

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einflüsse von Genistein und Fenofibrat auf den hepatischen Lipidstoffwechsel im *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Krüger

aus Potsdam

Datum der Promotion: 2. März 2018

Akronyme

ACSL	Acyl-CoA-Synthetase, Leberform.
APS	Ammoniumpersulfat.
AST	Aspartat-Aminotransferase.
ATPase	Adenosin-Triphosphatase.
BCA	Bichinonsäure.
BSA	(engl.) bovine serum albumin, Rinderalbumin.
C _T -Wert	(engl.) cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus.
CPT1L	Carnitin-Palmitoyl-Transferase, Typ 1, Leberform.
CRP	C-reaktives Protein.
DEPC	Diethylpyrocarbonat.
DMSO	Dimethylsulfoxid.
DNA	Desoxyribonukleinsäure.
ECL	(engl.) enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemolumineszenz.
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure.
ERK1/2	Extrazellulär Regulierte Proteinkinase, Typ 1/2.
FAM	6-FAM-phosphoramidit.
FASN	Fettsäure-Synthase.
FCS	(engl.) fetal calf serum, Fetales Kälberserum.
FDA	(engl.) Food and Drug Administration, US-amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde.
FFA	(engl.) free fatty acids, freie Fettsäuren.
HCC	Hepatozelluläres Karzinom.
HDL	High-Density-Lipoprotein-Partikel.
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure.
HFD	(engl.) high fat diet, fettreiche Ernährung.
HIV	Humanes Immundefizienzvirus.
LCPUFA n-3	(engl.) long chain polyunsaturated fatty acids, mehrfach-ungesättigte langkettige Fettsäuren n-3.
LDH	Laktatdehydrogenase.

LDL	Low-Density-Lipoprotein-Partikel.
LXR α	Liver X Receptor, Typ α .
MEK1	(engl.) mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase 1.
MEM NEAA	Minimum Essential Medium-Eagle mit (engl.) non-essential amino acids, nicht-essentielle Aminosäuren.
mRNA	(engl.) messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure.
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid.
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat.
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis.
NF κ B	(engl.) nuclear factor- κ B.
PBS	(engl.) phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung.
PCR	Polymerase-Kettenreaktion.
PHH	Primäre humane Hepatozyten.
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor.
rpm	(engl.) rotations per minute, Umdrehungen pro Minute.
RXR α	Retinoid-Rezeptor, Typ α .
SCAP	(engl.) SREBP-cleavage activating protein.
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulfate.
SRB	Sulforhodamin B.
SRE	Sterol-regulierendes Element.
SREBP	(engl.) sterol regulatory element-binding protein.
TAG	Triacylglycerine.
TBS	(engl.) Tris-buffered saline.
TEMED	Tetramethylethyldiamin.
TNF α	Tumornekrosefaktor, Typ α .
Tris	Trishydroxymethylaminometha.
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein-Partikel.
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung/ Summary	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary	2
2 Einleitung	4
2.1 Hepatischer Lipidstoffwechsel	4
2.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung	6
2.3 Herausforderungen in der Leberchirurgie	11
2.4 Genistein	12
3 Fragestellung und Zielsetzung	16
4 Material	18
4.1 Geräte	18
4.2 Verbrauchsmaterialien	19
4.3 Chemikalien	19
4.4 Ansätze	21
5 Methoden	26
5.1 Isolierung primärer humaner Hepatozyten	26
5.1.1 Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusion	26
5.1.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll [®]	28
5.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	28
5.2 Zellkultur	29
5.2.1 Induktion der <i>in vitro</i> -Steatosis	29
5.2.2 Substanzinkubation	29
5.3 Evaluation der Steatosis	30
5.4 Viabilität und Toxizität	30
5.4.1 XTT-Assay	31
5.4.2 AST-Assay	31
5.4.3 LDH-Assay	32
5.5 Metabolische Aktivität	32
5.5.1 Urea	32
5.6 mRNA-Analytik	33
5.6.1 mRNA-Isolierung mittels Trizol [®]	33

5.6.2	Reverse Transkription	33
5.6.3	Quantitative Real time-PCR	34
5.7	Proteinanalytik	35
5.7.1	Proteinextraktion	35
5.7.2	Proteinquantifizierung	35
5.7.3	Western Blot	35
5.7.4	Wiederverwendung der Membranen	37
5.8	Statistische Auswertung und Software	37
6	Ergebnisse	38
6.1	Darstellung der Spender	38
6.2	<i>In vitro</i> -Modell der Steatosis hepatis	41
6.3	Einflüsse von Fenofibrat	48
6.4	Einflüsse von Genistein	53
7	Diskussion	60
7.1	<i>In vitro</i> -Modell der Steatosis hepatis	60
7.2	Fenofibrat als Vergleichssubstanz	64
7.3	Genistein	66
7.4	Bedeutung für die Leberchirurgie	69
7.5	Limitationen	70
8	Literaturverzeichnis	i
	Eidesstattliche Erklärung	xviii
	Danksagung	xix
	Lebenslauf	xx

1 Zusammenfassung/ Summary

1.1 Zusammenfassung

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) stellt aufgrund der steigenden Prävalenz des metabolischen Syndroms nicht nur in der gesamten Medizin eine Herausforderung dar. Insbesondere in der Leberchirurgie geht eine Steatosis hepatis bei Leberteilektomien oder Transplantationen mit einem erheblichen zusätzlichen Risiko einher. Bisherige Untersuchungen zum Isoflavon Genistein deuten auf einen Nutzen in der Therapie der NAFLD hin, u.a. durch Senkung des Lipidgehalts der Leber.

In der vorliegenden Arbeit wurde an primären humanen Hepatozyten von insgesamt 16 Spendern ein *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis entwickelt und bezüglich der Zytotoxizität, der metabolischen Aktivität und der Expression der zentralen Rezeptoren PPAR α und SREBP-1c mit ihren Zielgenen CPT1L, ACSL und FASN charakterisiert. In einem zweiten Schritt wurden der PPAR α -Agonist Fenofibrat und das Isoflavon Genistein in den Konzentrationen 0, 1, 75 μ M bzw. 0, 1, 5, 10, 50, 100 μ M appliziert und Veränderungen im Lipidgehalt, in der Zytotoxizität und metabolischen Aktivität bestimmt. Des Weiteren wurde auf Transkriptions- und Proteinebene die Expression von PPAR α und SREBP-1c sowie ihrer Zielgene CPT1L, ACSL und FASN untersucht.

Die Untersuchungen ergaben ein *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis mit geringer Zytotoxizität, welches eine verstärkte Transkription von PPAR α und dessen Zielgene ACSL und CPT1L sowie eine verringerte Transkription von SREBP-1c und FASN zeigte. Auf Proteinebene zeigte sich die Erhöhung von PPAR α insbesondere im Zytosol. Die Steatosis bewirkte eine verstärkte Translokation von SREBP-1c in den Zellkern, korrelierend mit einer verringerten Proteinkonzentration im Membran-gebundenen Anteil. Die Zugabe von Fenofibrat erzielte eine Induktion von PPAR α auf mRNA- und Proteinebene, vorrangig in den nicht-steatotischen Zellen. Gleichzeitig wurde die Transkription von SREBP-1c erhöht. Die Zugabe von Genistein zeigte in höheren Konzentrationen relevante zytotoxische Effekte, während die

metabolische Aktivität wenig beeinflusst wurde. Der Fettgehalt veränderte sich unter den Bedingungen nicht. Auf mRNA-Ebene zeigte Genistein keinen eindeutigen, signifikanten Effekt auf PPAR α , CPT1L oder ACSL. Bei SREBP-1c sowie FASN konnte man jedoch in der unbehandelten und in der steatotischen Gruppe eine Verringerung durch Genistein verzeichnen. Auf Proteinebene konnte dies nur in der nicht-steatotischen Gruppe bestätigt werden. Die Konzentration an PPAR α wurde durch Genistein tendenziell erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die vorliegende Arbeit zeigte zum einen ein *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis an primären humanen Hepatozyten auf, welches keine relevante Toxizität verursachte. Zum anderen stellen die Untersuchungen von Fenofibrat und Genistein mögliche positive Einflüsse auf den hepatischen Lipidmetabolismus dar. Die Ergebnisse sind im Kontext des Modellcharakters zu sehen. Sie deuten jedoch auf einen Ansatzpunkt von Genistein hin, die NAFLD und die damit einhergehenden klinischen Konsequenzen zu behandeln.

1.2 Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a major challenge not only in medicine, considering the increasing prevalence of the metabolic syndrome. Especially in hepatic surgery, steatosis hepatis is associated with a considerable additional risk in liver resection or liver transplantation. Preliminary findings of the isoflavone Genistein indicate a beneficial effect in the therapy of NAFLD, among others by reducing lipid content of the liver.

In the present work, primary human hepatocytes by a total of 16 donors were used to develop an *in vitro* model of steatosis hepatis. It was characterised in cytotoxicity, metabolism and in the expression of the lipid receptors PPAR α and SREBP-1c as well as their target genes CPT1L, ACSL and FASN. In a second step, the PPAR α agonist Fenofibrate and Genistein were administered in concentrations of 0, 1, 75 μ M and 0, 1, 5, 10, 50, 100 μ M, respectively. Changes in lipid content, cytotoxicity and metabolic activity were determined. Furthermore, mRNA and protein content of PPAR α and SREBP-1c as well as their target genes CPT1L, ACSL and FASN were investigated.

The results revealed an *in vitro* model of steatosis hepatis with a low degree of cytotoxicity. Transcription of PPAR α as well as its target genes CPT1L and ACSL was increased, whereas SREBP-1c and FASN was lowered. On protein level, PPAR α concentration was raised, especially in the cytosolic compartment. In steatotic cells, translocation of SREBP-1c from the membranous to the nuclear compartment was increased. Therefore, induction of steatosis

enhanced the turnover of free fatty acids. Administration of Fenofibrate led to an induction of **PPAR α mRNA** and protein content, primarily in non-steatotic cells. Also, transcription of **SREBP-1c** was increased. Administration of Genistein resulted in substantial toxic effects only at high concentrations, whereas metabolic activity was unaffected. In this setting, lipid content remained unchanged by Genistein. Regarding **mRNA** content, Genistein had no clear significant effect on **PPAR α** , **CPT1L** or **ACSL**. However, Genistein led to a decrease of **mRNA** of **SREBP-1c** and **FASN**. On protein level, this was replicable only in the non-steatotic group. Protein content of **PPAR α** was slightly raised by Genistein, without statistic significance.

This work presents a conclusive *in vitro* model of steatosis hepatis in primary human hepatocytes without relevant cytotoxicity. Also, the results of Fenofibrate and Genistein administration showed possible favourable effects on hepatic lipid metabolism. The findings have to be looked at in a model setting. They however point towards an objective for Genistein to approach **NAFLD** and its clinical implications.

2 Einleitung

2.1 Hepatischer Lipidstoffwechsel

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Sie ist nicht nur für die Synthese wichtiger Plasmaproteine und die Ausscheidung von Toxinen und Stoffwechselprodukten, sondern auch für die Homöostase des Energiestoffwechsels des Körpers unerlässlich. Als eine wesentliche Schnittstelle im Lipidmetabolismus reguliert die Leber die Verteilung der Blutfette. Nach Nahrungsaufnahme im Verdauungssystem werden die Fette in Form von Chylomikronen an die Lymphe abgegeben und gelangen anschließend ins Blut. Dort werden die Lipide zu diversen extrahepatischen Geweben transportiert, welche sie über die Lipoproteinlipase aufnehmen können. Die Überstände, Remnants, gelangen zur Leber. Dort wird ein Teil als **Triacylglycerine (TAG)** in **Very-Low-Density-Lipoprotein-Partikel (VLDL)** oder **Low-Density-Lipoprotein-Partikel (LDL)** wieder exkretiert. Der übrige Teil der Lipide wird in den Hepatozyten gespeichert oder über intrazelluläre Oxidation verstoffwechselt. Im physiologischen Zustand besteht somit ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Synthese sowie Abgabe und Verwertung von Lipiden. Bei einem erhöhten Substratangebot, beispielsweise nach gesteigerter Kohlenhydratzufuhr, wird die Synthese von Lipiden verstärkt. Die Stoffwechselwege in der Leber werden auf umfangreiche Weise koordiniert. Wesentliche Transkriptionsfaktoren für das Gleichgewicht zwischen Fettsäuresynthese und -abbau sind u.a. **Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) α** und (engl.) **sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c**.

PPAR α gehört, wie auch die Subtypen β , γ und δ zu einer Gruppe von intrazellulären Steroid-hormonrezeptoren. Während **PPAR α** vornehmlich in der Leber, dem braunen Fettgewebe, dem Muskel und Herzen exprimiert wird, findet sich **PPAR γ** vor allem im Fettgewebe, im Darm, im Gehirn und in Immunzellen (112). Die Bindung eines Liganden ermöglicht die Translokation in den Zellkern und eine Dimerisierung mit dem **Retinoid-Rezeptor, Typ α (RXR α)** (92). Daraufhin bindet das Dimer an die jeweilige Promoterregion der **Desoxyribonukleinsäure (DNA)** und es werden je nach **PPAR-Subtyp** unterschiedliche Zielgene

transkribiert. Ebenso unterscheiden sich die Subtypen in der Gewebeexpression und in der Affinität von möglichen Liganden (174).

PPAR α hat eine katabole Funktion in der Regulation der Lipidhomöostase. Es führt zur erhöhten Transkription von Proteinen für die Aufnahme, Aktivierung und Degradation von Fettsäuren sowie für die Ketonkörpersynthese. Geschwindigkeits-bestimmende Enzyme im Lipidstoffwechsel sind u.a. die **Acyl-CoA-Synthetase, Leberform (ACSL)**, welche die Fettsäuren aktiviert und für weitere Stoffwechselwege zur Verfügung stellt; sowie die **Carnitin-Palmitoyl-Transferase, Typ 1, Leberform (CPT1L)**, welche die Translokation der aktivierten Fettsäuren in das Mitochondrium katalysiert (129). In den Mitochondrien erfolgt daraufhin die β -Oxidation der Fettsäuren. **PPAR α** übt somit einen senkenden Einfluss auf die Fettsäurekonzentration aus. Des weiteren übt **PPAR α** einen anti-inflammatorischen Effekt auf die Hepatozyten aus. Es verhindert beispielsweise die Aktivierung von Entzündungsfaktoren durch **NF κ B**, einem zentralen Entzündungsmediator (90).

Die **SREBPs** gehören ebenfalls zu den Steroidhormonrezeptoren. In der Gruppe wurden bisher **SREBP-1a**, **SREBP-1c** und **SREBP-2** identifiziert. Sie sind die wichtigsten Regulatoren der Fettsäure- und Cholesterolsynthese (48). Während **SREBP-2** vorwiegend die Induktion von Enzymen für die Cholesterolsynthese bewirkt, haben **SREBP-1a** und **SREBP-1c** vor allem eine Verstärkung der Fettsäuresynthese zur Folge (3). **SREBP-1a** wird besonders in der Milz, im Darm sowie in der HepG2- und diversen Fibroblasten-Zelllinien exprimiert, **SREBP-1c** dagegen vorwiegend in der Leber, im Fettgewebe und in der Muskulatur (147). In der Leber ist der Gehalt an **SREBP-1c** etwa neunmal so hoch wie der von **SREBP-1a** (147).

Die Aktivität von **SREBPs** wird auf eine komplexe Weise reguliert, welche im Detail noch nicht vollständig geklärt ist. Es ist bekannt, dass zum einen Insulin eine Aktivierung von **SREBP-1c** bewirkt (14). Dies erklärt die Suppression von **SREBP-1c** während des Fastens und der Anstieg bei Wiederaufnahme von kohlenhydratreicher Nahrung (76). Zum anderen scheint der **Liver X Receptor, Typ α (LXR α)** eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von **SREBP-1c** zu spielen (43). **LXR** ist ein nukleärer Rezeptor, welcher von diversen Sterolen, wie z.B. Cholesterin, aktiviert wird. So führt ein hoher Gehalt an Sterolen zu einer gesteigerten Synthese von Ölsäure, welche wiederum für die Speicherung und den Transport von Cholesterin benötigt wird (77).

SREBPs liegen als inaktive Vorstufen zusammen mit dem (engl.) **SREBP-cleavage activating protein (SCAP)** membranständig im endoplasmatischen Retikulum vor. Im Zuge einer Aktivierung dissoziiert der **SREBP-SCAP-Komplex** zum Golgi-Apparat, in welchem

die weitere proteolytische Spaltung erfolgt (140). Das aktive, cleaved SREBP kann daraufhin in den Zellkern translozieren und an das Sterol-regulierende Element (SRE) in einer Promotorregion der DNA binden. In Abhängigkeit von SREBP-1c werden u.a. geschwindigkeitsbestimmende Proteine der Fettsäuresynthese, wie die Fettsäure-Synthase (FASN) verstärkt transkribiert (85).

In Abbildung 2.1 ist die Regulation des hepatischen Lipidstoffwechsels vereinfacht dargestellt.

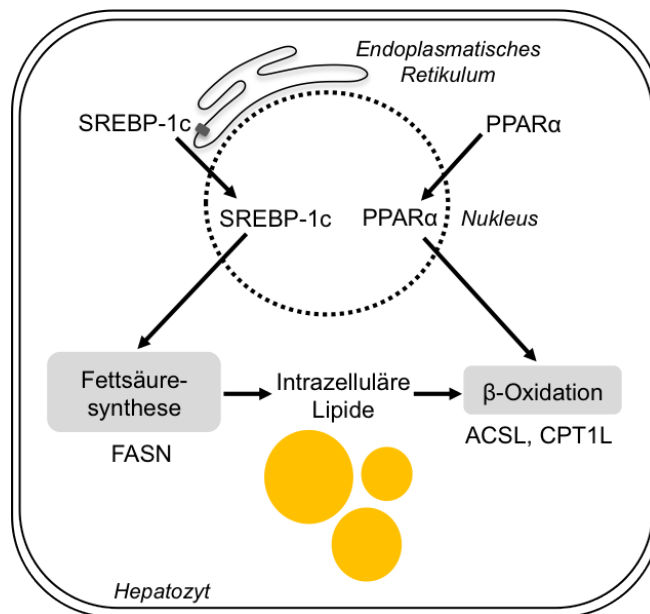


Abbildung 2.1: Auszug der physiologischen Signalwege des Lipidstoffwechsels. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Homöostase des intrahepatischen Fettsäuregehalts sowie einige der Zielgene sind aufgeführt. ACSL – Acyl-CoA-Synthase, CPT1L – Carnitin-Palmitoyltransferase, Typ 1, Leberform, FASN – Fettsäuresynthase, PPARα – Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor, Typ α, SREBP-1c – (engl.) sterol-regulatory element binding protein, Typ 1c.

2.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Der Lebenswandel in der westlichen Welt hat im letzten Jahrhundert zu einem Anstieg des durchschnittlichen Kaloriengehalts der täglichen Nahrung geführt. In der Nationalen Verzehrsstudie II wurde ermittelt, dass 36% der Männer und 31% der Frauen die empfohlene Energiezufuhr überschreiten (107). Dieses Missverhältnis zwischen Energieaufnahme und -verwertung führt zur vermehrten Speicherung im Körper, insbesondere in Form von Fett. Die Global Burden and Disease Study konnte 2013 feststellen, dass aktuell weltweit 36,9% der

Männer und 38% der Frauen übergewichtig sind (121). In Deutschland waren 2008 66% der Männer und 56% der Frauen übergewichtig sowie 20% der Bevölkerung adipös (107). Es ist daher nicht ungewöhnlich, dass ernährungsbedingte Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 und Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten chronischen Gesundheitsstörungen in Deutschland gehören. In den letzten Jahrzehnten wurde für die Konstellation von abdomineller Fettleibigkeit, arterieller Hypertonie, Dyslipidämie und Insulinresistenz der Begriff des metabolischen Syndroms eingeführt. Er unterstreicht die häufige Assoziation dieser Erkrankungen im Zusammenhang einer systemischen Dysregulation des Energiestoffwechsels. Die Ausprägung korreliert stark mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus (177). Auch dieser Symptomkomplex verzeichnet weltweit eine steigende Prävalenz (78, 117, 120).

Als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms gilt die **NAFLD** (67). Diese umfasst eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Lipidspeicherung, die Steatosis hepatis oder Fettleber, sowie die darauf aufbauende **Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)**, welche durch zusätzliche inflammatorische Prozesse gekennzeichnet ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine starke Korrelation zwischen der Ausprägung einer Fettleber und der Prävalenz von Diabetes mellitus sowie einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko besteht (166). Daher sollte bei der Beurteilung des kardiovaskulären Risikos neben Faktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie, auch bereits bestehende Organmanifestationen des metabolischen Syndroms, wie die **NAFLD**, einbezogen werden. Die asymptomatische Präsentation dieser Erkrankung und die limitierten diagnostischen Möglichkeiten machen eine Bezifferung der Prävalenz schwierig. Sie wird bei der Steatosis hepatis in der amerikanischen Gesellschaft auf 17 bis 33% geschätzt (54). In Westeuropa werden ähnliche Zahlen vermutet (21). Somit ist die **NAFLD** die häufigste benigne Lebererkrankung und die häufigste Ursache für asymptomatische Transaminasenerhöhungen (7). Patienten mit einer Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung haben ein um etwa 34% signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko als die Normalbevölkerung (1). Die Gesamtmortalität der **NAFLD** entspricht in etwa der der chronischen Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (22).

In Abbildung 2.2 sind histologische Bilder einer normalen und steatotischen Leber dargestellt. Der Steatosis hepatis der **NAFLD** liegt eine pathologische Erhöhung des intrazellulären Fettgehalts auf über 5% der Parenchymmasse zugrunde, wobei eine Infektion mit den Hepatitisviren B und C sowie ein erhöhter Alkoholkonsum ausgeschlossen werden (8). Ursachen sind in den meisten Fällen die metabolische Dysregulation, oft bezeichnet als primäre **NAFLD** (6). Außerdem können als sekundäre Ursachen chirurgische Prozeduren, wie etwa Transplantationen, parenterale Ernährung oder diverse Substanzen, z.B. Amiodaron oder Umwelttoxine, zu einer

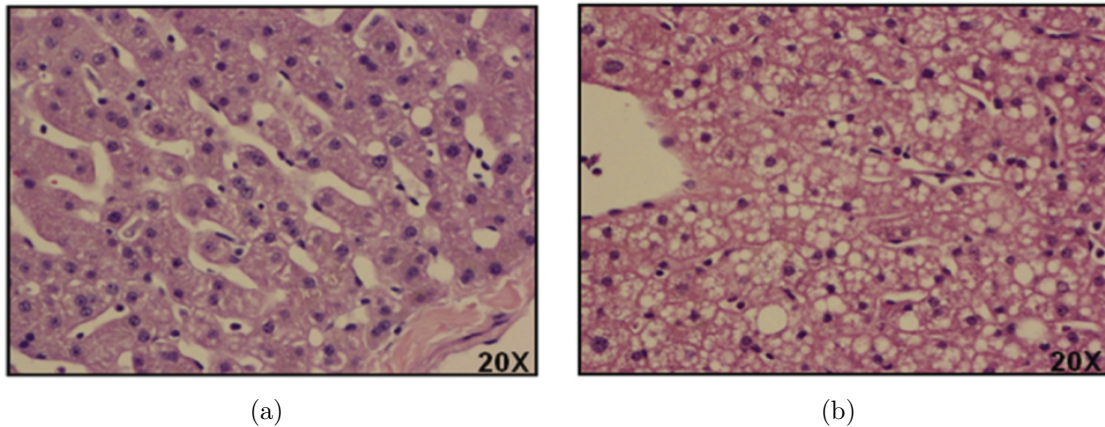


Abbildung 2.2: Histologische Bilder in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. (a) Normale Leber, (b) Steatosis hepatis. Vergrößerung 20-fach, nach *Hardwick et al., 2010* (70).

übermäßigen Fetteinlagerung in der Leber führen (7). Symptome fehlen bei der Mehrzahl der Patienten, die einzigen klinischen Zeichen sind eine Hepatomegalie und ein unklarer Transaminasenanstieg. Daher bleibt eine Fettleber in einer hohen Anzahl unerkannt und besteht oft asymptomatisch über Jahre und Jahrzehnte fort (153).

Die genaue Pathogenese der **NAFLD** ist noch ungeklärt. Bisher wird angenommen, dass im Zuge einer Insulinresistenz ein Ungleichgewicht zwischen Aufnahme und Synthese sowie Verwertung und Abgabe von Lipiden entsteht. Diese metabolische Dysregulation führt infolgedessen zu einer vermehrten Einlagerung von **TAG**. Im Rahmen der Hyperinsulinämie kommt es zu einer gestörten Glukoseaufnahme, während die Insulin-abhängige Steigerung der Lipogenese über **SREBP-1c** unbeeinflusst bleibt (64). Untersuchungen bei **NAFLD**-Patienten haben gezeigt, dass die erhöhten intrahepatischen Lipide in einem nur geringen Maße externen Ursprungs sind (51). Man nimmt an, dass infolge der Insulinresistenz vermehrt freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt werden und in der Leber zur **TAG**-Akkumulation führen (45).

Als ein weiterer Faktor für die Entstehung der **NAFLD** wird die hepatische Lipogenese angesehen. Aufgrund der peripheren Insulinresistenz bleibt postprandial ein erhöhter Glukosespiegel im Blut bestehen, welcher in der Leber zu einer Steigerung der Lipogenese führt (139). Außerdem wird vermutet, dass ein erniedrigter Spiegel an (engl.) **long chain polyunsaturated fatty acids**, mehrfach-ungesättigte langkettige Fettsäuren n-3 (**LCPUFA n-3**) die Entwicklung einer Steatosis hepatis fördert (9). **LCPUFA n-3** aktivieren in der Leber **PPAR α** und inhibieren **SREBP-1c** (35, 113). Eine Verringerung von **LCPUFA n-3** bewirkt so eine verringerte β -Oxidation und eine enthemmte Fettsäuresynthese. Studien an Biopsien

der humanen Fettleber konnten diese Veränderungen bestätigen. Sie ergaben bei **NAFLD**-Patienten eine erhöhte Expression von **SREBP-1c**, während **PPAR α** im Vergleich zu gesunden Patienten erniedrigt ist (127). Im Rahmen der **NAFLD** findet in den Hepatozyten somit zum einen eine erhöhte Aufnahme von Lipiden aus der Peripherie, zum anderen eine vermehrte endogene *de novo*-Lipogenese statt. Die bei Steatosis hepatis veränderten Stoffwechselwege sind beispielhaft in Abbildung 2.3 dargestellt.

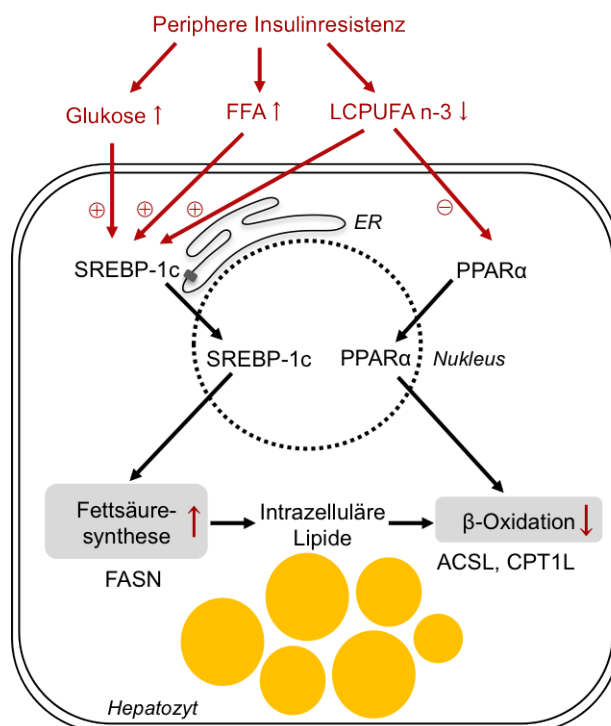


Abbildung 2.3: Signalwege des hepatischen Lipidmetabolismus bei Steatosis hepatis. Modifiziert nach *Pettinelli et al., 2011* (126). FFA – Freie Fettsäuren, LCPUFA n-3 – Mehrfach-ungesättigte langkettige Fettsäuren n-3, ER – Endoplasmatisches Retikulum, SREBP-1c – (engl.) sterol-recognition element binding protein, PPAR α – Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, Typ α FASN – Fettsäuresynthase, ACSL – Acyl-CoA-Synthetase, Leberform, CPT1L – Carnitin-Palmitoyltransferase, Typ 1, Leberform.

Bei etwa einem Drittel der Patienten findet eine Progression in das entzündliche Stadium statt, die **Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)** (72). *Day et al.* haben versucht, dies in ihrem sog. „Two-Hit-Modell“ darzustellen (41). Der erste Schritt ist dabei die zuvor beschriebene Steatosis hepatis. Auf lange Sicht werden durch die Fettakkumulation und Insulin-resistenz sowie zusätzlichen oxidativen Stress zahlreiche komplexe Entzündungsprozesse eingeleitet. Diverse Pathomechanismen, z.B. die Induktion von Cytochrom P450-Enzymen, die gesteigerte Generierung von Sauerstoffradikalen, ein erhöhter Stress des endoplas-

matischen Retikulums und die Vermittlung durch Leptin, Adiponektin und **Tumornekrosefaktor, Typ α (TNF α)** sowie ein inverser Zusammenhang mit Interleukin 10 werden zur Zeit genauer untersucht (104, 82, 134, 176). Als Folge der chronischen Entzündungsprozesse wird die Induktion des Fas-Liganden und eine Apoptose der Hepatozyten angenommen, welche zur Fibrose und im weiteren Verlauf zur Zirrhose führen können (49). Eine Progression zur fortgeschrittenen Fibrose und Zirrhose wird bei etwa einem Drittel der **NASH**-Fälle innerhalb von fünf bis zehn Jahren nach Diagnosestellung beobachtet (27). Einer kryptogenen Leberzirrhose liegt in den meisten Fällen eine unerkannte **NAFLD** zu Grunde (34). Typische Folgeerkrankungen reichen von der Leberinsuffizienz über die portale Hypertension bis zum **hepatozellulären Karzinom (HCC)** (155).

Therapeutisch stehen derzeit vorrangig Lebensstiländerungen wie Gewichtsreduktion mit Ernährungsumstellung und Bewegung zur Verfügung (36). Hier konnte nachgewiesen werden, dass sie eine Verbesserung der Steatosis und des Langzeitüberlebens der Patienten erzielen können (12). Für eine spezifische medikamentöse Behandlung der **NAFLD** gibt es noch keine klare Empfehlung (175, 99). Es konnten für diverse pharmazeutische Ansätze, u.a. Metformin, Orlistat, Vitamin E, Thiazolidindione und Statine positive Ergebnisse gezeigt werden, insbesondere weil sie auf die eng assoziierten Komorbiditäten wie Insulinresistenz bzw. Diabetes und Hyperlipidämie abzielen (119, 46, 79, 175, 108).

Auf gleiche Weise wird den Fibraten eine mögliche Rolle in der Therapie der **NAFLD** zugesagt. Sie gehören zur Gruppe der **PPAR α -Agonisten** und führen unter anderem durch Induktion von Enzymen der β -Oxidation zu einer erhöhten Umsetzung von freien Fettsäuren im Muskel und in der Leber (174). Fibrate werden therapeutisch in der Medizin bei Hyperlipidämien eingesetzt und stellen somit eine Ergänzung zu den Statinen dar, welche die Cholesterol-Synthese hemmen. Der **TAG**-Gehalt im Körper wird gesenkt und der Gehalt an Lipoproteinen vom vorteilhaften **HDL**-Typ erhöht (156). Daher wirken Fibrate v.a. protektiv auf das kardiovaskuläre System (63). Fenofibrat wird als häufigstes Fibrat verwendet. Studien über den therapeutischen Nutzen von Fenofibrat bei der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung konnten zeigen, dass es im *in vivo*-Mausmodell der **NASH** protektiv und sogar reversibel wirkt. Durch **PPAR α -Aktivierung** konnte zum einen der Grad der Verfettung, zum anderen die inflammatorische Antwort und die Anzahl der für die Fibrose kennzeichnenden Stern-Zellen gesenkt werden (150, 55). *Kleemann et al.* konnten zeigen, dass Fibrate die Interleukin-1-vermittelte Induktion von **C-reaktivem Protein (CRP)** und die Signaltransduktion von **NF κ B** senken und so der für die Progression der Erkrankung benötigten Entzündung entgegenwirken können (90). Des weiteren wurde im *in vivo*-Mausmodell beobachtet, dass Fenofibrat den Zustand der Insulinresistenz verbessern kann (32). In Abbildung 2.4 ist die

Strukturformel von Fenofibrat dargestellt.

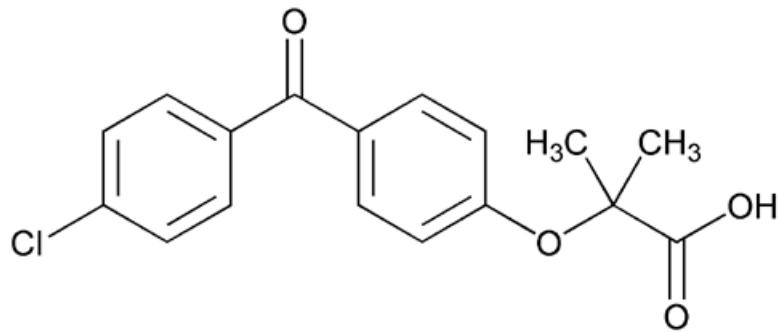


Abbildung 2.4: Strukturformel von Fenofibrat.

2.3 Herausforderungen in der Leberchirurgie

Leberverschattung ist ein bedeutungsvolles Thema in der Chirurgie. Da es oft eine Nebendiagnose ist, wird sie meist erst bei der Untersuchung aufgrund von anderen Erkrankungen bemerkt. Es wird geschätzt, dass bei Leberteilresektionen in etwa 20% der Fälle, und bei potenziellen Lebendspendern zu etwa 25% eine Hepatosteatosis vorliegt (143). Bei Leberteilresektionen wird zurzeit davon ausgegangen, dass eine Steatosis zu einer Verdoppelung des postoperativen Komplikationsrisikos führt (110). So werden beispielsweise erhöhte Raten an Infektionen, Wundheilungsstörungen sowie hepatobiliäre und gastrointestinale Komplikationen beobachtet (91).

Ein zentrales Thema der chirurgischen Forschung ist jedoch das durch Steatosis erhöhte Risiko bei Lebendspendentransplantationen. Die verbesserte Operationstechnik und eine steigende Zahl an Patienten mit Leberversagen haben zu einem enormen Anstieg des Bedarfs an Transplantaten geführt. Während im Jahre 2000 in Deutschland 570 Patienten für eine Lebertransplantation bei Eurotransplant gelistet waren, waren es 2011 schon 2064. Von den gelisteten Patienten erhalten zurzeit jedoch nur etwa die Hälfte eine Lebertransplantation (61). Die erhebliche Diskrepanz zwischen Angebot und Bedarf zwingt die Medizin die Kriterien für die Genehmigung von Transplantaten zur Spende zu erweitern. Etwa ein Drittel der Spenderlebern werden jedoch aufgrund einer Verfettung abgelehnt (33). Die Einschätzung des Risikos für die Transplantation liegt dabei bei den jeweiligen Transplantationszentren. Seit einigen Jahrzehnten werden zunehmend Organe verwendet, die aufgrund verschiedener

Eigenschaften, wie Spenderalter, Fibrosegrad oder Steatosis als minderwertig eingestuft und als „marginal“ bezeichnet werden (128).

Besonders aufgrund der steigenden Prävalenz der **NAFLD** bei potenziellen Transplantanten wird derzeit eingehend untersucht, wie nachteilig die Transplantation von steatotischen Lebern wirklich ist. Die beträchtliche Diskrepanz der Forschungsergebnisse ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass keine einheitlichen Kriterien für die Diagnose der Steatosis und die jeweilige Ausprägung verwendet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass radiologische Verfahren nicht ausreichen, sondern Biopsien notwendig sind, insbesondere um Typ und Grad der Steatosis bestimmen zu können (7). Da Biopsien der Transplantate vor der Operation meist nicht verfügbar sind, wird oft auf eine optische Begutachtung der Transplanteure oder die Bildgebung zurückgegriffen (71). Diese Beurteilung führt jedoch dazu, dass bis zu 17% der verworfenen Transplantate potenziell geeignet wären und nicht genutzt werden (130). Die zusätzliche Unterscheidung in makro- und mikroversikuläre Verfettung ist sinnvoll. Hochgradige, d.h. $> 60\%$ des Lebervolumens, makroversikuläre Steatosis konnte eindeutig mit einem stärkeren Reperfusionsschaden, einem größeren primären Transplantatversagen und einem geringeren Langzeitüberleben in Verbindung gebracht werden (144, 74). Bei moderater und leichter Steatosis sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Während manche Untersuchungen keinen signifikanten Nachteil durch eine Transplantation von leicht steatotischen ($< 30\%$), mikroversikulären Organen gefunden haben, gehen andere davon aus, dass je höher die Verfettung und die Größe der Lipidtröpfchen, desto schlechter ist das kurz- und langfristige Transplantat- sowie Patientenüberleben (66, 143). Insgesamt scheint die allgemein anerkannte Meinung jedoch zu sein, dass mit einer höhergradigen Verfettung das Risiko für peri- und postoperative Komplikationen ansteigt (109).

Ein Ansatzpunkt könnte die im Anschluss an die Entnahme des Spenderorgans durchzuführende Behandlung mit geeigneten Substanzen sein, welche zum einen die durch die Behandlung vergleichsweise längere Ischämiezeit auf ein Minimum begrenzen und zum anderen die Qualität des Organs und damit das postoperative Überleben der Patienten entscheidend verbessern kann.

2.4 Genistein

Genistein ist eine seit langer Zeit bekannte pflanzliche Substanz. Es wurde erstmals 1899 aus dem Färber-Ginster (lat. *Genista tinctoria*) isoliert. Auch in diversen anderen Pflanzen, wie der Sojabohne, der Ackerbohne, im Rotklee und in Lupinen ist Genistein enthalten (83). In

zahlreichen epidemiologischen Studien wurde die These gestellt, die geringere Prävalenz von bestimmten Krebsarten und Hyperlipidämie in Asien, verglichen mit westlichen Ländern, sei auf die sojareiche Ernährungsweise der Asiaten zurückzuführen (145, 94, 161). Daher werden die einzelnen Substanzen der Sojabohne, insbesondere die Isoflavone, eingehend untersucht. Genistein ist eines der wichtigsten Isoflavone der Sojabohne. Die chemische Struktur besteht aus einem Isoflavon mit drei Hydroxylgruppen, siehe Abbildung 2.5.

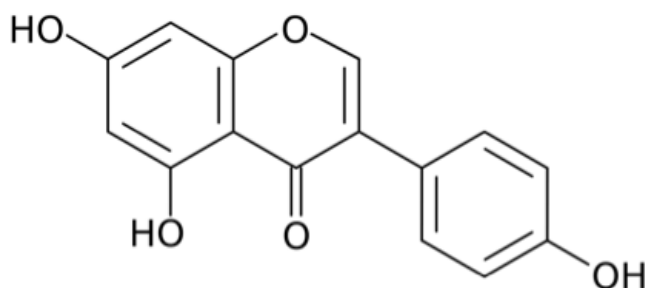


Abbildung 2.5: Strukturformel von Genistein.

Die Bioverfügbarkeit von Genistein variiert stark in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Enzymgenetik, Ernährungsgewohnheiten und Darmflora des Menschen sowie der Zubereitungsform von Genistein (169, 137, 100). Bei einmaliger oraler Aufnahme von 3,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht konnte im Menschen ein maximaler Plasmaspiegel von 4 μM nach etwa 8,5 Stunden erreicht werden (89). Die Plasmahalbwertszeit betrug dabei 6 Stunden. Genistein wird im Darm von β -Glukosidasen hydrolysiert und absorbiert. In der Leber wird es zunächst zu Dihydrogenistein und 6-Hydroxy-O-Desmethylangolensin verstoffwechselt und fast vollständig mit Glucuronsäure und Sulfat konjugiert (93). Anschließend werden die Metabolite vorwiegend über den Urin, ein geringer Anteil über die Galle ausgeschieden (89, 136). Auch die Exkretion ist einer hohen individuellen Variation ausgesetzt (84).

Genistein ist ein Phytoestrogen aufgrund der nachgewiesenen Eigenschaft, in den Estrogen-signalweg einzugreifen (105, 58, 25, 53, 115). Bei gleicher Konzentration hat Genistein eine etwa neunfach höhere Affinität zu dem Estrogenrezeptor β als zum α -Rezeptor. Die relative Affinität von Genistein zum Estrogenrezeptor α ist etwa 6% und die zum Estrogenrezeptor β etwa 150% von der des β -Estradiols (37). So kann Genistein in Abhängigkeit von Rezeptor-status und Estrogenkonzentration in verschiedenen Geweben sowohl pro als auch anti-estrogene Effekte haben. Nachgewiesen wurden positive Einflüsse auf das hormonabhängige Mammakarzinom und das Prostatakarzinom (158, 125, 50, 20). Des Wei-

teren wurde in klinischen Studien bei Genisteinanwendung eine Verbesserung menopausaler Symptome beobachtet, u.a. eine Verminderung des postmenopausalen Knochenabbaus und eine Verringerung von Hitzewallungen (118, 98, 4, 10). In einigen Studien an Brustkrebs-Zelllinien und *in vivo*-Tierversuchen wurden proliferative Effekte beobachtet, die als potenziell kanzerogen gewertet wurden (2, 42). Insgesamt wird die Anwendung von Genistein bei post-menopausalen Frauen für mindestens drei Jahre als unbedenklich bewertet (158). In den USA wurde Genistein nur zum Teil durch die (engl.) Food and Drug Administration, US-amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) zugelassen (18). In Deutschland hat das Bundesministerium für Risikobewertung die Belege für die Wirksamkeit und Sicherheit von Genistein für unzureichend erklärt (132).

Bei Genistein-Anwendung wurden jedoch auch Effekte beobachtet, die offensichtlich nicht durch Estrogenrezeptoren vermittelt wurden. So wird Genistein eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. Potenzielle Mechanismen sind die Reaktion mit reaktiven oxidativen Spezies, die Vorbeugung von oxidativen DNA-Schäden, die Reduktion der Hypermethylierung der DNA während der Karzinogenese und/oder die Induktion von antioxidativen Genen, u.a. NF κ B und ERK1/2, welche an diversen inflammatorischen Signalwegen beteiligt sind (167, 24, 101, 116, 96). Auch wurde eine Inhibition der Protein-Tyrosinkinase sowie der Topoisomerase I und II nach Genisteingabe festgestellt, welche wahrscheinlich zur antikanzerogenen Wirkung von Genistein beitragen (103, 13). Des Weiteren hat man zahlreiche Veränderungen in der Blutgerinnung, Angiogenese, Proliferation sowie Zytokin- und Wachstumsfaktoren-vermittelte Zellaktivitäten beobachtet (171, 142, 60, 59).

In den letzten Jahren erlangte Genistein Aufmerksamkeit durch die Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen, welche auf niedrigere Blutfettwerte und verminderter Arteriosklerose zurückgeführt wurden (159, 151). Seit langem ist die Cholesterolsenkende Wirkung von Sojaprodukten bekannt (29). Studien diesbezüglich zeigten eine signifikante Senkung von Serum-Gesamt-Cholesterolemie, LDL-Cholesterolemie und TAG durch Anwendung von Sojaprotein (5). Untersuchungen über die ursächlichen Substanzen, d.h. ob diese Effekte durch Phytoestrogene allein oder nur in Verbindung mit Sojaprotein ausgelöst werden, treffen jedoch teilweise gegensätzliche Aussagen (5, 165, 106). Auch die Untersuchungen über die Mechanismen der potenziellen Lipidsenkung, haben bis dato noch zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt (138, 152, 86). Untersucht werden sowohl Einflüsse auf das Fett- als auch auf das Lebergewebe (38).

Der Einfluss von Genistein auf das Fettgewebe variiert je nach Konzentration. Studien an Adipozyten-Zelllinien und humanen Prä-Adipozyten haben herausgefunden, dass Genistein

in Konzentrationen bis 10 μM die Lipogenese hemmt und die Lipolyse fördert (157). Diese Effekte werden vor allem durch den Estrogenrezeptor vermittelt. In höheren Konzentrationen bindet Genistein an $\text{PPAR}\gamma$ und bewirkt damit eine Estrogenrezeptor-unabhängige Stimulierung der Lipogenese (39). Außerdem könnte Genistein einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und dadurch eine Hemmung der Adipozytendifferenzierung ausüben (97). Studien über die Effekte von Genistein auf die Leber sind nicht eindeutig. Während manche *in vivo*-Studien eine Senkung des TAG -Gehalts der Leber beobachten konnten, haben andere keinen Einfluss durch die Administration von Genistein sehen können (124, 88, 152). Auch über die Mechanismen ist bisher kein Konsens gefunden worden. Neben dem direkten Einfluss auf den hepatischen Lipidstoffwechsel wurden außerdem Änderungen des antioxidativen Systems, des mitochondrialen Energiemetabolismus und des Schilddrüsenhormonstoffwechsels beobachtet (17, 95, 152).

3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung ist ein zunehmendes Krankheitsbild, nicht nur in der westlichen Welt. Aufgrund der begrenzten Therapiemöglichkeiten, des hohen Komplikationsrisikos für operative Eingriffe und der schwerwiegenden chronischen Folgen wird dieser Erkrankung intensive Forschung gewidmet. Die Isoflavone der Sojabohne haben sich in den letzten Jahrzehnten als eine vielversprechende Substanz für die Behandlung von neoplastischen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen herausgestellt. Mögliche positive Einflüsse auf die **NAFLD** wurden Gegenstand weiterer Forschung. Diverse *in vivo*- und *in vitro*-Studien haben jedoch unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Wirksamkeit und zugrunde liegender Mechanismen ergeben. Eine hohe Aussagekraft wird den Untersuchungen mit primären humanen Zellen zugeschrieben. So können Änderungen durch Spezies-typische Unterschiede und durch Immortalisierung veränderte Stoffwechselwege vermieden werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Genistein auf den hepatischen Lipidstoffwechsel in primären humanen Hepatozyten zu untersuchen. Dazu wurde zunächst ein *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis etabliert. Im folgenden Schritt wurden die Zellen der steatotischen und der unbehandelten Kontrollgruppe mit Genistein in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Um einen Vergleich mit einer pharmazeutisch bereits etablierten Substanz herstellen zu können, die einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweist, wurde die gleiche Vorgehensweise für Fenofibrat gewählt. Eine Übersicht des Arbeitsablaufs ist in **Abbildung 3.1** ersichtlich.

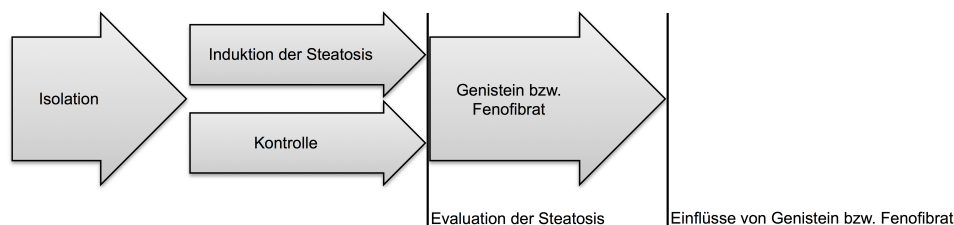


Abbildung 3.1: Arbeitsablauf. Primäre humane Hepatozyten wurden aus Resektaten isoliert. Daraufhin folgte eine Kultivierung in Zellkulturmedium mit und ohne Zusatz von freien Fettsäuren. Anschließend wurden beide Gruppen mit Fenofibrat oder Genistein in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

Die Zellen wurden in Bezug auf die Viabilität, die Membranintegrität, die metabolische Aktivität sowie den Lipidgehalt charakterisiert. Außerdem wurden auf Transkript- sowie auf Proteinebene die zentralen Marker des hepatischen Lipidmetabolismus untersucht. **PPAR α** wurde als Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Lipolyse ermittelt. Außerdem wurden die für die β -Oxidation bedeutenden Enzyme **ACSL** und **CPT1L** untersucht. Für die Lipogenese wurde **SREBP-1c** als zentraler Transkriptionsfaktor sowie **FASN** als essentielles Enzym der Fettsäuresynthese ermittelt. Das Spektrum der Untersuchungsmethoden ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

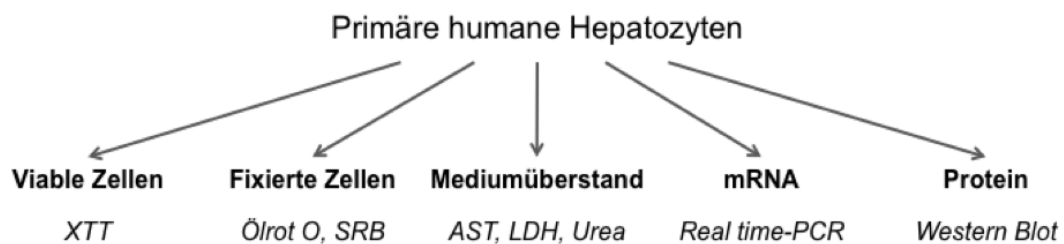


Abbildung 3.2: Methodik. XTT – XTT Viabilitätstest, SRB – Sulforhodamine B, AST – Aspartat-Aminotransferase, LDH – Laktatdehydrogenase, PCR – (engl.) polymerase chain reaction.

4 Material

Die für die Versuche verwendeten Gerätschaften, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien werden getrennt aufgeführt.

4.1 Geräte

Knopfkanülen	Amefta, Limburg (D)
Peristaltikpumpe Cyclo I	Roth, Karlsruhe (D)
Silikonschläuche	Roth, Karlsruhe (D)
Umwälzthermostat Typ B	Lauda, Lauda-Königshofen (D)
Büchner-Trichter 127 C	Roth, Karlsruhe (D)
Elektronische Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, München (D)
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf (D)
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena (D)
Pipette	Eppendorf Research, Hamburg (D)
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf Research, Hamburg (D)
Dispenser Multipette plus	Eppendorf Research, Hamburg (D)
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen (D)
Lichtmikroskop BH-2	Olympus, Hamburg (D)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin (D)
pH-Meter CG840	Schott, Mainz (D)
Spektralphotometer Fluostar Optima	BMG, Offenburg (D)
Plattformschüttler Promax 2020	Heidolph, Schwabach (D)
Tischzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg (D)
Elektrophorese-Kammer	Biorad, München (D)

Gel-Glasplatten Mini Protean System	Biorad, München (D)
Kassette Mini Trans-Blot	Biorad, München (D)
Lumineszenz-Detektor VersaDoc Model 4000	Biorad, München (D)
Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen (D)
Thermocycler Veriti 96-Well	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Real time PCR-Cycler Step One Plus	Applied Biosystems, Foster City (USA)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Histoacryl [®] -Gewebekleber	B. Braun, Aesculap AG, Tuttlingen (D)
Einmalskalpell	Feather, Osaka (J)
Eppendorfgefäße (1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Falcon [®] -Röhrchen (15, 50 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Glaspipetten (5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
PCR-Platten (96-Well) MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City (USA)
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Zellkulturplatten (12-, 96-Well)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkultur-Dishes (60 x 15 mm)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Dispenserspitze Combitips plus (5, 10 ml)	Eppendorf Research, Hamburg (D)
Zellschaber	TPP, Trasadingen (CH)
Filterpapier	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (GB)
Nitrozellulose-Membran	Biorad, München (D)

4.3 Chemiekalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Reinheit p.a. bezogen.

William's Medium E	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
Easycoll [®] Percoll	Biochrom AG, Berlin (D)
PBS	PAA Laboratories, Pasching (A)

BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Methanol	J.T. Baker, Deventer (NL)
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sodiumpalmitat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ölsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Kollagen	Rattenschwänze aus eigenem Tierlabor
Fenofibrat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Genistein	Roth, Karlsruhe (D)
Ölrot O	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (D)
Formaldehyd (3,7%)	Herbeta Arzneimittel, Berlin (D)
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Essigsäure	Merck, Darmstadt (D)
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
XTT Cell Proliferation Kit II	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Bio Cal [®] E Standard	Analyticon, Lichtenfels (D)
LDH Fluitest [®] Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
AST Fluitest [®] Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
Urea Fluitest [®] Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
Subcellular Protein Fractionation Kit	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Kupfer-Sulfat	Merck, Darmstadt (D)
BC Assay Reagent A	Interchim Uptima, Montluçon Cedex (F)
Protein-Ladder PageRuler [®]	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Tween 20	Merck, Darmstadt (D)
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt (D)
Reblotting-Reagenz ReBlot Plus	Millipore, Temecula (USA)
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Ethanol	Herbeta Arzneimittel, Berlin (D)
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
RNA-Aufreinigungs-Kit DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
cDNA-Synthese-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
DEPC	Roth, Karlsruhe (D)

4.4 Ansätze

Aqua dest. wurde aus der eigenen Reinstwasseranlage entnommen.

Perfusionslösung I:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
<u>Stammlösung</u>		
Aqua dest.	-	-
Natrium Chlorid	142 mM	Merck, Darmstadt (D)
Kalium Chlorid	6,7 mM	Merck, Darmstadt (D)
HEPES	10 mM	Roth, Karlsruhe (D)
Die Perfusionslösung I wurde zunächst 10-fach konzentriert angesetzt und der pH auf 7,5 eingestellt. Vor Verwendung wurde es 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die folgenden Reagenzen zugesetzt.		
<u>mit EGTA</u>		
EGTA	2,5 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Der pH wurde auf 7,4 eingestellt und die Perfusionslösung I mit EGTA wurde steril filtriert.		
<u>ohne EGTA</u>		
FCS	10% (v/v)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)

Perfusionslösung II:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
<u>Lösung 1</u>		
Aqua dest.	-	-
Natrium Chlorid	67 mM	Merck, Darmstadt (D)
Kalium Chlorid	6,7 mM	Merck, Darmstadt (D)
HEPES	100 mM	Roth, Karlsruhe (D)
BSA	0,5% (m/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<u>Lösung 2</u>		
Aqua dest.	-	-
Calciumchlorid-Dihydrat	4,8 mM	Merck, Darmstadt (D)
Die Perfusionslösung II wurde vor Verwendung aus 1300 ml Lösung 1 und 150 ml Lösung 2 hergestellt. Der pH wurde auf 7,6 adjustiert und mit Aqua dest. auf 1500 ml aufgefüllt. Am Isolationstag wurde Kollagenase P zugesetzt und bei 37° C bis zur Verwendung bereitgehalten.		
Kollagenase P	100 mg/ 100 ml	Roche Diagnostics, Mannheim (D)

Hepatozyten-Inkubationsmedium (INK-Medium):

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Williams Medium E	-	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
Penicillin / Streptomycin	100 U/l / 100 µg/ml	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
Sodium Pyruvat	1 mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
HEPES	15 mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
FCS	10% (v/v)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
MEM NEAA	1% (v/v)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
Fortecortin	1,6 µM	Merck, Darmstadt (D)
Insulin (human)	1 mM	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main (D)

Die Medien wurden steril filtriert und bei 4° C für max. 2 Wochen aufbewahrt. Vor Verwendung wurden sie auf 37° C erwärmt.

Low-FCS-INK-Medium (Kontroll-Medium):

Ansatz siehe INK-Medium, 5% FCS anstatt 10% FCS.

FFA-Medium:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Low-FCS-INK-Medium	-	-
Ölsäure	0,67 mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)
Palmitinsäure	0,33 mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe (D)

Probenpuffer:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	0,4 M	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SDS	10% (m/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycerol	50% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Bromphenol Blau	0,025% (m/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
2-Mercaptoethanol	25% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Sammelgel und Trenngel:

Reagenz	Konzentration		Hersteller
	<i>Trenngel</i>	<i>Sammelgel</i>	
Aqua dest.	4,7 ml	3,4 ml	-
Acrylamid Rotiphere Gel	2,7 ml	0,83 ml	Roth, Karlsruhe (D)
Tris base 1,5M pH 8,8	2,5 ml	-	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Tris base 1,0M pH 6,8	-	0,63 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SDS 10% (m/v)	0,1 ml	50 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
APS	50 μ l	50 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
TEMED	5 μ l	5 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Running Buffer (5x):

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	125 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycin	1,25 M	Serva, Heidelberg (D)
SDS	0,5% (m/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Der pH wurde auf 8,9 eingestellt. Vor Verwendung wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, um Running Buffer (1x) zu erhalten.

Blotting Buffer:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	50 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycin	380 mM	Serva, Heidelberg (D)
SDS	0,1% (m/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Methanol	20% (v/v)	J.T. Baker, Deventer (NL)

Poinceau S-Lösung:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	250 ml	-
Poinceau S	5 g	Merck, Darmstadt (D)
Trichloressigsäure	75 g	Merck, Darmstadt (D)
Sulfosalicylsäure	75 g	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

TBS (5x):

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	50 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Natriumchlorid	150 mM	Merck, Darmstadt (D)

TBS wurde zunächst in 5-facher Konzentration angesetzt, der pH wurde auf 7,5 eingestellt. Vor Verwendung wurden 200 ml von TBS (5x) mit 800 ml Aqua dest. verdünnt und vorsichtig 1 ml Tween 20 zugesetzt, sodass sich TBST-Puffer ergab.

ECL-Lösung:

Reagenz	Konzentration	Hersteller
<u>Lösung 1</u>		
Tris base (0,1 M)	2,5 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Wasserstoffperoxid	1,5 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
<u>Lösung 2</u>		
Tris base (0,1 M)	2,5 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Luminol (250 mM)	25 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
p-Coumarinsäure (90 mM)	11 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Antikörper:

Bezeichnung	Spezies	Verd.	Inkubation	Hersteller
Anti-PPAR α	Maus	1:1000	Über Nacht	Dianova, Hamburg (D)
Anti-SREBP-1c	Maus	1:200	2 h	Biozol, Eching (D)
Anti- α -Tubulin	Maus	1:2000	1 h	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Anti-p84	Maus	1:2000	1 h	Abcam, Cambridge (GB)
Anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Kaninchen	1:1000	1 h	Cell Signaling, Danvers (USA)
Anti-mouse	Schaf	1:4000	1 h	Amersham, Freiburg (D)
Anti-rabbit	Esel	1:4000	1 h	Dianova, Hamburg (D)

Verd. - Verdünnung

TaqMan[®] Gene Expression Assays:

Gen	Bestellnummer	Reaktion
PPAR α	#Hs00947539_m1	250
SREBP-1c	#Hs01088691_m1	250
CPT1L	#Hs00912671_m1	75
ACSL	#Hs00242530_m1	75
FASN	#Hs01005622_m1	75
β -Actin	#Hs99999903_m1	750

Real time-PCR-Ansatz (1x):

Reagenz	Menge	Hersteller
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	5 μ l	Applied Biosystems, Foster City (USA)
TaqMan [®] Gene Expression Assay	0,5 μ l	Applied Biosystems, Foster City (USA)
DEPC-Wasser	3,5 μ l	-
cDNA (50 ng)	1 μ l	-

5 Methoden

Es werden die für die Untersuchungen durchgeführten Methoden kurz ausgeführt. Die zuvor aufgezählten Materialien wurden hierzu verwendet.

5.1 Isolierung primärer humaner Hepatozyten

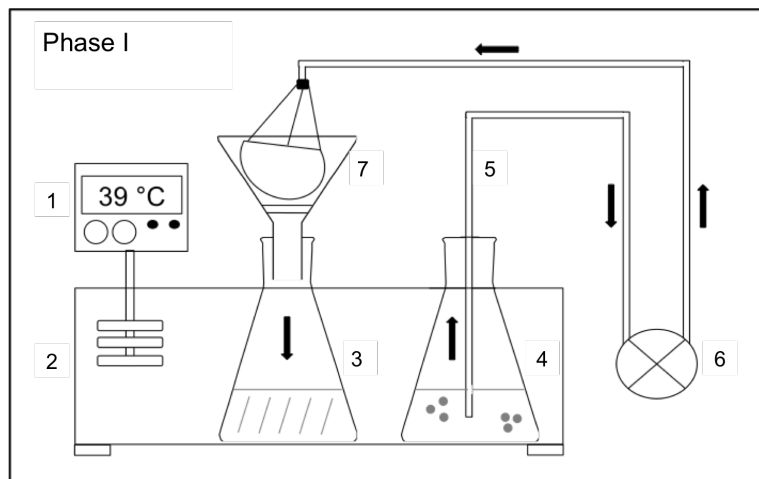
Das humane Material wurde nach Bereitstellung durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationsmedizin Charité, Campus Virchow Klinikum, verwendet. Die Präparate wurden gemäß Votum der Ethikkommission der Charité Campus Virchow Klinikum vom 23.07.2009 (Antrag Nr. EA2/076/09) und nach Einverständniserklärung der Patienten bezogen. Es wurden Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, HIV sowie Resektate mit Echinococcuszysten oder einer Leberzirrhose Child B oder C ausgeschlossen. Bei Leberteilresektionen von Patienten mit malignen oder benignen Raumforderungen wurden vom Resektat ein 10 bis 40 g schweres, makroskopisch tumorfreies Präparat entnommen. Der Transport erfolgte in William's Medium E bei 4°C. Die Warmischämiezeit lag bei max. 30 min, die Kaltischämiezeit bei max. 20 min.

Unter sterilen Bedingungen wurde die Extraktion der [primären humanen Hepatozyten \(PHH\)](#) nach den unter 4.1.1 bis 4.1.3 erläuterten Verfahren vorgenommen.

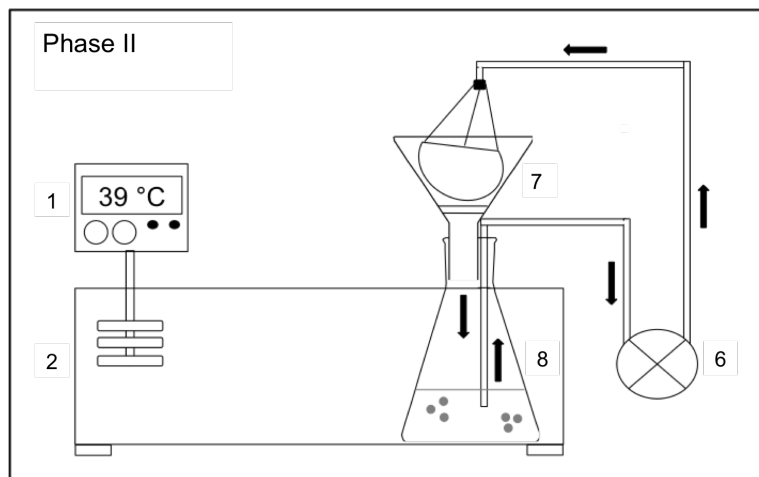
5.1.1 Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusion

In die vorhandenen Gefäßöffnungen des Präparat wurden drei bis sieben Knopfkanülen mit Histoacryl®-Gewebekleber befestigt. Verbleibende größere Gefäß- und Gallengangsöffnungen wurden ebenfalls mit Gewebekleber versiegelt, um einen Druckgradienten zu erzielen. Danach erfolgte die Perfusion, siehe Abbildung 5.1. Der erste Perfusionsschritt erfolgte mit ca. 500 ml Perfusionslösung I mit [EGTA](#) bei 37°C mit 25 ml/min, siehe Abbildung 5.1 (a). Das Gewebe wurde so erwärmt und das Blut entfernt. [EGTA](#) bewirkte dabei durch Bindung von Calcium

zum einen eine Hemmung der Koagulation, zum anderen eine partielle Auflösung der Zell-Zell-Kontakte. Nach 20 min wurde der zweite Perfusionsschritt eingeleitet, in welchem die Kollagenase-haltige Perfusionslösung II das bindegewebige Gerüst des Präparats zersetzte, sodass die Hepatozyten herausgetrennt werden konnten, siehe Abbildung 5.1 (b). Die Perfusion erfolgte als Rezirkulation bei 25 ml/min für 8 bis maximal 15 min. Der Perfusionsschritt wurde abgebrochen, wenn die Konsistenz des Präparats eine irreversible Verformung durch Pinzettendruck zuließ.



(a) Phase I mit EGTA-haltiger Perfusionslösung I



(b) Phase II mit Kollagenase-haltiger Perfusionslösung II

Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusion. Komponenten: 1 - Umwälzthermostat, 2 - Wasserbad, 3 - Behälter mit Perfusionslösung I und u.a. herausgelöstem Blut, 4 - Reservoir mit EGTA-haltiger Perfusionslösung I, 5 - Silikonschlauch, 6 - Peristaltikpumpe, 7 - Leberteilresektat mit Knopfkanülen, 8 - Behälter mit Kollagenase-haltiger Perfusionslösung II.

Anschließend wurde das Präparat in einer Petrischale an der Resektionsfläche mit einem Skalpell aufgeschnitten. Perfusionslösung I ohne EGTA mit einem hohen Anteil an FCS diente zur Beendigung der Proteolyse. Das Gewebestück wurde in der Perfusionslösung I vorsichtig bewegt, sodass die Hepatozyten sich herauslösten und in Suspension übergingen. Diese wurde über sterile Gaze filtriert, in gekühlte 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt und für 5 min bei 50 *g* und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in INK-Medium resuspendiert und bei 4°C gelagert.

5.1.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll®

Um eine weitere Aufreinigung der viablen Hepatozyten zu erzielen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll® durchgeführt. 15 ml PBS wurden mit 5 ml Percoll® in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen gründlich gemischt. Jeweils 5 ml der Zellsuspension wurden pro Falcon®-Röhrchen langsam und vorsichtig überschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 1280 *g* und 4°C. Es ergaben sich zwei Schichten, die obere bestand aus toten Zellen, Zelltrümmern und Percoll®, die untere stellte das Zellpellet der viablen Zellen dar. Die obere Schicht wurde vorsichtig abgesaugt und die Pellets zusammen in INK-Medium resuspendiert und bei 4°C gelagert.

5.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Jeweils vor und nach Percoll®-Aufreinigung wurden die Hepatozyten in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 900 µl Trypanblaulösung (0,1% (m/v)) vermischt. Der Farbstoff dringt durch defekte Zellmembranen und bindet an intrazelluläre Proteine, viable Zellen werden nicht angefärbt. Es wurden vier Quadranten ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl ergab sich folgendermaßen:

Viable Zellzahl = gezählte viable Zellzahl · 10⁴ · Verdünnungsfaktor 10 · Volumen

$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{\text{viable Zellzahl} \cdot 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

5.2 Zellkultur

Nach Isolation der Hepatozyten wurden die Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät. Diese wurden vor Gebrauch für min. 30 Minuten mit einer 1%-igen Kollagenlösung (v/v in PBS) beschichtet, sodass die Zellen eine Matrix zur Adhäsion zur Verfügung hatten. Um eine Dichte von etwa 100.000 viablen Zellen / cm² zu erreichen, ergaben sich folgende Zellzahlen:

Zellkulturoberfläche	Zellzahl pro Oberfläche
60 mm Zellkultur-Dish	2,1 Mio.
12-Well-Platte	400.000
96-Well-Platte	33.300

Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C, 21% Sauerstoff und 5% CO₂ kultiviert. Nach 1,5 Stunden Kultivierung in INK-Medium zeigten die Zellen eine ausreichende Adhärenz, sodass ein Mediumwechsel durchgeführt und für weitere 12 - 16 Stunden mit INK-Medium inkubiert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit PBS gespült.

5.2.1 Induktion der *in vitro*-Steatosis

Das *in vitro*-Steatosis-Modell an Primären humanen Hepatozyten (PHH) wurde in Anlehnung an das Modell von *Gómez-Lechón et al.* entwickelt (65). Als Kontrolle dienten PHH, die nach der Behandlung mit INK-Medium für 24 Stunden auf Low-FCS-INK-Medium gesetzt wurden. Die anderen Zellen wurden für 24 Stunden mit (engl.) *free fatty acids*, freie Fettsäuren (FFA)-Medium behandelt. Die Gesamtkonzentration an FFA lag bei 1 mM, wobei 0,67 mM Ölsäure und 0,33 mM Palmitinsäure war. Die Ölsäure-Stammlösung entsprach 50 mM Oleat in PBS, die Palmitinsäure-Stammlösung 50 mM Palmitat in Methanol. Vor Verwendung des Mediums wurde es für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eine gründliche Emulsion zu gewährleisten.

5.2.2 Substanzinkubation

Nach Induktion der Steatosis wurde nach Versuchsplan ggf. eine Substanzinkubation mit Genistein oder Fenofibrat durchgeführt. Die Stammlösung von Genistein hatte eine Konzentration von 120 mM in DMSO. Für Fenofibrat wurde eine 15 mM-Stammlösung in DMSO

hergestellt. Die Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert. Vor Verwendung wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit **DMSO** angesetzt. Danach wurde 1:200 mit Low-**FCS**-**INK**-Medium verdünnt, sodass die finale **DMSO**-Konzentration 0,05% (v/v) betrug. Die finalen Konzentrationen an Genistein betragen 0, 1, 5, 10, 50 und 100 µM, die von Fenofibrat 0, 1 und 75 µM. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit der Substanz inkubiert.

5.3 Evaluation der Steatosis

Um die intrazelluläre Ablagerung der Lipide darzustellen, wurde eine Ölrot-Färbung durchgeführt. Der Diazofarbstoff bindet an neutrale Lipide und färbt sie rot. Eine Stock-Lösung wurde aus 0,7 g Ölrot O und 200 ml Isopropanol hergestellt. Vor der Färbung wurde eine Ölrot O-Arbeitslösung durch Verdünnung der Stock-Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 3:2 gebildet. Zuerst wurden die Zellen für min. 30 Minuten mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für min. 20 Minuten mit Ölrot O-Arbeitslösung inkubiert. Nicht fixierter Farbstoff wurde in drei Waschschritten mit Leitungswasser entfernt. Danach konnte die Färbung lichtmikroskopisch beurteilt werden. Die Zellen wurden getrocknet. Danach konnte der fixierte Farbstoff mittels einer definierten Menge an Isopropanol (1000 µl / Well einer 12-Well-Plate) herausgelöst werden. Die spektralphotometrische Bestimmung erfolgte bei 492 nm.

Im Anschluss wurden die Zellen zur Zellzahlbestimmung mit **Sulforhodamin B (SRB)** angefärbt. Der Farbstoff bindet an protonierte Aminosäuren. Somit kann eine Korrelation mit dem Proteingehalt und somit indirekt der Zellzahl erstellt werden. Die fixierten Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenkinkubator mit **SRB**-Lösung (0,4% (m/v)) behandelt. Anschließend wurde nicht gebundener Farbstoff mit mehrfachem Waschen mit Essigsäurelösung (1% (v/v)) entfernt. Das gebundene **SRB** wurde dann mittels 10-minütiger Inkubation mit 10 mM-**Tris**-Lösung herausgelöst. Die Menge des herausgelösten Farbstoffs wurde spektralphotometrisch bei 580 nm bestimmt. Der Hintergrund bei 690 nm wurde davon subtrahiert.

5.4 Viabilität und Toxizität

Die Einschätzung der Viabilität und Toxizität erfolgte mittels **XTT** Assay und den enzymkinetischen Messungen von **AST** und **LDH** aus dem Zellkulturmedium verwendet.

5.4.1 XTT-Assay

Als Zytotoxizitätstest wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) von Roche verwendet. Dieses verwendet das gelbe Tetrazolium-Salz 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT), welches in den Mitochondrien einer vitalen Zelle zu orangenem Formazan umgesetzt wird. Dies geschieht nur in vitalen Zellen, sodass das gebildete Formazan direkt mit der Zahl der viablen Zellen korreliert (Herstellerangaben).

Der Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. XTT labeling reagent wurde mit dem XTT electron-coupling reagent im Verhältnis 50:1 gemischt und anschließend 50 μ l des Gemisches auf ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation von 24 Stunden im Inkubator. Anschließend wurde die spektralphotometrische Absorption bei 492 nm im Photometer gemessen.

5.4.2 AST-Assay

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) gehört zu den Transaminasen der Leberzelle, welche sowohl im Zytoplasma als auch im Mitochondrium vorhanden sind. Bei Schädigung der Zelle wird das Enzym zunächst aus dem Zytoplasma, bei schwerer Schädigung auch aus den Mitochondrien freigesetzt. Durch Messung im Zellkulturmedium können so Rückschlüsse auf das Ausmaß der Zellschädigung gezogen werden. Die Bestimmung von AST erfolgte mit dem Fluitest[®] Kit von Analyticon. Der Test koppelt das Reaktionsprodukt von Oxalglutarat an eine zweite Indikatorreaktion durch die Malatdehydrogenase. Spektralphotometrisch wird dabei die Absorption von NADH gemessen, welches zu NAD⁺ umgesetzt wird. Der Bio Cal[®] E-Standard wurde in einer 1:2-Verdünnungsreihe angesetzt, sodass Konzentrationen zwischen 3,11 und 199 U/l als Referenz dienen. Der Überstand des Zellkulturmediums wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Die Reagenzien 1 und 2 des Kits wurden im Verhältnis 5:1 gemischt und bei 37°C für mindestens 10 min inkubiert. 40 μ l des verdünnten Standards und 40 μ l der Medium-Proben wurden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Danach wurde 200 μ l des Reagenzien-Gemisches auf jedes Well gegeben. Unverzöglich danach begann die kinetische Messung bei einer Wellenlänge von 340 nm. Zu 6 Zeitpunkten im Abstand von je 30 Sek. wurde die Umsetzung der Reagenzien gemessen. Dadurch konnte, mit Bezug zum Standard, auf die Enzymaktivität im Medium geschlossen werden.

5.4.3 LDH-Assay

Die **Laktatdehydrogenase (LDH)** wird, wie auch die **AST**, bei Zellschädigung freigesetzt. Sie wird demzufolge auch als Anhalt dafür genommen, wie stark die Zellen durch bestimmte Behandlung oder Substanzen gestresst werden. Die Bestimmung der **LDH** erfolgte aus den gleichen Medium-Proben nach Bestimmung der **AST**. Mit dem Fluitest[®] Kit von Analyticon wurde die Aktivität der **LDH** durch kinetische Absorptionsbestimmung des direkten Reaktionsprodukts **NADH** gemessen. Die Standards wurden ebenfalls in einer 1:2-Verdünnungsreihe angesetzt, sodass Konzentrationen zwischen 3,5 und 224 U/l als Standards dienten. Die Messung erfolgte auf gleiche Weise wie die **AST**-Bestimmung. Es wurde ebenfalls zu 6 Zeitpunkten von je 30 Sek. Abstand die Absorption bei 340 nm gemessen und mit Bezug zum Standard die Enzymaktivität bestimmt.

5.5 Metabolische Aktivität

Für die Messung der metabolischen Aktivität der Hepatozyten wurde die Harnstoffkonzentration im Zellkulturmedium ermittelt.

5.5.1 Urea

Im Rahmen des Abbaus von Aminosäuren entsteht Ammoniak, welcher in der Leber zu Harnstoff, auch Urea, umgewandelt wird. Die metabolische Aktivität einer Leberzelle kann somit anhand des produzierten Harnstoffs abgeschätzt werden. Analog zu den Enzymbestimmungen s.o. wurde der Mediumüberstand und das entsprechende Fluitest[®] Kit von Analyticon für die Messung verwendet. Harnstoff wird dabei mittels Urease zu CO_2 und NH_4^+ umgewandelt. An diese Reaktion schließt sich die Indikatorreaktion an, in der Ammoniak mit Ketoglutarat und **NADH** zu Glutamat und **NAD⁺** reagiert. Der kinetische Abfall der Absorption von **NADH** wird so zur Konzentrationsbestimmung von Harnstoff genutzt.

Als Standardreihe wurde der Kalibrator des Kits verwendet, der in einer 1:2-Verdünnungsreihe angesetzt wurde, sodass Konzentrationen zwischen 0,13 und 8,33 mg/dl als Standards dienten. Die Reaktionslösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 5:1 gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 10 µl der Standards und 10 µl der Medium-Probe auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl des Reaktionsgemisches zugegeben und eine kinetische Absorptionsmessung im Photometer bei 340 nm vorgenommen. Zu 6 Zeitpunkten

im Abstand von je 30 Sek. wurde die Absorptionsabnahme von NADH gemessen. Mit Bezug zum Standard ergab sich daraus die Harnstoffkonzentration.

5.6 mRNA-Analytik

Die mRNA wurde zunächst aus den Hepatozyten isoliert, mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im Anschluss in der Real time-PCR gemessen.

5.6.1 mRNA-Isolierung mittels Trizol®

Zur Isolation von mRNA aus den kultivierten Hepatozyten erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion mittels Trizol®. 200 µl wurden auf jedes Well einer 12-Well-Platte gegeben und anschließend die Zellsuspension mit einem Zellschaber gelöst und in ein Eppendorf®-Gefäß überführt. Die Proben wurden daraufhin weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert. Die Isolation erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers Invitrogen. Die Resuspension erfolgte in DEPC-Wasser.

Die Reinheit der Ausbeute wurde am Nanodrop-Spektralphotometer ermittelt. Dabei wurde 1,5 µl der Probe aufgetragen und die Absorption bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient $A_{260/280}$ sollte mindestens 1,9 betragen. Bei $A_{260/280}$ von 1,8-1,9 wurde eine RNA-Aufreinigung mittels DNase durchgeführt. Dazu wurde die DNase I von Fermentas genutzt. Das Verfahren wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

5.6.2 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der isolierten mRNA in cDNA wurde das cDNA-Synthese-Kit von Fermentas verwendet. 1000 ng mRNA-Probe wurden mit 1 µg Oligo(dT)₁₈-Primer und dem entsprechenden Volumen an DEPC-Wasser in einem PCR-Gefäß gemischt und im Thermocycler für 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die übrigen Reagenzien hinzugefügt und für 60 min bei 37°C sowie für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C für max. 2 Wochen gelagert.

5.6.3 Quantitative Real time-PCR

Die Bestimmung des mRNA-Gehalts der einzelnen Gene erfolgte mit der quantitativen Real time-PCR. Es wurden TaqMan[®] Gene Expression Assays mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM verwendet. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der zyklischen Amplifikation spezifischer Gensequenzen, um eine Aussage über die ursprüngliche Genexpression zu treffen. Die DNA-Stränge werden in jedem Zyklus zunächst denaturiert. Danach lagern sich sequenzspezifische Primer an die DNA-Stränge an (*Annealing*). Mittels einer Taq-Polymerase und Nukleotiden im Überschuss erfolgt daraufhin die Synthese eines komplementären Strangs. So wird in jedem Zyklus die Genkopienzahl verdoppelt. Zusätzlich ist an der Primer-Sonde ein Fluoreszenzmarker sowie ein Signal unterdrückender Quencher angebracht. Während der Synthese wird der Quencher durch die Polymerase entfernt und ein Fluoreszenzsignal ausgesendet, welches am Ende eines jeden Durchgangs gemessen wird. Ab einem bestimmten Zyklus kann mit Anstieg der synthetisierten komplementären Stränge ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals verzeichnet werden.

Für jedes Gen wurde zunächst ein Mix aus Master Mix[®], Gene Expression Assay und DEPC-Wasser angesetzt, der daraufhin in jedes Well pipettiert wurde. Anschließend wurde die cDNA-Probe in das Well pipettiert. Außerdem enthielt jede 96-Well-Platte eine Negativkontrolle, in der anstelle von cDNA DEPC-Wasser verwendet wurde. Jede Probe wurde in Duplikaten aufgetragen. Die Platte wurde mit Klebefolie bedeckt und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte die PCR im PCR-Cycler nach folgendem Schema:

Schritt	Temperatur	Dauer (Min. : Sek.)	Wiederholung
1. Aktivierung	50°C	2:00	1
2. Heizstart	95°C	10:00	1
3. Denaturierung	95°C	0:15	4
4. Annealing	60°C	1:00	4

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Wert-Methode. Als endogene Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Differenz der C_T -Werte von Duplikaten durfte nicht größer als 0,5 sein.

5.7 Proteinanalytik

Zuerst erfolgte die Extraktion und Quantifizierung der Proteine. Im Anschluss konnten die gewünschten Proteine im Western Blot dargestellt werden.

5.7.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte mittels des Subcellular Protein Fractionation Kit von Thermo Scientific. Auf die Zellkultur-Dishes, welche etwa 2,1 Mio. viable Zellen enthielten, wurden 200 μ l des Cytosolic Extraction Buffers gegeben. Die Zellen wurden danach abgeschabt und in einem Eppendorf[®]-Gefäß überführt. Die weitere Behandlung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Fraktionen des zytoplasmatischen, der Membran-gebundenen und der löslichen Kernproteine konnten so mittels verschiedener Extraktionspuffer aus einer Zellprobe extrahiert werden.

5.7.2 Proteinquantifizierung

Die extrahierten Proteine wurden mittels einer **BCA**-Messung quantifiziert. **Bichinonsäure (BCA)** wird genutzt, um die Umsetzung von Kupferionen durch Proteine zu bestimmen. Es reagiert mit Cu^{2+} zu einem violetten Komplex, dessen Absorption photometrisch gemessen werden kann. Als Standard wurde 20 g **BSA** in 10 ml Aqua dest. gelöst und als Aliquots zu je 200 μ l bei -20°C gelagert. Bei der **BCA**-Messung wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe mit dem Standard hergestellt, sodass Konzentrationen zwischen 1000 $\mu\text{g/ml}$ und 62,5 $\mu\text{g/ml}$ als Standardreihe dienen. 20 μ l des Standards sowie 20 μ l der zuvor 1:10 verdünnten Proteinproben wurden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Das **BCA**-Reagenz A wurde mit 4%-Kupfersulfat (m/v) im Verhältnis 50:1 gemischt und 300 μ l des Gemisches auf jedes Well der 96-Well-Platte gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Die Absorption des Farbstoffs wurde spektralphotometrisch bei 550 nm gemessen. Mit Bezug zur Absorption des Standards konnte so die Proteinkonzentration bestimmt werden.

5.7.3 Western Blot

Die Darstellung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels semi-quantitativem Western Blot. Nach der Messung wurden die Proben aliquotiert. Dazu wurden je 30 μg Protein mit

Aqua dest. auf 20 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 5 μ l Probenpuffer dazugegeben, das Eppendorfgefäß kurz auf 10.000 rpm zentrifugiert, für 5 min bei 100°C erhitzt, anschließend noch einmal kurz auf 10.000 rpm zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Polyacrylamidgel-Elektrophorese gewählt. Das 8%-ige Trenngel wurde angesetzt und in zwei eingespannte Elektrophorese-Gläser gegossen und sofort mit Aqua dest. bedeckt. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua dest. abgegossen und das Sammelgel angesetzt. Nach Gießen des Sammelgels wurde unmittelbar im Anschluss ein 15er-Kamm vorsichtig eingesetzt, sodass keine Bläschen entstehen konnten. Nach Aushärtung des Sammelgels konnte das Gel verwendet werden oder wurde für max. 5 Tage in TBST aufbewahrt. Vor Verwendung des Gels wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel samt Gläser in eine Elektrophoresekammer eingespannt, welche daraufhin mit Running-Buffer gefüllt wurde. In die Kammtaschen des Gels wurden die Protein-Proben vorsichtig pipettiert. Außerdem wurde zur Markierung der Laufhöhe 3 μ l des Proteinmarker PageRuler® in eine Kammtasche neben den Proben aufgetragen. An die Elektroden wurde zunächst eine Spannung von 65 V angelegt, bis der Ladepuffer und der Marker als eine waagerechte, dünne Linie zu erkennen waren. Dann wurden die Proteine bei 120 V solange aufgetrennt, bis die entsprechenden Proteinbanden des Markers noch gerade sichtbar waren.

Die Proteine wurden dann vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und fixiert. In eine Blotting-Kassette wurden übereinander ein Schwamm, ein Filterpapier, eine Nitrozellulose-Membran, das Gel, ein Filterpapier und ein weiterer Schwamm gespannt. Die Materialien wurden vorher für mindestens 5 min in Blotting-Buffer eingeweicht und feucht gehalten. Dann wurde die Kassette in eine mit Blotting-Buffer gefüllte Kammer gespannt und ein Kühlblock hinzugefügt. Unter ständigem Rühren wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 340 mA in 60 min auf die Membran transferiert.

Anschließend erfolgte eine reversible Färbung der Proteinbanden mittels Poinceau S. Die Membranen wurden für 5 min in Poinceau S-Lösung inkubiert und anschließend in zwei Schritten mit Aqua dest. gewaschen. Die Banden des Markers wurden mit einem Bleistift markiert.

Danach erfolgte das Blocking. Dazu wurde die Membran in einem Blocking-Buffer aus Milchpulver und TBST (1 g in 20 ml TBST) für mindestens eine Stunde unter Schütteln inkubiert. So wurden die Proteinbindungsstellen der Membran, an welche keine Proteine des Gels gebunden hatten, maskiert. Die Membranen konnten anschließend mit dem Primärantikörper

behandelt werden. Die Antikörper wurden in TBST und 1% (v/v) BSA verdünnt. Die Membran wurde in 3 ml Antikörper-TBST-Lösung auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten vier Waschschriffe mit TBST. Darauf folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach weiteren vier Waschschriffen mit TBST konnten die von den Antikörpern markierten Proteine detektiert werden. Dazu wurden die zwei ECL-Lösungen s.o. angesetzt. Vor Verwendung wurden je 1 ml der beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und vorsichtig auf die Membran gegeben. Die Detektion erfolgte im VersaDoc.

5.7.4 Wiederverwendung der Membranen

Zur erneuten Verwendung der Membranen wurden die Antikörper mittels eines Reblotting-Reagenz von Millipore entfernt. Das Reagenz wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die Membran für 15 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran für zweimal 5 min mit Blocking-Buffer behandelt. Anschließend konnte die nächste Antikörperinkubation erfolgen.

5.8 Statistische Auswertung und Software

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit Quantity One, die Auswertung der Real time-PCR-Ergebnisse mit dem Programm von Applied Biosystems. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel 2011, IBM SPSS Statistics 19 sowie Graphpad Prism 5.0. In den graphischen Abbildungen sind die Mittelwerte sowie die jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Als statistische Tests wurden für AST, LDH und Urea der Mann-Whitney-U-Test und für XTT, die Protein- und mRNA-Daten der Wilcoxon-Test für gepaarte Untersuchungen angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0,05 gewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Darstellung der Spender

Für die vorliegende Arbeit wurden **Primäre humane Hepatozyten (PHH)** aus humanem Lebergewebe verwendet. Von insgesamt 16 Spendern wurden nach adäquater Aufklärung und Einverständnis Resektate zur Durchführung der Zellisolation genutzt. Die Patienten erhielten eine Leberteilresektion aufgrund von 11 verschiedenen Diagnosen, siehe Abbildung 6.1. Die Lebermetastase eines kolorektalen Karzinoms war die häufigste Diagnose.

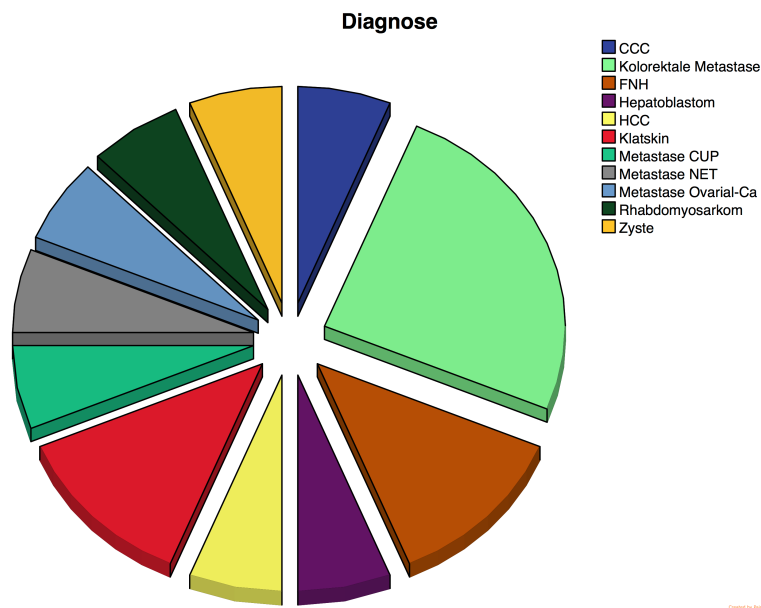


Abbildung 6.1: Entitäten der Lebererkrankung der einbezogenen Spender.

Das Alter der Spender umfasste ein Spektrum von 2 bis 77 Jahren, siehe Abbildung 6.2. 50% der Patienten waren zwischen 60 und 80 Jahren alt. Acht Spender waren männlich, acht waren weiblich.

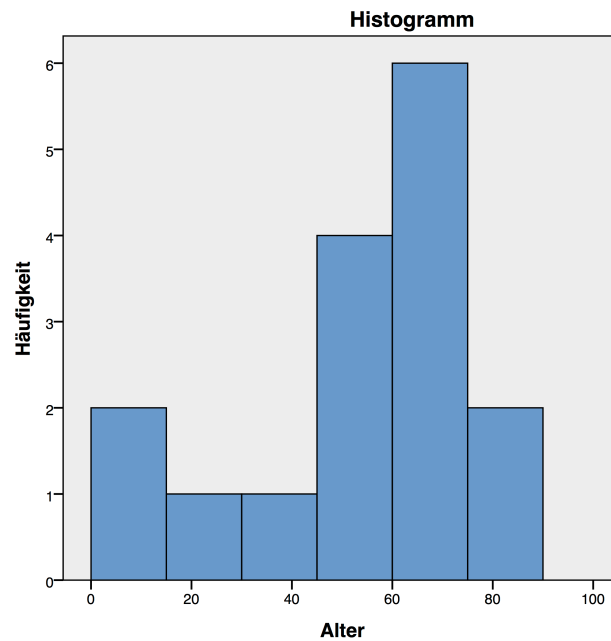


Abbildung 6.2: Altersverteilung der einbezogenen Spender.

Nach Verwendung der Leberteilresektate wurden klinische und operative Informationen der Spender überprüft, welcher Einfluss auf die Qualität und den Stoffwechsel der Hepatozyten haben konnten. Die Details der Spender sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Details der Spender.

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	Diabetes	Chemo.	Pringle-Manöver
1	21	W	FNH	Nein	Nein	Nein
2	46	W	FNH	Nein	Nein	Nein
3	45	M	Korektale Metastase	Ja	Ja	Nein
4	50	M	Korektale Metastase	Nein	Ja	Ja
5	13	M	Rhabdomyosarkom	Nein	Ja	Ja
6	67	W	Metastase Ovarial-Ca.	Ja	Nein	Ja
7	77	M	Klatskin-Tumor	Ja	Nein	Ja
8	76	W	HCC	Nein	Nein	Nein
9	69	W	CCC	Ja	Ja	Ja
10	43	W	Metastase CUP	Ja	Ja	Nein
11	57	M	Klatskin-Tumor	Ja	Nein	Ja
12	66	W	Korektale Metastase	Nein	Ja	Nein
13	66	W	Zyste	Nein	Nein	Ja
14	62	M	Korektale Metastase	Ja	Ja	Nein
15	63	M	Metastase NET	Ja	Nein	Nein
16	2	M	Hepatoblastom	Nein	Ja	Ja

ID – Identifikationsnr., Chemo. – Durchgeführte Chemotherapie vor Operation, W - Weiblich, FNH – Fokale noduläre Hyperplasie, M - Männlich Ovarial-Ca. – Ovarial-Karzinom, HCC – Hepatozelluläres Karzinom, CCC – Cholangiozelluläres Karzinom, CUP – (engl.) cancer of unknown primary, NET – Neuroendokriner Tumor

Es wurden die Informationen eines bekannten Diabetes, einer vorangegangenen Chemotherapie sowie eines während der Operation durchgeführten Pringle-Manövers jeweils mit den Zytotoxizitätsmarkern **AST** und **LDH** aus den isolierten **PHH** korreliert, um eine potenzielle Schädigung durch diese klinischen Details zu ermitteln. Eine vorangegangene Chemotherapie oder ein Pringle-Manöver hatten jeweils eine Erhöhung von **AST** und **LDH** zur Folge, verglichen mit dem Fehlen dieses Einflusses. Die Tatsache, ob ein Diabetes vorhanden war oder nicht, führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellschädigung. In Abbildung 6.3 ist beispielhaft der Zusammenhang von Chemotherapie und **AST** sowie des Pringle-Manövers mit **LDH** dargestellt.

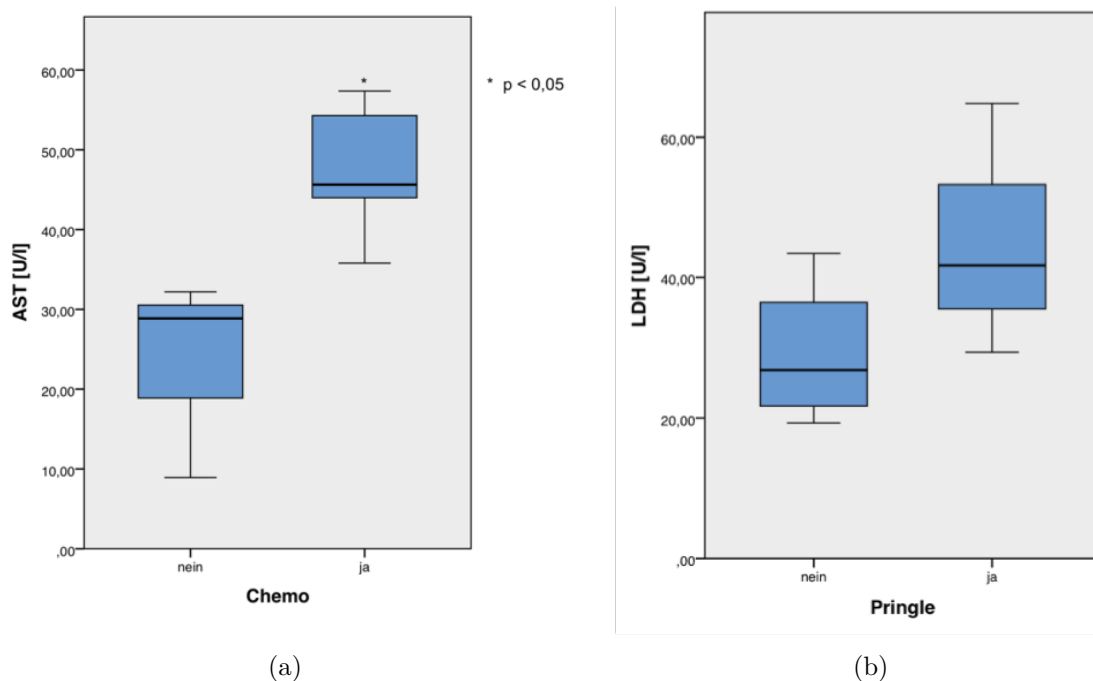


Abbildung 6.3: Boxplot-Darstellung der Spenderdetails auf die Qualität der PHH. (a) AST-Konzentrationen der PHH von Spendern mit und ohne vorangegangene Chemotherapie. (b) LDH-Konzentrationen der PHH von Spendern mit und ohne durchgeführtes Pringle-Manöver.

6.2 *In vitro*-Modell der Steatosis hepatis

Zur adäquaten Abbildung einer Steatosis hepatis des Menschen wurde das *in vitro*-Modell mit primären humanen Hepatozyten verwendet. In Anlehnung an Untersuchungen von *Gómez-Lechón et al.* wurde eine Inkubation mit freien Fettsäuren für 24 h durchgeführt (65). Die Fettsäuren wurden dabei zum einen so gewählt, dass sie dem tatsächlichen Vorkommen *in vivo* ähneln (9). Zum anderen wurde die Toxizität der Fettsäuren auf die Hepatozyten in Zusammenhang mit vorhandenen Untersuchungen berücksichtigt (131). Die Gesamtkonzentration an freien Fettsäuren im Medium wurde demnach mit 1 mM gewählt, wobei das Verhältnis von Ölsäure und Palmitinsäure 2:1 betrug.

Die Darstellung der intrazellulären Lipidakkumulation erfolgte mittels Ölrot O-Färbung. Nach Fixation der Hepatozyten und Behandlung mit dem Farbstoff stellte sich lichtmikroskopisch eine gemischtropfige Verfettung der Hepatozyten dar. Die lichtmikroskopischen Auf-

nahmen zeigen, dass die Lipide in zahlreichen kleinen und größeren Lipidtröpfchen gleichmäßig im gesamten intrazellulären Kompartiment eingelagert wurden, vgl. Abbildung 6.4.

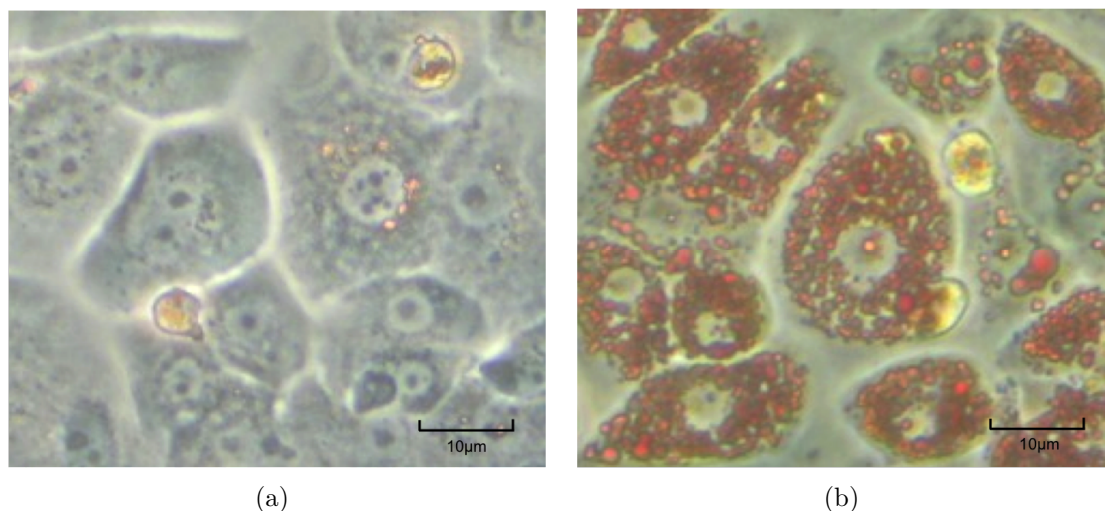


Abbildung 6.4: Lipidakkumulation in den PHH. Lichtmikroskopische Aufnahmen von PHH nach 24 h Inkubation mit (a) Kontroll- bzw. (b) FFA-Medium sowie anschließender Färbung mit Ölrot O., Vergrößerung 10x40.

Nach Herauslösen des Farbstoffs wurde die Absorption im spezifischen Wellenbereich gemessen. Im Anschluss wurde eine SRB-Färbung durchgeführt, sodass eine Normierung mit dem Proteingehalt und damit indirekt der Zellzahl gewährleistet werden konnte. Die gemessene Absorption aus der Ölrot O-Färbung wurde in Bezug gesetzt zur Absorption aus der SRB-Färbung. Es ergab sich ein auf die Zellzahl normierter, quantifizierter Fettgehalt, siehe Abbildung 6.5.

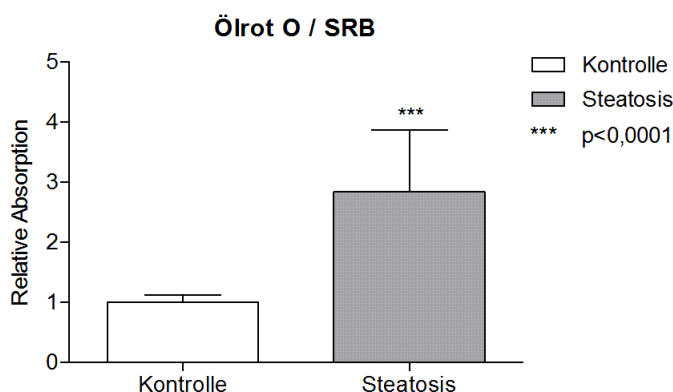


Abbildung 6.5: Relativer Quotient aus Absorption der Ölrot O-Färbung und der SRB-Färbung. PHH wurden für 24 h mit Kontroll- bzw. FFA-Medium inkubiert. Es wurden 12 Isolationen von PHH untersucht.

Die Induktion der Steatosis war in jeder Isolation signifikant. Der Lipidgehalt steigerte sich im Mittel auf das 2,83-fache ($\pm 1,04$).

Im Weiteren wurde das *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis mit Bezug auf Toxizität und metabolischer Funktion charakterisiert. Der toxische Effekt der FFA auf die PHH wurde mittels des XTT-Viabilitätstests beurteilt. Dazu wird im Mediumüberstand der Umsatz eines Farbstoffs durch die Mitochondrien der viablen Zellen gemessen und somit auf die relative Viabilität der Hepatozyten geschlossen.

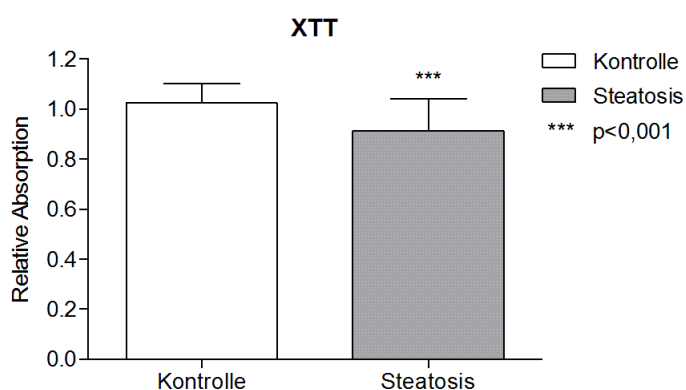


Abbildung 6.6: Relative Absorption des XTT-Viabilitätstests. PHH wurden für 24 h mit Kontroll- bzw. FFA-Medium inkubiert. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

Die relative Viabilität der steatotischen PHH, verglichen mit den unbehandelten PHH, war signifikant erniedrigt, bei einer Verringerung auf 91,8% ($\pm 12,5\%$), siehe Abbildung 6.6.

Zusätzlich wurde die Freisetzung der Enzyme **AST** und **LDH** in das Zellkulturmedium bestimmt, um die Toxizität der **FFA** auf die Hepatozyten einzuschätzen. Bei einem Verlust der Membranintegrität kommt es zu einer Freisetzung dieser beiden Enzyme in das Zellkulturmedium. Die Messung erfolgte mittels gekoppelter kinetischer Indikatorreaktion.

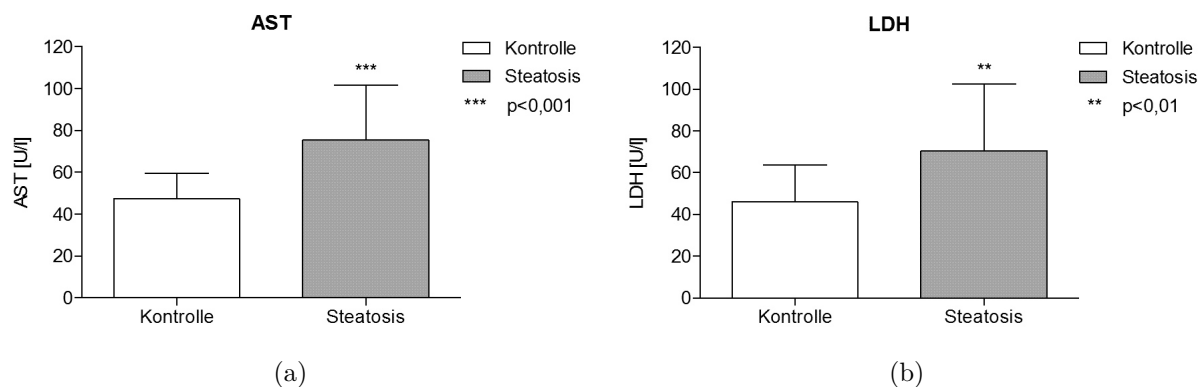


Abbildung 6.7: Messung der (a) **AST**- bzw. (b) **LDH**-Konzentration im Mediumüberstand der **PHH** nach 24 h Inkubation mit Kontroll- bzw. **FFA**-Medium. Es wurden jeweils 5 Isolationen beurteilt.

In **Abbildung 6.7** ist ersichtlich, dass sich die Freisetzung von **AST** durch **FFA**-Behandlung von 47,3 U/l (\pm 12,1 U/l) auf 75,3 U/l (\pm 26,4 U/l) erhöhte. **LDH** zeigte eine ähnliche Erhöhung von 46,0 U/l (\pm 17,8 U/l) auf 70,5 U/l (\pm 32,0 U/l). Besonders in den steatotischen Zellen wurden interindividuell hohe Unterschiede festgestellt. Beide Enzyme zeigten bei der Steatosis eine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle.

Die Charakterisierung bezüglich metabolischer Funktion der Hepatozyten erfolgte mithilfe der Messung des freigesetzten Harnstoffs in das Zellkulturmedium.

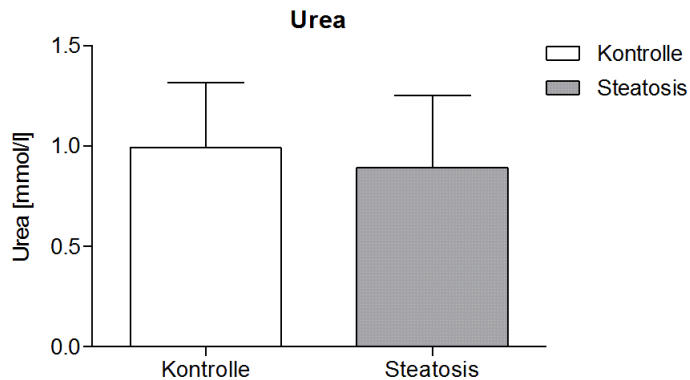


Abbildung 6.8: Harnstoff-Konzentration im Mediumüberstand der PHH nach 24 h Inkubation mit Kontroll- bzw. FFA-Medium. Analyse von 5 Isolationen.

Abbildung 6.8 zeigt die Ergebnisse der Harnstoffmessung. Der Mediumüberstand der steatosischen Zellen enthielt 0,89 mmol/l (\pm 0,36 mmol/l) Harnstoff, während in den Kontrollgruppen 0,99 mmol/l (\pm 0,33 mmol/l) zu messen war. Dies entspricht einer leicht verminderten Menge an Harnstoffproduktion, welche nicht signifikant war.

Im Folgenden wurde der Lipidstoffwechsel des *in vitro*-Steatosis-Modell charakterisiert. Nach 24 h Inkubation mit und ohne FFA wurden die Signalwege des Fettstoffwechsels untersucht. Dazu wurden in der Real time-PCR die Expression der lipolytischen Proteine PPAR α , ACSL und CPT1L sowie die lipogenetischen Proteine SREBP-1c und FASN ermittelt, siehe Abbildung 6.9.

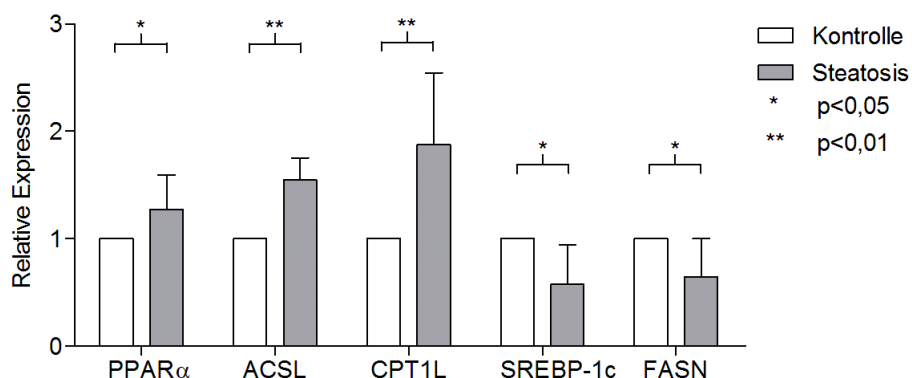


Abbildung 6.9: Relative mRNA-Konzentrationen nach 24 h Inkubation der PHH mit Kontroll- bzw. FFA-Medium. Ergebnisse der Real time-PCR von 5 Spendern, als endogene Kontrolle diente die Expression von β -Actin.

Die Induktion der Steatosis führte zu einer signifikanten Erhöhung des Transkriptionsfaktor **PPAR α** sowie der abhängigen Enzyme **ACSL** und **CPT1L**. **PPAR α** erfuhr durch die **FFA**-Behandlung eine relative Induktion auf 1,27 (\pm 0,32), **ACSL** auf 1,55 (\pm 0,21) und **CPT1L** auf 1,88 (\pm 0,67). Der Transkriptionsfaktor **SREBP-1c** und dessen Zielgen **FASN** wurden durch **FFA**-Behandlung supprimiert. Der relative **mRNA**-Gehalt von **SREBP-1c** verringerte sich signifikant auf 0,57 (\pm 0,37), der von **FASN** auf 0,65 (\pm 0,36).

Die **mRNA**-Daten wurden um die Messungen aus der Proteinanalyse mittels Western Blot ergänzt. So kann auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors geschlossen werden. Es wurden verschiedene Kompartimente untersucht, in denen die Proteine vorzufinden sind. **PPAR α** wurde im Zytosol und im Nukleus untersucht, während **SREBP-1c** als inaktive, „uncleaved“ Form im Membrankompartiment sowie nach Aktivierung als abgespaltene, „cleaved“ Form im Nukleus gemessen wurde.



Abbildung 6.10: Western Blot von **PPAR α** (a) im Zytosol und (b) im Nukleus. Es wird exemplarisch eine Isolierung dargestellt. Als Kontrolle wurden für das Zytosol α -Tubulin und für den Nukleus das Protein p84 bestimmt.

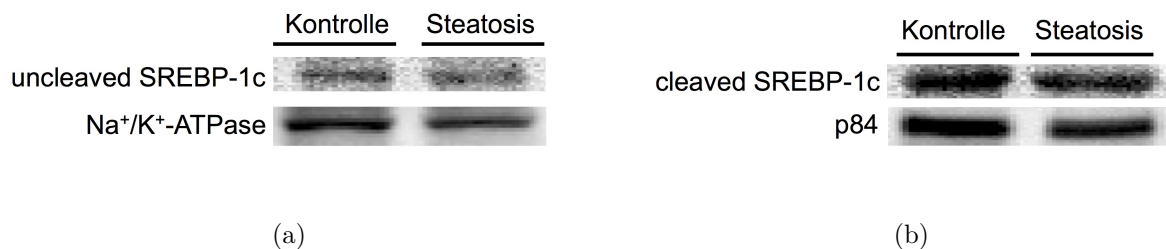


Abbildung 6.11: Western Blot von **SREBP-1c** (a) im Membrankompartiment und (b) im Nukleus. Es wird exemplarisch eine Isolierung dargestellt. Als Kontrolle diente die Na⁺/K⁺-ATPase für die Membran und p84 für den Nukleus.

In der Proteinanalyse ist bei **PPAR α** eine leichte Erhöhung bei den steatotischen Zellen sichtbar, insbesondere im Nukleus. Bei **SREBP-1c** sind optisch keine signifikanten Unter-

schiede ersichtlich, vgl. Abbildung 6.10 und 6.11. Daher wurden aus 5 Isolierungen zusätzlich jeweils densitometrische Analysen durchgeführt. Diese sind in Abbildung 6.12 dargestellt.

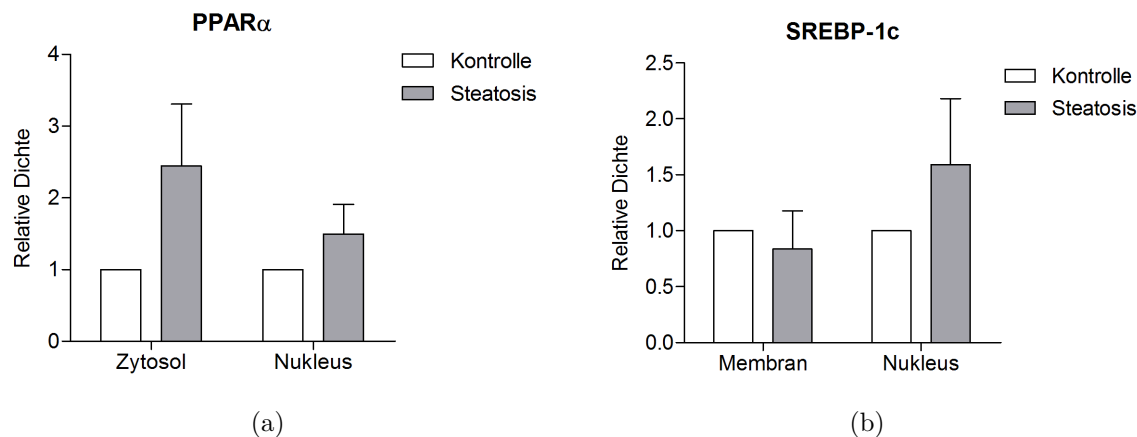


Abbildung 6.12: Densitometrische Auswertung der Western Blots von 5 Isolierungen. (a) Auswertung von **PPARα** aus Zytosol und Nukleus. (b) Auswertung von **SREBP-1c** aus dem Membrankompartiment und dem Nukleus

In Abbildung 6.12 ist ersichtlich, dass der Gehalt an **PPARα** in beiden Zellkompartimenten zunahm. Die relative Proteinkonzentration von **PPARα** im Zytosol betrug $3,04 (\pm 2,11)$, die im Kern $2,41 (\pm 2,14)$.

SREBP-1c wurde durch die induzierte Steatosis im Membrankompartiment gering verändert. Der relative Proteingehalt betrug hier $0,84 (\pm 0,34)$. Im Nukleus kam es zu einer Erhöhung von **SREBP-1c** auf $1,41 (\pm 0,81)$. Somit war eine geringe Abnahme der inaktiven Form von **SREBP-1c** und eine Zunahme des aktiven Transkriptionsfaktors im Zellkern zu verzeichnen. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Das *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis zeigte in den Untersuchungen eine signifikante Lipidakkumulation. Der Anstieg der intrazellulären Enzyme **AST** und **LDH** weisen auf eine Abnahme der Membranintegrität hin. Die wird durch die gesteigerte Lipotoxizität im **XTT**-Test bestätigt. Die metabolische Funktion, gemessen an der Harnstoffkonzentration, war von der Steatosis unbeeinflusst. Die lipolytischen Gene **PPARα**, **ACSL** und **CPT1L** wurden induziert, während die lipogenetischen Gene **SREBP-1c** und **FASN** supprimiert wurden. Auf Proteinebene bestätigte sich die Induktion von **PPARα**. **SREBP-1c** wurde in der aktiven Form jedoch erhöht gemessen.

6.3 Einflüsse von Fenofibrat

Fenofibrat ist ein bekannter **PPAR** α -Agonist und wurde als Positivkontrolle für die Untersuchung von Genistein verwendet. Zunächst wurden Zytotoxizitätsmessungen in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Diese ergaben eine höchste, nicht toxische Konzentration von 75 μ M. Als niedrige Dosis wurde 1 μ M gewählt. Im Anschluss an die Behandlung mit **FFA**-Medium bzw. das **FFA**-freie Kontrollmedium erfolgte die Applikation von Fenofibrat für weitere 24 h. Die Ergebnisse des **XTT**-Viabilitätstest sind in Abbildung 6.13 abgebildet.

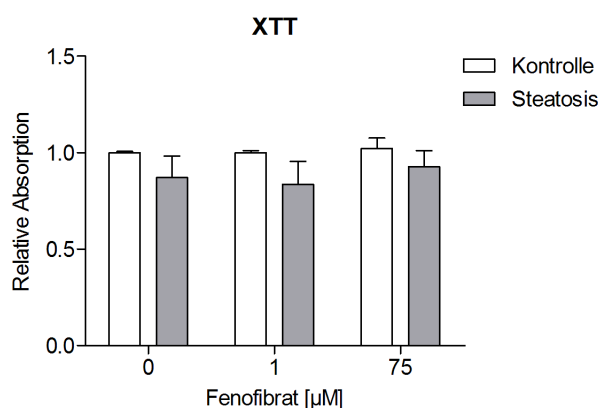


Abbildung 6.13: Relative Absorption des **XTT**-Viabilitätstests nach Inkubation mit Fenofibrat. Es wurden 3 Isolationen untersucht.

In der Steatosisgruppe ergab sich, analog zu den Untersuchungen des Steatosis-Modells, eine leicht erniedrigte Viabilität verglichen mit der Kontrollgruppe, siehe Abbildung 6.13. Die Applikation von Fenofibrat bis zu 75 μ M führte weder in der Kontroll- noch in der Steatosisgruppe zu einer Verringerung der Viabilität.

Des Weiteren wurde nach Induktion der Steatosis sowie Fenofibrat-Inkubation die Freisetzung der Enzyme **AST** und **LDH** untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.14 dargestellt.

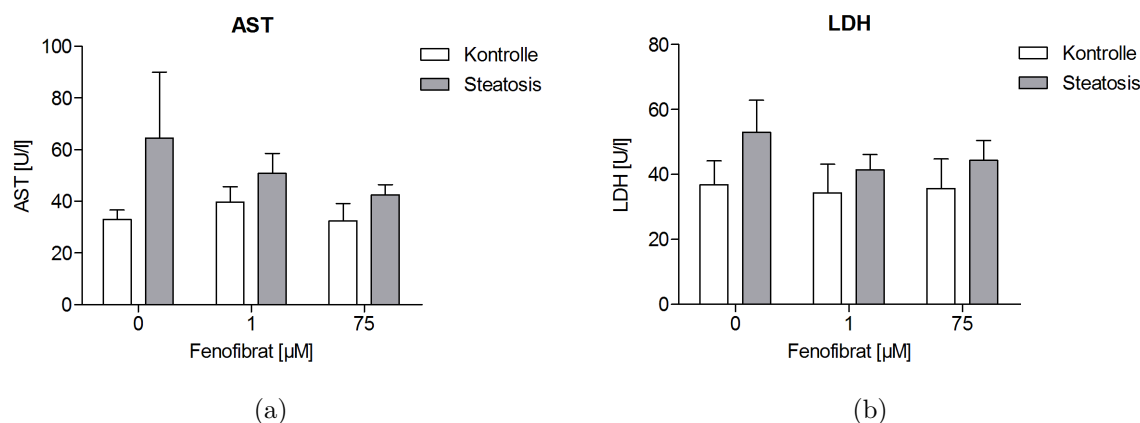


Abbildung 6.14: (a) *AST*- und (b) *LDH*-Konzentrationen im Mediumüberstand der PHH nach 24 h Inkubation mit Kontroll- bzw. FFA-Medium sowie 24 h Fenofibrat. Es wurden 3 Isolationen untersucht.

Abbildung 6.14(a) zeigt, dass die Behandlung mit Fenofibrat bei den steatotischen Zellen zu einer Senkung der *AST*-Freisetzung führte. Von 64,5 U/l ($\pm 10,4$ U/l) bei 0 µM erniedrigte sich die *AST*-Konzentration auf 42,4 U/l ($\pm 1,6$ U/l) bei 75 µM Fenofibrat. Die Kontrollgruppe zeigte keine wesentlichen Effekte durch Fenofibrat-Applikation. Die Messung der *LDH*-Freisetzung ergab ähnliche Einflüsse durch die Fenofibrat-Gabe, vgl. Abbildung 6.14(b). In der Steatosisgruppe sank der *LDH*-Gehalt von 53,0 U/l bei 0 µM auf 41,3 U/l sowie 44,3 U/l bei 1 bzw. 75 µM Fenofibrat. In der Kontrollgruppe wurden mittlere *LDH*-Konzentrationen von 36,8 U/l, 34,4 U/l bzw. 35,7 U/l bei 0, 1 bzw. 75 µM Fenofibrat ermittelt. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

Fenofibrat wurde auf eine Lipid-senkende Wirkung in dem *in vitro*-Steatosis-Modell untersucht. Hier wurde eine Ölrot O-Färbung mit anschließender *SRB*-Färbung durchgeführt. Lichtmikroskopisch war kein Unterschied erkennbar. Im Anschluss wurde spektralphotometrisch die Absorption der gelösten Farbstoffe quantifiziert, siehe Abbildung 6.15.

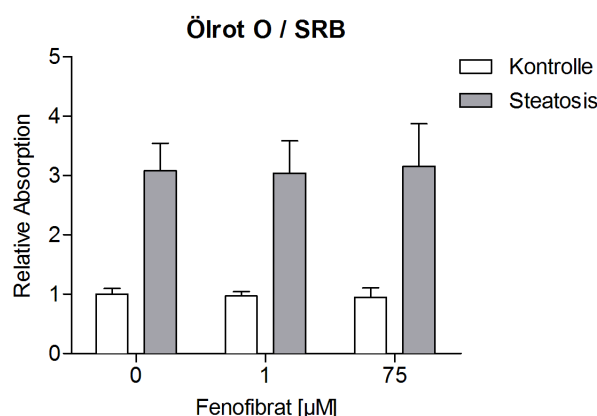


Abbildung 6.15: Relativer Quotient aus Absorptionen der Ölrot O- und SRB-Färbung der PHH nach Inkubation mit Kontroll- bzw. FFA-Medium sowie Fenofibrat-Behandlung. Es wurden 3 Isolationen untersucht.

Die quantitativen Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Induktion der Steatosis. Die Effekte von Fenofibrat auf den Lipidgehalt sind unwesentlich. Weder in den Kontroll- noch den Steatosis-Zellen änderte sich der relative Lipidgehalt nach Fenofibrat-Applikation.

Die Einflüsse von Fenofibrat auf die metabolische Aktivität der PHH wurde anhand der Harnstoffkonzentration untersucht, vgl. Abbildung 6.16.

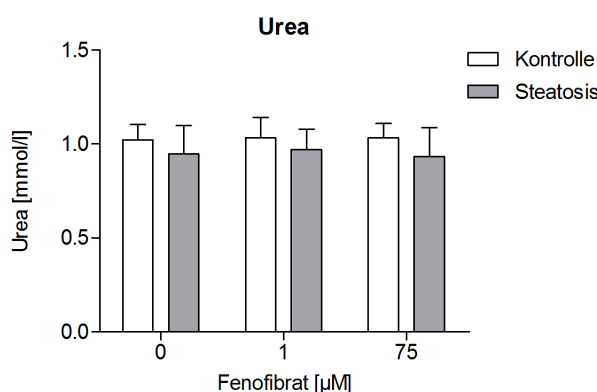


Abbildung 6.16: Harnstoffkonzentration im Medium der PHH nach 24 h Inkubation mit Kontroll- bzw. FFA-Medium sowie 24 h Fenofibrat. Es wurden 3 Isolationen untersucht.

Es zeigten sich leicht erniedrigte Konzentrationen an Harnstoff in den steatotischen Zellen, verglichen mit der Kontrolle. Die mittleren Konzentrationen an Harnstoff betragen bei 0, 1 und 75 μM 1,02 mmol/l, 1,03 mmol/l und 1,03 mmol/l in der Kontrollgruppe bzw. 0,95

mmol/l, 0,97 mmol/l und 0,93 mmol/l in der Steatosisgruppe. Die Zugabe von Fenofibrat zeigte somit keinen deutlichen Einfluss auf die metabolische Aktivität der PHH, gemessen an der Harnstoffkonzentration.

Um die Einflüsse von Fenofibrat auf Signalebene zu untersuchen, wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren $PPAR\alpha$ und $SREBP-1c$ mittels Real time-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.17 dargestellt.

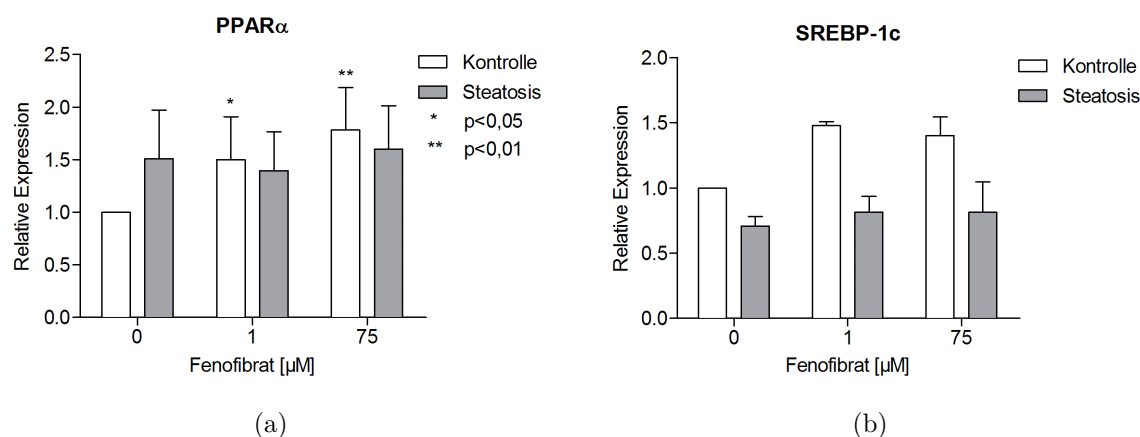


Abbildung 6.17: Relative mRNA-Expression von (a) $PPAR\alpha$ und (b) $SREBP-1c$. Als endogene Kontrolle wurde β -Actin verwendet. Es wurden 3 Isolationen untersucht.

Fenofibrat führte in den Kontrollhepatozyten zu einer signifikanten Erhöhung der $PPAR\alpha$ -Expression auf durchschnittlich 1,50 bzw. 1,78 bei 1 bzw. 75 μ M. Bei den steatotischen Zellen war der Effekt nicht zu erkennen. $SREBP-1c$ wurde in den unbehandelten PHH durch Fenofibrat erhöht. Der relative mRNA-Gehalt stieg bei 1 μ M auf 1,48 und bei 75 μ M auf 1,40. In den steatotischen Zellen zeigte sich der Effekt in einem geringeren Ausmaß. Hier stieg der relative Gehalt von durchschnittlich 0,71 bei 0 μ M auf 0,82 bei 1 μ M und 0,81 bei 75 μ M.

Der Transkriptionsfaktor $PPAR\alpha$ wurde ebenso auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. In Abbildung 6.18 sind die Ergebnisse dargestellt.

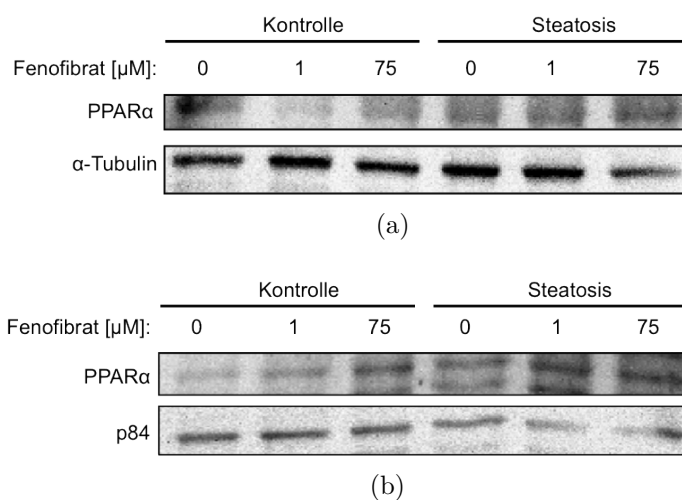


Abbildung 6.18: Western Blot des Proteingehalts an $\text{PPAR}\alpha$ (a) im Zytosol und (b) im Nukleus. Es wird exemplarisch eine Isolierung dargestellt. Als endogene Referenz wurden für das Zytosol α -Tubulin und für den Nukleus das Protein p84 bestimmt.

Die Western Blot-Ergebnisse zeigen hohe interindividuelle Unterschiede. Dennoch ist insbesondere im Nukleus mit steigender Fenofibrat-Konzentration eine Zunahme an $\text{PPAR}\alpha$ ersichtlich. Anhand der densitometrischen Auswertung konnte dies quantitativ bestätigt werden, siehe Abbildung 6.19.

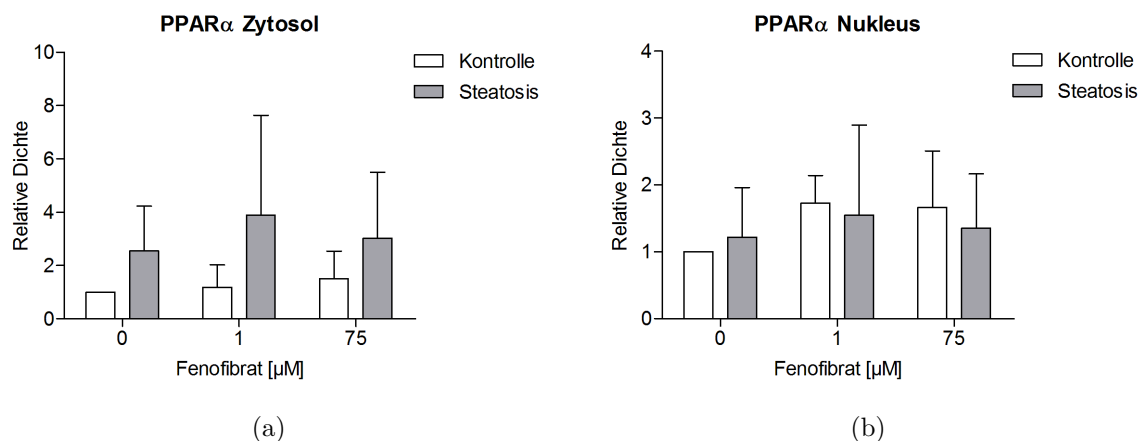


Abbildung 6.19: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus 3 Isolationen. (a) $\text{PPAR}\alpha$ im Zytosol. (b) $\text{PPAR}\alpha$ im Nukleus.

Der erhöhte $\text{PPAR}\alpha$ -Gehalt im Zytosol der steatotischen Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe spiegelt die Effekte der Steatosis wieder. Fenofibrat führte in einem nur geringen

Maße zu einer Erhöhung an **PPAR** α in den steatotischen und den unbehandelten Zellen. In der Kontrollgruppe war der relative Proteingehalt bei 1 μ M 1,19, bei 75 μ M 1,50. In der Steatosis-Gruppe stieg der Gehalt von 2,56 bei 0 μ M auf 3,89 und 3,00 bei 1 bzw. 75 μ M Fenofibrat. Diese Effekte waren aufgrund der hohen Spender-spezifischen Variabilität nicht signifikant. Im Zellkern führte die Applikation von Fenofibrat in der Kontrollgruppe zu einer leichten Erhöhung von **PPAR** α auf 1,73 bzw. 1,66 bei 1 bzw. 75 μ M. In den steatotischen Zellen war dieser Effekt, u.a. aufgrund der hohen Schwankungsbreite nicht erkennbar.

6.4 Einflüsse von Genistein

Wie Fenofibrat wurde auch Genistein auf seine Einflüsse untersucht. Zunächst erfolgte eine Untersuchung des zytotoxischen Potenzials, siehe Abbildung 6.20.

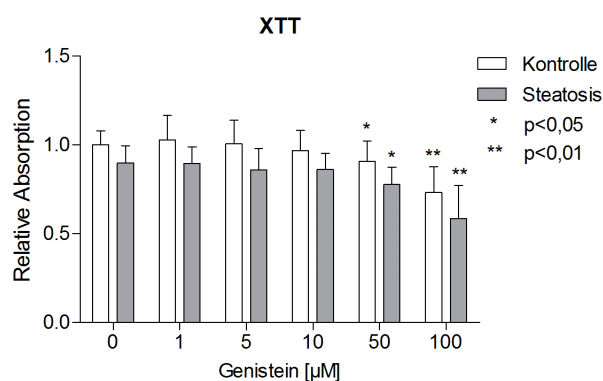


Abbildung 6.20: Relative Absorption des **XTT**-Assays nach Behandlung der **PHH** mit Kontroll- bzw. **FFA**-Medium sowie Genistein. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

Der **XTT**-Assay ergab eine erhöhte Toxizität bei den steatotischen Hepatozyten. Mit steigender Genisteinkonzentration konnte eine verstärkte Zytotoxizität beobachtet werden. Eine signifikante Toxizität wurde in beiden Gruppen ab 50 μ M ermittelt. In den Kontroll-Hepatozyten sank die relative Viabilität auf 73,1% bei 100 μ M, in den steatotischen Zellen auf 58,3% bei 100 μ M.

Zur weiteren Abschätzung der Zytotoxizität von Genistein wurden die Konzentrationen von **AST** und **LDH** im Mediumüberstand gemessen.

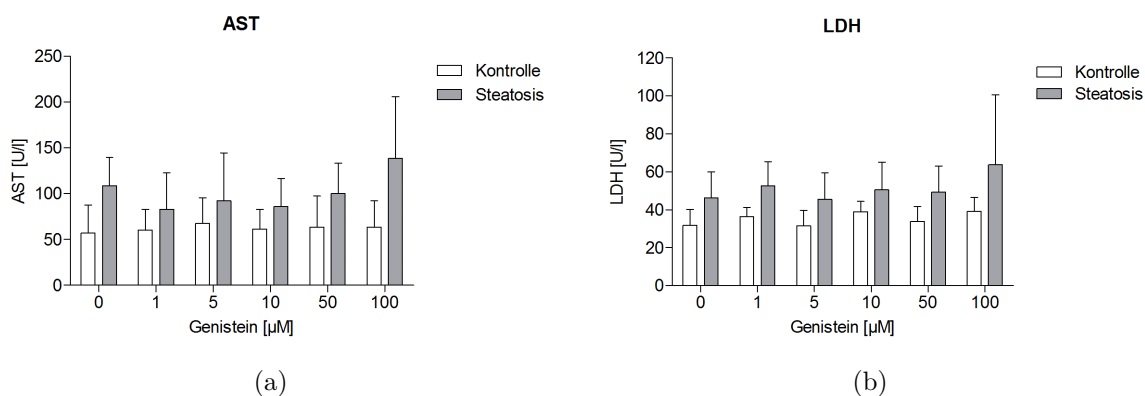


Abbildung 6.21: Konzentrationen von (a) **AST** und (b) **LDH** im Mediumüberstand der **PHH** nach Behandlung mit Kontroll- bzw. **FFA**-Medium sowie Genistein. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

In Abbildung 6.21 ist ersichtlich, dass die steatotischen Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen eine höhere Membranschädigung erfuhren, gemessen an den ausgeschütteten Enzymen **AST** und **LDH**. Genistein in den Konzentrationen zwischen 0 und 50 μM führte zu keiner deutlichen Änderung der **AST**- und **LDH**-Konzentration. Bei 100 μM ist eine Steigerung der Ausschüttung beider Enzyme zu verzeichnen. **AST** stieg auf 138,4 U/l ($\pm 67,3$ U/l), **LDH** auf 63,7 U/l ($\pm 36,8$ U/l). Aufgrund der interindividuellen Schwankungen war dieser Effekt nicht signifikant.

Der Einfluss von Genistein auf den Lipidgehalt der Hepatozyten wurde anhand der Ölrot O-Färbung ermittelt. Lichtmikroskopisch ergab sich kein eindrucklicher Unterschied. Nach Färbung wurde der fixierte Farbstoff herausgelöst und die Absorption gemessen. Mit der sich anschließenden **SRB**-Färbung und deren Absorption wurde der Bezug zum Proteingehalt hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.22 dargestellt.

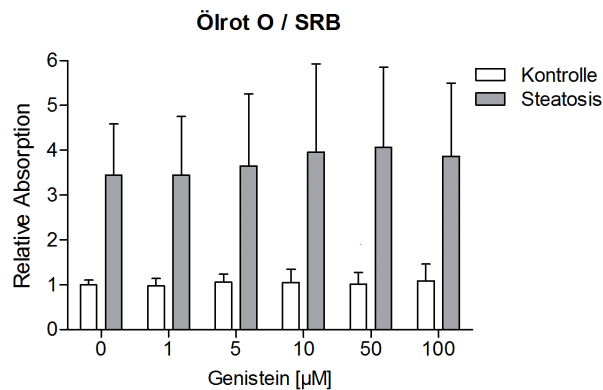


Abbildung 6.22: Quotient aus den Absorptionen aus Ölrot O- und SRB-Färbung. Die PHH wurden für 24 h mit Kontroll- bzw. FFA-Medium sowie für 24 h mit Genistein behandelt. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

Genistein führte in dieser Applikation zu keiner signifikanten Änderung des Lipidgehalts gemessen anhand der Ölrot O- und SRB-Färbungen. In den steatotischen Zellen kam es zu einem leichten Anstieg des Lipidgehalts bei 10 und 50 μM , welcher keine Signifikanz hatte.

Die Veränderung der metabolischen Aktivität durch Genistein wurde anhand der Harnstoffkonzentration im Mediumüberstand beurteilt, siehe Abbildung 6.23.

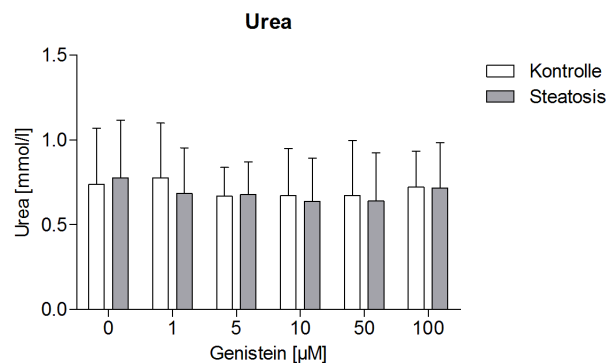


Abbildung 6.23: Harnstoffkonzentration im Mediumüberstand der PHH nach 24 h Inkubation mit Kontroll- bzw. FFA-Medium sowie 24 h Genistein. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

Genistein hatte sowohl in den Kontroll- als auch den steatotischen Hepatozyten keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität, gemessen an der Konzentration des produzierten Harnstoffs.

Um mögliche Effekte auf Ebene der Signaltransduktionewege zu erfassen, wurde eine Real time-PCR der Transkriptionsfaktoren $PPAR\alpha$ und $SREBP-1c$ sowie deren Zielgene $CPT1L$ und $ACSL$ bzw. $FASN$ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.24 zusammengefasst.

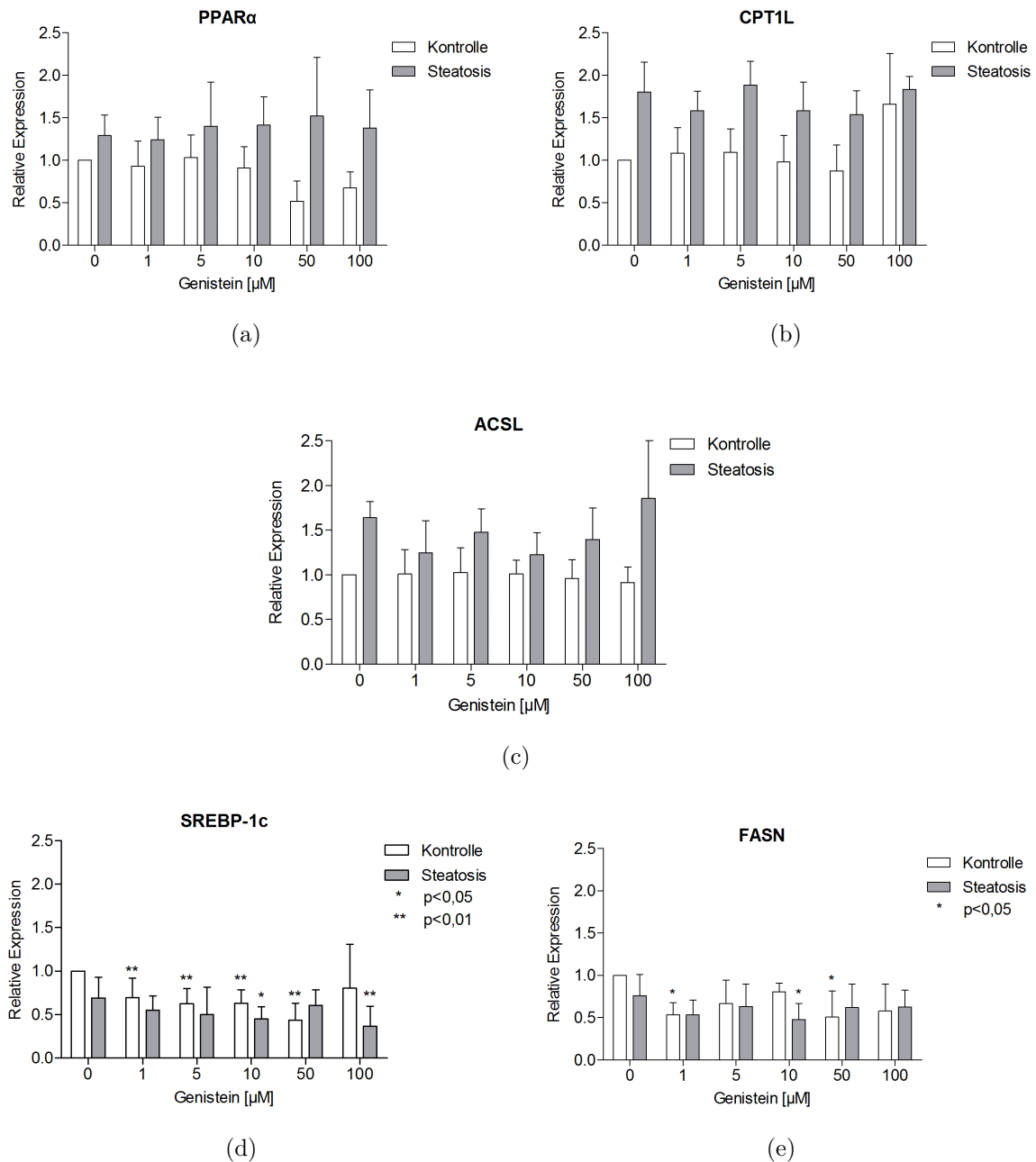


Abbildung 6.24: Relative mRNA-Expression von (a) $PPAR\alpha$, (b) $CPT1L$, (c) $ACSL$, (d) $SREBP-1c$ und (e) $FASN$. Als endogene Kontrolle wurde β -Actin verwendet. Es wurden 5 Isolationen untersucht.

In der Auswertung der Real time-PCR-Ergebnisse ist ersichtlich, dass die Genisteinapplikation auf $\text{PPAR}\alpha$ keine eindeutigen Effekte hatte. In den Kontroll-Hepatozyten nahm der mRNA-Gehalt von $\text{PPAR}\alpha$ ab einer Konzentration von 50 μM geringfügig auf die relative Konzentration von 0,52 ($\pm 0,24$) ab. In den steatotischen Zellen kam es, bei höherem Ausgangsniveau im Vergleich zur Kontrolle, nach Genisteinapplikation zu einer sehr leichten Zunahme der relativen Expression. Bei den $\text{PPAR}\alpha$ -abhängigen Genen CPT1L und ACSL kam es in den Kontroll-Hepatozyten zu keiner deutlichen Änderung. Die Expression blieb bei beiden Enzymen in etwa auf ähnlichem Niveau. Ein singulärer nach oben abweichender Wert war bei CPT1L bei 100 μM Genistein zu erkennen. Bei den steatotischen Zellen ist insbesondere bei CPT1L bis zu 50 μM Genistein eine leichte Abnahme der Expression ersichtlich. Bei 100 μM Genistein kam es bei beiden Enzymen zu einer Erhöhung über das Niveau der unbehandelten Kontrolle hinaus.

Genistein bewirkte in den Kontroll- und in den steatotischen Hepatozyten eine Abnahme an SREBP-1c . Diese war in der Kontrollgruppe bei allen Genisteinkonzentrationen, in der Steatosis-Gruppe bei 10 und 100 μM Genistein statistisch signifikant gegenüber der jeweiligen Expression der unbehandelten Kontrolle. Der Effekt von Genistein auf SREBP-1c ist auch in der Untersuchung der Expression von FASN im Trend zu erkennen. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Senkung der Expression bei 1 und 50 μM Genistein. Bei den steatotischen Zellen war die Senkung der Expression bei 10 μM statistisch signifikant gegenüber dem Wert bei 0 μM Genistein. Die Änderungen sind bei beiden Gruppen nicht konzentrationsabhängig.

Die Transkriptionsfaktoren $\text{PPAR}\alpha$ und SREBP-1c wurden auch auf Proteinebene untersucht. Dabei wurden die Proteinisolate aus den unterschiedlichen Kompartimenten der Transkriptionsfaktoren analysiert, siehe Abbildung 6.25.

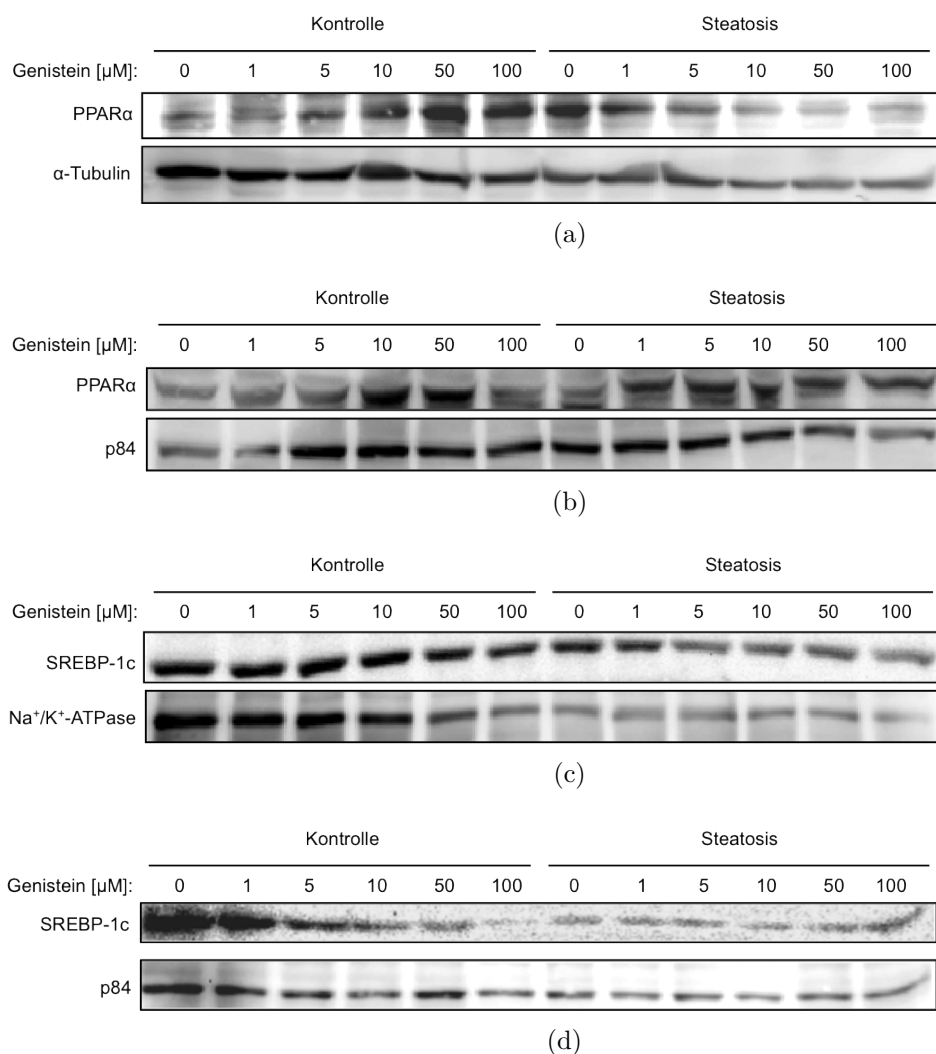


Abbildung 6.25: Western Blots von PPAR α (a) im Zytosol und (b) im Nukleus sowie von SREBP-1c (c) in der Membran und (d) im Nukleus. Es wird exemplarisch je eine Isolierung dargestellt. Als endogene Referenzen wurden für das Zytosol α -Tubulin, für die Membran die Na⁺/K⁺-ATPase und für den Nukleus p84 herangezogen.

Abbildung 6.26 zeigt die densitometrische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse.

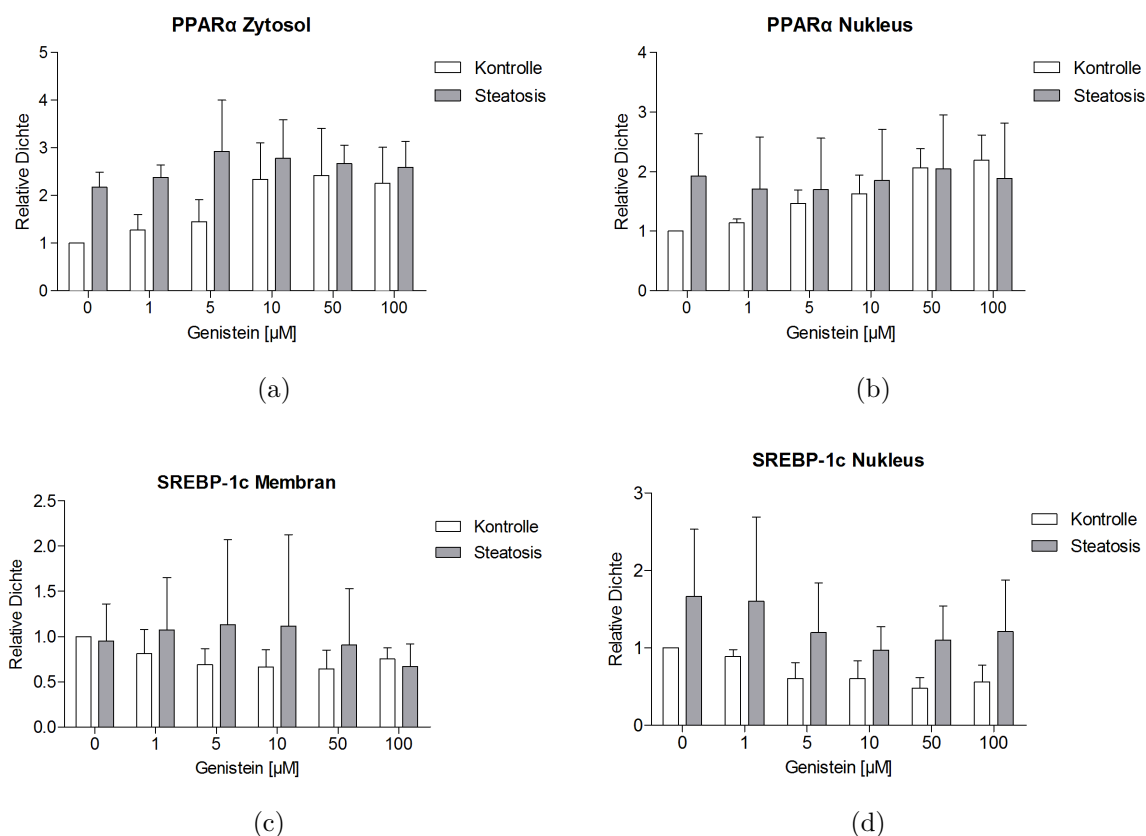


Abbildung 6.26: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus 5 Isolationen. Proteingehalt von **PPARα** (a) im Zytosol und (b) im Nucleus sowie **SREBP-1c** (c) im Membrankompartiment und (d) im Nucleus. Als endogene Kontrolle dienten für das Zytosol α -Tubulin, für die Membran die Na^+/K^+ -ATPase und für den Nucleus p84.

Es bestanden bei allen Western-Blot-Auswertungen hohe interindividuelle Abweichungen, welche in der Folge eine statistische Signifikanz verhinderte. Dennoch lassen sich anhand der Daten einige Tendenzen ablesen. Genistein erhöhte den Proteingehalt von **PPARα** im Zytosol in den unbehandelten Hepatozyten. In den steatotischen Zellen war diese Änderung nur gering ausgeprägt. Im Nucleus kam es nach Genistein-Applikation ebenso zu einer annähernd konzentrationsabhängigen Zunahme an **PPARα** in den Kontroll-Hepatozyten. Bei den steatotischen Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Der Proteingehalt von **SREBP-1c** wurde durch Genistein in den Kontrollzellen erniedrigt. Dies war sowohl im Membran- als auch im Nucleuskompartiment in etwa konzentrationsabhängig zu beobachten. In den steatotischen Zellen führte Genistein ebenso zu einer leichten Abnahme, welche im Nucleus deutlicher ausgeprägt war.

7 Diskussion

7.1 *In vitro*-Modell der Steatosis hepatis

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste benigne Lebererkrankung in der westlichen Welt. Obwohl nur ein relativ geringer Anteil der Patienten mit einer Steatosis hepatis in das entzündliche Stadium der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) fortschreitet, kann diese Entwicklung folgenschwere Konsequenzen haben, wie die Bildung einer Fibrose und Zirrhose sowie langfristig die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC).

Um in der medizinischen Forschung ein geeignetes Forschungsmodell zu verwenden, wurden bereits in der Vergangenheit ausführliche Untersuchungen dazu durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde das *in vitro*-Modell der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis in Anlehnung an die Arbeiten von *Gómez-Lechón et al.* entwickelt (65). Nach Zufuhr von den freien Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure konnte innerhalb von 24 Stunden eine zufriedenstellende gemischtropfige Verfettung in den kultivierten PHH erzielt werden, die dem vielfachen des Normalzustands entsprach und in der Zusammensetzung den Verhältnissen einer Steatosis *in vivo* ähnelte (9). In den Versuchen konnte eine durchschnittliche Zunahme des Gehalts an neutralen Fetten auf das 2,8-fache der Kontrolle erreicht werden. In einem ähnlichen *in vitro*-Steatosis-Modell an HepG2-Zellen mit einer identischen FFA-Behandlung konnte eine relative Lipidakkumulation von 2,1 erzielt werden (163). Untersuchungen von *Araya et al.* konnten bei Biopsien aus NAFLD-Patienten eine etwa 5-fache Erhöhung des Gehalts an TAG messen (9). Dieser Unterschied kann zum einen damit erklärt werden, dass lediglich ein Zeitraum von 24 Stunden für die Induktion der Steatosis genutzt wurde. *In vivo* erfolgt die Pathogenese als chronische Erkrankung über mehrere Monate bis zu Jahrzehnten.

Zum anderen wurden bei den bioptischen Proben der Patienten ebenso Lipide erfasst, die nicht in den Hepatozyten enthalten waren. Das verwendete *in vitro*-Modell der Steatosis

hepatis hat somit den Nachteil, dass vornehmlich Hepatozyten in Abwesenheit von nicht-parenchymatösen Zellen, wie Kupfer-, Stern- oder Endothelzellen, kultiviert wurden. So wurden Interaktionen zwischen den Zelltypen unterbunden, die in der Pathogenese, Aufrechterhaltung und Progression der NAFLD eine große Rolle zu spielen scheinen (170, 154, 69). Aus diesem Grund kann man mit dem verwendeten Modell lediglich von einer Momentaufnahme der Steatosis hepatis mit Augenmerk auf die parenchymatösen Leberzellen sprechen.

Die Toxizitätsuntersuchungen LDH, AST und XTT ergaben eine moderate Schädigung der Membranintegrität bzw. eine Einschränkung der Mitochondrienaktivität der Zellen durch die Fettsäuren. Lipide induzieren diverse pathophysiologische Prozesse, u.a. eine reaktiv gesteigerte Fettsäureoxidation, welche zu einer erhöhten Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einer gesteigerten Expression des Fas/CD95-Rezeptors führt (28). Dies führt zu einer höheren Rate an Apoptose und einer erhöhten Empfänglichkeit der Zellen für oxidativen Stress. Dieser als Lipotoxizität bezeichnete Prozess war bei den Isolaten in unterschiedlichem Maße ausgeprägt, welche auch durch eine unterschiedlich starke Vorschädigung der Membranintegrität, beispielsweise durch die inflammatorischen Prozesse der Tumorerkrankung oder vorangegangene Ischämie, bedingt sein kann.

Bei der Analyse der zur Verfügung stehenden Informationen der Spender zeigte sich ein deutlicher Einfluss auf die Qualität der Hepatozyten insbesondere als Folge einer vorangegangenen Chemotherapie sowie einer intraoperativen Ischämie beim sog. Pringle-Manöver. Diese Ergebnisse gehen konform mit bereits durchgeführten Untersuchungen über Zytotoxizität im *in vitro*-Steatosis-Modell. Gómez-Lechón *et al.* fanden für Ölsäure und Palmitinsäure eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität sowohl bei HepG2-Zellen als auch bei PHH (65). Dabei scheint die Komposition der Fettsäuren für die Induktion der Steatosis eine entscheidende Rolle zu spielen. Für Palmitinsäure wurde eine deutliche Induktion der Apoptose der Hepatozyten gezeigt, während Ölsäure diesem Prozess entgegenzuwirken scheint (131).

Bei der Untersuchung des Harnstoffs als Parameter der Syntheseleistung der Hepatozyten konnten unterschiedliche Einflüsse für die verschiedenen Präparate festgestellt werden, welche in Summation eine leichte Erniedrigung des Harnstoffspiegels ergaben. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass der Metabolismus der Präparate im Vorhinein auf unterschiedliche Weise beeinflusst war. Eine Untersuchung von Vidyashankar *et al.* ergab einen erniedrigten Harnstoffspiegel nach Induktion einer *in vitro*-Steatosis (164). Diese wurde jedoch an der Zelllinie HepG2 und nach Behandlung mit ausschließlich Ölsäure durchgeführt. Auch hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Eine Untersuchung an NASH-Patienten konnte

ebenso zeigen, dass eine geringfügig niedrigere Rate der Harnstoffsynthese bei Patienten mit **NASH** im Vergleich zu gesunden Patienten besteht (40). Dies lässt schließen, dass der Harnstoffmetabolismus in nur einem geringen Maße von den Prozessen der **NASH** beeinflusst ist. Um weitere Aussagen über die Syntheseleistung in Hinblick auf weitere Stoffwechselprodukte treffen zu können, müssten hier weitere Untersuchungen, wie z.B. Bestimmungen von Albumin oder Gallensäuren, durchgeführt werden.

In dem verwendeten Modell der Steatosis hepatis konnte durch **FFA**-Behandlung eine Induktion von **PPAR α** und seinen Zielgenen sowohl auf **mRNA**- als auch auf Proteinebene beobachtet werden. Bisherige Untersuchungen zeigten sowohl an *in vivo*-Modellen als auch an Gewebeproben der humanen Steatosis hepatis eine Suppression von **PPAR α** im Vergleich zum Normalzustand (141, 102, 127). Dies waren jedoch Messungen, die nach einem chronischen Zustand der Steatosis durchgeführt wurden. So kann man dort davon ausgehen, dass die Suppression von **PPAR α** das heißt der Lipolyse, Teil der Pathogenese der Erkrankung ist.

Bei Untersuchungen an Zellkulturen konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden. *Rogue et al.* erzielten an HepaRG-Zellen durch Applikation von 1 mM Ölsäure für 24 Stunden eine Erhöhung von **PPAR α** auf 1,43 (133). Demgegenüber konnten *Ziamajidi et al.* zeigen, dass die Behandlung von 1 mM Ölsäure für 24 Stunden an HepG2-Zellen eine Suppression von **PPAR α** auf etwa die Hälfte des Ausgangsniveau bewirkte (179). Da anscheinend der einzige Unterschied die Zelllinien sind, muss davon ausgegangen werden, dass hier nur eine limitierte Übertragung auf die Signalwege in den humanen Hepatozyten möglich ist. Wir gehen davon aus, dass unsere *in vitro*-Steatosis aufgrund der kurzen Zeit zur Induktion der Steatosis eine kurzfristige Gegenregulation in Form der **PPAR α** -Induktion erzeugt hat, die zur Protektion der Zellen diente. Ein Anhalt dafür stellt auch die stärkere Erhöhung des zytosolischen **PPAR α** -Gehalts gegenüber dem Protein im Nukleus dar. Im Unterschied zu den erwähnten *in vitro*-Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Palmitinsäure verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass Palmitinsäure eine Induktion von **PPAR α** bewirkt (131).

Wir konnten durch die *in vitro*-Steatosis eine Suppression von **SREBP-1c** auf **mRNA**-Ebene beobachten. Auch dies kann als Teil der Reaktion auf die kurzfristige Erhöhung des intrazellulären Lipidgehalts verstanden werden. Auf Proteinebene jedoch zeigte sich eine Erhöhung von aktivem, cleaved **SREBP-1c** im Nukleus, d.h. es erfolgte eine gesteigerte Spaltung der aktiven Form aus der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Hier sank der Proteingehalt an unreifem, uncleaved **SREBP-1c**, vermutlich zum einen als Folge der reduzierten Transkription, zum anderen aufgrund einer vermehrten Freisetzung von cleaved

SREBP-1c. Letzteres kann auf eine Zunahme an Stress des endoplasmatischen Retikulums, u.a. durch die Lipid-akkumulation, zurückgeführt werden. Untersuchungen von *Ferré et al.* haben gezeigt, dass Stress am endoplasmatischen Retikulum unabhängig von der Ursache eine rasche Spaltung und Freisetzung von cleaved **SREBP-1c** bewirkt (57). In einer Arbeit von *Fang et al.* konnte vor kurzem demonstriert werden, dass eine direkte **TAG**-Akkumulation *in vitro* zu Stress am endoplasmatischen Retikulum führt und infolgedessen die Spaltung von **SREBP-1c** erhöht ist (52). Hier wurde jedoch bei den steatotischen Hepatozyten eine erhöhte Expression an mRNA von **SREBP-1c** und **FASN** ermittelt. Diese konnte in unseren Versuchen nicht nachvollzogen werden, vermutlich aufgrund einer geringeren Inkubationszeit mit den Lipiden. In einer anderen Arbeit von *Kim et al.* an Mäusen, die einer (engl.) **high fat diet**, **fettreiche Ernährung (HFD)** unterzogen wurden, konnte jedoch ebenso eine durch alimentäre Verfettung erniedrigte Expression von **FASN** festgestellt werden (88). Unglücklicherweise wurde dort die Expression von **SREBP-1c** nicht ermittelt.

Nachfolgend sind die Einflüsse der **FFA**-Applikation auf die Signalwege im Lipidmetabolismus der **PHH** dargestellt, vgl. Abbildung 7.1

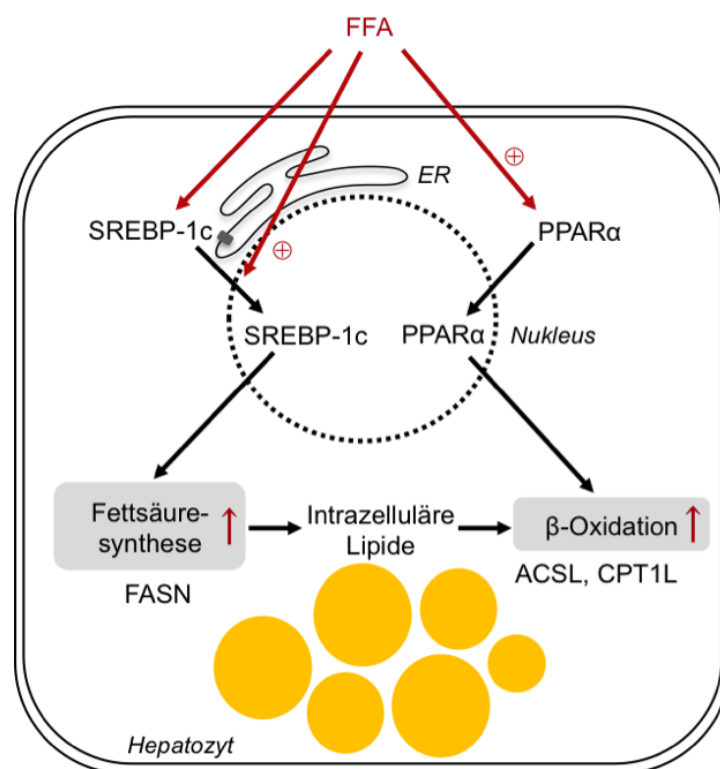


Abbildung 7.1: Einflüsse der induzierten Steatosis auf den hepatischen Lipidmetabolismus

7.2 Fenofibrat als Vergleichssubstanz

Fenofibrat wird im medizinischen Alltag bei Komorbiditäten der **NAFLD**, wie der Hyperlipidämie und dem metabolischen Syndrom eingesetzt. In diversen Untersuchungen konnten bereits Hinweise auf einen positiven Nutzen bei der **NAFLD** gesammelt werden (90, 150, 32). Die übliche medizinische Dosierung von Fenofibrat liegt zwischen 100 und 300 mg. Nach Ingestion von 300 mg konnten maximale Plasmakonzentrationen von 10 mg/l, d.h. 30 μM gemessen werden (16). In den vorliegenden Untersuchungen wurden nach vorangehender Toxizitätsermittlung mittels **XTT**-Viabilitätstest die Konzentrationen 1 und 75 μM für Fenofibrat verwendet. Diese sind im Bereich der für Toxizitätsuntersuchungen üblichen Dosierungen (68). Es zeigten sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Steatosisgruppe keine signifikanten Einschränkungen der Viabilität bei den angewandten Fenofibratkonzentrationen.

Auch bei den Ergebnissen aus der **AST**- und **LDH**-Messung konnte keine negative Wirkung auf die Membranintegrität festgestellt werden. Im Gegenteil konnte beispielsweise in den steatotischen Zellen eine Verminderung der **AST**-Ausschüttung um bis zu 34% bei 75 μM Fenofibrat beobachtet werden. Die Ergebnisse aus der **LDH**-Messung waren nicht so deutlich, es war jedoch auch hier eine fallende Tendenz zu beobachten, z.B. in den steatotischen Zellen um 16% bei 75 μM Fenofibrat. Dies weist auf eine zytoprotektive Wirkung von Fenofibrat hin. Bei *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen konnte durch Fenofibrat-Behandlung bereits eine reduzierte Infiltration mit Makrophagen sowie eine verminderte Expression an inflammatorischen Genen beobachtet werden (150, 90). In einer kleinen klinischen Studie mit Fenofibrat konnten ebenso sinkende Transaminasen beobachtet werden (56).

Im verwendeten Steatosis-Modell konnte nach einmaliger Fenofibrat-Gabe keine Änderung des Lipidgehalts erzielt werden, weder optisch nach Färbung noch quantitativ nach Herauslösen des Farbstoffs. Ein Grund könnte die geringe Applikationszeit von Fenofibrat darstellen. In einer vor kurzem veröffentlichten Untersuchung von *Rogue et al.* an einem Ölsäure-induzierten Steatosis-Modell an HepaRG-Zellen wurde Fenofibrat sowohl einmalig für 24 Stunden als auch repetitiv für 14 Tage appliziert (133). Nach einmaliger Gabe konnte dort noch keine Änderung des Lipidgehalts festgestellt werden, während die 14-tägige Inkubation mit Fenofibrat eine signifikante Reduktion des Lipidgehalts um etwa 50% erzielte. Eine derart lange Kultivierung der **PHH** ist jedoch aufgrund von Vitalitätsverlusten und Entdifferenzierung in der verwendeten Zellkultur nicht möglich.

Einen anderen Grund für die unzureichende Reduktion des Lipidgehalts könnte das Fehlen von anderen Zelltypen darstellen. In einer Monokultur von **PHH** können physiologische

Prozesse wie die Aufnahme und Abgabe von Stoffwechselprodukten zwischen den Organismen, beispielsweise zwischen Hepatozyten und Adipozyten, nicht stattfinden. So kann die durch eine induzierte β -Oxidation freigesetzte Energie nicht verwertet werden und die darauf folgende Einstellung eines Gleichgewichts der enzymatischen Reaktionen wirkt der Reduktion der Lipide entgegen.

Die Ermittlung des Harnstoffspiegels ergab keine Beeinflussung durch Fenofibrat. Die durch die Induktion der Steatosis leicht reduzierte Harnstoffkonzentration blieb bestehen. Die fehlende Beeinflussung des Harnstoffmetabolismus unterstreicht die Sicherheit von Fenofibrat in der klinischen Anwendung.

Fenofibrat führte in den nicht-steatotischen Hepatozyten jedoch zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Induktion von $PPAR\alpha$ auf Transkriptionsebene. Dies spiegelte sich auch im Proteingehalt wider. In den steatotischen Zellen war der Effekt von Fenofibrat nicht so deutlich. Da sich $PPAR\alpha$ allein aufgrund der induzierten Steatosis auf einem höheren Level befand, könnte dies zu einer unzureichenden weiteren Erhöhung durch die zusätzliche Gabe von Fenofibrat geführt haben. Insbesondere auf Proteinebene ist dies auch der hohen Variation zwischen den Spendern zu schulden. Eine Induktion von $PPAR\alpha$ durch Fenofibrat geht konform mit Untersuchungen aus der Literatur (133, 81, 149). Wie auch bei den Ergebnissen aus der Induktion der Steatosis erfolgte der Anstieg von $PPAR\alpha$ insbesondere im zytosolischen Kompartiment. Eine Erklärung könnte die zeitliche Verzögerung zwischen Änderungen im zytosolischen und nukleären Kompartiment sein. Alternativ kann angenommen werden, dass die Steatosis die Translokation von $PPAR\alpha$ in den Zellkern, bspw. durch Stress verhindert. So konnte gezeigt werden, dass die unter Stress verstärkt aktivierte Extrazellulär Regulierte Proteinkinase, Typ 1/2 (ERK1/2), über Bildung eines MEK1/ $PPAR\alpha$ -Komplex und die Verlagerung ins Zytosol, die nukleäre Aktivität von $PPAR\alpha$ verringert (15).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch Fenofibrat eine konzentrationsabhängige Induktion von SREBP-1c bei den nicht-steatotischen Hepatozyten beobachtet werden. Diese Beobachtung entspricht den vorbeschriebenen Ergebnissen aus der Literatur (122, 32, 133). *Oosterveer et al.* erklären dies zum einen mit einem erhöhten Angebot an plasmatischen Lipiden, welche durch Fenofibratbehandlung aus dem Fettgewebe freigesetzt werden. Zum anderen wird eine Förderung der Lipogenese vermutet durch Acetyl-CoA, das bei der β -Oxidation entsteht, sowie $NADPH/H^+$, welches von Fenofibrat-induzierten Enzymen, z.B. der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, vermehrt gebildet wird (122). Aufgrund der Kulturbedingungen *in vitro* kann der erste Zusammenhang im vorliegenden Modell ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wird seit einigen Jahren davon ausgegangen, dass neben Insulin und $LXR\alpha$ auch $PPAR\alpha$ essentiell für die Aktivität von $SREBP-1c$ und den davon regulierten Lipidmetabolismus ist (75, 80). Deren Erklärung für diesen physiologischen Mechanismus ist eine balancierte Kontrolle des Lipidmetabolismus bei $PPAR\alpha$ -Aktivierung. Andererseits scheint $SREBP-1c$ ebenso wichtig für die Aktivierung von $PPAR\alpha$ zu sein. *Chakravarthy et al.* fanden heraus, dass eine Defizienz an $SREBP-1c$ abhängiger $FASN$ die Aktivierung von $PPAR\alpha$ stark beeinträchtigt (31). So scheint in der Tat eine komplexe Regulation des Fettsäureabbaus und -aufbaus zu existieren, in der die vermeintlichen Gegenspieler $PPAR\alpha$ und $SREBP-1c$ einander bedingen.

7.3 Genistein

In der vorliegenden Arbeit wurde Genistein hinsichtlich seiner Effekte auf die Steatosis hepatis an einem *in vitro*-Modell mit primären humanen Hepatozyten untersucht. Zunächst wurden Viabilitätsuntersuchungen zur Abschätzung der Toxizität an den Hepatozyten durchgeführt. Anhand des XTT konnten insbesondere in den steatotischen Zellen ab $50\ \mu\text{M}$ eine signifikant eingeschränkte Viabilität auf bis zu 58% der unbehandelten Kontrollen beobachtet werden. Im Zusammenhang mit bereits durchgeführten Untersuchungen sind dies Konzentrationen, die bei enteraler Aufnahme von Genistein aufgrund der limitierten Absorption und raschen Metabolisierung nicht möglich sind (89, 19). Dennoch wurden auch diese hohen Konzentrationen für die Untersuchungen verwendet, da ein anderer Applikationsweg, z.B. die intravenöse Gabe, oder eine direkte Perfusion der Leber nach Entnahme des Organs ebenso denkbar wären. Die signifikante Verminderung der Viabilität der Hepatozyten spricht jedoch gegen einen Einsatz von Genistein in diesem Konzentrationsbereich.

Bei der Messung der freigesetzten Enzyme AST und LDH , welche als Marker für die Membranintegrität eingesetzt werden, ergaben sich erst bei $100\ \mu\text{M}$ deutliche Erhöhungen um 27% bei AST bzw. 38% bei LDH . Bei diesen Messungen müssen jedoch die hohen Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern beachtet werden, welche zum Teil auf diversen Vorschäden der Zellen basieren. Insgesamt kann somit davon ausgegangen werden, dass Genistein in Konzentrationen ab $50\ \mu\text{M}$ einen toxischen Einfluss auf die Hepatozyten haben kann.

Wie auch bei Fenofibrat konnte nach Genisteingabe in diesem Modell der Steatosis hepatis keine Änderung des Lipidgehalts, gemessen mittels Ölrot O-Färbung, festgestellt werden. Die bereits erwähnten möglichen Ursachen dafür können hier übertragen werden. Darüber hinaus wird Genistein eine kürzere biologische Halbwertszeit zugeschrieben, etwa zwischen 5

und 14 Stunden, während sie bei Fenofibrat mit 21 Stunden angegeben wird (178, 172, 173). Eine eingeschränkte Wirkdauer könnte somit den Einfluss auf den Lipidgehalt mindern.

Nichtsdestotrotz muss im vorliegenden Modell im Vergleich zum menschlichen Metabolismus mit einer grundlegend anderen Pharmakokinetik gerechnet werden. Bei beiden lipophilen Substanzen kommt dem Zusammenspiel von enteraler Absorption, enteraler Metabolisierung, hepatischer Metabolisierung, hepatischer Exkretion und enteraler Reabsorption von Metaboliten eine große Bedeutung zu (172, 178, 44). Da im vorliegenden Modell weder das enterale Organsystem noch die biliären Zellen vertreten sind, ist es sehr schwierig, die Metabolisierung von Fenofibrat bzw. Genistein abzuschätzen. *Bursztyka et al.* haben gezeigt, dass bei der hepatischen Metabolisierung von Genistein einige Produkte entstehen, welche bereits im menschlichen Blutplasma, im Urin und in der Galle nachgewiesen werden konnten (26). Es stehen jedoch Untersuchungen aus, die einen Vergleich bei der Menge, dem zeitlichen Verlauf und den übrigen Stoffwechselprodukten zwischen *in vitro*-Untersuchungen an Hepatozyten und dem Organismus *in vivo* herstellen.

Im vorliegenden Modell hatte Genistein weder in den steatotischen noch in den unbehandelten Hepatozyten einen Einfluss auf die Harnstoffkonzentration. Wie bei Fenofibrat wird diese Tatsache als Hinweis auf eine bezüglich des Harnstoffmetabolismus unbedenkliche Verwendung gewertet.

Da unter den Bedingungen im vorliegenden Modell keine Änderung des Lipidgehalts festgestellt werden konnte, wurde zudem der Einfluss von Genistein auf molekularer Ebene untersucht. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die hepatische Lipidhomöostase sind **PPAR α** und **SREBP-1c**. Eine Aktivierung von **PPAR α** führt zu einer Induktion von zentralen Enzymen der β -Oxidation, wie z.B. **CPT1L** und **ACSL** (129).

Anhand der Ergebnisse aus der Real time-PCR ist ersichtlich, dass Genistein unter diesen Bedingungen zu keiner eindeutigen Induktion von **PPAR α** führte. Die steatotischen Zellen hatten gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine erhöhte **PPAR α** -Expression. In den steatotischen Hepatozyten stieg der mRNA-Gehalt von **PPAR α** ab einer Genisteinkonzentration von 5 μ M gegenüber 0 μ M geringfügig an. In der Kontrollgruppe kam es bei höheren Genisteinkonzentrationen jedoch zu einem Abfall der **PPAR α** -Expression. Die hohe Schwankungsbreite zwischen den Spendern erschwert zusätzlich die Interpretation der Werte.

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus dem Western Blot ist allerdings ersichtlich, dass in den Kontrollhepatozyten der Proteingehalt von **PPAR α** sowohl im Zytosol als auch im Nukleus

einen Anstieg durch Genistein verzeichnet. Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Werten könnte zum einen durch eine von Genistein beeinflusste Prozessierung des Proteins erklärt werden. Zum anderen könnte eine auf die erhöhte Proteinkonzentration von PPAR α folgende Gegenregulation zu einem Abfall der PPAR α -Expression geführt haben. Die induzierte Steatosis hat diese Wirkung von Genistein unterbunden, sodass bei der Protein-konzentration der Einfluss nicht mehr ersichtlich war. Einige Untersuchungen weisen daraufhin, dass Genistein eine Erhöhung von PPAR α bewirkt (111, 87, 146). Am häufigsten und stärksten konnte dies jedoch im Zusammenhang mit Sojaproteinisolat gezeigt werden, welches reich an Isoflavonen ist (135, 152). So besteht die Möglichkeit, dass nicht nur Genistein oder ein anderes Sojaiso-flavon allein, sondern die gesamte Zusammensetzung im Sojaprotein den größten Einfluss auf PPAR α hat.

Die Applikation von Genistein bewirkte sowohl bei den unbehandelten als auch bei den steatotischen Hepatozyten eine Senkung des Gehalts an SREBP-1c. Dies war insbesondere auf mRNA-Ebene signifikant. Auch die Ergebnisse aus der Proteinanalyse ergaben bei den Kontrollhepatozyten eine durch Genistein bewirkte Senkung von SREBP-1c im Membran- und Nukleuskompartiment. Die steatotischen Zellen haben diese Änderungen nicht so deutlich gezeigt, lassen jedoch im Ansatz einen ähnlichen Einfluss vermuten. Die beobachteten Ergebnisse gehen zum Teil konform mit einer anderen Untersuchung, die gezeigt hat, dass Genistein den Proteingehalt von SREBP-1c senkt (148). Hier wurde an HepG2-Zellen jedoch die Prozessierung des SREBP-1c-Proteins als Angriffspunkt von Genistein vermutet. Der mRNA-Gehalt blieb in dieser Untersuchung unbeeinflusst. Eine Veröffentlichung von Park *et al.* konnte eine Senkung der Expression von SREBP-1c durch Genistein feststellen (123). Diese wurde jedoch an Adipozyten durchgeführt und lässt sich somit nicht ohne weiteres auf Hepatozyten übertragen. Übrige Studien zeigten Einflüsse auf SREBP-1c, wie auch bei PPAR α , vor allem im Kontext von Untersuchungen als Sojaproteinisolat (11, 73). Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, sollten hier noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Vermutung liegt nahe, dass die induzierte Steatosis zu erheblichen Änderungen des Lipidmetabolismus geführt hat, welche die möglichen Einwirkungen von Genistein maskieren könnten. Weiterführende Untersuchungen sollten in Betracht ziehen, die Behandlung mit Genistein vor Induktion der Steatosis durchzuführen und so eine mögliche präventive Rolle bei der Entwicklung der NAFLD zu prüfen.

7.4 Bedeutung für die Leberchirurgie

In der chirurgischen Praxis ergibt sich durch die eingeschränkte metabolische Funktion der steatotischen Hepatozyten ein erheblicher Nachteil bei der Leberteilektomie sowie bei der Verwendung der steatotischen Organe in der Lebertransplantation. Um die Qualität der Transplantate zu erhöhen und eine Verwendung von steatotischen Lebern zu ermöglichen, gibt es diverse Ansätze. Eine Methode könnte die pharmakologische Reduktion des hepatischen Lipidgehalts darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Isoflavon Genistein hinsichtlich des Einflusses auf den Lipidstoffwechsel in steatotischen Hepatozyten untersucht, um als möglicher Ansatzpunkt für die Behandlung der **NAFLD** zu dienen. Als Bezugspunkt wurde Fenofibrat verwendet, welches bereits klinisch bei Lipidstoffwechselstörungen und zum Teil bei der **NAFLD** eingesetzt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben erste Hinweise auf eine mögliche pharmakologische Beeinflussung des Lipidgehalts für Leberpräparate gegeben. Das verwendete *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis diente zu einer Darstellung der Bedingungen *in vivo*. Obwohl der Lipidgehalt und die Toxizitätsuntersuchungen dies widerspiegeln, deuten die unterschiedliche Genexpression verglichen zu erhobenen Daten aus *in vivo*-Proben auf eine nur eingeschränkte Übertragbarkeit des Modells hin (s.u.).

Um die Ergebnisse der Transplantation marginaler Organe zu verbessern, werden derzeit diverse Verfahren untersucht. Als unabdingbar wird die Minimierung anderer Risikofaktoren, wie Warm- und Kaltischämie perioperativ, angesehen. Darüberhinaus werden verschiedene Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Transplantationsergebnisse verfolgt. Zum Beispiel könnte die inflammatorische Reaktion *post transplantationem* durch Beeinflussung der Zytokinsignalwege, des Endothelin-Rezeptors, des Hämoxigenase-Systems oder der mitochondrialen Dysfunktion gedämpft werden (162, 168, 160). Eine andere Möglichkeit könnte die maschinelle Perfusion der Leber als Überbrückung zur Implantation darstellen. Dabei wird die Leber in einem aufwendigen Verfahren mit normothermer oder hypothermer, oxygenierter Perfusionslösung behandelt, um die Energieversorgung aufrechtzuerhalten und ischämische und Reperfusionsschäden zu verringern (47). Allerdings gibt es für diese Möglichkeiten noch keine ausreichenden Forschungsergebnisse, sodass derzeit noch kein Verfahren etabliert ist, um den Erfolg von Transplantationen marginaler Organe zu verbessern (114).

7.5 Limitationen

Es wurden **Primäre humane Hepatozyten (PHH)** verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass es ab dem Zeitpunkt der Isolierung und mit Beginn der Kultivierung *ex vivo* zu einer Veränderung der Genexpression und somit zur Modifikation von Zellzyklusphase, Zellmorphologie und metabolischer Aktivität kommt (62). Um diese Dedifferenzierung zu verzögern, wurden im verwendeten Zellmodell dem Zellkulturmedium die Substanzen Insulin und Fordecortin sowie fötales Kälberserum zugesetzt. Es wurden Kollagen-beschichtete Zellkulturplatten verwendet, um die Adhärenz zu ermöglichen und den Phänotyp der Hepatozyten zu erhalten. Derzeit stellt das *in vitro*-Modell mit **PHH** den Goldstandard für pharmakologische Studien dar, da die Genexpression den Zellen *in vivo* am nächsten kommt, verglichen beispielsweise mit der am häufigsten verwendeten Zelllinie HepG2 (23, 30, 62).

Für die Untersuchung wurde ein weites Spektrum an Spendern einbezogen. Dies führte dazu, dass Veränderungen, die spezifisch für die Erkrankung, die Altersgruppe oder das Geschlecht sind, nicht so stark ins Gewicht fielen. Auf der anderen Seite haben die bestehenden Unterschiede zwischen den Spendern zu erheblichen Spannweiten der Messergebnisse geführt. Diese können nicht nur auf die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse, die spezifisch für eine Krankheit sind, zurückgeführt werden, sondern auch auf das Alter, andere entzündliche Prozesse, bestehende Komorbiditäten sowie auf Veränderungen durch medikamentöse Vorbehandlung. Außerdem sind weitere spenderspezifische Unterschiede durch angeborene oder im Laufe des Lebens erworbene Einflüsse auf die genetische Enzymausprägung und -aktivität einzubeziehen. Zusätzlich muss ebenso die unmittelbare Behandlung der Zellen vor und nach Entnahme des Gewebes in Betracht gezogen werden. Ein während der Operation durchgeführtes Pringle-Manöver, das heißt eine kurzzeitige Unterbindung des Ligamentum hepatoduodenale inklusive der darin verlaufenden *Arteria hepatica communis* und der Pfort-ader, führte zu einer Ischämie und infolgedessen zu einer eingeschränkten Viabilität der isolierten **PHH**. Obwohl die Prozesse der Isolation nach einem standardisierten Protokoll stattfanden, konnte eine identische perioperative Behandlung und Ischämiezeit aller Präparate nicht gewährleistet werden.

8 Literaturverzeichnis

- [1] ADAMS, LA ; LYMP, JF ; SAUVER, J S. ; SANDERSON, SO ; LINDOR, KD ; FELDSTEIN, A ; ANGULO, P: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. In: *Gastroenterology* 129 (1) (2005), S. 113–121
- [2] ALLRED, CD ; ALLRED, KF ; JU, YH ; VIRANT, SM ; HELFERICH, WG: Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. In: *Cancer Research* 61 (13) (2001), S. 5045–5050
- [3] AMEMIYA-KUDO, M. ; SHIMANO, H. ; HASTY, A.H. ; YAHAGI, N. ; YOSHIKAWA, T. ; MATSUZAKA, T. ; OKAZAKI, H. ; TAMURA, Y. ; IIZUKA, Y. ; OHASHI, K. ; OSUGA, J. ; HARADA, K. ; GOTODA, T. ; SATO, R. ; KIMURA, S. ; ISHIBASHI, S. ; YAMADA, N.: Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. In: *Journal of Lipid Research* 43 (2002), S. 1220–1235
- [4] ANDERSON, J.J. ; AMBROSE, W.W. ; GARNER, S.C.: Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 217 (3) (1998), S. 345–350
- [5] ANDERSON, JW ; JOHNSTONE, BM ; COOK-NEWELL., ME: Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. In: *New England Journal of Medicine* 333 (5) (1995), S. 276–282
- [6] ANDERSON, N ; BORLAK, J: Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. In: *Pharmacological Reviews* 60 (3) (2008), S. 311–357
- [7] ANGULO, P.: Nonalcoholic fatty liver disease. In: *New England Journal of Medicine* 346 (16) (2002), S. 1221–1231
- [8] ANGULO, P. ; LINDOR, KD: Non-alcoholic fatty liver disease. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17 Suppl (2002), S. 186–190
- [9] ARAYA, J. ; RODRIGO, R. ; VIDELA, L.A. ; THIELEMANN, L. ; ORELLANA, M. ; PETTINELLI, P. ; PONIACHIK, J.: Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. In: *Clinical Science* 106 (6) (2004), Juni, S. 635–643
- [10] ARJMANDI, B.H. ; ALEKEL, L. ; HOLLIS, B.W.: Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. In: *Journal of Nutrition* 126 (1) (1996), S. 161–167

- [11] ASCENDIO, C ; TORRES, N ; ISOARD-ACOSTA, F ; GÓMEZ-PÉREZ, FJ ; HERNÁNDEZ-PANDO, R ; TOVAR, AR: Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. In: *The Journal of Nutrition*. 134 (3) (2004), S. 522–529
- [12] ATTAR, BM ; THIEL, DH V.: Current concepts and management approaches in non-alcoholic fatty liver disease. In: *TheScientificWorldJournal* 2013 (2013), S. 481893–481893
- [13] AZAROVA, AM ; LIN, RK ; TSAI, YC ; LIU, LF ; LIN, CP ; LYU., YL: Genistein induces topoisomerase IIbeta- and proteasome-mediated DNA sequence rearrangements: Implications in infant leukemia. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (1) (2010), S. 66–71
- [14] AZZOUT-MARNICHE, D. ; BECARD, D. ; GUICHARD, C. ; FORETZ, M. ; FERRE, P. ; FOUFELLE, F.: Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. In: *Biochemical Journal* 350 (2000), S. 389–393
- [15] AZZOUZI, H el ; LEPTIDIS, S ; BOURAJAJ, M ; BILSEN, M van ; COSTA MARTINS, PA da ; WINDT., LJ D.: MEK1 inhibits cardiac PPARalpha activity by direct interaction and prevents its nuclear localization. In: *PLoS One* 7 (6) (2012), S. e36799
- [16] BALFOUR, JA ; MCTAVISH, D ; HEEL., RC: Fenofibrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. In: *Drugs* 40 (2) (1990), S. 260–290
- [17] BANZ, W ; HAUCK, S ; GENAME, B ; WINTERS, T ; BARTKE., A: Soy isoflavones modify liver free radical scavenger systems and liver parameters in Sprague-Dawley rats. In: *Journal of medicinal food* 7 (4) (2004), S. 477–481
- [18] BARLOW, J ; JOHNSON, JAP ; SCONFIELD, L: *Early Life Exposure to the Phytoestrogen Genistein and Breast Cancer Risk in Later Years*. July 2007. – URL http://www.bcerc.org/COTCpubs/BCERC.FactSheet_Phytoestrogen_Genistein.pdf
- [19] BARNES, S: Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. In: *The Journal of Nutrition*. 125 (3) (1995), S. 777S–783S
- [20] BARNES, S. ; GRUBBS, C. ; SETCHELL, K.D. ; CARLSON, J.: Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. In: *Progress in Clinical Biological Research* 347 (1990), S. 239–253
- [21] BELLENTANI, S. ; SCAGLIONI, F. ; MARINO, M. ; BEDOGNI, G.: Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. In: *Digestiv* 28 (1) (2010), Januar, S. 155–161
- [22] BHALA, N ; ANGULO, P ; POORTEN, D van ; LEE, E ; HUI, JM ; SARACCO, G ; ADAMS, LA ; CHARATCHAROENWITTHAYA, P ; TOPPING, JH ; BUGIANESI, E ; DAY, CP ; GEORGE, J: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced

- fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. In: *Hepatology* 54 (4) (2011), S. 1208–1216
- [23] BOESS, F ; KAMBER, M ; ROMER, S ; GASSER, R ; MULLER, D ; ALBERTINI, S ; SUTER, L: Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. In: *Toxicological Sciences* 73 (2) (2003), S. 386–402
- [24] BORRÁS, C ; GAMBINI, J ; GÓMEZ-CABRERA, MC ; SASTRE, J ; PALLARDÓ, FV ; MANN, GE ; VIÑA., J: Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. In: *FASEB Journal* 20 (12) (2006), S. 2136–2138
- [25] BRADEN, A.W.H. ; HART, N.K. ; LAMBERTON, J.A.: The estrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. In: *Australian Journal of Agricultural Research* 18 (1967), S. 335–348
- [26] BURSZTYKA, J ; PERDU, E ; TULLIEZ, J ; DEBRAUWER, L ; DELOUS, G ; CANLET, C ; SOUSA, G D. ; RAHMANI, R ; BENFENATI, E ; CRAVEDI., JP: Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. In: *Food and Chemical Toxicology* 46 (3) (2008), S. 939–948
- [27] CALDWELL, S ; ARGO, C: The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. In: *Digestive Diseases* 28 (1) (2010), S. 162–168
- [28] CANBAY, A ; GIESELER, RK ; GORES, GJ ; GERKEN., G: The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 43 (2) (2005), S. 211–217
- [29] CARROLL, KK: Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. In: *Journal of the American Di* 91 (7) (1991), S. 820–827
- [30] CASTELL, JV ; JOVER, R ; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, CP ; GÓMEZ-LECHÓN, MJ: Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. In: *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2 (2) (2006), S. 183–212
- [31] CHAKRAVARTHY, MV ; PAN, Z ; ZHU, Y ; TORDJMAN, K ; SCHNEIDER, JG ; COLEMAN, T ; TURK, J ; SEMENKOVICH., CF: "New"hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. In: *Cell metabolism* 1 (5) (2005), S. 309–322
- [32] CHAN, SM ; SUN, RQ ; ZENG, XY ; CHOONG, ZH ; WANG, H ; WATT, MJ ; YE, JM: Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. In: *Diabetes* 62 (6) (2013), S. 2095–2105

- [33] CHAVIN, K.D. ; FIORINI, R.N. ; SHAFIZADEH, S. ; CHENG, G. ; WAN, C. ; EVANS, Z. ; RODWELL, D. ; POLITO, C. ; HAINES, J.K. ; BAILLIE, G.M. ; SCHMIDT, M.G.: Fatty acid synthase blockade protects steatotic livers from warm ischemia reperfusion injury and transplantation. In: *American Journal of Transplantation* 4 (9) (2004), September, S. 1440–1447
- [34] CLARK, JM ; DIEHL, AM: Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. In: *JAMA* 289 (22) (2003), S. 3000–3004
- [35] CLARKE, SD.: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. In: *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 281 (4) (2001), S. 865–869
- [36] CORRADO, RL ; TORRES, DM ; HARRISON, SA: Review of treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. In: *The Medical Clinics of North America*. 98 (1) (2014), S. 55–72
- [37] DAI, S.Y. ; BURRIS, T.P. ; DODGE, J.A. ; MONTROSE-RAFIZADEH, C. ; WANG, Y. ; PASCAL, B.D. ; CHALMERS, M.J. ; GRIFFIN, P.R: Unique ligand binding patterns between estrogen receptor alpha and beta revealed by hydrogen-deuterium exchange. In: *Biochemistry* 48 (40) (2009), Oktober, S. 9668–9676
- [38] DANG, ZC: Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. In: *Obesity reviews*. 10 (3) (2009), S. 342–349
- [39] DANG, ZC ; AUDINOT, V ; PAPAPOULOS, SE ; BOUTIN, JA ; LÖWIK, CW: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2) (2003), S. 962–967
- [40] DASARATHY, S ; KASUMOV, T ; EDMISON, JM ; GRUCA, LL ; BENNETT, C ; DUENAS, C ; MARCZEWSKI, S ; MCCULLOUGH, AJ ; HANSON, RW ; KALHAN., SC: Glycine and urea kinetics in nonalcoholic steatohepatitis in human: effect of intralipid infusion. In: *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 297 (3) (2009), S. G567–575
- [41] DAY, C.P. ; JAMES, O.F.W: Steatohepatitis: a tale of two “hits”? In: *Gastroenterology* 114 (1998), S. 842–845
- [42] DAY, JK ; BESCH-WILLIFORD, C ; MCMANN, TR ; HUFFORD, MG ; LUBAHN, DB ; MACDONALD, RS: Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER alpha KO, mice. In: *Nutrition and Cancer* 39 (2) (2001), S. 226–232
- [43] DEBOSE-BOYD, R.A. ; OU, J. ; GOLDSTEIN, J.L. ; BROWN, M.S.: Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 13 (2001), Februar, S. 1477–82

- [44] DO, TT ; SPEYBROECK, M V. ; MOLS, R ; ANNAERT, P ; MARTENS, J ; HUMBEECK, J V. ; VERMANT, J ; AUGUSTIJNS, P ; MOOTER., G V. den: The conflict between in vitro release studies in human biorelevant media and the in vivo exposure in rats of the lipophilic compound fenofibrate. In: *International Journal of Pharmaceutics* 414 (1-2) (2011), S. 118–124
- [45] DONNELLY, KL ; SMITH, CI ; SCHWARZENBERG, SJ ; JESSURUN, J ; BOLDT, MD ; PARKS., EL: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. In: *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2005), S. 1343–1351
- [46] DOYCHEVA, I ; LOOMBA, R: Effect of Metformin on Ballooning Degeneration in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): When to Use Metformin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). In: *Advances in Therapy* 31 (1) (2014), S. 30–43
- [47] DUTKOWSKI, P ; ROUGEMONT, O de ; CLAVIEN, PA: Machine perfusion for 'marginal' liver grafts. In: *American Journal of Transplantation* 8 (5) (2008), S. 917–924
- [48] EBERLÉ, D. ; HEGARTY, B. ; BOSSARD, P. ; FERRÉ, P. ; FOUFELLE, F.: SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. In: *Biochimie* 86 (11) (2004), November, S. 839–48
- [49] ESTEP, J.M. ; BIRERDINC, A. ; YOUNOSSI, Z.: Non-Invasive Diagnostic Tests for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *Current Molecular Medicine* 10 (2) (2010), S. 166–172
- [50] EVANS, B.A.J. ; GRIFFITHS, K. ; MORTON, M.S.: Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. In: *Journal of Endocrinological Investigation* 147 (2) (1995), S. 295–302
- [51] FABBRINI, E. ; MOHAMMED, BS ; MAGKOS, F. ; KORENBLAT, KM ; PATTERSON, BW ; KLEIN, S.: Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Gastroenterology* 134 (2) (2008), S. 424–431
- [52] FANG, DL ; WAN, Y ; SHEN, W ; CAO, J ; SUN, ZX ; YU, HH ; ZHANG, Q ; CHENG, WH ; CHEN, J ; NING., B: Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. In: *Molecular and cellular biochemistry*. 381 (1-2) (2013), S. 127–137
- [53] FARMAKALIDIS, E. ; HATHCOCK, J.N. ; MURPHY, P.A.: Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. In: *Food and Chemical Toxicology* 23 (1985), S. 741–745
- [54] FARRELL, G.C. ; LARTER, C.Z.: Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. In: *Hepatology* 43 (2 Suppl 1) (2006), S. 99–112

- [55] FATANI, S ; ITUA, I ; CLARK, P ; WONG, C ; NADERALI, EK: The effects of diet-induced obesity on hepatocyte insulin signaling pathways and induction of non-alcoholic liver damage. In: *International Journal of General Medicine* 4 (2011), S. 211–219
- [56] FERNÁNDEZ-MIRANDA, C ; PÉREZ-CARRERAS, M ; COLINA, F ; LÓPEZ-ALONSO, G ; VARGAS, C ; SOLIS-HERRUZO, JA: A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. In: *Digestive and Liver Disease* 40 (3) (2008), S. 200–205
- [57] FERRÉ, P ; FOUFELLE., F: Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl. 2 (2010), S. 83–92
- [58] FOLMAN, Y. ; POPE, G.S.: The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistien and other utero- vaginotrophic compounds of low potency. In: *Journal of Endocrinology* 34 (1966), S. 215–225
- [59] FOTSIS, T. ; PEPPER, M. ; ADLERCREUTZ, H.: Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (7) (1993), S. 2990–2994
- [60] FOTSIS, T. ; PEPPER, M. ; ADLERCREUTZ, H.: Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. In: *Journal of Nutrition* 125 (3) (1995), S. 790–797
- [61] FOUNDATION, Eurotransplant I.: *Eurotransplant Statistics - 2000 and Eurotransplant Statistics - 2011*. 2000/2011. – URL <http://www.eurotransplant.org>
- [62] FRACZEK, J ; BOLLEYN, J ; VANHAECKE, T ; ROGIERS, V ; VINKEN, M: Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. In: *Archives of Toxicology* 87 (4) (2013), S. 577–610
- [63] FRUCHART, J.C. ; DURIEZ, P.: Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. In: *Drugs Today (Barc)* 42 (1) (2006), Januar, S. 39–64
- [64] GEORGE, J. ; LIDDLE, C.: Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets. In: *Molecular Ph* 5 (1) (2008), S. 49–59
- [65] GÓMEZ-LECHÓN, MJ ; DONATO, MT ; MARTINEZ-ROMERO, A ; JIMÉNEZ, N ; CASTELL, JV ; O’CONNOR., JE: A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. In: *Chemico-Biological Interactions* 165 (2) (2007), S. 106–116
- [66] GRAAF, E.L. de ; KENCH, J. ; DILWORTH, P. ; SHACKEL, N.A. ; STRASSER, S.I. ; JOSEPH, D. ; PLEASS, H. ; CRAWFORD, M. ; MCCAUGHAN, G.W. ; VERRAN, D.J.: Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 (3) (2012), März, S. 540–546

- [67] GRUNDY, SM: Metabolic syndrome pandemic. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (4) (2008), S. 629–636
- [68] GUO, Y ; JOLLY, RA ; HALSTEAD, BW ; BAKER, TK ; HUFFMAN, M ; CALLEY, JN ; WEST, A ; GAO, H ; SEARFOSS, GH ; LI, S ; IRIZARRY, AR ; QIAN, HR ; STEVENS, JL ; RYAN., TP: Underlying mechanisms of pharmacology and toxicity of a novel PPAR agonist revealed using rodent and canine hepatocytes. In: *Toxicological Sciences* 96 (2) (2007), S. 294–309
- [69] GUTIÉRREZ-GROBE, Y ; GAVILANES-ESPINAR, JG ; MASSO-ROJAS, FA ; SÁNCHEZ-VALLE, V ; PÁEZ-ARENAS, A ; PONCIANO-RODRIGUEZ, G ; CHÁVEZ-TAPIA, NC ; URIBE, M ; MÉNDES-SÁNCHEZ, N: Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. The role of endothelial progenitor cells. In: *Annals of Hepatology* 12 (6) (2013), S. 908–914
- [70] HARDWICK, RN ; FISHER, CD ; CANET, MJ ; LAKE, AD ; CHERRINGTON, NJ: Diversity in Antioxidant Response Enzymes in Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Drug Metabolism and Disposition* 38 (12) (2010), S. 2293–2301
- [71] HARRING, TR ; O’MAHONY, CA ; GROSS, JA: Extended donors in liver transplantation. In: *Clinics in Li* 15 (4) (2011), S. 879–900
- [72] HARRISON, SA ; TORGERSON, S ; HAYASHI, PH: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. In: *American Journal of G* 98 (9) (2003), S. 2042–2047
- [73] HASHIDUME, T ; SASAKI, T ; SATO, J I. andR: Consumption of soy protein isolate reduces hepatic SREBP-1c and lipogenic gene expression in wild-type mice, but not in FXR-deficient mice. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (9) (2011), S. 1702–1707
- [74] HAYASHI, M. ; FUJII, K. ; KIUCHI, T. ; URYUHARA, K. ; KASAHARA, M. ; TAKATSUKI, M. ; TAKEICHI, T. ; KITADE, H. ; SUGIMOTO, T. ; UEMOTO, S. ; ASONUMA, K. ; EGAWA, H. ; FUJITA, S. ; INOMATA, Y. ; TANAKA, K.: Effects of fatty infiltration of the graft on the outcome of living-related liver transplantation. In: *Transplantation Proceedings* 31 (1-2) (1999), Februar-März, S. 403
- [75] HEBBACHI, AM ; KNIGHT, BL ; WIGGINS, D ; PATEL, DD ; GIBBONS., GF: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding: restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (8) (2008), S. 4866–4876
- [76] HORTON, J.D. ; BASHMAKOV, Y. ; SHIMOMURA, I. ; SHIMANO, H.: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), S. 5987–5992

- [77] HORTON, JD ; GOLDSTEIN, JL ; BROWN., MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. In: *The Journal of Clinical Investigation* 109 (9) (2002), S. 1125–1131
- [78] HU, G ; LINDSTRÖM, J ; JOUSILAHTI, P ; PELTONEN, M ; SJÖBERG, L ; KAAJA, R ; SUNDVALL, J ; TUOMILEHTO, J: The increasing prevalence of metabolic syndrome among Finnish men and women over a decade. In: *Journal of Endocrinology & Metabolism* 93 (3) (2008), S. 832.836
- [79] IBRAHIM, MA ; KELLENI, M ; GEDDAWY, A: Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. In: *Life Sciences* 92 (2) (2013), S. 114–118
- [80] ISLAM, KK ; KNIGHT, BL ; FRAYN, KN ; PATEL, DD ; GIBBONS., GF: Deficiency of PPARalpha disturbs the response of lipogenic flux and of lipogenic and cholesterologenic gene expression to dietary cholesterol in mouse white adipose tissue. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1734 (3) (2005), S. 259–268
- [81] JI, G ; YANG, Q ; GUO, L ; CHEN, X ; HU, J ; LENG, L ; JIANG, Z: Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. In: *International Immunopharmacology* 11 (6) (2011), S. 762–768
- [82] KAMADA, Y ; TAKEHARA, T ; HAYASHI, N: Adipocytokines and liver disease. In: *Journal of Gastroenterology* 43 (11) (2008), S. 811–822
- [83] KAUFMAN, PB ; DUKE, JA ; BRIELMANN, H ; BOIK, J ; HOYT., JE: A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. In: *Journal of alternative and complementary medicine*. 3 (1) (1997), S. 7–12
- [84] KELLY, GE ; JOANNOU, GE ; REEDER, AY ; NELSON, C ; WARING, MA: The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208 (1) (1995), S. 40–43
- [85] KIM, J.B. ; SARRAF, P. ; WRIGHT, M. ; YAO, K.M. ; MUELLER, E. ; SOLANES, G. ; LOWELL, B.B. ; SPIEGELMAN, B.: Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. In: *Journal of Clinical Investigation* 101 (1998), S. 1–9
- [86] KIM, MH ; KANG, KS ; LEE, YS: The inhibitory effect of genistein on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. In: *The British Journal of Nutrition* 104 (9) (2010), S. 1333–1342
- [87] KIM, S ; SHIN, HJ ; KIM, SY ; KIM, JH ; LEE, YS ; KIM, DH ; LEE, MO: Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 220 (1-2) (2004), S. 51–58

- [88] KIM, S ; SOHN, I ; LEE, YS ; LEE., YS: Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. In: *Journal of Nutrition* 135 (1) (2005), S. 33–41
- [89] KING, RA ; BURSILL, DB: Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 67 (5) (1998), S. 867–972
- [90] KLEEMANN, R ; GERVOIS, PP ; VERSCHUREN, L ; STAELS, B ; PRINCEN, HM ; KOOISTRA, T: Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. In: *Blood* 101 (2) (2003), S. 545–551
- [91] KOOBY, D.A. ; Y.FONG ; SURIAWINATA, A. ; GONEN, M. ; ALLEN, P.J. ; KLIMSTRA, D.S. ; DEMATTEO, R.P. ; D'ANGELICA, M. ; BLUMGART, L.H. ; JARNAGIN, W.R.: Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. In: *Journal of Gastrointestinal Surgery* 7 (8) (2003), Dezember, S. 1034–1044
- [92] KREY, G. ; BRAISSANT, O. ; L'HORSET, F.: Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. In: *Molecular Endocrinology* 11 (1997), S. 779–91
- [93] KURZER, M.S. ; XU, X.: Dietary phytoestrogens. In: *Annual Review of Nutrition* 17 (1997), S. 358–381
- [94] LEE, HP ; GOURLEY, L ; DUFFY, SW ; ESTÉVE, J ; LEE, J ; DAY., NE: Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. In: *Lancet* 337 (8751) (1991), S. 1197–1200
- [95] LEE, YM ; CHOI, JS ; KIM, MH ; JUNG, MH ; LEE, YS ; SONG, J: Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. In: *Nutrition* 22 (9) (2006), S. 956–964
- [96] LI, Y ; TOLLEFSBOL, TO: Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. In: *Current Medicinal Chemistry* 17(20) (2010), S. 2141–2151
- [97] LIAO, QC ; LI, YL ; QIN, YF ; QUARLES, LD ; XU, KK ; LI, R ; ZHOU, HH ; XIAO., ZS: Inhibition of adipocyte differentiation by phytoestrogen genistein through a potential downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (5) (2008), S. 1853–1863
- [98] LIU, J ; BURDETTE, JE ; XU, H ; GU, C ; BREEMEN, RB van ; BHAT, KP ; BOOTH, N ; CONSTANTINOU, AI ; PEZZUTO, JM ; FONG, HH ; FARNSWORTH, NR ; BOLTON., JL: Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (5) (2001), S. 2472–2479

- [99] LOMONACO, R ; SUNNY, NE ; BRIL, F ; CUSI, K: Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. In: *Drugs* 73 (1) (2013), S. 1–14
- [100] LU, LJ ; LIN, SN ; GRADY, JJ ; NAGAMANI, M ; ANDERSON, KE: Altered kinetics and extent of urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure. In: *Nutrition and* 26 (3) (1996), S. 289–302
- [101] MAHN, K ; BORRÁS, C ; KNOCK, GA ; TAYLOR, P ; KHAN, IY ; SUGDEN, D ; POSTON, L ; WARD, JP ; SHARPE, RM ; VIÑA, J ; AARONSON, PI ; MANN., GE: Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. In: *FASEB Journal* 19 (12) (2005), S. 1755–1757
- [102] MALAGUARNERA, M ; ROSA, M D. ; NICOLETTI, F ; MALAGUARNERA., L: Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. In: *Journal of molecular medicine* 87 (7) (2009), S. 679–695
- [103] MARKOVITS, J. ; LINASSIER, C. ; FOSSÉ, P.: Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. In: *Cancer Research* 49 (18) (1989), S. 5117–5117
- [104] MARRA, F.: Nuclear factor-kappaB inhibition and non-alcoholic steatohepatitis: inflammation as a target for therapy. In: *Gut - An International Journal of Gastroenterology and Hepatology* 57 (5) (2008), S. 570–572
- [105] MARTIN, P.M. ; HORWITZ, K.B. ; RYAN, D.S. ; MCGUIRE, W.L.: Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. In: *Endocrinology* 103 (1978), S. 1860–1867
- [106] MATTHAN, NR ; JALBERT, SM ; AUSMAN, LM ; KUVIN, JT ; KARAS, RH ; LICHTENSTEIN., AH: Effect of soy protein from differently processed products on cardiovascular disease risk factors and vascular endothelial function in hypercholesterolemic subjects. In: *American Journal of Clinical N* 85 (4) (2007), S. 960–966
- [107] MAX-RUBNER-INSTITUT ; LEBENSMITTEL, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und: *Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht, Teil 2*. 2008. – URL http://www.was-esse-ich.de/uploads/media/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf
- [108] MAZZELLA, N ; RICCIARDI, LM ; MAZZOTTI, A ; MARCHESINI, G: The role of medications for the management of patients with NAFLD. In: *Clinics in Liver Disease* 18 (1) (2014), S. 73–89
- [109] MCCORMACK, L. ; DUTKOWSKI, P. ; EL-BADRY, A.M. ; CLAVIEN, P.A: Liver transplantation using fatty livers: always feasible? In: *Journal of Hepatology* 54 (5) (2011), Mai, S. 1055–1062
- [110] MEIJER, V.E. de ; KALISH, B.T. ; PUDER, M. ; IJZERMANS, J.N.: Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. In: *British Journal of Surgery* 97 (9) (2010), September, S. 1331–1339

- [111] MEZEI, O ; BANZ, WJ ; STEGER, RW ; PELUSO, MR ; WINTERS, TA ; SHAY., N: Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. In: *Journal of Nutrition* 133 (5) (2003), S. 1238–1243
- [112] MICHALIK, L ; AUWERX, J ; BERGER, JP ; CHATTERJEE, VK ; GLASS, CK ; GONZALEZ, FJ ; GRIMALDI, PA ; KADOWAKI, T ; LAZAR, MA ; O’RAHILLY, S ; PALMER, CN ; PLUTZKY, J ; REDDY, JK ; SPIEGELMAN, BM ; STAELS, B ; WAHLI., W: International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. In: *Pharmacological Reviews* 58 (4) (2006), S. 726–741
- [113] MINNO, MN D. ; RUSSOLILLO, A ; LUPOLI, R ; AMBROSINO, P ; MINNO, A D. ; TARANTINO., G: Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. In: *World journal of gastroenterology* 18 (41) (2012), S. 5839–5847
- [114] MITTLER, J ; PASCHER, A ; NEUHAUS, P ; PRATSCHKE, J: The utility of extended criteria donor organs in severely ill liver transplant recipients. In: *Transplantation* 86 (7) (2008), S. 895–896
- [115] MOLTENI, A. ; BRIZIO-MOLTENI, L. ; PERSKY, V.: In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. In: *Journal of Nutrition* 125 (1995), S. 751–756
- [116] MOORE, JO ; WANG, Y ; STEBBINS, WG ; GAO, D ; ZHOU, X ; PHELPS, R ; LEBWOHL, M ; WEI., H: Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. In: *Carcinogenesis* 27 (8) (2006), S. 1627–1635
- [117] MOZUMDAR, A. ; LIGUORI, G.: Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. In: *Diabetes Care* 34 (2011), S. 216–219
- [118] MURKIES, A.L. ; LOMBARD, C. ; STRAUSS, B.J. ; WILCOX, G. ; BURGER, H.G. ; MORTON, M.S.: Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flashes: effect of soy and wheat. In: *Maturitas* 61 (1-2) (2008), S. 27–33
- [119] NAKAJIMA, K: Multidisciplinary pharmacotherapeutic options for nonalcoholic Fatty liver disease. In: *International Journal of Hepatology* 2012 (2012), S. 950693
- [120] NESTEL, P. ; LYU, R. ; LOW, L.P.: Metabolic syndrome: recent prevalence in East and Southeast Asian populations. In: *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16 (2007), S. 362–367
- [121] NG, M ; FLEMING, T ; ROBINSON, M ; THOMSON, B ; GRAETZ, N ; MARGONO, C ; MULLANY, EC ; BIRYUKOV, S ; ABBAFATI, C ; ABERA, SF ; ABRAHAM, JP ; ABU-RMEILEH, NM ; ACHOKI, T ; ALBUHAIRAN, FS ; ALEMU, ZA ; ALFONSO, R ; ALI, MK ; ALI, R ; GUZMAN, NA ; AMMAR, W ; ANWARI, P ; BANERJEE, A ; BARGUERA, S ; BARQUERA, S ; BASU, S ; BENNETT, DA ; BHUTTA, Z ; BLORE, J ; CABRAL, N ; NONATO, IC ; CHANG, JC ; CHOWDHURY, R ; COURVILLE, KJ ; CRIQUI,

- MH ; CUNDIFF, DK ; DABHADKAR, KC ; DANDONA, L ; DAVIS, A ; DAYAMA, A ; DHARMARATNE, SD ; DING, EL ; DURRANI, AM ; ESTEGHAMATI, A ; FARZADFAR, F ; FAY, DF ; FEIGIN, VL ; FLAXMAN, A ; FOROUZANFAR, MH ; GOTO, A ; GREEN, MA ; GUPTA, R ; HAFEZI-NEJAD, N ; HANKEY, GJ ; HAREWOOD, HC ; HAVMOELLER, R ; HAY, S ; HERNANDEZ, L ; HUSSEINI, A ; BT, BT I. ; IKEDA, N ; ISLAMI, F ; JAHANGIR, E ; JASSAL, SK ; JEE, SH ; JEFFREYS, M ; JONAS, JB ; KABAGAMBE, EK ; KHALIFA, SE ; KENGNE, AP ; KHADER, YS ; KHANG, YH ; KIM, D ; KIMOKOTI, RW ; KINGE, JM ; KOKUBO, Y ; KOSEN, S ; KWAN, G ; LAI, T ; LEINSALU, M ; LI, Y ; LIANG, X ; LIU, S ; LOGROSCINO, G ; LOTUFO, PA ; LU, Y ; MA, J ; MAINOO, NK ; MENSAH, GA ; MERRIMAN, TA ; MOKDAD, AH ; MOSCHANDREAS, J ; NAGHAVI, M ; NAHEED, A ; NAND, D ; NARAYAN, KM ; NELSON, EL ; NEUHOUSER, ML ; NISAR, MI ; OHKUBO, T ; OTI, SO ; PEDROZA, A ; PRABHAKARAN, D ; ROY, N ; SAMPSON, U ; SEO, H ; SEPANLOU, SG ; SHIBUYA, K ; SHIRI, R ; SHIUE, I ; SINGH, GM ; SINGH, JA ; SKIRBEKK, V ; STAPELBERG, NJ ; STURUA, L ; SYKES, BL ; TOBIAS, M ; TRAN, BX ; TRASANDE, L ; TOYOSHIMA, H ; VIJVER, S van de ; VASANKARI, TJ ; VEERMAN, JL ; VELASQUEZ-MELENDEZ, G ; VLASSOV, VV ; VOLLSET, SE ; VOS, T ; WANG, C ; WANG, X ; WEIDERPASS, E ; WERDECKER, A ; WRIGHT, JL ; YANG, YC ; YATSUYA, H ; YOON, J ; YOON, SJ ; ZHAO, Y ; ZHOU, M ; ZHU, S ; LOPEZ, AD ; MURRAY, CJ ; GAKIDOU., E: Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *Lancet* 384 (9945) (2014), S. 766–781
- [122] OOSTERVEER, MH ; GREFHORST, A ; DIJK, TH van ; HAVINGA, R ; STAELS, B ; KUIPERS, F ; GROEN, AK ; REIJNGOUD., DJ: Fenofibrate simultaneously induces hepatic fatty acid oxidation, synthesis, and elongation in mice. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (49) (2009), S. 34036–34044
- [123] PARK, HJ ; DELLA-FERA, MA ; HAUSMANN, DB ; RAYALAM, S ; AMBATI, S ; BAILE., CA: Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. In: *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (2) (2009), S. 140–148
- [124] PARK, S A. ; CHOI, MS ; CHO, SY ; SEO, JS ; JUNG, UJ ; KIM, MJ ; SUNG, MK ; PARK, YB ; LEE., MK: Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. In: *Life Sciences* 79 (12) (2006), S. 1207–1213
- [125] PETERSON, T.G. ; BARNES, S.: Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. In: *Prostate* 22 (1993), S. 335–345
- [126] PETTINELLI, P ; OBREGÓN, AM ; VIDELA, LA: Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Nutricion Hospitalaria* 26 (3) (2011), S. 441–450
- [127] PETTINELLI, Paulina ; POZO, Talía del ; ARAYA, Julia ; RODRIGO, Ramón ; ARAYA, A.V. ; SMOK, Gladys ; CSENDES, Attila ; GUTIERREZ, Luis ; ROJAS, Jorge ; KORN, Owen ; MALUENDA, Fernando ; DIAZ, J. C. ; RENCORET, Guillermo ; BRAGHETTO, Italo ; CASTILLO, Jaime ; PONIACHIK, Jaime ; VIDELA, L. A.: Enhancement in liver

- SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1792 (11) (2009), S. 1080–1086
- [128] PRATSCHKE, J ; MITTLER, J ; NEUHAUS, P: Ausweitung des Spender- pools unter Verwendung marginaler Organe. In: *Chirurg* 79 (2) (2008), S. 130–134
- [129] REDDY, JK ; HASHIMOTO, T: Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. In: *Annual Review of Nutrition* 21 (2001), S. 193–230
- [130] REY, JW ; WIRGES, U ; DIENES, HP ; FRIES, JW: Hepatic steatosis in organ donors: disparity between surgery and histology? In: *Transplantation P* 41 (6) (2009), S. 2557–2560
- [131] RICCHI, M. ; ODOARDI, M.R. ; CARULLI, L. ; ANZIVINO, C. ; BALLESTRI, S. ; PINETTI, A. ; FANTONI, L.I. ; MARRA, F. ; BERTOLOTTI, M. ; LONARDO, A. B. ; CARULLI, N. ; LORIA, P.: Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24 (5) (2009), Mai, S. 830–840
- [132] RISIKOBEWERTUNG, Bundesinstitut für: *Risiken pflanzlicher Stoffe – Das Beispiel der Isoflavone*. April 2008. – URL http://www.bfr.bund.de/cm/343/risiken_pflanzlicher_stoffe_das_beispiel_der_isoflavone.pdf
- [133] ROGUE, A ; ANTHÉRIEU, S ; VLUGGENS, A ; UMBDENSTOCK, T ; CLAUDE, N ; MOUREYRE-SPIRE, C de la ; WEAVER, RJ ; GUILLOUZO., A: PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 276 (1) (2014), S. 73–81
- [134] ROLO, AP ; TEODORO, JS ; PALMEIRA, CM: Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. In: *Free Radical Biology & Medicine* 52 (1) (2012), S. 59–69
- [135] RONIS, MJ ; CHEN, Y ; BADEAUX, J ; BADGER, TM: Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR, and SREBP signaling. In: *The Journal of Nutrition*. 139 (8) (2009), S. 1431–1438
- [136] ROWLAND, I ; FAUGHNAN, M ; HOEY, L ; WÄHÄLÄ, K ; WILLIAMSON, G ; CASSIDY., A: Bioavailability of phyto-oestrogens. In: *The British Journal of Nutrition* 89 Suppl1 (2003), S. 45–58
- [137] ROWLAND, IR ; WISEMAN, H ; SANDERS, TA ; ADLERCREUTZ, H ; BOWEY, EA: Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. In: *Nutrition an* 36 (1) (2000), S. 27–32

- [138] SALIH, S M. ; NALLASAMY, P ; MUNIYANDI, P ; PERIYASAMI, V ; VENKATRAMAN, A C.: Genistein improves liver function and attenuates non-alcoholic fatty liver disease in a rat model of insulin resistance. In: *Journal of Diabetes* 1 (4) (2009), S. 278–287
- [139] SAMUEL, VT ; PETERSEN, KF ; SHULMAN., GI: Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. In: *Lancet* 375 (9733) (2010), S. 2267–2277
- [140] SATO, R: Sterol metabolism and SREBP activation. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (2) (2010), S. 177–181
- [141] SCHMILOVITZ-WEISS, H ; HOCHHAUSER, E ; COHEN, M ; CHEPURKO, Y ; YITZHAKI, S ; GROSSMAN, E ; LEIDBOWITZ, A ; ACKERMAN, Z ; BEN-ARI., Z: Rosiglitazone and bezafibrate modulate gene expression in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease - A historical prospective. In: *Lipids in Health and Disease* 12 (2013), S. 41–41
- [142] SCHWEIGERER, L. ; CHRISTELEIT, K. ; FLEISCHMANN, G.: Identification in human urine of a natural growth inhibitor for cells derived from solid paediatric tumors. In: *European Journal of Clinical Investigation* 22 (4) (1992), S. 260–264
- [143] SELZNER, M. ; CLAVIEN, P.A.: Fatty liver in liver transplantation and surgery. In: *Seminars in Liver Disease* 21 (2001), S. 105–113
- [144] SELZNER, N. ; SELZNER, M. ; JOCHUM, W. ; AMANN-VESTI, B. ; GRAF, R. ; CLAVIEN, P.A.: Mouse livers with macrosteatosis are more susceptible to normothermic ischemic injury than those with microsteatosis. In: *Journal of Hepatology* 44 (4) (2006), April, S. 694–701
- [145] SEVERSON, RK ; NOMURA, AM ; GROVE, JS ; STEMMERMANN, GN: A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. In: *Cancer Research* 49 (7) (1989), S. 1857–1860
- [146] SHEN, P ; LIU, MH ; NG, TY ; YONG, EL: Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR α , PPAR γ , and adipocyte differentiation in vitro. In: *Journal of Nutrition* 136 (4) (2006), S. 899–905
- [147] SHIMOMURA, I. ; SHIMANO, H. ; HORTON, J.D. ; GOLDSTEIN, J.L. ; BROWN, M.S.: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. In: *Journal of Clinical Investigation* 99 (5) (1997), März, S. 838–45
- [148] SHIN, ES ; LEE, HH ; CHO, SY ; PARK, HW ; LEE, SRJ ; LEE, TR: Genistein down-regulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. In: *The Journal of Nutrition*. 137 (5) (2007), S. 1127–1131
- [149] SHIN, SJ ; LIM, JH ; CHUNG, S ; YOUN, DY ; CHUNG, HW ; KIM, HW ; LEE, JH ; CHANG, YS ; PARK., CW: Peroxisome proliferator-activated receptor- α activator fenofibrate prevents high-fat diet-induced renal lipotoxicity in spontaneously hypertensive rats. In: *Hypertension Research* 32 (10) (2009), S. 835–845

- [150] SHIRI-SVERDLOV, R ; WOUTERS, K ; GORP, PJ van ; GIJBELS, MJ ; NOEL, B ; BUFFAT, L ; STAELS, B ; MAEDA, N ; BILSEN, M van ; HOFKER, MH: Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates. In: *Journal of hepatology* 44 (4) (2006), S. 732–741
- [151] SI, H ; LIU, D: Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights. In: *Current Medicinal Chemistry* 14 (27) (2007), S. 2581–2589
- [152] SIMMEN, FA ; MERCADO, CP ; ZAVACKI, AM ; HUANG, SA ; GREENWAY, AD ; KANG, P ; BOWMAN, MT ; PRIOR, RL: Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. In: *Journal of Nutritional* 21 (11) (2010), S. 1106–1113
- [153] SMITH, BW ; ADAMS, LA: Non-alcoholic fatty liver disease. In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 48 (3) (2011), S. 97–113
- [154] SMITH, K: Liver disease: Kupffer cells regulate the progression of ALD and NAFLD. In: *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 10 (9) (2013), S. 503
- [155] SOUZA, MR ; MDE, F D. ; MEDEIROS-FILHO, JE ; ARAÚJO, MS: Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. In: *Arquivos de Gastroenterologia* 49 (1) (2012), S. 89–96
- [156] STAELS, B ; DALLONGEVILLE, J ; AUWERX, J ; SCHOONJANS, K ; LEITERSDORF, E ; FRUCHART, JC: Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. In: *Circulation* 98 (19) (1998), S. 2088–2093
- [157] SZKUDELSKA, K ; NOGOWSKI, L ; SZKUDELSKI, T: Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75 (4-5) (2000), S. 265–271
- [158] TAYLOR, CK ; LEVY, RM ; ELLIOT, JC ; BURNETT, BP: The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. In: *Nutrition reviews* 67 (7) (2009), S. 398–415
- [159] TEEDE, HJ ; DALAIS, FS ; KOTSPOULOS, D ; LIANG, YL ; DAVIS, S ; MCGRATH., BP: Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (7) (2001), S. 3053–3060
- [160] THERUVATH, TP ; ZHONG, Z ; PEDIADITAKIS, P ; RAMSHESH, VK ; CURRIN, RT ; TIKUNOV, A ; HOLMUHAMEDOV, E ; LEMASTERS., JJ: Minocycline and N-methyl-4-isoleucine cyclosporin (NIM811) mitigate storage/reperfusion injury after rat liver transplantation through suppression of the mitochondrial permeability transition. In: *Hepatology* 47 (1) (2008), S. 236–246.
- [161] TOMLINSON, B ; PANG, CC ; CHAN, P: Hyperlipidaemia in Chinese populations. In: *Hospital medicine* 59 (7) (1998), S. 549–552

- [162] TULLIUS, SG ; NIEMINEN-KELHÄ, M ; BUELOW, R ; REUTZEL-SELKE, A ; MERTINS, PN ; PRATSCHKE, J ; BACHMANN, U ; LEHMANN, M ; SOUTHARD, D ; IYER, S ; SCHMIDBAUER, G ; SAWITZKI, B ; REINKE, P ; NEUHAUS, P ; VOLK, HD: Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. In: *Transplantation* 74 (5) (2002), S. 591–598
- [163] VELLA, S ; GNANI, D ; CRUDELE, A ; CECCARELLI, S ; STEFANIS, C D. ; GASPERI, S ; NOBILI, V ; NLOCATELLI, F ; MARQUEZ, VE ; ROTA, R ; ALISI, A: EZH2 down-regulation exacerbates lipid accumulation and inflammation in in vitro and in vivo NAFLD. In: *International Journal of Molecular Sciences* 14 (12) (2013), S. 24154–24168
- [164] VIDYASHANKAR, S ; KUMAR, LM S. ; BAROOAH, V ; VARMA, R S. ; NANDAKUMAR, KS ; PATKI, PS: Liv.52 up-regulates cellular antioxidants and increase glucose uptake to circumvent oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. In: *Phytomedicine* 19 (13) (2012), S. 1156–1165
- [165] WAGNER, JD ; SCHWENKE, DC ; GREAVES, KA ; ZHANG, L ; ANTHONY, MS ; BLAIR, RM ; SHADOAN, MK ; WILLIAMS., JK: Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (12) (2003), S. 2241–2246
- [166] WANG, C.C. ; TSENG, T.C. ; HSIEH, T.C. ; HSU, C.S. ; WANG, P.C. ; LIN, H.H. ; KAO, J.K.: Severity of fatty liver on ultrasound correlates with metabolic and cardiovascular risk. In: *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 28 (3) (2012), S. 151–160
- [167] WEI, H. ; CAI, Q. ; RAHN, R.O.: Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. In: *Carcinogenesis* 17 (1) (1996), S. 73–77
- [168] WILHELM, SM ; STOWE, NT ; ROBINSON, AV ; SCHULAK., JA: The use of the endothelin receptor antagonist, tezosentan, before or after renal ischemia protects renal function. In: *Transplantation* 71 (2) (2001), S. 211–216
- [169] WISEMAN, H: The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens. In: *Proceedings of the Nu* 58 (1) (1999), S. 139–146
- [170] WOBSE, H ; DORN, C ; WEISS, TS ; AMANN, T ; BOLLHEIMER, C ; BUETTNER, R ; SCHMOELMERICH, J ; HELLERBRAND, C: Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. In: *Cell research* 19 (8) (2009), S. 996–1005
- [171] YANAGIHARA, K. ; ITO, A. ; TOGE, T. ; NUMOTO, M.: Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. In: *Cancer Research* 53 (23) (1993), S. 5815–5821

- [172] YANG, Z ; ZHU, W ; GAO, S ; XU, H ; WU, B ; KULKARNI, K ; SINGH, R ; TANG, L ; HU, M: Simultaneous determination of genistein and its four phase II metabolites in blood by a sensitive and robust UPLC-MS/MS method: Application to an oral bioavailability study of genistein in mice. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (1) (2010), S. 81–89
- [173] YANG, Z ; ZHU, W ; GAO, S ; YIN, T ; JIANG, W ; HU, M: Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. In: *Drug Metabolism and Disposition* 40 (10) (2012), S. 1883–1893
- [174] YOON, M.: The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. In: *Pharmacol Research* 60 (3) (2009), September, S. 151–9
- [175] YOUNOSSI, ZM ; REYES, MJ ; MISHRA, A ; MEHTA, R ; HENRY, L: Systematic review with meta-analysis: non-alcoholic steatohepatitis - a case for personalised treatment based on pathogenic targets. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 39 (1) (2014), S. 3–14
- [176] ZAHARAN, WE ; EL-DIEN, KA S. ; KAMEL, PG ; EL-SAWABY, AS: Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. In: *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 28 (2) (2013), S. 141–146
- [177] ZARICH, S.W.: Metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular events: current controversies and recommendations. In: *Minerva Anestesiologica* 54 (2) (2006), S. 195–214
- [178] ZHU, T ; ANSQUER, JC ; KELLY, MT ; SLEEP, DJ ; PRADHAN, RS: Comparison of the gastrointestinal absorption and bioavailability of fenofibrate and fenofibric acid in humans. In: *Journal of Clinical Pharmacology* 50 (8) (2010), S. 914–921
- [179] ZIAMAJIDI, N ; KHAGHANI, S ; HASSANZADEH, G ; VARDASBI, S ; AHMADIAN, S ; NOWROUZI, A ; GHAFFARI, SM ; ABDIRAD., A: Amelioration by chicory seed extract of diabetes- and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPARalpha and SREBP-1. In: *Food and Chemical Toxicology* 58 (2013), S. 198–209

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anne Krüger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Einflüsse von Genistein und Fenofibrat auf den hepatischen Lipidstoffwechsel im *in vitro*-Modell der Steatosis hepatis“ selbstständig und ohne nicht offengelegt Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, der 2. März 2018

Anne Krüger

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. D. Seehofer, der mich betreute und mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Glanemann danken, der mir zu Beginn der Arbeit beiseite stand.

Auch möchte ich Herrn Dr. rer. nat. D. Knobloch danken, der das interessante Thema dieser Arbeit entwickelte und mich inhaltlich und menschlich stets unterstützte.

Weiterhin geht ein großer Dank an Herrn Dr. rer. nat. G. Damm für die fachliche Betreuung, die wertvolle Hilfe im praktischen Teil sowie die umfangreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Team der AG Glanemann/Seehofer, insbesondere bei Frau A. Schirmeier und Frau J. Golembus, die mich im methodischen und praktischen Teil mit wertvollen Hinweisen und Tipps beiseite standen und die Zusammenarbeit sehr angenehm machten.

Ich möchte weiterhin Sebastian Lünse und Dr. med. Christine Tarnogrocki danken für die gute Zusammenarbeit im Labor, die über praktische Unterstützung weit hinausging. Die Isolationen der Spendenlebern und die Untersuchungen zum Lipidgehalt, zur Zytotoxizität und metabolischen Aktivität des Fettlebermodells und der Genisteinwirkung wurden im Rahmen eines Gemeinschaftsprojekts mit Sebastian Lünse durchgeführt.

Tiefer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mit viel Geduld, Verzicht, Verständnis und Unterstützung diese Arbeit begleitet haben.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.