

Auswirkung von Atorvastatin auf die hepatische Fibrogenese bei gallengangsligierten Ratten

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

Khan Wali Shir
aus Kabul/Afghanistan

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Heller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.02.2013

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Prof. Dr. med T. Sauerbruch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Leberfibrose: Definition und Epidemiologie	7
1.2 Anatomie und Physiologie der Leber	9
1.3 Pathophysiologie der Leber	10
1.3.1 Fibrosierung der Leber	10
1.3.2 Aktivierung der hepatischen Sternzellen	12
1.3.3 Bindegewebsvermehrung	16
1.3.4 Fibrolyse in der Leber	16
1.3.5 Die monomeren GTP-asen	17
1.4 Statine	19
1.4.1 Statin-Klassen und pharmakokinetische Parameter von Statinen	19
1.4.2 Pleiotrope Wirkungen von Statinen	21
2. Fragestellung	23
2.1 Prophylaktische Gabe von Atorvastatin	23
2.2 Behandlung mit Atorvastatin in unterschiedlichen zeitlichen	23
Abständen nach BDL	23
2.3 Effekte von Atorvastatin in weit fortgeschrittener Leberfibrose	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Tiere	24
3.1.1 Gallengangsligatur zur Fibroseinduktion	24
3.1.2 Behandlung der Tiere mit Atorvastatin	24
3.1.3 Probenahme und Probenaservierung	27
3.1.4 Gewebshomogenisierung, Proteinbestimmung, Probenvorbereitung	27
3.2 Westernblotting	28
3.3 Hydroxyprolintest	29
3.4 Histologie	31
3.4.1 Sirius-rot Färbung	31
3.4.2 Immunhistochemie von α -SMA	31
3.4.3 Morphometrie	32
3.5 Quantitative RT-PCR	33
3.6 MMP-2-Zymographie	34
3.7 Caspase-3 Aktivitätsbestimmung	35
3.8 Evaluation der hepatischen Inflammation, TUNEL Assay, Immunhisto-chemie	35

3.9. Statistische Analysen	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Allgemeine Charakteristika und biochemische Parameter	37
4.2 Fibrose- und Myofibroblastenakkumulation nach BDL	39
4.2.1 Fibrosierung und Myofibroblastenakkumulation nach prophylaktischer Behandlung mit Atorvastatin (Gruppe P).....	39
4.2.2 Fibrosierung und Myofibroblastenakkumulation nach therapeutischer Gabe von Atorvastatin im fortlaufenden Fibrosierungsprozess (Gruppe T).....	41
4.3 Profibrotische Faktoren in der Therapie mit Atorvastatin (Gruppe T)	45
4.4 Auswirkung von Atorvastatin auf Myofibroblasten in ausgeprägter Fibrose (Gruppe T5).....	47
4.4.1 Hepatische und Myofibroblastenproliferation	47
4.4.2 Hepatische und Myofibroblastenapoptose	49
4.4.3 Hepatische Inflammation.....	51
5. Diskussion.....	53
6. Zusammenfassung.....	58
7. Literaturverzeichnis	59
8. Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammonium- Persulfat
AST (=ASAT)	Aspartat –Aminotransferase
BDL	bile duct ligation, Gallengangsligatur
BIS	(N,N' Methylen-) Bisacrylamid
BMP	bone morphogenetic protein
CTGF	connective tissue growth factor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPP	Farnesylpyrophosphat
F-Score	Fibrosescore
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HSC	hepatic stellate cell
GT	Gewebsthromboplastin
HYP	Hydroxyprolin
kDa	kilo-Dalton
MAP	mitogen activated protein
MCP	Monozyten chemotaktisches Peptid
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	matrix metalloproteinase
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PBC	Primär biliäre Zirrhose

PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS-T	PBS mit Tween
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PDGF β -R	PDGF β -receptor
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNA	p-Nitroanilin
PP	Pyrophosphat
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RTq-PCR	real time quantitative PCR
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
SMA	smooth muscle actin
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TEMED	(N,N,N',N'-) Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF	transformig growth factor
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TUNEL	<i>T</i> dT-mediated d <i>U</i> TP-biotin <i>nick</i> end <i>labeling</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Leberfibrose: Definition und Epidemiologie

Die Leberfibrosierung, eine bindegewebige Umwandlung der Leber, stellt die universelle Antwort auf chronische Schädigung der Leber dar und ähnelt in den Grundmechanismen der Wundheilung (Friedman, 1993). Die Ausbildung von Kollagenfasern und bindegewebigen Septen in der fibrotischen Leber beeinträchtigt zwar die physiologisch-anatomische Struktur der Leber, zerstört sie jedoch nicht vollständig. Die Leberzirrhose dagegen ist durch vermehrte Umwandlung der Leberstruktur mit Ausbildung von Regeneratknoten gekennzeichnet. Sie führt zunehmend zu Störung der Mikrozirkulation und der StoffwechsellLeistungen der Leber und stellt das Endstadium aller chronischen Lebererkrankungen dar (Herold, 2006; Classen et al., 2003). Hauptursache für die Leberzirrhose in Deutschland sind chronischer Alkoholabusus und chronisch verlaufende Virushepatitiden (HBV, HCV). Mögliche Ursachen der Leberschädigung werden in der Tab.1 aufgeführt (Zimmermann und Ishak, 1994). Die Leberzirrhose zeigt sich klinisch u. a. durch Ikterus, Gerinnungsstörungen, portalen Hypertonus und Aszites. Ihre Komplikationen (Leberausfallskoma, Ösophagusvarizenblutungen oder Leberzellkarzinom) nehmen oft einen tödlichen Verlauf (Preuss, 2004). Neben dem Verlust an Lebensqualität des Einzelnen stellt die Leberzirrhose in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Neuerkrankungsrate von 250 Fällen pro 100000 Einwohner/Jahr einen beträchtlichen gesundheitsökonomischen Faktor dar (Geork, 2000). Die direkten Kosten für die Leistungen wegen chronischer Lebererkrankungen wurden vom Statistischen Bundesamt im Jahre 1994 auf 1 Milliarde Euro beziffert (Robert Koch Institut und Statistisches Bundesamt, 2003).

Toxisch	Alkohol, Medikamente (z.B. Isoniazid, Methyldopa, Paracetamol), Chemikalien (z.B. CCl ₄)
Erregerbedingte, chronische Infektionen	Hepatitis (HBV, HCV), Schistosomiasis
Autoimmun	Autoimmunhepatitis, PBC, PSC, Overlap-Syndrom,
Biliäre Obstruktionen	Sekundär biliäre Zirrhose, PSC, Zystische Fibrose, Alagille-Syndrom
Hereditäre Stoffwechselerkrankungen	Hämochromatose, Morbus Wilson, Zystische Fibrose (α -1-Antitrypsin-Mangel), Glykogenspeicherkrankheiten Typ III-IV, Galaktosämie, Hereditäre Fruktoseintoleranz, Tyrosinämie Typ I
Kardiovaskulär	Cirrhose cardiaque (bei chronischer Rechtsherzinsuffizienz), Pericarditis constrictiva, Budd-Chiari-Syndrom, „Venocclusive disease“
Sonstiges	Sarkoidose, NASH (nicht alkoholische Steatohepatitis)
Kryptogen	Unbekannt

Tab. 1: Mögliche Ursachen der Leberfibrose und -zirrhose

1.2 Anatomie und Physiologie der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Sie nimmt an der Synthese und dem Abbau von Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten teil und ist für die Produktion der Galleflüssigkeit verantwortlich. Daneben dient sie als Vitaminspeicher und greift in das Immun- und Hormonsystem ein. Mikroanatomische Bauelemente der Leber sind die Leberläppchen. Diese werden von radiär auf die Zentralvene zulaufenden Hepatozytenbalken und strukturierenden Bindegewebsanteilen gebildet. Zwischen den Leberzellbalken spannt sich ein dichtes Kapillarnetz auf, welche die Lebersinusoiden bilden (Abb.1A). In den Sinusoiden vereinigt sich das von der A. hepatica und der V. portae herangeführte Blut. Sie sind von Endothelzellen ausgekleidet, die im Gegensatz zu anderen Endothelzellen keine Basalmembran, jedoch große Poren (fenestrae) zwischen den Zellen besitzen (Junqueira et al., 2001). Hierdurch entsteht eine unmittelbare Verbindung zwischen den Sinusoiden und dem Disse-Raum, der zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten liegt. Im Disse-Raum befinden sich die hepatischen Sternzellen (HSC). Diese Zellen sind in der gesunden Leber für die Vitamin-A-Speicherung, Kontrolle des sinusoidalen Blutflusses, Prozessierung und Präsentation von Antigenen und für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich (Gressner und Weiskirchen, 2006). Durch die zahlreichen zytoplasmatischen Ausläufer der HSC liegen sie mit den Hepatozyten und den Endothelzellen in enger Nachbarschaft. Dies ermöglicht die Beeinflussung der HSC durch eine Vielzahl parakriner Mediatoren (Ueno et al., 1997).

Ferner stellen die HSC die Hauptquelle der extrazellulären Matrix (EZM) dar. Sie befindet sich ebenfalls im subendothelialen Disse-Raum. Die EZM besteht vor allem aus nichtfibrillärem Kollagen (Typ IV, VI, XIV) [4], Glykoproteinen (Fibronectin, Laminin, Tenascin, Undulin), Proteoglykane und Glykosaminoglykane (Hyaluronan) (Gressner und Bachem, 1995). Die EZM dient einerseits dem mechanischen Zusammenhalt des Leberzellparenchyms, andererseits steuert sie die Differenzierung, Migration und Proliferation der mit ihr wechselwirkenden Zellen. Die extrazelluläre Matrix ist somit unerlässlich für die Aufrechterhaltung der verschiedenen Funktionen der Leber (Friedman, 2000; Schuppan et al., 2001).

In der gesunden Leber existiert ein Gleichgewicht zwischen der Synthese der EZM (Fibrogenese) und dem enzymatischen Abbau der EZM (Fibrolyse). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs- Tissue inhibitors of metallo proteinases)

sorgen in der gesunden Leber für ein Gleichgewicht im Auf- und Abbau der EZM. Die Proteasen (MMPs) bauen auf der einen Seite die EZM ab. Ihre Inhibitoren sorgen auf der anderen Seite für eine Hemmung des Abbaus und somit für die Akkumulation des EZMs (Arthur, 1994, 1995a, 1995b). Sowohl die MMPs als auch die TIMPs werden von HSC, Makrophagen, portalen Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten sezerniert.

1.3 Pathophysiologie der Leber

1.3.1 Fibrosierung der Leber

Die pathophysiologischen Vorgänge in der Fibrosierung weisen in verschiedenen Organen (Lunge, Haut, Niere und Pankreas) zahlreiche Parallelen auf (Atmas, 2002; Phan, 2002; Schuppan et al., 2000). Hauptmerkmal der Fibrose ist die übermäßige Bindegewebsbildung und -akkumulation, die bis zum 6-fachen des Ausgangswertes betragen kann (Classen et al., 2003). Alle der über 20 verschiedenen Kollagentypen sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut. Weiteres gemeinsames Merkmal sind stabförmige tripelhelikale Abschnitte, deren Anteil zwischen den verschiedenen Kollagenen variiert. Insbesondere fibrilläre Kollagene, wie sie bei der Fibrose auftreten, verfügen über einen hohen tripelhelikalen Anteil (Gardner et al., 2007). Wesentliche Bausteine des Kollagens sind die Aminosäuren Glycin sowie Prolin und Hydroxyprolin (HYP). Hydroxyprolin ist durch seine Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Polypeptidketten einzugehen, essentiell für die Strukturfunktion tripelhelikaler Kollagene (Löfler, 2003). Während Glycin und Prolin in vielen Proteinen vertreten sind, kommt Hydroxyprolin fast ausschließlich nur im Kollagen vor. Im Zuge der Fibrogenese findet man in der Leber eine deutliche Zunahme der extrazellulären Matrix. Die EZM verdichtet sich unterhalb des sinusoidalen Endothels zu einer sog. Pseudomembran und verschließt die Fenestrierung der Sinusoiden (Abb. 1B). Hauptverantwortlich für diese Vermehrung von Kollagen in der Leber sind die hepatischen Sternzellen. Damit stellt die Aktivierung der Sternzellen und ihre Transdifferenzierung zur Kollagen produzierenden Myofibroblasten das Schlüsselereignis der Leberfibrose dar (Friedman, 2000; Reeves und Friedman, 2002; Gressner und Bachem, 1990).

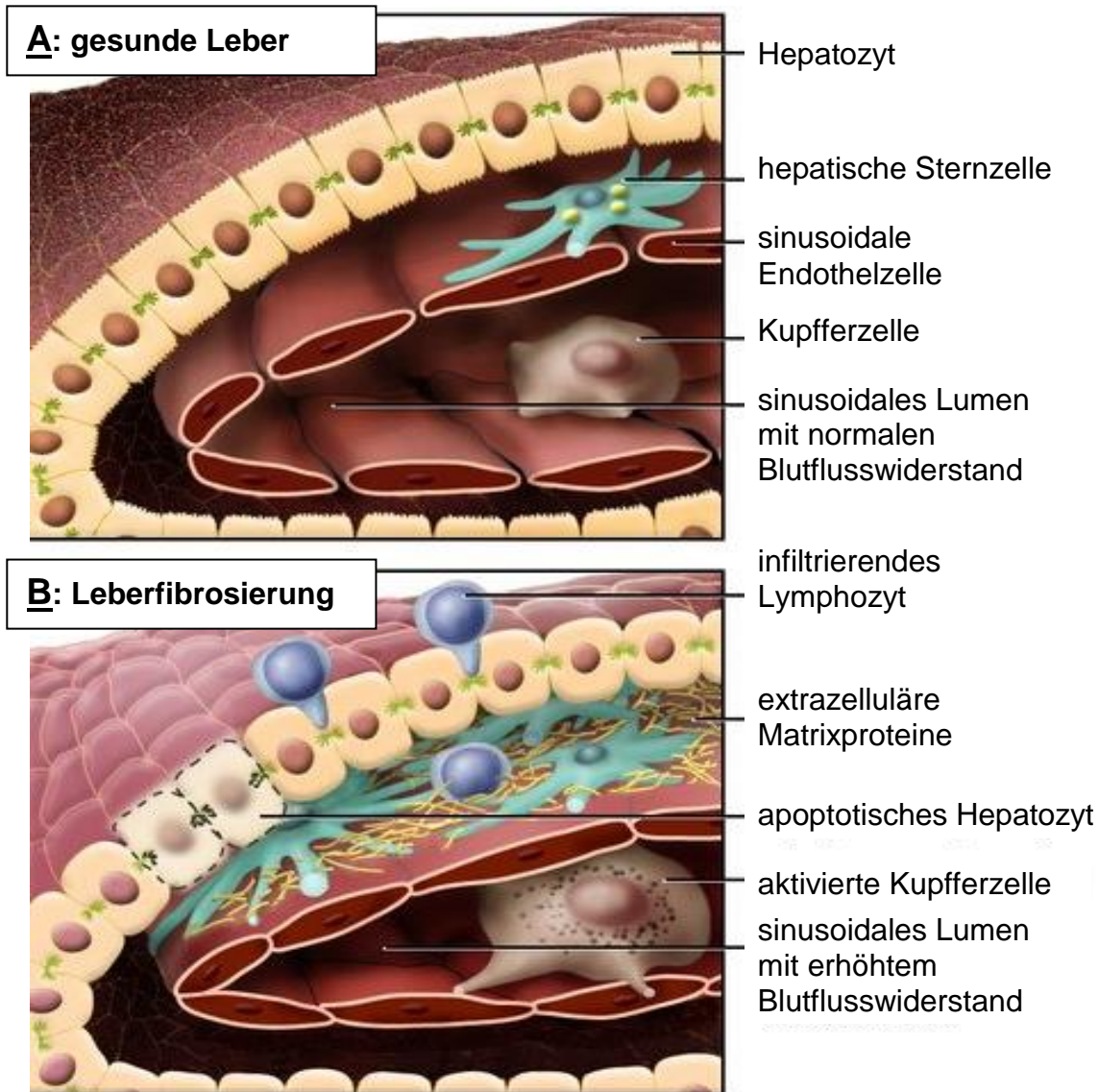


Abb. 1: Pathomechanismen fibrosierender Lebererkrankungen:

Teil A zeigt gesundes Lebergewebe.

Teil B zeigt fibrotische Veränderungen. Die Aktivierung der ruhenden hepatischen Sternzelle zum Kollagen produzierenden Myofibroblasten führt zur vermehrten Synthese und vermehrten Ablagerung der EZM. Es kommt zur Einengung des Sinusoidalraumes und damit zur Erhöhung des intrahepatischen Blutflusswiderstandes.

Modifiziert aus: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15690074>

1.3.2 Aktivierung der hepatischen Sternzellen

Die chronische Schädigung von Hepatozyten führt zur Aktivierung der Lebermakrophagen (Kupfferzellen) und Rekrutierung von Entzündungszellen (Monozyten, Granulozyten) sowie Thrombozyten aus dem Blut (Armbrust und Ramadori, 1995). Die letztgenannten Zellen, Endothelzellen, aber auch geschädigte Hepatozyten sezernieren eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine. (Abb. 2). Insbesondere transforming growth factor (TGF- β 1), platelet derived growth factor (PDGF) und connective tissue growth factor (CTGF) zählen zu den wichtigsten Mediatoren, die zur Aktivierung der Sternzelle führen. Die Sternzellaktivierung wird eingeleitet und unterhalten durch autokrine und parakrine Zytokinstimulation (Gressner und Bachem 1995; Ramadori und Armbrus, 2001; Gressner, 1995; Hellerbrand et al., 1999). Die Sternzelle verliert ihre natürlichen Funktionen und transformiert zum kontraktilen, Kollagen produzierenden Myofibroblasten (Friedman, 2000). Der gesamte Prozess der Sternzellaktivierung lässt sich in zwei Phasen einteilen:

1. Initiationsphase:

Bei der Initiation handelt es sich um einen Vorgang, der oft auch als präinflammatorisch bezeichnet wird. Dabei wird durch frühe Umstellungen in Genexpression und Phänotyp das Ansprechen der Zellen auf Zytokine und andere Stimuli verändert (Li und Friedman, 1999). Durch eine chronische Leberzellschädigung werden von allen Zelltypen der Leber parakrine Mediatoren freigesetzt. So setzen geschädigte, apoptotische Hepatozyten vor allem lipidische Peroxide und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei (Gressner 1995). Endothelzellen sezernieren unter toxischen Einflüssen eine Splicevariante des zellulären Fibronektins in den Disse-Raum. Diese und weitere frühe und subtile Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen zur Sternzellaktivierung bei. Aus Entzündungszellen wird PDGF freigesetzt, der als wichtigster Mediator die Proliferation der Sternzellen induziert. Die Kupfferzellen sezernieren ebenfalls Zytokine (TGF- β , PDGF, CTGF) und freie Radikale (ROS) (Li und Friedman, 1999; Siegenthaler, 2001).

2. Perpetuationsphase:

In der Phase der Aufrechterhaltung (Perpetuationsphase) weisen die aktivierten HSC mehrere phänotypische Veränderungen auf, die sich von den ruhenden HSC unter-

scheiden: Verlust der Retinoide, Proliferation, Fibrogenese, Matrixabbau, Kontraktilität und Chemotaxis.

Die Sternzellen wandeln sich somit von ruhenden, retinoidspeichernden Zellen in kontraktile Myofibroblasten um. Ihre Anzahl ist sowohl in der menschlichen als auch bei experimenteller Leberzirrhose deutlich erhöht.

Während der Aktivierung verliert die HSC ihre typische perinukleäre Retinoid-(Vitamin A) tröpfchen. Das α -SMA, welches ein Bestandteil des kontraktiven Zytoskeletts ist und sich als ein histologischer Marker für die Aktivierung der HSC eignet, wird vermehrt exprimiert (Rockey et al., 1992). Die vermehrte Fibrosierung und Proliferation ist mit steigender Expression von Cathepsin B und D assoziiert (Moles et al., 2009). Cathepsine sind Proteasen, die u.a. am Abbau von extrazellulären Matrix beteiligt sind.

Als wichtigstes Mitogen ist PDGF zu nennen, welches in der Initiationsphase parakrin durch Thrombozyten ausgeschüttet wurde und in der Perpetuationsphase autokrin durch aktivierte HSC sezerniert wird (Wong et al., 1994). Dieser stellt den stärksten Induktor für die Proliferation der HSC dar. Zusätzlich steigt der PDGF-Rezeptorbesatz auf den aktivierten Sternzellen, vor allem die Rezeptoren des Homodimers PDGF-BB.

Die EZM-Produktion ist vor allem durch TGF- β 1 vermittelt, wobei autokrines TGF- β 1 die größte Rolle spielt. Es führt zu einer gesteigerten posttranskriptionalen Expression von Kollagen I durch Sternzellen (Lindquist et al., 2000; Gressner et al., 2002). Gleichzeitig weisen aktivierte Sternzellen eine vermehrte Expression von Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) auf (Benyon et al., 1996). Wenn nun die Inhibitoren der matrixabbauenden Enzyme überwiegen, kommt es zu einer Reduktion der Proteasenaktivität und einer Akkumulation extrazellulärer Matrix. Somit kommt es nicht nur zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix, sondern auch zur Veränderung ihrer Zusammensetzung.

Schließlich wurde auch eine Produktion autokriner Chemokine durch die Sternzellen nachgewiesen, welche eine Infiltration von Leukozyten hervorrufen und somit die Entzündungsreaktion der zirrhotischen Leber weiter fördern. Hier kommt es zusätzlich als Reaktion auf eingewanderte Leukozyten zu einer vermehrten Kollagensynthese durch die Sternzellen.

Des Weiteren wurden proinflammatorische Eigenschaften der Sternzellen nachgewiesen, so zum Beispiel ihre Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Toll-like-Rezeptoren (Knittel et al., 1999; Maher, 2001).

Nach ihrer Aktivierung sind die Sternzellen in der Lage, in Richtung des Verletzungsgebietes zu migrieren. Bei einer Schädigung zentral im Leberazinus kommt es so neben der perisinusoidalen auch zu einer septalen Fibrose. Die Sternzellen reagieren hierbei auf autokrin wirksame Chemokine wie PDGF und Monozyten chemo-taktisches Peptid-1 (MCP-1) (Marra et al., 1998).

Die aktivierten Sternzellen reagieren auf eine Vielzahl konstriktorischer Stimuli (Angiotensin-II, Adrenalin, Endothelin-1) mit überschießender Kontraktion. Somit regulieren sie durch ihre zahlreichen Ausläufer den Gefäßtonus einzelner Sinusoide und führen dadurch zu einer Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes (Rockey, 1997). Damit ist die erhöhte Kontraktilität der Sternzellen ein weiterer entscheidender pathogener Faktor in der Entwicklung des portalen Hochdrucks in der Leberzirrhose. Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, was im Falle einer möglichen Rückbildung der Leberfibrose mit den Sternzellen geschieht. Nachweislich reduziert sich die Anzahl aktivierter Sternzellen im Verlauf der Restitution. Mögliche Schicksale sind die Rückkehr zum Ruhetyp, Zellzyklusarrest (Seneszenz) oder die Elimination der Zellen durch den programmierten Zelltod (Apoptose) (Li und Friedman, 1999; Krizhanovsky et al., 2008).

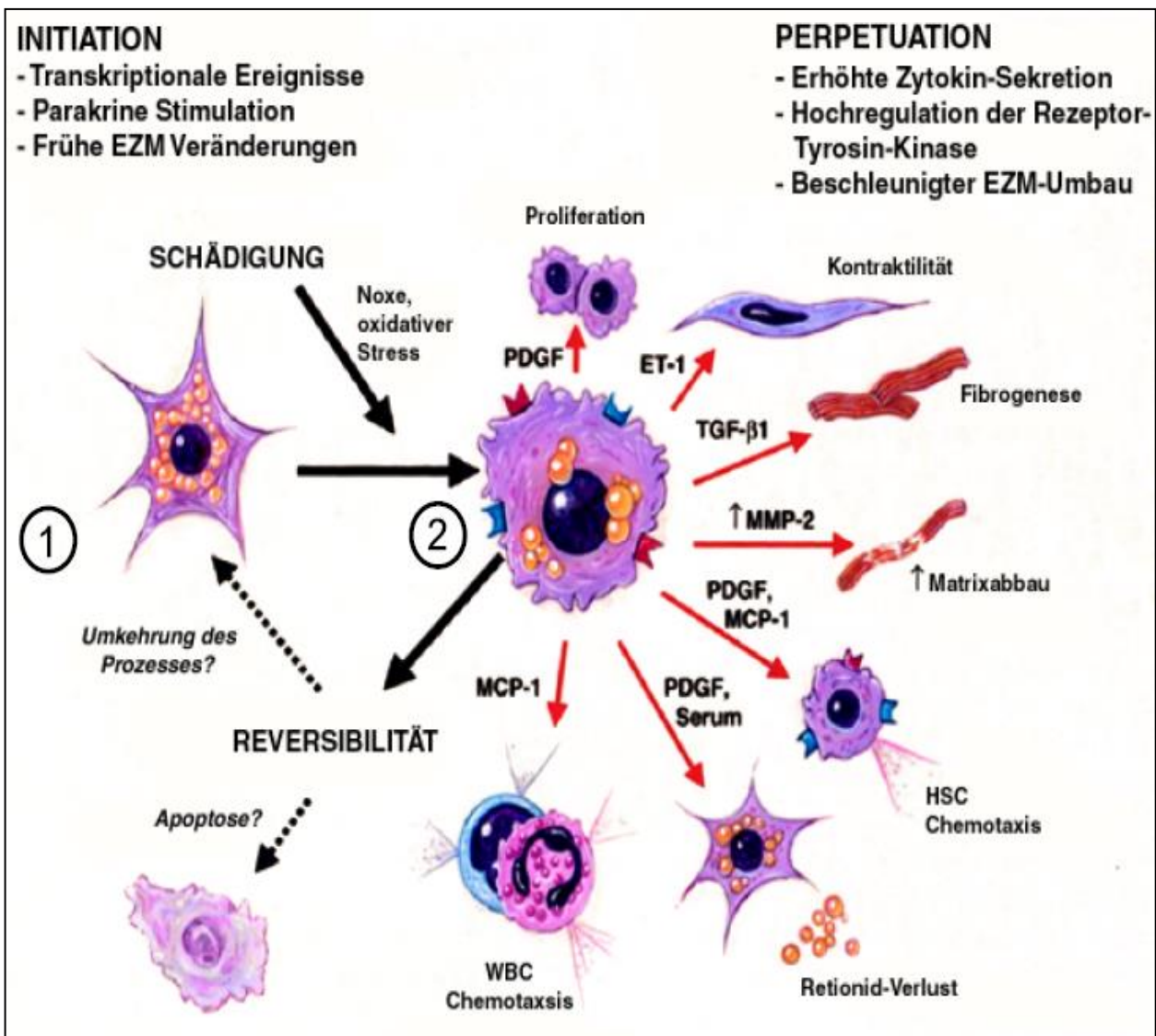


Abb. 2: Pathophysiologische Mechanismen und phänotypische Effekte der Sternzellaktivierung (nach Friedmann, 1999). Ausgelöst durch Parenchymzellschädigung kommt es bei oxidativem Stress zur Stimulation der Kupferzelle, die mit Hilfe verschiedener Mediatoren Einfluss auf die Sternzellendifferenzierung nimmt. Reguliert wird dieser Prozess durch parakrine und autokrine Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Die Sternzelle verliert ihre Funktion als Vitamin-A-Speicherzelle und transformiert zum kontraktilen, Kollagen produzierenden Myofibroblasten. Neben der Fähigkeit zur Proliferation kann sie zudem mittels Zytokinen Leukozyten anlocken (Chemotaxis)

1: ruhende Sternzelle

2: aktivierte Sternzelle:

PDGF = Plättchen-Wachstumsfaktor, ET = Endothelin, TGF = transformierender Wachstumsfaktor, TNF = Tumor-Nekrosefaktor, IGF = insulinähnlicher Wachstumsfaktor, MMP = Matrix Metalloproteinase, MCP = Monozyten chemotaktisches Protein, WBC= white blood cells = Leukozyten.

1.3.3 Bindegewebsvermehrung

Im Disse-Raum lagern sich im frühen Erkrankungsstadium fibrilläre Kollagene vom Typ III und V sowie das Glykoprotein Fibronectin ab. Später überwiegen Kollagene vom Typ I und IV, und es kommt zur vermehrten Einlagerung von Hyaluronan, Laminin, Elastin, α -SMA und Proteoglykanen (Schuppan 1990). Im Gefolge dieses Prozesses bilden sich portoportale und portozentrale Bindegewebssepten. Die Portalfelder sind verbreitert und fibrosiert. Die Veränderung der Architektur der hepatischen Lobuli führt zu einer erheblich verlängerten Transit- bzw. Diffusionsstrecke zwischen Blut und Hepatozyten, verbunden mit Störungen der Clearance v.a. makromolekularer Substanzen (Popper und Kent, 1975). Außerdem erhöht diese Fibrosierung des Parenchyms mechanisch den Flusswiderstand innerhalb der Leber und trägt insofern zur Entwicklung des portalen Hypertonus bei. Es entwickeln sich hepatozelluläre Regeneratknoten unterschiedlicher Größe, so dass man zirrhotische Umbauvorgänge makromorphologisch in kleinknotige und grobknotige Leberzirrhosen untergliedern kann.

1.3.4 Fibrolyse in der Leber

Unter Fibrolyse versteht man den Abbau der extrazellulären Matrix. In der gesunden Leber werden Konstanz und Funktion der EZM durch eine Balance zwischen Synthese und Abbau der Matrixproteine gesichert. Verantwortlich für die Fibrolyse sind Matrix-Metalloproteinasen (v. a. MMP-3 und -9). Sie sind eine Familie neutraler Proteasen, die Zinkionen für ihre Aktivität benötigen. Es werden drei Gruppen unterschieden: 1. Kollagenasen, die das fibrilläre Kollagen (Typen I, II und III) umsetzen, 2. Stromelysin, das mit geringer Substratspezifität Proteoglykane, Laminin, Gelatine u.a. abbaut und 3. Gelatinasen, die das Basalmembran-Kollagen (Typ IV und V), Gelatin, Fibronectin und Elastin metabolisieren. Die MMPs werden von Fibroblasten, HSC, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert (Arthur, 1994; Arthur, 1995a, 1995b). Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wird über die Steuerung ihrer Gentranskription und durch spezielle Gewebsinhibitoren (Tissue Inhibitors of Metallo proteinase = TIMPs) reguliert, die besonders ihre Aktivität hemmen. Vermindert wird die Aktivität der Proteasen auch durch Glukokortikoide, Retinoide und TGF- β . TGF- β reguliert die Synthese von Kollagenase, Stromelysin, Elastase, des Plasminaktivators und anderer am Abbau der Matrix beteiligten Proteasen herunter (Edwards et al., 1987). Somit ist eine Hemmung der Fibrolyse zum einen durch eine Senkung der Expression von MMPs und

zum anderen durch eine erhöhte Synthese spezifischer Inhibitoren der MMPs bedingt (Yoshiji et al., 2000) (TIMP-1 und TIMP-2 sowie LIPMs= Large Inhibitor of Metallo Proteinases). TIMP-1 hemmt vor allem die interstitielle Kollagenase und wird nach der Transformation der hepatischen Sternzellen (HSC) in Myofibroblasten vermehrt produziert und sezerniert (Iredale et al., 1992; Iredale et al., 1994; Iredale und Arthur, 1994); TIMP-2 hemmt die Gelatinase. Bei chronischer Schädigung der Leber kommt es parallel zur erhöhten Produktion der extrazellulären Matrix auch zu einer Hemmung der Fibrolyse, so dass die EZM unkontrolliert, kontinuierlich und verdrängend an Größe zunimmt.

1.3.5 Die monomeren GTP-asen

Die monomeren GTP-asen RhoA, Ras und Rac sind für die Migration, Proliferation und Hypertrophie von Fibroblasten und glatten Muskelzellen erforderlich, und dadurch entscheidend in der Fibrogenese verschiedener Organe beteiligt (Fuller et al., 1998; Hunter et al., 1995; Hassanain et al., 2005; Becker et al., 2001; Watts et al., 2006). Die Rezeptorvermittelte RhoA-Aktivierung geht mit einem Austausch von GDP zu GTP an RhoA und einer Translokation des Proteins zur Membran einher. Für die Membranverankerung und nachfolgende Aktivierung von RhoA werden Geranylgeranyl-Pyrophosphate (Isoprenoide) benötigt. RhoA aktiviert daraufhin mehrere Signalwege, u.a. die Rho-Kinase (ROK-2). ROK-2 hemmt schließlich die Myosin-light-chain-Phosphatase (MLCP) und führt so zur Kontraktion der glatten Muskelzelle. Unsere Arbeitsgruppe hat diesen Signalweg in HSC erfolgreich durch Statine hemmen können (Trebicka et al., 2007).

Ferner reguliert RhoA die Expression von profibrotischen parakrinen Faktoren (Park et al., 1999; Eberlein et al., 2001; Watts et al., 2004). Ras ist in der Proliferation von Zellen maßgeblich beteiligt und Rac - ein kleines GTP-bindendes Protein aus der RhoA-Familie- steigert über die Aktivierung der NADPH-Oxidase in HSC die Produktion von ROS (reactive oxygen species). Dies führt dann zur Proliferation der Sternzellen und zur vermehrten Kollagensynthese (Choi, 2006). Die Isoprenoide Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) sind Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese. Sie sind einerseits Vorläufermoleküle von Cholesterin und andererseits dienen sie als Membranlipidanker für GTPasen. Die Isoprenoide entstehen über mehreren Schritten aus mehreren Acetyl-CoA. Die geschwindigkeitsbestimmende

Schlüsselreaktion der Cholesterinbiosynthese wird dabei von der 3-hydroxy-3-methylglutary-Coenzym-A- Reduktase (β -HMG-CoA-R) katalysiert (Rombouts et al., 2003; Goldstein und Brown, 1990; Van Aelst et al., 1997; Hall, 1998; Laufs und Liao, 1998; Laufs et al., 1998; Masterson et al., 2006) (Abb. 3).

Die Hemmung der β -HMG-CoA-Reduktase durch Statine führt zu einem Produktionsstopp der Isoprenoiden, verhindert die Membranassoziation und damit die Aktivierung der kleinen monomeren GTPasen (Rombouts et al., 2003; Trebicka et al., 2007, Takemoto et al., 2001)

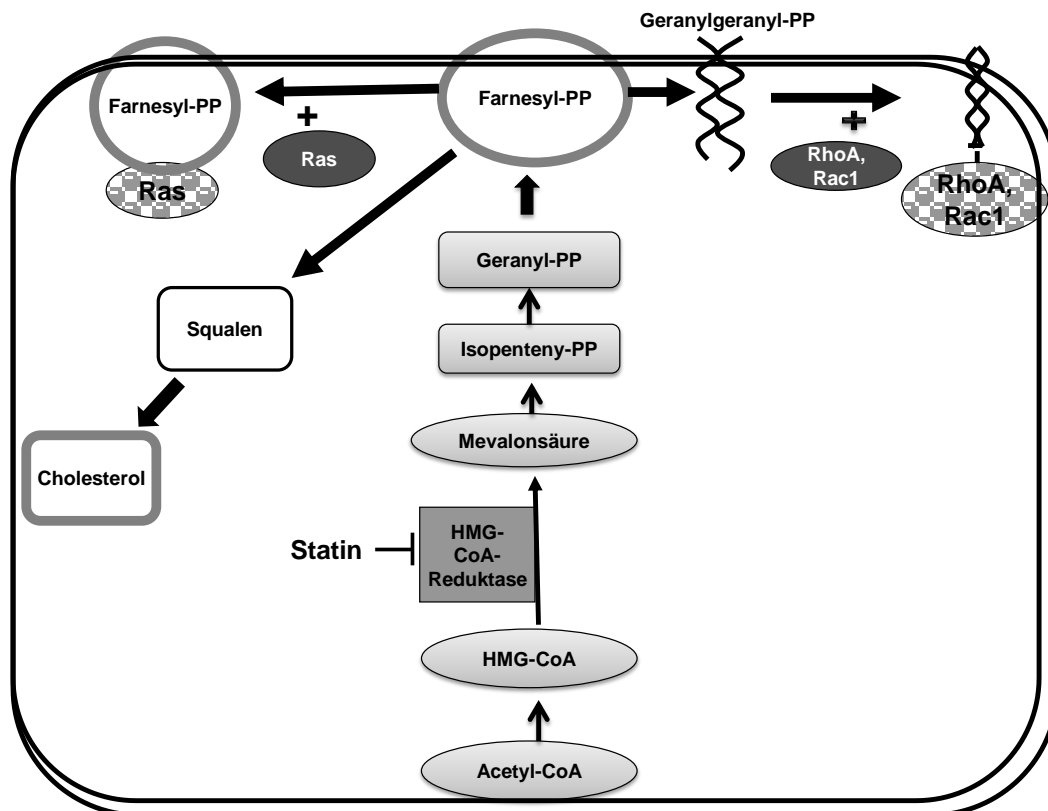


Abb. 3: Nach ihrer Membranassoziation initiieren die kleinen GTP-asen (Ras, RhoA, Rac) in unterschiedlichen Zellen mehrere Prozesse wie Migration, Proliferation, Hypertrophie, Proteinsynthese, Genexpression und EZM-Produktion. Dies sind Vorläuferprozesse der Fibrose. Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase und führen durch Mangel an Isoprenoiden (Farnesyl-PP, Geranylgeranyl-PP) zur Hemmung der kleinen GTP-asen, ihrer Membranassoziation und folglich zur Hemmung ihrer Aktivierung.

1.4 Statine

Statine senken den Cholesteringehalt durch eine Inhibition der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Zusätzlich zu ihrer Hauptwirkung führt die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase auch zur verminderten Synthese von Zwischenprodukten der Cholesterinsynthese, insbesondere der beiden Isoprenylderivate Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) (Goldstein und Brown, 1990). Diese dienen unter anderem als Lipidanker für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle (wie die GTPasen Rho, Ras, Rac) (Jackson et al.; 1997). Die Reduktion ihrer Synthese beeinträchtigt die Membranassoziation verschiedener Effektoren (Abb.3). Zahlreiche In-vitro Studien deuten darauf hin, dass die nichtlipidsenkenden, auch pleiotrop genannten Effekte der Statine auf diesem Mechanismus beruhen (Liao, 2002; Laufs und Liao, 2003; Bi et al., 2004; Danesh und Kanwar, 2004; Liao und Laufs, 2005; Lahera et al., 2007).

Zwischen den einzelnen Statinklassen bestehen pharmakokinetische Unterschiede (Lipophilie, Metabolismus, äquipotente Dosis, Interaktionen (Tab. 2)), es zeigen sich jedoch keine pharmakodynamische Unterschiede ((Wirkmechanismus, Wirkprofil, Dosis-Wirkungs-Beziehung (Igel et al., 2002))). Möglicherweise ist die Lipophilie der Hauptdiskriminator für pleiotrope Effekte.

1.4.1 Statin-Klassen und pharmakokinetische Parameter von Statinen

Fünf Statine (Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin und Simvastatin) sind aktuell rezeptierbar, zwei weitere (Pitavastatin, Rosuvastatin) befinden sich in der klinischen Prüfung oder sind in anderen Ländern zugelassen. Cerivastatin (Lipobay®) ist 2001 vom Markt genommen worden, da seine Einnahme zusammen mit Fibraten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen (Rhabdomyolyse und Nierenversagen) führte (Deutsches Ärzteblatt, 2004).

Für unsere Studie wählten wir Atorvastatin, da es sich besonders durch einen schnellen Wirkungseintritt und hohe hepatische Anreicherung kennzeichnet.

	Atorva- statin	Prava- statin	Simva- statin	Fluva- statin	Lova- statin	Ceriva- statin	Rosuva- statin	Pitiva- statin	Meva- statin	Kombination mit Statinen			
										Simva- statin + Eziti- mibe	Simv- statin + Niacin	Atorva- statin + Amlo- dipin	Lova- statin + Niacin
<i>Prodrug</i>	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja				
<i>Resorption</i>	30%	34%	60%	98%	30%	>98%	20%	NV					
<i>t_{max} in Stunden</i>	1-2	1-1,5	1,3- 2,4	0,5-1	2-2,4	2-3	3-5	0,8					
<i>Bioverfügbarkeit</i>	12%	17%	5%	20- 30%	5%	60%	20%	80%					
<i>Plasmaeiweiß- bindung</i>	98%	49%	95%	98%	>95%	>99%	90%	96%					
<i>Metabolismus CYP</i>	3A4	-	3A4	2C9	3A4	3A4, 2C9	-	-	3A4				
<i>t_{1/2} in Stunden</i>	14	2,6- 3,2	1,9	1,7-2,8	1-2	1,5-3	13-20	11					
<i>Ausscheidung renal</i>	2%	20%	13%	5%	10%	26- 30%	10%	2%					
<i>Ausscheidung bilär</i>	>95%	71%	60%	95%	83%	70%	90%	>95%					

Tab. 2: Pharmakokinetische Parameter der Statine (Christoph et al., 2003). NV: nicht verfügbar. *t_{max}*: Zeit bis zum Erreichen maximaler Plasmaspiegel. *t_{1/2}*: Eliminationshalbwertszeit. CYP: Cytochrom P450.

1.4.2 Pleiotrope Wirkungen von Statinen

Viele der pleiotropen Effekte lassen sich mit der Hemmung der Synthese der Zwischenprodukte von Cholesterinbiosynthese, insbesondere der beiden Isoprenylderivate FPP und GGPP erklären. So erhöhen Statine die lokale Verfügbarkeit von NO, indem sie die Geranylgeranylierung der GTPase Rho stören. Dadurch vermindert sich die Aktivität der Rho-Kinase, sodass die Expression der Stickstoffoxidsynthase (Laufs et al., 1998) und die Stabilität ihrer mRNA gesteigert wird (Laufs und Liao, 1998). Auch reduziert die verminderte Synthese von Geranylgeranylpyrophosphat die Aktivität der Rac-abhängigen NADH-Oxidase (Wassmann et al., 2001). Statine verstärken den vasodilatierenden Effekt von Acetylcholin (O'Driscoll et al., 1997) und schwächen die vasokonstriktorische Wirkung von Noradrenalin ab (Straznicky et al., 1995). Darüber hinaus vermindern sie die Genexpression des Angiotensin-Typ-1-Rezeptors und somit die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II (Wassmann et al., 2001). Statine reduzieren die Proliferationstendenz vaskulärer glatter Muskelzellen durch Hemmung der nukleären Effekte des PDGFs (Yang et al., 2000) und durch Stillstand des Zellzyklus nach der G1-Phase (Laufs et al. 1999). Dieser antiproliferative Effekt beruht wahrscheinlich auf der Blockade der Isoprenylierung der GTPasen Rho und Ras. Rho ist an der PDGF-induzierten DNA-Synthese vaskulärer Muskelzellen beteiligt, wohingegen Ras den Zellzyklus über die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges (*MAP*= mitogen-activated protein) steuert (Hughes, 1995). Da die Anzahl glatter Gefäßmuskelzellen in arteriosklerotischen Läsionen auch durch Apoptose kontrolliert wird und Statine diesen in Gefäßmuskelzellen induzieren, reduzieren sie die Stärke der Neovaskularisierung sowie der Restenosierung (Guijarro et al., 1998; Falk et al., 1995).

Durch Sekretion proteolytischer Matrix-Metalloproteasen schwächen aktivierte Makrophagen das Plaquedach, was letztlich zur Plaqueruptur führen kann. Statine verbessern die Plaquestabilität durch direkte Hemmung der Expression proteolytischer Matrix-Metalloproteasen (Aikawa et al., 2001). Statine bewirken eine Verringerung der Thrombozytenaggregation, in dem sie die Thromboxan-A₂-Synthese hemmen und die Dichte der Oberflächenproteine CD62 und CD63 reduzieren (Vaughan et al., 2000; Huhle et al., 1999; Alfon et al., 1999). Statine reduzieren die Synthese von Gewebsthromboplastin (GT) durch Hemmung der Geranylgeranylierung von Rho und konsekutiv der Rho-Kinase, die für die Synthese von GT essenziell ist (Eto et al., 2002). Im fibrinolytischen System erhöhen Statine die Expression des Gewebeplasminogenaktivator bis zum

Dreifachen (Essig et al., 1998). Auch hemmen sie die Expression und Aktivität seines Gegenspielers, dem Gewebefibrinolyse-Inhibitor-1 (Isaac-sonn et al., 1994). Statine reduzieren direkt die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in Makrophagen (Pahan et al., 1997) und Monozyten (Ferro et al., 2000) sowie die mRNA-Konzentration der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Endothelzellen (Inoue et al., 2000). Desweiteren wurde eine signifikant geringere CRP-Serumkonzentration durch Statine gezeigt, die auch mit einer geringeren Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse einherging (Downs et al., 1998; Balk et al., 2003; Ridker et al., 1999). Es zeigte sich ein geringeres Risiko für die Entstehung tiefer Beinvenenthrombosen und Lungenembolien bei mit Statinen behandelten Patientinnen (Grady et al., 2000; Ray et al., 2001).

In-vitro-Untersuchungen und auch epidemiologische Daten weisen auf einen Osteoblastenstimulierenden Effekt der Statine hin, welcher dem pathogenetischen Geschehen der Osteoporose entgegenwirkt (Waldman und Kritharides, 2003; Ohnaka et al., 2001). Der neuroprotektive Effekt von Statinen wird auf die positive Beeinflussung des NO-Stoffwechsels (Endres et al., 1998) der Endothelfunktion und der Gerinnung zurückgeführt (Liao, 2003), kann aber auch auf der Plaquestabilisierung mit verminderter Embolierate beruhen (Callahan, 2001, 2003). Erhöhte Cholesterinserumkonzentrationen werden als Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit kontrovers diskutiert (Notkola et al., 1995; Roher et al., 1999; Sparks, 1997). In vitro begünstigt Cholesterin die Bildung von β -Amyloid (Bodovitz und Klein, 1996; Freas et al., 1999; Mizuno et al., 1998) wohingegen Statine dies verhindern (Fassbender et al., 2001).

2. Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit möchte ich die Auswirkung von Atorvastatin bei gallengangs-
ligierten Ratten mit sekundär biliär-induzierten Leberfibrose evaluieren. Im einzelnen
wurden folgende Fragestellungen überprüft:

2.1 Prophylaktische Gabe von Atorvastatin

Kann eine prophylaktische Gabe von Atorvastatin (unmittelbar nach BDL) die hepatis-
che Fibrosierung hemmen oder verzögern?

2.2 Behandlung mit Atorvastatin in unterschiedlichen zeitlichen Abständen nach BDL

Spielt der Zeitpunkt des Behandlungsbeginns mit Atorvastatin an der Effektivität der
Therapie eine Rolle?

Gibt es einen " point of no return" für die Statinbehandlung in der Leberfibrose?

2.3 Effekte von Atorvastatin in weit fortgeschrittener Leberfibrose

Werden die aktivierten HSC in ihrer Funktion und Aktivität durch Statinbehandlung
beeinträchtigt?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem initialem Körpergewicht von 180-200 g herangezogen. Insgesamt bekamen 103 Ratten die unten beschriebene Gallengangsligatur. Davon wurden 51 Ratten mit Atorvastatin behandelt. Als Kontrolle dienten „shamoperierte“ Ratten. Hier wurde, wie unten beschrieben, unter Ketamin-Narkose der Gallengang freipräpariert, jedoch keine Ligaturen gesetzt. Die Haltung erfolgte bei 21 °C mit einem konstanten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei freiem Zugang zu Wasser und Futter. Die Tierexperimente wurden von dem lokalen Komitee für Tierstudien der Bezirksregierung Köln genehmigt (50.203.2BN 22,46/05).

3.1.1 Gallengangsligatur zur Fibroseinduktion

Zur Induktion der sekundär biliären Zirrhose wurde unter Ketamin-Narkose (60 mg/kg KG intramuskulär Ketanest S, 25 mg/ml, Esketamin Hydrochlorid, Parke-Davis GmbH, Pfitzer GmbH, Karlsruhe) nach medianer Laparotomie der Ductus choledochus durch eine doppelte Ligatur mit einem resorbierbaren Faden verschlossen und zwischen den beiden Ligaturen durchtrennt. Muskelschicht und Fell wurden anschließend separat zugenäht (Suturamid Schwarz 3/0, Johnson+Johnson Brüssel, Belgien, Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland). In Folge der Gallengangsligatur kommt es zu einer Cholestase, wodurch die Tiere auf Grund einer resultierenden Entzündung der Leber eine Fibrose und nach ca. 5 Wochen eine sekundär biliäre Zirrhose entwickelt (Batts und Ludwig, 1995).

3.1.2 Behandlung der Tiere mit Atorvastatin

Atorvastatin wird von der Firma Altromin (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) in Tierfutter zugesetzt. Täglich wurden die Ratten gewogen und bekamen das mit Atorvastatin zugesetzte Futter mit einer Atorvastatin-Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Das Behandlungsschema ist in Abb. 4 zusammengefasst. In Gruppe A sind die Tiere mit der dauerhaften Behandlung dargestellt, d.h. ihnen wurde direkt nach der Ligatur das Atorvastatinfutter zugesetzt und die Behandlung wurde bis zu Organentnahme ohne Unterbrechung fortgeführt. Die Ratten der Untergruppen P1, P3 und P5 wurden jeweils 1, 3 und 5 Wochen mit Atorvastatin behandelt bevor ihnen die Organe entnommen wurden. Parallel dienten in entsprechender Anzahl

gallengangsligierte Ratten ohne Atorvastatinbehandlung als Kontrolle. Die Kontrolltiere wurden mit normalem Tierfutter ernährt. Die Tiere der Gruppe B wurden jeweils 1 Woche mit Atorvastatin behandelt. Dabei hat die Behandlung zu unterschiedlicher Zeit nach der Ligatur begonnen. T1, T2, T3 und T5 präsentieren die Tiere, die 1, 2, 3, bzw. 5 Wochen nach der Ligatur das Atorvastatinfutter für eine Woche bekamen. Zuvor wurden sie wie die Tiere der Kontrollgruppen mit normalem Tierfutter ernährt.

Behandlungsschema mit Atorvastatin (15mg/kg*d)

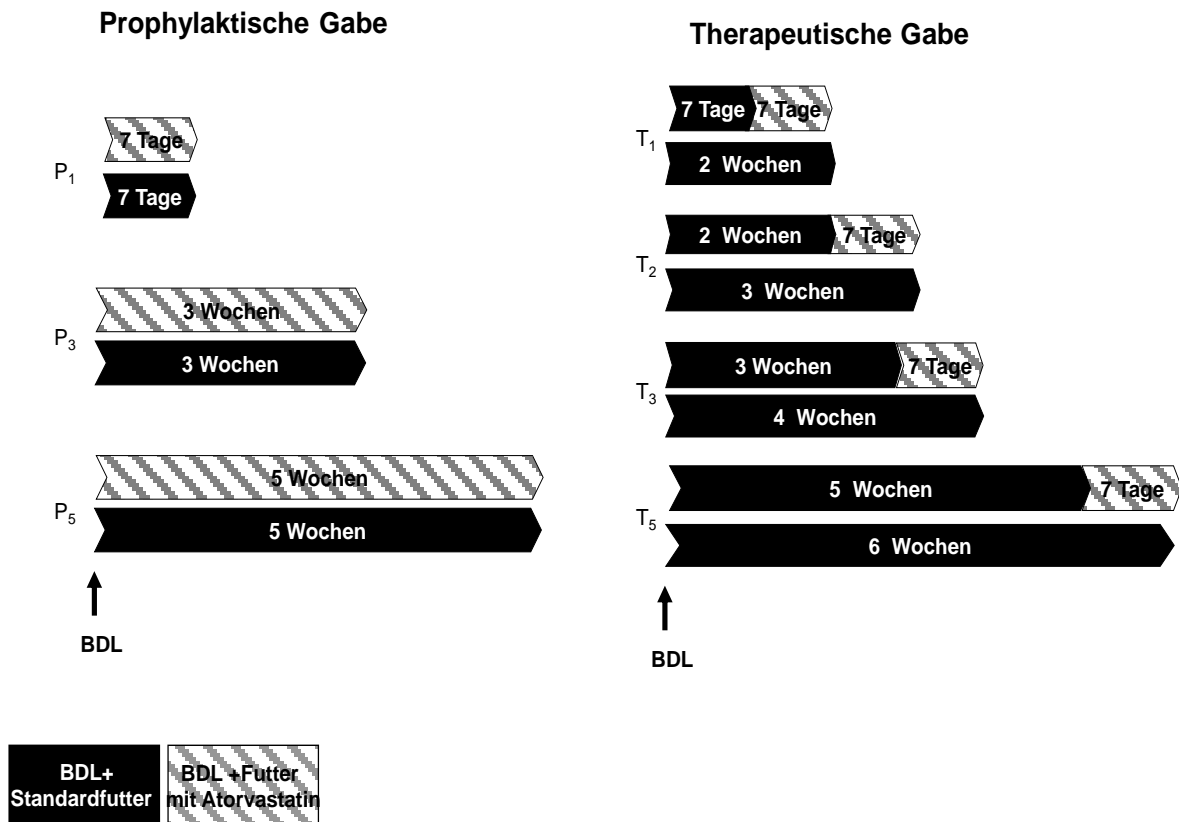


Abb. 4: Experimentelles Design

Jede Untergruppe bestand bei der Organentnahme aus mindestens 6 Tieren. Alle Tiere bekamen ausreichend Leitungswasser zu trinken

Prophylaxe-Gruppe (P): Ratten, die unmittelbar nach der Gallengangsligatur mit Atorvastatinfutter eine (P₁), drei (P₃) und fünf (P₅) Wochen ernährt wurden (schraffierte Balken) und Kontrolltiere, die auch einer Gallengangsligatur unterzogen wurden, jedoch durch normalen Tierfutter ohne Atorvastatin ernährt wurden (schwarze Balken).

Therapie-Gruppe (T): Ratten, die zu unterschiedlicher Zeit, nämlich 1,2,3 und 5 Wochen nach der Gallengangsligatur (entsprechend T₁,T₂,T₃ und T₅) eine Woche lang mit Atorvastatinfutter ernährt wurden (schraffierte Balken) bevor ihnen die Organe entnommen wurden und Kontrolltiere, die auch einer Gallengangsligatur unterzogen wurden, jedoch mit normalem Tierfutter ohne Atorvastatin ernährt wurden (schwarze Balken). In der Zeit zwischen der Gallengangsligatur und der Atorvastatinbehandlung wurden die Tiere mit normalem Tierfutter ernährt.

3.1.3 Probenahme und Probenaservierung

Am Ende der Atorvastatin-Behandlung werden die Ratten unter Ketamin-Narkose median laparotomiert. Die V. cava inferior wird freigelegt und es werden jeweils ca. 1- 2 ml Blut für Serum und Plasma entnommen. Anschließend wird das Blut bei 2 C° in einer Zentrifuge 10 Minuten lang bei 3400 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Serum bzw. Plasma) bei – 80 C° gelagert. Für die histologischen Schnitten (zur Sirius-rot-Färbung) wird eine Leberprobe in Formalin asserviert, die anderen Leberproben werden sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Dabei wird darauf geachtet, dass für das entsprechende Experiment (z.B. Hydroxyprolin) Proben von gleichen Leberläppchen verwendet werden. Die schockgefrorenen Gewebeproben wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 C° gelagert.

3.1.4 Gewebshomogenisierung, Proteinbestimmung, Probenvorbereitung

Das Homogenisieren der Gewebe erfolgte mit einem Potter-Homogenisator (B. Braun, Biotech International) unter Verwendung von Glas-Stempeln. Die frischen Homogenate wurden abzentrifugiert („spin-down“, 5000 U/min, 4 °C, 5 min). Das Homogenisationspuffer bestand aus Tris-HCl-Puffer (25 mM), EDTA (5 mM), PMSF (10 µM), Benzamidin (1 mM) und Leupeptin (10 µg/ml). Die Protein-Bestimmung erfolgte colorimetrisch mit Hilfe des Dc-Assay-Kits (Biorad, München, Deutschland). Das Prinzip des Assays beruht auf dem Lowry-Test. Der Lowry-Test ist eine biochemische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Dabei sind zwei Reaktionen zu unterscheiden: Im ersten Schritt bildet sich ein blauvioletter, quadratisch planarer Komplex zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung (Biuretreaktion). In einem zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Dieses Cu(I) wiederum reduziert das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie bei 700 nm vermessen (Lottspeich et al., 2006; Oliver und Lowry, 1951;). Als Standard dienten BSA-Verdünnungs-Reihen. Die zu bestimmenden Leberproben wurden 1:50 verdünnt, um Messungen im linearen Absorptions-Bereich zu gewährleisten. Um eine gute Lösung der Proteine, die Auflösung von Tertiärstrukturen und die Inhibition von Proteasen zu gewährleisten, wurden die Proteinhomogenate im fertigen SDS-Probenpuffer (Biorad) aufgenommen und bei 95 °C 5 Minuten lang denaturiert.

3.2 Westernblotting

Die Auftrennung von Protein-Gemischen durch SDS-PAGE erfolgte nach Molekülgröße durch das ursprünglich von Laemmli beschriebene Prinzip (Laemmli, 1970). Hierbei macht man sich die gleichmäßige Bindung von SDS an Proteine zunutze (ca. 1,9 mg SDS/mg Protein). Dies führt zu einer verschiedenen starken negativen Beladung der unterschiedlichen Proteine, welche von der Größe des Proteins abhängt. Größere Proteine binden mehr SDS als kleinere Proteine und dadurch laufen größere Proteine in dem Elektrophoresemedium langsamer als Kleinere. Für die zu untersuchenden Proteine (α -SMA, PARP-1, PCNA, Cathepsin-D, Cathepsin-B) wurde ein 10 %iges Polyacrylamid verwendet. Es wurden jeweils 20 μ g Proteine in die vorgemerkten Geltaschen eingetragen; die Gelelektrophorese lief 75 Minuten bei 180 v (Elektrophoresekammer: Mini-Protean, Stromgeber: Elektrophorese Power-Supply). Für die Immunodetektion wurden die Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Nach dem Blotten auf Nitrozellulose-Membranen wurde diese über Nacht in PBS-T (Phosphat-gepufferte Salzlösung + 1 % Tween) mit Milchpulver zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt (4 °C). Nach dem Waschen mit Aqua dest. wurde die Membran mit dem ersten Antikörper für α -SMA (Abcam plc, Cambridge, Großbritannien), PARP-1 (BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland), PCNA oder Cathepsin D (sc-56 und sc-6487, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), oder Cathepsin B (AB4064, Chemicon International/Millipore, Billerica, MA, USA) inkubiert. Nach ca. 2-stündiger Inkubationzeit mit dem ersten Antikörper wurde mit PBS-T gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Danach wurde der korrespondierende zweite, peroxydasegekoppelte Antikörper (Calbiochem, San Diego, USA) zugegeben. Anschließend wurde mehrmals mit PBS-T gewaschen und mit ECL (Amersham, Großbritannien) entwickelt. Zum Visualisieren wurden schließlich in einer Dunkelkammer ECL-Hyperfilme mit den Membranen belichtet, die dann automatisch entwickelt wurden (Kodak-X-omat). Die Intensitäten der resultierten Banden auf jedem Blot wurde densitometrisch mit einem FLA-3000 phosphoimager (Fuji-Film, Düsseldorf) verglichen.

3.3 Hydroxyprolintest

Der hepatische Kollagengehalt wird über die photometrische Quantifizierung der kollagenspezifischen Aminosäure Hydroxyprolin bestimmt. Wie in der Einleitung erwähnt, kommt Hydroxyprolin fast ausschließlich nur im Kollagen vor. Eine Möglichkeit der Quantifizierung von Fibrose kann daher über Messung der Hydroxyprolinkonzentration der Leber als Fibroseparameter erfolgen. Der Hydroxyprolingehalt wurde photometrisch nach Jamall et al. (1981) in Leberhydrolysaten bestimmt. Prinzip der Hydrolysatpräparation ist die saure Hydrolyse, bei der die einzelnen Aminosäuren aus ihrer Proteinbindung gelöst werden. Jeweils 200 mg Leber wurde in 4 ml 6 M HCl (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) in verschließbare hitzestabile Glasröhrchen aufgenommen und mit Hilfe des Potter-Homogenisator unter Verwendung von Glas-Stempeln homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 110 °C (Ofen: Heraeus INSTRUMENTS) wurde das Homogenat filtriert (Papierfilter, Schleicher&Schnell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland). Grundlage der photometrischen HYP-Bestimmung ist die Oxidation des gelösten Hydroxyprolins durch Chloramin-T-Lösung und die Bildung eines Chromophors durch Zugabe von Ehrlichs Reagenz. Folgende Lösungen wurden benötigt: 100 ml 0,84 %ige Chloramin-T-Lösung, die aus 840 mg Chloramin-T, 60,5 ml Chloramin-T-Puffer (42 mM Natriumacetat + 2,6 mM Zitronensäure, pH 6,0) und 39,5 ml 100 %ige Isopropanol bestand. Und eine frisch zubereitete Ehrlich's Reagenz- Lösung, die umgerechnet pro Probe 248 mg 4-Dimethylaminobenzaldehyd, 270 µl 60 %ige Perchlorsäure, 730 µl 100 %ige Isopropanol enthielt. Im Einzelnen wurde wie folgt verfahren: Jeweils 30 µl des Hydrolysats (doppelter Ansatz pro Tier) wurde unter Zusatz von 10 µl Methanol unter N₂ bei 55 °C (Reacti-0 Therm III, Heating/Stirring Module, Pierce, Rockford, USA) in 2-ml Eppis eingetrocknet und anschließend in 1 ml 50 % Isopropanol gelöst. Gleichzeitig wurden ein Standard (zweifacher Ansatz) aus einer Stammlösung aus in Isopropanol (50 %) gelöstem Hydroxyprolin und eine Leerprobe (1 ml 50 % Isopropanol) erstellt. Standard und Leerprobe wurden wie die übrigen Proben gehandhabt. Nach Zugabe von 200 µl Chloramin-T-Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml Ehrlichs Reagenz. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei 50 °C. In dieser Zeit fand abhängig vom Hydroxyprolingehalt eine Farbreaktion von gelb nach rot statt. Die Absorption des Standards und der Proben wurde im Photometer UV-vis Spectrophotometer (UV mini SHIMADZU, Japan) bei 558 nm gegen die Leerprobe gemessen. Für die

Berechnung der einzelnen Hydroxyprolinwerte ergab sich folgende Gleichung: $HYP = A/K \times F$

A = Absorption der Probe

K = Regressionskoeffizient der Standardkurve

F = Faktor der Verdünnung 666,7 (F ergibt sich aus 30 µl Homogenat aus 200 mg Leber in 4 ml HCl).

Die Angabe der Hydroxyprolinkonzentration (HYP) erfolgte als Mittelwert der beiden untersuchten Proben pro Tier in µg/g Lebergewebe.

3.4 Histologie

3.4.1 Sirius-rot Färbung

Lichtmikroskopisch lässt sich Kollagen (Kollagen I und III) durch eine Färbung mit Siriusrot darstellen (Sweat et al., 1964). Die in 10 % Formalin fixierten Leberproben wurden in Parafin eingebettet, geschnitten (~3-5 µm) und auf Objektträgern fixiert. Um eine bessere Haftung der Präparate auf dem Objektträger zu erzielen, wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C im Ofen (Heraeus, Kendro, Hanau) belassen. Nach Auskühlung der Schnitte wurden sie nach folgendem Schema gefärbt. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte je 3 Minuten im Xylolbad belassen und anschließend der absteigenden Alkoholreihe zugeführt. Die jeweilige Verweildauer betrug 3 Minuten. Die Färbung über 30 Minuten erfolgte in 0,1 % Picosirius-Lösung, die jeweils frisch aus 0,1 g Siriusrot F3BA (Typ 1A280, Chroma-Gesellschaft, Münster, Deutschland) in 100 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure angesetzt wurde. Nach Entfernung von Färberesten unter fließendem Leitungswasser für 30 Sekunden wurde den Schnitten in der aufsteigenden Alkoholreihe überschüssiges Wasser entzogen (Konzentrationen entgegen der absteigenden Alkoholreihe, Verweildauer je 3 Minuten). Anschließend verblieben die Schnitte für je 3 Minuten in zwei aufeinander folgenden Xylolbädern. Das Eindecken erfolgte mit dem auf Xylolbasis gelösten Kleber Vitro-Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen). Siriusrot färbt Kollagen I und Kollagen III in kräftigem Rot an, wodurch es sich lichtmikroskopisch zum übrigen blass gelblich-rosa dargestellten Gewebe deutlich abhebt.

Die kollagenenthaltenden Areale wurden auch durch morphometrischen Analysen quantifiziert.

3.4.2 Immunhistochemie von α -SMA

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von Antigenen z.B. an einem histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Das Verfahren wird zur Identifizierung bestimmter Zelltypen, Zellstrukturen oder Zellprodukte angewandt. Grundlage der Immunhistochemie ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Man benutzt dabei zumeist monoklonale Antikörper, also Antikörper, die nur mit einem bestimmten Epitop des Antigens reagieren. In unseren Versuchen wurden für α -SMA die gefärbten Schnitte mit Maus-Anti-SMA (Klon 1A4; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert, der in Tris-Puffer-Salzlösung 60 min. lang 1:600 verdünnt wurde. Danach wurde der mit Biotin konjugierte und in Rattenserum (Dako, Glostrup, Dänemark) absorbierte,

sekundäre Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper angesetzt (Verdünnung: 1:200, Inkubationszeit 45 min) und mit Streptavidin konjugierte Alkalin-Phosphatase verflochten (Verdünnung: 1:200, Inkubation: 45 min, Firma: Dako, Dänemark). Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Schließlich wurden die Schnitte in neuem Fuchsin-Naphtol AS-BI (Sigma-Albrich) entwickelt und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.4.3 Morphometrie

Um die Kollagen enthaltenden Bereiche auf den Leberschnitten zu quantifizieren, wurde eine Punktezähl-Methode durchgeführt. Dafür wurde ein Mikroskop mit Objektisch und halbautomatischen Vorschub verwendet (Gross et al., 1987). Auf den Sirius Rot gefärbten Schnitten wurden jeweils 500 Punkte als Hepatozyten, Gallengängen, Bindegewebe oder Andere eingeteilt. Ebenso haben wir in α -SMA gefärbte Schnitte Subtypen von EZM-produzierenden Zellen quantifiziert. Wir passten die Morphometrie speziell an und stufen die α -SMA positiven Zellen als sinusoidal (typisch aktivierte HSC), periductulär (in direkter Nachbarschaft von Gallengängen bzw. Gallengänge umzingelnd), portal/septal (einschließlich Zwischenräume), und Andere ein (z.B. vaskuläre glatte Muskelzellen). Die morphometrischen Ergebnisse sind als Volumenanteil dargestellt (Anteil von spezieller Auszählung im Verhältnis zur gesamten Zahl der ausgezählten Punkte).

3.5 Quantitative RT-PCR

Das Prinzip der PCR beruht auf einer selektiven enzymatischen Vermehrung eines zwischen zwei Oligonucleotid-Primern gelegenen DNA-Abschnitts, wobei die Primer gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge binden (Knippers, 1997). Eine zyklische Wiederholung von Strangtrennung (Denaturierung), Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Extension) führt zur exponentiellen Zunahme des amplifizierten DNA-Abschnitts. Die RTq-PCR (quantitative Echtzeit-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen (Holzapfel und Wickert, 2007). In unseren Versuchen wurde das RNA aus 30 mg Lebergewebe durch Anwendung von RNeasy kit (Qiagen, Basel, Schweiz) mit DNase (Promega, Wallisellen, Schweiz) isoliert. Anschließend folgte die reverse Transkription mit M-MLV Reverse-Transkriptase (Invitrogen, Basel, Schweiz) gemäß der Arbeitsanweisung des Herstellers. Die quantitative PCR wurde durch das ABI 7700 Sequence- Detektor (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) ausgeführt. Die verwendeten Nukleotid-Sequenzen und die Vermehrungsanzahl sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Gen-Expressionswerte wurden auf der Basis der Δ Ct-Methode (Trebicka et al., 2007) berechnet und auf die Expression von GAPDH genormt. Die Ergebnisse der Leberproben wurden als $-\Delta$ Ct wiedergegeben.

Ziel mRNA	Codes	Sequenz
Rat TGF- β 1	NM_021578	5'-GTCCCAAAGTCGAGGTGAC-3'
Rat TGF- β 2	NM_031131	5'-CCAGGTGCTCTGTGGGTACCT-3'
Rat PDGF- β -R	Z14117.1	5' TGGCCAATGGCATGGAAT 3'
Rat CTGF	NM_022266	5'- TCTCTTCTGCGACTTCCGGCT -3'
Rat procollagen Ia	Rn00801649	5'- CCTAAGGGTGACAGAGGTGATGCTG - 3

Tab. 4: Nukleotid-Sequenzen von RT-PCR Primern und Sonden. Bezogen auf die Ausgangssequenz, ist die Position als 5' Nukleotid vom entsprechenden Primern oder Sonden definiert

3.6 MMP-2-Zymographie

Die Zymographie ist eine elektrophoretische Methode zur Messung der proteolytischen Aktivität von Proteasen und ihren Proenzymen. Sie basiert auf einer Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und dann ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthält das Zymographie-Gel zusätzlich Gelatine, so dass über Nacht inkubierte, Gelatinasen (z.B. MMP-2 oder MMP-9) enthaltende Proben das Substrat enzymatisch abbauen können. Wurde die Gelatine abgebaut, bilden sich in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden, die auf die Aktivität der Gelatinasen hinweisen. In Anlehnung an Watanabe et al. (2001) wurde der Überstand von Leberhomogenat (20 μ g Proteine) der 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unterzogen, wobei das Gel 0,3 % Gelatine enthielt. Die proteolytischen Banden von 62 und 65 kDa entsprechend der aktiven bzw. latenten Form von MMP-2 wurden densitometrisch durch AIDA-Software (Raytest, Urdorf, Schweiz) quantifiziert.

3.7 Caspase-3 Aktivitätsbestimmung

Die Caspase-3-Aktivität stellt einen wichtigen Parameter für die Aktivität der Apoptose in den Zellen dar. Die Aktivität der Leber-Caspase-3 wurde entsprechend der Herstellerleitlinien durch die Ausrüstung der kolorimetrischen Assay gemessen (Axxora, Lörrach, Deutschland). Durch die Spaltung des künstlichen Substrats in dieser Probe fällt p-Nitroanilin ab (pNA), dessen Lichtemission bei 405 nm gemessen wurde. Zur Vorbereitung der Homogenate wurde vorrätiges Lysepuffer verwendet.

3.8 Evaluation der hepatischen Inflammation, TUNEL Assay, Immunhistochemie für Ki-67 und α -SMA

Zur Beurteilung der Inflammation des Lebergewebes wurde die Chloracetatesterase-Färbung durchgeführt, wie sie im Vorfeld von Dinges und Redl beschrieben worden ist (Dinges und Redl, 1983). Die TUNEL-Methode dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Während der Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die an den Bruchenden freiwerdenden Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) werden durch das Enzym TdT mit markierten Nukleotiden versehen, welche z. B. aufgrund von Fluoreszenz mit entsprechenden Mikroskopen sichtbar gemacht werden können (Gavrieli et al., 1992). Für die TUNEL-Färbung und die Immunhistochemie wurden in Formalin fixierten und in Paraffin eingebettete 3 μ m Gewebeschnitten verwendet (Schulte et al., 2009). Die apoptotischen Zellen wurden der Herstelleranweisung folgend entweder durch die Alkalinphosphatase oder durch den FITC (Reaktivfarbstoff) konjugierten TUNEL-Assay von Roche Diagnostics (Mannheim) auffindig gemacht. Um die TUNEL-Färbung mit der Anti- α -SMA Immunhistochemie zu kombinieren, wurden die Objektträger zusätzlich mit anti- α -SMA (Klon 1A4) cy3-gekennzeichneten Antikörpern (1:100) inkubiert (Sigma Aldrich, Hamburg) und dann mit DAPI (Sigma Aldrich) gegengefärbt. Die Exemplare wurden mit Fluoreszenzmikroskop beobachtet und zehn Gesichtsfelder (400-fache Vergrößerung) wurden morphometrisch als Durchschnittswerte der Cell-P Abbildungssoftware (Olympus, Hamburg) bewertet.

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, d.h. er färbt die Zellen im Gewebe an, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht. Die

Färbung für Ki67 gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes. Wie es von Schulte et al. (2009) beschrieben wurde, ist das Ki67 nach der ABC Methode immunhistochemisch gefärbt worden. Nach der Fluoreszenzlöschung endogener Peroxidasen und den Blockierungsschritten wurden die Proben mit Ki67-Antikörpern (Dako, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Danach wurde die Kolo-kalisierung von α -SMA durch die Inkubation von Anti- α -SMA-Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase (ALP) konjugiert wurde, durchgeführt. Die ALP wurde durch Fast-red (ein zu immunhistochemischen Färbung verwendetes Chromogen, welches in Anwesenheit von ALP einen hellroten Niederschlag erzeugt) 30 Minuten lang entwickelt. Die Ki-67 Positivität wurde durch die Peroxidase-Färbung, bei der DAB als Substrat verwendet wurde, visualisiert. Fünf Gesichtsfelder von 100-facher Vergrößerung wurden morphometrisch durch Cell-P software analysiert.

3.9. Statistische Analysen

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) präsentiert. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die Vergleiche zwischen den Gruppen herangezogen. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeine Charakteristika und biochemische Parameter

Das durchschnittliche Körpergewicht der behandelten und der nicht behandelten Gruppen blieb über der gesamten Lebenszeit gleich. Die Mortalität betrug weniger als 15 %, und sie unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Gruppen. Im Vergleich zu den sham-operierten Tieren ließ sich in den gallengangsligierten Tieren ein signifikanter Anstieg der biochemischen Parameter (Bilirubin, ALT, AST) im Serum beobachten (Tab. 5). Die Atorvastatinbehandlung hat keinen Einfluß auf den Anstieg der Laborparameter gezeigt.

Gruppe	Bilirubin (mg/dl)	ALT (U)	AST (U)
Sham	0,2±0,0	62±6	164±11
P1	BDL	8,7±0,7 ^a	129±18 ^a
	BDL+Atorvastatin	11,4±0,7 ^{ab}	143±21 ^a
P3	BDL	8,9±0,8 ^a	126±21 ^a
	BDL+Atorvastatin	10,0±1,4 ^a	212±40 ^a
P5	BDL	7,9±0,7 ^a	123±19 ^a
	BDL+Atorvastatin	6,1±1,1 ^a	239±92 ^a
T1	BDL	9,1±0,7 ^a	144±26 ^a
	BDL+Atorvastatin	12,7±1,9 ^a	237±47 ^a
T2	BDL	7,5±0,5 ^a	87±14 ^a
	BDL+Atorvastatin	9,4±0,7 ^a	128±21 ^a
T3	BDL	8,9±0,8 ^a	126±21 ^a
	BDL+Atorvastatin	8,7±1,7 ^a	118±24 ^a
T5	BDL	7,9±0,7 ^a	123±19 ^a
	BDL+Atorvastatin	8,4±0,4 ^a	142±63 ^a

Tab. 5: Biochemische Parameter, $p < 0,05$ vs. Sham, ^b $p < 0,05$ vs. BDL

4.2 Fibrose- und Myofibroblastenakkumulation nach BDL

Verglichen mit den sham-operierten Ratten verursachte die Gallengangsligatur sowohl einen deutlichen Anstieg des Hydroxyprolinegehalts (Abb. 5A, 6A) als auch einen Anstieg des EZM-Volumenanteils, welches durch die Morphologie der Siriusrot-Färbung dargestellt ist (Tab. 6, Abb. 6B). Parallel dazu ist in den Lebern der BDL-Ratten ein Anstieg der Gesamt- α -SMA-Expression in den Westernblots (Abb. 5B, 7A) und ein massiver Anstieg im Volumenanteil von α -SMA-positiven Zellen in der Immunhistochemie zu sehen (Tab. 6, Abb. 7B). Diese Daten geben die massive Fibrosierung und Akkumulation von Myofibroblasten in den BDL-Ratten im Vergleich zur Sham- Kohorte wieder.

4.2.1 Fibrosierung und Myofibroblastenakkumulation nach prophylaktischer Behandlung mit Atorvastatin (Gruppe P)

Durch die prophylaktische Behandlung der BDL-Ratten mit Atorvastatin wurden die hepatische Fibrosierung und die Myofibroblastenakkumulation (HSC-Aktivierung) im Vergleich zu unbehandelten BDL-Ratten signifikant reduziert. Dies wurde durch die Analysen des hepatischen Hydroxyprolinegehalts und der α -SMA-Expression gezeigt (Abb. 5A, 5B).

Kollagen-Akkumulation in prophylaktisch behandelten Tieren (Gruppe P)

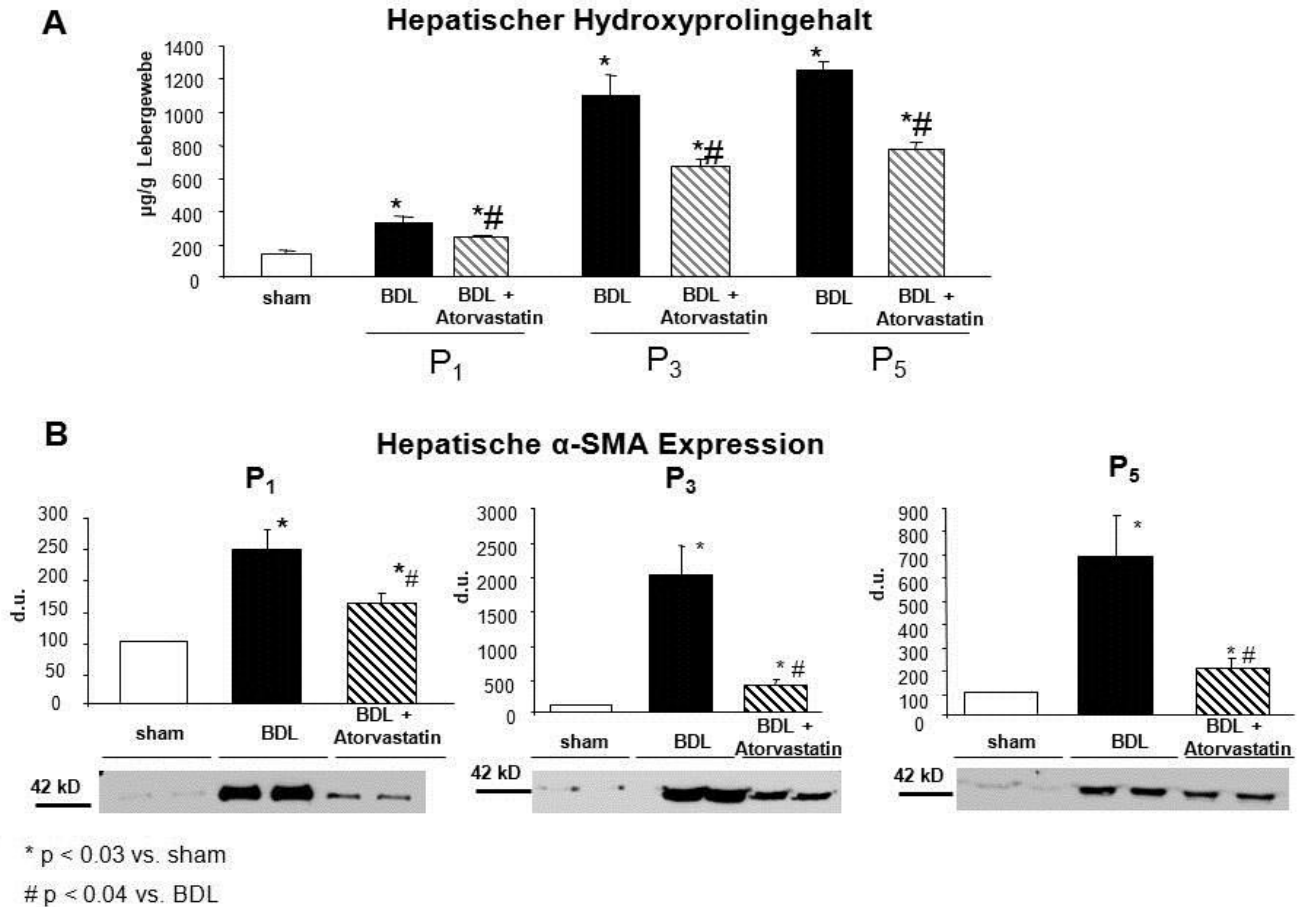


Abb. 5: Auswirkung von prophylaktischer Behandlung mit Atorvastatin (Gruppe P) auf die hepatische Kollagen- und Myofibroblastenakkumulation. Die Kollagenakkumulation war als hepatische Hydroxyprolinegehalt bewertet (A) und die Myofibroblastenakkumulation als Proteinexpression von α -SMA (B). Die Atorvastatinbehandlung begann bei den Ratten unmittelbar nach der Gallengangligatur und dauerte 1 (P₁), 3 (P₃) oder 5 (P₅) Wochen lang (siehe experimentelles Design). Die entsprechenden Kontrolltiere wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, nicht behandelt (jede Gruppe mit einem Minimum von n=6). Die Angaben in A sind Mittelwerte \pm Standardfehler. In Abb. 2B sind repräsentative Westernblots und densitometrische Quantifizierungen gezeigt (Mittelwert \pm Standardfehler, Angaben sind als relative densitometrische Einheiten (d.u.) dargestellt und zum Vergleich zu den sham-operierten Ratten gesetzt, die bei 100 d.u. festgelegt sind). Die unterschiedliche Behandlungsdauer innerhalb jeder Gruppe verdeutlicht die Auswahl der relativen densitometrischen Einheit.

4.2.2 Fibrosierung und Myofibroblastenakkumulation nach therapeutischer Gabe von Atorvastatin im fortlaufenden Fibrosierungsprozess (Gruppe T)

Die einwöchige Behandlung mit Atorvastatin, welche eine bzw. zwei Wochen nach der Gallengangsligatur begonnen hatte (T1 und T2), führte zur signifikanten Reduktion der Fibrosierung, die sich durch den Hydroxiprolingehalt widerspiegelte (Abb. 6A). Verglichen mit deren unbehandelten BDL-Kontrolltieren wurde der Volumenanteil der EZM in den therapeutischen Gruppen T1 und T3 signifikant reduziert (Tab. 6, Abb. 6B).

Verglichen mit den entsprechenden BDL-Kontrolltieren, ist in den therapeutischen Gruppen T1 und T2 die gesamte α -SMA-Expression signifikant reduziert (Abb. 7A). Die Anzahl der sinusoidalen α -SMA-positiven Zellen (entspricht aktivierte HSC) wurde durch Atorvastatin nur in der frühen Therapiegruppe T1 signifikant reduziert (Abb. 7B und Tab. 6). Zusätzlich zu HSC-Aktivierung wurde durch Atorvastatin der Anstieg der periduktalen und portalseptalen α -SMA-positiven Zellen in den therapeutischen Gruppen T1 und T2 gehemmt (Tab. 6). Wenn die Atorvastatinbehandlung drei und fünf Wochen nach der Gallengangsligatur (T3 und T5) begonnen hatte, blieb die Gesamt- α -SMA-Expression in den Westernblots und bei allen Subtypen von α -SMA-positiven Zellen (Immunhistochemie und Morphometrie), verglichen mit den entsprechen unbehandelten Kontrolltieren, unverändert (Abb. 7, Tab. 6).

Interessanterweise verhinderte Atorvastatin signifikant die Reduktion des Hepatozytenvolumenanteils sowohl in der frühen Therapiegruppe T1 als auch in den späteren Therapiegruppen T3 und T5 (Tab. 6). Im Gegensatz dazu verringerten sich die Volumenanteile der Gallengängen in allen entsprechend behandelten BDL-Gruppen, aber statistisch signifikante Unterschiede gab es nur in der Gruppe T3 (Tab. 6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Atorvastatin die EZM und die Myofibroblastenakkumulation in der frühen fortlaufenden Fibrosierungsphase verringert, aber nicht in der fortgeschrittenen Fibrosierungspase. Atorvastatin hemmt den Hepatozytenverlust in der fortlaufenden Fibrosierungspase.

	T1		T2		T3		T4		
	Sham	BDL + AT	BDL + AT	BDL + AT	BDL + AT	BDL + AT	BDL + AT	BDL + AT	
Volumenanteil von:									
Hepatozyten	96,5 ± 4	72,1 ± 2,0 ^a	73,3 ± 1,1 ^{a,b}	65,3 ± 9,7	68,5 ± 6,2 ^a	31,7 ± 3,9 ^a	58,4 ± 9 ^{a,b}	33,6 ± 3,9 ^a	52,1 ± 5,5 ^{a,b}
Gallengänge	0,2 ± 0,1	9,9 ± 0,9 ^a	8,5 ± 0,7 ^b	19,2 ± 5,2 ^a	15,2 ± 3,5 ^a	32,2 ± 2,5 ^a	18,6 ± 3,7 ^{a,b}	19,5 ± 2,7 ^a	14,3 ± 1,1 ^a
EZM	3,1 ± 0,4	18,0 ± 1,5 ^a	14,2 ± 0,6 ^{a,b}	15,5 ± 5,1 ^a	17,1 ± 2,5 ^a	35,7 ± 2,0 ^a	23,1 ± 2,8 ^{a,b}	46,9 ± 1,8 ^a	33,6 ± 5,1 ^a
α – SMA +Zellen:									
periduktulär	0 ± 0	4,5 ± 0,5 ^a	2,5 ± 0,5 ^{a,b}	4,0 ± 1,0 ^a	3,1 ± 0,7 ^a	7,8 ± 1,6 ^a	5,3 ± 1,1 ^{a,b}	4,1 ± 0,6 ^a	4,6 ± 1,1 ^a
portal-septal	0,2 ± 0,1	5,9 ± 1,1 ^a	2,6 ± 0,5 ^{a,b}	4,4 ± 1,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^{a,b}	6,6 ± 1,6 ^a	5,6 ± 1,6 ^a	8,7 ± 3,0 ^a	6,1 ± 1,5 ^a
sinusoidal	0 ± 0	1,0 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^{a,b}	0,9 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^a

Tab. 6: Sirius-rot und α-SMA (immunhistochemisch) gefärbte Lebergewebsschnitte wurden morphometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind als Volumenanteil dargestellt (Prozentsatz von spezifischen Anzahl bezogen auf Gesamtzahl der ausgezählten Punkten) und als Mittelwert ± Standardfehler wiedergegeben. Gruppenergebnisse wurden durch nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney U-Test) verglichen. ^a p<0.002 vs. sham, ^b p<0,05 vs. BDL

Kollagen-Akkumulation in therapeutisch behandelten Tieren (Gruppe T)

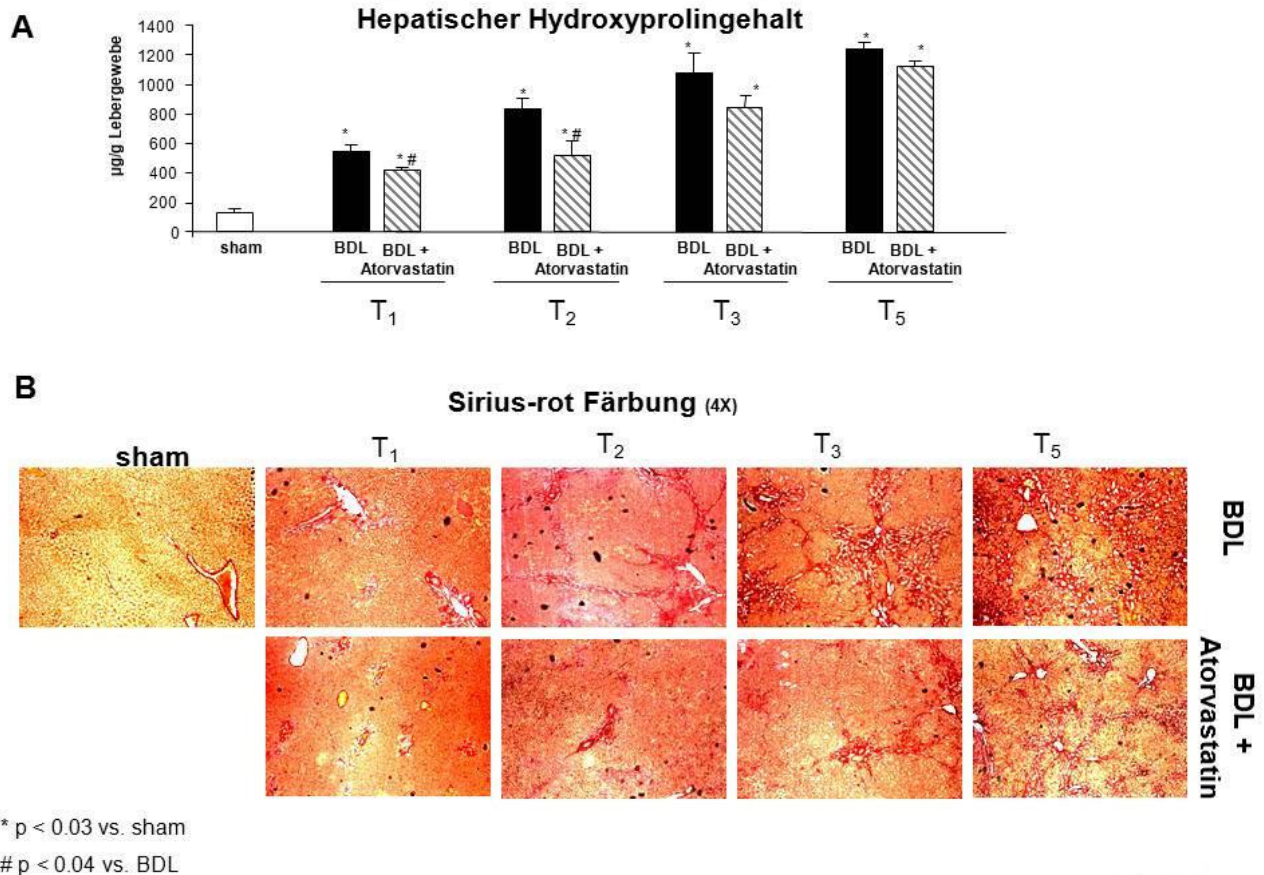


Abb. 6: Auswirkung von therapeutischer Behandlung mit Atorvastatin (Gruppe T) auf die hepatische Kollagenakkumulation. Diese wurde bewertet anhand von

A: hepatischen Hydroxyprolinegehalt
B: Sirius-rot-Färbung

Die Ratten wurden eine (T₁), zwei (T₂), drei (T₃) oder fünf (T₅) Wochen lang nach der Gallengangsligatur für jeweils eine Woche mit Atorvastatin behandelt. Die entsprechenden Kontrolltiere wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, nicht behandelt (jede Gruppe mit einem Minimum von n=6). Die Angaben in A sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Für die hepatische Sirius-rot-Färbung sind repräsentative Schnitte mit Originalgröße X4 gezeigt, zur ihrer Quantifizierung siehe bitte auch Tab. 6.

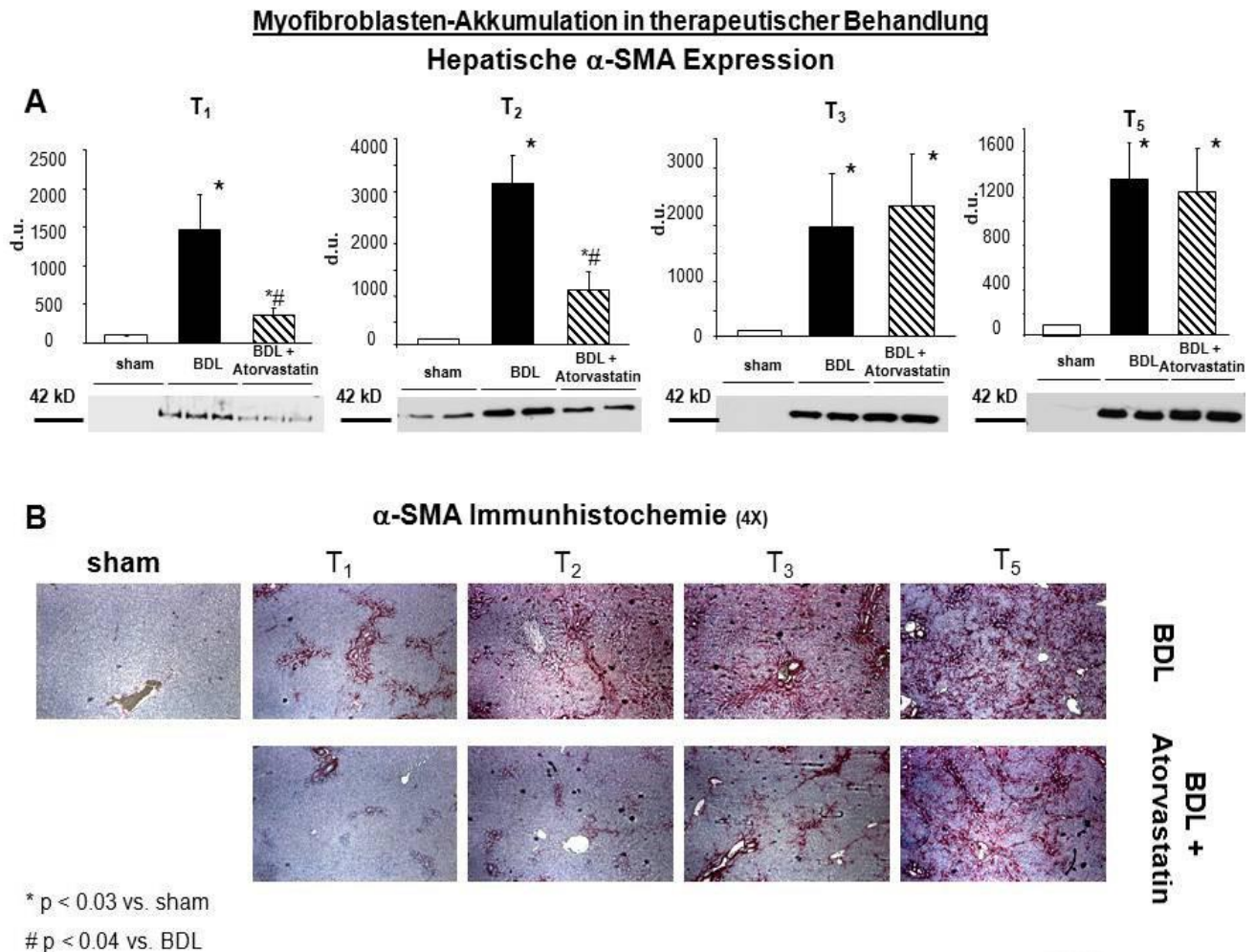


Abb. 7: Auswirkung von Atorvastatin auf die hepatische Myofibroblastenakkumulation in der Gruppe T. Die Myofibroblastenakkumulation wurde bemessen durch

A: die Expression von α -SMA

B: die Immunhistochemie für α -SMA

Die Ratten wurden eine (T₁), zwei (T₂), drei (T₃) oder fünf (T₅) Wochen lang nach der Gallengangsligatur für jeweils eine Woche mit Atorvastatin behandelt. Die entsprechenden Kontrolltiere wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, nicht behandelt (jede Gruppe mit einem Minimum von n=6).

In Abb. 7A sind repräsentative Westernblots und densitometrische Quantifizierungen gezeigt (Mittelwert \pm Standardfehler). Angaben sind als relative densitometrische Einheiten (d.u.) dargestellt und den sham-operierten Ratten zum Vergleich gesetzt, die bei 100 d.u. festgelegt sind.

In Abb. 7B sind für die hepatischen Immunhistochemie zur α -SMA repräsentative Schnitte mit Original-größe X4 gezeigt, zu ihrer Quantifizierung siehe auch Tab. 6.

4.3 Profibrotische Faktoren in der Therapie mit Atorvastatin (Gruppe T)

Verglichen mit den sham-operierten Ratten war der mRNA-Spiegel von TGF β 1, CTGF und PDGF β -R in den Lebern der BDL-Ratten signifikant höher. Im Gegensatz zu Hydroxyprolinegehalt und α -SMA-Proteinexpression (Abb. 6, 7) hatte die frühe Atorvastatinbehandlung (T1) weder den mRNA-Spiegel der Zytokine TGF- β 1 und CTGF, noch von PDGF β -R geändert. Allerdings war der hepatische mRNA-Spiegel von TGF- β 1, CTGF und PDGF β -R in den späteren Therapiegruppen mit angelegter Fibrosierung erniedrigt (Abb. 8A-C).

In gleicher Weise blieb in den früh behandelten Gruppen (T1-T3) die MMP-2-Aktivität unverändert (Abb. 8). Bei den Tieren, die mit Atorvastatin fünf Wochen nach der Gallengangsligatur eine Woche lang behandelt wurden (T5), wurde im Vergleich zu den nicht behandelten BDL-Ratten die MMP-2 Expression und MMP-2-Aktivität signifikant erniedrigt (Abb. 8D, E).

Profibrotische Faktoren in therapeutisch behandelten Ratten (Gruppe T)

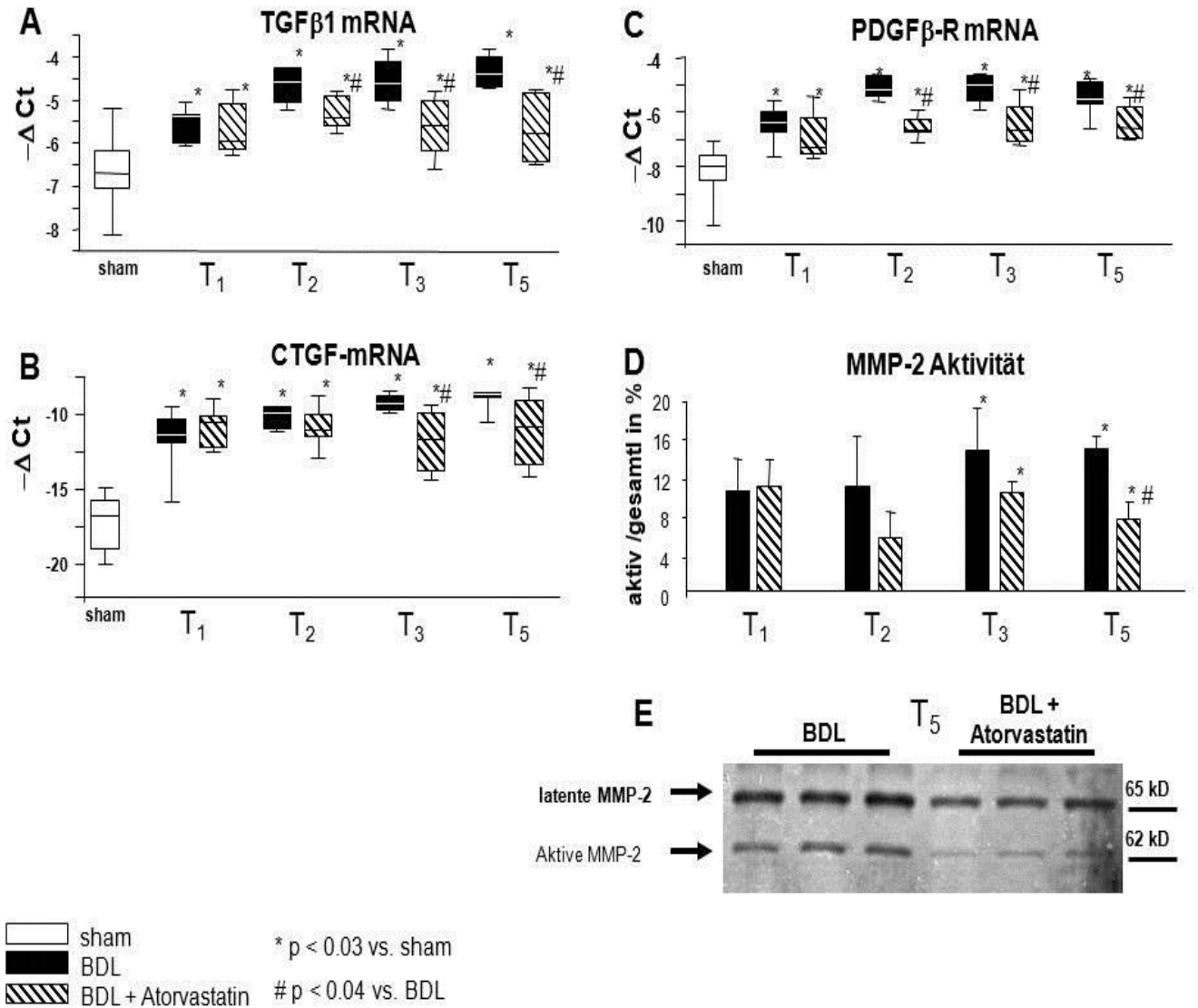


Abb. 8: Auswirkung von therapeutischer Behandlung mit Atorvastatin auf die profibrotischen Zytokin-Expression. Die Zytokin-Expression wurde sowohl durch den hepatischen mRNA-Spiegel von TGF-β1 (A), CTGF (B), PDGFβ-R (C) als auch durch die hepatische Gewebsaktivität vom profibrotischen MMP-2 (D und E) bemessen (jede Gruppe mit einem Minimum von n=5). Der m-RNA-Spiegel wurde durch quantitativen RT-PCR bestimmt und gegen GAPDH als Haushaltsgen normiert. Quantitative Auswertungen von proteolytischen Banden wurden densitometrisch durchgeführt (D). Die Abb. 8 E zeigt proteolytische Banden von 62 kD und 65 kD, die nach der SDS-PAGE erreicht wurden und die Gelatin Zymographie, die der aktiven und latenten Form von MMP-2 der Gruppe T5 entspricht.

4.4 Auswirkung von Atorvastatin auf Myofibroblasten in ausgeprägter Fibrose (Gruppe T5)

Obwohl Atorvastatin keine Auswirkung auf die Kollagenablagerung und Myofibroblastenakkumulation in der ausgeprägten, fortlaufenden Fibrosierung (T5) hatte, änderte es die Expression von profibrotischen Zytokinen, die hauptsächlich von Myofibroblasten stammen. Deshalb habe ich die Aktivität dieser Zellen bezüglich Proliferation, Apoptosis und Entzündung in der Behandlungsgruppe T5 untersucht

4.4.1 Hepatische und Myofibroblastenproliferation

Verglichen mit den nicht behandelten BDL-Ratten war in der Atorvastatin behandelten Gruppe T5 die hepatische PCNA-Expression verringert (Abb.9A). Weiterhin war die intrazelluläre Expression von Cathepsin B (30kD) und Cathepsin D (52 kD), die als Marker für die Proliferation aktivierter HSC/Myofibroblasten gelten (Moles et al., 2009), durch die Atorvastatinbehandlung signifikant erniedrigt (Abb. 9B, C). Diese Ergebnisse wurden durch die Ki-67-Färbung von Leberschnitten bestätigt. Verglichen mit den entsprechenden BDL-Kontrolltieren, war bei den Atorvastatin behandelten Tieren (T5) die Anzahl der mesenchymalen Ki-67-positiven Zellen signifikant reduziert (Abb. 9D).

Proliferation in der Therapiegruppe T₅

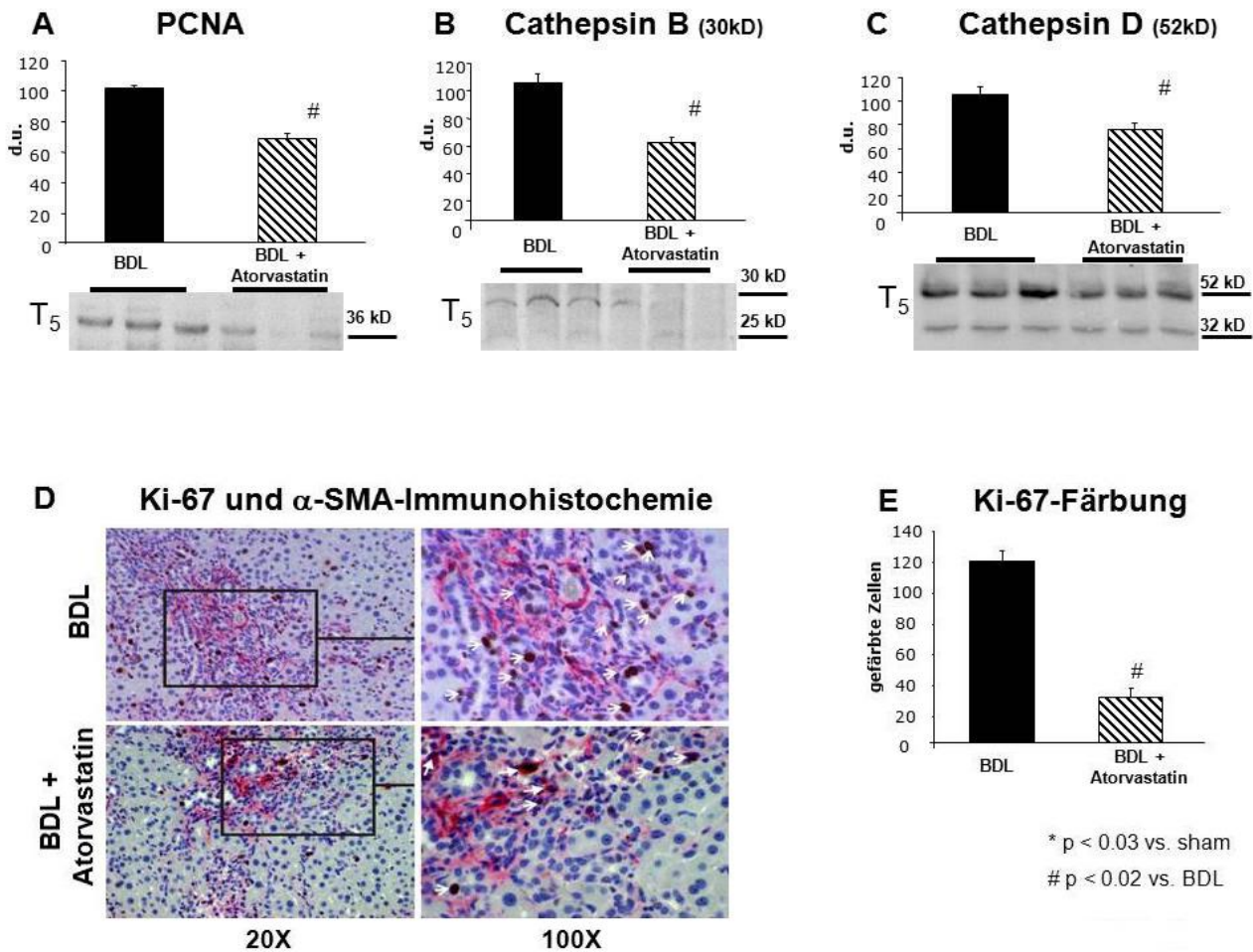


Abb. 9: Proliferationsmarker in Ratten, die mit Atorvastatin für eine Woche nach fünfwöchiger BDL behandelt wurden (T₅). Die hepatische Proteinexpression von PCNA (A), Cathepsin B (B) und Cathepsin D (C) sind mit repräsentativen Westernblots dargestellt. Ihre densitometrische Quantifizierung (für intrazelluläre Isoform von Cathepsin B (30 kD) und D (52 kD), Mittelwert \pm Standardfehler, angegeben durch relative densitometrische Einheiten (d.u.)) ist im Vergleich zu den unbehandelten BDL-Ratten, die bei 100 d.u. festgelegt sind, gezeigt. Proliferative Zellen sind immunhistochemisch mit Ki67-Antikörpern gefärbt (braun) und das Vorkommen von Myofibroblasten ist, wie es in den repräsentativen Schnitten mit Originalgröße X20 und X100 in Abb. 9D gezeigt wird, durch die α -SMA- immunhistochemische Färbung (rot) dargestellt. Die offenen Richtungspfeile zeigen die Ki67- positive Zellkerne an, wohingegen die geschlossenen Richtungspfeile auf die Ki67- positive Zellkerne in α -SMA gefärbten Myofibroblasten anzeigen. Die Quantifizierung von Ki67/ α -SMA positiven mesenchymalen Zellen ist in Abb. 9E als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

4.4.2 Hepatische und Myofibroblastenapoptose

Die hepatische Caspase-3-Aktivität änderte sich durch die Atorvastatinbehandlung nicht signifikant, aber es war eine Tendenz zu Erniedrigung bemerkbar (Abb. 10A). Die Expression und Spaltung von dem endogenen Caspase-3-Substrat PARP-1 wurde in Leberproben durch Westernblotuntersuchungen gemessen. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der das große ungespaltene Protein (118kDa) und die kleine gespaltene Fragmente (28 kDa) erkennen lässt. Wie die unveränderte endogene Caspase3- Aktivität, blieb die Spaltung von PARP-1 in der Atorvastatin behandelten Gruppe T5 unverändert (Abb. 10B, C). Histologische Untersuchungen, bei denen TUNEL-Assay und immunhistochemische Färbung mit α -SMA verwendet wurden, deckten in der Atorvastatin behandelten Gruppe T5, im Vergleich zu den entsprechenden nicht behandelten BDL-Ratten, eine hoch signifikante Reduktion der apoptotischen mesenchymalen Zellen auf (Abb. 10D, E).

Apoptose in der Therapiegruppe T₅

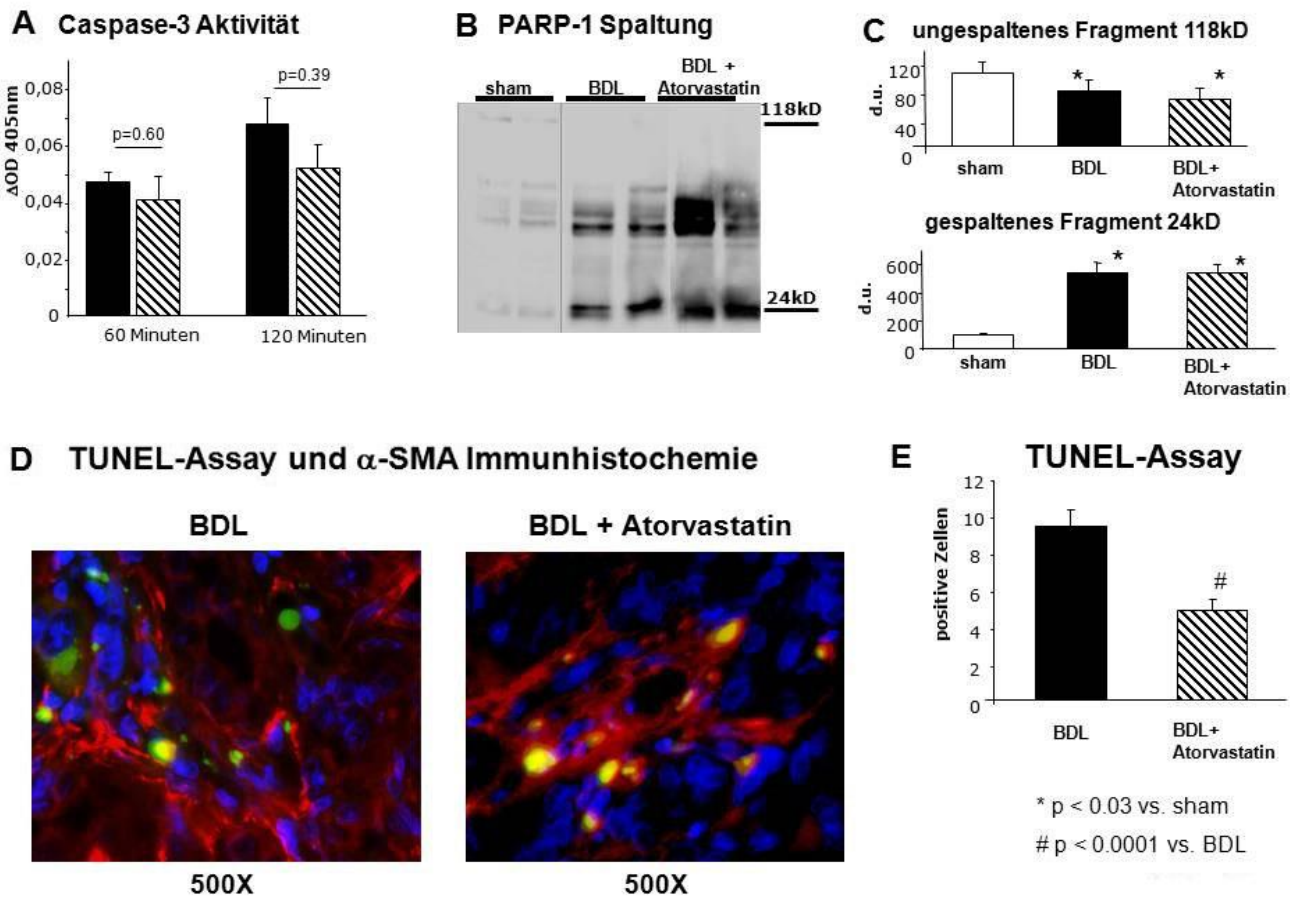


Abb. 10: Hepatische und Myofibroblastenapoptose in der Gruppe T₅.

Sowohl die enzymatische Caspase-3 Assay (A) als auch die Spaltung des endogenen Caspase-3-Substrats PARP-1 (B, C) wurden in Leberhomogenaten der Gruppe T₅ untersucht. Western-blotuntersuchungen für PARP-1 wurden mit einem Antikörper durchgeführt, der die ungespaltene (118 kD) und die gespaltenen kleinen Fragmente (28 kD) markiert (B). Repräsentative Westernblots (B) und densitometrische Quantifizierung (C) (Mittelwert±SEM, angegeben in relativen densitometrischen Einheiten (d.u.)) sind mit sham-operierten Ratten verglichen. In (D) wurden die Zellkerne der apoptotischen Zellen durch die TUNEL-Assay FICT (grün) markiert, während das Zytoskelett von den Myofibroblasten durch die rote Immunfluoreszenz mittels Cy3-konjugierter anti-α-SMA-Antikörpern gefärbt wurde (repräsentative Schnitte von BDL (links) und BDL+Atorvastatin (rechts) mit Originalgröße X500). Die Quantifizierung der TUNEL-positiven mesenchymalen Zellen ist in Abb. 10E als Mittelwert± Standardfehler dargestellt.

4.4.3 Hepatische Inflammation

Obwohl die Atorvastatintherapie in der Gruppe T5 die profibrotischen Zytokinen signifikant reduzierte (Abb. 8), hat sie den Transaminasengehalt im Serum der Tiere nicht verändert (Abb. 11A, B). Die Transaminasen spiegeln das Absterben der Hepatozyten wider und stellen einen Marker für die hepatische Nekrose und Entzündung in der Leber dar. Durch die Atorvastatinbehandlung wurde weder AST noch ALT signifikant reduziert (Abb. 11A, B), obwohl die Reduktion des Hepatozytenanteils in der Gruppe T5 signifikant gehemmt wurde (Abb. 11C). Auch die Chloracetatesterase-Färbung ergab keine Auswirkung von Atorvastatinbehandlung auf die Entzündung nach der Gallengangsligatur in der Gruppe T5 (Abb. 11D, E).

Hepatische Inflammation in der Therapiegruppe T

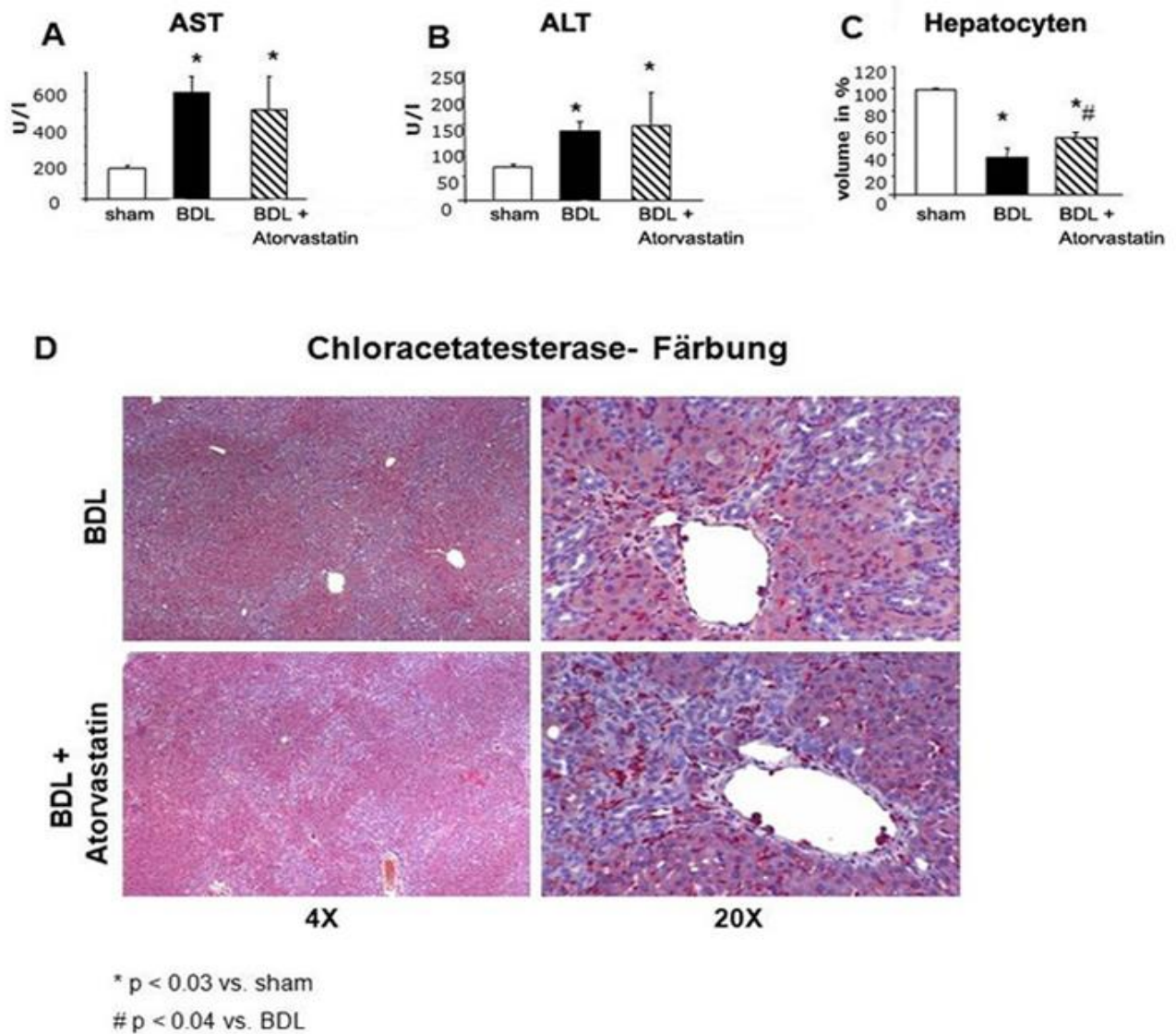


Abb. 11: Die hepatische Inflammation in der Gruppe T5. AST (A) und ALT (B) wurden durch Anwendung von Standardmethoden sowohl in der sham-operierten Gruppe als auch in der Gruppe T5 untersucht. Der Hepatozytenanteil (C) wurde in den Leberschnitten gemessen (siehe auch Tab. 6). Hepatische Entzündung (D) wurde histologisch durch hepatische Färbung der Chloracetatesterase gemessen (repräsentative Schnitte mit Originalgröße X4 und X20).

5. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit, die auf in vivo Versuchen basiert, wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Atorvastatinbehandlung die hepatische Fibrosierung bei gallengangsliierten Ratten verzögert. Sowohl die Prophylaxe als auch die frühe therapeutische Behandlung mit Atorvastatin verminderte die hepatische Kollagenablagerung und die Aktivierung der HSC. Bei fortgeschrittener Fibrose regulierte Atorvastatin die Proliferation und die Apoptose der myofibroblastischen HSC und die profibrotische Zytokinexpression herunter, jedoch ohne einen erkennbaren Effekt auf die Entzündung zu haben.

Die Aktivierung von HSC spielt eine zentrale Rolle in der Leberfibrogenese. Die hepatische Schädigung, unabhängig von der Genese, ist durch eine anfängliche Nekrose und/oder Entzündung charakterisiert, die das Absterben von Hepatozyten auslöst und mit einem Anstieg der Transaminasen einhergeht. Als nächstes produzieren Entzündungszellen und geschädigte Hepatozyten Zytokine (TGF- β 1, PDGF, CTGF), die zur Aktivierung der HSC und ihrer Transformation zum myofibroblastischen Phänotyp führen (Bataller und Brenner, 2005; Friedman, 2008; Gressner und Weiskirchen, 2006; Parola et al., 2008; Pinzani, 2002). Dieser Phänotyp ist durch veränderte Rezeptorcharakteristik (Hochregulierung von PDGF β -Rezeptoren) und eine exzessive Proliferation gekennzeichnet. Die Myofibroblasten sind ebenfalls die Hauptproduzenten von Kollagen und der profibrotischen Schlüsselzytokine (TGF- β 1, PDGF und CTGF). Auf diese Weise aktivieren sich HSC gegenseitig auf autokrinen und parakrinen Wegen (Friedman, 2001; Bataller und Brenner, 2005; Friedman, 2008; Gressner und Weiskirchen, 2006; Parola et al., 2008; Pinzani, 2002).

Die vorliegende Arbeit bestätigt diese aktuelle Auffassung über die hepatischen Fibrogenese. So spiegeln die gesteigerten Transaminasen die Leberschädigung bzw. -entzündung wieder (Tab. 5). Die vermehrte HSC-Aktivierung wurde u. a. durch die Hochregulierung von α -SMA- und PDGF β -Rezeptoren bewiesen (Abb. 2-5), und die Kollagenablagerung wurde histologisch (Abb. 2-4) nachgewiesen. In meiner Arbeit war der Transaminasenspiegel durch Atorvastatinbehandlung nicht verändert (Tab. 5). Daraus ist zu folgern, dass Atorvastatin in diesem Fibrosemodell keine Auswirkung auf die hepatische Nekrose/Entzündung hat (Tab. 6, Abb. 8 (A-C)). Die prophylaktische Behandlung (Gruppen P1, P3, P5) und die frühe therapeutische Behandlung (Gruppen T1 und T2) mit Atorvastatin verminderte die Myofibroblastenakkumulation, die mit redu-

zierter hepatischer Fibrosierung einherging (Abb. 2-4). Trotz der verminderten Myofibroblastenakkumulation und der herabgesetzten Fibrosierung blieben die mRNA-Spiegel der Zytokine bei diesen Gruppen hoch (Abb. 5). Dies überrascht nicht, da die Zytokine in dieser Phase hauptsächlich durch Entzündungszellen produziert werden und nicht durch HSC (Bataller und Brenner, 2005; Friedman, 2008; Gressner und Weiskirchen, 2006; Parola et al., 2008; Pinzani, 2002).

Zusammengefasst weisen diese Befunde darauf hin, dass Atorvastatin die Aktivierung der ruhenden HSC in der beginnenden Fibrose hemmt. Demzufolge reduziert die Atorvastatinbehandlung die Myofibroblasten und EZM-Akkumulation in der frühen Fibrosierungsphase ohne dabei eine Auswirkung auf die hepatische Entzündung zu haben (im BDL-Model). Obwohl in anderen Untersuchungen (Nie et al., 2004; Oberti et al., 1997) keine signifikante prophylaktische Auswirkung von Statinen auf die hepatische Fibrosierung gezeigt wurde, deuten diese Studien einen Effekt von Atorvastatin auf die Kollagenproduktion (Gardner et al., 2007) und auf die Angiotensin-II induzierte Entzündung und Fibrose an (Moreno et al., 2009; Nie et al., 2004). Das Fehlen von eindeutig prophylaktischen und antifibrotischen Effekt von Statinen in diesen Studien könnte durch die sehr niedrig eingereichten Statindosen erklärt werden (Nie et al., 2004; Oberti et al., 1997; Moreno et al., 2009). Dennoch zeigt Atorvastatin eine additive antifibrotische Wirkung zur Angiotensin-II- Typ1-Rezeptor-Blockern und reduziert die Angiotensin-II induzierte Entzündung (Nie et al., 2004; Moreno et al., 2009). Die letzten Erkenntnisse unterstützen meine Ergebnisse, da Angiotensin-II die HSC-Aktivierung anstößt, welche die Entzündung aufrechterhält und zur Fibrosierung führt.

Wenige klinische Fälle, in denen ausnahmsweise eine chronische Leberschädigung im Frühstadium bekannt ist, können einer prophylaktischen oder frühen Therapie unterzogen werden. In den meisten klinischen Fällen ist hingegen ein fortgeschrittenes Stadium der Leberschädigung vorzufinden. Aus diesem Grund haben ich die Auswirkung von Atorvastatin auf fortgeschrittenen und fortlaufenden Fibrosierung getestet. Die Atorvastatinbehandlung hat keine signifikante Auswirkung auf die fortgeschrittene Fibrosierung (Abb. 2-4). Das fortgeschrittene Stadium der Fibrose (BDL) oder die relative kurze Behandlungszeitraum (eine Woche) könnten eine mögliche Erklärung für die unveränderte Kollagenablagerung sein. In vollständiger und ausgeprägter Fibrose sind Myofibroblasten die Hauptproduzenten von Zytokinen (Bataller und Brenner, 2005; Friedman, 2008; Gressner und Weiskirchen, 2006; Pinzani, 2002). In diesem Stadium

verminderte Atorvastatin die Zytokin-Gen-Expression, die Gewebsaktivität von profibrotischen Enzymen (MMP-2 (Abb. 5)) und den PDGF β -R-mRNA-Gehalt (Abb. 5C). Dies deutet auf eine verminderte Aktivität der HSC hin (Gressner und Weichkirchen, 2006; Pinzani, 2002). Im Gegensatz dazu war eine Auswirkung von Atorvastatin auf die hepatische Entzündung in diesem Stadium nicht zu beobachten, wie es durch die unveränderte Chloracetatesterase-Färbung gezeigt worden ist (Abb. 8D).

Zusammenfassend kann also angenommen werden, dass Atorvastatin die HSC-Aktivität verringern könnte ohne die hepatische Entzündung in fortgeschrittener Fibrose zu verändern. Dies reicht nicht aus, um von antifibrotischen Effekten auszugehen wie sie in der prophylaktischen und der frühen therapeutischen Behandlungsphasen beobachtet wurden. Dies könnte sich auf die hohe EZM-Ablagerung in den Phasen vor der Behandlungsperiode beziehen.

Da die therapeutische Atorvastatingabe die eindeutigste Auswirkung auf Zytokine in der Gruppe mit der meist fortgeschrittenen Fibrose (T5) hatte, habe ich diese Gruppe bezüglich Proliferation (die hauptsächlich von den Myofibroblasten ausgeht) analysiert. In vorangegangenen *in vitro* Studien wurde keine Auswirkung von Atorvastatin auf die Proliferation der HSC nach 24 stündiger Inkubation gezeigt (Trebicka et al., 2007). Es kam allerdings zur Hemmung der HSC nach mehreren Tagen (Mallat et al., 1994; Rombouts et al., 2003). In meiner *in vivo* Arbeit blieb sogar nach siebentägiger Atorvastatingabe die Anzahl der Myofibroblasten unverändert (Abb. 4). Wie durch die PCNA-Expression gezeigt wurde, hemmte die Atorvastatingabe insgesamt die hepatische Proliferation (Abb. 9A). Weiterhin zeigte die Ki67-Färbung eine merkliche Hemmung der proliferierenden mesenchymalen Zellen durch Atorvastatin (Abb. 6 D, E). Letztlich wurde dies durch die verminderte Expression von intrazellulären Cathepsine bestätigt (Abb. 6 B, C), die für die Proliferation aktivierter HSC sehr spezifisch sind (Moles et al., 2009).

Interessanterweise ging die verminderte HSC-Aktivität, die nach späterer Atorvastatinbehandlung beobachtet wurde, nicht mit einer erhöhten caspaseabhängigen Apoptose einher, wie es neulich in *in vitro* Versuchen beschrieben wurde (Aprigliano et al., 2008). Im Gegenteil, wie es im TUNEL-Assay für mesenchymalen α -SMA positiven Zellen bewertet wurde, war in dieser Arbeit die HSC-Apoptose reduziert (Abb. 7 D, E). Zur selben Zeit war die gesamthepatische Apoptose nicht signifikant verändert (Abb. 7A-C). Dies weist auf eine Einflussnahme von Atorvastatin auf die Apoptose, die speziell in HSC oder Myofibroblasten auftritt. Die entgegengerichtete Wirkung von Atorvastatin auf die

HSC-Apoptose in meinen in vivo Untersuchungen und den vorangegangenen in vitro Untersuchungen könnte eine unterschiedliche Regulationsweg der HSC-Apoptose in vivo und in vitro widerspiegeln. So fehlen zum Beispiel unter in vitro Bedingungen parakrine Faktoren und die Zell-Zell-Interaktionen. Letztendlich könnte die reduzierte HSC-Apoptose auch die reduzierte Proliferation kompensieren, das wiederum den mangelnden Atorvastatineffekt auf die HSC-Akkumulation in der Gruppe T5 erklären könnte.

Atorvastatin verminderte die Proliferation und die Apoptose von mesenchymalen und α -SMA positiven Zellen, aber die Anzahl von α -SMA positiven Zellen blieb unverändert. Diese Tatsache führt zu der Fragestellung, ob auch andere inflammatorische mesenchymale Zellen rekrutiert wurden. Eine neulich veröffentlichte Studie zeigte, dass Atorvastatin die Angiotensin II-induzierte Entzündung in der Leber hemmt (Moreno et al., 2009), und dass Simvastatin in den ersten 12 Stunden nach BDL die Entzündungsreaktion vermindert (Dold et al., 2009). Indessen blieben in unserem Model die histologisch erfasste Entzündung und die Transaminasen in der Behandlungsgruppe (T5) im fortgeschrittenen Fibrosierungsstadium unverändert (Abb. 8). Dies weist darauf hin, dass Statine keine Auswirkung auf die Entzündung nach langzeitiger Gallengangsligatur haben. Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnisse kontrovers zu sein, aber es gibt Parallelen zwischen beiden Studienergebnissen. Auf der einen Seite hemmt Atorvastatin die Aktivierung der HSC durch intrazelluläre Hemmung der Angiotensin II-Wirkung auf die HSC (Moreno et al., 2009). Auf der anderen Seite, wie in meiner Arbeit gezeigt, wirkt Atorvastatin durch Hemmung der Zytokine. Diese und meine Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass der nachgeschaltete Signalweg von TGF- β , PDGF und CTGF in Fibroblasten und glatten Muskelzellen von der Aktivierung der kleinen GTPasen (wie Rho, Ras) abhängig sind (Becker et al., 2001; Watts et al., 2006). Wie in der Einleitung beschrieben, verhindern Statine die Aktivierung der kleinen GTPasen durch die Hemmung ihrer Membranassoziation. In früheren Untersuchungen hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass Atorvastatin die Aktivierung von RhoA und Ras in aktivierten HSC hemmt (Trebicka et al., 2007). Daher könnten Statine den nachgeschalteten Signalweg von TGF- β , PDGF und CTGF in Fibroblasten und glatten Muskelzellen hemmen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass über diesen Mechanismus tatsächlich die zytokininduzierte Aktivierung der HSC in-vivo effektiv blockiert wird.

Demzufolge könnten alle beobachteten Auswirkungen von Atorvastatin in der hepatischen Fibrosierung durch den Einfluss der HSC erklärt werden: Die frühzeitige Behandlung mit Atorvastatin zögert die Aktivität der HSC hinaus und folglich die Kollagenablagerung. Die fortlaufende späte Fibrosierungsphase könnte durch Atorvastatin modulierte sein, welches die Aktivität der myofibroblastischen HSC hemmt und dadurch die profibrotische Zytokinproduktion vermindert wird.

6. Zusammenfassung

Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) und ihre Transdifferenzierung zu Myofibroblasten infolge von Leberschädigung sind die wichtigsten Zwischenschritte im Zuge der hepatischen Fibrogenese. Diese Myofibroblasten äußern sich in gesteigerter Proliferation, Migration, Kontraktilität und Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM). Wir haben die Auswirkung von Atorvastatin in in-vivo Versuchen bei gallengangsligierten Ratten (BDL) untersucht. Statine als β -HMGCoA-Reduktase-Hemmer unterbrechen die Aktivierung von HSC durch die Hemmung der monomeren GTPasen Rho und Ras, die für die Migration, Proliferation und Hypertrophie von Myofibroblasten erforderlich sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Atorvastatinbehandlung die Fibrosierung bei gallengangsligierten Ratten eindämmt. Sowohl bei den Ratten, die Atorvastatin prophylaktisch unmittelbar nach der Gallengangsligatur dauerhaft bis zu Organentnahme bekamen, als auch bei den Ratten, die eins bis zwei Wochen nach der Gallengangsligatur jeweils eine Woche lang therapeutisch mit Atorvastatin behandelt wurden, zeigte sich eine signifikant verminderte hepatische Kollagenablagerung und eine signifikant verminderte Aktivierung der HSC. Im fortgeschrittenen Fibrorestadium, d.h. bei den Ratten, die fünf Wochen nach der Gallengangsligatur eine Woche lang mit Atorvastatin behandelt wurden, zeigte sich keine Auswirkung auf die hepatische Kollagenablagerung oder der Myofibroblastenakkumulation. Allerdings setzte Atorvastatin in dieser Phase der Leberfibrose/Leberzirrhose die Proliferation und die Apoptose der myofibroblastischen HSC ab und hob die profibrotische Zytokinexpression auf. Dabei zeigte sich aber keine erkennbare Auswirkung auf die hepatische Inflammation.

Diese Daten legen nahe, Atorvastatin als Prophylaxe bei chronisch lebererkrankungsgefährdeten Patienten und bei Patienten mit Leberfibrose im Frühstadium zu erproben.

7. Literaturverzeichnis

- Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 276-283
- Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1812-1817
- Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G, Saile B. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008; 28: 546-557
- Armbrust T, Ramadori G. Mononuclear phagocytes of acutely injured rat liver abundantly synthesize and secrete fibronectin in contrast to Kupffer cells of normal liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 752-758
- Arthur MJ. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Patho Res Pract* 1994; 190: 825-833
- Arthur MJ. Collagenosis and liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22: 43-48
- Arthur MJ. Role of Ito-cells in the degradation of matrix in liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 57-62
- Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sciences* 2002; 72: 631-623
- Balk EM, Lau J, Goudas LC. Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 2003; 139: 670-682
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005 Feb; 115: 209-218
- Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*, 1995; 19: 1409-1417
- Becker GJ, Perkovic V, Hewitson TD. Pharmacological intervention in renal fibrosis and vascular sclerosis. *J Nephrol* 2001; 14: 332-339
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 821-831
- Bi X, Baudry M, Liu J, Yao Y, Fu L, Brucher F, Lynch G. Inhibition of geranylgeranylation mediates the effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors on microglia. *J Biol Chem*. 2004; 279: 48238-48245
- Bodovitz S, Klein WL. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 4436-4440
- Callahan A. Cerebrovascular disease and statins: a potential addition to the therapeutic armamentarium for stroke prevention. *Am J Cardiol* 2001; 88: 33-37
- Callahan AS, 3rd: Vascular pleiotropy of statins: clinical evidence and biochemical mechanisms. *Curr Atheroscler Rep* 2003; 5: 33-37

- Choi SS, Sicklick JK, Ma Q, Yang L, Huang J, Qi Y, Chen W. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology* 2006; 44: 1267-1277
- Christoph A, Ritter, Heyo K. Kroemer. Interaktions- und Nebenwirkungspotenzial der Statine: Was ist bei der Gabe von CSE-Hemmern zu beachten? *Pharmazie in unserer Zeit*. 2003; 32: 490-497
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin*. München-Jena: Urban & Fischer, 2003
- Danesh FR, Kanwar YS. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J*. 2004; 18: 805-815
- Deutsches Ärzteblatt 101, Ausgabe 6 vom 06.02.2004, 293, 300, 352
- Dinges HP, Redl H. Comparative evaluation of immunohistochemistry and enzyme histochemistry for granulocyte visualization in formalin-fixed and paraffin-embedded liver and lung biopsies. *Histochemistry* 1983; 77: 9-14
- Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 466-474
- Downs JR, Clearfield M, Weis S. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615-1622
- Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001; 133: 1172-1180
- Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty Aj, Angel, Heath JK. Transforming growth factor beta Modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*. 1987; 6: 1899-1904
- Endres M, Laufs U, Huang Z. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8880-8885
- Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998; 83: 683-690
- Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002; 105: 1756-1759
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-671
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, Von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5856-5861

- Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 427-431
- Fears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM: The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 1999; 10: 1699-1705
- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- Friedman S. The hepatic stellate cell. In: PD. B, editor. *Semin Liver Dis*. New York: Thieme; 2001: 307-452
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-225
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-140
- Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 18146-18152
- Gardner JL, Turner SM, Bautista A, Lindwall G, Awada M, Hellerstein MK. *Measurement of liver collagen synthesis by heavy water labeling: effects of profibrotic toxicants and antifibrotic interventions*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: 1695-1705
- Gavrieli Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 1992; 119: 493-501
- Gerok W. *Die Innere Medizin*. Stuttgart- New York: Schattauer, 2000
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430
- Grady D, Wenger NK, Herrington D. Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med* 2000; 132: 689-696
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets, *J. Cell. Mol. Med* 2006; 10: 76-99
- Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis- a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 1995; 56: 335-346
- Gressner AM, Bachem MG. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: Role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 30-46
- Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fatstoring cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: 793-807

- Gross JB, Jr., Reichen J, Zeltner TB, Zimmermann A. The revolution of changes in quantitative liver function tests in a rat model of biliary cirrhosis: correlation with morphometric measurement of hepatocyte mass. *Hepatology* 1987; 7: 457-463
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induces apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998; 83: 490-500
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-514
- Hassanain HH, Irshaid F, Wisel S, Sheridan J, Michler RE, Goldschmidt-Clermont PJ. Smooth muscle cell expression of a constitutive active form of human Rac 1 accelerates cutaneous wound repair. *Surgery* 2005; 137: 92-101
- Herold G. Leberzirrhose. In: Herold G, Hrsg. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold und Mitarbeiter, 2006: 478-485
- Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). In: *Biologie in unserer Zeit*; 2007; 37: 120-126
- Hughes DA. Control of signal transduction and morphogenesis by Ras. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 89-94
- Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res* 1999; 95: 229-234
- Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 1995; 270: 23173-23178
- Igel M, Sudhop T, von Bergmann K: Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 835-845
- Inoue I, Goto S, Mizotani K. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci* 2000; 67: 863-876
- Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJ. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *Clin Invest*. 1992; 90: 282-287
- Iredale JP, Ferris WF, Murphy G, Arthur MJP. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is expressed by hepatic lipocytes and upregulated in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Clin Sci* 1994; 87: 34
- Iredale JP, Arthur MJ. Hepatocyte-matrix interactions *Gut*. 1994; 35: 729-732
- Isaacsohn JL, Setaro JF, Nicholas C. Effects of lovastatin therapy on plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels. *Am J Cardiol* 1994; 74: 735-737
- Ishak K. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 1995; 22: 696-699
- Jackson SM, Ericsson J, Edwards PA: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Subcell Biochem* 1997; 28: 1-21

- Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 1981; 112: 70-75
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. *Histologie*. Berlin: Springer Verlag, 2001
- Knippers R. *Molekulare Genetik*. Thieme 1997, 429
- Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol*. 1999; 154: 153-167
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008; 134: 657-667
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685
- Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Luño J. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 243-248
- Laufs U, Liao JK. Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2003; 5: 372-378
- Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-24271
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-1135
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p 27(Kip1). *J Biol Chem* 1999; 274: 21926-21931
- Liao JK: Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 2002; 110: 285-288
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 89-118
- Liao JK: Role of statin pleiotropism in acute coronary syndromes and stroke. *Int J Clin Pract Suppl* 2003: 51-57
- Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-633
- Lindquist JN, Marzluff WF, Stefanovic B. Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 471-476
- Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg- New York: Springer, 2003
- Lottspeich F, Engels JW, Simeon A. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2006: 38
- Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 417-426

- Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, Dhumeaux D, Rosenbaum J, Mavier P. Effect of simvastatin, an inhibitor of hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase, on the growth of human Ito cells. *Hepatology* 1994; 20: 1589-1594
- Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol.* 1998; 152: 423-430
- Masterson R, Kelynack K, Hewitson T, Becker G. Effect of inhibition of farnesylation and geranylgeranylation on renal fibrogenesis in vitro. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 102: 19-29
- Mizuno T, Haass C, Michikawa M, Yanagisawa K: Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid beta-protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1373: 119-130
- Moles A, Tarrats N, Fernandez-Checa JC, Mari M. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology* 2009; 49: 1297-1307
- Moreno M, Ramalho LN, Sancho-Bru P, Ruiz-Ortega M, Ramalho F, Abraldes JG. Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: 147-156
- Nie L, Imamura M, Itoh H, Ueno H. Pitavastatin enhances the anti-fibrogenesis effects of candesartan, an angiotensin II receptor blocker, on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *J UOEH* 2004; 26: 165-177
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 14-20
- Oberti F, Pilette C, Rifflet H, Maiga MY, Moreau A, Gallois Y, Girault A, Bouil AL, Le Jeune JJ. Effects of simvastatin, pentoxifylline and spironolactone on hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. *J Hepatol* 1997; 26: 1363-1371
- O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; 95: 1126-1131
- Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 337-342
- Oliver H. Lowry. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997; 100: 2671-2679
- Park HJ, Galper JB. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor-beta signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11525-11530
- Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 58-66

- Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122: 286-289
- Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7: 1720-1726
- Popper H, Kent G. Fibrosis in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol* 1975; 4: 315-332
- Preuss R. Komplikationen der Leberzirrhose. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J, Hrsg. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München-Jena: Urban & Fischer, 2004: 674-681
- Ramadori G, Armbrus T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 777-784
- Ray JG, Mamdani M, Tsuyuki RT, Anderson DR, Yeo EL, Laupacis A: Use of statins and the subsequent development of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1405-1410
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: 808-826
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999; 100: 230-235
- Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt, 2003: Gesundheitsberichterstattung des Bundes,
http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reUzuR53Jx9JI/PDF/24d1rmXbF2ZqM_58.pdf
Zugriffsdatum: 10.08. 2011
- Rockey DC. New concepts in the pathogenesis of portal hypertension: hepatic wounding and stellate cell contractility. *Clin Liver Dis*. 1997; 1: 13-29
- Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24: 193-203
- Roher AE, Kuo YM, Kokjohn KM, Emmerling MR, Gracon S. Amyloid and lipids in the pathology of Alzheimer disease. *Amyloid* 1999; 6: 136-145
- Rombouts K, Kisanga E, Hellemans K, Wielant A, Schuppan D, Geerts A. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 38: 564-572
- Schulte S, Oidtmann A, Kociok N, Demir M, Odenthal M, Drebber U, Dienes HP, Nierhoff D, Goeser T, Toex U, Steffen HM. Hepatocyte expression of angiotensin II type 1 receptor is downregulated in advanced human liver fibrosis. *Liver Int* 2009; 29: 384-391
- Schuppan D. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-372
- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 1-1019. Schuppan D. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta gastro-enterologica Belgica* 2000; 63: 366-370
- Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart- New York: Thieme, 2001

- Sparks DL. Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease? *Ann NY Acad Sci* 1997; 826: 128-146
- Straznicky NE, Howes LG, Lam W, Louis WJ. Effects of pravastatin on cardiovascular reactivity to norepinephrine and angiotensin II in patients with hypercholesterolemia and systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1995; 75: 582-586
- Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SII. Sirius Red F3ba as a Stain for ConnectiveTissue. *Arch Pathol*, 1964; 78: 69-72
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1712-1719
- Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
- Ueno T, Sata M, Sakata R, Torimura T, Sakamoto M, Sugawara H, Tanikawa K. Hepatic stellate cells and intralobular innervation in human liver cirrhosis. *Hum Pathol* 1997; 28: 953-959
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11: 2295-2322
- Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1-10
- Waldman A, Kritharides L. The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs* 2003; 63: 139-152
- Wassmann S, Laufs U, Baumer AT. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001; 37: 1450-1457
- Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 646-654
- Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *Journal of Hepatology* 2001; 35: 465-473
- Watts KL, Cottrell E, Hoban PR, Spiteri MA. RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7: 88
- Watts KL, Spiteri MA. Connective tissue growth factor expression and induction by transforming growth factor-beta is abrogated by simvastatin via a Rho signaling mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: 1323-1332
- Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1563-1569

- Yang Z, Kozai T, van der Loo B. HMG-CoA reductase inhibition improves endothelial cell function and inhibits smooth muscle cell proliferation in human saphenous veins. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1691-1697
- Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000; 32: 1248-1254
- Zimmerman H, Ishak K. Hepatic Injury due to drugs and toxins. In: Macsween, Anthony, Scheuer, Burt, Portmann, Editors. *Pathology of the liver*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1994