

Die Effekte des Multikinase-Inhibitors Regorafenib auf die zirrhotische und nicht-zirrhotische portale Hypertension im Rattenmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Frank Erhard Uschner, geb. Schulze

aus Dernbach

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jonel Trebicka
2. Gutachter: Prof. Dr. Marieta Toma

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.01.2020

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Material und Methoden	11
1.3 Ergebnisse	15
1.4 Diskussion	19
1.5 Zusammenfassung	23
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	24
2. Veröffentlichung	29
Abstract	29
Introduction	30
Results	30
Discussion	35
Materials and Methods	41
References	43
Supplementary Table 1	47
3. Danksagung	48

Abkürzungsverzeichnis

Acta2	muscle alpha 2 actin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
AST	Aspartat-Aminotransferase
BDL	Gallengangsligatur
G	Gauge
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CD31+	cluster of differentiation 31+
γ GT	gamma-Glutamyltransferase
CO	Herzzeitvolumen
Col1a1	collagen type 1 alpha 1 chain
ECM	extrazelluläre Matrix
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPVR	Hepatisch portal vaskulärer Widerstand
HSC	hepatische Sternzellen
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
MAP	Mittelarterieller Druck

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PP	Pfortaderdruck
PPVL	Partielle Portalvenenligatur
ROCK	Rho-associated protein kinase
s.c.	subkutan
SF	mesenterischer Shunt-Fluss
SpVR	Splanchnisch vaskulärer Widerstand
SVR	Systemisch vaskulärer Widerstand
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase
pVASP	phospho- vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Leberzirrhose ist Folge eines chronischen Leberschadens mit einem konsekutiven fibrotischen Gewebsumbau und führt zu einer eingeschränkten Leberfunktion bis hin zum akuten Leberversagen. Sowohl eine direkte (z.B. toxisch, viral, autoimmun), als auch eine indirekte Parenchymschädigung, z.B. in Folge geänderter Druck-/Flussverhältnisse (Budd-Chiari-Syndrom, Stauungsleber) können dabei ursächlich sein.

Die Aktivierung und Kontraktion hepatischer Sternzellen (HSC) sowie eine ausgeprägte Produktion von Extrazellulärmatrix (ECM) sind maßgeblich an der Entstehung der Fibrose beteiligt, welche wiederum den intrahepatischen Widerstand erhöht. Dadurch bildet sich eine portale Hypertension mit schwerwiegenden Komplikationen, wie Aszites und Varizenblutung (Bosch et al., 2010; Bosch et al., 2015; Friedman, 2008; Reeves und Friedman, 2002; Sanyal et al., 2008). Intrahepatische Mikrozirkulationsstörungen können zusätzlich ein hypoxisches Milieu begünstigen, welches über die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), zu einer intrahepatischen Angiogenese führt und dadurch den Progress der Fibrose weiter vorantreibt (Lemoine et al., 2016).

Auch vaskuläre Lebererkrankungen (z.B. Pfortaderthrombose) können, ohne Vorhandensein einer Leberzirrhose, durch eine Widerstandserhöhung im Pfortaderkreislauf zur portalen Hypertension führen (De Franchis, 2015; European Association for the Study of the Liver, 2016). Interessanterweise zeigen sowohl die zirrhotische- als auch die nicht-zirrhotische portale Hypertension ähnliche Charakteristika. Der erhöhte Pfortaderdruck induziert eine reflektorische Vasodilatation und nachfolgende Hyperämie des splanchnischen Gefäßbettes. Dadurch wird extrahepatisch ebenfalls eine

gesteigerte Angiogenese begünstigt, die zu einem weiteren Anstieg des portal-venösen Flusses und somit letztlich auch des Pfortaderdruckes beiträgt (McConnell und Iwakiri, 2018).

Die Hemmung der Angiogenese ist einer der Hauptaspekte der heutigen medikamentösen Tumorthherapie. Sowohl die Leberzirrhose, als auch vaskuläre Lebererkrankungen sind eng mit dem Auftreten von Tumor-Erkrankungen assoziiert. (Fernández et al., 2009; Ripoll et al., 2009). Während die Leberzirrhose ursächlich an der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) beteiligt ist, treten vaskuläre Lebererkrankungen gehäuft bei hepatischen und extrahepatischen Malignomen auf (Fernández et al., 2009; Moucari et al., 2008; Plessier et al., 2012). Vor kurzem erhielt der Multikinase-Inhibitor Regorafenib eine Zulassung der Food and Drug Administration zur Zweitlinientherapie des HCC sowie zur Behandlung gastrointestinaler Tumoren und wird seit Kurzem ebenfalls in Deutschland eingesetzt (Bruix et al., 2013; Bruix et al., 2017; Rimassa et al., 2017). Bereits das Vorgänger-Medikament Sorafenib zeigte anti-angiogenetische, aber vor allem auch anti-fibrotische Eigenschaften im Tiermodell, welche jedoch in der humanen Leberzirrhose nur bedingt bestätigt werden konnten (Hennenberg et al., 2011; Mejias et al., 2009; Pinter et al., 2012; Reiberger et al., 2009). Die grundlegende Wirkung von Multikinase-Inhibitoren basiert auf einer Hemmung verschiedener Kinase-vermittelter Signalwege, wie den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet derived growth factor- und den Rho-associated protein kinase (ROCK) Signalweg. Diese Signalwege sind maßgeblich an der Regulation der Angiogenese und vor allem auch des vaskulären Tonus beteiligt (Hennenberg et al., 2009; Wilhelm et al., 2006; Wilhelm et al., 2011).

Aufgrund des angenommenen Wirkungsspektrums von Regorafenib könnte es ein

geeignetes Medikament für die Therapie der portalen Hypertension darstellen.

Aus diesem Grund war das Ziel unserer Arbeit, den Einfluss von Regorafenib auf die zirrhotische und nicht-zirrhotische portale Hypertension im Tiermodell zu untersuchen.

1.2 Material und Methoden

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz, unter der Oberbehörde LANUV Nordrhein-Westfalen mit dem Aktenzeichen: 84-02.04.2015.A493, durchgeführt. Insgesamt wurden 56 männliche, ca. 180-200 g schwere, Sprague-Dawley Wildtyp (WT) Ratten verwendet. Alle Tiere erhielten Wasser und Standardnahrung *ad libitum* und wurden in kontrollierter Umgebung (Standard-IVC Käfige) unter zwölfstündigem Tag- und -Nachtzyklus bei konstant 22-24 °C gehalten. Die Experimente wurden während des Tageszyklus durchgeführt.

Für die Gallengangsligatur (BDL) wurden die Ratten mittels Ketamin (80-100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5-10 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal (i.p.) anästhesiert. Anschließend wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt, der Gallengang im Ligamentum hepatoduodenale aufgesucht und von der Portalvene, sowie der Arteria hepatica propria gelöst. Der Gallengang wurde anschließend mittels 3-0 Seide am proximalen und distalen Ende ligiert und in der Mitte durchtrennt. Abschließend wurden das Peritoneum und die Haut mittels Naht verschlossen. Die Finalversuche wurden nach 4 Wochen, wenn Aszites als definiertes Zeichen der dekompenzierten Leberzirrhose vorhanden war, ausgeführt.

Für die Portalvenenligatur (PPVL) wurden die Ratten wie beschrieben anästhesiert und es wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt. Anschließend wurde die Portalvene am Zusammenfluss der ileocolischen Venen im mesenterialen Fett aufgesucht und stumpf frei präpariert. Eine 20 Gauge (G) Kanüle wurde auf der Portalvene positioniert und mittels 3-0 Seide fixiert. Um einen Restfluss über die Pfortader zu gewährleisten, wurde die 20 G

Kanüle vorsichtig entfernt. Zum Schluss wurden Peritoneum und Haut mittels Naht verschlossen.

Regorafenib wurde von der Bayer AG, Leverkusen, Deutschland, zur Verfügung gestellt und in 34 % 1,2 Propylenglykol (1,2 Propandiol, #882281, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), 34 % Polyethylenglykol 400 (#81172, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 12 % Kollophor[®] P188 (#15759, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst. Regorafenib wurde entweder im Akutversuch oder über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die Ratten erhielten im Akutversuch entweder 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Regorafenib, 30 mg/kg KG Regorafenib oder das Lösungsmittel als Kontrolle. Bei der Langzeitgabe erhielten die Tiere täglich entweder 30 mg/kg KG Regorafenib oder das Lösungsmittel via Schlundsondierung.

Zur Bestimmung der Angiogenese wurde in BDL- und PPVL Ratten je 0,5 ml Matrigel (Matrigel, Corning, NY, USA) subkutan (s.c) und i.p. injiziert. Matrigel ist bei 4 °C flüssig und härtet bei Raumtemperatur aus. Nach Ende des Versuches wurde das Matrigel entnommen und mittels Tissue Tek[®] (Tissue Tek[®] OCT Compound, Sakura Finetek Deutschland) eingebettet. Zur Bestimmung der Angiogenese wurden mittels Kryostat Kryoschnitte mit einer Dicke von 10µm angefertigt. Die Kryoschnitte wurden mittels eines Erstantikörpers, cluster of differentiation (CD31+) (ab24590, Abcam, Cambridge, UK) (Endothelzellen) und alpha-smooth muscle actin (αSMA) (clone1A4, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) (Perizyten) Antikörper und dem korrespondierenden Zweitantikörper eingefärbt und es wurden die Zellzahlen ausgezählt.

Im Finalversuch wurde bei den Tieren eine invasive Hämodynamikmessung durchgeführt. Dafür wurden zunächst die linke Arteria und Vena femoralis freipräpariert, ein

Polyethylenkatheter eingeführt und mittels 3-0 Seide fixiert. Der Katheter in der A.femoralis diente dabei zur Messung des mittelarteriellen Drucks (MAP) und der Katheter in der V. femoralis zur Medikamentenapplikation. Anschließend wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt und ein weiterer Katheter in eine ileocolische Vene eingeführt. Der Katheter wurde dann bis zur Pfortader vorgeschoben und dort zur Portaldruck-(PP)-Messung fixiert. Abschließend wurde die rechte A. carotis präpariert und ein weiterer Katheter eingeführt und fixiert. Über diesen Katheter erfolgte die Applikation der systemischen Mikrosphären. Die invasiven Drücke wurden mittels Power Lab von AD Instruments (Power Lab, AD Instruments, Oxford, UK) gemessen.

Für die Mikrosphärentechnik wurden jeweils 300.000 systemische (rot/gelb) Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton-Technologies, San Diego, USA) über den Carotiskatheter in den linken Ventrikel über 30 s injiziert. Zeitgleich wurde über den Femoraliskatheter 0,65 ml Blut über einen Zeitraum von 1 min entnommen, um das Herzzeitvolumen zu kalkulieren. Anschließend wurden 150.000 Mikrosphären (weiß/blau) über den Portalvenenkatheter appliziert, um den Shunt-Fluss als Differenz zwischen Mikrosphären in der Lunge und der Leber zu kalkulieren. Am Ende der Versuche wurden die Organe entnommen und bei -80 °C eingefroren.

Die Leber- und Aortenproben wurden dann für die Proteinanalyse mittels Westernblot benutzt. Die Proben wurden in einem Puffer mit 25mM Tris/Salzsäure, 5mM Ethylendiamintetraessigsäure, 10µm Phenylmethylsulphyfluorid, 1mM Benzamidin und 10µg/ml Leupeptin homogenisiert. Anschließend wurde ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese Gel (10 %) verwendet und die Proben wurden auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Eine Ponceau-S-Färbung wurde verwendet um eine

gleichmäßige Proteinbeladung nachzuweisen. Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde als endogene Kontrolle verwendet. Die Membranen wurden in Milch blockiert und zunächst mit einem ersten Antikörper (Suppl. Table 1) und dann mit dem korrespondierenden, Meerrettichperoxidase-konjugierten zweiten Antikörper inkubiert (Santa-Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, USA). Die Auswertung erfolgte mittels Chemi-Smart (PeqLab, Biotechnologies, Erlangen, Germany).

Die Analyse der Serummarker Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP), gamma-Glutamyltransferase (γ GT) sowie Glutamatdehydrogenase (GLDH) erfolgte aus Serumproben der behandelten Ratten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney-*U*-Test durchgeführt und bei einem $p < 0.05$ als statistisch signifikant angesehen. Zur Analyse wurde GraphPad Prism 5.0 für Macintosh (Graph-Pad, San Diego, USA) verwendet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Langzeitgabe von Regorafenib im BDL - Modell

Nach 14-tägiger Gabe von Regorafenib (30 mg/kg KG) in den BDL-operierten Ratten wurden mögliche Effekte auf die Angiogenese und Hämodynamik untersucht. Es zeigte sich im s.c. und i.p. implantierten Matrigel eine verminderte Invasion von CD31+ (Endothelzellen) - und α -SMA (Perizyten)- positiven Zellen im Vergleich zu den Lösungsmittel-behandelten Kontrollen (Figure 3 A – B). Zusätzlich führte die Regorafenib-Gabe zu einem signifikant erhöhten splanchnischen vaskulären Widerstand (SpVR) (Fig. 3 C) sowie zu einem reduzierten mesenterischen Shunt-Fluss (SF) (Fig. 3 D) im Vergleich zu der Lösungsmittel-Gruppe. Interessanterweise wurden der PP (Fig. 3 E) und der hepatisch vaskuläre Widerstand (HPVR) ebenfalls signifikant durch die Regorafenib-Gabe gesenkt. Die systemische Zirkulation, dargestellt durch MAP, Herzminutenvolumen (CO) und systemischen vaskulären Widerstand (SVR), wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht durch Regorafenib beeinflusst (Table 1).

1.3.2 Akute Gabe von Regorafenib im BDL – Modell

Auch die akute Gabe von Regorafenib reduzierte den PP signifikant in BDL-operierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe, während der MAP unverändert blieb (Fig. 4 A). Der SpVR war im Gegensatz zur Langzeitgabe nur leicht erhöht, aber der SF signifikant durch Regorafenib reduziert (Fig. 4 B, Table 1). Die Gabe von 10 mg/kg Regorafenib und 30 mg/kg Regorafenib senkten den HPVR in den BDL-operierten Ratten (Table 1). Überraschenderweise hatte nur die niedrige Dosis einen signifikanten Einfluss auf Herzminutenvolumen und SVR (Table 1). Dort zeigte sich in Folge eines gesteigerten SVR ein signifikanter Abfall des Herzminutenvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe

(Table 1).

Diese gegensätzlichen Ergebnisse in Leber und im Gefäßsystem können durch Unterschiede in der Expression vasoaktiver Proteine erklärt werden. Während Regorafenib intrahepatisch zu einer reduzierten ROCK Aktivierung, gezeigt durch eine verminderte Moesin- sowie erhöhte vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) - Phosphorylierung (pVASP) führte, löste Regorafenib in der Aorta eine ROCK Aktivierung, gezeigt durch erhöhte Moesin-Phosphorylierung bei unverändertem pVASP, aus (Fig. 4 D).

1.3.3 Hepatotoxische Nebenwirkungen von Regorafenib

Nach Langzeitgabe von Regorafenib in den BDL-operierten Ratten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Transaminasen ALT und AST sowie der γ GT und AP im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fig. 5 A). Überraschenderweise konnte dieser Anstieg nicht nach akuter Gabe von 10 mg/kg und 30 mg/kg Regorafenib festgestellt werden. Während AST, γ GT und AP unverändert blieben, waren die ALT Serumlevel nur leicht erhöht (Fig. 5 B).

1.3.4 Regorafenib im PPVL – Modell

Neben der Leberzirrhose können auch vaskuläre Veränderungen zu einer portalen Hypertension führen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Regorafenib in einem Modell der nicht-zirrhatischen, prähepatischen portalen Hypertension untersucht. Sowohl nach akuter als auch nach langfristiger Gabe von Regorafenib wurde der PP im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt (Fig. 6 A-B). Während die akute Gabe lediglich zu einem leichten Anstieg des SpVR führte, stieg der SpVR nach langfristiger Gabe von Regorafenib signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe an (Fig. 6 C-D). Nach akuter Gabe

von 10 mg/kg Regorafenib und nach Langzeitgabe von 30 mg/kg Regorafenib wurde der SF signifikant gesenkt (Fig. 6E-F). Regorafenib hatte keinen Einfluss auf den MAP, aber nach akuter Gabe von 10 mg/kg Regorafenib kam es zu einem Anstieg des SVR (Table 2). Das Herzminutenvolumen und der HpVR blieben unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Table 2).

Zusätzlich reduzierte Regorafenib die Anzahl einwandernder CD31+ - und α -SMA-positiver Zellen in das s.c. und i.p. implantierte Matrigel (Fig. 6 G). Die einzige Ausnahme bildete die Anzahl α -SMA-positiver Zellen im s.c. Matrigel, auf die Regorafenib keinen Einfluss hatte (Fig. 6 G).

Abschließend wurden die hepatotoxischen Effekte einer Langzeitgabe von Regorafenib im PPVL-Modell untersucht. Hier zeigte sich, dass bei fehlender Vorschädigung der Leber, bis auf einen leichten Anstieg der ALT, sowohl AST, γ GT, als auch AP nach Regorafenib Gabe normwertig blieben (Fig. 6 H).

1.3.5 Effekte von Regorafenib auf die Leberfibrose und *in vitro* auf hepatische Sternzellen

Die Experimente zur Fibroseprogression/-regression in CCl₄ behandelten Mäusen und die *in vitro* Zellexperimente wurden von unseren Kooperationspartnern des Universitätsklinikums Aachen durchgeführt.

In WT-Mäuse wurde über einen Zeitraum von 7 Wochen mittels wiederholter intraperitonealer Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) Injektion eine Leberfibrose ausgelöst. Danach wurde Regorafenib oder dessen Vorgänger Sorafenib additiv über einen Zeitraum von zwei Wochen gegeben (Fibroseprogression) oder Regorafenib/Sorafenib wurde ohne weitere CCl₄ Injektion appliziert (Fibroseregession). Es zeigte sich, dass Sorafenib sowohl das Leber-zu-Körpergewicht-Verhältnis im Progressions- als auch im

Regressionsmodell reduzierte (Fig. 1 A). Dagegen führte die Gabe von Regorafenib zu einer signifikanten Reduktion des Milz-zu-Körpergewicht-Verhältnisses im Progressionsmodell und einer Reduktion des Leber-zu-Körpergewicht-Verhältnisses im Regressionsmodell (Fig. 1 A). Interessanterweise hatte Regorafenib keinen Einfluss auf den Kollagengehalt der Leber, gezeigt durch Sirius-Rot-Färbung und Hydroxyprolinbestimmung in BDL Ratten, im CCl₄ Progressions- und im Regressionsmodell (Fig. 1 B-C).

Weiterhin zeigte sich kein Effekt auf muscle alpha 2 actin (Acta2) mRNA oder alpha-smooth muscle actin (αSMA) Proteinexpression in der Leber nach Regorafenib und Sorafenib Behandlung (Fig.1 D).

Weder Regorafenib noch Sorafenib hatten einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von LX-2 Zellen (humane, immortalisierte, hepatische Sternzelle), aber Sorafenib reduzierte die Viabilität in GRX Zellen (murine, immortalisierte, hepatische Sternzelle) signifikant nach 48 h *in vitro* (Fig. 2 A-B). Die mRNA Expression der profibrotischen Marker Acta2, collagen type 1 alpha 1 chain (Col1a1) und tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp1) war sowohl in GRX-Zellen, als auch in primär isolierten murinen HSC inkonsistent und zeigte keinen klaren antifibrotischen Effekt von Regorafenib oder Sorafenib (Fig. 1 C-F). Neben der fehlenden antifibrotischen Effekte von Regorafenib oder Sorafenib zeigten sich nach der Langzeitgabe zusätzlich ein signifikanter Anstieg der AST, ALT und AP im Progressionsmodell und erhöhte Werte der AST, ALT, und GLDH im Regressions-Modell (Fig. 5 C-D).

1.4 Diskussion

Diese Studie zeigt, dass die Gabe des Multikinase-Inhibitors Regorafenib den Pfortaderdruck in der zirrhotischen und nicht-zirrhotischen portalen Hypertension effektiv senkt. Während eine langfristige Behandlung in beiden Tiermodellen die Angiogenese hemmen konnte, wurde kein signifikanter Effekt auf die Fibrogenese festgestellt. Stattdessen zeigten sich nach langfristiger Gabe von Regorafenib toxische Nebenwirkungen in der experimentellen Zirrhose.

Multikinase-Inhibitoren werden in der Tumorthherapie eingesetzt, da sie über eine Hemmung verschiedener Proteinkinasen, z.B. ROCK und VEGF, das Wachstum und die Gefäßversorgung des Tumorgewebes reduzieren können. Regorafenib soll als Nachfolgepräparat von Sorafenib vor allem eine höhere Effektivität und ein breiteres Wirkspektrum zeigen. Regorafenib wurde bereits zur Therapie kolorektaler Karzinome und gastrointestinaler Stromatumoren verwendet und zuletzt von der FDA zur Behandlung des HCC zugelassen. Darüber hinaus bestehen bereits umfassende Daten zur Behandlung des HCC mit Sorafenib, dem Vorgängerpräparat von Regorafenib (Fan et al., 2016; Grothey et al., 2013; Li et al., 2015; Stintzing, 2014; Takigawa et al., 2016). Dabei konnte gezeigt werden, dass Sorafenib und Regorafenib die Lebenserwartung in diesen Patienten verlängern und vor allem, dass Regorafenib seit der Zulassung in der HCC-Therapie ein wirksames Mittel bei Versagen der Erstlinientherapie mit Sorafenib darstellt (Bruix et al., 2013; Bruix et al., 2017).

Eine gesteigerte Angiogenese spielt bei nahezu allen Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle für Wachstum und Migration. Somit stellt die Hemmung der Angiogenese einen vielversprechenden Angriffspunkt aktueller medikamentöser Tumorthherapie dar (Fernández et al., 2009).

In der Leberzirrhose führt eine verstärkte Angiogenese im splanchnischen Gefäßbett durch einen gesteigerten portal-venösen Blutfluss zu einem Anstieg des Portaldrucks und letztlich zu Komplikationen für Patienten (Shah und Bruix, 2009). Nicht zuletzt können gastrointestinale Tumoren aufgrund ihres thrombogenen Potentials auch vaskuläre Lebererkrankungen verursachen (Regnault et al., 2017; Riva et al., 2012). Daher könnten Patienten mit Leberzirrhose und Nachweis eines HCCs sowie Patienten mit Tumor-assoziiierter Pfortaderthrombose von einer anti-angiogenetischen Therapie in doppeltem Sinne profitieren.

Diese Arbeit zeigt, dass Regorafenib deutliche anti-angiogenetische Eigenschaften hat. Sowohl die Invasion von Endothelzellen und Perizyten als auch der mesenterische Shunt-Fluss konnten durch Regorafenib reduziert werden. Dabei hat vor allem die akute Gabe von Regorafenib zusätzliche, vorteilhafte Effekte auf den vaskulären Tonus und führte auch zu einer strukturellen Veränderung des Gefäßsystems in den untersuchten Tieren. Wichtig dabei ist, dass diese positiven Effekte nicht auf die Leberzirrhose beschränkt blieben, sondern auch im Modell der Portalvenenobstruktion zu finden waren. Eine gesteigerte intrahepatische Angiogenese, die vor allem zu irregulären, deformierten Shuntverbindungen und damit einem weiteren Anstieg des hepatischen Widerstands führt, trägt zum Progress der Leberfibrose bei (Lemoine et al., 2016). Daher könnte eine Langzeittherapie mit Regorafenib auch positive, anti-fibrotische Effekte haben.

In dieser Studie konnten wir keinen direkten Effekt auf die Aktivierung der hepatischen Sternzellen und damit auf den Progress oder Regress der Leberfibrose feststellen. Auch die Gabe von Sorafenib hatte in unseren verwendeten Modellen keinen klaren anti-fibrotischen Effekt und entsprach somit den bereits in der Vergangenheit veröffentlichten, teils widersprüchlichen Studien. Diese beschrieben im Großteil der Fälle einen positiven

Effekt nur in frühen Phasen der Fibrose oder bei prophylaktischer Gabe von Sorafenib. (Hennenberg et al., 2009; Li et al., 2015; Mejias et al., 2009; Sung et al., 2018; Wang et al., 2010). In diesem Zusammenhang bestätigen unsere Daten, dass Multikinase-Inhibitoren in fortgeschrittenen Stadien und bei bereits etablierter Fibrose nur einen untergeordneten Effekt zu haben scheinen (Hong et al., 2013).

Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass Regorafenib bei langfristiger Gabe und vorgeschädigtem Lebergewebe hepatotoxische Nebenwirkungen verursachte. Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit in der Vergangenheit veröffentlichten Fallberichten von Patienten, die unter Regorafenib-Therapie ein akutes Leberversagen erlitten (Béchade et al., 2017; Mir et al., 2016; Sacré et al., 2016; Uetake et al., 2017). Mechanistisch könnte sowohl der Abbau von Regorafenib über das Cytochrom P450 3A4 System in der Leber, als auch eine negative Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette durch Regorafenib eine entscheidende Rolle für die Lebertoxizität spielen (Paech et al., 2018; Wang et al., 2018). Daher ist bei der Therapie mit Multikinase-Inhibitoren ein enges Monitoring der Leberwerte angezeigt.

Interessanterweise waren sowohl die akute Behandlung mit Regorafenib als auch die Gabe in der Portalvenenobstruktion gut verträglich und ein Anstieg der Leberenzyme konnte in diesem Setting nicht festgestellt werden.

Die größten Limitationen dieser Arbeit sind der Mangel an Humandaten, die relativ hoch gewählten Dosen von Regorafenib, welche dadurch hepatotoxische Nebenwirkungen auslösen könnten und die Fokussierung auf zwei Fibrosemodelle mit relativ kurzer Beobachtungszeit, die unter Umständen antifibrotische Effekte überdecken könnten. Nichtsdestotrotz konnten wir die gewonnenen Daten in verschiedenen Tiermodellen und unterschiedlichen Modellen der portalen Hypertension reproduzieren.

Abschließend zeigt diese Studie, dass Regorafenib ein geeignetes Medikament ist, um die Angiogenese und damit den Pfortaderdruck in der portalen Hypertension zu senken. Dabei scheint es vor allem dann sinnvoll, Regorafenib einzusetzen, wenn kein Lebervorschaden besteht, oder eine schnelle Drucksenkung im Pfortadersystem gewünscht ist.

1.5 Zusammenfassung

Chronische Lebererkrankungen führen zu einer portalen Hypertension mit schwerwiegenden Komplikationen für Patienten. Pathogenetisch entscheidend ist sowohl eine gesteigerte Angiogenese im splanchnischen Gefäßbett, als auch eine vaskuläre Dysregulation mit intrahepatischer Widerstandserhöhung und extrahepatischer Vasodilatation. Die portale Hypertension kann auch ohne zugrundeliegende Lebererkrankung im Rahmen von vaskulären Ereignissen auftreten. Der Multikinase-Inhibitor Regorafenib wird bereits zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms eingesetzt und greift in angiogenetische, fibrotische und kontraktile Signalwege ein. Regorafenib konnte in verschiedenen Tiermodellen der portalen Hypertension die Angiogenese hemmen und dadurch den Pfortaderdruck sowie den mesenterialen Shuntfluss und den hepatischen Widerstand, in der experimentellen Leberzirrhose, senken. Regorafenib hatte jedoch keinen Einfluss auf hepatische Sternzellen und damit auf die Fibrose, weder bei anhaltender Leberschädigung noch im Fibrose-Regressionmodell. Zusätzlich konnten hepatotoxische Nebenwirkungen bei der Langzeitgabe von Regorafenib in zirrhotischen Tieren festgestellt werden. Dagegen war die Wirkung vor allem bei akutem Einsatz oder im Modell der nicht-zirrhotischen portalen Hypertension vielversprechend und nicht mit toxischen Nebenwirkungen behaftet. Daher könnte Regorafenib in Zukunft vor allem selektiv in Patienten eingesetzt werden, die eine portale Hypertension bei erhaltener Leberfunktion haben.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Béchade, D., Desjardin, M., Castain, C., Bernard, P.-H., Fonck, M. Fatal Acute Liver Failure as a Consequence of Regorafenib Treatment in a Metastatic Colon Cancer. *Case Rep. Oncol.* 2017; 10: 790–794

Bosch, J., Abraldes, J.G., Fernández, M., García-Pagán, J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J. Hepatol.* 2010; 53: 558–567

Bosch, J., Groszmann, R.J., Shah, V.H. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J. Hepatol.* 2015; 62: S121-S130

Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.-H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P.J., Song, T., Bronowicki, J.-P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A.-L., Llovet, J.M., Finn, R.S., LeBerre, M.-A., Baumhauer, A., Meinhardt, G., Han, G. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389: 56–66

Bruix, J., Tak, W.-Y., Gasbarrini, A., Santoro, A., Colombo, M., Lim, H.-Y., Mazzaferro, V., Wiest, R., Reig, M., Wagner, A., Bolondi, L. Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *Eur. J. Cancer* 2013; 49: 3412–3419

De Franchis, R. on behalf of the Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J. Hepatol.* 2015; 63: 743-752

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Vascular diseases of the liver. *J. Hepatol.* 2016; 64: 179–202

Fan, L.-C., Teng, H.-W., Shiau, C.-W., Tai, W.-T., Hung, M.-H., Yang, S.-H., Jiang, J.-K., Chen, K.-F. Regorafenib (Stivarga) pharmacologically targets epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 64136–64147

Fernández, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., Bosch, J. Angiogenesis in liver disease. *J. Hepatol.* 2009; 50: 604–620

Friedman, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655–1669

Grothey, A., Van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., Adenis, A., Tabernero, J., Yoshino, T., Lenz, H.-J., Goldberg, R.M., Sargent, D.J., Cihon, F., Cupit, L., Wagner, A., Laurent, D. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381: 303–312

Hennenberg, M., Trebicka, J., Kohistani, Z., Stark, C., Nischalke, H.-D., Krämer, B., Körner, C., Klein, S., Granzow, M., Fischer, H.-P., Heller, J., Sauerbruch, T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab. Invest.* 2011; 91: 241–251

Hennenberg, M., Trebicka, J., Stark, C., Kohistani, A.Z., Heller, J., Sauerbruch, T. Sorafenib targets dysregulated Rho kinase expression and portal hypertension in rats with secondary biliary cirrhosis. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 157: 258–270

Hong, F., Chou, H., Fiel, M.I., Friedman, S.L. Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo. *Dig. Dis. Sci.* 2013; 58: 257–264

Lemoine, S., Thabut, D., Housset, C. Portal Myofibroblasts connect angiogenesis and fibrosis in liver. *Cell Tissue Res.* 2016; 365: 583-9

Li, J., Qin, S., Xu, R., Yau, T.C.C., Ma, B., Pan, H., Xu, J., Bai, Y., Chi, Y., Wang, L., Yeh, K.-H., Bi, F., Cheng, Y., Le, A.T., Lin, J.-K., Liu, T., Ma, D., Kappeler, C., Kalmus, J., Kim,

T.W. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 619–629

McConnell, M., Iwakiri, Y. Biology of portal hypertension. *Hepatol. Int.* 2018; 12 (Suppl 1):11-23

Mejias, M., Garcia-Pras, E., Tiani, C., Miquel, R., Bosch, J., Fernandez, M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009; 49: 1245–1256

Mir, O., Brodowicz, T., Italiano, A., Wallet, J., Blay, J.-Y., Bertucci, F., Chevreau, C., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Salas, S., Perrin, C., Delcambre, C., Liegl-Atzwanger, B., Toulmonde, M., Dumont, S., Ray-Coquard, I., Clisant, S., Taieb, S., Guillemet, C., Rios, M., Collard, O., Bozec, L., Cupissol, D., Saada-Bouزيد, E., Lemaignan, C., Eisterer, W., Isambert, N., Chaigneau, L., Cesne, A.L., Penel, N. Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 1732–1742

Moucari R., Rautou, P.E., Cazals-Hatem, D., Geara, A., Bureau, C., Consigny, Y., Francoz, C., Denninger, M.H., Vilgrain, V., Belghiti, J., Durand, F., Valla, D., Plessier, A. Hepatocellular carcinoma in Budd-Chiari syndrome: characteristics and risk factors. *GUT* 2008; 57: 828-835

Paech, F., Mingard, C., Grünig, D., Abegg, V.F., Bouitbir, J., Krähenbühl, S. Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology* 2018; 395: 34–44

Pinter, M., Sieghart, W., Reiberger, T., Rohr-Udilova, N., Ferlitsch, A., Peck-Radosavljevic, M. The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma--a pilot study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012; 35: 83–91

Plessier, A., Rautou, P.E., Valla, D.C. Management of hepatic vascular diseases. *J. Hepatol.* 2012; 56 Suppl.1: S25-S38

Reeves, H.L., Friedman, S.L. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front. Biosci.* 2002; 7: d808-d826

Regnault, H., Emambux, S., Lecomte, T., Doat, S., Dhooge, M., Besson, M., Dubreuil, O., Moryoussef, F., Silvain, C., Bachet, J.-B., Tougeron, D. Clinical outcome of portal vein thrombosis in patients with digestive cancers: A large AGEO multicenter study. *Dig. Liver Dis.* 2017; 50: 285-290

Reiberger, T., Angermayr, B., Schwabl, P., Rohr-Udilova, N., Mitterhauser, M., Gangl, A., Peck-Radosavljevic, M. Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J. Hepatol.* 2009; 51: 865–873

Rimassa, L., Pressiani, T., Personeni, N., Santoro, A. Regorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2017; 17: 567–576

Ripoll, C., Groszmann, R.J., Garcia-Tsao, G., Bosch, J., Grace, N., Burroughs, A., Planas, R., Escorsell, A., Garcia-Pagan, J.C., Makuch, R., Patch, D., Matloff, D.S. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J. Hepatol.* 2009; 50: 923–928

Riva, N., Donadini, M.P., Dentali, F., Squizzato, A., Ageno, W. Clinical approach to splanchnic vein thrombosis: risk factors and treatment. *Thromb. Res.* 2012; 130: Suppl 1, S1-3

Sacré, A., Lanthier, N., Dano, H., Aydin, S., Leggenhager, D., Weber, A., Dekairelle, A.-F., De Cuyper, A., Gala, J.-L., Humblet, Y., Sempoux, C., Van den Eynde, M. Regorafenib induced severe toxic hepatitis: characterization and discussion. *Liver Int.* 2016; 36: 1590–1594

Sanyal, A.J., Bosch, J., Blei, A., Arroyo, V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008; 134: 1715–1728

Shah, V.H., Bruix, J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009; 49: 1066–1068

Stintzing, S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 108

Sung, Y.-C., Liu, Y.-C., Chao, P.-H., Chang, C.-C., Jin, P.-R., Lin, T.-T., Lin, J.-A., Cheng, H.-T., Wang, J., Lai, C.P., Chen, L.-H., Wu, A.Y., Ho, T.-L., Chiang, T., Gao, D.-Y., Duda, D.G., Chen, Y. Combined delivery of sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development. *Theranostics* 2018; 8: 894–905

Takigawa, H., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Yuge, R., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Sci.* 2016; 107: 601–608

Uetake, H., Sugihara, K., Muro, K., Sunaya, T., Horiuchi-Yamamoto, Y., Takikawa, H. Clinical Features of Regorafenib-induced Liver Injury in Japanese Patients From Postmarketing Experience. *Clin. Colorectal Cancer.* 2017; 17: e49-e58

Wang, Y., Gao, J., Zhang, D., Zhang, J., Ma, J., Jiang, H. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2010; 53: 132–144

Wang, Y.-K., Xiao, X.-R., Xu, K.-P., Li, F. Metabolic profiling of the anti-tumor drug regorafenib in mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 159: 524–535
Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006; 5: 835–844

Wilhelm, S.M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C.A., Schütz, G., Thierauch, K.-H., Zopf, D. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer* 2011; 129: 245–25

The multikinase inhibitor regorafenib decreases angiogenesis and improves portal hypertension

Frank Erhard Uschner^{1,9}, Florian Schueller², Ivelina Nikolova¹, Sabine Klein^{1,3,9}, Robert Schierwagen¹, Fernando Magdaleno¹, Stefanie Gröschl¹, Sven Loosen², Thomas Ritz², Christoph Roderburg², Michael Vucur², Glen Kristiansen⁴, Twan Lammers⁵, Tom Luedde^{2,*} and Jonel Trebicka^{1,6,7,8,9,*}

¹Department of Internal Medicine I, University of Bonn, Bonn, Germany

²Department of Internal Medicine III, University of Aachen, Aachen, Germany

³Institute of Cellular Medicine, Fibrosis Research Group, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

⁴Department of Pathology, University of Bonn, Bonn, Germany

⁵Department of Nanomedicine and Theranostics, Institute for Experimental Molecular Imaging, University of Aachen, Aachen, Germany

⁶Institute of Clinical Research, Odense University Hospital, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

⁷European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure, Barcelona, Spain

⁸Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona, Spain

⁹Department of Internal Medicine I, University Hospital Frankfurt, Frankfurt, Germany

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Jonel Trebicka, email: jonel.trebicka@efclif.com

Keywords: fibrosis; cirrhosis; inflammation; angiogenesis; portal hypertension

Received: June 19, 2018

Accepted: October 24, 2018

Published: November 16, 2018

Copyright: Uschner et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Background and Aims: Angiogenesis is critically involved in the development of liver fibrosis, portal hypertension (PHT) and hepatocellular carcinoma (HCC). Regorafenib is a novel second-line therapy for HCC, but might also be beneficial in fibrosis and PHT even in absence of HCC. This study investigated the effects of regorafenib in experimental models without HCC.

Methods: Fibrosis (*in vivo* and *in vitro*), inflammation, liver damage (aminotransferases), angiogenesis (matrigel implantation) and *in vivo* systemic and portal hemodynamics were assessed in different mouse and rat models (bile duct ligation, CCl₄, partial portal vein ligation) after acute and chronic treatment with regorafenib.

Results: Long-term treatment with regorafenib improved portal hypertension most likely due to blunted angiogenesis, without affecting fibrosis progression or regression. Interestingly, acute administration of regorafenib also ameliorated portal hemodynamics. Although regorafenib treatment led to hepatotoxic side effects in long-term treated fibrotic animals, in partial portal vein ligated rats, no liver toxicity due to regorafenib was observed.

Discussion: Regorafenib might be especially suitable as therapy in patients with PHT and preserved liver function.

INTRODUCTION

In chronic liver disease, activation of contractile myofibroblasts with excessive extracellular matrix production leads to liver fibrosis and thereby increased hepatic vascular resistance [1, 2]. Structural changes in the liver architecture induce intra- and extrahepatic angiogenesis, which further promotes fibrosis progression and vascular dysfunction [3, 4]. Consequently, a vicious cycle is established that deteriorates portal hypertension, the prerequisite for potentially life threatening events, such as variceal bleeding, ascites and hepatorenal syndrome [5]. Also, in vascular liver diseases, portal hypertension can develop with similar complications [6]. Meanwhile, in portal hypertension due to advanced fibrosis or vascular liver diseases, hepatocellular carcinoma (HCC) can develop as it shares several common mechanisms, such as inflammation and/or angiogenesis [6–8]. Sorafenib is already well established as therapy for advanced HCC, while regorafenib is recommended as second-line therapy after sorafenib failure [9, 10]. However, even in the absence of HCC, experimental models suggested an effect of sorafenib on portal hypertension explained by reduced angiogenesis and vasoconstriction of splanchnic vessels [11–13]. Nevertheless, only a limited effect of sorafenib has been observed in human cirrhosis [14].

From the pathophysiological point of view, multikinase inhibitors target an abundance of signaling pathways. Apart from vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor, sorafenib also modulates Transforming protein RhoA (RHOA) / Rho-associated protein kinase (ROCK) signaling [15, 16]. Regorafenib is a more potent multikinase inhibitor [17], which could be particularly beneficial in patients with portal hypertension and HCC.

This study comprehensively investigated the effects of regorafenib and partly compared them to sorafenib in animals with liver fibrosis and portal hypertension.

RESULTS

Role of regorafenib treatment in progression and regression of fibrosis *in vivo*

Liver fibrosis was induced by intraperitoneal (i.p.) injections of carbon tetrachloride (CCl₄) (twice per week; 17 injections in total) in mice and regorafenib (30mg/kg BW per day), sorafenib (30mg/kg BW per day) or vehicle was administered daily by gavage feeding. Treatment started at the 14th CCl₄ injection for a further 14 days to determine the effects on fibrosis progression, while for fibrosis regression, treatment started on the last day of CCl₄ application for six additional days (Figure 1A).

While regorafenib reduced the spleen-bodyweight ratio, sorafenib reduced the liver- bodyweight ratio in the CCl₄ progression model. By contrast, regorafenib and

sorafenib reduced the liver- but not the spleen-bodyweight ratio in the regression mouse model compared to vehicle-treated animals (Figure 1A). Importantly, regorafenib and sorafenib treatment had no direct effect on fibrosis, shown by unchanged liver appearance (Supplementary Figure 1A), Sirius red staining (Figure 1B), hepatic hydroxyproline content (Figure 1C) and expression of profibrotic markers (Figure 1D; Supplementary Figure 1B-1C) in both animal models. Although hepatic mRNA levels of *actin*, *alpha 2*, *smooth muscle*, *aorta (Acta2)* were slightly reduced after sorafenib and regorafenib administration, protein levels remained unaltered in both therapeutic approaches (Figure 1C-1D). Furthermore, regorafenib treatment (30mg/kg BW per day; 14 days) had no effect on Actin, aortic smooth muscle (α -SMA) deposition, hydroxyproline content or hepatic profibrotic marker expression in an additional fibrosis progression model (bile duct ligation/BDL in rats) (Figure 1B-1C; Supplementary Figure 1C-1D). Nevertheless, regorafenib treatment significantly reduced hepatic *interleukin 1beta*, *interleukin 6* and *C-X-C motif chemokine ligand 10* mRNA expression in fibrosis regression, while in the progression model, none of these expressions were influenced by regorafenib or sorafenib (Supplementary Figure 1E).

Effect of regorafenib on HSC activation *in vitro*

Immortalized human (LX-2 cells) and murine (GRX cells) hepatic stellate cells (HSC) were used to analyze the effects of regorafenib and sorafenib (10nmol/ml) *in vitro*. Cell viability was not altered after regorafenib or sorafenib incubation in LX2 cells with and without parallel TGF- β 1 (4 ng/ml) stimulation (Figure 2A), while GRX cells displayed a reduced cell viability after 48 h of sorafenib administration with and without parallel TGF- β 1 (20ng/ml) activation (Figure 2B).

The mRNA expression of *Acta2*, *collagen, type I, alpha 1 (Colla1)* and *tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1)* was measured in GRX cells 24 h after regorafenib or sorafenib treatment. However, HSC marker expression was only slightly and inconsistently altered after either regorafenib or sorafenib incubation (Figure 2C-2E) and after parallel TGF- β 1 stimulation (Supplementary Figure 2A-2C).

Next, the effect of regorafenib and sorafenib on isolated primary murine HSCs was analyzed. HSCs were treated *in vitro* with regorafenib or sorafenib for 12 h before being harvested on day 2 or day 5 and expression of *Acta2*, *Colla1* and *Timp1* was monitored (Figure 2F). Since (i) regorafenib led to an elevated *Acta2* expression on day 2 but not on day 5, (ii) *Colla1* remained unaltered by regorafenib and sorafenib compared to the respective controls and (iii) only *Timp1* expression was mildly reduced after regorafenib treatment on day 5, no consistent effect of regorafenib or sorafenib on HSC activation could be observed in this experimental setup (Figure 2F).

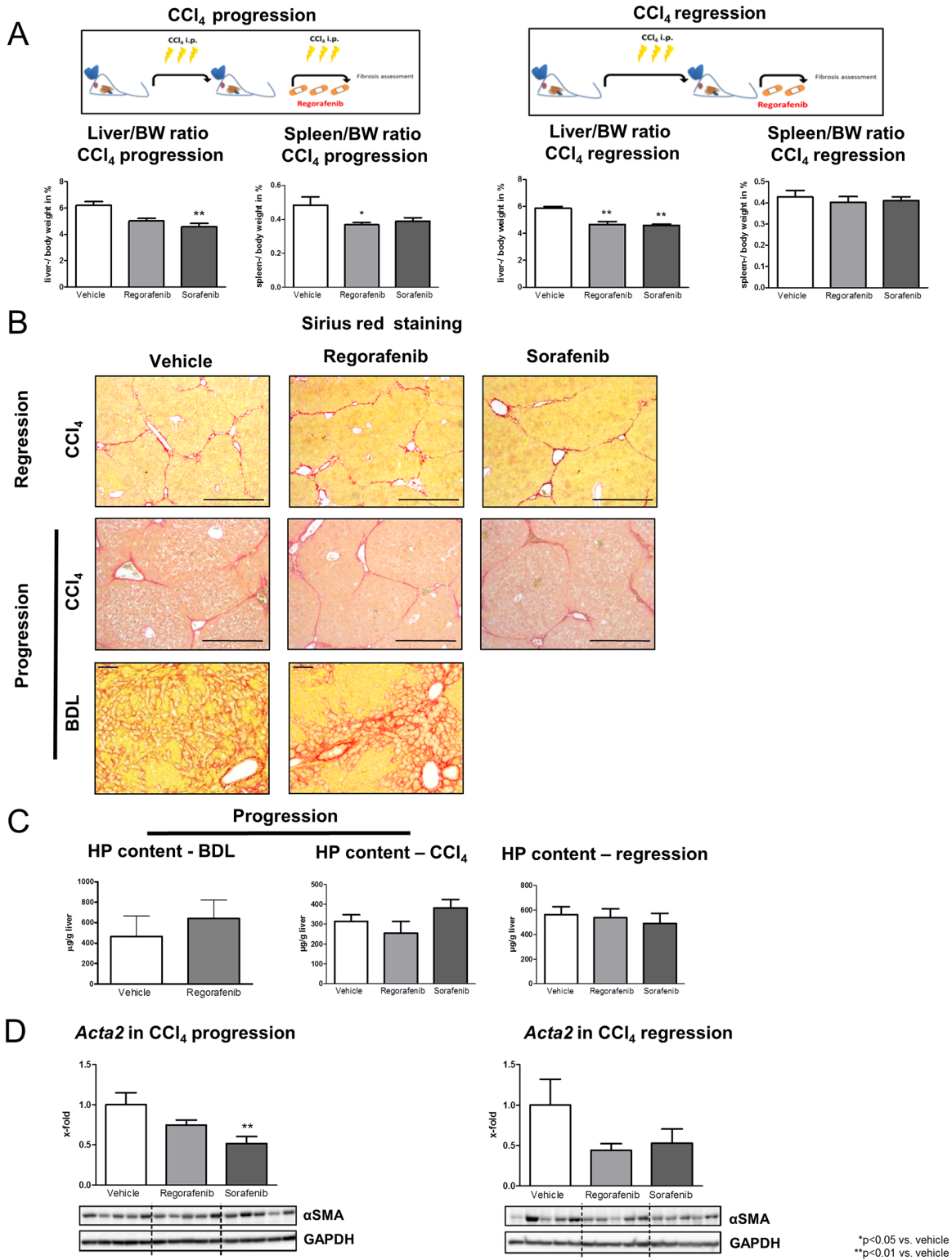


Figure 1: Role of regorafenib treatment in progression and regression of fibrosis *in vivo*. (A) Liver and spleen bodyweight ratio in the CCl₄ progression and regression model. (30mg/kg BW sorafenib or regorafenib) *p<0.05 vs. vehicle, **p<0.01 vs. vehicle (Kruskal-Wallis test or Bonferroni post-test). (B) Sirius red staining of liver sections as well as (C) hepatic hydroxyproline content in BDL rats, in the mouse progression and in the regression model after regorafenib or sorafenib administration (Kruskal-Wallis test or Bonferroni post-test). (BDL: scale bar = 100μm; CCl₄: scale bar = 400μm) (D) *Acta2* mRNA expression and α SMA protein expression after sorafenib and regorafenib treatment in the fibrosis progression and in the regression mouse model **p<0.01 vs. vehicle (Bonferroni post-test). Data are represented as mean +/- SEM.

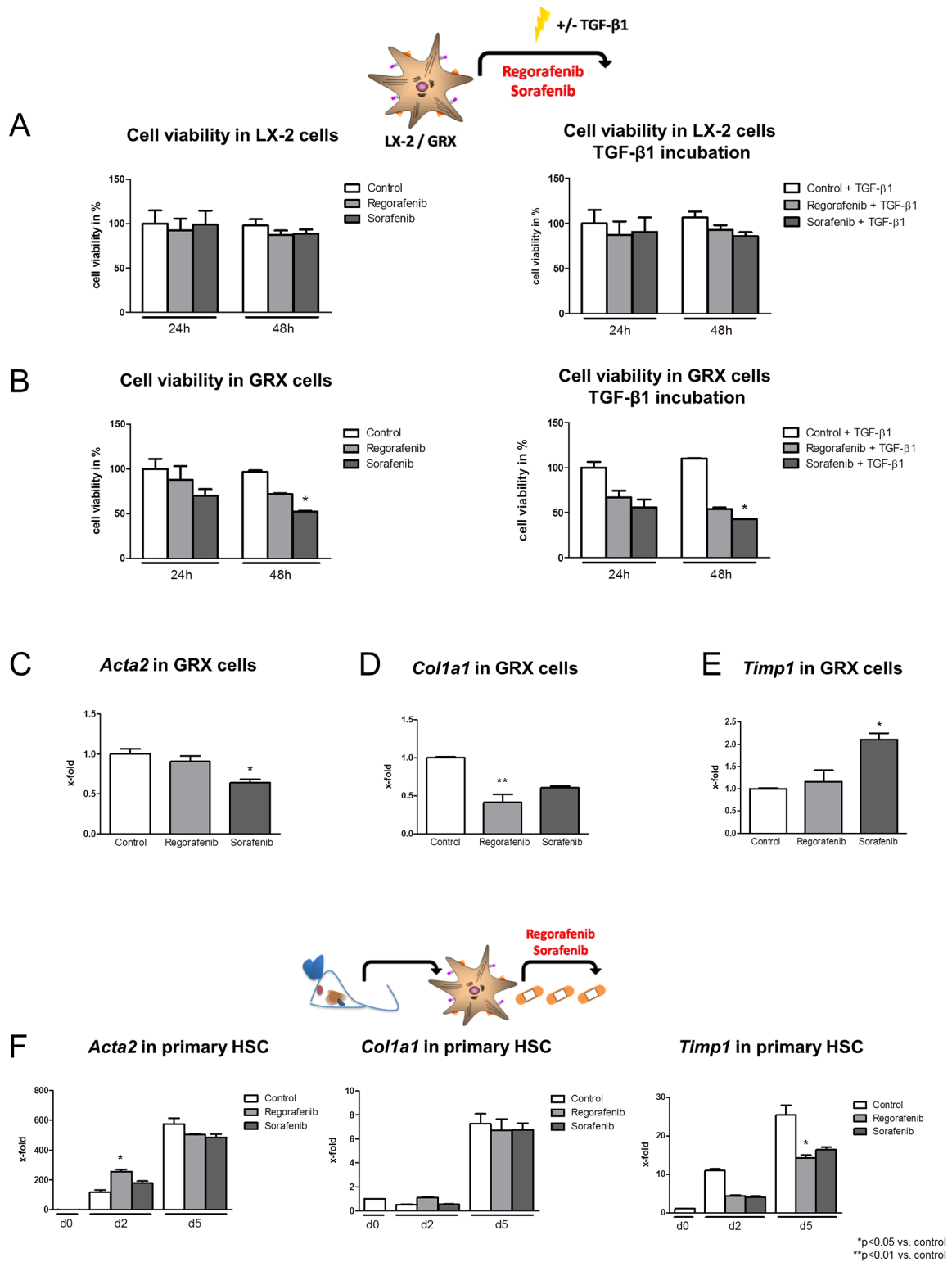


Figure 2: Effect of regorafenib on HSC activation *in vitro*. (A) Cell viability of human-derived LX-2 cells after 24 h and 48 h incubation with sorafenib or regorafenib (10nmol/ml) alone and after additional incubation with TGF-β1 (4ng/ml). (B) Cell viability in murine GRX cells after sorafenib or regorafenib incubation with and without TGF-β1 (20ng/ml) *p=0.05 vs. control (Kruskal-Wallis test). TGF-β1 concentration for murine and human cells was chosen according to previous published literature [44, 45]. mRNA expression of (C) *Acta2*, (D) *Col1a1* and (E) *Timp1* after regorafenib or sorafenib treatment (both 10nmol/ml) in GRX cells and (F) primary isolated murine HSC. *p<0.05 vs. control, **p<0.01 vs. control (Kruskal-Wallis test). Data are represented as mean +/- SEM.

In summary, regorafenib had no direct observable effect on HSC activation, fibrosis progression or regression. However, since recent studies showed antiangiogenic properties of multikinase inhibitors, which might be beneficial in chronic liver disease with portal hypertension [12–14], we further analyzed the angiogenic and hemodynamic changes in response to regorafenib.

Changes in hemodynamics and splanchnic angiogenesis after chronic regorafenib treatment

After two weeks of BDL, rats were treated with regorafenib (30mg/kg BW per day) for an additional two weeks by gavage feeding. Then, angiogenesis was assessed *in vivo* using matrigel implantation (subcutaneous: s.c. and intraperitoneal: i.p). At the end of the experiments, matrigel was stained for cluster of differentiation 31+ (CD31+) and α -SMA as marker for endothelial cells (EC) and pericytes. Interestingly, the amount of CD31+ cells (EC) and the amount of α -SMA-positive cells (pericytes) in the s.c. and i.p. implanted matrigel were significantly lower after treatment with regorafenib (Figure 3A-3B).

Since angiogenesis due to new vessel formation reduces vascular resistance, further worsens splanchnic hyperperfusion and aggravates portal hypertension, we measured invasive hemodynamics after completion of the experiments.

In the BDL model, regorafenib treatment significantly increased splanchnic vascular resistance (SpVR) and reduced portosystemic collateral blood flow (SF) compared to vehicle-treated animals (Figure 3C-3D). Furthermore, daily administration of regorafenib significantly reduced portal pressure (PP) compared to vehicle-treated animals without influencing mean arterial pressure (MAP) (Figure 3E, Table 1).

Interestingly, regorafenib treatment had also intrahepatic effects. Hepatic portal vascular resistance (HPVR) was significantly reduced after treatment with regorafenib compared to vehicle. Thus, systemic vascular resistance (SVR) and cardiac output (CO) were not influenced by regorafenib treatment (Table 1).

Taken together, regorafenib reduced splanchnic angiogenesis in liver fibrosis and thereby improved portal hypertension in long-term treated fibrotic animals. This might be the rationale to prevent portal hypertension-related complications in humans. Since the question remained whether a single dose of regorafenib might be beneficial, acute hemodynamic changes were further analyzed in BDL rats.

Hemodynamic changes after acute regorafenib treatment in BDL rats

After induction of liver cirrhosis by BDL for four weeks, a single dose of regorafenib (10mg/kg or 30mg/kg BW) was administered intravenously and hemodynamic

changes were assessed. PP was significantly reduced after regorafenib treatment with 10mg/kg and 30mg/kg regorafenib, while MAP was increased (Figure 4A). Both doses of regorafenib slightly increased SpVR compared to vehicle treatment and 10mg/kg regorafenib significantly reduced SF (Figure 4B-4C). Interestingly, 10mg/kg BW regorafenib treatment significantly reduced HPVR and CO, while SVR was significantly increased compared to vehicle treatment (Table 1). The dose of 30mg/kg BW also reduced HPVR, while CO and SVR were not altered by regorafenib.

These changes were due to reduced ROCK activation assessed by phosphorylated moesin protein and nitric oxide (NO) availability, shown by increased vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) protein phosphorylation in cirrhotic liver tissue (Figure 4D). Moreover, regorafenib treatment induced ROCK activation, shown by increased moesin protein phosphorylation in aortas of BDL rats, while phosphorylation of VASP remained unchanged (Figure 4D).

In conclusion, acute regorafenib administration also had beneficial effects on portal hemodynamics, which could provide a useful short-term approach in humans with liver fibrosis and portal hypertension.

Hepatotoxicity of regorafenib and sorafenib

As several reports have highlighted the hepatotoxicity of multikinase inhibitors [18–21] serum liver function markers were determined to further evaluate liver toxicity due to regorafenib treatment.

After two weeks of treatment, serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), γ -glutamyltransferase (γ -GT) and alkaline phosphatase (AP) were considerably increased in regorafenib-treated BDL rats (30mg/kg BW) compared to vehicle (Figure 5A). Comparable results were observed in the mouse fibrosis progression model (30mg/kg BW regorafenib) and less pronounced in the fibrosis regression model (30mg/kg BW regorafenib). Thus, AST, ALT and AP were significantly increased in the fibrosis progression model after regorafenib treatment compared to vehicle controls, while AST, ALT and glutamate dehydrogenase (GLDH) serum levels were increased in the fibrosis regression model (Figure 5B-5C). Furthermore, sorafenib slightly increased serum AP levels compared to vehicle in the fibrosis progression model and AST, ALT and GLDH in the fibrosis regression model (Figure 5B-5C).

Repeated regorafenib administration resulted in hepatotoxic effects, shown by increased levels of serum function markers. However, as it is unclear whether this is an acute phenomenon or whether it depends on the cumulative dose, we measured serum function markers after acute regorafenib administration in BDL rats (4 weeks).

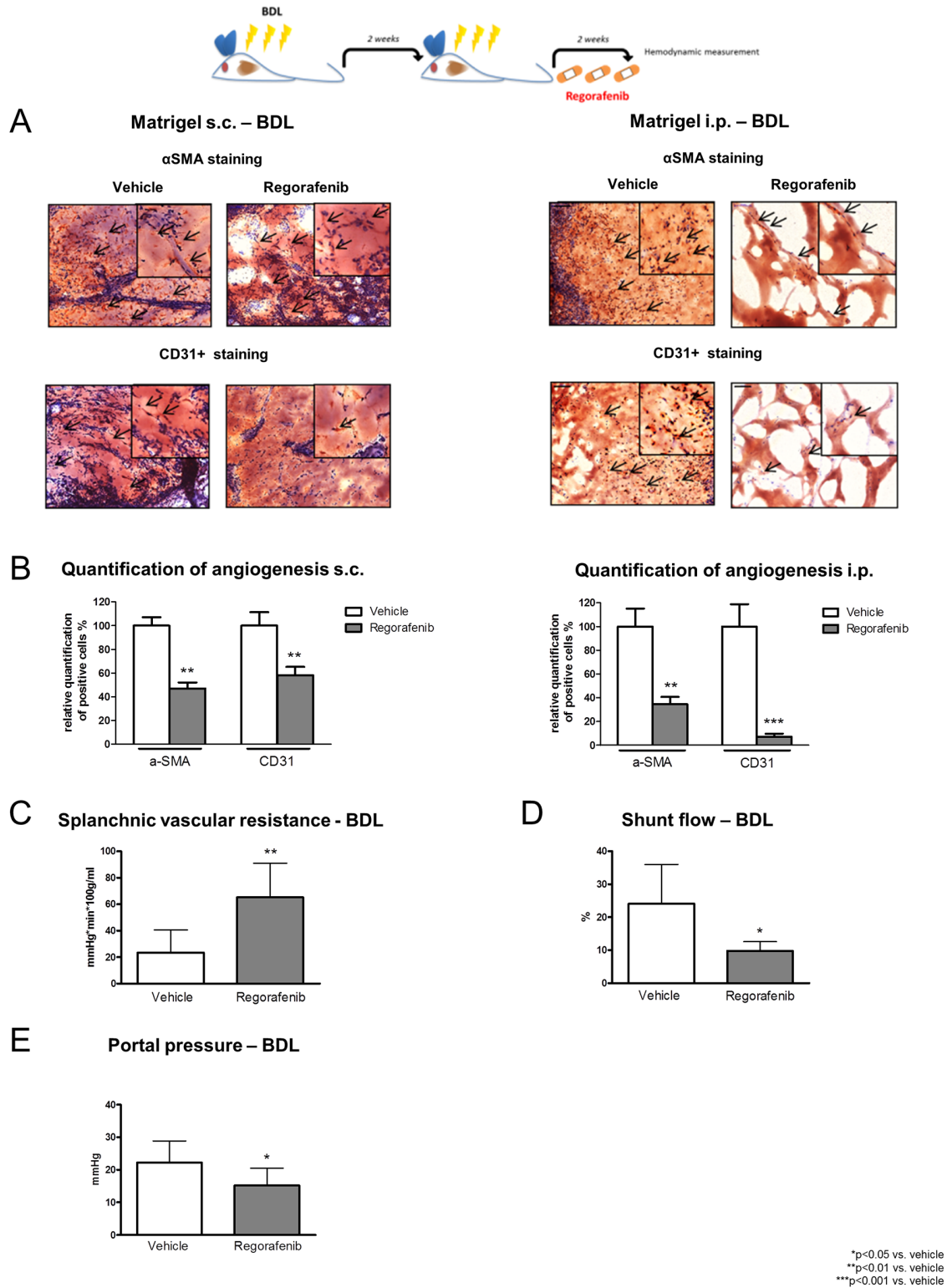


Figure 3: Changes in hemodynamics and splanchnic angiogenesis after two weeks of regorafenib treatment. (A) α SMA and CD31+ staining of s.c. and i.p. implanted matrigel in BDL rats after vehicle or regorafenib treatment (30mg/kg BW). (B) Quantification of angiogenesis in BDL rats treated with regorafenib or vehicle. **p<0.01 vs. vehicle, ***p<0.001 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). (C) Splanchnic vascular resistance, (D) portosystemic collateral blood flow and (E) portal pressure after long-term treatment with regorafenib compared to vehicle. *p<0.05 vs. vehicle, **p<0.01 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). Data are represented as mean +/- SEM.

Table 1: Hemodynamic changes after regorafenib treatment in BDL rats

	acute regorafenib administration in BDL rats														two weeks of regorafenib administration in BDL rats					
	vehicle (n=5)					10mg/kg regorafenib (n=7)					30mg/kg regorafenib (n=6)				vehicle (n=5)		30mg/kg regorafenib (n=6)			
	before		after			before		after			before		after		mean	SEM	mean	SEM	p-value	
	mean	SEM	mean	SEM	p-value	mean	SEM	mean	SEM	p-value	mean	SEM	mean	SEM						p-value
hepatic vascular resistance (mmHg*min*100g/ml)	7.159	2.083	7.538	2.017	1.0000	10.15	3.617	7.778	3.314	0.0469 *	9.73	3.896	7.251	3.359	0.3125	11.80	1.557	4.384	0.8603	0.0019 **
systemic vascular resistance (mmHg/ml/min/100g)	4.461	1.383	6.058	1.797	0.1250	4.966	0.704	11.61	4.389	0.0273 *	3.741	0.9523	8.377	1.915	0.0156 *	7.291	1.438	5.078	0.9296	0.2142
cardiac output (ml/min)	21.06	4.822	13.51	2.11	0.3750	26.35	7.646	17.04	5.579	0.0469 *	20.06	3.446	17.86	4.057	1.0000	28.05	6.602	25.55	6.806	0.9333
mean arterial pressure (mmHg)																86.00	9.680	94.50	8.122	0.5212

Interestingly, serum levels of AST, γ -GT and AP remained unchanged after acute single administration of increasing doses (10mg/kg; 30mg/kg) of regorafenib compared to vehicle in BDL rats, while ALT levels were just slightly increased (Figure 5D).

These data further support the hypothesis that regorafenib is useful for therapeutic acute short-term approaches. Nevertheless, regorafenib is mainly metabolized in the liver and thereby predestinates for hepatotoxic side effects. While HCC is frequently associated with portal vein thrombosis, this rarely occurs in the absence of cirrhosis. Furthermore, regorafenib is also used in colon and intestinal stromal cancer, which is possibly associated with portal vein thrombosis. For this group of patients, an anti-angiogenic, antihypertensive drug could be very beneficial. Therefore, we tested the hypothesis whether regorafenib also improves portal hypertension and angiogenesis in a model of subtotal portal vein ligation mimicking partial portal vein thrombosis.

Effects of regorafenib in an animal model of portal vein obstruction

Partial portal vein ligation (PPVL) was performed for two weeks in wild type rats. Regorafenib was administered as a single dose (10mg/kg BW; 30mg/kg BW) and acute hemodynamic changes were measured. In another set of PPVL rats, regorafenib was administered daily for two weeks (30mg/kg per day) by gavage feeding. Acute and chronic regorafenib treatment significantly reduced PP in all treated animals, while it remained unchanged after vehicle treatment (Figure 6A-6B). MAP was not influenced by acute and chronic regorafenib administration (Table 2).

SpVR was slightly increased after regorafenib treatment, whereas SF was significantly reduced in PPVL

rats treated with 10mg/kg BW regorafenib (Figure 6C, 6E). Furthermore, SVR was significantly increased after administration of 10mg/kg regorafenib, while 30mg/kg had no significant influence on SVR (Table 2).

After two weeks of regorafenib administration, SF was significantly reduced compared to vehicle treatment and SpVR was significantly increased in the regorafenib-treated animals (Figure 6D, 6F). HPVR and CO were not altered by acute regorafenib treatment (Table 2) and no effects were observed in HPVR, SVR and CO in animals treated for two weeks (Table 2).

In summary, acute regorafenib administration not only improved cirrhotic portal hypertension, but also hemodynamic circulation in an animal model mimicking portal vein thrombosis.

Next, angiogenesis was assessed by matrigel staining for α -SMA and CD31. Similar to the data obtained from BDL matrigel, the total amount of infiltrating EC and pericytes was significantly reduced in s.c. and i.p. implanted matrigel after treatment with regorafenib compared to the vehicle-treated PPVL rats (6G). Interestingly, except for increased ALT levels, liver serum markers remained unchanged during acute (single doses of 10mg/kg or 30mg/kg BW regorafenib) and chronic regorafenib (30mg/kg BW) administration (Figure 6H).

PPVL rats benefitted from acute as well as chronic regorafenib treatment through an inhibition of angiogenesis without the previously described toxic side effects.

DISCUSSION

This study shows that the multikinase inhibitor regorafenib reduces angiogenesis and improves portal hypertension in different experimental models of liver fibrosis and portal vein obstruction (Figure 7).

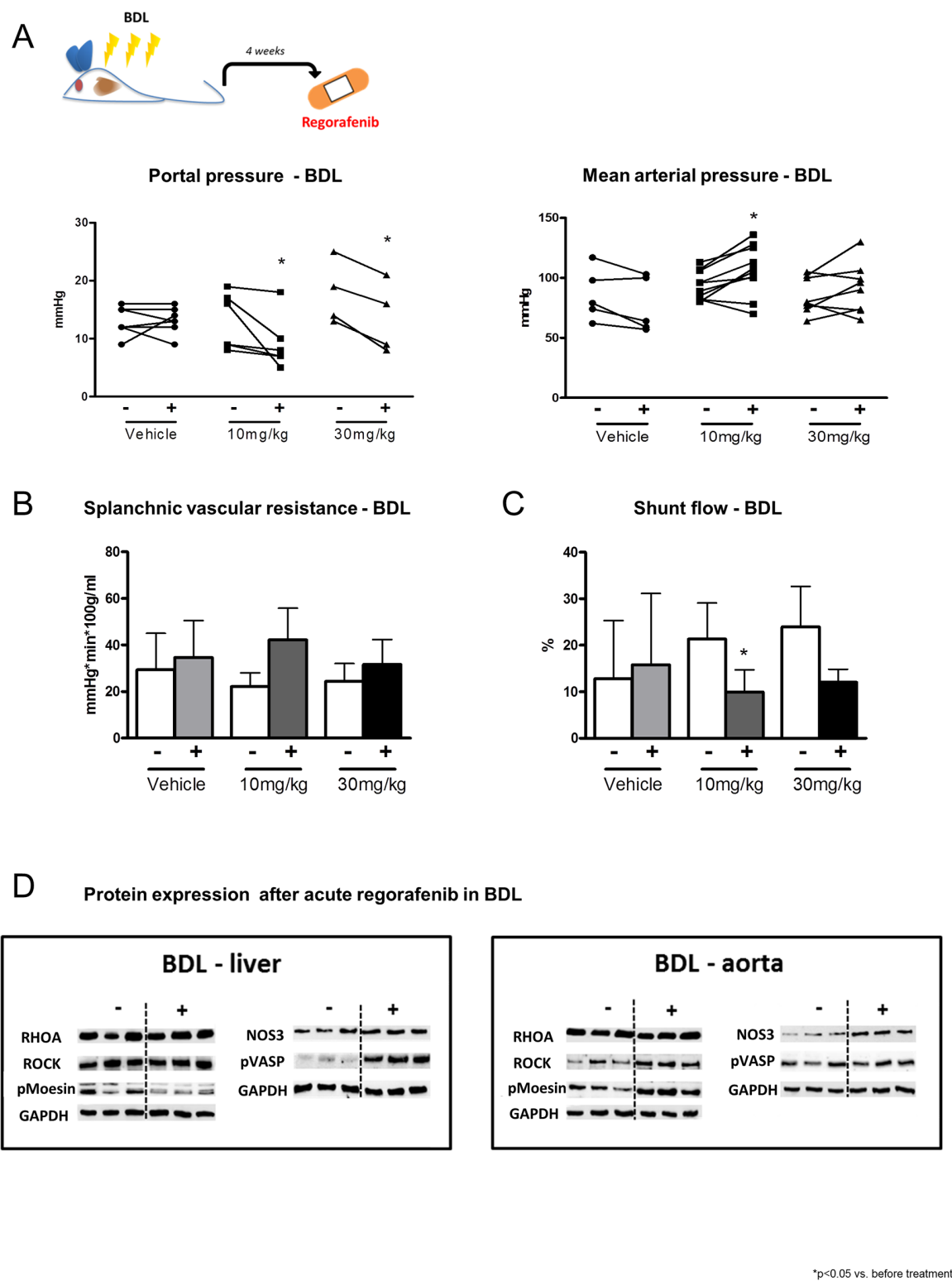


Figure 4: Hemodynamic changes after acute regorafenib treatment. (A) Portal pressure, mean arterial pressure, (B) splanchnic vascular resistance and (C) portosystemic collateral blood flow before and after acute administration of vehicle or regorafenib (10mg/kg and 30mg/kg BW) in BDL rats. *p<0.05 vs. before treatment (Mann-Whitney U-test). (D) Protein expression of RhoA, ROCK, pMoesin, nitric oxide synthase 3 (NOS3) and pVASP in liver and aortic tissue of BDL rats after regorafenib treatment. GAPDH served as endogenous control. Data are represented as mean +/- SEM.

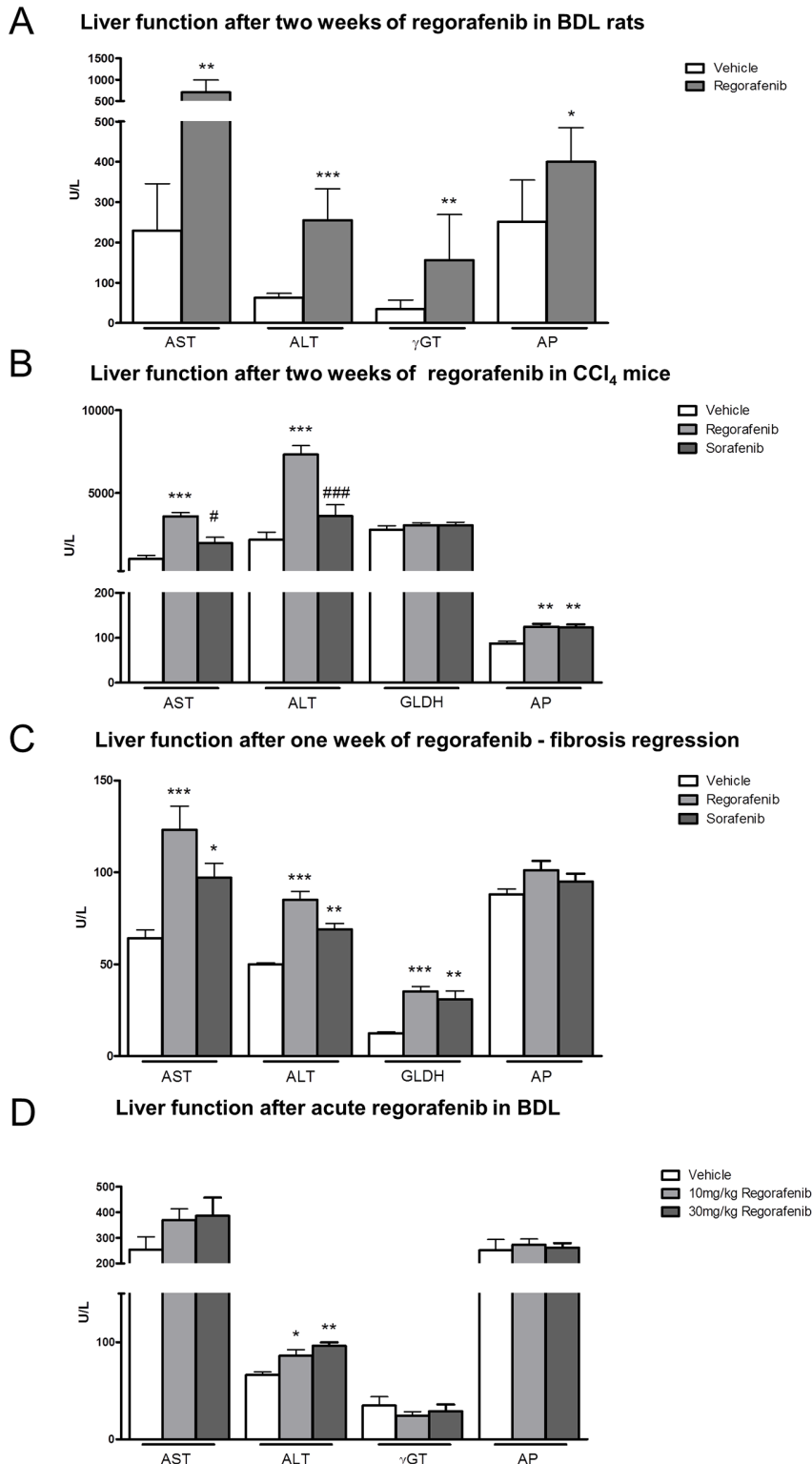


Figure 5: Hepatotoxicity of regorafenib and sorafenib. (A) Serum liver function markers (AST, ALT, μ GT and AP) after long-term treatment with regorafenib (30mg/kg BW) in BDL rats compared to vehicle. *p<0.05 vs. vehicle, **p<0.01 vs. vehicle, ***p<0.001 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). (B-C) Serum levels of AST, ALT, GLDH and AP after treatment with sorafenib or regorafenib (30mg/kg BW) in fibrosis progression and regression. *p<0.05 vs. vehicle, **p<0.01 vs. vehicle, ***p<0.001 vs. vehicle, #p<0.05 vs. regorafenib, ###p<0.001 vs. regorafenib (Kruskal-Wallis test or Bonferroni post-test) (D) Levels of AST, ALT, γ GT and AP after acute administration of regorafenib (10mg/kg, 30mg/kg BW) in BDL rats compared to vehicle. *p<0.05 vs. vehicle, **p<0.01 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). Data are represented as mean \pm SEM.

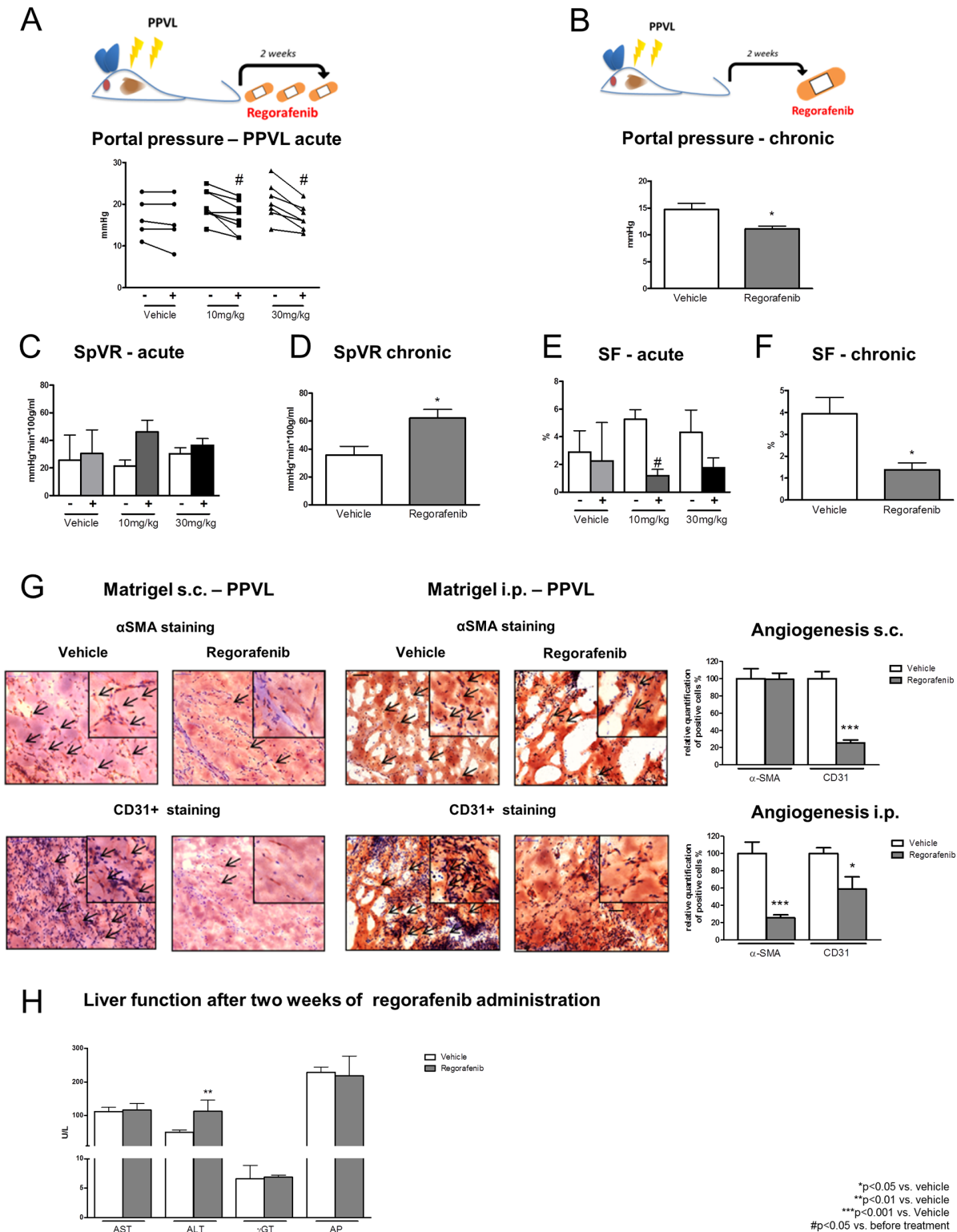


Figure 6: Effects of regorafenib in an animal model of portal vein obstruction. (A-B) Portal pressure in PPVL rats after acute (10mg/kg and 30mg/kg BW) and long-term treatment (30mg/kg) with regorafenib or vehicle. *p<0.05 vs vehicle, #p<vs. before treatment (Mann-Whitney U-test). **(C-D)** Splanchnic vascular resistance and **(E-F)** portosystemic collateral blood flow in acute and long-term treated PPVL rats compared to vehicle treatment. *p<0.05 vs vehicle, #p<0.05 vs. before treatment (Mann-Whitney U-test). **(G)** α SMA and CD31+positive cells in s.c. and i.p. implanted matrigel of PPVL rats treated with regorafenib. *p<0.05 vs. vehicle, ***p<0.001 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). **(H)** ALT, AST, μ GT and AP serum levels after long-term treatment with regorafenib in PPVL rats. **p<0.01 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test). Data are represented as mean +/- SEM.

Table 2: Hemodynamic changes after regorafenib administration in PPVL rats

	acute regorafenib administration in PPVL rats															two weeks of regorafenib administration in PPVL rats				
	vehicle (n=5)					10mg/kg regorafenib (n=6)					30mg/kg regorafenib (n=4)					vehicle (n=7)		30mg/kg regorafenib (n=5)		
	before		after			before		after			before		after							
	mean	SEM	mean	SEM	p-value	mean	SEM	mean	SEM	p-value	mean	SEM	mean	SEM	p-value	mean	SEM	mean	SEM	p-value
cardiac output (ml/min)	29.92	9.493	12.13	0.7631	0.1563	42.70	14.00	24.22	6.047	0.0938	38.16	18.52	22.92	7.422	0.2500	32.83	6.078	40.69	9.637	0.4908
hepatic vascular resistance (mmHg*min*100g/ml)	5.046	1.531	4.775	1.281	1.0000	6.336	1.511	4.901	0.9297	0.6875	6.696	2.498	6.693	2.925	1.0000	7.036	0.7529	5.481	0.7044	0.1622
systemic vascular resistance (mmHg/ml/min/100g)	4.549	1.271	7.930	0.9028	0.1833	3.302	1.469	7.323	2.052	0.0313*	3.272	1.195	3.690	1.295	0.6250	5.597	1.537	4.751	0.8393	0.6594
mean arterial pressure (mmHg)	97.17	7.097	103.00	5.672	0.0975	89.00	6.294	88.86	4.284	1.0000	108.80	9.196	98.50	7.194	0.1859	117.30	5.027	112.00	5.134	0.4765

In recent years, regorafenib was established for the therapy of colorectal cancer and gastrointestinal stromal tumors and was shown to prolong life expectancy in these patients [22–26]. Of note, regorafenib has now been approved as second-line therapy for hepatocellular carcinoma and it is currently the only alternative treatment if patients show disease progression while on sorafenib [9, 10].

Angiogenesis is a common mechanism of these cancers to maintain growth and infiltration. Therefore, the aim of anticancer therapy should be to reduce vessel formation and growth [8]. Moreover, the majority of patients with HCC have concomitant liver fibrosis and portal hypertension. In this scenario, regorafenib might have a dual beneficial effect, considering that angiogenesis is a driver of liver fibrosis [27]. Furthermore, gastrointestinal cancers have thrombotic potential and might lead to portal vein thrombosis, thereby yielding complications for patients and reducing life expectancy [28, 29]. Here, the pleiotropic effects of regorafenib might extend treatment options with better overall management, improving survival and quality of life in these patients.

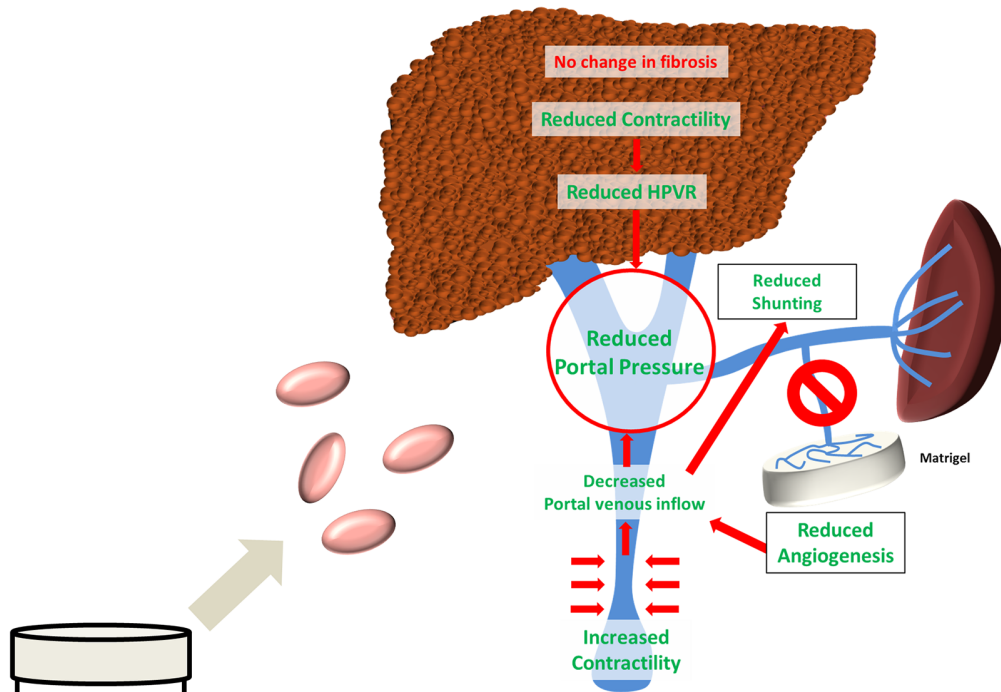
Considering previous experiences with sorafenib, which was shown to reduce experimental fibrosis and angiogenesis, the investigation of regorafenib in liver disease seems to be a logical consequence [12, 13, 30]. This study shows that regorafenib has strong anti-angiogenic properties, since intrahepatic and extrahepatic angiogenesis was reduced in different animal models of liver fibrosis and portal hypertension. This led to reduced portal venous inflow. Moreover, regorafenib treatment caused splanchnic and systemic vasoconstriction and thereby ultimately reduced portal pressure. Secondary to these effects, the decrease in portal venous inflow also reduced collateral blood flow and shunting. Outstanding hemodynamic changes were also observed after acute treatment with regorafenib due to rebalancing

of vasoconstrictive and –dilatory pathways. Thereby, regorafenib improved portal hypertension not only in experimental fibrosis, but also in a model of portal vein obstruction.

However, in our experimental setups, regorafenib and sorafenib displayed no therapeutic effect on the degree of matrix deposition during fibrosis progression or regression. Furthermore, *in vitro* analysis did not show a clear reduction of HSC activation markers after treatment with regorafenib or sorafenib. Several studies have indicated an antifibrotic effect of sorafenib, but inconsistent experimental results can be found in the literature and direct antifibrotic effects, especially in an advanced stage of liver fibrosis, could not be determined with certainty [13, 15, 30–32]. Importantly, sorafenib administration showed antifibrotic properties only in a prophylactic treatment model and in very low doses. In higher doses or later stages of fibrosis, sorafenib had no convincing effect [33]. In our setting, regorafenib showed effects similar to those observed with sorafenib.

Furthermore, hepatotoxicity is frequently noted with regorafenib treatment and cases of liver failure have been reported, with potentially fatal results for the treated patients [18–21]. Our current data are further supporting these findings. Fibrotic animals developed increased levels of serum function markers after chronic treatment with regorafenib (potentially slightly higher than with sorafenib). These effects might be due to the hepatic metabolism of regorafenib by cytochrome P450 3A4. Regorafenib seems to interfere with mitochondrial respiratory chain and thereby induced hepatocyte apoptosis and necroptosis *in vitro*. Taken together, these recently described side-effects might neutralize potential beneficial antifibrotic effects in experimental fibrosis [34, 35]. Importantly, under acute regorafenib treatment, liver function parameters were not markedly influenced, while in the healthy livers of the portal vein

Fibrosis / Cirrhosis



Prehepatic portal hypertension

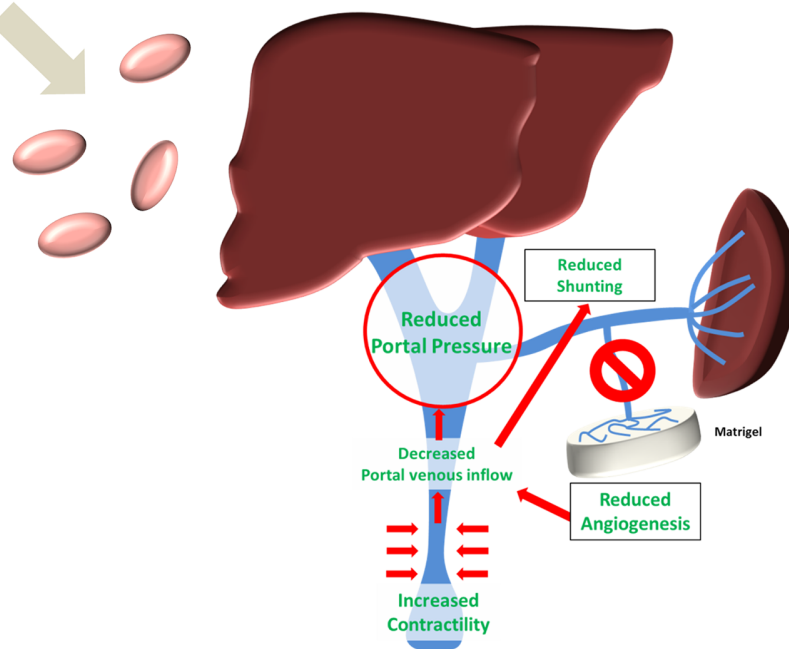


Figure 7: Graphical abstract. Treatment with the multikinase inhibitor regorafenib led to reduced contraction and hepatic vascular resistance in experimental liver cirrhosis without a major impact on fibrosis. Still, regorafenib significantly reduced angiogenesis, portosystemic collateral blood flow and shunting and thereby portal pressure. By contrast, in a model of prehepatic portal hypertension, regorafenib improved portal hypertension and reduced angiogenesis without hepatotoxic side-effects.

ligated animals, regorafenib had no major effect on liver function parameters. This raises the question as to whether regorafenib can be beneficial in the treatment of portal hypertension.

Our data deliver evidence that short-term administration is beneficial in portal hypertension in the presence as well as absence of liver disease without hepatotoxic side effects. Thus, acute treatment might be beneficial when a rapid reduction of portal pressure is needed, while, long-term treatment might be recommended in portal vein thrombosis and preserved liver function, especially if based on preexisting cancer. Nevertheless, there are few major limitations of this study. As recently described, beginning and duration of treatment seem to have a major impact on antifibrotic effects of multikinase inhibitors [33]. This is especially the case for the fibrosis regression model, in which the relatively short observation time during potent heterogenic fibrosis regression might cover antifibrotic effects. Moreover, the used doses of regorafenib might be responsible for the observed hepatotoxic side-effects and might lead to covering of antifibrotic effects. In addition, another major limitation is the lack of human data to confirm our hypotheses in a clinical setting.

However, we see similar effects of regorafenib in different models of liver fibrosis and portal hypertension and in different animal species. In this context, the present study possibly provides important rationales for patient selection, especially since these therapies are very expensive and might culminate in side effects [36].

In conclusion, this study shows that regorafenib could be especially beneficial in patients with preserved liver function and portal hypertension.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Regorafenib and sorafenib were kindly provided by Bayer AG, Leverkusen, Germany. Compounds were dissolved in an aqueous solution of 34% of 1,2 propylene glycol (1,2 propandiol, #882281, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 34% of polyethylene glycol 400 (#81172, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 12% of Kolliphor® P188 (#15759, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Animals

We used male wild type (WT) Sprague Dawley rats and male C57BL/6J mice in our experiments. The experiments were performed according to guidelines and regulations approved by LANUV, the responsible committee for animal studies in North Rhine-Westphalia. All animals received water and chow *ad libidum*. Sprague

Dawley rats were housed in a controlled environment (standard IVC-cage, 12 h light/dark, temperature 22°C -24°C), and fed standard rat chow (Ssniff, Soest, Germany). The experiments were performed during light cycle.

Induction of liver fibrosis in mice

Six to seven week old male C57BL/6J mice were used for both CCl₄-induced liver fibrosis models. In the liver fibrosis progression model, mice were injected intraperitoneally with 0.6ml carbon tetrachloride per kg body weight (CCl₄, Sigma Aldrich, Munich, Germany; mixed with sunflower seed oil) twice a week and 17 times in total. Starting from the 14th CCl₄ injection, mice were treated daily via oral gavage with either regorafenib (30mg/kg body weight) or sorafenib (30mg/kg body weight) for 14 days.

In the liver fibrosis regression model, mice were injected intraperitoneally with CCl₄ (0.6ml/kg body weight) twice a week and 17 times in total. Regorafenib or sorafenib was administrated via oral gavage for six days, starting on the last day of CCl₄ injection. Control mice were daily gavaged with vehicle solution (6µl/g body weight) for the respective treatment period.

Cholestatic model of fibrosis

Bile duct ligation (BDL) was performed in WT rats with an initial body weight (BW) of 180-200g as described previously [37, 38]. Experiments were carried out four weeks after BDL. Rats received either a single intravenous dose of regorafenib (10mg/kg BW or 30mg/kg BW) or daily oral doses of regorafenib (30mg/kg BW per day) for two weeks before sacrifice. Vehicle treatment served as control (1ml/kg BW).

Partial portal vein ligation (PPVL)

PPVL was performed in WT rats with an initial BW of 180-200g as described previously [39, 40]. Experiments were carried out two weeks after PPVL. Rats received either a single intravenous dose of regorafenib (10mg/kg BW or 30mg/kg BW) after two weeks of PPVL or daily oral doses of regorafenib (30mg/kg BW per day) for two weeks before sacrifice. Vehicle treatment served as control (1ml/kg BW).

In vivo hemodynamic experiments

In vivo hemodynamic studies were performed in BDL and PPVL rats as described previously [41]. The regorafenib effect was assessed using invasive continuous measurements of mean arterial pressure (MAP) and portal pressure (PP).

Microsphere technique

To investigate hemodynamics, the colored microsphere technique was performed as described previously [41], whereby 300,000 systemic (red/yellow) microspheres (15µm diameter, Triton-Technologies, San Diego, USA) were injected in the left ventricle. Mesenteric portal-systemic shunt volume was estimated by injection of 150,000 microspheres (white/blue) in the ileocecal vein [41].

Hydroxyproline assay

Hepatic hydroxyproline (HP) was measured photometrically in snap-frozen rat (200mg) and mouse (50mg) liver samples as described previously [42–44].

Cell culture experiments

GRX and LX2 cells were cultured in DMEM in 10% FCS and penicillin/streptomycin as previously described [44, 45]. The murine immortalized HSC-cell line GRX was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, Brazil). For stimulation, cells were seeded for either cell viability in 96-well plates (12,500 cells per well) or RNA expression analysis in 12-well plates (125,000 cells per wells) and were allowed to attach overnight. Stimulation was performed with 10 nmol/ml regorafenib or sorafenib (stock solution dissolved in DMSO; 0.1% DMSO in final solution) in medium that contained 2% FCS for GRX cells and 5% FCS for LX2 cells, according to the literature [44, 46]. Additional TGF stimulation was performed according to the literature with 20ng/ml TGF-β1 (#100-21, PeproTech, Rocky Hill, USA) for GRX cells and 4ng/ml for LX2 cells [44, 45]. Cells incubated in DMEM supplemented with either 5% (LX2) or 2% FCS (GRX) and 0.1% DMSO were used as controls. Cells were used at indicated time points for the respective analysis. Primary HSC were isolated and pooled from three 42-week old C57Bl6 mice via iohexol gradient with subsequent FACS sorting as described previously [47]. For RNA expression analysis, 112,500 cells were seeded out in 12-well plates and cultured in DMEM medium containing 10% FCS and penicillin/streptomycin for up to five days. Cells were stimulated for 12h with 10 nmol/ml regorafenib or 10nmol/ml sorafenib (culture medium containing 0.1% DMSO) before they were harvested two days or five days after seeding.

Western blotting

Rat liver samples were processed as previously described using sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and nitrocellulose membranes [37, 48]. Ponceau-S staining assured equal protein loading. Glyceraldehyde- 3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) served as endogenous control. Membranes were incubated with the respective primary antibody (Supplementary Table 1) and corresponding secondary peroxidase-coupled antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). After enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK), digital detection was evaluated using Chemi-Smart (PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Germany). Mice liver tissues were homogenized in NP-40 lysis buffer using Bead Ruptor 12 (omni international) to obtain protein lysates. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to *polyvinylidene difluoride* (PVDF) membrane (Merck Millipore) and analyzed by immunoblotting as previously described [49]. Primary antibodies are listed in Supplementary Table 1. As secondary antibody, anti-mouse HRP (GE Healthcare) was used.

Quantitative RT-PCR

RNA isolation, reverse transcription and detection by RT-PCR in rats were performed as described previously (18,19) and 18S rRNA served as endogenous control. RNA of mice and HSC samples were isolated using *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Germany) in combination with RNase-Free DNase Set (Qiagen) or *NucleoSpin RNA Plus* (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's protocols. RNA was reverse transcribed using either *cDNA synthesis Kit H Plus* (Peqlab, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) or *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* (#K1691, Thermo Scientific). 2µl of cDNA was added in a total volume of 10µl containing *Fast-SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) together with specific primers (Supplementary Table 2 and 3) and qPCR was performed on the *QuantStudio 6 flex* PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All results are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ and represent the x-fold increase of gene expression compared to the control group.

Histological staining

As described previously, paraffin sections, fixed with 4% paraformaldehyde) were stained with H/E and Sirius red, respectively, following a standard protocol for paraffin sections [50]. Images were obtained using a Leica DM 1000 microscope and a Leica EC3 camera in combination with Leica Application Suite.

Immunohistochemical staining for CD31+ and α-SMA

Staining for CD31+ and α-SMA was performed in cryosections from liver tissue (3µm and 7µm thickness, respectively) as described previously [51–53]. Briefly, after several steps, cryosections were incubated with a mouse anti-SMA antibody (clone 1A4; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) or with antibody against CD31+

(ab24590, Abcam, Cambridge, UK). Thereafter, a biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was used.

Serum analysis

Levels of serum ALT, AST, GLDH, AP and μ GT activity were measured by standard procedures at the Institute of Clinical Chemistry at University Hospital RWTH Aachen and at the Institute for Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology at University Hospital Bonn.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM unless otherwise indicated. Statistical analysis of two groups was performed with Mann-Whitney-*U* test. Only groups with more than three animals were tested statistically. Comparison of three groups was performed by using one-way Anova with Bonferroni post-test or by using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. Statistical analyses and graphics were performed using GraphPad Prism 5.0 for Macintosh (Graph-Pad, San Diego, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Abbreviations

Acta2: actin, alpha 2, smooth muscle, aorta; ALT: alanine aminotransferase; AP: alkaline phosphatase; α -SMA: Actin, aortic smooth muscle; AST: aspartate aminotransferase; BDL: bile duct ligation; BW: bodyweight; CCl₄: carbon tetrachloride; CD31+: cluster of differentiation 31+; γ GT: γ -glutamyltransferase; CO: cardiac output; Coll1 α 1: collagen type 1 alpha 1 chain; EC: endothelial cell; NOS3: nitric oxide synthase 3; GAPDH: glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase; GLDH: glutamate dehydrogenase; HCC: hepatocellular carcinoma; HPVR: hepatic portal vascular resistance; HSC: hepatic stellate cell; i.p.: intraperitoneal; MAP: mean arterial pressure; mRNA: messenger ribonucleic acid; NO: nitric oxide; PP: portal pressure; PPVL: partial portal vein ligation; RHOA: Transforming protein RhoA; ROCK: Rho-associated protein kinase; s.c.: subcutaneous; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis; SF: portosystemic collateral blood flow; SpVR: splanchnic vascular resistance; SVR: systemic vascular resistance; Timp1: tissue inhibitor of metalloproteinase 1; VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein; WT: wild type.

Author contributions

J.T. initiated the work. J.T. and T.Lu. coordinated the work. F.E.U., F.S., I.N., S.K., S.L., T.R. and S.G. performed experiments. F.E.U., F.S., D.M., I.N., R.S., F.M., S.G., C.R., M.V. and J.T. performed statistics. G.K., T.La. and T.Lu. provided essential materials. F.E.U., F.S.,

G.K., T.La., T.Lu. and J.T. drafted the manuscript. All authors critically discussed, corrected and reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank G. Hack, S. Bellinghausen and C. Esch for excellent technical assistance and S. Dentler for critical reading and correction of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

FUNDING

J. Trebicka, T. Luedde and Twan Lammers are supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant SFB TRR57) and Cellex Foundation.

REFERENCES

- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1655–69. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*. 2002; 7: d808-826.
- Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2010; 53: 558–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.021>.
- Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol*. 2015; 62: S121-130. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.003>.
- Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1715–28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.007>.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu. EASL Clinical Practice Guidelines: Vascular diseases of the liver. *J Hepatol*. 2016; 64: 179–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.040>.
- Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Makuch R, Patch D, Matloff DS; Portal Hypertension Collaborative Group. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol*. 2009; 50: 923–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.014>.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009; 50: 604–20. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.011>.

9. Bruix J, Tak WY, Gasbarrini A, Santoro A, Colombo M, Lim HY, Mazzaferro V, Wiest R, Reig M, Wagner A, Bolondi L. Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *Eur J Cancer*. 2013; 49: 3412–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.05.028>.
10. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017; 389: 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9).
11. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Krämer B, Körner C, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest*. 2011; 91: 241–51. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.148>.
12. Reiberger T, Angermayr B, Schwabl P, Rohr-Udilova N, Mitterhauser M, Gangl A, Peck-Radosavljevic M. Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol*. 2009; 51: 865–73. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.06.024>.
13. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*. 2009; 49: 1245–56. <https://doi.org/10.1002/hep.22758>.
14. Pinter M, Sieghart W, Reiberger T, Rohr-Udilova N, Ferlitsch A, Peck-Radosavljevic M. The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma—a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012; 35: 83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04896.x>.
15. Hennenberg M, Trebicka J, Stark C, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T. Sorafenib targets dysregulated Rho kinase expression and portal hypertension in rats with secondary biliary cirrhosis. *Br J Pharmacol*. 2009; 157: 258–70. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00158.x>.
16. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 835–44. <https://doi.org/10.1038/nrd2130>.
17. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch KH, Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*. 2011; 129: 245–55. <https://doi.org/10.1002/ijc.25864>.
18. Béchade D, Desjardin M, Castain C, Bernard PH, Fonck M. Fatal Acute Liver Failure as a Consequence of Regorafenib Treatment in a Metastatic Colon Cancer. *Case Rep Oncol*. 2017; 10: 790–4. <https://doi.org/10.1159/000479732>.
19. Mir O, Brodowicz T, Italiano A, Wallet J, Blay JY, Bertucci F, Chevreau C, Piperno-Neumann S, Bompas E, Salas S, Perrin C, Delcambre C, Liegl-Atzwanger B, et al. Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 1732–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30507-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30507-1).
20. Uetake H, Sugihara K, Muro K, Sunaya T, Horiuchi-Yamamoto Y, Takikawa H. Clinical Features of Regorafenib-induced Liver Injury in Japanese Patients From Postmarketing Experience. *Clin Colorectal Cancer*. 2018; 17:e49–e58. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.09.004>.
21. Sacré A, Lanthier N, Dano H, Aydin S, Leggenhager D, Weber A, Dekairelle AF, De Cuyper A, Gala JL, Humblet Y, Sempoux C, Van den Eynde M. Regorafenib induced severe toxic hepatitis: characterization and discussion. *Liver Int*. 2016; 36: 1590–4. <https://doi.org/10.1111/liv.13217>.
22. Fan LC, Teng HW, Shiau CW, Tai WT, Hung MH, Yang SH, Jiang JK, Chen KF. Regorafenib (Stivarga) pharmacologically targets epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 64136–47. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11636>.
23. Takigawa H, Kitadai Y, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Sci*. 2016; 107: 601–8. <https://doi.org/10.1111/cas.12907>.
24. Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep*. 2014; 6: 108. <https://doi.org/10.12703/P6-108>.
25. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Taberero J, Yoshino T, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013; 381: 303–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61900-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61900-X).
26. Li J, Qin S, Xu R, Yau TC, Ma B, Pan H, Xu J, Bai Y, Chi Y, Wang L, Yeh KH, Bi F, Cheng Y, et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015; 16: 619–29. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70156-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70156-7).
27. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology*. 2009; 49: 1066–8. <https://doi.org/10.1002/hep.22872>.
28. Regnault H, Emambux S, Lecomte T, Doat S, Dhooge M, Besson M, Dubreuil O, Moryoussef F, Silvain C, Bachet JB, Tougeron D. Clinical outcome of portal vein thrombosis in patients with digestive cancers: A large AGEO multicenter study. *Dig Liver Dis*. 2018; 50: 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.11.001>.
29. Riva N, Donadini MP, Dentali F, Squizzato A, Ageno W. Clinical approach to splanchnic vein thrombosis: risk factors

- and treatment. *Thromb Res.* 2012; 130: S1-3. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.08.259>.
30. Wang Y, Gao J, Zhang D, Zhang J, Ma J, Jiang H. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2010; 53: 132–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.02.027>.
 31. Liu C, Yang Z, Wang L, Lu Y, Tang B, Miao H, Xu Q, Chen X. Combination of sorafenib and gadolinium chloride (GdCl₃) attenuates dimethylnitrosamine(DMN)-induced liver fibrosis in rats. *BMC Gastroenterol.* 2015; 15: 159. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0380-5>.
 32. Sung YC, Liu YC, Chao PH, Chang CC, Jin PR, Lin TT, Lin JA, Cheng HT, Wang J, Lai CP, Chen LH, Wu AY, Ho TL, et al. Combined delivery of sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development. *Theranostics.* 2018; 8: 894–905. <https://doi.org/10.7150/thno.21168>.
 33. Hong F, Chou H, Fiel MI, Friedman SL. Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo. *Dig Dis Sci.* 2013; 58: 257–64. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2325-y>.
 34. Wang YK, Xiao XR, Xu KP, Li F. Metabolic profiling of the anti-tumor drug regorafenib in mice. *J Pharm Biomed Anal.* 2018; 159: 524–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.039>.
 35. Paech F, Mingard C, Grünig D, Abegg VF, Bouitbir J, Krähenbühl S. Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology.* 2018; 395: 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.01.005>.
 36. Parikh ND, Singal AG, Hutton DW. Cost effectiveness of regorafenib as second-line therapy for patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2017; 123: 3725–31. <https://doi.org/10.1002/cncr.30863>.
 37. Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology.* 2007; 46: 242–53. <https://doi.org/10.1002/hep.21673>.
 38. Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, Laleman W, Klein S, Granzow M, Nevens F, Zaagsma J, Heller J, Sauerbruch T. Role of β ₃-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 50: 1924–35. <https://doi.org/10.1002/hep.23222>.
 39. Resch M, Wiest R, Moleda L, Fredersdorf S, Stoelcker B, Schroeder JA, Schölmerich J, Endemann DH. Alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries in experimental portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297: G849–857. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00084.2009>.
 40. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1223–33. <https://doi.org/10.1172/JCI17458>.
 41. Grace JA, Klein S, Herath CB, Granzow M, Schierwagen R, Masing N, Walther T, Sauerbruch T, Burrell LM, Angus PW, Trebicka J. Activation of the MAS receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013; 145: 874–884.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.036>.
 42. Klein S, Hinüber C, Hittatiya K, Schierwagen R, Uschner FE, Strassburg CP, Fischer HP, Spengler U, Trebicka J. Novel Rat Model of Repetitive Portal Venous Embolization Mimicking Human Non-Cirrhotic Idiopathic Portal Hypertension. *PLoS One.* 2016; 11: e0162144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162144>.
 43. Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, Shir K, Klein S, Granzow M, Vogt A, Dienes HP, Lammert F, Reichen J, Heller J, Sauerbruch T. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2010; 53: 702–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.025>.
 44. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53: 209–18. <https://doi.org/10.1002/hep.23922>.
 45. Li HY, Ju D, Zhang DW, Li H, Kong LM, Guo Y, Li C, Wang XL, Chen ZN, Bian H. Activation of TGF- β 1-CD147 positive feedback loop in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis. *Sci Rep.* 2015; 5: 16552. <https://doi.org/10.1038/srep16552>.
 46. Su TH, Shiau CW, Jao P, Liu CH, Liu CJ, Tai WT, Jeng YM, Yang HC, Tseng TC, Huang HP, Cheng HR, Chen PJ, Chen KF, et al. Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 7243–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507499112>.
 47. Bartneck M, Warzecha KT, Tag CG, Sauer-Lehnen S, Heymann F, Trautwein C, Weiskirchen R, Tacke F. Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2015; 2015: 417023. <https://doi.org/10.1155/2015/417023>.
 48. Klein S, Klösel J, Schierwagen R, Körner C, Granzow M, Huss S, Mazar IG, Weber S, van den Ven PF, Pieper-Fürst U, Fürst DO, Nattermann J, Lammert F, et al. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest.* 2012; 92: 1440–50. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.106>.
 49. Schneider AT, Gautheron J, Feoktistova M, Roderburg C, Loosen SH, Roy S, Benz F, Schemmer P, Büchler MW, Nachbur U, Neumann UP, Tolba R, Luedde M, et al. RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2017; 31: 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.009>.

50. Roderburg C, Benz F, Vargas Cardenas D, Koch A, Janssen J, Vucur M, Gautheron J, Schneider AT, Koppe C, Kreggenwinkel K, Zimmermann HW, Luedde M, Trautwein C, et al. Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver Int.* 2015; 35: 1172–84. <https://doi.org/10.1111/liv.12627>.
51. Trebicka J, Racz I, Siegmund SV, Cara E, Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Wojtalla A, Hennenberg M, Huss S, Fischer HP, Heller J, Zimmer A, et al. Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor-deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int.* 2011; 31: 860–70. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02496.x>.
52. Huss S, Schmitz J, Goltz D, Fischer HP, Büttner R, Weiskirchen R. Development and evaluation of an open source Delphi-based software for morphometric quantification of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010; 3: 10. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-3-10>.
53. Trebicka J, Wix C, von Heydebrand M, Hittatiya K, Reiberger T, Klein S, Schierwagen R, Kristiansen G, Peck-Radosavljevic M, Fischer HP, Møller S, Bendtsen F, Krag A, et al. Expression of vasoactive proteins in gastric antral mucosa reflects vascular dysfunction in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* 2014; 25: 1393-1402. <https://doi.org/10.1111/liv.12613>.

Supplementary Table 1: Primary antibodies used for Western blots

Antigen/Origin	Company
α SMA / mouse IgG	Sigma-Aldrich, USA (A2547)
RHOA / mouse IgG	Santa Cruz, USA (sc-418)
ROCK / rabbit IgG	Santa Cruz, USA (sc-5561)
P-Moesin / rabbit IgG	Santa Cruz, USA (sc-12895-R)
NOS3 / mouse IgG	BD, USA (Cat. 610296)
P-VASP / mouse IgG	Merck, USA (#676602)
GAPDH / rabbit IgG	Santa Cruz, USA (sc-25778)
GAPDH / mouse IgG	Bio Rad, USA (MCA 4739)

3. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jonel Trebicka, welcher mich herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und von Anfang an integriert hat. Seither hat er mir nicht nur mein Dissertationsthema zur Verfügung gestellt, sondern mir über die ganze Zeit mit Rat und Tat sowie vielen guten Einfällen zur Seite gestanden und mir natürlich auch einige schlaflose Nächte bereitet. So ist er in dieser Zeit zu einem Mentor geworden, der mich auch in Zukunft auf meinem wissenschaftlichen Weg begleiten wird. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Sabine Klein, die mich vom ersten Tag an betreut und mir alle praktischen Fähigkeiten und Fertigkeiten mitgegeben hat, die ich heute beherrsche. Ohne sie wäre meine Arbeit im Labor nicht denkbar gewesen und sie ist darüber in den letzten Jahren zu einer meiner besten Freunde geworden. Daneben möchte ich mich vor allem bei Robert Schierwagen, Gudrun Hack und Silke Bellinghausen bedanken, die mich bei jeder Frage und jedem Problem im Labor unterstützt haben und mir in den letzten Jahren die beste Zeit bereitet haben, die ich mir vorstellen kann. Vor allem im privaten, aber auch im beruflichen Umfeld war mein Freund und Kollege, Fernando Magdaleno eine große Stütze und ich bin ihm für alles dankbar, was er für mich getan hat. In der ganzen Zeit ist so das Labor zu meiner zweiten Familie geworden. Besonderer Dank gilt meinem Vater, Frank Uschner. Er hat mich so lange ich zurückdenken kann motiviert zu lernen, offen für Neues zu sein, mein Bestes zu geben, hart zu arbeiten und vor allem hat er mich während des Studiums und der Promotionszeit sehr unterstützt. Zuletzt gilt mein Dank meiner Mutter Christine, meinen Schwestern Nadine und Sabrina, sowie meinem Onkel und meiner Tante, die mich vor allem privat unterstützt haben und es mir zum Glück auch nicht übel genommen haben, wenn ich mich in Arbeit versunken längere Zeit nicht bei ihnen gemeldet habe.