic haemodynamic response to acute portal venous blood flow reductions in the dog. *Pflugers Arch*, 1983. 399(3): p. 223-7.
31. Lauth, W.W., D.J. Legare, und W.R. Ezzat, Quantitation of the hepatic arterial buffer response to graded changes in portal blood flow. *Gastroenterology*, 1990. 98(4): p. 1024-8.
32. Bozova, S. und G.O. Elpek, Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in experimental cirrhosis: correlation with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *APMIS*, 2007. 115(7): p. 795-801.
33. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. und Keshet, E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992. 359(6398): p. 843-5.
34. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. und Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989. 246(4935): p. 1306-9.
35. Ziche, M., Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ und Bicknell R., Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*, 1997. 99(11): p. 2625-34.
36. Folkman, J. und P.A. D'Amore, Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 1996. 87(7): p. 1153-5.
37. Ferrara, N., H.P. Gerber, und J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
38. Ankoma-Sey, V., Y. Wang, und Z. Dai, Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000. 31(1): p. 141-8.
39. Mejias, M., Garcia-Pras, E., Tiani, C., Miquel, R., Bosch, J. und Fernandez, M., Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*, 2009. 49(4): p. 1245-56.
40. Ferrara, N. und T. Davis-Smyth, The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997. 18(1): p. 4-25.
41. Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletier, N. und Ferrara, N., Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*, 2001. 276(5): p. 3222-30.
42. Fernandez, M., Vizzutti, F., Garcia-Pagan, J. C., Rodes, J. und Bosch, J., Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology*, 2004. 126(3): p. 886-94.

43. Fernandez, M., Mejias, M., Angermayr, B., Garcia-Pagan, J. C., Rodes, J. und Bosch, J., Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol*, 2005. 43(1): p. 98-103.
44. Ku, D.D., Zaleski, JK., Liu, S. und Brock, TA., Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 1993. 265(2 Pt 2): p. H586-92.
45. Wu, H.M., Huang, Q., Yuan, Y. und Granger, HJ., VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol*, 1996. 271(6 Pt 2): p. H2735-9.
46. Morbidelli, L., Chang, CH., Douglas, JG., Granger, HJ., Ledda, F. und Ziche, M., Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. H411-5.
47. Fernandez, M., Mejias, M., Garcia-Pras, E., Mendez, R., Garcia-Pagan und J. C. Bosch, J., Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology*, 2007. 46(4): p. 1208-17.
48. Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P. und Betsholtz, C., Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997. 277(5323): p. 242-5.
49. Gibbons, G.H. und V.J. Dzau, The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*, 1994. 330(20): p. 1431-8.
50. Davies, P.F., Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 519-60.
51. Zipprich, A., Loureiro-Silva, M. R., Jain, D., D'Silva, I. und Groszmann, R. J., Nitric oxide and vascular remodeling modulate hepatic arterial vascular resistance in the isolated perfused cirrhotic rat liver. *J Hepatol*, 2008. 49(5): p. 739-45.
52. Rudic, R.D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S. und Sessa, W. C., Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*, 1998. 101(4): p. 731-6.
53. Kuchan, M.J. und J.A. Frangos, Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol*, 1994. 266(3 Pt 1): p. C628-36.
54. Rubanyi, G.M., J.C. Romero, und P.M. Vanhoutte, Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 1986. 250(6 Pt 2): p. H1145-9.
55. Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J. und Hintze, T. H., Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*, 1994. 74(2): p. 349-53.
56. Cornwell, T.L., Arnold, E., Boerth, N. J. und Lincoln, T. M., Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 1994. 267(5 Pt 1): p. C1405-13.

57. Sarkar, R., Meinberg, E. G., Stanley, J. C., Gordon, D. und Webb, R. C., Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1996. 78(2): p. 225-30.
58. von der Leyen, H.E., Gibbons, G. H., Morishita, R., Lewis, N. P., Zhang, L., Nakajima, M., Kaneda, Y., Cooke, J. P. und Dzau, V. J., Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(4): p. 1137-41.
59. Noiri, E., Hu, Y., Bahou, W. F., Keese, C. R., Giaever, I. und Goligorsky, M. S., Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(3): p. 1747-52.
60. Murrell, G.A., D. Jang, und R.J. Williams, Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 206(1): p. 15-21.
61. Richter, S., Mücke, I., Menger, MD. und Vollmar, B., Impact of intrinsic blood flow regulation in cirrhosis: maintenance of hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. 279(2): p. G454-62.
62. Albornoz, L., Motta, A., Alvarez, D., Estevez, A., Bandi, J. C., McCormack, L., Matera, J., Bonofiglio, C., Ciardullo, M., De Santibanes, E., Gimeno, M. und Gadan, A., Nitric oxide synthase activity in the splanchnic vasculature of patients with cirrhosis: relationship with hemodynamic disturbances. *J Hepatol*, 2001. 35(4): p. 452-6.
63. Zipprich, A., Mehal, WZ., Ripoll, C. und Groszmann, RJ., A distinct nitric oxide and adenosine A1 receptor dependent hepatic artery vasodilatory response in the CCl<sub>4</sub>-cirrhotic liver. *Liver Int.* 30(7): p. 988-94.
64. Coriat, R., Gouya, H., Mir, O., Ropert, S., Vignaux, O., Chaussade, S., Sogni, P., Pol, S., Blanchet, B., Legmann, P. und Goldwasser, F., Reversible decrease of portal venous flow in cirrhotic patients: a positive side effect of sorafenib. *PLoS One*. 6(2): p. e16978.
65. Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, L. E., Bollag, G. und Trail, P. A., BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 2004. 64(19): p. 7099-109.
66. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R. und Bukowski, R. M., Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2007. 356(2): p. 125-34.
67. Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D. und Bruix, J., Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008. 359(4): p. 378-90.

68. Fukumura, D., S. Kashiwagi, und R.K. Jain, The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 521-34.
69. Rosmorduc, O., Wendum, D., Corpechot, C., Galy, B., Sebbagh, N., Raleigh, J., Housset, C. und Poupon, R., Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol*, 1999. 155(4): p. 1065-73.
70. Hickey, P.L., Angus, P.W., McLean, A.J. und Morgan, D.J., Oxygen supplementation restores theophylline clearance to normal in cirrhotic rats. *Gastroenterology*, 1995. 108(5): p. 1504-9.
71. Angus, P.W., D.J. Morgan, und R.A. Smallwood, Review article: hypoxia and hepatic drug metabolism--clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther*, 1990. 4(3): p. 213-25.
72. Harvey, P.J., Gready, J.E., Yin, Z., Le Couteur, D.G. und McLean, A.J., Acute oxygen supplementation restores markers of hepatocyte energy status and hypoxia in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 293(2): p. 641-5.
73. Guyot, C., Gready, J.E., Yin, Z., Le Couteur, D.G. und McLean, A.J., Fibrogenic cell fate during fibrotic tissue remodelling observed in rat and human cultured liver slices. *J Hepatol*, 2007. 46(1): p. 142-50.
74. Abraldes, J.G., Tarantino, I., Turnes, J., Garcia-Pagan, J. C., Rodes, J. und Bosch, J., Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology*, 2003. 37(4): p. 902-8.
75. Merkel, C., Bolognesi, M., Sacerdoti, D., Bombonato, G., Bellini, B., Bighin, R. und Gatta, A., 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*, 2000. 32(5): p. 930-4.
76. Kroeger, R.J. und R.J. Groszmann, Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology*, 1985. 5(1): p. 97-101.
77. Thalheimer, U., J. Bosch, und A.K. Burroughs, How to prevent varices from bleeding: shades of grey--the case for nonselective beta blockers. *Gastroenterology*, 2007. 133(6): p. 2029-36.
78. Bosch, J., Masti, R., Kravetz, D., Bruix, J., Gaya, J., Rigau, J. und Rodes, J., Effects of propranolol on azygos venous blood flow and hepatic and systemic hemodynamics in cirrhosis. *Hepatology*, 1984. 4(6): p. 1200-5.
79. Cales, P., Braillon, A., Jiron, M. I. und Lebrec, D., Superior portosystemic collateral circulation estimated by azygos blood flow in patients with cirrhosis. Lack of correlation with oesophageal varices and gastrointestinal bleeding. Effect of propranolol. *J Hepatol*, 1985. 1(1): p. 37-46.
80. Garcia-Tsao, G., Grace, N. D., Groszmann, R. J., Conn, H. O., Bermann, M. M., Patrick, M. J., Morse, S. S. und Alberts, J. L., Short-term effects of propranolol on portal venous pressure. *Hepatology*, 1986. 6(1): p. 101-6.

81. Angelico, Carli, L., Piat, C., Gentile, S. und Capocaccia, L., Effects of isosorbide-5-mononitrate compared with propranolol on first bleeding and long-term survival in cirrhosis. *Gastroenterology*, 1997. 113(5): p. 1632-9.
82. Bergers, G. und D. Hanahan, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(8): p. 592-603.
83. O'Connor, R., Clynes, M., Dowling, P., O'Donovan, N. und O'Driscoll, L., Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007. 3(6): p. 805-17.
84. Gorre, M.E. und C.L. Sawyers, Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*, 2002. 9(4): p. 303-7.
85. Kerbel, R.S., Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed. *Cancer Cell*, 2005. 8(4): p. 269-71.
86. Kadenhe-Chiweshe, A., Papa, J., McCrudden, KW., Frischer, J., Bae, JO., Huang, J., Fisher, J., Lefkowitz, JH., Feirt, N., Rudge, J., Holash, J., Yancopoulos, GD., Kandel, JJ. und Yamashiro, DJ., Sustained VEGF blockade results in microenvironmental sequestration of VEGF by tumors and persistent VEGF receptor-2 activation. *Mol Cancer Res*, 2008. 6(1): p. 1-9.
87. Reiberger, T., Angermayr, B., Schwabl, P., Rohr-Udilova, N., Mitterhauser, M., Gangl, A. und Peck-Radosavljevic, M., Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol*, 2009. 51(5): p. 865-73.
88. Hennenberg, M., Trebicka, J., Stark, C., Kohistani, AZ., Heller, J. und Sauerbruch, T., Sorafenib targets dysregulated Rho kinase expression and portal hypertension in rats with secondary biliary cirrhosis. *Br J Pharmacol*, 2009. 157(2): p. 258-70.
89. Kerbel, R.S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, BL. und Rak, J., Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. 20(1-2): p. 79-86.

## 8 Thesen

1. Leberzirrhose geht mit einer Zunahme des portalen Druckes und Abnahme der portal-venösen Durchblutung einher, wobei es durch einen verminderten Blutfluss über die Portalvene in die Leber kompensatorisch zur vermehrten Durchblutung der Leberarterie kommt (hepatic arterial buffer response).
2. Die Vasodilatation der Leberarterie im Frühstadium der Zirrhose ist durch eine erhöhte Konzentration an NO bedingt.
3. Es kommt schon im Frühstadium der Zirrhose zu einer Dilatation der Leberarterie ohne Vorliegen einer portalen Hypertension, wobei die Ursache der vermehrten Durchblutung der Leberarterie der durch Hypoxie verursachte Mehrbedarf an Sauerstoff der Hepatozyten sein könnte.
4. Demnach wäre die erhöhte hepatisch-arterielle Durchblutung in diesem Stadium unabhängig von der portalen Durchblutung und keine Folge, der in diesem Stadium noch nicht verminderten portal-venösen Durchblutung.
5. Zur Neoangiogenese und Remodeling der Leberarterie kommt es hauptsächlich im Spätstadium der Zirrhose.
6. Der verminderte Widerstand der Leberarterie kann sowohl im Frühstadium, als auch bei etablierter Zirrhose durch die Gabe des Multikinaseinhibitors Sorafenib unterbunden werden.
7. Im Stadium mit portaler Hypertension der Zirrhose ist Sorafenib nach langfristiger Anwendung nicht in der Lage die erhöhte Stickstoffmonoxidproduktion suffizient zu senken.
8. Different dazu ist bei kurzfristiger Anwendung, auch bei bereits etablierter Zirrhose, die Therapie mit Sorafenib in der Lage, der hepatisch-arteriellen Vasodilatation teilweise entgegenzuwirken.
9. Der portale Druck und der sinusoidale Widerstand waren bei etablierter Zirrhose, außer bei Ratten mit vier wöchiger Sorafenibbehandlung, signifikant erhöht.
10. Sorafenib könnte auf Grund unserer Ergebnisse als therapeutische Option im Stadium der Zirrhose ohne portale Hypertension möglicherweise das Spektrum der medikamentösen Therapie in Zukunft erweitern.

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Vor- und Zuname	Miriam Möller
Geburtsdatum und -ort	27.06.1987, Halle/Saale
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

### Schulbildung

---

08/1993 – 07/1997	Grundschule Karl Friedrich Friesen
08/1997 – 07/1999	Realschule Albrecht Dürer
08/1999 – 06/2006	Herdergymnasium Halle, Abschluss mit dem Abitur

### Studium

---

10/2006 – 12/2012	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
09/2008	Erste Ärztliche Prüfung
12/2012	Zweite Ärztliche Prüfung

### Assistenzzeit

---

seit 04/2013	Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau, Klinik für Innere Medizin II
--------------	---

Halle, den

Miriam Möller

### **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Halle, den

Miriam Möller