

**Die Effekte von Udenafil und Propranolol
auf die portale Hypertension und erektile Dysfunktion
in der experimentellen Leberzirrhose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Kathleen Glückert

aus Herford

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jonel Trebicka
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Pfeifer

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.09.2021

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Direktor: Prof. Dr. Christian P. Strassburg

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.2.1	Humane Proben	9
1.2.2	Induktion der Leberzirrhose im Tiermodell	9
1.2.3	Medikamente.....	10
1.2.4	Messungen der hepatischen und systemischen Hämodynamik.....	11
1.2.5	Messungen der Hämodynamik des Corpus cavernosums	12
1.2.6	Molekulare Auswirkungen auf den NO-cGMP-Signalweg	13
1.2.7	Patientenkollektiv und Erfassung der ED	15
1.2.8	Statistische Analyse	15
1.3	Ergebnisse	16
1.3.1	Hämodynamische Auswirkungen von Udenafil und Propranolol in der experimentellen Leberzirrhose	16
1.3.2	Auswirkungen von Udenafil und Propranolol auf den NO-cGMP- Signalweg in der Leberzirrhose.....	17
1.3.3	Vorkommen von ED in der Leberzirrhose und unter NSBB-Einnahme	19
1.4	Diskussion.....	19
1.5	Zusammenfassung.....	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
2.	Veröffentlichung.....	28
	Abstract.....	28
	Introduction	29
	Materials and Methods.....	29

Results	31
Discussion.....	37
References.....	39
3. Danksagung.....	45

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Leberzirrhose stellt mit einer Inzidenz von ca. 250 Fällen auf 100.000 Personen pro Jahr in Europa ein häufiges Krankheitsbild dar (Herold, 2018). Hierbei führt eine Leberschädigung zur Aktivierung von Leber-Sternzellen (HSC), was wiederum eine Proliferation, Kontraktion, Produktion von extrazellulärer Matrix und Transdifferenzierung zu Myofibroblast-ähnlichen Zellen zur Folge hat (Friedman, 2008; Reeves und Friedman, 2002). Des Weiteren kommt es zum Umbau der sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) mit einer Kapillarisation der Sinusoide sowie einem fehlreguliertem Gefäßtonus durch ein Überangebot vasokonstriktiver Mediatoren wie Endothelin und einem Mangel an Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) (DeLeve, 2015; García-Pagán et al., 2012; Hu et al., 2013). Die Fibrosierung und Dysregulation des Vasotonus sind bedeutende Faktoren in der Entstehung eines erhöhten hepatischen Gefäßwiderstandes. Hierunter entwickelt sich eine Hyperperfusion des splanchnischen Gefäßbettes mit einer konsekutiven NO-vermittelten Vasodilatation (Bolognesi et al., 2014). Die resultierende portale Hypertension (PHT) führt zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie zum Beispiel Ösophagusvarizenblutungen (Sanyal et al., 2008; Turon et al., 2013). Außerdem rücken zunehmend Folgen der Leberzirrhose und PHT in den Fokus, welche die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen. Hierzu zählt die erektile Dysfunktion (ED), deren Vorkommen in Abhängigkeit des Schweregrades der Lebererkrankung in den letzten Jahren in mehreren Studien diskutiert wurde (Andersson, 2018; Durazzo et al., 2010; Paternostro et al., 2018; Philonenko et al., 2019).

Der unselektive β -Blocker (NSBB) Propranolol wird als Standard in der Prophylaxe und Therapie bei PHT-bedingten Blutungsereignissen eingesetzt. Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob die Einnahme von β -Blockern ein unabhängiger Risikofaktor für das Vorkommen einer ED in der Leberzirrhose ist (Maimone et al., 2019; Paternostro et al., 2018). In diesem Falle bestünde für viele Patienten mit Leberzirrhose ein stark erhöhtes Risiko für das Auftreten einer ED mit entsprechender Einschränkung der Lebensqualität sowie einer potentiell verminderten Adhärenz, wie es bei anderen

Erkrankungen für die NSBB-Therapie bereits gezeigt wurde (Manolis und Doumas, 2012). NSBB bewirken sowohl über eine Reduktion des Herzzeitvolumens als auch über eine splanchnische Vasokonstriktion eine Verbesserung der PHT (Giannelli et al., 2014; Groszmann et al., 2005; Turon et al., 2013). Eine direkte Senkung des Leberwiderstandes fehlt jedoch in diesem medikamentösen Therapieansatz.

In der Vergangenheit wurden bereits medikamentöse Optionen zur Verstärkung intrahepatisch vasodilatatorischer Mediatoren wie NO in der PHT untersucht. NO wird in Endothelzellen von Stickstoffsynthasen gebildet und bewirkt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase eine Freisetzung des sekundären Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP wirkt an den vaskulären glatten Muskelzellen relaxierend bis es durch Phosphodiesterasen zu Guanosinmonophosphat degradiert wird (Moncada und Higgs, 1993; Mónica et al., 2016). Eine Hemmung der Phosphodiesterase führt somit zu einer Verlängerung der cGMP-Wirkung und darüber zur Vasodilatation.

Die ED ist ein prominentes Beispiel für den erfolgreichen klinischen Einsatz von Phosphodiesterase-5-(PDE5)-Inhibitoren. Sildenafil wurde als erster Vertreter der Wirkstoffgruppe 1998 für die ED in Deutschland zugelassen – nachdem es zuvor in der Behandlung der arteriellen Hypertension und Angina pectoris erprobt wurde. Es folgten mit Vardenafil und Tadalafil sowie 2014 Avanafil weitere Wirkstoffe, die sich in ihrer Selektivität der Phosphodiesterasen, dem Wirkeintritt und der Wirkdauer unterscheiden. Sildenafil, Vardenafil und Avanafil sind durch eine jeweils recht kurze Halbwertszeit von unter fünf Stunden gekennzeichnet. Mit Tadalafil und seiner Halbwertszeit von 17,5 Stunden steht in Deutschland nur ein lang wirksamer Vertreter der Gruppe zur Verfügung, der jedoch aufgrund seiner Interaktion mit der Isoform Phosphodiesterase 11 zu muskuloskelettalen Nebenwirkungen führen kann (Hong et al., 2017). Der PDE5-Inhibitor Udenafil zeichnet sich durch eine annähernd gleich lange Halbwertszeit wie Tadalafil mit 11-13 Stunden, einen schnellen Wirkeintritt sowie eine starke Selektivität für die PDE5 aus (Hong et al., 2017). Bis jetzt gibt es keine Zulassung für Udenafil in Deutschland, jedoch kommt es bereits seit 2005 in Südkorea in der Therapie der ED zur Anwendung.

Bisherige Studien zu PDE5-Inhibitoren in der Leberzirrhose kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Teilweise wurde eine Senkung des Pfortaderdrucks unter PDE5-Inhibitor-

Therapie in der Leberzirrhose beschrieben (Choi et al., 2009; Deibert et al., 2018; Kreisel et al., 2015; Lee et al., 2008). In anderen Studien konnte kein Einfluss auf die portale Hämodynamik durch den Einsatz von PDE5-Inhibitoren festgestellt werden (Clemmesen et al., 2008; Colle et al., 2004; Tandon et al., 2010). Das molekulare Wirkprinzip der PDE5-Inhibition in der Leberzirrhose ist bisher noch weitgehend unerforscht.

Die folgende Zusammenfassung auf Grundlage der von Uschner und Glückert et al. im Juli 2020 veröffentlichten Originalpublikation „Combination of phosphodiesterase-5-inhibitors and beta blockers improves experimental portal hypertension and erectile function“ thematisiert einerseits das Vorkommen der ED in der Leberzirrhose in Abhängigkeit von deren Schweregrad und der Einnahme von NSBB sowie andererseits neue therapeutische Ansätze mit dem PDE5-Inhibitor Udenafil als Monotherapie und in Kombination mit dem NSBB Propranolol in der experimentellen Leberzirrhose.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Humane Proben

Leberproben von sieben gesunden Spendern und 41 zirrhotischen Empfängern wurden im Rahmen von Transplantationen im Zeitraum von 1999 und 2005 gesammelt und für Genexpressionsassays verwendet. Dies wurde von dem Ethikkomitee der Universität Bonn (019/13) genehmigt.

1.2.2 Induktion der Leberzirrhose im Tiermodell

Insgesamt wurden an 136 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA) Versuche durchgeführt. Sie waren dauerhaft in einer kontrollierten Umgebung mit einem zwölfstündigem Tag-/Nachtzyklus und Temperaturen zwischen 22° C und 24° C untergebracht. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) *ad libitum*. Die Experimente erfolgten nach den Richtlinien des Landesamts für Natur, Umwelt und

Verbraucherschutz als der für Tierstudien in Nordrhein-Westfalen zuständigen Behörde (Zulassungsnummer 84-02.04.2014.A030).

Eine cholestatische Leberzirrhose wurde bei 79 Ratten mit einem Initialgewicht von 180-200 g mittels Gallengangsligatur (BDL) induziert. Hierfür wurden die Ratten mit Ketamin (80-100 mg/kg Körpergewicht (KG)) und Xylazin (5-10 mg/kg KG) intraperitoneal narkotisiert. Nach Überprüfung der Schmerzfreiheit wurde eine mediane Laparotomie mit Eröffnung des Peritoneums durchgeführt. Der Gallengang wurde im Ligamentum hepatoduodenale aufgesucht, von der Arteria hepatica propria und der Vena portae freipräpariert, mit Seide (3-0) ligiert und abgesetzt. Abschließend wurden eine Peritoneal- und eine Hautnaht gesetzt. Die Versuche erfolgten nach vier Wochen bei Vorhandensein von Aszites als Zeichen einer PHT.

Als Kontrollgruppe wurde bei zehn Ratten eine Sham-Operation mit einer Laparotomie unter intraperitonealer Narkose wie oben beschrieben ohne Ligatur des Gallenganges durchgeführt.

Eine toxische Leberzirrhose wurde bei 42 Ratten mit einem Initialgewicht von 80-100 g durch eine zwei Mal wöchentliche Inhalation von 1 l/min Tetrachlormethan (CCl₄) induziert. Die Versuche wurden nach der Ausbildung von Aszites als Zeichen einer PHT nach ca. 12 bis 14 Wochen durchgeführt.

1.2.3 Medikamente

Der PDE5-Hemmer Udenafil (Batch No. AFGH000722) wurde von Dr. Falk Pharma GmbH (Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der NSBB Propranolol (Batch No. P8688) wurde von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

1.2.4 Messungen der hepatischen und systemischen Hämodynamik

Die Finalversuche erfolgten in fünf Kontrolltieren, fünf Sham-operierten, 43 BDL-operierten und 22 CCl₄-intoxikierten Ratten zur Analyse der hepatischen und systemischen Hämodynamik *in vivo*.

Für die Allgemeinanästhesie wurden Ketamin (80-100 mg/kg KG) und Xylazin (5-10 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Die Vena und Arteria femoralis, Vena portae und Arteria carotis communis wurden jeweils freipräpariert und mit einem Polyethylenkatheter PE-50 kanüliert, der mittels Seide (3-0) fixiert wurde. Der Zugang zur Vena portae erfolgte dabei als mediane Laparotomie mit Kanülierung einer ileokolischen Vene und Vorschub in die Vena portae. Der Karotiskatheter wurde bis zum linken Ventrikel vorgeschoben. Die Druckmessung *in vivo* erfolgte, wie bei Heller et al. (2003) vorbeschrieben, nach einer Stabilisierungsphase mittels Power Lab von AD Instruments (Oxford, UK). Für die Messung des Pfortaderdrucks (PP) wurde der Katheter in der Vena portae verwendet und der Druck in der Arteria femoralis diente als Maß für den mittleren arteriellen Druck (MAP).

Zur Berechnung weiterer hämodynamischer Kenngrößen wurde die Mikrosphärentechnik angewandt, die ausführlich vorbeschrieben ist (Klein et al., 2017). Hierbei wurden für den systemischen Kreislauf 300.000 rote Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton-Technologies, San Diego, Kalifornien, USA) über den Karotiskatheter in den linken Ventrikel über 30 Sekunden appliziert. Gleichzeitig startete die Aspiration über eine Minute von insgesamt 0,65 ml Blut über den Femoraliskatheter. Dies wurde in gleicher Weise nach der Wirkstoffgabe mit gelben Mikrosphären wiederholt. Für die Kalkulation des portal-systemischen Shunts wurden anschließend vor Medikamentengabe 150.000 weiße und nach Medikamentengabe 150.000 blaue Mikrosphären (15 µm Durchmesser, Triton-Technologies, San Diego, Kalifornien, USA) über den Portalvenenkatheter über 30 Sekunden infundiert.

Die Messungen erfolgten vor und nach der akuten Medikamentengabe. Je nach Versuchsaufbau wurden dafür a) Zitronensäure in Natriumchlorid als Vehikel, b) 1 mg/kg KG Udenafil, c) 5 mg/kg KG Udenafil oder d) 1 mg/kg KG Propranolol und nach 30 Minuten 1 mg/kg KG Udenafil über die Vena femoralis appliziert. Post mortem

erfolgte die Organentnahme und Konservierung bei -80°C bis zur Durchführung weiterer Experimente.

Für die Mikrosphärentechnik wurden Lunge, Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt und Milz mit 4 M Kaliumhydroxid und 2%-igem Tween und die Blutprobe mit 5,3 mol Kaliumhydroxid und Tween 80 versetzt und anschließend für eine Stunde gekocht. Die verdauten Proben wurden gevortext, mittels Whatman Nucleopore Filters (Whatman International Limited, Madison, UK) gefiltert und mit 0,2 ml Dimethylformamid versetzt. Die Absorption wurde spektralphotometrisch gemessen und anhand dessen die systemische und hepatische Hämodynamik kalkuliert.

1.2.5 Messungen der Hämodynamik des Corpus cavernosums

In fünf Sham- und sechs BDL-operierten männlichen Ratten wurde der Einfluss der akuten Gabe von Udenafil (1 mg/kg KG) und in Kombination mit Propranolol (1 mg/kg KG) auf die Erektionsfähigkeit evaluiert.

Hierzu wurde eine mediane Laparotomie unter intraperitoneal applizierter Allgemeinanästhesie mittels Ketamin (80-100 mg/kg KG) und Xylazin (5-10 mg/kg KG) durchgeführt. Die Harnblase wurde aufgesucht, stumpf abpräpariert und kranial fixiert. Die Hoden wurden aus dem Skrotum mobilisiert und mit den Glandulae vesiculosae lateral fixiert, um einen freien Zugang zum dorsalen Anteil der Prostata im Operationssitus zu erzielen (Supplementary Method Fig. 1). Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica A60 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) konnte der Nervus cavernosus von der Prostata zur Urethra ziehend aufgesucht und freipräpariert werden. Mit einer bipolaren Elektrode (MLA 0320, AD Instruments, Oxford, UK) wurde der Nerv mit 7,5 V bei einer Frequenz von 20 Hz und einer Impulsbreite von 0,005 Sekunden für insgesamt eine Minute stimuliert (Supplementary Method Fig. 2). Zur invasiven Druckmessung wurde der Penis denudiert und das Corpus cavernosum mit einer 27-Gauge-Kanüle punktiert (Supplementary Method Fig. 3). Die Schwellkörperdrücke wurden kontinuierlich mittels Power Lab von AD Instruments (Oxford, UK) aufgezeichnet. Die Änderung des Corpus-Cavernosum-Druckes (CCP) vor und während der Erektion wurde als erektile Funktion gewertet. Post

mortem erfolgte die Organentnahme und Konservierung bei -80° C bis zur Durchführung weiterer Experimente.

1.2.6 Molekulare Auswirkungen auf den NO-cGMP-Signalweg

Zum Nachweis des NO-abhängigen Effekts von Udenafil wurden Leberperfu-
sionsuntersuchungen *in situ* in 30 BDL-operierten und 20 CCl₄-behandelten Ratten unter
Allgemeinanästhesie, wie von Klein et al. (2017) beschrieben, durchgeführt. Methoxamin
(Batch No. M6524, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) wurde zur Vorkontraktion der
Leber verwendet. Anschließend wurde jeweils eine Gruppe in den beiden Modellen der
experimentellen Leberzirrhose mit dem NO-Synthase-Inhibitor *N*_ω-Nitro-L-Arginin-
Methylester-Hydrochlorid (L-NAME; Batch No. 5751, Sigma-Aldrich, Darmstadt,
Deutschland) vorbehandelt und mit einem Vehikel oder Udenafil in steigender Dosis
(0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml Perfusionslösung) perfundiert. Die Kontraktion der
Leber wurde gemessen.

Für die Analysen der Gen- und Proteinexpression am Signalweg beteiligter Enzyme
wurden die unter 1.2.1, 1.2.4 und 1.2.5 beschriebenen Organproben aus Mensch und
Ratte verwendet. Außerdem wurden LSEC und HSC aus Leberproben von Sham-
operierten und BDL-operierten Ratten, wie vorbeschrieben (Trebicka et al., 2007), isoliert
und untersucht. Zusammengefasst wurde nach Vorbereitung durch *in situ* Perfusion der
Leber mit Kollagenase und Pronase die Probe durch eine Dichte-Gradientenzentrifugation
nach hepatischen Zelltypen aufgetrennt und dann für Polymerasekettenreaktionen (PCR)
verwendet.

Zum quantitativen Nachweis der Genexpression der endothelialen Stickstoff-Synthase
(*Nos3*), der induzierbaren Stickstoff-Synthase (*Nos2*) und der Phosphodiesterase-5
(*Pde5*) wurden quantitative Echtzeit-PCR, wie von Trebicka et al. (2007) beschrieben,
durchgeführt. Hierfür wurde Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellisolationen von LSEC und
HSC sowie Gewebeproben von Leber, Aorta und Penis von Sham- und BDL-operierten
Ratten isoliert. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription und PCR mit in Tab. 1

dargestellten Taqman Assays des Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA):

Tab. 1: Für die Echtzeit-PCR verwendeten Assays

Gen	Human: Assay ID	Ratte: Assay ID
<i>Nos2</i>	Hs01075529_m1	Rn00561646_m1
<i>Nos3</i>	Hs01574659-m1	Rn07312037_g1
<i>Pde5a</i>	Hs00153649_m1	Rn01639345_m1

18S rRNA wurde als endogene Kontrolle verwendet. Als Ausdruck des vielfachen Anstiegs der Genexpression bezogen auf die Referenzgruppe wurden die Ergebnisse als $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt.

Mittels Western Blot wurden die Proteinexpressionen von am NO-cGMP-Signalweg beteiligten Enzyme bestimmt, wie bereits beschrieben (Trebicka et al., 2007). Hierzu wurden Leberproben von zirrhotischen Ratten nach BDL ohne und mit Udenafiltherapie verwendet. Zur Vorbereitung wurden die gefrorenen Proben homogenisiert, lysiert, mit Probenpuffer verdünnt und denaturiert. Anschließend wurden die Proben (20 µg Protein) auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Platten übertragen, bei 200 V über 60 Minuten aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran im Semi-dry-Blot überführt. Zum Nachweis der äquivalenten Proteinladung wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen mit folgenden primären Antikörpern inkubiert: eNOS (Cat.610296, Lot41425; BD Bioscience, San Jose, CA, USA), peNOS (#9571, Lot 14; Cell Signaling, Boston, MA, USA), PDE5 (Lot A91778; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (sc-25778, Lot # K1511; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) als endogene Kontrolle. Der entsprechende sekundäre Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) wurde hinzugefügt. Die Proteinexpression wurde durch eine erhöhte Chemolumineszenz (ECL, Amersham, UK) dargestellt und mit Chemi-Smart (PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) ausgewertet.

1.2.7 Patientenkollektiv und Erfassung der ED

Zur Analyse des Vorkommens einer ED in der Leberzirrhose wurde ein Patientenkollektiv von $n = 86$ erfasst. Die Patienten wurden zwischen Dezember 2010 und Dezember 2012 an der Universitätsklinik für Innere Medizin III der Medizinischen Universität Wien sowie zwischen Juli 2017 und Juli 2018 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren das männliche Geschlecht sowie das Vorhandensein einer radiologisch oder histologisch gesicherten Leberzirrhose. Ausschlusskriterien waren ein Patientenalter über 80 Lebensjahre, eine Hepatische Enzephalopathie, der Zustand nach einer Lebertransplantation, sonstige relevante Nebenerkrankungen (extrahepatische maligne Neoplasie, Diabetes mellitus, vorherige Operation des Urogenitaltraktes, schwere kardiale Erkrankung, Depression) sowie fehlende Informationen über eine NSBB-Einnahme oder eine NSBB-Einnahme aus anderer Indikation als die Blutungsprophylaxe bei PHT. Zur Erfassung des Vorkommens und der Schwere der ED wurde der International Index of Erectile Function (IIEF-5) verwendet.

1.2.8 Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen der tierexperimentellen Versuche und die Erstellung der Graphen wurden GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, USA) und SPSS 22 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) verwendet. Die Korrelationen wurden mit dem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Der Zusammenhang zwischen Schwere der Lebererkrankung, Schwere der ED und NSBB-Einnahme wurde mittels einer binären, multivariaten Regressionsanalyse beurteilt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Hämodynamische Auswirkungen von Udenafil und Propranolol in der experimentellen Leberzirrhose

Zur Analyse der Effekte von Udenafil und Propranolol in der experimentellen Leberzirrhose wurden hepatisch und systemisch hämodynamische Messungen *in vivo* sowie die Mikrosphärentechnik durchgeführt. Die akute Gabe des PDE5-Inhibitors Udenafil in einer Dosis von 1 mg/kg KG führte zu einer signifikanten Reduktion des PP bei nicht signifikant abweichenden Werten unter Vehikelkontrolle. Dabei wurden vergleichbare Effekte im cholestatischen (- 30 %) wie im toxischen (- 30 %) Modell der Leberzirrhose erzielt (Fig. 3A). Eine Dosissteigerung auf 5 mg/kg KG Udenafil erbrachte keine weitere PP-Senkung in der BDL-operierten Gruppe (Table 2) oder CCl₄-intoxikierten Gruppe (Table 3). Es konnte eine signifikante Reduktion des hepatisch vaskulären Widerstandes bei gleichbleibendem splanchnischem Widerstand nach akuter Applikation von 1 mg/kg KG Udenafil in beiden Modellen der experimentellen Leberzirrhose gezeigt werden (Table 2, Table 3). Der Shuntflow war nach Udenafilgabe im toxischen Modell signifikant erniedrigt (Table 3) und im cholestatischen Modell leicht reduziert (mit $p = 0,0625$; Table 2). Neben dem erwünschten Effekt der PP-Senkung wurde ein signifikanter Abfall des MAP in beiden Modellen der Leberzirrhose (-25 % in BDL, -31 % in CCl₄) unter der Monotherapie mit Udenafil beobachtet (Fig. 3B).

Bemerkenswerterweise kam es zu keinem Abfall des MAP unter der Kombinationstherapie von Udenafil mit 1 mg/kg KG des NSBB Propranolol in BDL-operierten Ratten (Fig. 3F). Außerdem konnte eine weitere Senkung des PP auf nun 60 % des Ausgangswertes nach akuter Gabe von Udenafil und Propranolol im cholestatischem Leberzirrhosemodell erreicht werden (Fig. 3C). Die Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den splanchnischen und systemischen vaskulären Widerstand stellten sich in den untersuchten Tieren divergent dar. Teilweise wurden erniedrigte, teilweise erhöhte Widerstände beobachtet. Ein eindeutiger Trend war nicht erkennbar (Fig. 3D-E). Der hepatische vaskuläre Widerstand und das Herzzeitvolumen sanken unter Udenafil und Propranolol in den BDL-operierten Ratten.

Zur Evaluation der erektilen Funktion in der Leberzirrhose und unter einer Therapie mit Udenafil und Propranolol erfolgten hämodynamische Messungen des CCP *in vivo*. Der CCP vor Stimulation sowie die maximalen Drücke während der Erektion waren bei BDL-operierten Ratten jeweils niedriger als in der Sham-operierten Gruppe. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des CCP mit 31 mmHg in den zirrhotischen Ratten signifikant reduziert war im Vergleich zu den gesunden Tieren mit einem CCP-Anstieg von 56 mmHg (Fig. 2B). Im Folgenden wurde der Verlauf der CCP-Drücke unter medikamentöser Akuttherapie mit 1 mg/kg KG Udenafil alleine oder in Kombination mit 1 mg/kg KG Propranolol in beiden Gruppen untersucht. Die CCP-Drücke vor der Stimulation bildeten die Bezugsgröße (100 %). Wie in Figure 2C dargestellt ist, führte sowohl in den Sham- als auch in den BDL-operierten Ratten die Gabe von Propranolol zu einer Reduktion des maximalen CCP während der Erektion. Die anschließende Applikation von Udenafil führte in beiden Gruppen zu einer Verbesserung der erektilen Funktion. Diese entsprach interessanterweise dem CCP-Anstieg der BDL-operierten Ratten nach Udenafilgabe ohne vorheriger Propranololtherapie (Fig. 2C).

1.3.2 Auswirkungen von Udenafil und Propranolol auf den NO-cGMP-Signalweg in der Leberzirrhose

Die Leberperfusionsuntersuchungen in BDL-operierten und CCl₄-intoxikierten Ratten dienten dem Beweis der NO-abhängigen Wirkungsweise von Udenafil. Die Udenafilgabe führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der Leberkontraktion in beiden Zirrhosemodellen, während unter Vehikelkontrolle die Kontraktion konstant blieb. Die Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME verhinderte die relaxierende Wirkung von Udenafil in BDL- und CCl₄-intoxikierten Ratten (Fig. 5A-B).

Sowohl humane Leberproben als auch Proben von Leber, Aorta und Penis von Ratten nach Sham-Operation, BDL-Operation oder CCl₄-Intoxikation wurden hinsichtlich ihrer Veränderungen von Gen- und Proteinexpression am NO-cGMP-Signalweg beteiligter Enzyme analysiert.

Die hepatischen Spiegel der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) der *Nos3*, *Nos2* und *Pde5* waren sowohl in der humanen Leberzirrhose als auch in zwei Modellen der experimentellen Leberzirrhose signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Fig. 4A-C). Zur Klärung des intrahepatischen Ursprungs der verstärkten Genexpression wurde die quantitative Echtzeit-PCR in isolierten LSEC und HSC durchgeführt. Hier zeigten sich ein signifikanter Anstieg von *Nos3*, *Nos2* und *Pde5* in LSEC sowie eine Erhöhung der Genexpression von *Pde5* von HSC in der Leberzirrhose, wobei die HSC die Hauptquelle der *Pde5* zu sein scheinen (Fig. 4D).

In Leberproben von BDL-operierten Ratten stellte sich lediglich eine leichte Erhöhung der Proteinexpression der endothelialen Stickstoffsynthase (eNOS) nach der akuten Gabe von 1 mg/kg KG Udenafil dar (Fig. 5C-D). Bemerkenswerterweise kam es jedoch unter Udenafiltherapie zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung der eNOS (Fig. 5C-D) und damit zur Aktivierung der Synthase. Die hepatische Proteinexpression von PDE5 blieb nach Udenafil-Applikation in zirrhotischen Ratten unverändert (Fig. 5C-D).

Die Akutgabe von Udenafil und die Kombination mit Propranolol führten in der Aorta von Ratten nach Zirrhose-Induktion zu unterschiedlichen Effekten in der Genexpression der untersuchten Enzyme. Nach Udenafilgabe konnte ein signifikanter Anstieg der *Nos3* in den Aortenproben beobachtet werden, unter der Kombination mit Propranolol kam es zu einer signifikanten Senkung im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Fig. 5F). Die Therapie mit Udenafil hatte keinen Einfluss auf die Genexpression von *Nos2* und *Pde5* in der Aorta (Fig. 5F). Die Kombination mit Propranolol führte zu einer signifikanten Senkung der mRNA Level von *Nos2* und *Pde5* in den Aorten der BDL-Ratten.

Die Genexpression in den Proben des Corpus cavernosum zeigte ein gegensätzliches Verhalten zu den Untersuchungen in den Leberproben nach BDL in Ratten. Sowohl *Nos3*, *Nos2* als auch *Pde5* waren im Vergleich zur Vehikelgruppe im Corpus cavernosum signifikant erniedrigt (Fig. 2C). Die Kombinationstherapie mit Udenafil und Propranolol in den BDL-Ratten führte zu einem signifikanten Anstieg von *Nos3* und *Nos2* gegenüber der Vehikelgruppe sowie einer signifikanten Senkung von *Pde5* (Fig. 2C).

1.3.3 Vorkommen von ED in der Leberzirrhose und unter NSBB-Einnahme

Bei 86 Patienten mit Leberzirrhose wurde das Vorkommen einer ED erfasst. Die genauen Patientencharakteristika sind in Table 1 zusammengefasst. Es konnte eine Korrelation der Schwere der Lebererkrankung – abgebildet durch das Child-Pugh-Stadium – mit dem IIEF-5-Score als Maß für eine ED nachgewiesen werden (Fig. 1A). Des Weiteren war der IIEF-5-Score unter NSBB-Einnahme in dem gesamten Patientenkollektiv signifikant niedriger (Table 1B). Die Subgruppenanalyse ergab eine Abhängigkeit des IIEF-5-Scores von der NSBB-Einnahme bei Patienten im Child-Pugh-Stadium A und B, jedoch nicht im Child-Pugh-Stadium C (Fig. 1C). Somit steigt das Risiko für das Vorkommen einer ED bei Patienten mit einer Leberzirrhose mit dem Schweregrad der Erkrankung und mit der Therapie mit NSBB an (Fig. 1D).

1.4 Diskussion

Die Dysregulation des NO-cGMP-Signalweges nimmt in der Entstehung einer PHT in der Leberzirrhose eine bedeutende Rolle ein. Intrahepatisch ist die NO-vermittelte Vasodilatation vermindert, während ein extrahepatisches Überangebot an NO zu einer verstärkten splanchnischen Vasodilatation und darüber zur Aggravation der PHT führt (DeLeve, 2015; Hu et al., 2013). In Übereinstimmung mit früheren tierexperimentellen Daten von Schaffner et al. (2018) zeigen die vorliegenden Untersuchungen in humanen Proben und verschiedenen tierexperimentellen Modellen, dass intrahepatisch die Genexpression der NO-Synthasen *Nos3* und *Nos2* in der Leberzirrhose hochreguliert ist. Zeitgleich kommt es zu einer Überexpression von *Pde5*. Hierunter kann es zu einem vermehrten Abbau von cGMP und darüber zu einer verkürzten vasodilatatorischen Wirkung von NO kommen. In der vorliegenden Arbeit kann durch die Bestimmung der quantitativen Genexpression in isolierten Leberzellen gezeigt werden, dass die Hauptquelle der *Pde5*-Expression HSC sind. Dies steht im Einklang mit immunhistochemischen Untersuchungen von Schaffner et al. (2018).

Somit erscheint die PDE5 als geeigneter Angriffspunkt einer medikamentösen Therapie der intrahepatischen Vasokonstriktion in der Leberzirrhose. Bisherige Studien zur Effektivität des Einsatzes von PDE5-Hemmern kommen zu unterschiedlichen

Ergebnissen. Die in dieser Studie durchgeführten hämodynamischen Untersuchungen der akuten Udenafilgabe in der experimentellen Leberzirrhose zeigen eine Senkung des PP und des hepatisch vaskulären Widerstandes kongruent zu Daten von Choi et al. (2009), Lee et al. (2008) und Schaffner et al. (2018). Die abweichenden Einschätzungen von Tandon et al. (2010), Colle et al. (2004) und Clemmesen et al. (2008) können teilweise auf unterschiedliche Dosierungen der PDE5-Hemmer, sehr frühe Stadien der Leberzirrhose mit einer geringen vaskulären Dysfunktion und geringe Stichprobengrößen zurückgeführt werden.

Die Analysen der Leberperfusion *in situ* beweisen, dass der Udenafileffekt NO-abhängig ist. Es ist bekannt, dass PDE5-Inhibitoren die Degradation von cGMP verhindern und damit die vasodilatatorische Wirkung von NO verlängern. In der vorliegenden Studie wird außerdem gezeigt, dass die PDE5-Inhibition mit Udenafil zu einer erhöhten Proteinexpression der phosphorylierten und somit aktivierten Form der eNOS führt. In anderen Studien wurde außerdem ein antifibrotischer und antiinflammatorischer Effekt verschiedener PDE5-Hemmer beschrieben, sodass diese sogar weitere Vorteile in der Therapie der Leberzirrhose haben könnten (Ahmed et al., 2017; El-Agamy et al., 2018; Mansour et al., 2018; Molehin et al., 2018; Said et al., 2013).

Bisher blieb in der Leberzirrhose die Kombination eines PDE5-Hemmers mit dem NSBB Propranolol, der als Standardprophylaxe und -therapie bei PHT-bedingten Blutungsereignissen eingesetzt wird, unerforscht. Bemerkenswerterweise konnte in dieser Studie der PP in der experimentellen Leberzirrhose mit der Kombinationstherapie gegenüber einer Monotherapie mit Udenafil weiter gesenkt werden.

Berechtigte Kritikpunkte an der Anwendung von PDE5-Inhibitoren in der Leberzirrhose sind systemische Nebenwirkungen (Clemmesen et al., 2008; Tandon et al., 2010). Auch in dieser Studie wurde unter der Monotherapie mit Udenafil eine dosisabhängige arterielle Hypotension festgestellt. Dies kann neben der direkten PDE5-Inhibition auf eine vermehrte eNOS-Expression unter Udenafil und somit einem gegebenenfalls erhöhten NO-Angebot in der Aorta zurückgeführt werden. Die Kombination von Udenafil mit Propranolol führte in Ratten nach Zirrhoseinduktion zu einer herabgesetzten Genexpression von *Nos2* und *Nos3* sowie *Pde5* in der Aorta. Hierbei blieb der arterielle Blutdruck stabil, sodass die Kombinationstherapie mit Udenafil und Propranolol in der

Leberzirrhose bezüglich der systemischen Nebenwirkungen im tierexperimentellen Modell gut verträglich erscheint.

PDE5-Hemmer werden bereits zur Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt; prominentestes Beispiel ist die ED. Diese rückt auch bei Patienten mit Leberzirrhose zunehmend in den Fokus. Zuletzt wurde eine positive Korrelation der Schweregrade von Leberzirrhose und ED von verschiedenen Autoren beschrieben (Andersson, 2018; Durazzo et al., 2010; Paternostro et al., 2018; Philonenko et al., 2019). Gegensätzliche Ergebnisse erzielten Maimone et al. (2019) bei der Betrachtung von 102 Patienten mit Leberzirrhose. Hier konnten als unabhängige Risikofaktoren für eine ED lediglich das Alter und der Hämoglobinwert gefunden werden, jedoch nicht die Leberzirrhose per se. Dabei ist anzumerken, dass hier ausschließlich Patienten mit Leberzirrhose im Stadium A nach Child-Pugh berücksichtigt wurden, in dem auch in anderen Studien das geringste Vorkommen einer ED gegenüber fortgeschrittenen Stadien beschrieben wurde. Außerdem ist von besonderem Interesse, ob eine NSBB-Einnahme einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung einer ED in der Leberzirrhose darstellt, da es sich um eine gängige Medikation von Patienten mit Leberzirrhose handelt. Maimone et al. (2019) und Paternostro et al. (2018) konnten die NSBB-Einnahme nicht als unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer ED in der Leberzirrhose nachweisen. Dem gegenüber zeigt diese Studie für die Child-Pugh-Stadien A und B, nicht jedoch für das Stadium C ein erhöhtes Risiko für eine ED unter NSBB-Therapie. Außerdem belegt diese Arbeit eine verminderte erektile Funktion in der dekompensierten Leberzirrhose im Tiermodell sowie eine weitere Verschlechterung durch die akute Gabe von Propranolol. Dabei ist im Corpus cavernosum zirrhotoser Ratten eine verminderte Genexpression der am NO-cGMP-Signalweg beteiligten Enzyme zu sehen. Unter Udenafiltherapie konnte die erektile Funktion signifikant verbessert werden. Der positive Effekt von Udenafil auf die erektile Funktion bestand auch unter vorangegangener Propranololtherapie.

Im Einklang dazu stellten Thakur et al. (2019) bei zirrhotosen Patienten unter der Gabe des PDE5-Hemmer Tadalafil über vier Wochen eine Steigerung des IIEF-5-Scores als Maß der erektilen Funktion fest.

Die Leberzirrhose und PHT stellen aufgrund der komplexen Pathophysiologie nach wie vor große Herausforderungen an die medikamentöse Therapie. Der in der PHT bisher

etablierte NSBB Propranolol hat keinen direkten intrahepatischen Effekt, sondern wirkt über eine Verringerung der splanchnischen Hyperperfusion. Dagegen bietet der PDE5-Hemmer Udenafil Möglichkeiten der intrahepatischen Beeinflussung der portalen Hämodynamik über eine dortige NO-vermittelte Vasodilatation. Die Kombination der beiden Wirkstoffe erreichte in der experimentellen Leberzirrhose eine Verbesserung der PHT ohne systemische Nebenwirkungen. Zeitgleich konnte eine ED, die in der Zirrhose und unter NSBB-Therapie gehäuft vorkommt, durch Udenafil verbessert werden.

Es gilt an dieser Stelle zu beachten, dass in dieser Studie nur die akuten medikamentösen Effekte im Tiermodell analysiert wurden. Aufgrund der tierexperimentellen Daten sollten nachfolgende Studien die chronische Gabe von Udenafil und Propranolol bei Patienten erforschen, um zukünftig sowohl das Überleben als auch die Lebensqualität von Patienten mit Leberzirrhose weiter verbessern zu können.

1.5 Zusammenfassung

Die Dysregulation des Vasotonus in der Leberzirrhose ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der portalen Hypertension. Propranolol als Standardtherapeutikum beeinflusst insbesondere die extrahepatische Hämodynamik und kann mit Nebenwirkungen einhergehen, die die Lebensqualität stark einschränken wie der erektilen Dysfunktion. In der vorliegenden Studie wurde der in der erektilen Dysfunktion etablierte Phosphodiesterase-5-Inhibitor Udenafil in Kombination mit Propranolol als mögliches Therapeutikum in der experimentellen Leberzirrhose evaluiert.

Die Leberzirrhose wurde in Ratten in einem cholestatischen Modell nach Gallengangsligatur und in einem toxischen Modell nach CCl₄-Inhalation untersucht. Molekulare Mechanismen der Regulierung des Stickstoff-cGMP-Signalweges wurden auf mRNA- und Proteinebene in der Leberzirrhose nach Udenafil- und Propranolol-Gabe in der Leber, der Aorta und dem Penis analysiert. Hepatische und systemische hämodynamische Messungen sowie Corpus-Cavernosum-Druck-Messungen als Maß für die erektile Funktion *in vivo* und Leberperfusionen *in situ* wurden unter der Gabe von Udenafil und Propranolol durchgeführt. Das Vorkommen einer erektilen Dysfunktion in der

humanen Leberzirrhose wurde in Abhängigkeit der Einnahme von unselektiven β -Blockern analysiert.

Die Stickstoffsynthasen und die Phosphodiesterase-5 waren in der zirrhotischen Leber vermehrt exprimiert. Die Hauptquelle der Phosphodiesterase-5 waren aktivierte hepatische Sternzellen. Unter einer Monotherapie mit Udenafil konnte der Pfortaderdruck verringert werden, jedoch kam es zeitgleich zu einer arteriellen Hypotension. In der Kombination mit Propranolol blieb der arterielle Blutdruck allerdings stabil, wobei durch diese Synergie eine weitere Senkung des Pfortaderdrucks erreichen konnte. Die erektile Funktion war in der humanen und tierexperimentellen Leberzirrhose vermindert und wurde durch Propranololgabe zusätzlich verschlechtert. Udenafil konnte die erektile Funktion im Tiermodell verbessern.

Somit zeigt diese Arbeit, dass die Kombination von Udenafil mit Propranolol in der experimentellen Leberzirrhose eine Verbesserung der portalen Hämodynamik sowie der erektilen Funktion ohne systemische Nebenwirkungen bewirkt.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ahmed N, Bakhashwain NF, Alsehemi AF, El-Agamy DS. Hepatoprotective role of vardenafil against experimentally induced hepatitis in mice. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2017. 31

Andersson K-E. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *British journal of pharmacology*. 2018. 175: 2554-2565

Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World journal of gastroenterology*. 2014. 20: 2555-2563

Choi S-M, Shin J-H, Kim J-M, Lee C-H, Kang K-K, Ahn B-O, Yoo M. Effect of udenafil on portal venous pressure and hepatic fibrosis in rats. A novel therapeutic option for portal hypertension. *Arzneimittel-Forschung*. 2009. 59: 641-646

Clemmesen J-O, Giraldi A, Ott P, Dalhoff K, Hansen B-A, Larsen F-S. Sildenafil does not influence hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. *World journal of gastroenterology*. 2008. 14: 6208-6212

Colle I, Vriese AS de, van Vlierberghe H, Lameire NH, DeVos M. Systemic and splanchnic haemodynamic effects of sildenafil in an in vivo animal model of cirrhosis support for a risk in cirrhotic patients. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2004. 24: 63-68

Deibert P, Lazaro A, Stankovic Z, Schaffner D, Rössle M, Kreisel W. Beneficial long term effect of a phosphodiesterase-5-inhibitor in cirrhotic portal hypertension: A case report with 8 years follow-up. *World journal of gastroenterology*. 2018. 24: 438-444

DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2015. 61: 1740-1746

Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C, Bo S, Ghigo E, Manieri C. Male sexual disturbances in liver diseases: what do we know? *Journal of endocrinological investigation*. 2010. 33: 501-505

El-Agamy DS, Almaramhy HH, Ahmed N, Bojan B, Alrohily WD, Elkablawy MA. Anti-Inflammatory Effects of Vardenafil Against Cholestatic Liver Damage in Mice: a Mechanistic Study. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018. 47: 523-534

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008. 134: 1655-1669

García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2012. 57: 458-461

Giannelli V, Lattanzi B, Thalheimer U, Merli M. Beta-blockers in liver cirrhosis. *Annals of Gastroenterology*. 2014. 27: 20-26

Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Gao H, Makuch R. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *The New England journal of medicine*. 2005. 353: 2254-2261

Heller J, Shiozawa T, Trebicka J, Hennenberg M, Schepke M, Neef M, Sauerbruch T. Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats. *European journal of clinical investigation*. 2003. 33: 1006-1012

Innere Medizin 2018. Herold G, Reg. Köln: Gerd Herold. 2018

Hong JH, Kwon YS, Kim IY. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and clinical efficacy of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2017. 13: 183-192

Hu LS, George J, Wang JH. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World journal of gastroenterology*. 2013. 19: 1707-1717

Klein S, Schierwagen R, Uschner FE, Trebicka J. Mouse and Rat Models of Induction of Hepatic Fibrosis and Assessment of Portal Hypertension. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2017. 1627: 91-116

Kreisel W, Deibert P, Kupcinkas L, Sumskiene J, Appenrodt B, Roth S, Neagu M, Rössle M, Zipprich A, Caca K, Ferlitsch A, Dilger K, Mohrbacher R, Greinwald R, Sauerbruch T. The phosphodiesterase-5-inhibitor udenafil lowers portal pressure in compensated preascitic liver cirrhosis. A dose-finding phase-II-study. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2015. 47: 144-150

Lee K-C, Yang Y-Y, Wang Y-W, Hou M-C, Lee F-Y, Lin H-C, Lee S-D. Acute administration of sildenafil enhances hepatic cyclic guanosine monophosphate production and reduces hepatic sinusoid resistance in cirrhotic patients. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2008. 38: 1186-1193

Maimone S, Saffioti F, Oliva G, Di Benedetto A, Alibrandi A, Filomia R, Caccamo G, Saitta C, Cacciola I, Pitrone C, Squadrito G, Raimondo G. Erectile dysfunction in compensated liver cirrhosis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2019. 51: 843-849

Manolis A, Doumas M. Antihypertensive treatment and sexual dysfunction. *Current hypertension reports*. 2012. 14: 285-292

- Mansour HM, Salama AAA, Abdel-Salam RM, Ahmed NA, Yassen NN, Zaki HF. The anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of tadalafil in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2018. 96: 1308-1317
- Molehin OR, Adeyanju AA, Adefegha SA, Aina OO, Afolabi BA, Olowoyeye AO, Oyediran JA, Oladiran OR. Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, offers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2018. 29: 29-35
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*. 1993. 329: 2002-2012
- Mónica FZ, Bian K, Murad F. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. 2016. 77: 1-27
- Paternostro R, Heinisch BB, Reiberger T, Mandorfer M, Schwarzer R, Seeland B, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Ferlitsch A. Erectile dysfunction in cirrhosis is impacted by liver dysfunction, portal hypertension, diabetes and arterial hypertension. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2018. 38: 1427-1436
- Philonenko S, Rivière P, Mallet M, Poullenot F, Tripon S, Munteanu M, Boukherrouf R, Sultanik P, Roupret M, Thabut D, Rudler M. Neurocognitive impairment is associated with erectile dysfunction in cirrhotic patients. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2019. 51: 850-855
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2002. 7: d808-26
- Said E, Said SA, Gameil NM, Ammar EM. Modulation of thioacetamide-induced liver fibrosis/cirrhosis by sildenafil treatment. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2013. 91: 1055-1063
- Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*. 2008. 134: 1715-1728
- Schaffner D, Lazaro A, Deibert P, Hasselblatt P, Stoll P, Fauth L, Baumstark MW, Merfort I, Schmitt-Graeff A, Kreisel W. Analysis of the nitric oxide-cyclic guanosine

monophosphate pathway in experimental liver cirrhosis suggests phosphodiesterase-5 as potential target to treat portal hypertension. *World journal of gastroenterology*. 2018. 24: 4356-4368










Tandon P, Inayat I, Tal M, Spector M, Shea M, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Sildenafil has no effect on portal pressure but lowers arterial pressure in patients with compensated cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010. 8: 546-549

Thakur J, Rathi S, Grover S, Chopra M, Agrawal S, Taneja S, Duseja A, Bhansali A, Chawla YK, Dhiman RK. Tadalafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Improves Erectile Dysfunction in Patients With Liver Cirrhosis. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2019. 9: 312-317

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 (Baltimore, Md.)*. 2007. 46: 242-253

Turon F, Casu S, Hernández-Gea V, Garcia-Pagán JC. Variceal and other portal hypertension related bleeding. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. 2013. 27: 649-664

Combination of phosphodiesterase-5-inhibitors and beta blockers improves experimental portal hypertension and erectile dysfunction

Frank E. Uschner¹  | Kathleen Glückert² | Rafael Paternostro^{3,4}  | Thorsten Gnad⁵  | Robert Schierwagen¹ | Mattias Mandorfer^{3,4}  | Fernando Magdaleno² | Cristina Ortiz¹ | Katharina Schwarzkopf¹  | Patrick S. Kamath⁶ | Carlo Alessandria⁷ | Christoph Boesecke² | Alexander Pfeifer⁵  | Thomas Reiberger^{3,4}  | Wolfgang Kreisel⁸  | Tilman Sauerbruch¹ | Arnulf Ferlitsch^{3,4} | Jonel Trebicka^{1,9}  | Sabine Klein¹

¹Department of Internal Medicine I, Hospital of the Goethe University, Frankfurt, Germany

²Department of Internal Medicine I, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

³Hepatic Hemodynamic Lab, Medical University Vienna, Vienna, Austria

⁴Division of Gastroenterology & Hepatology, Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁵Institute of Pharmacology and Toxicology, University Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany

⁶Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

⁷Division of Gastroenterology and Hepatology, Città della Salute e della Scienza Hospital, Turin, Italy

⁸Department of Medicine II, Gastroenterology, Hepatology, Endocrinology, and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Medical Center - University of Freiburg, Freiburg, Germany

⁹European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure, Barcelona, Spain

Correspondence

Jonel Trebicka, Department of Internal Medicine I, University Hospital, Goethe

Abstract

Background & Aims: Phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE-5-I) are used for treatment of erectile dysfunction (ED), which is common in patients with cirrhosis. They may improve portal hypertension (PH), but contradictory data on efficacy and side-effects have been reported. Non-selective beta blockers (NSBB) reduce portal pressure, but might aggravate ED. Thus, we evaluated the combination of PDE-5-I with NSBB and its impact on PH and ED in experimental cirrhosis.

Methods: ED was assessed in cirrhotic patients (n = 86) using standardized questionnaire. Experimental cirrhosis was induced by bile-duct-ligation or carbon-tetrachloride intoxication in rats. Corpus cavernosum pressure – a surrogate of ED –, as well as systemic and portal haemodynamics, were measured in vivo and in situ after acute administration of udenafil alone or in combination with propranolol. mRNA and protein levels of PDE-5 signalling were analysed using PCR and western Blot.

Results: ED in humans was related to severity of liver disease and to NSBB treatment. PDE-5 was mainly expressed in hepatic stellate cells and upregulated in human and experimental cirrhosis. Propranolol reduced corpus cavernosum pressure in cirrhotic rats and it was restored by udenafil. Even though udenafil treatment improved PH, it led to a reduction of mean arterial pressure. The combination of udenafil and propranolol reduced portal pressure and hepatic resistance without systemic side-effects.

Abbreviations: *Adrb1*, beta-1-adrenoceptor; *Adrb2*, beta-2-adrenoceptor; BDL, bile duct ligation; BW, body weight; CCl₄, carbon tetrachloride; CCP, corpus cavernosum pressure; CCP_{max}, maximum of corpus cavernosum pressure; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HSC, hepatic stellate cell; IIEF-5, International Index of Erectile Function-5; L-NAME, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; MELD, Model of End Stage Liver Disease; *Nos2*, inducible nitric oxide synthase; *Nos3*, endothelial nitric oxide synthase; NSBB, non-selective beta-blocker; PCR, polymerase chain reaction; PDE-5/*Pde-5*, phosphodiesterase-5; peNOS, phosphorylated endothelial nitric oxide synthase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis; SEM, standard error of the mean; WT, wild type.

Frank Erhard Uschner and Kathleen Glückert shared first authorship.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. *Liver International* published by John Wiley & Sons Ltd

University, Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Germany.
Email: jonel.trebicka@kgu.de

Funding information

The authors received direct funding from Dr Falk Pharma GmbH (Freiburg, Germany; 20.000€). J. Trebicka is supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant SFB TRR57 and CRC 1382), European Union Horizon 2020 Research and Innovation Program GALAXY (Grant 668031), MICROB-PREDICT (Grant 825694) and LIVERHOPE (Grant 731875) as well as Cellex Foundation.

Handling editor: Virginia Hernandez-Gea

Conclusions: ED is common with advanced cirrhosis and concomitant NSBB treatment. The combination of PDE-5-I and NSBB improves ED and PH in experimental cirrhosis.

KEY WORDS

erectile dysfunction, non-selective beta-blocker, PDE-5-inhibitor, portal hypertension

1 | INTRODUCTION

Phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors are used for treatment of erectile dysfunction as they prolong sufficient corpus cavernosum pressure. This is because of an inhibition of the conversion of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) to biologically inactive 5'-GMP, thereby enhancing nitric oxide bioavailability and causing vasodilation.¹ In cirrhotic livers, nitric oxide production is reduced and its vasodilatory response is further impaired by increased expression of PDE-5.²⁻⁵ Thus, PDE-5 inhibitors have already been proposed as a therapy for cirrhosis with portal hypertension in the past. Nevertheless, previous studies reported inconsistent results with regard to efficacy and potential side-effects in experimental and human cirrhosis. In fact, cirrhotic animal models deliver evidence that PDE-5 inhibitors sufficiently reduce portal pressure and hepatic resistance, but might impact systemic circulation and decrease mean arterial pressure.⁶⁻⁹ By contrast, conflicting results were reported in patients treated with PDE-5 inhibitors; either no effect on portal pressure with deleterious systemic side-effects was reported or a relevant reduction in portal pressure with minor systemic effects was observed.¹⁰⁻¹³

Furthermore, little is known about the cell specific biological role of PDE-5 in cirrhosis. It is unclear which cells express PDE-5. Moreover the effect of PDE-5 inhibitors on extrahepatic vascular beds, which contribute to portal hypertension, are poorly understood in patients with cirrhosis.

Non-selective beta-blockers (NSBB) are a cornerstone to prevent bleeding in patients with PH. They decrease the portal-venous inflow by reducing cardiac output and by causing splanchnic vasoconstriction.¹⁴⁻¹⁶ Adequate haemodynamic response to NSBB also hampers decompensation of cirrhosis and may improve overall survival.^{17,18} NSBB may lead to erectile dysfunction, which impairs life-quality and may influence drug adherence, but this has not been investigated in patients with cirrhosis to date.¹⁹

Thus, the aim of our study was (a) to assess the effects of NSBB on erectile dysfunction in patients with different severity of cirrhosis, (b) to investigate the effects of PDE-5 inhibition on portal hypertension and on erectile dysfunction in experimental cirrhosis and (c) to test the combination of PDE-5 inhibitors with NSBB on portal hypertension and erectile dysfunction.

Lay Summary

Patients with cirrhosis frequently report erectile dysfunction, which is worsened by beta blocker therapy. The combination of beta blockers and phosphodiesterase-5-inhibitors improves erectile function and portal pressure, in experimental cirrhosis, without major side-effects.

2 | METHODS

2.1 | Patients and data collection

Eighty-six cirrhotic patients were included in this study. The patients were prospectively enrolled between December 2010 and December 2012 at the Division of Gastroenterology and Hepatology, Department for Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Austria and between July 2017 and July 2018 at the Department for Internal Medicine I, University Hospital Bonn, Germany. Inclusion criteria were male sex and proven cirrhosis (either by radiologic/clinical parameters or by histology). Exclusion criteria were missing information on NSBB treatment or indication for NSBB treatment other than bleeding prophylaxis (treatment other than propranolol and carvedilol was excluded), age over 80 years, current overt hepatic encephalopathy, previous liver transplantation, extrahepatic malignancies, previous urologic surgery, diabetes, depression and severe cardiac disease. Concomitant medication and concomitant diseases, Model of End Stage Liver Disease (MELD) and Child-Pugh score were recorded.

2.2 | International Index of Erectile Function-5 (IIEF-5)

The 5-item version of the International Index of Erectile Function (IIEF-5) was used to determine the presence and the severity of erectile dysfunction.²⁰ The score ranges from 5 to 25 points and classifies the severity of erectile dysfunction in five categories: no erectile dysfunction (22-25 points), mild erectile dysfunction (17-21



points), mild to moderate erectile dysfunction (12-16 points), moderate erectile dysfunction (8-11 points) and severe erectile dysfunction (5-7 points).

Ethics

The human studies were approved by the ethics committee of the University Hospital Bonn (Study Number 279/14) and Medical University of Vienna (Study Number 450/2010) and performed in accordance to the current version of the Declaration of Helsinki. All patients signed an informed consent prior to study inclusion. The use of human samples was approved by the ethics committee of the University of Bonn (029/13). Liver and hepatic artery samples were obtained at liver transplantation between 1999 and 2005 and non-cirrhotic donor samples served as controls.

2.2.1 | Reagents

Udenafil (Batch No. AFGH000722) was kindly provided by Dr Falk Pharma GmbH (Freiburg, Germany). Propranolol was purchased from Sigma-Aldrich (Batch-No. P8688, Darmstadt, Germany).

2.2.2 | Animals

In total, 136 male wild type (WT) Sprague Dawley rats were used. The experiments were performed according to the guidelines and regulations approved by LANUV, the responsible committee for animal studies in North Rhine-Westphalia/Germany (permission number 84-02.04.2014.A030). All rats were placed in a controlled environment (12 hours light/dark, temperature between 22°C and 24°C), and received water and standard rat feed (Ssniff, Soest, Germany) ad libitum.

2.3 | Induction of cirrhosis

2.3.1 | Cholestatic model of fibrosis

Bile duct ligation (BDL) was performed in 79 WT rats with an initial body weight (BW) of 180-200 g as described previously.²¹⁻²³ After four weeks, when ascites as a definite sign of portal hypertension was present, experiments were performed.

2.3.2 | Toxic model of fibrosis

Forty-two rats with an initial BW of 80-100 g were intoxicated twice weekly by inhalation of 1 l/min carbon tetrachloride (CCl₄) for 12-14 weeks. Experiments were performed when ascites was present as described previously.²¹

2.3.3 | Invasive erectile function measurement

Corpus cavernosum pressure (CCP) was measured invasively in five sham-operated and six BDL rats. This method is described in detail in the Data S1.

2.3.4 | In vivo haemodynamic experiments

In vivo systemic and liver haemodynamic studies were performed in five control, five sham-operated, 43 BDL and 22 CCl₄ intoxicated rats as described previously.^{21,24}

To evaluate the effects of udenafil and propranolol, invasive measurements of mean arterial pressure and portal pressure were performed continuously (for a total of 60 minutes after udenafil and 90 minutes after propranolol/udenafil) after acute intravenous drug administration.

2.3.5 | Microsphere technique

To investigate portal and systemic haemodynamics, the colored microsphere technique was carried out before and 60 minutes after acute administration of udenafil and 90 minutes after propranolol/udenafil as described previously.²⁴⁻²⁶ 300.000 systemic (red/before; yellow/after udenafil or udenafil/propranolol) microspheres (15 µm diameter, Triton-Technologies, San Diego, USA) were injected in the left ventricle. In parallel, peripheral blood was removed from the femoral artery and cardiac output was calculated as microspheres per pre-defined amount of blood (0.65 mL/min femoral artery blood). Mesenteric portal-systemic shunt volume was estimated by injection of 150.000 microspheres (white/before; blue/after) in the ileocecal vein and calculated as microspheres liver/microspheres lung ratio.^{21,24-26}

2.3.6 | In situ isolated liver perfusion

In situ isolated liver perfusion was performed in 30 BDL and 20 CCl₄ intoxicated rats. Experiments were performed in a recirculating system as previously described.^{21,27} The criteria for liver viability were gross appearance of the liver, stable perfusion, bile production >0.4 µL/min x g in CCl₄ rats and stable buffer pH (7.4 ± 0.1) during the initial stabilization period. Livers were incubated with methoxamine (Batch-No. M6524, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) for initial pre-contraction and N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME Batch-No. 5751, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) for inhibition of nitric oxide-dependent signalling.

2.3.7 | Quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA from human and rodent liver tissue and RNA from samples of rodent hepatic stellate cells (HSC), liver sinusoidal endothelial

TABLE 1 General characteristics of patients

Variables	All 86 (100%)	no ED 28 (33%)	ED 58 (67%)	P
Etiology (alcoholic/viral/others)	43/22/21	11/10/7	32/12/14	
Age	54.5 (19-76)	49 (19-68)	57.5 (39-76)	<.001
Child-Pugh class (A/B/C)	29/40/17	15/11/2	14/29/15	
Child-Pugh score	8 (5-13)	6 (5-11)	8 (5-13)	.0069
MELD score	12 (6-22)	11 (6-18)	14 (7-22)	.0103
NSBB (yes/no)	49/37	11 (39%)/ 17 (61%)	38 (65%)/ 20 (35%)	.0212
Grade IIEF-5 (mild/mild-moderate/moderate/severe)			26/18/7/7	

Note: General characteristics of the patient cohort.

Abbreviations: ED, erectile dysfunction; IIEF, international index of erectile function; MELD, model for end-stage liver disease; NSBB, non-selective beta-blocker; P, P-value.

cells (LSEC), aorta and penis were isolated. Reverse transcription and detection by real-time polymerase chain reaction (PCR) were performed as described previously.^{22,23} Assays were provided by Applied Biosystems (Foster City, USA). 18S rRNA served as endogenous control. Results were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, which corresponds to the x-fold increase of gene expression of the reference group.

2.3.8 | Hepatic cell isolation

The subsets of liver cells (hepatic stellate cells, liver sinusoidal endothelial cells) were isolated from healthy and BDL rats, as described previously.^{25,27-30} Briefly, primary liver cells were isolated in a two-step pronase-collagenase perfusion fractionated by density gradient centrifugation. Afterwards, the purified cells were subjected to PCR analysis.

2.3.9 | Western blotting

Liver samples were processed using sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE gels and nitrocellulose membranes were used as described previously.^{23,25} Ponceau staining and glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as endogenous control confirmed equal protein loading. Membranes were incubated with the respective primary antibodies: eNOS (BD Bioscience, San Jose, CA, USA; Cat.610296, Lot41425), peNOS (Cell Signalling, Boston, MA, USA; #9571, Lot 14), PDE5 (sigma HPA004729, Lot A91778) or GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-25778, Lot # K1511). A corresponding secondary peroxidase-coupled antibody was added (Santa-Cruz-Biotechnology, Santa Cruz, USA). After enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK) digital detection was evaluated using Chemi-Smart (PiqLab Biotechnologies, Erlangen, Germany).

2.3.10 | cGMP determination

cGMP levels were measured by EIA (Cayman Chemical) following the manufacturer's instructions.

2.4 | Statistical analysis

Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. Statistical analysis of two groups was either performed with Mann-Whitney-U test or Wilcoxon-signed-rank test for animal experiments. Only groups with more than three animals were tested statistically. Correlations were analysed by calculating Spearman's Rank Correlation Coefficient. A binary multivariate logistic regression model was fitted using MELD score (MELD was chosen over Child-Score to avoid multicollinearity) and NSBB intake as covariates and statistical significance for the subsequent steps. Statistical analyses and graphing were performed using GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, USA) or SPSS 22 (SPSS Inc Chicago, IL, USA). $P < .05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Erectile dysfunction in patients with cirrhosis

Eighty-six patients were prospectively included for erectile dysfunction using standard erectile function questionnaire (International Index of Erectile Function-5/ IIEF-5). Fifty percent of the patients suffered from alcoholic cirrhosis, 26% from chronic viral hepatitis and 24% from other aetiologies. The median age was 54.5 years, the median Child-Pugh Score was eight points and the median MELD score was twelve (Table S1).

Overall, 58 out of 86 patients (67%) reported erectile dysfunction with an IIEF-5 score < 22 (out of a maximum of 25 points). Out of

these, 28% reported mild, 31% mild to moderate, 12% moderate and 12% severe erectile dysfunction (Table 1). Patients with erectile dysfunction were significantly older (48 ± 10.7 years vs 57 ± 8.5 years; $P < .001$) and had a significant higher Child-Pugh score (7 ± 2 vs 8 ± 2 $P = .007$), as well as MELD score (11 ± 4 vs 14 ± 4 ; $P = .01$) compared to patients without erectile dysfunction.

Age ($r_s = -.482$, $P < .001$), Child-Pugh score ($r_s = -.357$, $P = .001$), as well as MELD score ($r_s = -.301$, $P = .01$) significantly correlated with the IIEF-5 score. Thereby, IIEF-5 score decreased with the severity of disease, assessed by Child-Pugh score (Figure 1A).

Overall, patients with NSBB treatment had significantly lower IIEF-5 scores than patients without NSBB treatment (Figure 1B). Importantly, this association was only present in Child A and B, but not in Child C patients (Figure 1C).

Of note, 65% of patients reporting erectile dysfunction were under NSBB treatment, while only 39% of patients without erectile dysfunction received NSBB treatment ($P = .02$). Logistic regression

analysis, using MELD score and NSBB intake as covariates, showed that NSBB intake increases by the factor 3.54 with reported erectile dysfunction (Odds Ratio 3.54, $P < .05$; 1.07-11.69 95% confidence interval) (Figure 1D).

Because of the significant association of erectile dysfunction and NSBB treatment, the effects of NSBB and PDE-5 inhibitors on erectile function were analysed in experimental cirrhosis.

3.2 | Erectile dysfunction in experimental cirrhosis

Erectile dysfunction was evaluated in vivo in rats after cavernous nerve stimulation by measuring invasive corpus cavernosum pressure (CCP) and the effects of propranolol (1 mg/kg BW, single dose, CCP measured after 30 minutes) and udenafil (1 mg/kg BW, single dose, CCP measured after 30 minutes) alone or as add-on to propranolol were analysed (Figure 2A). Erection dependent CCP

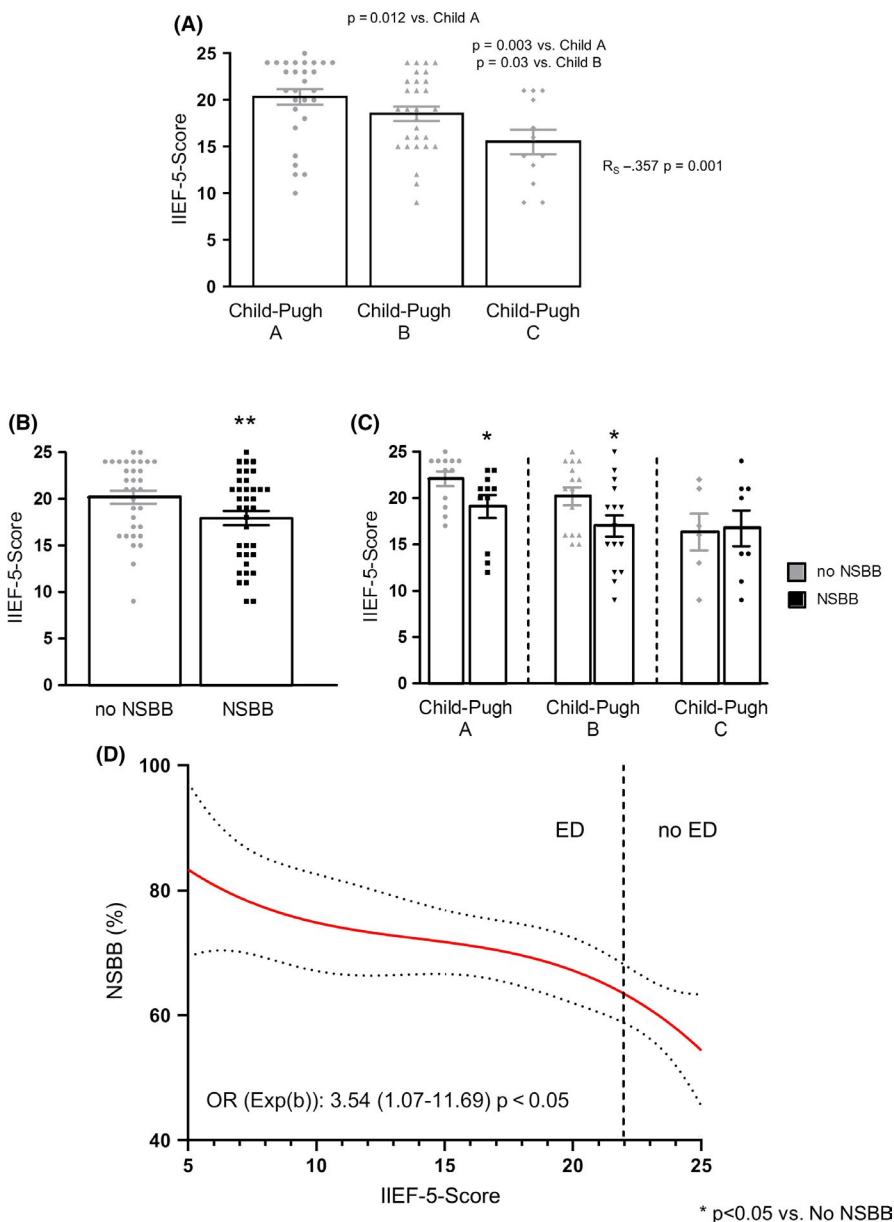


FIGURE 1 Erectile dysfunction in patients with cirrhosis. (A) Differences in IIEF-5 score between Child-Pugh A, B and C patients with a statistically significant negative correlation between categorical Child-Pugh score and IIEF-5 score; $R_s = -.357$, $P = .001$. (B) Differences in IIEF-5 score according to NSBB treatment in all patients and (C) stratified by Child-Pugh A, B and C. (D) Logistic regression analysis (Exp(B)/OR NSBB: 3.54, $P < .05$; 1.07-11.69 95% CI) on the probability for NSBB treatment in patients with and without ED. Abbreviations: 95%CI, 95% confidence interval; ED, erectile dysfunction; IIEF-5, International Index of Erectile Function 5; NSBB, non-selective beta-blocker; OR, odds ratio

increase was significantly lower in cirrhotic BDL rats compared to sham-operated animals (-46% , $P = .03$). Furthermore, the maximum CCP (CCP_{max}) during erection was lower in BDL than in sham-operated rats (31 vs 56 mmHg, Figure 2B).

Propranolol reduced CCP_{max} in BDL and sham-operated rats and udenafil improved erectile function both in sham and BDL animals either pretreated or not pretreated with propranolol (Figure 2C).

In the corpus cavernosum of BDL rats, treatment with propranolol and udenafil was associated with an increase of endothelial nitric oxide synthase (*Nos3*) ($P < .005$ vs untreated) and inducible nitric oxide synthase (*Nos2*) mRNA, as well as decreased levels of *Pde-5* compared to vehicle-treated animals ($P < .001$ vs untreated, Figure 2D). Combined administration of propranolol and udenafil significantly increased mRNA expression of beta-1- and beta-2-adrenoceptor (*Adrb1* and *Adrb2*) in corpus cavernosum of BDL rats compared to vehicle-treated animals ($P < .001$ vs untreated, Figure 2E).

Since udenafil showed beneficial effects on erectile dysfunction in experimental cirrhosis, we also studied the effects of PDE-5 inhibition on portal and systemic haemodynamics in vivo under the hypothesis that udenafil might have further beneficial effects on portal hypertension.

3.3 | Effect of PDE-5 inhibitors and NSBB on portal hypertension in experimental cirrhosis

Haemodynamic changes were investigated in BDL and CCl_4 rats after acute administration of different doses of udenafil (1 mg/kg BW and 5 mg/kg BW for 60 minutes). Treatment with 1 mg/kg and 5 mg/kg BW udenafil significantly decreased portal pressure in BDL rats (-30% 1 mg/kg; Figure 3A; -23% 5 mg/kg udenafil; Table 2).

As expected, portal pressure was unchanged after vehicle administration (Table 2). Similarly, application of 1 mg/kg udenafil led to a significantly decreased portal pressure in CCl_4 rats (-30% ; Figure 3A). No change in portal pressure was observed after administration of 5 mg/kg udenafil, probably because of a decrease in mean arterial pressure (Tables 2 and 3).

A dose of 1 mg/kg but not a dose of 5 mg/kg udenafil significantly reduced hepatic vascular resistance in BDL and CCl_4 rats (Tables 2 and 3). Moreover mesenteric shunt flow was reduced in all treated animals (Tables 2 and 3). Nevertheless, acute administration of udenafil significantly decreased mean arterial pressure (Figure 3B) and splanchnic vascular resistance (Tables 2 and 3) in both models of experimental cirrhosis. But cardiac output was

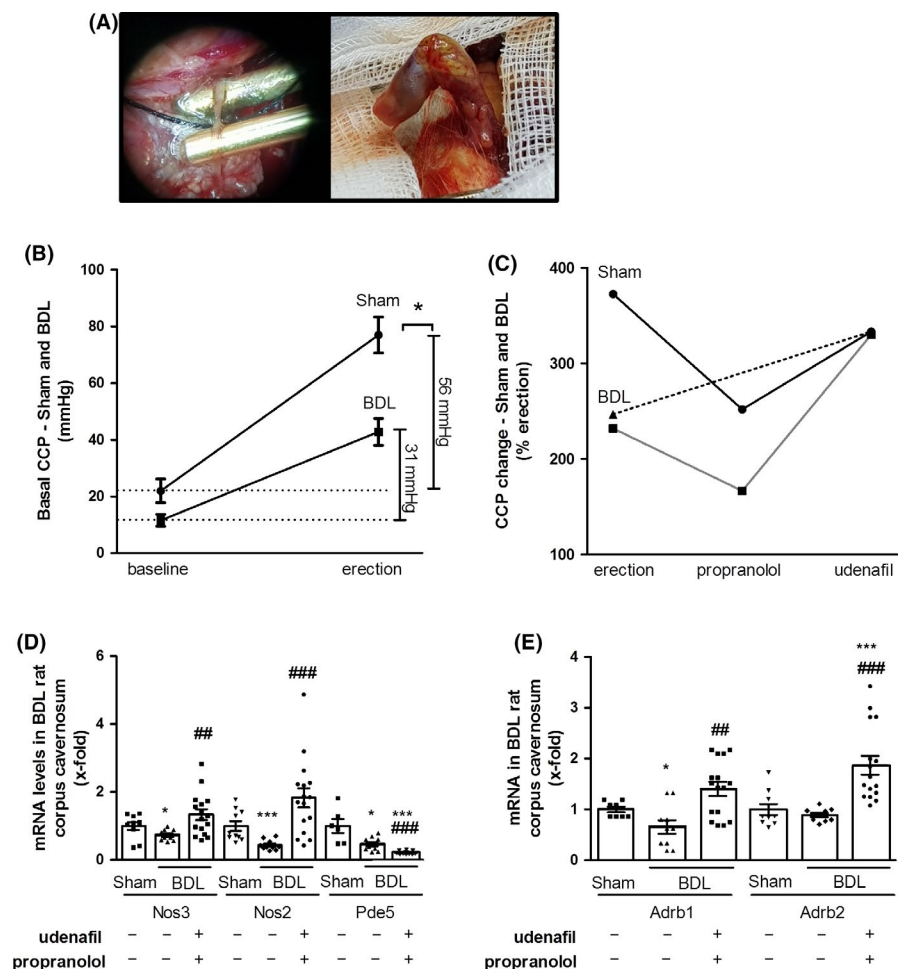
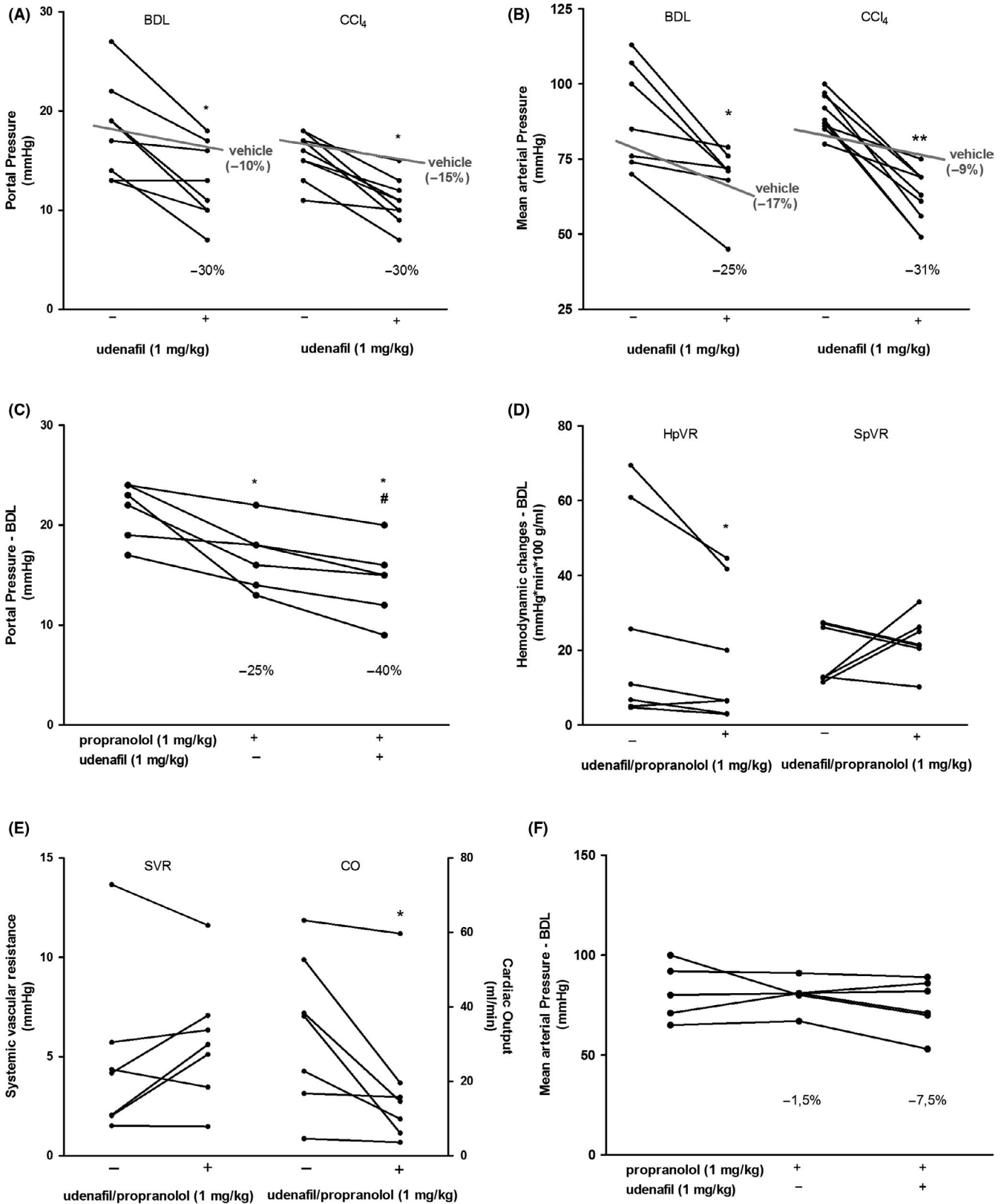


FIGURE 2 Erectile dysfunction in experimental cirrhosis. (A) Experimental setup, preparation and stimulation of cavernous nerve induces erection in BDL rats. (B) CCP in BDL and sham-operated rats at baseline and during erection. (C) Changes in CCP during erection after acute add-on treatment with propranolol and udenafil in BDL and sham-operated rats. (D) mRNA expression levels of *Nos-3*, *Nos-2* and *Pde-5* as well as (E) *Adrb1* and *Adrb2* in corpus cavernosum of BDL and sham-operated rats after treatment with udenafil and propranolol compared to vehicle treatment. Abbreviations: *Adrb1*, beta-1-adrenoceptor; *Adrb2*, beta-2-adrenoceptor; BDL, bile duct ligation; CCP, corpus cavernosum pressure; mRNA, messenger ribonucleic acid; *Nos-2*, inducible nitric oxide synthase; *Nos-3*, endothelial nitric oxide synthase; *Pde-5*, Phosphodiesterase-5

* / *** $p < 0.05$ / $p < 0.001$ vs. control; ### / #### $p < 0.005$ / $p < 0.001$ vs. cirrhosis



*/** p<0.05/p<0.005 vs. before treatment

FIGURE 3 Effect of PDE-5 inhibitors and NSBB on portal hypertension in experimental cirrhosis. (A) PP and (B) MAP in BDL and CCl₄ rats before and after monotherapy with udenafil. (C) PP, (D) HpVR and SpVR in BDL rats after combined treatment with propanolol and udenafil. (E) Changes in SVR, CO and (F) MAP after treatment with propanolol and udenafil in BDL rats. Abbreviations: BDL, bile duct ligation; CCl₄, carbon tetrachloride; CO, cardiac output; HpVR, hepatic portal vascular resistance; MAP, mean arterial pressure; NSBB, non-selective beta-blocker; PDE-5, phosphodiesterase-5; PP, portal pressure; SpVR, splanchnic vascular resistance; SVR, systemic vascular resistance

TABLE 2 Haemodynamic changes after udenafil treatment in BDL rats

	Vehicle (n = 5)			1 mg/kg udenafil (n = 6)			5 mg/kg udenafil (n = 5)		
	Before mean ± SEM	After mean ± SEM	P-value	Before mean ± SEM	After mean ± SEM	P-value	Before mean ± SEM	After mean ± SEM	P-value
HpVR (mmHg*min*100 g/mL)	6.8 ± 1.0	7.8 ± 1.6	.8125	6.9 ± 1.1	4.3 ± 0.7	.0313*	7.6 ± 2.0	4.3 ± 1.0	.0938
SpVR (mmHg*min*100 g/mL)	16.3 ± 2.6	14.8 ± 6.3	.6250	17.3 ± 3.3	12.4 ± 2.2	.2188	15.3 ± 1.5	10.3 ± 1.2	.0313*
SF (%)	15.9 ± 4.8	20.5 ± 6.1	.1250	15.3 ± 3.7	7.1 ± 3.2	.0625	17.8 ± 13.8	8.9 ± 9.3	.0625
CO (mL/min)	31.050 ± 11.580	30.570 ± 7.234	1.0000	44.600 ± 5.883	38.922 ± 8.324	1.0000	39.1 ± 10.7	31.1 ± 8.4	.6250
PP (mmHg)	22.0 ± 2.8	209 ± 8.7	.2785	18.0 ± 1.7	12.8 ± 1.4	.0223*	20.7 ± 2.4	16.1 ± 2.4	.0350*
MAP (mmHg)	88.6 ± 6.7	70.4 ± 5.3	.0625	84.1 ± 6.1	67.1 ± 3.5	.0090**	84.0 ± 3.2	72.1 ± 4.4	.0247*

Note: Haemodynamic changes after acute treatment with either vehicle, 1 mg/kg BW or 5 mg/kg BW udenafil in BDL rats.

Abbreviations: BDL, bile duct ligation; BW, body weight; CO, cardiac output; HpVR, hepatic portal vascular resistance; MAP, mean arterial pressure; PP, portal pressure; SEM, Standard error of the mean; SF, mesenteric shunt flow; SpVR, splanchnic vascular resistance. Bold is statistically significant, *P < .05 and **P > .01.

TABLE 3 Haemodynamic changes after udenafil treatment in CCl₄ rats

	Vehicle (n = 5)			1 mg/kg udenafil (n = 6)			5 mg/kg udenafil (n = 5)		
	Before mean ± SEM	After mean ± SEM	P-value	Before mean ± SEM	After Mean ± SEM	P-value	Before mean ± SEM	After mean ± SEM	P-value
HpVR (mmHg*min*100 g/mL)	6.3 ± 0.5	8.0 ± 3.3	.6250	6.8 ± 1.2	3.8 ± 1.0	00355*	6.5 ± 2.7	2.9 ± 0.6	.2188
SpVR (mmHg*min*100 g/mL)	22.4 ± 8.1	26.4 ± 6.4	.3125	25.5 ± 6.3	14.0 ± 5.7	.0625	26.2 ± 2.7	15.4 ± 6.7	.1250
SF (%)	7.4 ± 4.0	6.4 ± 2.4	.3125	7.4 ± 2.6	5.1 ± 2.9	.0313*	7.6 ± 2.2	2.6 ± 1.2	.0313*
CO (mL/min)	22.0 ± 2.9	26.7 ± 6.3	.6250	21.5 ± 7.8	21.0 ± 9.8	1.000	26.0 ± 3.5	28.2 ± 6.7	.8125
PP (mmHg)	16.8 ± 2.5	15.3 ± 3.0	.4142	17.5 ± 2.1	12.5 ± 1.8	.0058**	14.0 ± 1.0	14.7 ± 0.9	1.000
MAP (mmHg)	86.5 ± 6.2	72.5 ± 5.2	.0938	86.6 ± 4.0	60.0 ± 3.6	.0059**	93.5 ± 7.7	62.0 ± 4.4	.0579

Note: Haemodynamic changes after acute treatment with either vehicle, 1 mg/kg BW or 5 mg/kg BW udenafil in CCl₄ intoxicated rats.

Abbreviations: CCl₄, carbon tetrachloride; CO, cardiac output; HpVR, hepatic portal vascular resistance; MAP, mean arterial pressure; PP, portal pressure; SEM, Standard error of the mean; SF, mesenteric shunt flow; SpVR, splanchnic vascular resistance. Bold is statistically significant, *P < .05 and **P > .01.

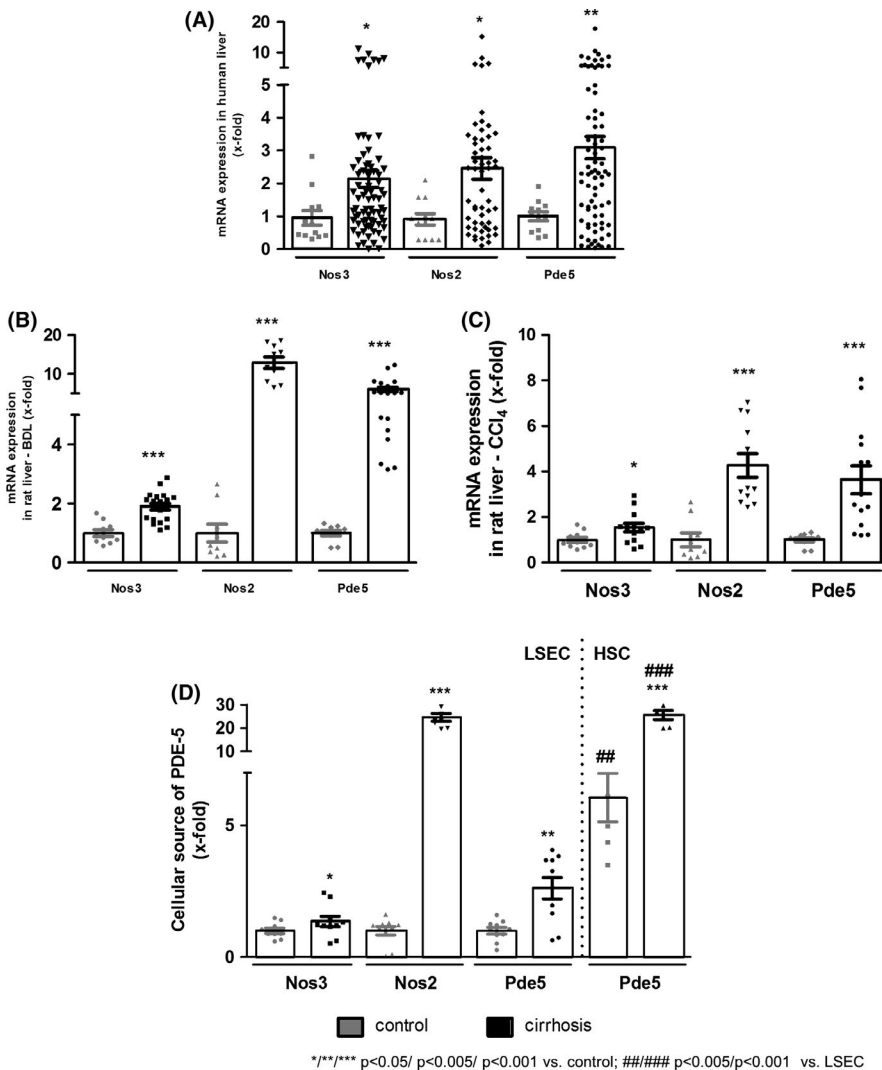


FIGURE 4 Role of PDE-5 in human and experimental cirrhosis. (A) mRNA expression levels of *Nos-3*, *Nos-2* and *Pde-5* in liver tissue of humans and (B-C) of BDL and CCl_4 intoxicated rats compared to healthy controls. (D) *Nos-3* and *Nos-2* mRNA levels in primary isolated LSEC from BDL rats compared to healthy controls and *Pde-5* mRNA expression in LSEC and HSC from healthy and cirrhotic BDL rats. Abbreviations: BDL, bile duct ligation; CCl_4 , carbon tetrachloride; HSC, hepatic stellate cells; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; mRNA, messenger ribonucleic acid; *Nos-2*, inducible nitric oxide synthase; *Nos-3*, endothelial nitric oxide synthase; *Pde-5*, Phosphodiesterase-5

not influenced either by the administration of udenafil or vehicle (Tables 2 and 3).

Interestingly, the combination of the NSBB propranolol and udenafil further reduced portal pressure compared to udenafil or propranolol alone (~25% propranolol; 60 minutes after administration vs ~30% udenafil; 60 minutes after administration vs ~40% combined treatment; after 30 minutes of propranolol and additional 60 minutes of udenafil) (Figure 3C). Additionally, hepatic vascular resistance as well as cardiac output were decreased after combined treatment compared to placebo (Figure 3D-E). Importantly, when propranolol was combined with udenafil, no systemic side-effects were observed, as shown by unchanged mean arterial pressure, splanchnic and systemic vascular resistance. That is in contrast to Figure 3B, where injection of udenafil alone significantly reduced mean arterial pressure (Figure 3E-F).

While PDE-5 inhibition reduced portal hypertension and was associated with systemic side-effects, combination with NSBB improved portal hypertension without negative impact on splanchnic and systemic circulation. Thus, we followed two questions: what is the role of PDE-5 in-, respectively outside the liver and how is it influenced by PDE-5 inhibitor and NSBB treatment.

3.4 | Role of PDE-5 in human and experimental cirrhosis

Liver and vessel samples from healthy liver transplant donors and cirrhotic recipients were used to analyse changes in nitric oxide signalling in human cirrhosis.

Nos3, *Nos2* and *Pde-5* were significantly upregulated in liver samples from liver transplant recipients compared to samples from transplant donors ($P < .05$ vs healthy control, Figure 4A). By contrast, *Pde-5* mRNA levels were reduced and *Nos3* and *Nos2* mRNA levels were increased in human hepatic artery samples from liver transplant recipients compared to transplant donors ($P < .05$ vs healthy control, Figure S1A).

In experimental cirrhosis, induced either by four weeks of BDL or 14 weeks of CCl_4 intoxication, hepatic levels of *Pde-5*, *Nos3* and *Nos2* mRNA were significantly upregulated compared to healthy controls ($P < .001$ vs control, Figure 4B-C). In line with human data, *Nos2* mRNA levels were upregulated ($P < .05$) and *Pde-5* mRNA levels were reduced ($P < .001$) in aorta samples from cirrhotic rats, while *Nos3* mRNA levels remained unchanged (Figure S1B-C).

To determine the source of disturbed nitric oxide signalling in cirrhotic livers, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and hepatic

FIGURE 5 Molecular mechanisms of PDE-5 effect with and without NSBB in experimental cirrhosis. (A-B) Changes in perfusion pressure in response to udenafil and L-NAME in BDL and CCl₄ rats. (C) Hepatic protein expression of eNOS, p-eNOS, PDE5 and GAPDH in BDL rats after udenafil treatment compared to vehicle control. (D-E) Changes in hepatic and aorta cGMP levels after treatment with udenafil and propranolol. (F) Aorta mRNA expression of *Nos-3*, *Nos-2* and *Pde-5* in BDL rats after udenafil monotherapy or in combination with propranolol. Abbreviations: BDL, bile duct ligation; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; L-NAME, N-Nitroarginine methyl ester; mRNA, messenger ribonucleic acid; NO, nitric oxide; *Nos-2*/iNOS, inducible nitric oxide synthase; *Nos-3*/eNOS, endothelial nitric oxide synthase; NSBB, non-selective beta-blocker; PDE-5, phosphodiesterase-5; p-eNOS phosphorylated eNOS

stellate cells (HSC) were isolated from healthy and BDL rats and further analysed in vitro.

In LSEC isolated from BDL rats, mRNA levels of *Nos3* and *Nos2* were significantly increased compared to healthy controls ($P < .001$ vs control, Figure 4D). Moreover *Pde-5* mRNA levels were significantly upregulated in LSEC ($P < .005$ vs control) as well as primary isolated rat HSCs compared to their respective controls ($P < .001$ vs control). This effect was even more pronounced in HSC compared to LSEC (Figure 4D).

3.5 | Molecular mechanisms of PDE-5 effect with and without NSBB in experimental cirrhosis

In situ isolated liver perfusion was performed in BDL and CCl₄ rats after initial pre-contraction with methoxamine. To determine NO-dependent effects of the PDE-5 inhibitor udenafil, a subset of livers was perfused with the NO-synthase inhibitor L-NAME. Administration of increasing doses of udenafil (0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL perfusate) significantly reduced perfusion pressure in BDL rats compared to vehicle ($P < .05$, Figure 5A). This effect was completely blunted by L-NAME in BDL rats (Figure 5A). Similarly, perfusion pressure in isolated liver of CCl₄ rats was reduced after udenafil treatment in a dose-dependent manner, while it remained unchanged after incubation with L-NAME ($P < .05$, Figure 5B).

Udenafil administration led to slightly increased protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and significantly promoted its phosphorylation (peNOS) in BDL liver samples ($P < .05$ vs untreated, Figure 5C). Consequently, udenafil treatment increased cGMP levels in liver and aorta samples from cirrhotic animals (Figure 5D). By contrast, the combination of propranolol and udenafil particularly blunted cGMP in aorta samples, while it was increased in cirrhotic liver samples (Figure 5D-E). Furthermore, combined acute administration of propranolol and udenafil reduced *Nos3*, *Nos2* and *Pde-5* mRNA expression in aorta samples ($P < .05$ vs untreated, Figure 5F).

These results suggest that PDE-5 inhibition enhances hepatic cGMP levels and induces intrahepatic vasodilation, which is further increased by the combined NSBB treatment in experimental cirrhosis.

4 | DISCUSSION

PDE-5 inhibitors restore erectile function in experimental cirrhosis and prevent NSBB-induced erectile dysfunction. Moreover the

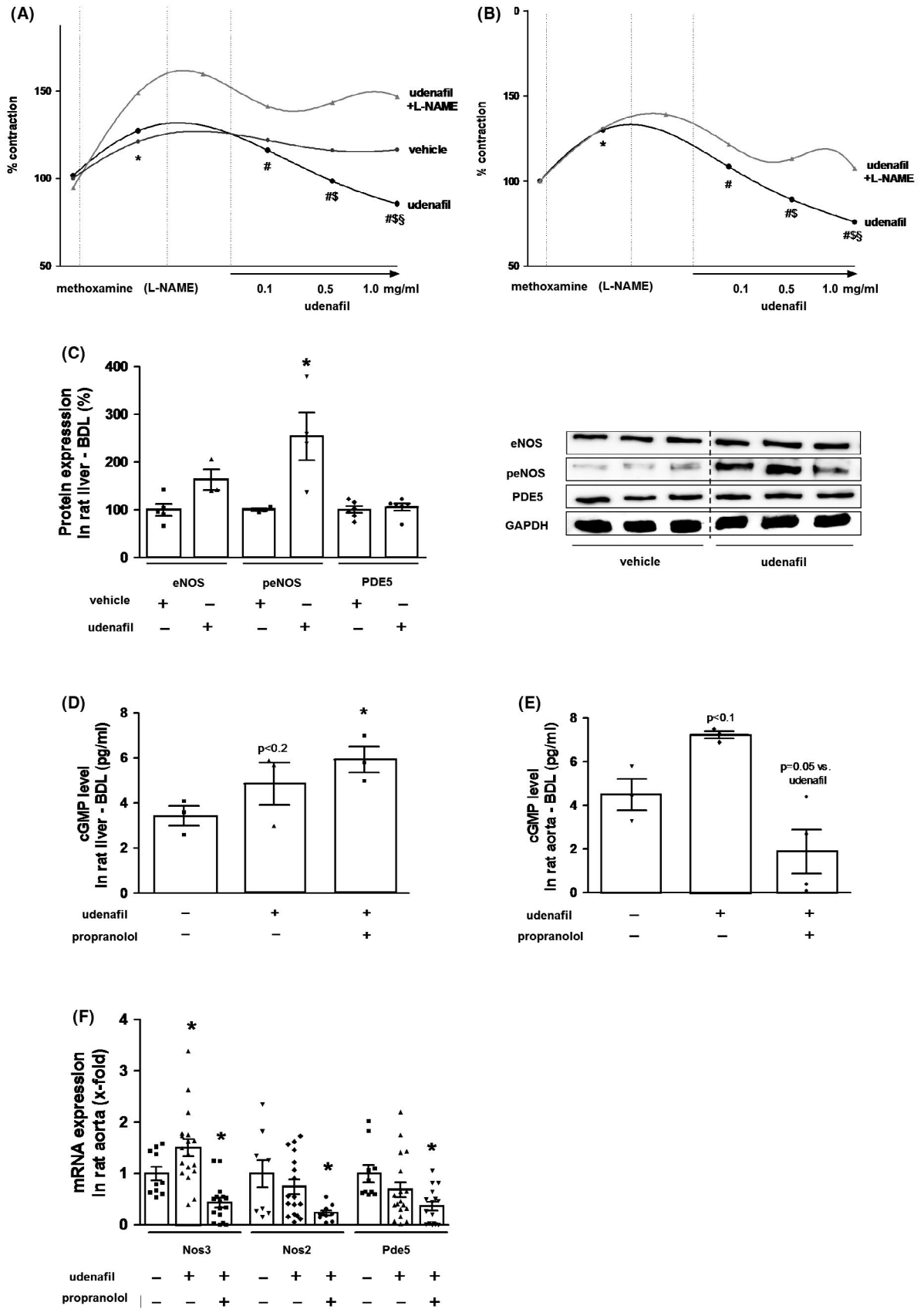
combination of PDE-5 inhibitors with NSBB decreases portal pressure without extrahepatic systemic effects.

Erectile dysfunction is a common complication in cirrhotic patients and its presence increases with the severity of liver disease.^{31,34} NSBB are used as standard medical therapy for the prevention of portal hypertension-related bleeding and erectile dysfunction is known as a side-effect of NSBB in general population.^{35,36} Nevertheless, recent studies could not identify a clear association of NSBB with the presence of erectile dysfunction in cirrhosis.^{31,34}

This is the first study delivering evidence that NSBB treatment is indeed associated with erectile dysfunction in cirrhotic patients, especially in less-severe (Child-A and -B) disease-stages. The major difference to previous studies is the exclusion of patients with extrahepatic diseases that might interfere with erectile function and exclusion of patients with indication for NSBB other than bleeding prophylaxis (eg arterial hypertension). This potentially leads to a more refined population with regard to the relation of NSBB and erectile dysfunction in cirrhosis. Nevertheless, we could further confirm that NSBB induce erectile dysfunction in a rodent model of cirrhosis. This was the case despite the downregulation of PDE-5, which is known to be an important enzyme in the regulation of erectile function.

PDE-5 inhibitors, originally developed as a therapy for angina pectoris and arterial hypertension, are licensed for the treatment of erectile dysfunction.^{1,32,37} Our data show that PDE-5 inhibition restores erectile function, especially after treatment with NSBB, in experimental cirrhosis.

At molecular level, PDE-5 inhibitors block the degradation of cGMP, thereby enhancing nitric oxide and inducing vasodilation.³⁸ In cirrhosis, an intrahepatic lack of nitric oxide effects aggravates vasoconstriction, while splanchnic overproduction of nitric oxide contributes to extrahepatic vasodilation.^{39,40} Thereby, the reduced intrahepatic nitric oxide availability is caused by a disturbed balance of production and degradation through PDE-5.^{5,41} In the liver, nitric oxide mainly derives from LSEC, which thereby regulate HSC contraction and vascular tone.^{38,40,42,43} Yet, our study delivers evidence that decreased nitric oxide effects are at least partially because of PDE-5 upregulation in cirrhosis and that the main hepatic source of PDE-5 are HSC's, and not due to decreased expression of NOS which are clearly upregulated in liver cirrhosis as demonstrated in this study and confirming previous studies. This confirms recent reports describing hepatic upregulation of PDE-5 in experimental cirrhosis shown by immunohistochemistry.^{5,6} Our



* p < 0.05 vs. before treatment; # p < 0.05 vs. Methoxamine/propranolol; \$ p < 0.05 vs. 0.1mg/ml udenaflil; § p < 0.05 vs. 0.5 mg/ml udenaflil

results attribute this effect to HSCs and suggest a specific role of PDE-5 and nitric oxide in the interaction between LSEC and HSC. In several lines of evidence, we could demonstrate *in vitro*, *in situ* and *in vivo* that PDE-5 inhibition decreases intrahepatic resistance and portal pressure.

The potential role of PDE-5 in cirrhosis has been investigated before.^{10,12,44-46} While some studies report improved portal haemodynamics, reduced hepatic resistance and reduced fibrosis after PDE-5 inhibitor treatment in rodents and human cirrhosis, others could not confirm these effects in human disease, especially because of severe systemic side-effects.^{10-13,47} In our hands, acute PDE-5 inhibition with udenafil decreased portal pressure in different models of cirrhosis. We could demonstrate that the PDE-5 inhibition was nitric oxide-dependent, as shown by our *in situ* experiments and underlined by our expression data of NOS and PDE-5 in total liver tissue and isolated LSEC and HSC from cirrhotic and healthy animals. Importantly, we demonstrated that PDE-5 inhibition promotes these effects by regulating hepatic cGMP levels in HSC.

Similar to sildenafil,^{13,47} udenafil also had significant systemic side-effect because of its lack of liver selectivity. These effects might be especially deleterious in human portal hypertension since *Nos3* and *Nos2* are upregulated in vessel samples from cirrhotic patients, despite the decreased PDE-5 expression. There, further PDE-5 inhibition would aggravate extrahepatic vasodilation. This was clearly demonstrated in our *in vivo* studies showing a dose-dependent effect of udenafil on systemic circulation and increased cGMP levels in the analysed human hepatic artery samples.

Notably, previous clinical trials, exploring the efficacy of PDE-5 inhibitors in cirrhosis, excluded all patients with previous NSBB treatment or stopped it for at least a few days before intervention.

Thus, our study provides a possible explanation for the observed limited effects of PDE-5 inhibitors. An ideal therapy for PH should induce intrahepatic vasodilation and systemic vasoconstriction. NSBB exert its effects through unselective blocking of beta-1 and beta-2 adrenoceptors, leading to reduced cardiac output and increased systemic vasoconstriction.^{14,15,48} Importantly, conventional NSBB have little to no influence on hepatic vascular resistance which is the major cause of portal hypertension.¹⁶

We demonstrate that combination of NSBB with udenafil has several benefits in cirrhotic portal hypertension. First, it acts synergistic on decreasing portal pressure, since udenafil reduces hepatic vascular resistance and NSBB decrease portal venous inflow by ameliorating splanchnic vasodilation. Second, the systemic effect of PDE-5 inhibition is abolished under NSBB therapy, what means that the mean arterial pressure is maintained. Third, udenafil co-administration with NSBB improves erectile dysfunction and thus may improve patient quality of life, which may eventually have an effect on the adherence to NSBB therapy.

A limitation of this work is that the combination of PDE-5 inhibitors and NSBB was not tested in patients with erectile dysfunction. However, our rodent data provides clear evidence for beneficial effects of combination therapy, and thus, future studies should be

performed to investigate its effect on hepatic and systemic haemodynamics, as well as on erectile dysfunction in men.

In conclusion, this study shows for the first time that combining NSBB and PDE-5 inhibitors might be a good strategy to treat portal hypertension without aggravating arterial hypotension or erectile dysfunction.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank G. Hack and S. Bellinghausen for excellent technical assistance and S. Dentler for critical reading and correction of the manuscript. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that no conflict of interest exists.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

JT initiated the work. JT and SK coordinated the work. FEU, KG, RP, FM, TG, CO and SK collected data/performed experiments. FEU, KG, RP, RS, SK, FM, MM, CO, KS and JT performed statistics. AF, TR, AP, WK, CB, PD, PK, CA, TR and TS provided essential materials. FEU, KG, RP, SK, AF and JT drafted the manuscript. All authors critically discussed, corrected and reviewed the manuscript.




ETHICS APPROVAL

The human studies were approved by the ethics committee of the University Hospital Bonn (Study Number 279/14) and Medical University of Vienna (Study Number 450/2010) and performed in accordance to the current version of the Declaration of Helsinki.

PATIENT CONSENT STATEMENT

All patients signed an informed consent prior to study inclusion.

ORCID

Frank E. Uschner  <https://orcid.org/0000-0002-3760-2887>
 Rafael Paternostro  <https://orcid.org/0000-0002-1813-5769>
 Thorsten Gnad  <https://orcid.org/0000-0003-0169-3067>
 Mattias Mandorfer  <https://orcid.org/0000-0003-2330-0017>
 Katharina Schwarzkopf  <https://orcid.org/0000-0002-2147-5051>
 Alexander Pfeifer  <https://orcid.org/0000-0001-8805-6831>
 Thomas Reiberger  <https://orcid.org/0000-0002-4590-3583>
 Wolfgang Kreisel  <https://orcid.org/0000-0001-6884-0135>
 Jonel Trebicka  <https://orcid.org/0000-0002-7028-3881>

REFERENCES

1. Mónica FZ, Bian K, Murad F. The endothelium-dependent nitric oxide-cGMP pathway. *Adv Pharmacol.* 2016;77:1-27.
2. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology.* 1998;114:344-351.
3. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology.* 1998; 28:926-931.

4. Biecker E, Trebicka J, Kang A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Heller J. Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension. *Liver Int.* 2008;28:331-338.
5. Loureiro-Silva MR, Iwakiri Y, Abraldes JG, Haq O, Groszmann RJ. Increased phosphodiesterase-5 expression is involved in the decreased vasodilator response to nitric oxide in cirrhotic rat livers. *J Hepatol.* 2006;44:886-893.
6. Schaffner D, Lazaro A, Deibert P, et al. Analysis of the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in experimental liver cirrhosis suggests phosphodiesterase-5 as potential target to treat portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2018;24:4356-4368.
7. Halverscheid L, Deibert P, Schmidt R, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors have distinct effects on the hemodynamics of the liver. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:69.
8. Lee K-C, Yang Y-Y, Huang Y-T, et al. Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci.* 2010;119:45-55.
9. Colle I, De Vriese AS, Van Vlierberghe H, Lameire NH, DeVos M. Systemic and splanchnic haemodynamic effects of sildenafil in an in vivo animal model of cirrhosis support for a risk in cirrhotic patients. *Liver Int.* 2004;24:63-68.
10. Kreisel W, Deibert P, Kupcinskas L, et al. The phosphodiesterase-5-inhibitor udenafil lowers portal pressure in compensated preascitic liver cirrhosis. A dose-finding phase-II-study. *Dig Liver Dis.* 2015;47:144-150.
11. Deibert P, Schumacher Y-O, Ruecker G, et al. Effect of vardenafil, an inhibitor of phosphodiesterase-5, on portal haemodynamics in normal and cirrhotic liver – results of a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:121-128.
12. Lee K-C, Yang Y-Y, Wang Y-W, et al. Acute administration of sildenafil enhances hepatic cyclic guanosine monophosphate production and reduces hepatic sinusoid resistance in cirrhotic patients. *Hepatol Res.* 2008;38:1186-1193.
13. Clemmesen J-O, Giraldi A, Ott P, Dalhoff K, Hansen B-A, Larsen F-S. Sildenafil does not influence hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:6208-6212.
14. Turon F, Casu S, Hernández-Gea V, Garcia-Pagán JC. Variceal and other portal hypertension related bleeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27:649-664.
15. Giannelli V, Lattanzi B, Thalheimer U, Merli M. Beta-blockers in liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol.* 2014;27:20-26.
16. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005;353:2254-2261.
17. Reiberger T, Ulbrich G, Ferlitsch A, et al. Carvedilol for primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhotic patients with haemodynamic non-response to propranolol. *Gut.* 2013;62:1634-1641.
18. Villanueva C, Albillos A, Genescà J, et al. β blockers to prevent decompensation of cirrhosis in patients with clinically significant portal hypertension (PREDESCI): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 2019;393:1597-1608.
19. Manolis A, Doumas M. Antihypertensive treatment and sexual dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14:285-292.
20. Rosen RC, Cappelleri JC, Smith MD, Lipsky J, Peña BM. Development and evaluation of an abridged, 5-item version of the International Index of Erectile Function (IIEF-5) as a diagnostic tool for erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1999;11:319.
21. Klein S, Schierwagen R, Uschner FE, Trebicka J. Mouse and rat models of induction of hepatic fibrosis and assessment of portal hypertension. *Methods Mol Biol.* 2017;1627:91-116.
22. Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, et al. Role of β 3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009;50:1924-1935.
23. Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology.* 2007;46:242-253.
24. Grace JA, Klein S, Herath CB, et al. 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.
25. Klein S, Klösel J, Schierwagen R, et al. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest.* 2012;92:1440-1450.
26. Uschner FE, Ranabhat G, Choi SS, et al. Statins activate the canonical hedgehog-signaling and aggravate non-cirrhotic portal hypertension, but inhibit the non-canonical hedgehog signaling and cirrhotic portal hypertension. *Sci Rep.* 2015;5:14573.
27. Klein S, Rick J, Lehmann J, et al. Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis. *Gut.* 2017;66:145-155.
28. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, et al. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest.* 2011;91:241-251.
29. Granzow M, Schierwagen R, Klein S, et al. Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology.* 2014;60:334-348.
30. Fernández-Iglesias A, Ortega-Ribera M, Guixé-Muntet S, Gracia-Sancho J. 4 in 1: antibody-free protocol for isolating the main hepatic cells from healthy and cirrhotic single rat livers. *J Cell Mol Med.* 2019;23:877-886.
31. Paternostro R, Heinisch BB, Reiberger T, et al. Erectile dysfunction in cirrhosis is impacted by liver dysfunction, portal hypertension, diabetes and arterial hypertension. *Liver Int.* 2018;38:1427-1436.
32. Andersson K-E. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *Br J Pharmacol.* 2018;175:2554-2565.
33. Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C, Bo S, Ghigo E, Manieri C. Male sexual disturbances in liver diseases: what do we know? *J Endocrinol Invest.* 2010;33:501-505.
34. Maimone S, Saffioti F, Oliva G, et al. Erectile dysfunction in compensated liver cirrhosis. *Dig Liver Dis.* 2019;51:843-849.
35. Shiri R, Koskimäki J, Häkkinen J, Auvinen A, Tammela TLJ, Hakama M. Cardiovascular drug use and the incidence of erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 2007;19:208-212.
36. Keene LC, Davies PH. Drug-related erectile dysfunction. *Adverse Drug React Toxicol Rev.* 1999;18:5-24.
37. Unegbu C, Noje C, Coulson JD, Segal JB, Romer L. Pulmonary hypertension therapy and a systematic review of efficacy and safety of PDE-5 inhibitors. *Pediatrics.* 2017;139:e20161450.
38. Kim NN. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: a biochemical and clinical correlation survey. *Int J Impot Res.* 2003;15(Suppl 5):S13-S19.
39. Hu LS, George J, Wang JH. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2013;19:1707-1717.
40. DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2015;61:1740-1746.
41. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G567-G574.
42. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J Hepatol.* 2016;65:608-617.

43. Natarajan V, Harris EN, Kidambi S. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), liver microenvironment, and fibrosis. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:4097205.
44. Deibert P, Lazaro A, Stankovic Z, Schaffner D, Rössle M, Kreisel W. Beneficial long term effect of a phosphodiesterase-5-inhibitor in cirrhotic portal hypertension: a case report with 8 years follow-up. *World J Gastroenterol*. 2018;24:438-444.
45. Tahseldar-Roumieh R, Ghali-Ghoul R, Lugnier C, Sabra R. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitor on alteration in vascular smooth muscle sensitivity and renal function in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H481-H488.
46. Choi S-M, Shin J-H, Kim J-M, et al. Effect of udenafil on portal venous pressure and hepatic fibrosis in rats. A novel therapeutic option for portal hypertension. *Arzneimittelforschung*. 2009;59:641-646.
47. Tandon P, Inayat I, Tal M, et al. Sildenafil has no effect on portal pressure but lowers arterial pressure in patients with compensated cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:546-549.
48. Mandorfer M, Reiberger T. Beta blockers and cirrhosis, 2016. *Dig Liver Dis*. 2017;49:3-10.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Uschner FE, Glückert K, Paternostro R, et al. Combination of phosphodiesterase-5-inhibitors and beta blockers improves experimental portal hypertension and erectile dysfunction. *Liver Int*. 2020;40:2228-2241. <https://doi.org/10.1111/liv.14586>

Supplementary Method

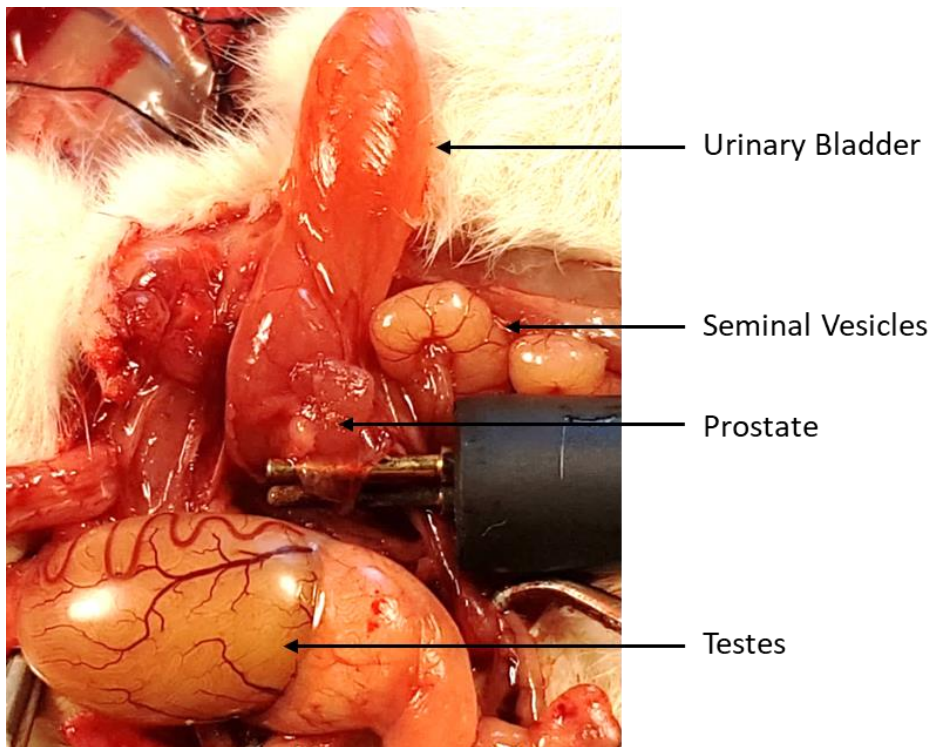
Invasive erectile function measurement.

Male Sprague-dawley rats with an initial bodyweight of 180-200g were anaesthetised and a median laparotomy was performed as previously described ¹.

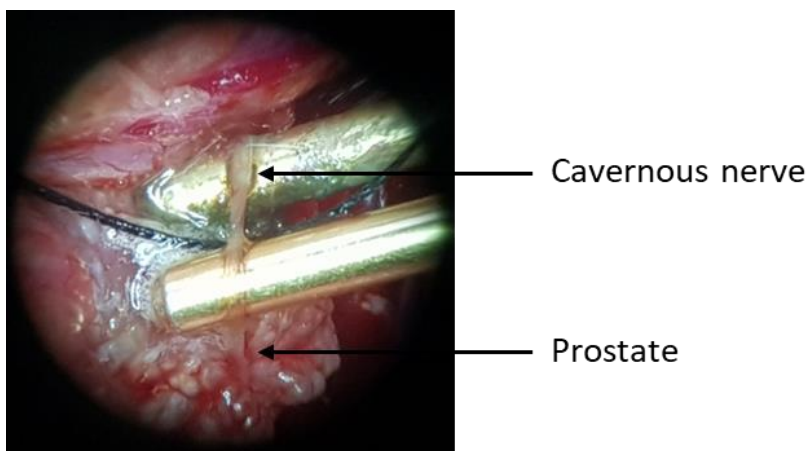
First, the urinary bladder was identified, freed by blunt dissection from surrounding tissue and translocated cranio-medially (Suppl. Method Fig. 1). Next, the testes were extracted from the scrotum and fixed laterally together with the connecting seminal vesicles. Thereafter, the dorsal lobe of the prostate could be identified as soft, uneven deep red tissue in the center (Suppl. Method Fig. 1). Using a stereomicroscope (Leica A60 S, Leica, Wetzlar, Germany), the major pelvic ganglion was identified on the prostate after blunt removal of soft tissue and fat. The cavernous nerve was then identified topographically running from the major pelvic ganglion towards the urethra. The cavernous nerve was dissected and grasped with an animal nerve stimulation bipolar electrode (MLA 0320, ADInstruments, Oxford, United Kingdom) (Suppl. Method Fig. 2). Next, assessment of the corpora cavernosum pressure (CCP) was performed. The penis was completely denuded from surrounding skin and soft tissue. Then, a 27 G cannula was inserted into the corpus cavernosum (Suppl. Method Fig. 3). The pressure was recorded continuously as previously described ¹⁻³.

For the analyses of the erectile function, the cavernous nerve was stimulated with 7.5V at a frequency of 20Hz and a pulse width of 0.005 seconds for a total of one minute and CCP was recorded simultaneously. Erectile function was assessed comparing baseline CCP and CCP at maximum erection.

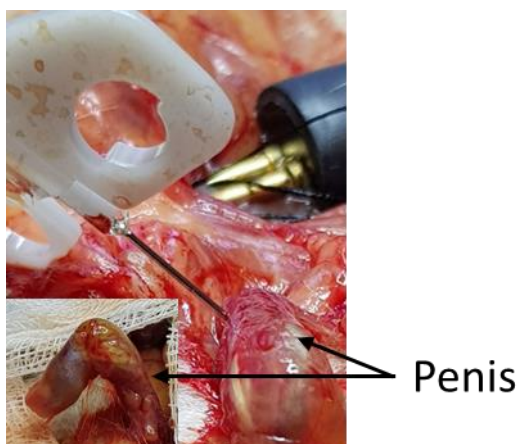
Supplementary Method Figure 1:



Supplementary Method Figure 2:



Supplementary Method Figure 3:



Supplementary Method References

1. Klein S, Schierwagen R, Uschner FE, Trebicka J. Mouse and Rat Models of Induction of Hepatic Fibrosis and Assessment of Portal Hypertension. *Methods Mol Biol.* 2017;1627:91–116.
2. Klein S, Rick J, Lehmann J, et al. Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis. *Gut.* 2017;66:145–155.
3. Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2010;53:702–712.

3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jonel Trebicka für das Überlassen des Dissertationsthemas sowie die stete Unterstützung bedanken. Trotz der räumlichen Distanz während meiner Forschungszeit war er immer erreichbar und hatte stets ein offenes Ohr für meine Belange. Mein herzlicher Dank gilt außerdem meinem Betreuer Herrn Dr. Frank Erhard Uschner. Er hat mir nicht nur das wissenschaftliche Rüstzeug für diese Arbeit mitgegeben, sondern auch die Freude an der Forschung, die mich hoffentlich noch weiter begleiten wird. Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgemeinschaft für Leberfibrose und portale Hypertension für die herzliche Aufnahme und die sowohl fachlich als auch menschlich bereichernde Zeit, namentlich bei Robert Schierwagen, Dr. Fernando Magdaleno, Gudrun Hack und Silke Bellinghausen.

Nicht genug kann ich meiner Familie danken, die nicht nur in der Zeit der Promotion meine größte Stütze war und ist: in ganz besonderer Weise mein Großvater Peter Lenk, meine Eltern Birgit und Reinhold Glückert sowie mein Bruder und Vorbild Patrick Glückert.

Ich danke Pirmin Zöhler für sein Verständnis und seine permanente Motivierung sowie all meinen Freunden und Freundinnen inklusive Mitbewohnern und Mitbewohnerinnen, die die alltäglichen Höhen und Tiefen mit mir teilten.