

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

**Umfassende Charakterisierung der Entwicklung einer
nicht-alkoholischen Steatohepatitis und Identifikation von
Merkmalen, die mit ihrer Progression korrelieren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Moritz Claudio Malms

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Johannes G. Bode

Zweitgutachterin: PD. Dr. med. Julia Reifenberger

„Die Forschung ist das Rückgrat der Medizin“

- Unbekannt

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Stephanie D. Wolf, Moritz C. Malms, Mascha Simon, Andre Beckmann, Tobias Hustedt, Christian Ehling, Tom Luedde, Johannes G. Bode, 2022, *Deletion of the thrombin receptor PAR4 reduces diet-induced liver damage*, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, Vol. 60, Seite 30-30

Zusammenfassung Deutsch

Metabolisch assoziierte Fettlebererkrankungen (MAFLD), die bislang unter der Überschrift nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD) zusammengefasst wurden, sind mit einem Anstieg der globalen Prävalenz auf aktuell ca. 25% eine der häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankungen. So verkörperte die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) im Jahr 2013 auf der Warteliste für eine Lebertransplantation bereits die zweithäufigste Indikation zur Listung. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist, zum Teil auch durch die u.a. im Hinblick auf den tolerierten Alkoholkonsum ungenaue Definition einer NAFLD bzw. NASH bedingt, nur unvollständig verstanden und komplex. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Etablierung eines sorgfältig charakterisierten präklinischen Mausmodells einer durch eine hyperkalorische Diät bedingten metabolisch assoziierten Fettlebererkrankung, die in dem gewählten Modell tatsächlich einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung entspricht. Die zur Fütterung eingesetzte hochkalorische Diät wurde hierbei im Hinblick auf den Fett- und Kohlenhydratanteil sowie die Zusammensetzung der Kohlenhydrate so gewählt, dass sie in etwa die Kost widerspiegelt, die in den westlichen Industrienationen führend der Zunahme an Adipositas zugrunde liegt. Abgesehen von Korrelationsanalysen wurde ein besonderes Augenmerk auf die zeitaufgelöste Analyse von Veränderungen der Makrophagen im Verlauf der Entwicklung einer NAFLD und ihrer Progression zur NASH gelegt und in diesem Zusammenhang auch auf die weitere Analyse der Entwicklung sogenannter kronenartiger Strukturen, die ringförmigen Strukturen entsprechen, welche sich aus Makrophagen zusammensetzen. Neben der Etablierung einer gut charakterisierten Kontrollkohorte, die eine wichtige Grundlage für zukünftige Projekte der Arbeitsgruppe darstellt, waren die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen, dass neben Körpergewicht, Ballonierung und Steatose-Score insbesondere die Zunahme von kronenartigen Strukturen, die CD11b+ Zellen enthalten, mit der Entwicklung einer Fibrose korreliert. Bemerkenswert ist auch, dass sich unter der gewählten westlichen Diät zwar eine Fibrose entwickelt, diese aber auch nach vergleichsweise längeren Fütterungszeiten von bis zu 40 Wochen keine ausgeprägten Formen oder gar das Vollbild einer Zirrhose erreicht.

Zusammenfassung Englisch

Metabolically associated fatty liver disease (MAFLD), currently still also grouped under the term non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is one of the most common causes of chronic liver disease, with an increase in global prevalence to currently around 25%. As a result, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was already the second most common indication for inclusion in the liver transplant waiting list in 2013. The underlying pathomechanism is complex and incompletely understood, in part because of imprecise definitions of NAFLD or NASH, such as tolerated alcohol consumption. The aim of the present studies was to establish a cohort of a carefully characterized preclinical mouse model of metabolically associated fatty liver disease induced by a hypercaloric diet representing a "true" nonalcoholic fatty liver disease. The high-calorie diet used for feeding was selected in terms of fat and carbohydrate content and composition to roughly reflect the diet underlying the increase in obesity in Western industrialized nations. Beyond correlation analyses, special attention was paid to the time-resolved analysis of changes in macrophages during the development of NAFLD and its progression to NASH and, in this context, to the further analysis of the development of so-called crown-like structures, which correspond to ring-like structures composed of macrophages. In addition to establishing a well-characterized control cohort, which is an important basis for future projects of the research group, the most important findings of the studies were that, in addition to body weight, ballooning and steatosis score, the increase of crown-like structures containing CD11b⁺ cells in particular correlate with the development of fibrosis. It is also noteworthy that although fibrosis develops under the chosen Western diet, it does not reach pronounced forms or even full-blown cirrhosis even after comparatively longer feeding periods of up to 40 weeks.

Abkürzungsverzeichnis

A/G *Albumin/Globulin (Quotient)*

AK *Antikörper*

ALP *Alkalische Phosphatase*

ALT *Alanin-Aminotransferase*

art. *arteriell(e)*

ASH *alkoholische Steatohepatitis*

AST *Aspartat-Aminotransferase*

ATP *Adenosintriphosphat*

BMI *engl. Body-Mass-Index*

BSA *engl. Bovine Serum Albumin*

CCL-2 *engl. CC-Chemokin-Ligand-2*

CLS *engl. crown-like structures*

CV *Zentralvene (von engl. central vein)*

DAB *Diaminobenzidin*

DRQ *De-Ritis-Quotient*

ELPA *engl. European Liver Patients' Association*

EtOH *Ethanol*

FCS *Fetales Kälberserum (von engl. fetal calf serum)*

FFAs *freie Fettsäuren (von engl. free fatty acids)*

GOT *Glutamat-Oxalacetat-Transaminase*

GPT *Glutamat-Pyruvat-Transaminase*

HCC *hepatozelluläres Karzinom*

hCLS *hepatische CLS*

HDL *engl. high density lipoprotein*

hep./h. *hepatisch*

HHU *Heinrich-Heine-Universität*

Hkt *Hämatokrit*

HRP *Meerrettichperoxidase (von engl. horseradish peroxidase)*

IF *Immunfluoreszenz*

IHC *Immunhistochemie*

IL *Interleukin*

INF *Interferon*

iNOS *induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase*

IR *Insulinresistenz*

KC *engl. Kupffer cells*

KG *Körpergewicht*

LANUV *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen*

LDH *Laktat-Dehydrogenase*

LG *Lebergewicht*

LPS *Lipopolysaccheride*

MΦ *Makrophage(n)*

MAFLD *engl. metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*

MdM *engl. monocyte-derived macrophages*

NaCl *Natriumchlorid*

NAFLD *engl. non-alcoholic fatty liver disease*

NAFLE *nicht-alkoholische Fettlebererkrankung*

NAS *engl. NASH-Activity-Score*

NASH *nicht-alkoholische Steatohepatitis*

NO *Stickstoffmonoxid*

OT *Objektträger*

Pat. *Patienten*

PBS *engl. Phosphate buffered saline*

PPAR- α *engl. peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

PRR *engl. pattern recognition receptor*

PV *Portalvene*

ROS *reaktive Sauerstoffspezies*

RT *Raumtemperatur*

SD *Standard Diät*

SPIO *engl. super-paramagnetic iron oxide*

T2DM *Diabetes mellitus Typ 2*

TBS *engl. Tris-buffered-Saline*

TGF *engl. Transforming growth factor*

TNF *Tumornekrosefaktor*

W *Wochen (Kontext: Fütterungsdauer)*

WD *Western Diät*

ZETT *zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 NICHT-ALKOHOLISCHE FETTLIBERERKRANKUNG (NAFLE).....	1
1.1.1 <i>Epidemiologie und gesamtgesellschaftliche Bedeutung</i>	3
1.1.2 <i>Ursachen, Risikofaktoren und Überschneidungen mit T2DM, Fettleibigkeit und Metabolischem Syndrom</i>	4
1.2 NICHT-ALKOHOLISCHE STEATOHEPATITIS (NASH).....	6
1.3 NATÜRLICHER VERLAUF UND PATHOPHYSIOLOGIE	7
1.4 ROLLE VON MAKROPHAGEN IN DER ENTSTEHUNG DER NASH	9
1.5 ZIELSETZUNG	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIAL.....	15
2.1.1 <i>Versuchstiere</i>	15
2.1.2 <i>Futter</i>	15
2.1.3 <i>Chemikalien</i>	16
2.1.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	17
2.1.5 <i>Geräte</i>	17
2.1.6 <i>Antikörper</i>	18
2.1.7 <i>Auflistung Firmen</i>	19
2.1.8 <i>Software</i>	20
2.1.9 <i>Lösungen</i>	20
2.2 METHODEN.....	22
2.2.1 <i>Fütterung</i>	22
2.2.2 <i>Organentnahme</i>	22
2.2.3 <i>Serummessungen</i>	22
2.2.4 <i>Färbungen für Histologische Untersuchungen</i>	23
Anfertigung von Kryoschnitten	23
Anfertigung von Paraffinschnitten.....	23
Oil-Red-O Färbung	23
Picrosirius-Red Färbung	24
Immunfluoreszenz-Färbung.....	24
Glutaminsynthetase-/mac2-Färbung.....	26
HE-Färbung	28
2.2.5 <i>Mikroskopische Aufnahmen</i>	28
2.2.6 <i>Auswertung</i>	29
Picrosirius-Red Färbung	30
Immunfluoreszenz-Färbung.....	31
Oil-Red-O Färbung	31

2.2.7	<i>Statistik</i>	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1	GEWEBSSCHÄDIGUNG/VERFETTUNG/NASH	33
3.1.1	<i>Gewichtsentwicklung</i>	33
3.1.2	<i>Strukturelle Veränderungen</i>	39
3.1.3	<i>Laborparameter</i>	50
3.2	GLUTAMINSYNTHETASE-FÄRBUNG	54
3.3	MAKROPHAGEN	56
3.4	KORRELATIONEN	67
4.	DISKUSSION	71
4.1	EINORDNUNG DER ERGEBNISSE	71
4.2	SCHLUSSFOLGERUNGEN	80
5.	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	82

1. EINLEITUNG

1.1 NICHT-ALKOHOLISCHE FETTLBERERKRANKUNG (NAFLE)

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLE) oder auch non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ist definiert als eine histologisch oder mittels bildgebender Verfahren ermittelte Verfettung von mehr als 5 % der Hepatozyten [1] bzw. einem entsprechenden Fettanteil gleicher Größenordnung am Gesamtgewicht der Leber, bei gleichzeitigem Ausschluss anderer, sekundärer Ursachen sowie einem Alkoholkonsum von > 20 g (Frauen) bzw. > 30 g (Männer) Alkohol pro Tag [1].

Unter dem Begriff NAFLD ist ein breites Krankheitsspektrum subsumiert, das von einfacher Verfettung, nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) und der Progression derselben zur Fibrose bis hin zur Leberzirrhose und der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) reichen kann [2].

Gegenstand regelmäßig geführter Diskussion ist, inwieweit der Einfluss von Alkohol bei der *nicht-alkoholischen* Fettlebererkrankung bzw. eine hierdurch bedingte Verzerrung zu berücksichtigen ist. Zwar ist eine andere sekundäre Ursache der Leberverfettung definitionsgemäß auszuschließen, dennoch bleiben jedoch viele Studien exakte und konkrete sowie einheitliche Ausschlusskriterien schuldig [3-5]. Dabei sieht die im überwiegenden Maße verwendete Definition einen *cut-off* bei einem täglichen Alkoholkonsum in der oben genannten Größenordnung vor [1], womöglich auch aus Gründen der Praktikabilität und Realisierbarkeit, wenngleich angeführt wird, dass der Einfluss des Alkohols geringer als jener der metabolischen Risikofaktoren zu sein scheint [6].

Die Annahme, dass dieses Argument sinnvoll mit dem Begriff der *nicht-alkoholischen* Fettlebererkrankung in Einklang gebracht werden kann, darf zumindest in Frage gestellt werden [5], was bei einer vereinfachten Rechnung, ausgehend von einem Volumen von 0,25 l/Getränk und einem Alkoholgehalt von $\approx 4,8\%$, oder 20 ml/Getränk und einem Alkoholgehalt von 37 %, sowie dem spezifischen Gewicht des Alkohols – 0,8 Gramm pro Kubikzentimeter (g/cm³) – einer approximativen Menge von > 3 Bier oder > 5 Standardeinheiten Schnaps entspricht – täglich wohl gemerkt.

Daher erscheint auch unter dem Aspekt Realitätsnähe statt Realisierbarkeit eine, wie in Studien jüngeren Datums teilweise bereits etablierte Reduzierung des *thresholds* auf < 10 g (Frauen) bzw. < 20 g (Männer) sinnvoll [7], insbesondere vor dem Hintergrund, dass Alkohol und metabolische Risikofaktoren gegenseitig potenzierend bzw. synergistisch statt additiv zu wirken scheinen [8, 9]. Wobei selbst bei diesem Grenzwert anzumerken ist, dass bislang für den Alkohol keine „unschädliche“ Menge definiert ist, die täglich bedenkenlos konsumiert werden kann.

Letzteres ist auch die Grundlage dafür, dass die Begriffsdefinition von 1980 [10] und seit jeher nicht aktualisierte [11] Distinktion in nicht-alkoholisch und alkoholisch als kritisch [5], da unzureichend, angesehen wird und sich neue Begrifflichkeiten und Definitionen mit unterschiedlich gewichteten Schwerpunkten hinsichtlich Ursache/Risikofaktoren, Pathophysiologie, Komplikationen und entsprechender Trennschärfe etablieren. Da der negierende Terminus der Erkrankung, welcher - abgesehen von der wortwörtlichen Angabe darüber, dass es sich um eine nicht durch Alkohol bedingte Erkrankung handelt (wenngleich eben dies, wie zuvor erläutert, als fraglich anzusehen ist) – keine weiteren Informationen über die Ursache der Erkrankung liefert, schlug die *European Liver Patients' Association* (ELPA) bereits 2019 eine Veränderung der Terminologie vor [11].

Die seitdem gefestigte Erkenntnis, dass durch den Begriff NAFLD der Hauptrisikofaktor und dadurch insbesondere die Auswirkungen auf den gesamten Organismus jenseits der Leber vernachlässigt werden, veranlasste Elsam et. al 2020 dazu, den Terminus der MAFLD (*metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*), dem englischen Begriff für eine Fettlebererkrankung, welcher die Assoziation mit dem metabolischen Syndrom mehr in den Vordergrund rückt und die Anwesenheit von Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), Adipositas oder Anzeichen einer Stoffwechselstörung zum festen Bestandteil der Diagnosekriterien macht [12], einzuführen, welcher aktuell zunehmend den Standard anstelle von NAFLD darstellt und ersetzt [13] und die Frage, welche Rolle der Alkoholkonsum in diesem Kontext spielt, offen lässt.

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND GESAMTGESELLSCHAFTLICHE BEDEUTUNG

Mit einem Anstieg der globalen Prävalenz auf aktuell ca. 25 % stellt die NAFLD eine der häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankung dar [14], wobei sich Abweichungen der Daten zur Krankheitslast zeigen und im Hinblick auf die Ursache wohl eher der Terminus MAFLD die Realität widerspiegelt. Diese Diskrepanz kann in Anteilen auf die unterschiedliche Sensitivität der zugrundeliegenden diagnostischen Methodik zurückführbar sein [15].

Auch sind erhebliche geographische Unterschiede festzustellen. So weisen der mittlere Osten und Südamerika mit ca. 32 % bzw. 31 % die höchste, Afrika mit ca. 14 % die niedrigste Prävalenz auf. Nordamerika sowie Europa liegen mit 24 %, respektive 23 % im oberen Mittelfeld, jedoch lassen sich die Auswirkungen der Erkrankung sowohl auf den einzelnen Patienten, als auch die Bevölkerung insgesamt bezogen, trotz der im Vergleich zum mittleren Osten/Südamerika geringeren Prävalenz, auf Grund einer ausgeprägten Anzahl Studien in Nordamerika und Europa umso deutlicher verbildlichen [14].

Beispielsweise geht für das Gesundheitssystem Amerikas von schätzungsweise 80 bis 100 Millionen Betroffenen in den Vereinigten Staaten, mit einer Progressionsrate zur NASH von nahezu jedem Vierten, eine immense Belastung sowohl finanzieller als auch humanitärer Natur aus, dessen Ausmaße und Auswirkung in den nächsten Jahrzehnten noch zunehmen werden [15]. Eine Studie aus dem Jahr 2016 geht bereits zum damaligen Zeitpunkt, ihre vorherige Einschätzung von 5,8 Milliarden US-Dollar revidierend, von 103 \$ Milliarden jährlichen NAFLD-bedingten Kosten in den Vereinigten Staaten aus. Legt man diesen die jährliche Zunahme der Adipositasprävalenz zugrunde, unter der Annahme, dass sich die Steigerungsrate der NAFLD parallel zu dieser verhielte, so könnten sich zukünftige 10-Jahres-Kosten auf bis zu 1\$ Billionen in Amerika und über 330 € Milliarden in Europa belaufen [16].

Auch unter klinischen Gesichtspunkten macht sich der konstante Anstieg der Prävalenz bemerkbar. Im Jahr 2013 repräsentiert die progressive oder auch aggressivere Form der NAFLD alias NASH [17] auf der Warteliste für eine Lebertransplantation bereits die zweithäufigste Indikation zur Listung, was einem 170%igem Anstieg und damit der am schnellsten zunehmenden Ätiologie im Zeitraum von 2004 bis 2013 entspricht [18]. Dieser Trend konnte durch eine Auswertung der Neulistungen von Erwachsenen seit 2014 bestätigt werden, was – sich ergebend aus einer Zunahme der Krankheitsfälle der NASH sowie gleichzeitigen Abnahme der Hepatitis-C bedingten Registrierungen auf Grund verbesserter

Therapiemöglichkeiten – die NASH im ersten Quartal 2019 zur führenden Indikation bei Frauen, sowohl bei Patientinnen mit als auch ohne HCC macht [19].

Wenngleich die Autoren auf eventuelle Einschränkungen auf Grund einer potentiellen Fehlklassifikation der Ätiologie hinweisen, so stehen die Daten dennoch in Einklang mit anderen Studien, in denen sich ähnliche Trends abzeichnen bzw. belegen lassen [20].

1.1.2 URSACHEN, RISIKOFAKTOREN UND ÜBERSCHNEIDUNGEN MIT T2DM, FETTLLEIBIGKEIT UND METABOLISCHEM SYNDROM

Wenn auch der genaue Pathomechanismus sehr komplex und nach wie vor nur unzureichend verstanden ist [2], so ist unstrittig, dass es sich bei den Ursachen der NAFLD um multifaktorielle Einflussfaktoren handelt, welche einer variablen Kombination aus Ernährung und physischer Aktivität, genetischer Prädisposition, Umwelt- sowie sozioökonomischen Faktoren entsprechen [15, 21, 22].

Die NAFLD, präziser primäre NAFLD, wird auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet [23] und ist demnach ätiologisch gesehen entsprechend mit ähnlichen bzw. gleichen Risikofaktoren/Kriterien vergesellschaftet:

- Stammbetone Adipositas mit einem Taillenumfang $\geq 80/94$ cm (Frauen/Männer)
- Arterieller (art.) Blutdruck $\geq 130/85$ mmHg bzw. therapiebedürftige art. Hypertonie
- Dyslipidämie mit erniedrigtem *High Density Lipoprotein* (HDL)-Cholesterin $< 40/50$ mg/dl (Männer/Frauen) oder erhöhten Triglyceriden (> 150 mg/dl)
- Nüchternblutzucker ≥ 100 mg/dl oder manifester Diabetes mellitus Typ 2 [1, 7]

Ein Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und dem Auftreten einer NAFLD ist dabei hinreichend bekannt und in einer Vielzahl Studien belegt, wobei Adipositas bei NAFLD-Patienten (Pat.) häufiger als NAFLD in einem adipösem Patientenkollektiv zu beobachten ist [15].

Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2014 deutet auch hier auf den Zusammenhang zwischen steigender Prävalenz von Obesitas und einer entsprechend steigenden Prävalenz der NAFLD hin [24].

Dabei gibt es eine direkte, positive Korrelation zwischen dem Grad eben jener und der Manifestation einer NAFLD bzw. deren Schweregrad, wobei der Body-Mass-Index (BMI) als unabhängiger Prädiktor angesehen werden kann [25, 26].

Die Auswertung einer Meta-Analyse von mehr als 8,5 Millionen Patienten wies eine zusammengelegte Obesitasprävalenz in 51 % aller NAFLD-Patienten nach, bei NASH-Pat. lag diese sogar bei über 80 % [14].

Doch auch bei normalgewichtigen Personen bedingt eine Gewichtszunahme einen Anstieg der Inzidenzraten, wenngleich dies nicht vice versa für eine Reduktion des Körpergewichts im selben Patientengut gilt [27].

Diese, häufiger auch als *lean-NAFLD*, also als NAFLD in nicht-adipösen (= *not-obese*) Patienten bezeichnete Variante, scheint dabei insbesondere mit einer Konstellation aus fett- und fructosereicher Ernährung, viszeraler Fettakkumulation sowie genetischer Prädisposition vergesellschaftet [21].

Vereinfacht formuliert ist die NAFLD insgesamt mit einem ungesunden, westlichen Lebensstil assoziiert [28]. Insbesondere eine im Allgemeinen oft als „*western-diet*“ bezeichnete Ernährung, d.h. eine hoch-kalorische Diät mit großen Anteilen raffinierten, be-/verarbeiteten Kohlenhydraten, gesättigten Fetten, Salz sowie Fructose, vielfach zugesetzt in Softdrinks [29], ist dabei eng mit der NAFLD verknüpft [1], oftmals ergänzt durch ein reduziertes Maß körperlicher Aktivität [30].

Jene Auswirkungen, die dem Gesamtkomplex des metabolischen Syndroms und den damit verbundenen Risiken und vergesellschafteten Krankheiten zuteilwerden, machen deutlich, dass das Krankheitsbild der NAFLD resp. NASH *nicht* isoliert betrachtet werden darf, sondern im Kontext der Gesamtbiographie des jeweiligen Patienten diagnostiziert, interpretiert und therapiert werden muss, da entsprechende Einzelfaktoren wie die Insulinresistenz (IR), Obesitas, Dyslipid-/Hypertriglyceridämie und Diabetes etc. sich gegenseitig potenzieren, weshalb der Befund einer NAFLD resp. eines metabolischen Syndroms immer zu einer entsprechenden Risikoanalyse für das wechselseitige Vorliegen führen sollte [1].

Eine besondere Rolle wird den metabolischen Syndrom-assoziierten HCCs auch insofern zuteil, als dass es bei Pat. mit entsprechenden Risikofaktoren auch ohne vorausgehende signifikante Fibrosierung [31] bzw. Zirrhose [32] zur Karzinomentstehung kommen kann, was bei NAFLD-Patienten überproportional häufiger als bei anderen Ätiologien in nicht-zirrhatischen Lebern zu beobachten ist [33], Patientenkollektive somit besonders intensiver und vor allem kontinuierlicher Überwachung bedürfen, wenngleich die Fibrose als solche der dominanteste Marker hinsichtlich einer entsprechenden Sterblichkeitsprognose ist [34].

1.2 NICHT-ALKOHOLISCHE STEATOHEPATITIS (NASH)

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis wird, wie zuvor erwähnt, auch als progressive Form der NAFLD bezeichnet [17] und unterscheidet sich definitorisch von der NAFLD durch das Vorhandensein von Leberzellschäden bei entzündlicher Aktivität, respektive entzündlichen Infiltraten, wobei eine fibrotische Veränderung zum Zeitpunkt der Diagnose nicht zwingend vorausgesetzt wird [7].

Diese Unterscheidung in Steatosis und Steatohepatitis hat auch bedeutende klinische Relevanz, da sich beide Ausprägungen nicht nur histologisch, sondern auch bezüglich ihrer Prognose deutlich unterscheiden. So ist das Lebenszeitrisko eine Zirrhose zu entwickeln für Pat. mit NASH > 5x höher als für Pat. mit einfacher Steatosis [35]. Auch das HCC-Risiko in NASH-Pat. ist signifikant erhöht [36].

Dabei ist die Prävalenz der NASH in der Allgemeinbevölkerung schwierig zu bestimmen, Studien gehen von geschätzt ca. 1,5-6,5 % aus [14], wobei immer wieder auf methodische Schwierigkeiten hingewiesen wird: Wenngleich die NAFLD der Hauptgrund für unerwartet hohe, resp. erhöhte Leberenzyme ist, so weisen dennoch 50-80 % der Pat. mit NAFLD normale Leberenzyme auf [1, 37], ultraschall-gesteuerte Methodik unterdiagnostiziert insbesondere bei milden Formen aufgrund einer geringen Sensitivität eine Vielzahl an Fällen [37].

So ist Goldstandard und gleichzeitig Voraussetzung für eine exakte Diagnose der NASH demnach eine bioptische Sicherung, in Hinblick auf prognostische Faktoren das Diagnostikum, einhergehend mit den besten sensitiven und spezifischen Eigenschaften [1, 38], wobei neben der erheblichen Problematik der Stichprobenunsicherheit resp. des Stichprobenfehlers [39, 40] erwähnt werden muss, dass eine sichere Differenzierung zur alkoholischen Steatohepatitis (ASH), wenngleich es differentialdiagnostisch feine Hinweise bspw. in Bezug auf Verfettungsmuster, Inflammation oder Fibrose gibt, [41] häufig rein histologisch nicht möglich ist [42, 43], sondern u.a. anhand von Anamnese und Fragebögen erfolgen muss. Zu bedenken ist außerdem das ganz Offensichtliche: Beim Großteil der Pat. mit NAFLD wird gar keine Biopsie durchgeführt [23].

Wenngleich die Risikofaktoren, wie Stammfettsucht und Insulinresistenz, die mit einer NAFLD bzw. Steatosis einhergehen, bekannt und unumstritten, sind die Risiko- bzw. auslösenden Faktoren, die die Progression zur aggressiveren und progressiveren NASH verursachen, weiter Großteils unverstanden.

1.3 NATÜRLICHER VERLAUF UND PATHOPHYSIOLOGIE

Wie bereits eingangs beschrieben, beinhaltet die NAFLD ein breites Spektrum an Ausprägungen, angefangen bei einfacher Verfettung bis hin zur Zirrhose. Dabei kann die einleitend aufgeführte Abfolge grob als Leitfaden angesehen werden, jedoch verläuft die Erkrankung dabei nicht linear und nur ein Bruchteil aller Pat. mit NAFLD - zumindest ausgehend von einer milden Anfangsform mit einfacher Verfettung - erreicht das Endstadium der Zirrhose/des HCC.

Die Pathophysiologie ist dabei noch nicht gänzlich verstanden, insbesondere die Progression von einfacher Steatosis zur NASH und die Mechanismen dahinter sind weiter weitestgehend unklar, die ehemals geltende *two-hit*

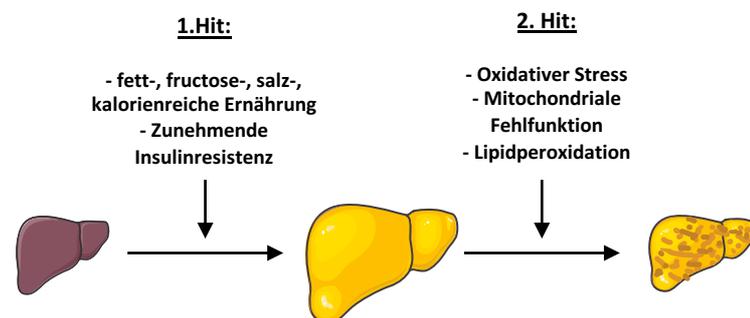


Abb. 1 Schematische Darstellung der two-hit Hypothese

Hypothese wird mittlerweile als zunehmend überholt angesehen. Diese besagt, dass die Leber im ersten *hit* infolge einer durch ungesunden Lebensstil sowie einer fett-, salz-, fructose- und kalorienreichen Ernährung bedingten Verfettung als auch Insulin-Resistenz für den zweiten *hit* „sensibilisiert“ wird, in welchem es dann durch Entzündungsgeschehen und Fibroseentwicklung zur eigentlichen Krankheitsprogression und Entwicklung der NASH kommt, wobei Fehlfunktionen auf mitochondrialer Ebene, oxidativem Stress und Lipidperoxidation wesentliche Bedeutungen zuteilwerden [4, 44] (s. Abb. 1).

Kritik und Schwachpunkt dieser Theorie zugleich ist die Tatsache, dass der sequentielle Ablauf des *first* und *second hit* eine Steatosis für die Entwicklung einer NASH zwingend voraussetzt [45].

Stattdessen hat sich in jüngster Zeit eine *multi-hit* bzw. *multi-hit-parallel* Theorie etabliert, welche versucht, die Komplexität sowie den eher simultanen als sukzedanen Ablauf mit einem variablen

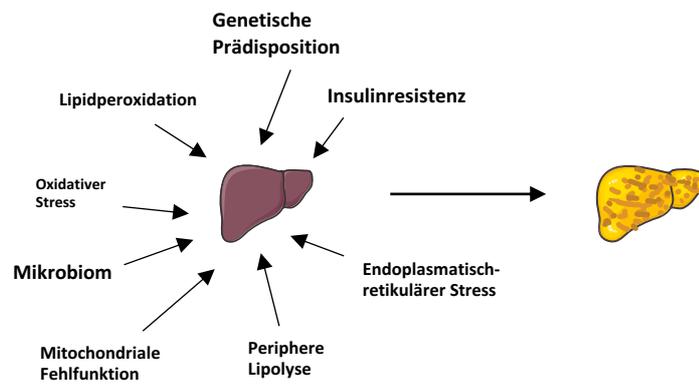


Abb. 2 Schematische Darstellung der multi-hit Hypothese

Zusammenspiel aus verändertem Lipid-Metabolismus, IR, oxidativem sowie endoplasmatisch-retikulärem Stress, verändertem Mikrobiom, Lipidtoxizität, genetischer Prädisposition, mitochondrialer Fehlfunktion sowie diätischen Faktoren, welche teils synergistisch teil antagonistischen wirken abzubilden [4, 45] (s. Abb. 2).

Von zentraler Bedeutung in der Entwicklung und im Verlauf der Krankheitsprogression der NAFLD resp. NASH ist die Insulinresistenz. So wird bei bis zu 75 % der Pat. mit T2DM eine NAFLD angenommen [46]. Bedingt durch die reduzierte bis aufgehobene Wirkung des Insulins, kommt es zu vermehrter hepatischer(hep./h.) Glucoseproduktion bei gleichzeitig verringerter Aufnahme in Fett- und Muskelgewebe, sowie gesteigerter peripherer Lipolyse, resultierend in einem erhöhten Angebot von freien Fettsäuren (FFAs) und Glucose in der Leber und letzten Endes, beim Überschreiten der Oxidations- und Kompensationsmechanismen, – stark verallgemeinert – durch Speicherung in Triglyceridform in Steatosis [45]. Dieser Prozess wird durch die häufig vorliegende generelle Hyperlipidämie und dem dementsprechenden Überangebot von FFAs aus der Blutzirkulation noch beschleunigt.

Die in den Mitochondrien normalerweise zwecks Adenosintriphosphat(ATP)-Gewinnung β -oxidierten FFAs erzeugen dabei in der Atmungskette reaktive Sauerstoffspezies (ROS), etwa in Höhe von 0,2-2 % des O₂-Bedarfs der Zelle [47]. Übersteigen die anfallenden FFAs jedoch die Oxidationskapazitäten, kommt es mit der Initiierung von β -Oxidation in Peroxisomen und ω -Oxidation in Mikrosomen und gleichzeitiger Beeinträchtigung der β -Oxidation in Mitochondrien zu einem Anstieg der ROS-Entstehung in NAFLD-Pat. auf das bis zu Zehnfache des Ausgangswertes [45].

Zwar verfügt die Leber über enorme anti-oxidantische Kapazitäten, dauerhaft erhöhte ROS-Level, oxidativer und zellulärer Stress führen jedoch langfristig zu Zellschäden, Apoptose und Nekrose und darüber zur Krankheitsprogression und Entstehung der NASH, was unter anderem auch darauf zurückzuführen ist, dass anti-oxidantische Kompensationsmechanismen nicht nur durch ein übermäßiges Angebot an reaktiven Substraten überschritten, sondern indes selbst durch eben diese inaktiviert werden können und mit dem Schweregrad der Schädigung invers korrelieren [48]. Dabei ist der Hauptort der Schädigung durch ROS gleichzeitig der Hauptort der Entstehung: Die Mitochondrien [45].

Störung des Elektronentransports [49] , Hemmung von anti-oxidantischen Enzymen [50], Induktion von Punktmutationen und DNA-Strangbrüchen führen letzten Endes zu

mitochondrialer Dysfunktion [44], was zu einer weiteren Erhöhung der ROS-Level und über Cytochrom-C Freisetzung zur Apoptoseinduktion, einem entscheidenden Mechanismus in der Progression von einfacher Verfettung zur NASH, führt.

1.4 ROLLE VON MAKROPHAGEN IN DER ENTSTEHUNG DER NASH

Makrophagen (MΦ) sind als Leukozyten Teil des Immunsystems, deren primäre Aufgabe in der Phagozytose und dem Abbau extrazellulärer Partikel (z.B. Zelldetritus oder Pathogene) sowie der Präsentation von deren Bestandteilen auf der Zelloberfläche besteht. Über diese Funktion und die hierdurch induzierte Sekretion von Zytokinen sind Makrophagen maßgeblich an der Initiation und Regulation einer Immunantwort beteiligt.

Die im Körper vorkommenden, sehr heterogenen MΦ-Populationen können anhand von Vorkommen, Funktion und Herkunft bzw. Ontogenese, sowie vieler weiterer Parameter klassifiziert werden. Stark vereinfacht formuliert, kann man zwei große Gruppen unterscheiden: Residente, gewebsständige und aus dem Blutkreislauf stammende, infiltrierende bzw. motile MΦ [51].

Residente Makrophagen in der Leber, welche mit einem Anteil von 80-90 % die Hauptgruppe gewebsständiger MΦ ausmachen und bereits während der Embryogenese in die Leber einwandern [51], werden als Kupffer-Zellen (Kupffer Cells, KCs) bezeichnet [52] und repräsentieren mit anderen nicht-parenchymatösen Zellen e.g. Sternzellen und sinusoidalen Endothelzellen ca. 30-35 % der Gesamtzellpopulation der Leber [53]. Auf Grund der teils uneinheitlichen Verwendung des Terminus der „Kupffer-Zelle“, historisch bedingt fälschlicherweise teils als Kupffer-Sternzelle bezeichnet, was je nach Literatur und Autor residente Lebermakrophagen (vergleichbar mit Alveolarmakrophagen in der Lunge, Hofbauer-Zellen in der Plazenta oder Mikroglia im Gehirn), teilweise jedoch auch in der Leber befindliche Makrophagen beschreibt, sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich die nachfolgende Betitelung nur auf jene während der Embryogenese eingewanderten Zellen bezieht.

Diese potentiell selbstregenerativen, entlang der Lebersinusoide vorkommenden Zellen repräsentieren die erste *defense-line* für aus der Portalvene bzw. dem Darm stammende Mikroorganismen und haben u.a. zur Aufgabe, Pathogene mit Hilfe von *pattern recognition receptors (PRR)* zu erkennen und ohne die Induktion einer Entzündungsreaktion zu beseitigen [45].

Kupffer-Zellen sind von nicht-residenten, infiltrierenden M Φ , welche in der Immunantwort supportive Funktion einnehmen, zu unterscheiden. Diese stammen aus dem Knochenmark und zirkulieren als Monozyten im Blutkreislauf [51, 54]. Im physiologischen Ausgangszustand gibt es für Monozyten kaum Anreiz, ins Gewebe zu migrieren und zu M Φ zu differenzieren, werden jedoch Lockstoffe, sog. Chemokine freigesetzt, so werden sie zum Ort des Geschehens geleitet und die Differenzierung zu Makrophagen induziert. Wichtiger Mediator für die Infiltration von Makrophagen monozytären Ursprungs (M Φ M von englisch *monocyte-derived macrophages*) in die Leber stellt dabei die CCR2-CCL2-Achse dar [55-59], wemgleich auch andere Signalwege resp. Achsen zu einer möglichen Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen beitragen können, wie bspw. CCR1-CCL5 oder CCR8-CCL1 [60, 61].

M Φ M phagozytieren tote Zellen und sezernieren im Falle einer Entzündungsreaktion selbst als Quelle von proinflammatorischen Mediatoren Zytokine wie Tumornekrosefaktor(TNF)- α , CCL(CC-Chemokin-Ligand)-2 und IL(Interleukin)-6, wodurch wiederum weitere Immunzellen wie Monozyten, Lymphozyten und Neutrophile rekrutiert werden, zusammenfassend beschrieben in Kazankov et. al. 2019 [62].

Funktionell werden Lebermakrophagen klassisch in Anlehnung an die Unterteilung der T-Zellen in zwei Aktivierungszustände unterteilt: Proinflammatorische, auch als „klassisch-aktivierte“ bezeichnete M1-Makrophagen und anti-inflammatorische, „alternativ-aktivierte“ M2-Makrophagen [63].

Studien legen nahe, dass je nach umgebendem, lokalem Milieu und vorherrschenden Zytokinen bzw. -konzentrationen ein Switch zum M1- bzw. M2-Phänotyp vice versa vonstattengeht. So bewirken u.a. Interferon(INF)- γ und Lipopolysaccheride (LPS) eine verstärkte Differenzierung hin zum M1- Typus, welcher durch Produktion von induzierter Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zur Freisetzung des in großen Mengen zytotoxisch wirkenden Stickstoffmonoxid (NO) führt, einem wichtigen Mechanismus in insbesondere der Initiation der protektiv intendierten Entzündungsreaktion [64].

Der M2-Phänotyp hingegen wird auch als „pro-regenerativer Typ“ bezeichnet, da dieser nach vorangegangener Aktivierung durch u.a. das anti-inflammatorisch wirkende IL-4 als auch durch Gewebsdebris, die Angiogenese sowie die Stammzelldifferenzierung potenziert, aber auch die durch M1-M Φ getriggerte Immunreaktion reguliert sowie antiinflammatorische Zytokine sezerniert [65].

Diese zytokingesteuerte Induktion des Aktivierungszustands der Makrophagen wurde vorwiegend in *in vitro* Modellen definiert und spiegelt nicht die Komplexität der Zusammensetzung des die Makrophagen umgebenden Mikromilieus wider. Daher handelt es sich bei der M1-/M2-Nomenklatur um ein vereinfachendes Modell, das aus unterschiedlichen Gründen sinnvoll ist, wenngleich es – wie durch den Terminus „vereinfachend“ beschrieben – nicht in der Lage ist, die Komplexität, Plastizität und Heterogenität der Makrophagenpopulationen in Gänze zu beschreiben [66] und sich Arbeiten neueren Datums zunehmend von dieser Klassifizierung entfernen [67].

Neben den protektiven Aspekten für Organhaushalt, -funktion und -homöostase scheinen MΦ indes auch negative Einflüsse und Auswirkungen auf die Progression hepatischer Krankheitsverläufe zu haben.

So legen Studien nahe, dass Makrophagen die Steatosisentwicklung beeinflussen und verfettungsbedingte Schäden intensivieren [68], was scheinbar auf eine veränderte Zusammensetzung der Makrophagen(sub)populationen im Krankheitsverlauf zurückzuführen ist. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass in Kupffer-Zell-depletierten Mäusen das Ausmaß der Steatosis geringer ist als in Vergleichstieren, bei gleichzeitig erhöhter Expression von PPAR(*peroxisome proliferator-activated receptor*)- α . Die Autoren kommen zu der schlussfolgernden Hypothese, dass durch eine von Kupffer-Zellen über IL-1 β modulierte Bindung von NF- κ B an Bindungsstellen des Promotors des PPAR- α -Gens eine Suppression von dessen Zielgenen und damit eine reduzierte Fettoxidation vonstattengeht, was somit in einer vermehrten Fettspeicherung in der Leber resultiert [69], ein Indikator für die Wechselwirkungen zwischen Hepatozyten und Makrophagen.

In der Progression einer einfachen Steatosis zur NASH verändert sich das Mikromilieu der Leber stetig. Nach dem initialen Shift der Makrophagenpopulation hin zur prädominant proinflammatorischen Variante, wodurch Gewebeschäden induziert werden [64, 70], beobachtet man im weiteren Verlauf verstärkt progenerative Makrophagen, die - neben immunsuppressiven Effekten - durch die Sekretion von TGF(*Transforming growth factor*)- β 1 und IL-13 gekennzeichnet sind, wodurch sie für ein Voranschreiten der Fibrose verantwortlich gemacht werden [71], da TGF- β 1 in substantiellem Maße an der Kollagenproduktion durch Aktivierung von Sternzellen beteiligt ist [72]. Dies ist auch in Verbindung mit den Ergebnissen anderer Studien zu bringen, die nahelegen, dass Makrophagen auch regulative Funktionen in der Fibroseentwicklung einnehmen.

Der Einfluss des Mikromilieus auf die Subpopulationen wird hierbei auch im Hinblick auf die Lokalisation deutlich: Proinflammatorische MΦ sind insbesondere im Bereich von geschädigten, toten Hepatozyten, aus welchen sie Lipid-Tropfen extrahieren, anzutreffen [73], antiinflammatorische MΦ sind eher im interstitiellen Raum [74] lokalisiert. Um die toten bzw. sterbenden Hepatozyten ordnen sich die Makrophagen ringförmig an [73] und bilden so die sogenannten *crown-like structures* (CLS), welche unter dem Mikroskop betrachtet einer kronenähnlichen Erscheinung gleichkommen, bisher v.a. aus entzündetem, viszeralem Fettgewebe bekannt.

Jüngere Studien weisen eben jene auch vermehrt im Fettgewebe tumorös veränderten Brust- [75-77], Endometrium- [78] oder Prostatagewebes [79] nach und konnten teilweise einen Zusammenhang zwischen dem unterschiedlichen Ausmaß der Progression dessen und den CLS ausmachen [75, 80].

Doch auch in einer adipös transformierten Leber werden CLS immer häufiger beschrieben, was die Vermutung nahelegen lässt, dass diese bei der Entstehung der NASH eminent ins Gewicht fallen, weshalb sich der Terminus hCLS (hepatische CLS) fortwährend etabliert.

Zu beachten dabei ist die Tatsache, dass CLS zwar in Pat. mit NAFLD/NASH nachweisbar sind, jedoch nicht oder nur in geringem Maße in Biopsien chron. viraler Hepatitiden [81] und somit Ausdruck einer fortgeschrittenen, lipidbedingten Schädigung darstellen, wobei vermutet wird, dass diese in zeitlichem Zusammenhang mit der Progression der Steatosis hin zur NASH steht [81].

Die ursprünglich vorherrschende Hypothese, die Gesamtanzahl der in der Leber befindlichen Makrophagen, sowie die der KCs stiege bei der Progression der NASH an [82], bedarf jedoch auf Grund Ergebnissen von Arbeiten jüngeren Datums [83] einer kritischen Beleuchtung.

Daemen et. al. [84] konnten in einer kürzlich (2021) erschienenen Arbeit nachweisen, dass die Anzahl TIM4^{pos} Zellen – einem spezifischen Marker für Kupffer-Zellen – abnahm, wobei gleichzeitig eine Zunahme TIM4^{neg} Makrophagen, sowohl in absoluten als auch relativen Zahlen zu beobachten war, was nach einer *lineage-tracing* und *fate-mapping* Analyse eindeutig auf Makrophagen monozytären Ursprungs zurückgeführt werden konnte.

Dieser Nachweis ist von Bedeutung, da man heute davon ausgeht, dass die infolge einer entzündlichen Reaktion rekrutierten Monozyten durch Verbleiben im Lebergewebe und Annahme eines entsprechenden Phänotyps auch in der Lage sind, residente KCs zu ersetzen [85, 86].

Unstrittig ist, dass Makrophagen durch die initiierenden und regulativen Funktionen und damit zu ihren in der Immunantwort primär zählenden Obliegenheiten, eine essentielle Rolle in der Entstehung der NASH einnehmen, nicht endgültig geklärt hingegen ist, worin genau diese besteht, durch welche (Sub-)Population sie realisiert, als auch über welche molekularen und zellulären Signalkaskaden sie aktiviert wird. Eine wiederkehrende Schwierigkeit bei der Bestimmung und Einteilung der (Sub-) Populationen ist eine übereinstimmende und eindeutige Definition, auch bedingt durch uneinheitliche literarische Verwendung entsprechender (Oberflächen-)Marker und Markerkombinationen.

Makrophagen werden, unabhängig von ihrem Ursprung i.d.R. als CD68^{pos} deklariert, weshalb auch von einem generellen Makrophagenmarker gesprochen wird [54, 87-90]. Dabei handelt es sich um ein, auch als Macsialin bezeichnetes, intrazelluläres Glykoprotein, das in erster Linie mit den zytoplasmatischen Granula und in einem geringeren Maß mit den Membranen von Makrophagen assoziiert ist. In der Immunhistochemie wird CD68 hauptsächlich zur Identifizierung von Makrophagen herangezogen, wobei es auch in anderen Zellen wie Neutrophilen, Basophilen und bestimmten Lymphozytenpopulationen exprimiert wird [91, 92]. CD11b (o.a. Mac-1, Integrin α -M) bezeichnet i.d.R. von Monozyten abstammende Makrophagen [93], wobei jedoch auch andere Immunzellpopulationen wie Monozyten oder dendritischen Zellen den Oberflächenmarker CD11b exprimieren.

1.5 ZIELSETZUNG

Die zuvor dargelegten Daten zeigen sehr deutlich, dass die NAFLD mit allen Ausprägungen des Erkrankungsspektrums ein erhebliches und ernstzunehmendes Krankheitsbild darstellt, welches nicht nur aus dem medizinischen Betrachtungswinkel, sondern insbesondere auch vor dem Hintergrund epidemiologischer und ökonomischer Auswirkungen gesamtgesellschaftliche Relevanz besitzt. Gleichzeitig ist die NAFLD sowie die genaue Pathophysiologie der Progression eben jener weiterhin nicht gänzlich verstanden und bedarf weiterer grundlegender Forschung, welche dazu beitragen könnte, sowohl potentielle diagnostische Mittel, um gefährdete Pat. zuverlässig und früh(er) zu erkennen, als auch auf Grund eines besseren Gesamtverständnisses der Erkrankung mögliche Therapieoptionen zu entwickeln.

Hauptziel dieser Arbeit war eine sauber charakterisierte und zeitlich hochaufgelöste Tierkohorte, welche die Veränderungen im Zuge einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung, insbesondere im Hinblick auf strukturelle Veränderungen wie Verfettung und Fibroseentwicklung detailliert und diskriminiert darstellt. Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass MΦ an der Entwicklung der NASH sowie an chronischen Lebererkrankungen im Allgemeinen einen signifikanten Anteil haben, wobei sie sowohl protektive als auch potentiell schädliche Auswirkungen auf die Homöostase und Organfunktion haben können [94]. Die Rolle der Makrophagen sowie Veränderungen in puncto Lokalisation, Infiltration und Zusammensetzung der sehr heterogenen Makrophagenpopulationen galt es daher ebenfalls näher zu beleuchten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Merkmale, die in besonderem Maße mit dem Voranschreiten der Erkrankung assoziiert sind, zu identifizieren und mittels Korrelationsanalyse Aussagen über die Stärke des Zusammenhangs jener mit der Progression des Krankheitsbildes treffen zu können.

Nach einer ausgiebigen Recherche öffentlich zugänglicher Datenbanken lässt sich feststellen, dass eine entsprechend zeitlich hochaufgelöste Kohorte in dem von uns ausgeführten Umfang nicht existiert. Diese Charakterisierung dient somit als etablierter Standard für alle zukünftigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe und stellt durch das besondere Detailreichtum für eine Vielzahl von folgenden Experimenten daher eine solide Ausgangslage dar.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 VERSUCHSTIERE

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Universität Düsseldorf (ZETT). Die Mäuse hatten freien Zugang zum Futter und Trinkwasser. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12h/12h, die Temperatur 22 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 50 %. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2017.A406 genehmigt und entsprechend dem Tierschutzgesetzes durchgeführt. Verwendet wurden wt C57BL/6J Wildtyp-Mäuse, männlich, Fütterungsbeginn im Alter von 8 Wochen (W) (Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich). Die Tiere wurden mit Standard Diät (SD) oder Western Diät (WD) für 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26, 30, 40 oder 50 Wochen gefüttert.

2.1.2 FUTTER

Standard Diät

Hersteller:	ssniff® Spezialdiäten GmbH
REF:	V1534-000
Bezeichnung:	Ratte/Maus-Haltung, 10mm (R/M H 10 mm)
Bruttoenergie:	16,2 MJ/kg (3,87 kcal/gm)
Umsetzbare Energie:	13,5 MJ/kg
Kohlenhydrate:	67 kJ%
Proteine:	24 kJ%
Fett:	9 kJ%

Western Diät

Hersteller:	OpenSource Diets®
REF:	D16022301
Energie:	4,5 kcal/gm
Kohlenhydrate:	40 kcal%
Proteine:	20 kcal%
Fett:	40 kcal%

2.1.3 CHEMIKALIEN

4% Formaldehyd (Paraffinschnitte) Roti®-Histofix	Carl Roth, REF: 3105.1
Aceton	Merck Biochrom GmbH, REF: 1.00013.2500
Avidin-Biotin-Block	Vector-Laboratories, REF: SP-2001
BSA	Roche, REF: 10735078001
Citronensäure-Monohydrat	Merck Biochrom GmbH, REF: 1.00244.1000
DAB Substrat Kit	Zytomed Systems, REF: DAB057
Dako Pen®	Agilent Dako, REF: S2002
Eosin-Färbelösung	Sigma-Aldrich, REF: HT110116-500ml
Ethanol absolute	VWR Chemicals, REF: 20821.330
Fluorescence Mounting Medium	Agilent Dako, REF: S3023
Formalin, 4%	Carl Roth, REF: P087.3
Gibco® FCS (South American)	Fisher Scientific GmbH, REF: 10270
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, REF: T865.1
Hämatoxylin n. Mayer	Sigma-Aldrich, REF: MHS16-500ml
Hämatoxylin-Färbelösung (Gill no. III)	Sigma-Aldrich, REF: GHS316-500ml
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth, REF: X906.1
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth, REF: X907.1
Hoechst 34580	Sigma-Aldrich, REF: 63493
Iso-Propanol / 2-Propanol, 2,5L	VWR Chemicals, REF: 20922.320
Ketavet® 100mg/ml	Pfizer AG, ATCvet-Code: QN01AX03
Natriumchlorid, 5kg	VWR Chemicals, REF: 27800.369
NeoClear®	VWR Chemicals, REF: 1.09843.5000
Oil-Red-O Pulver, 100g	Sigma-Aldrich, REF: O-0625
Paraformaldehyd, 1kg	Fluka (now: Sigma-Aldrich), REF: 76240
PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Merck Biochrom GmbH, REF: L 182-05
PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Gibco, REF: A1286301
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Laboratories, REF: SK-4100
Picrosirius Red Stain Kit, 500ml	Polysciences, Inc REF: 24901-500
Rompun® 2%ig	Bayer Healthcare, ATCvet-Code: QN05CM92
Salzsäure, rauchend, 2,5L	Merck Biochrom GmbH, REF: 1.00317.2500
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, REF: 4583
Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1kg	VWR Chemicals, REF: 28811.295
Tween 80%, 500g	Carl Roth, REF: 9139.3
VectaMount® Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, REF: H-5000

VECTASTAIN® ABC Kit, Peroxidase (Rat IgG)	Vector Laboratories, REF: PK-4004
Wasserstoffperoxid 30%, 2,5L	Merck Biochrom GmbH, REF: 1.08597.2500
Xylol „Xylenes“, 4L	Sigma-Aldrich, REF: 534056-4L

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Chemikalien und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Schneideblätter	Leica 819 Low profile, REF: 14035838925
Deckgläser 24x50mm	Engelbrecht, REF: K12450
Filterpapier whatman®	Sigma-Aldrich, REF: 10311645
Objektträger 76x26x1mm	Marienfeld superior REF: 081000 bzw. 1000200
Objektträger-Kasten (-20°C)	neoLab®, REF: 2-2345
Objektträger Paraffin 26x76x1,0mm	Leica X-tra Adhesive white REF: 3800200AE
Teststreifen für SpotChem® Trockenchemie-Analyser – „ALP“	Arkray, REF: 77176
Teststreifen für SpotChem® Trockenchemie-Analyser – „LDH“	Arkray, REF: 77171
Teststreifen für SpotChem® Trockenchemie-Analyser – „Liver 1“	Arkray, REF: 77182

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge

2.1.5 GERÄTE

Folgende Geräte fanden im Rahmen der Dissertation Anwendung:

Cell-Observer	ZEISS Observer.Z1
Histologie-Wasserbad	Leica Jung Histobath-1 HI1210
Kocher	Severin Dampfgarer Typ 2423
Kryostat	Leica CM3050S
Magnetrührer mit Heizung	IKA® RCT-Basic
Mikrotom	Leica Jung RM 2055
Mikroskop	ZEISS AxioLab.A1
pH-Meter	WTW pH 330
Präzisionswaage	Kern® 770
Präzisionswaage	Kern® 440-47N
Schüttler	GFL 3017 Orbital Shaker
Slide Scanner	Hamamatsu Photonics NanoZoomer 2.0-HT
Trockenchemie-Analyser	SpotChem® EZ SP-4430

2.1.6 ANTIKÖRPER

Art	Wirt	Ziel	Konjugat	Hersteller	REF
primär	Kaninchen	Maus CD68	unkonjugiert	abcam	ab125212
primär	Ziege	Maus CD26	unkonjugiert	R&D Systems	AF954
primär	Ratte	Maus F4/80	unkonjugiert	Bio-Rad (formerly: AbD Serotec)	MCA_497 RT
primär	Ratte	Maus CD11b	unkonjugiert	R&D Systems	MAB 1124
primär	Ratte	Maus Mac-2	unkonjugiert	Cedarlane Best	CL8942AP
primär	Kaninchen	Glutaminsynthetase	unkonjugiert	Sigma-Aldrichs	G2781
sekundär	Ziege	Kaninchen, IgG	HRP	Novus Biologicals	NB7160
sekundär	Esel	Ratte	FITC	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	712-096- 153
sekundär	Esel	Kaninchen	CY5	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	711-175- 152
sekundär	Esel	Ziege	CY3	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	705-165- 147
sekundär	Kaninchen	Ratte IgG2a	HRP	Novus Biologicals	NB7126
sekundär	-/-	Ratte	HRP	Vector Laboratories	PK-4004

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Antikörper und Hersteller

2.1.7 AUFLISTUNG FIRMEN

Abcam (Cambridge, UK)
Agilent Technologies (Glostrup, Denmark)
Akray (Kyōto, Präfektur Kyōto, Japan)
Bayer Healthcare (Leverkusen, Germany)
Bio-Rad (formerly: AbD Serotec) BioRad (Hercules, California, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Carl Zeiss (Jena, Germany)
Cedarlane (Burlington, Ontario, Kanada)
Engelbrecht Medizin- & Labortechnik (Edermünde, Germany)
Fluka (now: Sigma-Aldrich)
Gibco, Invitrogen (Carlsbad, Germany)
Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Shizuoka, Japan)
IKA (Staufen im Breisgau, Germany)
Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (Cambridgeshire, United Kingdom)
Kern (Balingen-Frommern, Germany)
Leica (Wetzlar, Germany)
Merck (Darmstadt, Germany)
neoLab (Heidelberg, Germany)
Novus Biologicals (Littleton, Colorado, United States)
OpenSource Diets® - Research Diets (New Brunswick, United States)
Paul Marienfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen, Germany)
Pfizer (New York, USA)
Polysciences, Inc. (Warrington, Pennsylvania, USA)
R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, United States)
Roche (Basel, Switzerland)
Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen im Breisgau, Germany)
Serverin (Sundern (Sauerland), Germany)
Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany)
Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, Massachusetts, USA)
Vector Laboratories (Newark, California, United States)
VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)
WTW (Weilheim, Germany)
Zytomed Systems (Berlin, Germany)

Tabelle 4 Auflistung der Firmen/Hersteller in alphabetischer Reihenfolge und der Standort jener Hauptsitze

2.1.8 SOFTWARE

ImageJ/Fiji

Version 1.53m (September 2021)

ImageScope

Version 12.3.3 (September 2021)

AxioVision - ZEISS

Version 4.9.1

GraphPad Prism

Version 9.4.1

Smart Servier Medical Art

Teile der Abbildung 1 und 2 wurden unter Verwendung von Bildern aus Servier Medical Art gestaltet. Servier Medical Art von Servier ist lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2.1.9 LÖSUNGEN

- *Citratpuffer pH-6 (für 1 Liter Zielvolumen)*
 - o 2,1 g Citronensäure-Monohydrat
 - o dH₂O
 - o NaOH

- *0,5% HCl-70%EtOH-Lösung (für 1 Liter Zielvolumen)*
 - o 20 ml 25% HCl-Lösung
 - o 980 ml 70%iger EtOH

- *4% PFA (für 500 ml Zielvolumen)*
 - o 20 g PFA
 - o 500 ml PBS
 - o pH 7,6

- *10x-TBS (für 1 Liter Zielvolumen)*
 - o 24,2 g Tris
 - o 80,0 g NaCl
 - o dH₂O

- pH 7,6
- *Oil-Red-O Stocklösung (für 100 ml Zielvolumen)*
 - 0,5 g Oil-Red-O Pulver
 - 100 ml Isopropanol
- *Oil-Red-O Arbeitslösung*
 - 40% dH₂O
 - 60% Oil-Red-O Stocklösung
 - Faltenfilterfiltration
- *5%ige Blockierlösung Immunfluoreszenz (für 100 ml Zielvolumen)*
 - 5 g BSA
 - 95 ml PBS
- *Blockierlösung GS-Färbung (für 150 ml Zielvolumen)*
 - 15 ml FCS
 - 15 ml 10 x TBS
 - 1,5 g BSA
 - 130 ml dH₂O
- *Blockierlösung Mac2-Färbung (für 150 ml Zielvolumen)*
 - 4,5 ml Tween 80%
 - 4,5 g BSA
 - 141 ml PBS
- *10x Tris-Puffer (für 1 Liter Zielvolumen)*
 - 60,57 g Tris
 - 1000 ml dH₂O
 - pH 7,6

2.2 METHODEN

2.2.1 FÜTTERUNG

Im Alter von 8 Wochen startete das Fütterungsexperiment, in dem die Tiere die unter 1.1.2 beschriebene SD oder WD erhielten. Die Versuchstiere wurden einmal wöchentlich gewogen, auf körperliche Unversehrtheit hin untersucht und das WD-Futter wurde erneuert. Die Dauer der Fütterung kann aus der Abb. 3 entnommen werden.



Abb. 3 Fütterungsdauer in Wochen

Im Rahmen dieser Betreuung wurde auch der versuchstierkundliche Kurs der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität (HHU) absolviert und am 29.11.2019 abgeschlossen.

2.2.2 ORGANENTNAHME

Die Organentnahme erfolgte nach intraperitonealer Narkose mittels 100 mg/100 ml Ketamin (Ketavet®) und 2 %igem Xylazin (Rompun®), gelöst in 0,9 %iger Natriumchloridlösung. Zunächst erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes. Nach Blutentnahme aus der unteren Hohlvene sowie Eröffnung der Pfortader und Einbringen einer Kanüle wurde die Leber bis zur Blutleere mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS *phosphate-buffered saline*) durchspült. Anschließend erfolgte die Entnahme der Leber. Der rechte Leberlappen wurde in Stickstoffschockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt, Anteile des linken Leberlappens wurden in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert.

2.2.3 SERUMMESSUNGEN

Serumproben von 100 µl Volumen wurden in ein entsprechendes Teströhrchen überführt und zusammen mit jeweils einem Teststreifen „liver-1“ und „ALP“ entsprechend den Herstellerangaben in das Testgerät gegeben.

„Liver-1“ bestimmt dabei folgende Parameter: T-Protein, Albumin, T-Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)/, Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)/, Alanin-Aminotransferase (ALT) und Laktat-Dehydrogenase (LDH).

Falls der LDH-Wert auf Grund eines Überschreitens von > 4000 IU/L nicht exakt bestimmt werden konnte, wurde eine 1:10 Verdünnung mit Natriumchlorid (NaCl) vorgenommen, dieser Wert einzeln nachbestimmt und abschließend mit dem Faktor 10 multipliziert.

2.2.4 FÄRBUNGEN FÜR HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN

Für die angewandten Färbemethoden Oil-Red-O und Immunfluoreszenz (IF) wurden Kryoschnitte des rechten Leberlappens angefertigt. Dazu wurde das gefrorene Leberteilstück mit Hilfe von O.C.T.® auf der Objektplatte befestigt und eingespannt. Kammertemperatur und Objekttemperatur betragen jeweils -20 °C bzw. -22 °C, die Schnittdicke betrug 10 µm.

Je Objektträger (OT) wurden 2 x 2 Schnitte aus zwei verschiedenen Arealen aufgetragen und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bei -20 °C bis zur Färbung aufbewahrt.

ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Die Gewebeprouen wurden nach der Entnahme in einer 4 %igen Formaldehydlösung bei RT fixiert. Die nächtliche Entwässerung erfolgte nach folgendem Schema:

50 % Ethanol bei 40 °C für mindestens 15 min. → 70 % Ethanol bei 40 °C zweimal für je 30 min. → 96 % Ethanol bei 40 °C zweimal für je 60 min. → 99,5 % Ethanol bei 40 °C dreimal für je 60 min. → NeoClear® bei 40 °C zweimal für je 60 min. → Paraffin bei 60 °C viermal für jeweils 45 min. Das Ausgießen der Paraffinblöcke erfolgte im Anschluss. Am Mikrotom erfolgte die Anfertigung von 5 µm dicken Schnitten, welche nach Streckung im Heißwasserbad auf Objektträger gezogen und vor Färbeprozessen mindestens einen Tag lang bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

OIL-RED-O FÄRBUNG

Kryoschnitte von 10 µm Dicke wurden für 30 min. in einer 4 %igen Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden diese 2 x 5 min. mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Färbung erfolgte nach einminütigem Waschen in 60 % Isopropanol durch anschließende 15 min. Inkubation in der Oil-Red-Arbeitslösung. Darauf folgte ein erneuter Waschgang mit 60 % Isopropanol für 30 Sekunden, um überflüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin n. Mayer für 1 Minute.

Die Schnitte wurden abschließend erneut 2 x 5 min. unter fließendem Wasser gebläut, mit Dako® Mounting Medium bedeckt und mit Deckgläsern versehen. Das Austrocknen der

Schnitte wurde mit Versiegeln der Kanten des Deckgläschens durch handelsüblichen transparenten (Nagel-)lack verhindert.

PICROSIRIUS-RED FÄRBUNG

Auch Picrosirius-Red gehört in die Gruppe der Azofarbstoffe und ist eine häufig angewandte Technik zum Nachweis von Kollagen, weshalb sie sich gut für die quantitative Einschätzung von Fibrosegraden in der Leber eignet.

An Paraffinschnitten von 5 µm Dicke wurde zunächst eine Entparaffinierung mit einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt:

Xylol (2 x 10 min.) → EtOH 100% (5 min.) → EtOH 90% (5 min.) → EtOH 70 % (5 min.) → dH₂O (2 x 5 min.)

Danach wurden diese in einer Methanol-Aceton Lösung (Verhältnis 1:1) für 10 min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte ein Trocknungsvorgang, bis das restliche Methanol verdampft war. Es schlossen sich ein kurzer Waschgang für 2 min. und ein etwas längerer für 5 min. mit destilliertem Wasser an.

Die Kernfärbung erfolgte für 8 min. mit Hämatoxylin n. Weigert. Dazu wurde die Hämatoxylinstammlösung A mit der Hämatoxylinstammlösung B im Verhältnis 1:1 gemischt. Es folgten zwei Waschgänge mit dH₂O für jeweils fünf Minuten. Nachfolgend wurden die Schnitte für 2 min. in die Lösung A des Pikro-Siriusrotfärbekits getaucht mit zwei anschließenden Waschgängen mit dH₂O für jeweils drei Minuten. Lösung B des Färbekits wirkte für insgesamt 60 min. ein. Daran schloss sich direkt, ohne weiteren Waschgang, die Lösung C (0,4 % HCl) für ca. 30 sec. an. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70 %igem Ethanol (EtOH) für 1 min., 90 %igem EtOH, 100 %igem EtOH und Xylol für jeweils fünf Minuten.

Eingedeckt wurden die Schnitte in einem wasserfreien Eindeckmedium VecaMount® und anschließend mit Deckgläsern versehen.

IMMUNFLUORESZENZ-FÄRBUNG

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden Kryoschnitte von 10 µm Dicke für 30 min. in 4 %iger PFA-Lösung fixiert. Dazu wurde 20 g Paraformaldehyd (PFA) in 400 ml PBS unter leichter Erwärmung gelöst und bei RT wieder erkalten gelassen. Ggfs. wurde dieser Vorgang wiederholt, ein vollständiges Klären der Flüssigkeit tritt jedoch erst nach adäquater Einstellung

des pH-Wertes ein, welcher mit Hilfe von NaOH/HCl bei pH 7,6 justiert wurde. Auffüllen auf 500 ml Zielvolumen und aliquotieren in Falcons, bis zur Verwendung bei -20 °C lagern.

Anschließend wurden die Schnitte für 2 x 10 min. in PBS gewaschen. Falls intrazelluläre Marker nachgewiesen werden sollten, wurden die Objektträger für 3 min. in 0,1 % Triton X-Lösung begeben und erneut für 2 x 2 min. in PBS gewaschen.

Durch Inkubation mit einer 5 % bovinen Serumalbumin(BSA)-PBS-Lösung für 1 h bei RT wurden unspezifische Antikörper(AK)-Bindungsstellen blockiert. Zusätzlich wurden bei jeder Färbung parallel AK-Kontrollen durchgeführt, bei denen ausschließlich Sekundär-AK aufgetragen wurden, um sicherzustellen, dass keine unspezifischen Signale nachgewiesen wurden.

Die Primär-AK wurden in der Blockierlösung verdünnt. Dabei kamen folgende Verdünnungen zur Anwendung:

Ziel	Verdünnung	Wirt
Maus CD11b	1:100	Ratte
Maus CD26	1:400	Ziege
Maus CD68	1:100	Kaninchen

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Primärantikörper der IF-Färbung (vgl. Tbl. 2)

Je Schnitt wurden 50µl der jeweiligen AK-Verdünnung aufgetragen, bei besonders großen Präparaten teilweise mehr. Eine Umrandung der Gewebeschnitte mit einem Fettstift (Dako-Pen®) half die Flüssigkeit auf diesen Bereich zu begrenzen. Die AK-Kontrolle wurde ausschließlich mit der 5%iger BSA-PBS-Lösung versehen.

Die Inkubationszeit der Primär-AK betrug 90 min bei RT. Darauf folgte ein erneuter Waschgang mit PBS für 3 x 10 min. Eine Übertragung von AK auf die Antikörperkontrolle wurde durch eine separate Küvette für die Kontrolle verhindert.

Die Sekundär-AK wurden ebenfalls in der Blockierlösung in folgenden Verdünnungen gelöst:

Ziel	Verdünnung	Wirt
Ratte (FITC)	1:200	Esel
Ziege (CY3)	1:200	Esel
Kaninchen (CY5)	1:200	Esel

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper der IF-Färbung (vgl. Tbl. 2)

Die Einwirkzeit betrug hier 60 min bei Raumtemperatur. Auch bei den sekundären AK erfolgten 3 Waschvorgänge à 10 min. mit PBS, jedoch wurden hierbei die Küvetten mit Alufolie bedeckt, um die an die Sekundärantikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zu schützen. Anschließend wurden mögliche Salzurückstände mit destilliertem Wasser entfernt. Die Schnitte wurden mit einem wässrigen Eindeckmedium (DAKO® Fluorescence Mounting Medium) eingebettet, mit Deckgläsern versehen und mit handelsüblichem, transparentem Nagellack gegen Austrocknung geschützt.

GLUTAMINSYNTHEASE-/MAC2-FÄRBUNG

Ziel der Glutaminsynthetase-/Mac2-Färbung war es, die Lokalisation der Makrophagen und eine evtl. Veränderung dieser zu untersuchen. Der Nachweis wurde mittels Immunhistochemie (IHC) durchgeführt, da diese im Vergleich zur IF einen deutlichen Mehrwert an Strukturinformationen bietet, welche nicht erst mittels spezifischer AK sichtbar gemacht werden müssen.

Dabei war der AK mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP von engl. *horseradish peroxidase*) gekoppelt, welches die Umsetzung des entsprechenden Substrats, im vorliegenden Fall 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), katalysiert und eine braune Ausfällung am Ort der HRP hinterlässt. Indem in zwei, direkt aufeinander folgenden Schnitten im ersten Schnitt die Glutaminsynthetase, im direkt darunterliegenden Schnitt Mac2 gefärbt wurde, kann durch direktes Gegenüberstellen beider Schnitte so eine Aussage über die Lokalisation der MΦ getroffen werden, da die Glutaminsynthetase strikt im Bereich um die Zentralvene lokalisiert ist.

Für die Glutaminsynthetase-Färbung wurden Paraffinschnitte in 5 µm Dicke verwendet. Die Entparaffinierung erfolgte nach folgendem Schema:

Xylol (2 x 15 min.) → EtOH 100 % (5 min.) → EtOH 90 % (5 min.) → EtOH 70 % (5 min.)
→ dH₂O (2 x 5 min.)

Für das Antigen-Retrieval wurden die Schnitte in eine Plastik-Küvette gegeben, welche danach mit einem Citratpuffer (pH 6) aufgefüllt und in einem vorgeheizten Kocher 15 min. auf eine Temperatur von 96-98 °C erhitzt wurde, wobei diese nicht überschritten wurde.

Nach 15-minütigem Abkühlen der Schnitte bei RT erfolgten zwei Waschgänge in PBS für jeweils fünf Minuten. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte über 1 h in einer einfachen Tris-gepufferten Kochsalzlösung (TBS von englisch *Tris-buffered saline*) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS von englisch *fetal calf serum*) und 1 % BSA.

Der Primär-AK (s. Tabelle 3) wurde 1:10.000 in einer 1 %igen BSA-PBS Lösung verdünnt und über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Die AK-Kontrolle wurde ausschließlich mit der 1 %igen BSA-PBS Lösung versehen. Es folgten drei Waschgänge mit PBS für jeweils 5 min., wobei eine AK-Übertragung auf die Kontrolle durch Verwendung einer separaten Küvette unterbunden wurde. Anschließend erfolgte die Blockierung endogener Peroxidaseaktivität mit einer 3 %igen H₂O₂ Lösung (gelöst in PBS) für 10 min. bei RT, welche im Folgenden durch drei Waschgänge wieder entfernt wurde.

Der sekundäre AK (s. Tabelle 3) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneuter Waschgang (3 x 5 min. mit PBS).

Die Detektion erfolgte in insgesamt vier Schritten. Zunächst wurden die Schnitte für 10 min. in 1 x TB Puffer belassen. Das eigentliche DAB-Substrat wurde für 2-10 min. unter ständiger Beobachtung aufgetragen, der Überstand abgegossen und erneut 5 min. mit TB Puffer gespült. Durch die Katalysation der Oxidation des Substrats durch die HRP wird ein brauner, wasserunlöslicher Farbstoff im Bereich dieser gebildet. Ein kurzer Waschgang für 1 min. mit Aqua dest. entfernte überschüssige TB Puffer Reste.

Die Kernfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun nach Mayer für eine Minute. Nach kurzem Abspülen der OT mit Leitungswasser wurde eine Differenzierung entsprechend einer regressiven Färbetechnik mit 0,5 %igem HCl in 70 % EtOH für 10 Sekunden durchgeführt.

An die Differenzierung schloss sich ein 10-minütiger Waschgang mit fließendem, kaltem Leitungswasser an. Durch den Anstieg des pH-Werts in den neutralen bis basischen Bereich färbt sich das gebundene Hämalaun blau. Für die Dehydrierung wurden die gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt (70 % EtOH (2 min.) → 90 % EtOH (2 min.) → 100 % EtOH (2 min.) → Xylol (5 min.)), um sie anschließend mit wasserfreiem Mounting Medium VectaMount® einzudecken.

Die Mac2-Färbung ähnelt in großen Teilen der Glutaminsynthetase-Färbung. Nach Antigenretrieval und entsprechendem Waschgang weicht die Färbung von zuvor genanntem Protokoll ab: Es erfolgt der 3 %ige H₂O₂-Block in Methanol für 10 min. im Dunkeln. Nach 3 x 5 min. Waschgang mit PBS erfolgte ein Avidin-Biotin-Block (Avidin/Biotin Blocking Kit) für 15 min, kurz spülen mit PBS, Biotin-ready-to-use für 15 min. und abschließender Waschgang für 5 min. mit PBS. Unspezifische Bindestellen wurden mittels Blockierung für 1 h bei RT, bestehend aus 3 % Tween-80 und 3 % BSA gelöst in PBS reduziert. Der Primär-AK (s. Tabelle 3), 1:500 verdünnt in 1 %iger BSA-Lösung (in PBS), wurde über Nacht bei 4 °C

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (à 5 min) erfolgte die Färbung mit dem Sekundärantikörper. Für den sekundären AK (s. Tabelle 3) wurde das ABC-Vectastain-Kit nach Hersteller-Anweisung verwendet, wobei sowohl sekundärer AK und ABC-Reagenz für 30 min. einwirkten, danach erneut ein Waschgang für 3 x 5 min. mit PBS sowie 1 x 5 min. dH₂O. Inkubation unter Sicht mit DAB-Vectastain-Kit (Vector) für ca. 6 min, dabei immer unter Beobachtung. Die Reaktion wurde durch das Spülen mit dH₂O für 5 min. gestoppt. Die Kernfärbung, Entwässerung und das Eindecken erfolgten entsprechend der Beschreibung zur Glutaminsynthetase-Färbung.

HE-FÄRBUNG

Kryoschnitte von 10 µm Dicke wurden für 10 min. mit einer 50%-Methanol:50%-Aceton Lösung fixiert, anschließend max. 5 min. luftgetrocknet, bis das überflüssige Aceton unter einem Abzug abgedampft war. Nach zweiminütigem dH₂O-Waschgang erfolgte eine 5-minütige Inkubation in Hämatoxylin-Färbelösung (Gill no. III). Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült, bis das Abwasser klar war.

Nach kurzem Eintauchen in eine 0,5%ige-HCl-70%EtOH Lösung und erneutem Spülen mit fließendem Leitungswasser für 10 min. erfolgte die Kernfärbung durch Inkubation für 10-15 Sekunden in die Eosin-Färbelösung und einmaliges Eintauchen in 70 % EtOH. Nachfolgend schloss sich das Entwässern nach folgendem Schema an: Zweimal Entwässern in 70 % EtOH für jeweils 3 Minuten, kurzes Eintauchen in 90 %-, sowie 100 % EtOH, abschließend für 5 min. Xylol. Es folgte das Eindecken mit wasserfreiem Mounting Medium VectaMount® sowie das Versehen der Objektträger mit Deckgläsern.

2.2.5 MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Die Aufnahmen der Oil-Red-O, Picrosirius-Red, HE und Mac2/GS-Färbungen bzw. IHC erfolgten zunächst am Mikroskop AxioLab.A1 der Firma ZEISS, wobei jeweils zwischen 5 bis zu 10 repräsentative Stellen ausgewählt und i.d.R. in zwei Vergrößerungsstufen (10er und 20er Objektiv) aufgenommen wurden.

Im Verlauf wurden durch die Heidelberger Arbeitsgruppe um Nils Grabe durch Frau Krauthoff (Department of Medical Oncology, National Center for Tumor Diseases (NCT), Heidelberg) mit Hilfe eines *whole-slide* Scanners die Präparate ganzheitlich abgelichtet. Dabei sind 0,2fache bis 40,0fache Vergrößerungen stufenlos am PC analysierbar. Die Aufnahmen der IF-Färbung erfolgten mittels Cell-Observer (Observer.Z1) der Firma ZEISS.

IF-Färbung

Es wurde auf standardisierte Bedingungen hinsichtlich Belichtungszeiten sowie Raum- und Hintergrundbeleuchtung geachtet.

Pro Tier wurden aus 2 x 2 Schnitten mindestens zehn repräsentative Stellen nach gleichem Schema ausgewählt und abgelichtet. Randbereiche oder beschädigte Areale wurden dabei vermieden.

Bei jeder Kohorte wurde außerdem eine AK-Kontrolle zum Ausschluss unspezifischen Färbeverhaltens des sekundär-AK durchgeführt und aufgenommen.

Falls eine nachträgliche Bearbeitung, beispielsweise zur Reduzierung des Hintergrundes notwendig war, wurde dies gleichsam für alle Aufnahmen einer Kohorte durchgeführt. Dabei wurden Veränderungen (sofern notwendig) ausschließlich an Helligkeit und Kontrast mit Hilfe der Software AxioVision® von ZEISS vorgenommen.

Picrosirius-Red Färbung

Um den Kontrast und damit die demonstrative Potenz zwischen Rot gefärbtem Kollagen und im optimalen Falle Gelb erscheinendem Hintergrund zu erhöhen, wurde - ausschließlich für die in der Monographie vorliegenden Darstellungen mit illustrativer Absicht, nicht jedoch für Aufnahmen anhand derer eine Auswertung hinsichtlich Fibrose, Ballonierung und Steatosis angefertigt wurde - die Farbtemperatur einheitlich geringfügig angepasst.

2.2.6 AUSWERTUNG

Die Auswertung der IHC und konventionellen Färbungen mit Ausnahme der Oil-Red O Färbung erfolgte anhand der durch die Arbeitsgruppe aus Heidelberg aufgenommenen *whole-slide* Scans. Dadurch konnte auf Grund der guten Übersichtsaufnahmen ein besserer und repräsentativerer Gesamteindruck des Lebergewebes gewonnen werden, was insbesondere bei der Frage nach Fibrosegraden und Ballonierung relevant ist.

Bei der Immunfluoreszenz konnte nicht auf *whole-slide* Scans zurückgegriffen werden, weshalb die Auswertung anhand jeweils 10 vorliegenden Aufnahmen gemacht wurde, wobei vorher aus der Gesamtanzahl eine Vorauswahl anhand von Färbe- und Schnittqualität sowie Lokalisation und vorhandener Strukturen wie z.B. Zentralvenen (CV von engl. *Central vein*) getroffen wurde, um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

Bei der Oil-Red-O Färbung wurden ebenfalls min. sechs, teilweise > 20 konventionelle, lichtmikroskopische Aufnahmen verwendet.

PICROSIRIUS-RED FÄRBUNG

Anhand von *whole-slide* Scans konnte ein guter Eindruck des Gesamtpräparates und der durchlaufenden strukturellen Veränderungen gewonnen werden. Die Klassifizierung der Fibrose erfolgte anhand von modifizierten Kriterien des *NASH Clinical Research Network Scoring System* von Kleiner et al. [95] einer Weiterentwicklung des Brunt-Scores [5], wobei die Fibrose nach folgendem Schema eingestuft wurde:

Fibrose:

<i>Fehlt</i>	0
<i>Perisinusoidal oder periportal</i>	1
<i>Perisinusoidal, Zone 3, mild</i>	1a
<i>Perisinusoidal, Zone 3, moderat</i>	1b
<i>Periportal ausschließlich</i>	1c
<i>Perisinusoidal und periportal</i>	2
<i>Perisinusoidal und periportal, mild</i>	2a
<i>Perisinusoidal und periportal, moderat</i>	2b
<i>Perisinusoidal und periportal, ausgeprägt</i>	2c
<i>Brückenbildende Fibrose</i>	3
<i>Zirrhose</i>	4

Die Untergruppen 1a-1c dürfen dabei, anders als die Untergruppen 2a-2c nicht als Steigerung der fibrotischen Veränderungen verstanden werden, da die Fibrose im Rahmen der NASH im überwiegenden Anteil von den CV bzw. perisinusoidal ausgeht, sodass der Score 1c nur sehr selten auftritt.

Weiterhin wurden die Picosirius-Red Aufnahmen hinsichtlich der Steatosis und des *Balloonings*, als Marker für den hepatozellulären Schaden, ausgewertet. Hierbei kamen beide Untergruppen des *NAFLD Activity Scores* (NAS) [95] unverändert zum Tragen:

Steatose

<i>Fehlt oder < 5 %</i>	0
<i>> 5 % - 33 %</i>	1
<i>> 33 % - 66 %</i>	2
<i>> 66 %</i>	3

Hepatozelluläres Ballonieren

<i>Fehlt</i>	0
<i>Wenige ballonierte Zellen</i>	1
<i>Hohe Zellbeteiligung/ Prominente Ballonierung</i>	2

Der daraus resultierende Score wurde gegenüber der Fütterungsdauer aufgetragen und in einer *Heat-Map* dargestellt.

Die Aufnahmen aus dem ImageScope-Programm wurden ausschließlich für die Anwendung in der vorliegenden Monographie zwecks besserer Darstellung geringfügig und einheitlich hinsichtlich Helligkeit & Kontrast verändert.

IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung bezog sich auf zwei Hauptkriterien.

Zum einen wurde die Anzahl an CLS händisch ausgezählt. Dabei wurde aus 10 Aufnahmen die Gesamtanzahl der CLS, als auch die Unterscheidung in $CD68^+/CD11b^-$ und $CD68^+/CD11b^+$ CLS ausgewertet.

Dabei wurde jedes Tier (und die dazugehörigen 10 Aufnahmen) in einer zufälligen Reihenfolge zweimal gezählt und der Mittelwert aus beiden Zählungen gebildet.

Auch hier erfolgten dann eine Gegenüberstellung mit der Fütterungsdauer als auch dem Gesamtgewicht der Mäuse sowie eine graphische Darstellung dessen.

Außerdem wurde die Gesamtanzahl der Makrophagen mittels Fiji/ImageJ ausgezählt. Hier wurden mindestens sieben Aufnahmen pro Tier numerisch ausgewertet sowie zwischen $CD68^+$ und $CD11b^+$ Zellen unterschieden und ebenfalls ein entsprechender Mittelwert pro Tier gebildet und graphisch sowohl für SD- als auch WD-gefütterte Tiere mittels Prism wiedergegeben.

OIL-RED-O FÄRBUNG

Mit Ausnahme eines 30W Tieres, bei dem nur drei Aufnahmen zu Verfügung standen, wurden bei allen Tieren bei mindestens sechs konventionell Lichtmikroskop basierten Aufnahmen mithilfe von Fiji/ImageJ der prozentuale Anteil der rot gefärbten Fläche an der Gesamtfläche ausgewertet.

Dazu wurde ein Bild in ein RGB-Stack umgewandelt, der dritte Kanal (*blue*) auf Grund des besten Kontrastes ausgewählt und der *Threshold* so adjustiert, dass das Originalbild und das entsprechend angepasste Bild einander bestmöglich entsprachen.

Dabei lag der minimale *Threshold* stets bei „0“ der obere Schwellenwert bei „9-255“ mit einem Median von „114“ und einem Mittelwert von „112“.

Anschließend wurden die Messkriterien in Fiji/ImageJ folgendermaßen angepasst und die Messung unter *Analyse* → *Measure* durchgeführt:

Set Measurements

Auswählen von:

- *Area*
- *Area fraction*
- *Limit to threshold*
- *Display label*

Aus den Ergebnissen wurde ein entsprechender Quotient gebildet und die Zeitpunkte graphisch aufgetragen sowie die Standardabweichung berechnet.

Zusätzlich wurden, wie bei der Picrosirius-Red Färbung, die in der vorliegenden Niederschrift dargestellten Aufnahmen zwecks besserer Vergleichbarkeit einheitlich in Helligkeit und Kontrast optimiert.

2.2.7 STATISTIK

Bei statistischer Auswertung der Daten konnte auf Grund der geringen n-Zahl nicht von normalverteilten Daten ausgegangen werden, weshalb bei Korrelationsanalysen nicht-parametrische Tests verwendet wurden. Dabei kam der Mann-Whitney-U-Test analysiert durch Prism zum Einsatz.

Um eine Beeinflussung bei der Analyse einer möglichen Korrelation zwischen zwei Parametern (z.B. Körpergewicht und Anzahl CD11b⁺/CD68⁺-hepatischen *crown-like structures* (CLS)) bewusst zu umgehen, wurde dabei nicht zwischen WD- und SD-gefütterten Tieren unterschieden, sondern ausschließlich eine monotone Korrelation beider Parameter mittels Spearman-Rangkorrelation beurteilt.

Der dabei ermittelte Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient gibt Auskunft über die Stärke und Richtung der Beziehung. Außerdem kann eine Aussage über dessen Signifikanz getroffen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 GEWEBSSCHÄDIGUNG/VERFETTUNG/NASH

Im Verlauf einer chronischen Schädigung der Leber, wie sie durch eine hochkalorische Diät und der hierdurch bedingten Entzündungsreaktion hervorgerufen wird, lassen sich grob drei Kernaspekte voneinander trennen:

- A) durch die Entzündungsreaktion hervorgerufene entzündliche Veränderungen mit Infiltration von Immunzellen.
- B) strukturelle Veränderungen und damit bedingte Störung des Blutflusses und auch des Galleflusses, wobei diese zunächst durch die massive Verfettung der Parenchymzellen bedingt ist und erst im Verlauf durch einen zunehmenden narbigen Umbau der Leber, der schließlich in das Vollbild einer Leberzirrhose übergeht.
- C) Verlust an funktionsfähigen Parenchymzellen, welcher sich in einer, zumeist erst später im Verlauf klinisch fassbaren, verringerten Synthese-/Entgiftungsleistung der Leber niederschlägt.

Für die Charakterisierung des hier untersuchten präklinischen Mausmodells wurde eine Reihe von Parametern evaluiert.

3.1.1 GEWICHTSENTWICKLUNG

Die Auswirkungen der erhöhten Energiedichte des Futters (WD) ist im Vergleich zum Standardfutter bereits im optischen Vergleich der Versuchstiere deutlich zu erkennen (Abb. 4). Durch zeitlich hochaufgelöste Dokumentation und graphische Darstellung des Körpergewichtes (KG) kann die Entwicklung kontinuierlich in beiden Versuchsgruppen nachvollzogen werden (Abb. 5).

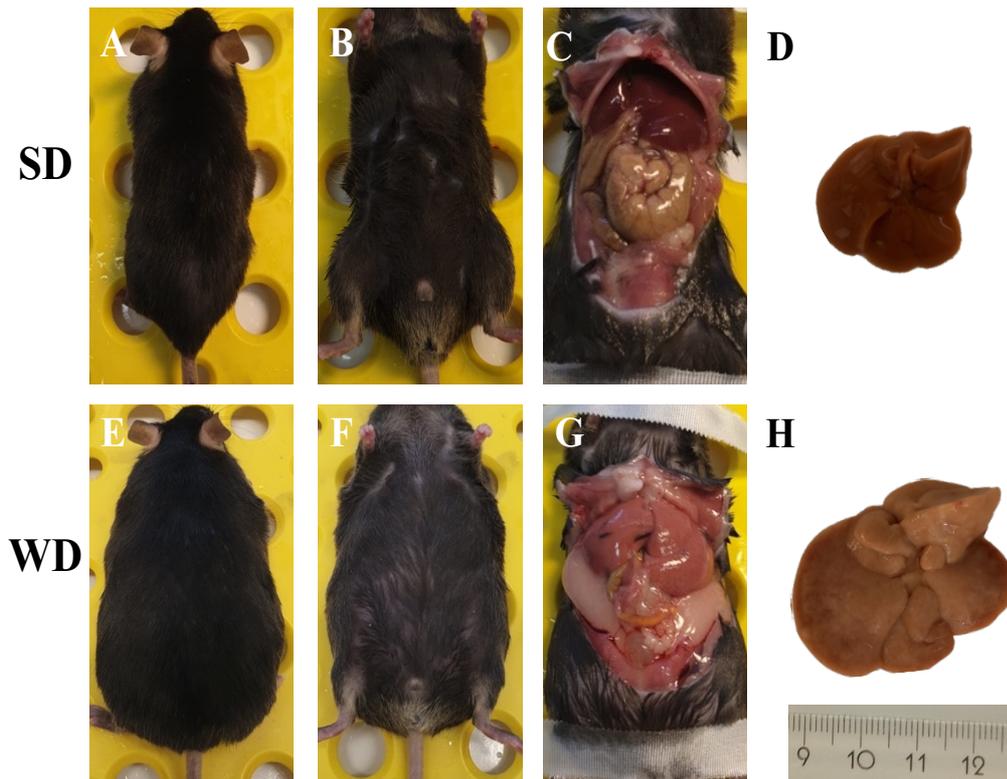


Abb. 4 Sichtbare Zunahme der Körper- und Lebergröße nach WD im Vergleich zur SD nach 30 Wochen Fütterung. A-C Tier nach Fütterung mit Standarddiät. E-G Tier nach Fütterung mit Western Diät. C, G eröffneter Situs mit Blick auf die Leber, den Darm und das Fettgewebe. D, H entnommene Leber nach Perfusion

Hierbei nimmt das Körpergewicht in beiden Gruppen (WD und SD) relativ konstant von 0W bis 50W zu. Der Anstieg verläuft bei den SD-gefütterten Tieren (Abb. 5A) jedoch deutlich langsamer und gleichmäßiger mit einer durchschnittlichen Zunahme von 1,32 g zwischen den Organentnahmen (mit einer maximalen Varianz von - 0,28 g min. und + 2,26 g max.) auf $\bar{\sigma}$ 36,71 g Endgewicht nach 50W, was ausgehend von $\bar{\sigma}$ 23,56 g einem Zuwachs von $\bar{\sigma}$ 13,16 g resp. dem 1,56-fachen entspricht.

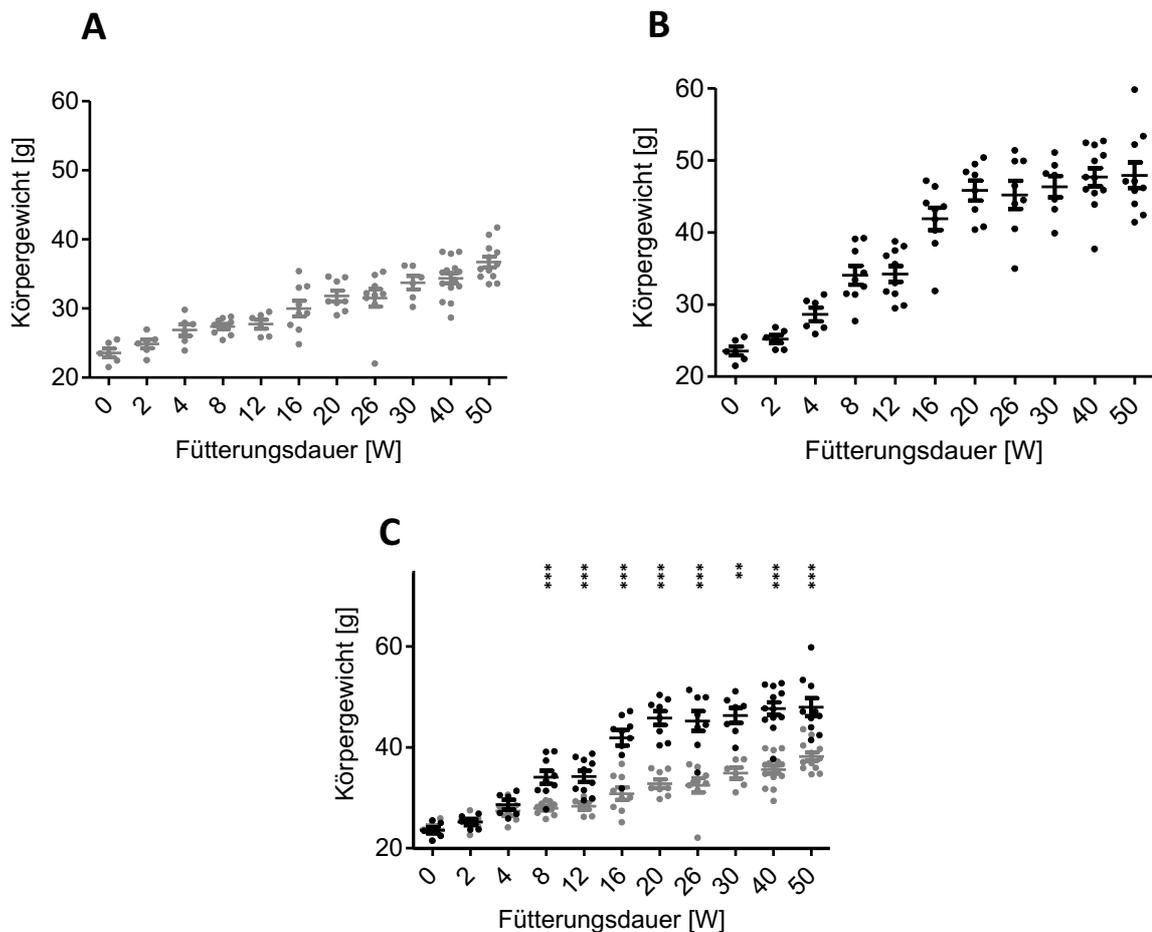


Abb. 5 Signifikante Zunahme des Körpergewichts nach Western Diät im Vergleich zur Standarddiät. **A** Körpergewicht nach SD-Fütterung (grau) und **B** Körpergewicht nach WD-Fütterung (schwarz). **C** Vergleichende Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts nach SD- und WD-Fütterung über einen Zeitraum von bis zu 50 Wochen. Analysiert wurden 6-12 Tiere je Fütterungsgruppe/Zeitpunkt. Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede mit ** für $p \leq 0.01$ und *** für $p \leq 0.001$. Die Mittelwerte der Datenpunkte sind mit \pm Standardfehler angegeben.

WD-gefütterte Tiere (Abb. 5B) legten im Vergleich mit \bar{x} 2,44 g (mit einer maximalen Varianz von - 0,6 g min. und + 7,65 g max.) das \bar{x} 1,84-fache an Gewicht zwischen den Entnahmezeitpunkten zu und erreichten ein durchschnittliches Endgewicht von 47,94 g, was einer Zunahme auf mehr als das Doppelte des durchschnittlichen Ausgangsgewichtes (\bar{x} 23,56 g) entspricht. Dabei verlief der mittlere Anstieg bis zum Zeitpunkt von 20W Fütterungsdauer recht linear, danach tritt nahezu eine Stagnation der Gewichtsentwicklung ein. In der vergleichenden Darstellung von SD- und WD-gefütterten Tieren (Abb. 5C) wird der ab Woche 8 im Vergleich zu den SD-gefütterten Tieren signifikant erhöhte Anstieg des KG nach

WD-Fütterung deutlich. Dieser bleibt bis Woche 50 signifikant erhöht, obwohl nach Woche 20 der Anstieg des KG dieser Tiere nahezu stagniert.

Die hochkalorische Diät macht sich jedoch nicht nur im Körper- sondern auch insbesondere im Lebergewicht (LG) bemerkbar. So kommt es, neben der markanten optischen Präsentation und Veränderung in Form, Größe und Farbe (Abb. 4D und H) bei WD-gefütterten Tieren wie auch beim KG, zu einer – bis auf wenige Ausnahmen – fortlaufenden Zunahme des Organgewichtes mit einem *Peak* und durchschnittlichem Gewicht von 4,91 g nach 40W Fütterung, was mehr als einer Verdreifachung ($\times 3,86$ -fach) des Ausgangsgewichtes entspricht. Im weiteren Verlauf kommt es dann nach weiteren 10 Wochen zu keiner weiteren Zunahme, sondern eher zu einem leichten Abfall des durchschnittlichen Lebergewichtes bei den WD-Tieren auf $\approx 4,42$ g (Abb. 6B).

Auffällig hierbei ist, dass anders als beim KG, das LG der SD-gefütterten Tiere zwar einen relativen Zuwachs in vergleichbarer Größenordnung (KG $\times 1,56$ -fach, LG $\times 1,37$ -fach) erfährt, die Diskrepanz zwischen WD- und SD-Tieren aber umso deutlicher ausfällt (Abb. 6C). Dies ist anhand einer gemeinsamen Darstellung der Quotienten für Leber- und Körpergewicht aus WD/SD-Fütterung gut ersichtlich (Abb. 7). Insbesondere ab einem Zeitpunkt von 12W wird die übermäßige Zunahme des LG der WD-Tiere im Vergleich zu den SD-Tieren und desselbigen Quotienten beim KG deutlich.

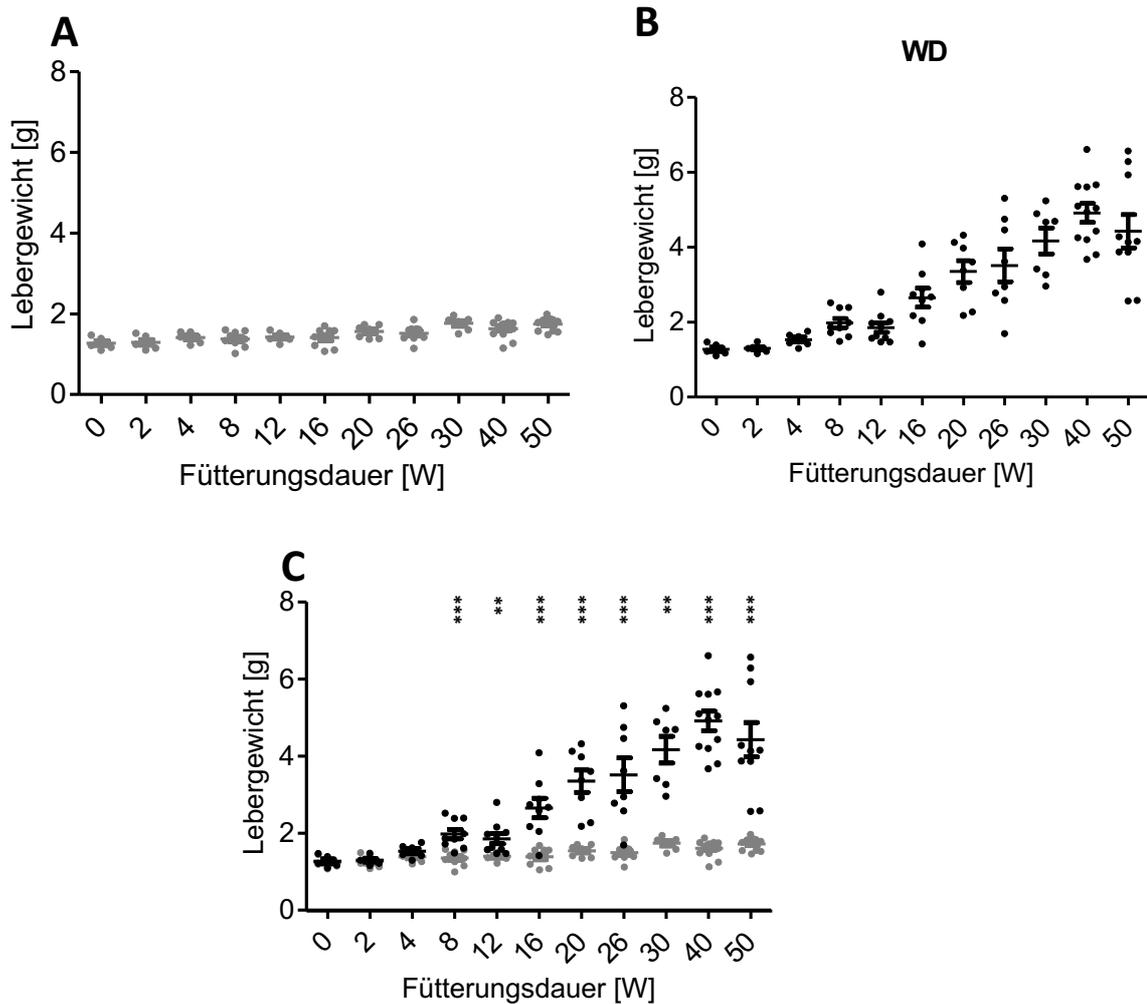


Abb. 6 Signifikante Zunahme des Lebergewichts nach Western Diät im Vergleich zur Standarddiät. **A** Lebergewicht nach SD-Fütterung (grau) und **B** Lebergewicht nach WD-Fütterung (schwarz). **C** Vergleichende Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts nach SD- und WD-Fütterung über einen Zeitraum von bis zu 50 Wochen. Analysiert wurden 6-12 Tiere je Fütterungsgruppe/Zeitpunkt. Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede mit ** für $p \leq 0.01$ und *** für $p \leq 0.001$. Die Mittelwerte der Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

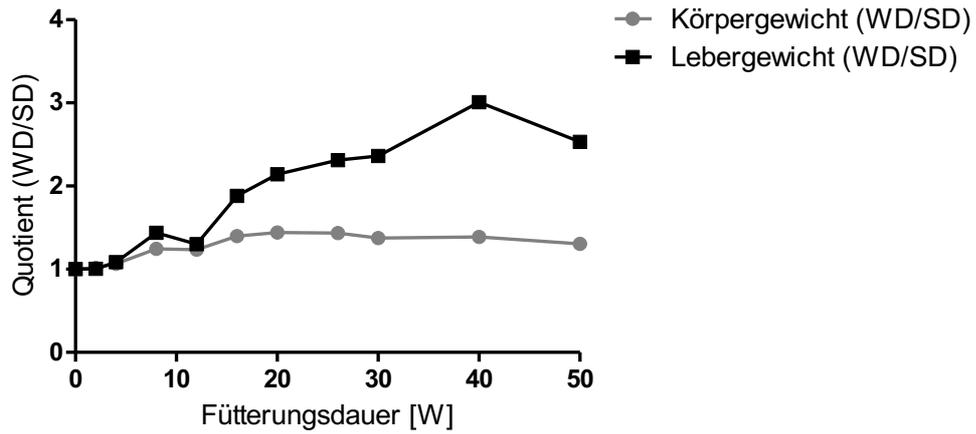


Abb. 7 Vergleichende Darstellung der Quotienten der Gewichtsentwicklung von Leber- und Körpergewicht nach Western Diät im Vergleich zur Standarddiät. Der Quotient der Entwicklung des Körpergewichts (grau) aus beiden Fütterungsgruppen (WD/SD) und aus der Entwicklung des Lebergewichts (schwarz) aus beiden Fütterungsgruppen (WD/SD) während der Fütterungsdauer bis zu 50 Wochen. Analysiert wurden 6-12 Tiere je Fütterungsgruppe und Zeitpunkt.

3.1.2 STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN

Strukturelle Veränderungen der Leber wurden primär mit Hilfe von zwei konventionellen Färbetechniken, der Oil-Red-O Färbung und der Picrosirius-Red Färbung, untersucht.

Die Ausbildung einer Fibrose im Verlauf der Entwicklung einer NAFLD und ihrer Progression zur NASH wurde dabei mit Hilfe von Picrosirius-Red Färbungen der zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Lebergewebe untersucht. Durch Auswertung des Bildmaterials anhand eines angepassten *NASH Clinical Research Network Scoring System* von Kleiner et al. (mit weiterer Unterteilung des Stadiums 2), bzw. des entsprechenden Teilscores für den fibrotischen Umbau, konnte eine semiquantitative Aussage getroffen werden. Hierfür wurden folgende Fibrose-Stadien unterschieden:

Fibrose

- 0 keine fibrotischen Veränderungen
- 1 perisinusoidale ODER periportale Veränderungen
 - 1a milde Ausprägung, perisinusoidal
 - 1b moderate Ausprägung, perisinusoidal (wurde hier nicht beobachtet)
 - 1c nur portal / periportal (wurde hier nicht beobachtet)
- 2 perisinusoidale UND periportale Veränderungen
 - 2a geringe Zunahme des fibrotischen Gewebes
 - 2b moderate Zunahme des fibrotischen Gewebes
 - 2c starke Zunahme des fibrotischen Gewebes ohne *Bridging*
- 3 *Bridging* (durchgehende Kollagenfasern zwischen Zentralvene und Periportalfeld)

Dabei sieht der in der Arbeit von Kleiner et al. angewandte Score keine Unterteilung der Stufe 2 vor. Grund der Modifikation ist der im vorliegenden Tiermodell jedoch überaus häufig vorkommende Score „2“, sodass eine zusätzliche Abstufung dessen im Sinne dreier, in der Ausprägung der vorkommenden fibrotischen Veränderungen aufsteigender Untergruppen (gering, moderat, stark) unternommen wurde, um mögliche Veränderungen innerhalb dieser Stufe besser darstellen zu können und die Trennschärfe so zu erhöhen.

Wie zuvor beschrieben, wurden die Picrosirius-Red Aufnahmen in Ergänzung zu den Oil-Red-O Färbereien auch hinsichtlich der Steatosis und des *Balloonings*, einem Marker des hepatozellulären Schadens, ausgewertet. Dabei kam der von Kleiner et. al angewandte NAS-Score unverändert zum Tragen:

Hepatozelluläres Ballonieren

- 0 *Fehlt*
- 1 *Wenige ballonierte Zellen*
- 2 *Hohe Zellbeteiligung/ Prominente Ballonierung*

(für den Score zur Steatosis s.u.)

Fibrose/Ballooning

Die untenstehenden Abbildungen (Abb. 8 und 10) zeigen insbesondere in direkter Gegenüberstellung sehr deutlich die Auswirkungen der Fütterung mit einer hochkalorischen Western Diät im Vergleich zur Standardfütterung. So sind bereits nach 2W, dem, in der gewählten zeitlichen Auflösung, Zeitpunkt mit der kürzesten Fütterungsdauer, erste, gering ausgeprägte fibrotische Veränderungen nachweisbar (Abb. 8B und 10J), wenn auch nur bei ~1/3 der WD-gefütterten Tiere. Bis zum Zeitpunkt von einschließlich 8W finden ausschließlich Veränderungen in der Verteilung und Häufigkeit des frühen Fibrorestadiums „1a“ statt, ab 12W kann dann zum ersten Mal eine sowohl perisinusoidale als auch periportale pathologische Kollagenvermehrung nachgewiesen werden (Abb. 8B und 10M).

Die Scores „1b“ und „1c“ wurden nicht beobachtet und sind daher in den Graphiken nicht aufgeführt. Dass dem Score „1c“ keine tragende Rolle zuteilwird, verwundert insofern nicht, da wie bereits oben beschrieben, die NASH-bedingte Kollagenvermehrung im überwiegenden Ausmaß von der Zentralvene (CV von engl. *central vein*) resp. perisinusoidal ausgeht, woraus auch resultiert, dass bei beginnender periportal Fibrosierung i.d.R. ein Score \geq „2“ vorliegt.

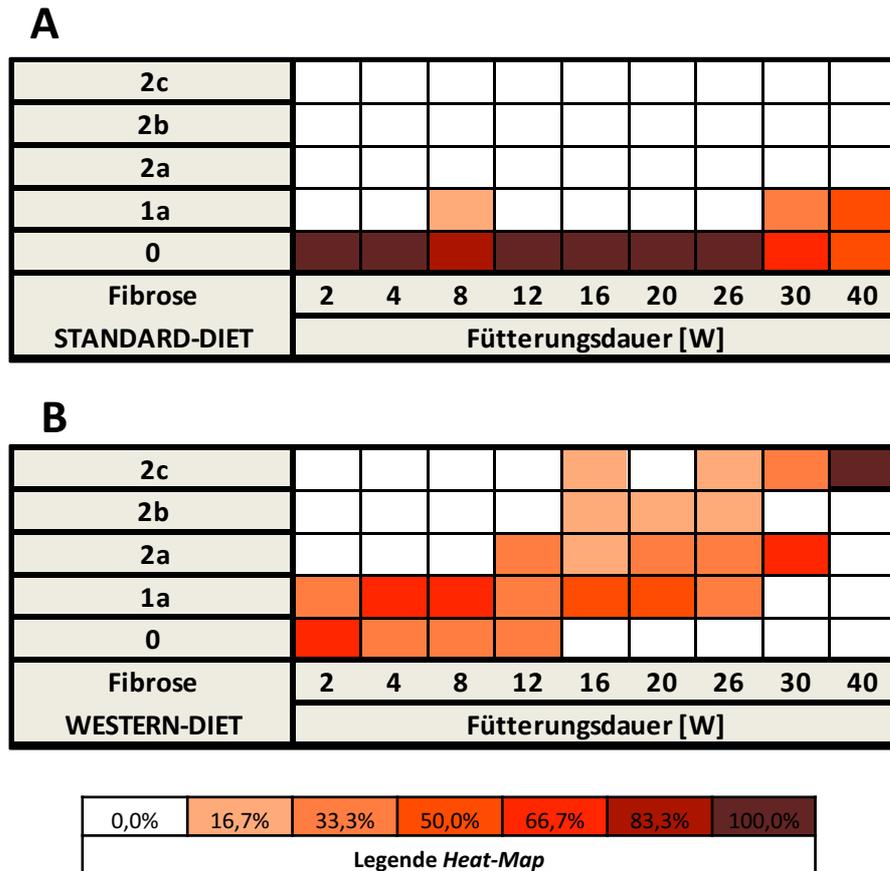


Abb. 8 Durch hochkalorische Diät induzierte Entwicklung von fibrotischem Lebergewebe ausgewertet entsprechend modifiziertem *NASH Clinical Research Network Scoring System*.

A Fibroseentwicklung nach SD. **B** Fibroseentwicklung nach WD.

Farbliche Darstellung der relativen Anzahl Tiere der jeweiligen Kohorte, die einen entsprechenden Fibrose-Grad aufweist, kodiert entsprechend der *Heat-Map* Legende. Analysiert wurden 3-6 Tiere pro Zeitpunkt und Diät, basierend auf *whole-slide* Scans Picrosirius-Red gefärbter Paraffinschnitte. Die Analysekriterien sind unter 2.2.6 sowie 3.1.2 aufgeführt.

Auffällig ist, dass bereits nach 16W der im vorliegenden Versuchsrahmen höchstvorkommende Fibrose-Score erstmalig erreicht wurde, als auch die Tatsache, dass nach 40W Fütterung 100 % der Versuchstiere in eben jenem einzustufen sind (Abb. 8B).

Bemerkenswert erscheint auch, dass – abgesehen von einem Einzelwert bei 8W – die SD-gefütterten Mäuse ab 30W ebenfalls Anzeichen einer geringen Kollagenvermehrung aufweisen (Abb. 8A, Abb. 10A-I), was am ehesten als altersbedingte Veränderung zu werten ist.

Erwähnt sei in diesem Abschnitt ebenfalls, dass die Fibroseentwicklung hinter der zu Versuchsbeginn angenommenen (Ein)Schätzung zurückblieb, und auch nach einer Fütterungsdauer von 40W kein Tier den Status einer fortgeschrittenen Fibrose mit Ausbildung

von *bridging fibrosis*, und somit einen Score „3“ erreichte und v.a. nicht das Vollbild einer voll ausgeprägten Zirrhose.

Das *Ballooning* wird als Marker hepatozellulären Schadens angesehen und ist für die Unterscheidung zwischen Steatosis und Steatohepatitis essentiell. Diese, insbesondere in der Umgebung von verfetteten Hepatozyten vorkommende Zellschwellung, kann bereits früh, d.h. ebenfalls nach bereits zwei Wochen Fütterung mit WD ausgemacht werden, wobei Ausmaß und Schweregrad im Verlauf zunehmen (Abb. 9B, Abb. 10J-R). Anders als bei der oben erwähnten, altersbedingten Fibrosierung nach 30W resp. 40W lässt sich bei der Ballonierung keine Veränderung im Verlauf bei SD-Tieren feststellen (Abb. 9A, Abb. 10A-I).

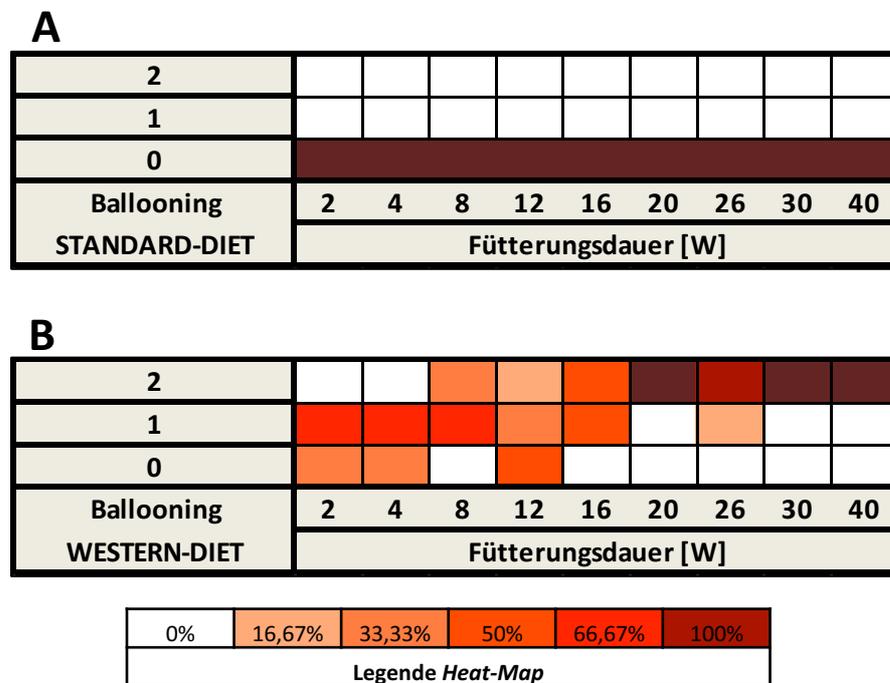
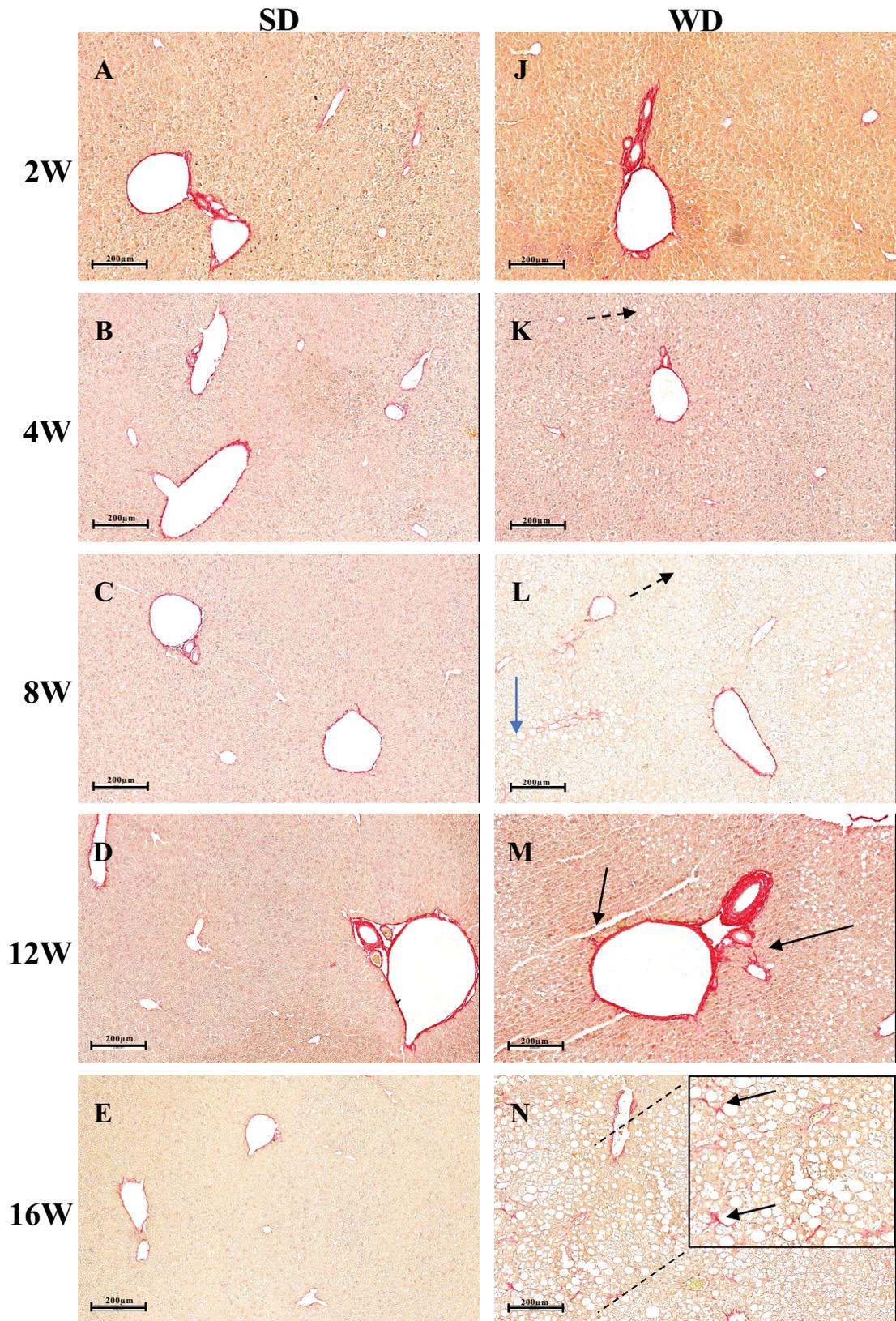


Abb. 9 Durch hochkalorische Diät induzierte Entwicklung von *Ballooning* klassifiziert entsprechend NAS. A Ballonierung nach SD. **B** Ballonierung nach WD. Farbliche Darstellung der relativen Anzahl Tiere der jeweiligen Kohorte, die einen entsprechenden Ballonierungsgrad aufweist, kodiert entsprechend der *Heat-Map* Legende. Analysiert wurden 3-6 Tiere pro Zeitpunkt und Diät, basierend auf *whole-slide* Scans Picosirius-Red gefärbter Paraffinschnitte. Die Analysekriterien sind unter 2.2.6 sowie 3.1.2 aufgeführt.



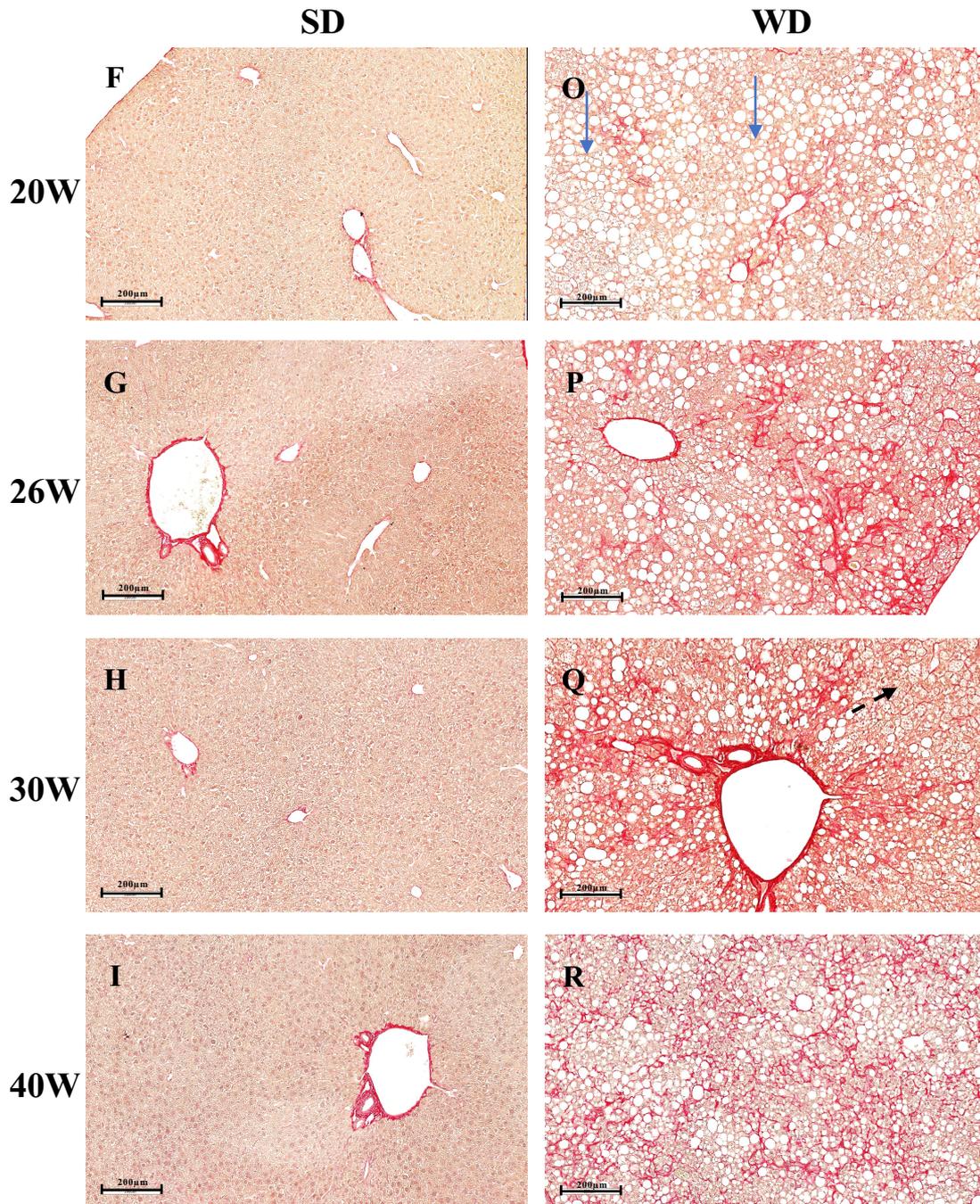


Abb. 10 Picrosirius-Red Färbung von Leberschnitten nach Standard bzw. Western Diät. A-I Fibroseentwicklung nach SD. **J-R** Fibroseentwicklung nach WD. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es sich um Ausschnitte aus *whole-slide* Scans. Jede Abbildung zeigt ein für den entsprechenden Fütterungszeitpunkt repräsentatives Bild. Schwarze Pfeile markieren fibrotische Veränderungen, typisches *Ballooning* ist mittels gestrichelter Pfeile markiert, steatosisbedingte Veränderungen mittels blauer Pfeile. Der Maßstab entspricht 200µm, die Vergrößerung 10x. In Abb. N ist ein Bereich des Gewebes vergrößert dargestellt.

Steatosis

Mit Hilfe der Oil-Red-O Färbung, einer etablierten Methode des Lipidnachweises, konnte bereits früh eine Akkumulation dessen bei WD-gefütterten Tieren aufgezeigt werden.

So fallen erste, deutliche Rotfärbungen bereits nach zwei Wochen der Fütterung mit einer WD auf (Abb. 11D). Diese imponieren kleinkalibrig und insgesamt recht gleichmäßig. Im Zuge des Voranschreitens der Verfettung kommt es, neben einer Intensivierung der Rotfärbung und einer sichtbaren Veränderung des Lipidtröpfchendurchmessers, zu einem zunehmenden Umbau bzw. einer zunehmenden Zerstörung des Gewebes, was in Abb. 11D-F gut sichtbar ist.

Bis zu einem Zeitpunkt resp. einer Fütterungsdauer von einschließlich 16W kann ein regelrechter Strukturerehalt und eine umschriebene Zonierung in der Fettverteilung im Bereich von Portalvene (PV)/Zentralvene (CV von englisch central vein) u.a. an den inkongruenten Durchmessern der rot gefärbten Lipidtröpfchen beobachtet werden (Abb. 11E).

Danach tritt an deren Stelle eine zunehmende Irregularität hinsichtlich Lokalisation und Verteilung sowie eine wachsende Heterogenität der Größe der Lipidtröpfchen, was vergleichend auch in bspw. der Picrosirius-Red Färbung auffällt (Abb. 11F, Abb. 10N-R). Eine Gliederung in Leberläppchen ist nicht mehr klar erkennbar, die Fettverteilung folgt keinem erkennbaren Muster (mehr). Die Gefäßverteilung macht einen willkürlichen Eindruck, bei teils a.e. als Artefakt einzustufenden leeren Vakuolen (Abb. 11F).

Im Vergleich hierzu kommt es bei SD-gefütterten Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den Kontrolltieren zum Beginn der Fütterungsreihe zu keinen fassbaren Veränderungen (Abb. 11A-C, Abb. 13A).

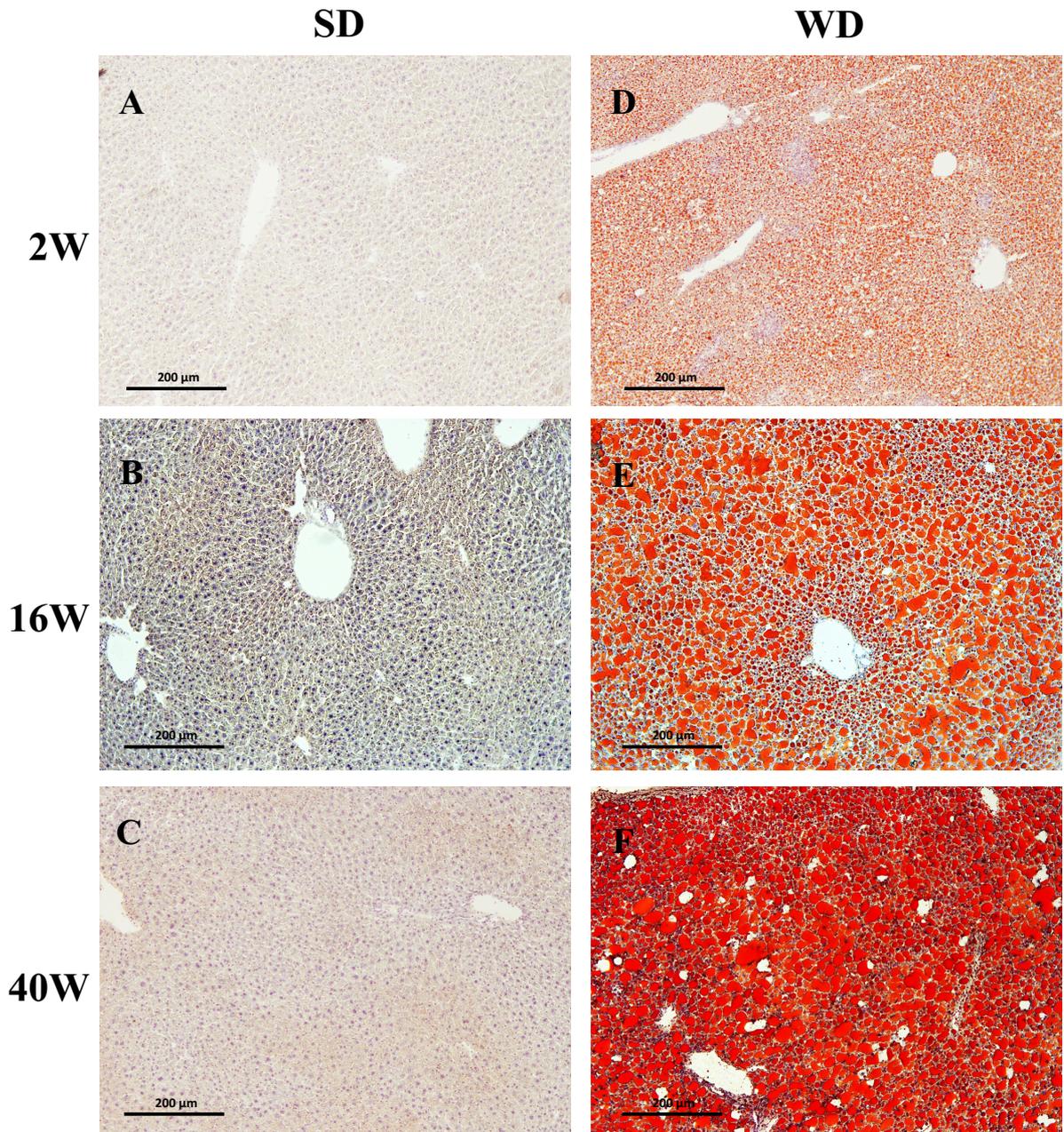


Abb. 11 Darstellung der Lipideinlagerung im Lebergewebe mittels Oil-Red-O Färbung im Verlauf der Entwicklung einer NASH im Vergleich zu Kontrolltieren. **A-C** Lipideinlagerungen nach SD. **D-F** Lipideinlagerungen nach WD. Jede Abbildung zeigt ein für den entsprechenden Fütterungszeitpunkt repräsentatives Bild. Der Maßstab entspricht 200 μ m, die Vergrößerung 10x

Durch Quantifizierung der „Rotfläche“ mittels Fiji/ImageJ, wie unter 2.2.6 beschrieben und Errechnen des prozentualen Anteils derselben an der Gesamtfläche, kann eine ungefähre Quantifizierung des Ausmaßes der Verfettung erfolgen. In Abb. 12B erkennt man, dass es unter einer Western Diät bereits innerhalb von 2W zu einer Färbung von ca. 20 % des Gewebes kommt, ein Wert, der sich innerhalb von weiteren 6 Wochen nahezu verdoppelt (vgl. 8W Abb. 12B). Danach verliert der Zuwachs zunächst an Geschwindigkeit (vgl. Wochen 12 und 20). Zum Zeitpunkt von 40W Fütterung einer WD sind ø 54 % der Flächen in der Oil-Red-O Färbung positiv.

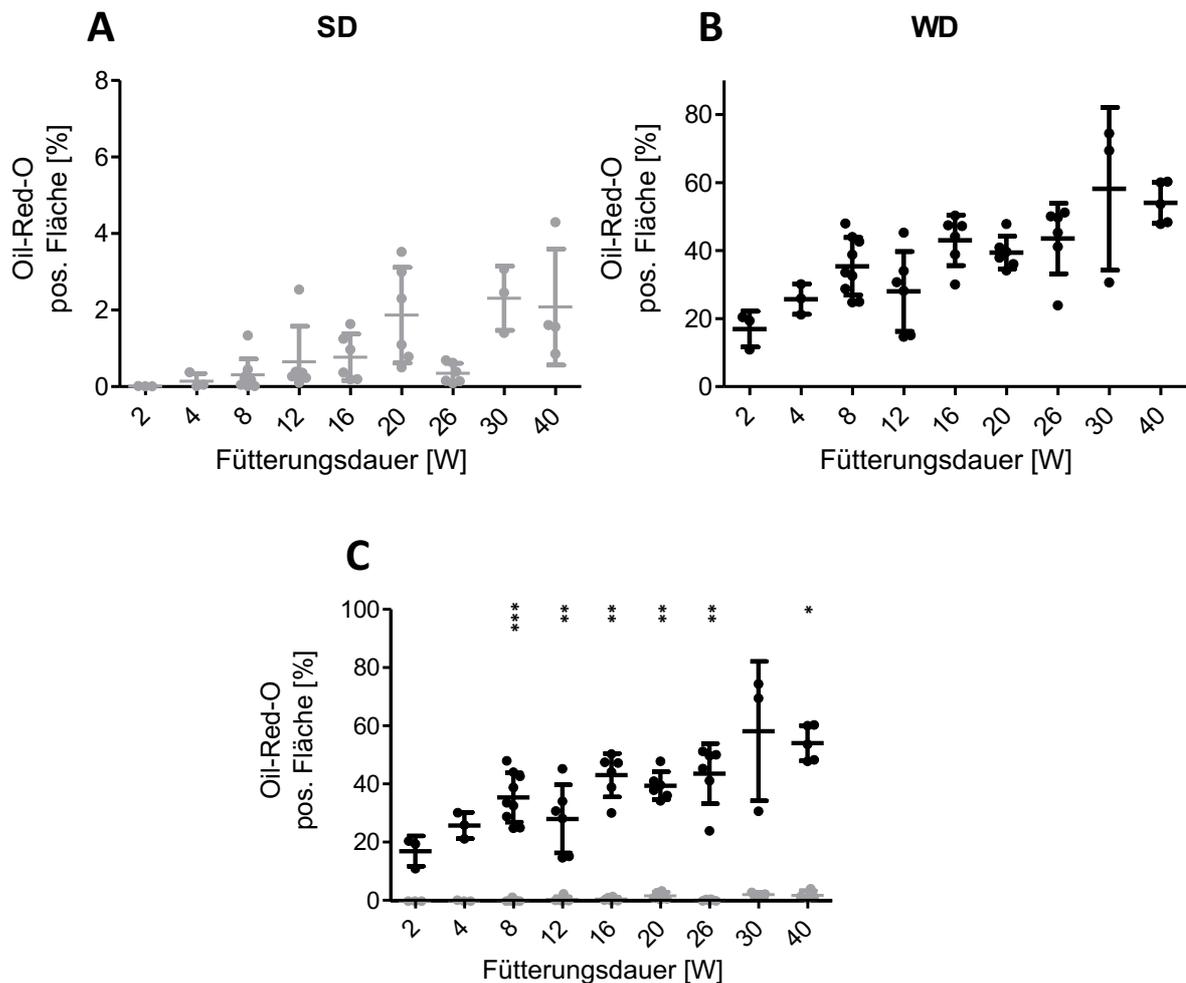


Abb. 12 Signifikante Zunahme des Oil-Red-O pos. gefärbten Flächenanteils nach Western Diät im Vergleich zur Standarddiät. A Oil-Red-O pos. gefärbte Fläche in Prozent nach SD-Fütterung (grau) und **B** Oil-Red-O pos. gefärbte Fläche in Prozent WD-Fütterung (schwarz). **C** Vergleichende Darstellung der Entwicklung des Oil-Red-O pos. gefärbten Anteils nach SD- und WD-Fütterung über einen Zeitraum von bis zu 40 Wochen. Analysiert wurden mindestens 6 lichtmikroskopische Aufnahmen Oil-Red-O gefärbter Kryoschnitte je Tier und 3-9 Tiere je Fütterungsgruppe. Die Quantifizierung erfolgte mittels Fiji/ImageJ, wie unter 2.2.6 angegeben. Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede mit * für $p \leq 0.05$, ** für

$p \leq 0.01$ und *** für $p \leq 0.001$. Die Mittelwerte der Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

Bei den mit Standardfutter gefütterten Tiere ergeben sich, sowohl im direkten optischen Eindruck der Oil-Red-O Färbereihe als auch in der Quantifizierung der Rotfläche keine signifikanten Veränderungen. Zwar kommt es (Abb. 12A) tendenziell zu einem minimalen Anstieg im zeitlichen Verlauf, welcher jedoch nie ein Signifikanzniveau erreicht und am ehesten altersbedingten Lipideinlagerung entspricht.

Auch die Picrosirius-Red gefärbten Zeitreihen wurden hinsichtlich der Entwicklung der Steatosis untersucht und entsprechend des NAS klassifiziert, auch wenn es sich bei dieser Färbetechnik anders als bei der Oil-Red-O Methodik um keine Standardlipidfärbung handelt. Dabei kamen die Kriterien des NAS unverändert zum Tragen:

Steatose

- | | |
|---|-------------------------|
| 0 | <i>Fehlt oder</i> < 5 % |
| 1 | > 5 % - 33 % |
| 2 | > 33 %-66 &% |
| 3 | > 66 % |

Bei Abgleich der Ergebnisse mit der Steatosisentwicklung anhand des Oil-Red-O gefärbten Bildmaterials fällt auf, dass die durch den NAS klassifizierte Entwicklung zwar insgesamt den gleichen Trend beschreibt, jedoch zeitlich hinter der Oil-Red-O Färbung zurückbleibt. So sind zum Zeitpunkt von 2W bei WD-gefütterten Tieren noch keine eindeutigen Lipideinlagerungen festzustellen, weshalb die auf der Picrosirius-Red Färbung basierende *Heat-Map* bspw. zum Zeitpunkt von 2W Fütterungsdauer etwas von den Befunden der Oil-Red-O Färbungen abweicht. Dennoch lässt sich auch hier langfristig ein klarer Trend (Abb. 13B) erkennen, so dass nach 16W erstmalig das volle Ausmaß des erreichbaren Score-Wertes erreicht wird, und auch bei diesem Teil-Score alle Versuchstiere nach 40 Wochen Fütterung mit einer WD die höchst-möglichen Score-Werte erreicht haben.

A

3									
2									
1									
0									
Steatosis STANDARD-DIET	2	4	8	12	16	20	26	30	40
	Fütterungsdauer [W]								

B

3									
2									
1									
0									
Steatosis WESTERN-DIET	2	4	8	12	16	20	26	30	40
	Fütterungsdauer [W]								

0%	16,67%	33,33%	50%	66,67%	100%
Legende <i>Heat-Map</i>					

Abb. 13 Durch hochkalorische Diät induzierte Entwicklung von Steatosis im Vergleich zu kontroll-gefütterten Tieren klassifiziert entsprechend NAS basierend auf Picrosirius-Red basierten Färbereihen. **A** Steatosisentwicklung nach SD. **B** Steatosisentwicklung nach WD. Farbliche Darstellung der relativen Anzahl Tiere der jeweiligen Kohorte, die einen entsprechenden Steatosisgrad aufweist, kodiert entsprechend der *Heat-Map* Legende. Analysiert wurden 3-6 Tiere pro Zeitpunkt und Diät, basierend auf *whole-slide* Scans Picrosirius-Red gefärbter Paraffinschnitte.

3.1.3 LABORPARAMETER

Die Fütterung mit einer hochkalorischen Diät geht, neben den die äußere (resp. „innere“) Erscheinung (Abb. 4E-H) betreffenden Veränderungen, auch mit einer Veränderung der „Leberwerte“ sowie der Syntheseparameter einher.

Ein Anstieg der Aspartat-Aminotransferase, kurz AST oder auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und insbesondere ein Anstieg der Alanin-Aminotransferase (ALT) oder auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) ist ein auch in der klinischen Diagnostik etablierter Marker für eine Leberschädigung.

Die ALT kommt führend in Hepatozyten vor, sodass, im Gegensatz zu der neben der Leber auch in Herz- und Skelettmuskulatur, Nieren, Gehirn und Bauchspeicheldrüse vorkommenden AST, von einem nahezu leberspezifischen Parameter gesprochen werden kann.

Dabei ist die AST v.a. in Mitochondrien lokalisiert, wodurch es die Bildung eines Quotienten aus beiden Enzymen (AST/ALT), auch De-Ritis-Quotient (DRQ) genannt, erlaubt, eine Aussage über das Ausmaß resp. den Schweregrad der Leberschädigung zu treffen. Dabei spricht ein Quotient < 1 i.d.R. für eine milde(re), ein Quotient > 1 i.d.R. für eine schwerwiegende(re) Form der Schädigung. Bedacht werden muss jedoch dabei die Akuität, d.h. die zeitliche Dimension der Progression der Erkrankung.

Bei beiden Enzymen kommt es nach etwa 4W zu einem temporären Anstieg, welcher jedoch erst nach 8W (ALT, Abb. 14I) bzw. 12W (AST, Abb. 14H) kontinuierlich zunimmt und nach 40W das Zehnfache des Ausgangswertes (AST: ~ 26 U/L zu > 280 U/L; ALT: ~ 39 U/L zu < 390 U/L) erreicht hat. Interessanterweise ist dabei, mit Ausnahme des 2W-Zeitpunktes, der de Ritis Quotient durchgängig < 1 .

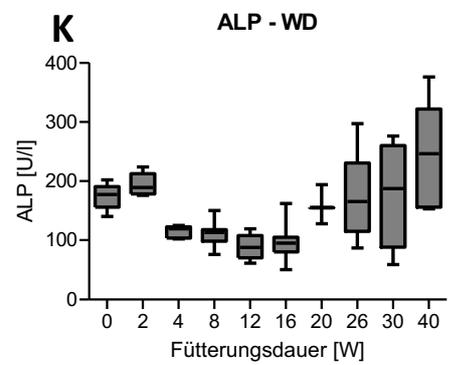
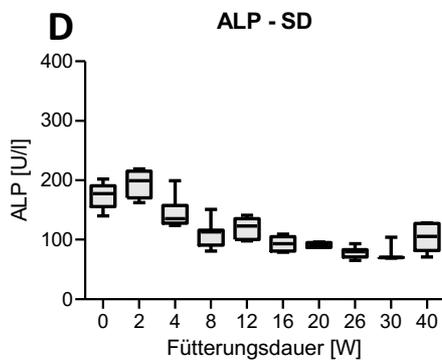
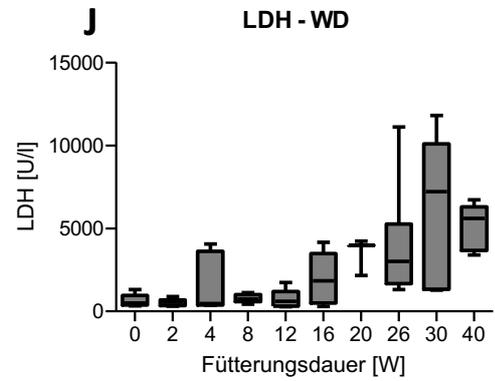
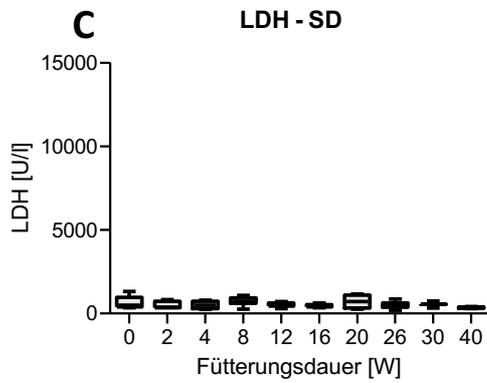
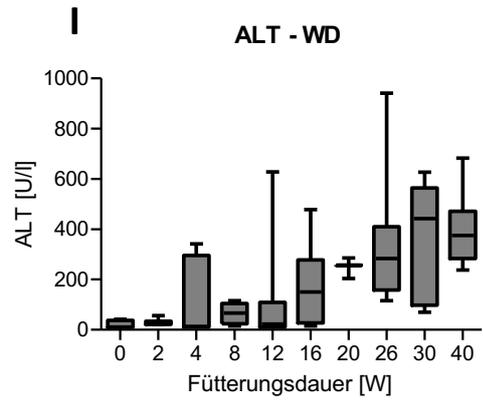
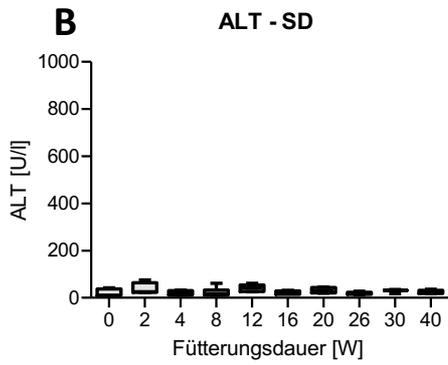
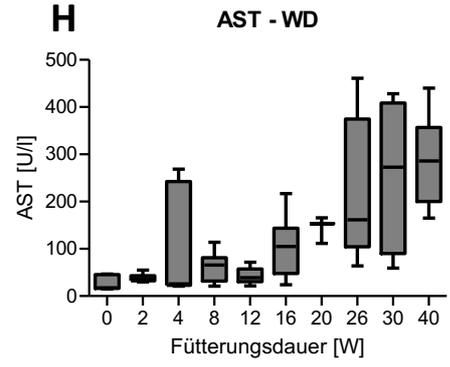
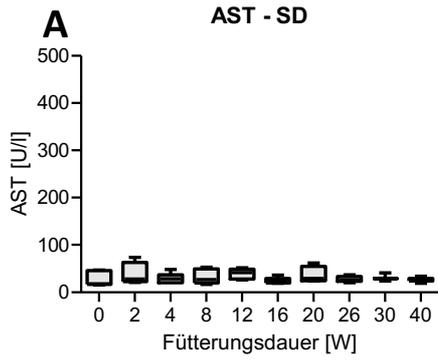
Erwartungsgemäß kommt es bei den Kontrolltieren (Abb. 14A und B) zu keiner relevanten Veränderung der Transaminasen.

Als in fast allen Zellen vorkommendes Enzym ist die LDH ein unspezifischer Marker für Zellschaden bzw. -untergang. Entsprechend kommt es auch bei dieser ab 12 Wochen zu einer kontinuierlichen Zunahme (Abb. 14J) mit einem Anstieg auf ein Maximum von über 6000 U/l, was einer Steigerung auf annähernd das 10-fache des Ausgangswertes entspricht. Ein Anstieg der alkalischen Phosphatase (AP oder auch ALP) lässt sich unter hochkalorischer Diät erst mit etwas Verzögerung beobachten. Dieser setzt zur 16ten Fütterungswoche ein und steigt im Vergleich zur SD dann zunehmend an. Diese Veränderung dürfte ebenfalls Ausdruck der

Leberschädigung im Sinne einer cholestatischen Komponente sein, wobei es insgesamt auch unter WD zu keiner Sekretionsstörung mit Anstieg des Bilirubins kommt (Abb. 14N).

Der Anstieg des Albumins und vor allem des Gesamtproteins im Verlauf der Fütterung unter hyperkalorischer Diät dürfte zunächst Ausdruck der Hyperalimentation sein (beim Menschen ca. 55 %) (Abb. 14L & 14M) und belegt, dass das Ausmaß der Leberschädigung im zeitlichen Verlauf nie ein Ausmaß erreicht, das mit einem Verlust der Syntheseleistung einhergeht.

Das sich aus Serumparametern präsentierende Gesamtbild des Zustands der Leber weist auf eine chronische, moderate, aber zunehmende Organschädigung bei noch erhaltenen Synthesekapazitäten hin, wenngleich erneut darauf hingewiesen sei, dass die alleinige Erhöhung der Leberwerte keine Aussage über die Ätiologie der Leberschädigung zulässt.



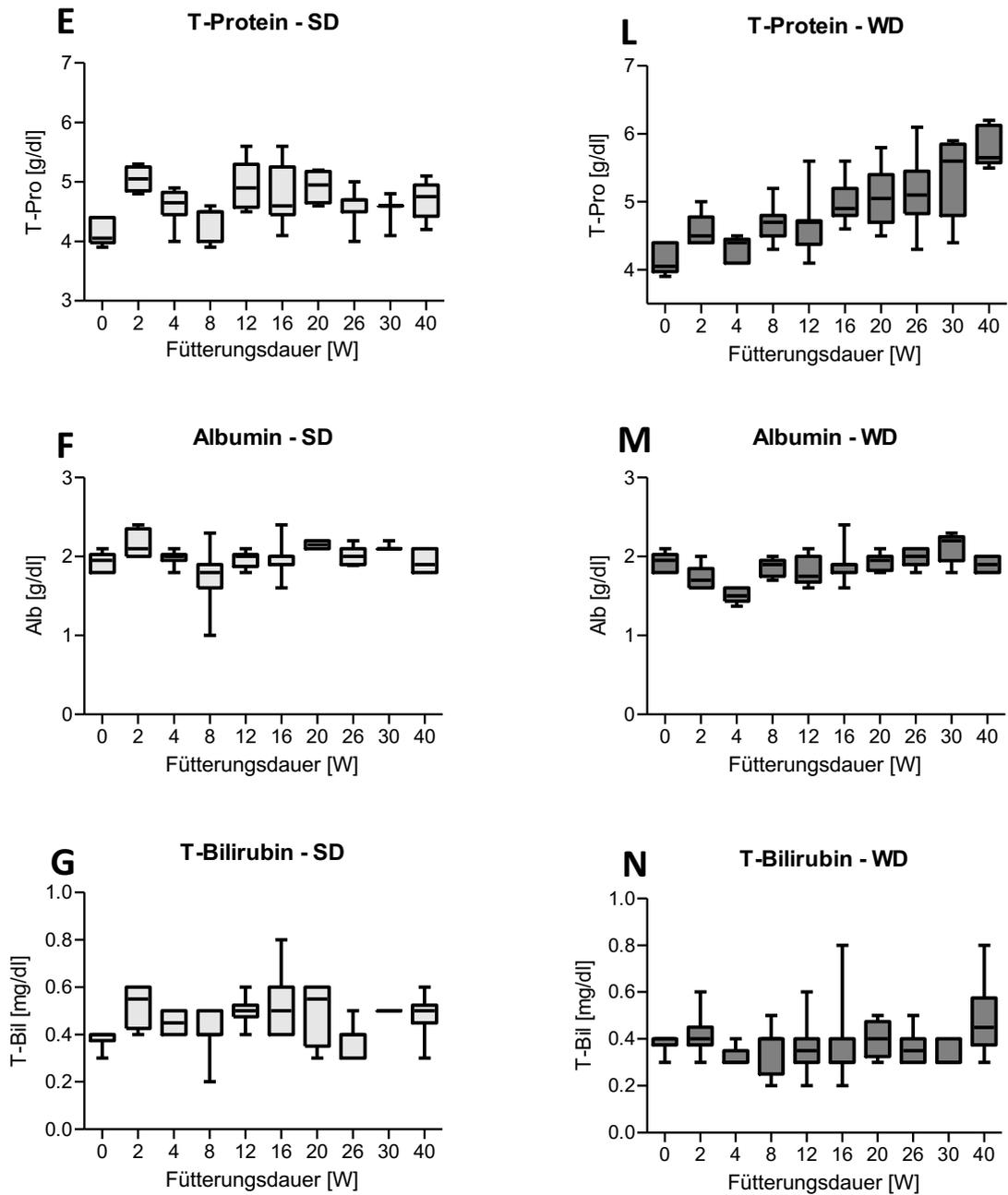


Abb. 14 Auswirkungen einer hochkalorischen Western Diät auf verschiedene Serumparameter im Vergleich zu Standard Diät gefütterten Tieren. A-G *Box-and-whiskers-Plots* verschiedener Laborparameter nach SD-Diät (weiß), H-N *Box-and-whiskers-Plots* verschiedener Laborparameter nach WD-Diät (grau). Analysiert wurden 3-12 Tiere pro Zeitpunkt und Diät. Die *whiskers* markieren das Minimum und Maximum, der Median ist durch den horizontalen Strich angegeben.

3.2 GLUTAMINSYNTHETASE-FÄRBUNG

Die Glutaminsynthetase, auch – da treffender – Glutamat-Ammonium-Ligase genannt, ist in der Leber ausschließlich um die Zentralvene herum lokalisiert und daher geeignet, um Veränderungen im Hinblick auf die Lokalisation genauer zu beschreiben. V.a. in frühen Stadien der Western Diät bzw. bei den Kontrolltieren ist dabei die Lokalisation beschränkt auf 1-3 Zellreihen der Hepatozyten, sog. *Scavenger*-Zellen, gut zu erkennen (Abb. 15 und 16A-D).

Zu späteren Zeitpunkten scheint die Färbungsintensität auch in den Kontrollen etwas abzunehmen, wobei für eine Quantifizierung alternative Techniken wie beispielsweise Immunoblots geeigneter sind.

Dabei stützt die Möglichkeit der besseren Lokalisierung von Veränderungen auf der Basis der GS-Färbung den bereits in der Oil-Red-O Färbung gewonnen Eindruck einer Zonierung der Fettakkumulation, die sich mit zunehmender Steatose weiter verändert.

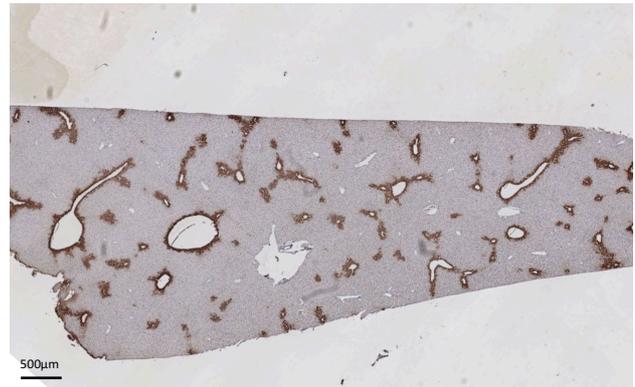


Abb. 15 whole-slide Scan einer GS-Färbung

Paraffinschnitt der Leber eines 8W WD-gefütterten Tieres in 1x Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 500µm.

Abb. 16 D-F ist deutlich erkennbar zu entnehmen, dass im Bereich der CV (GS-positiver Bereich) intrazelluläre Dichteveränderungen und *Ballooning* auftreten, wohingegen große Fettvakuolen verdrängenden Charakters zunächst eher im Bereich der PV angesiedelt sind. Diese „Zonierung“ der Veränderungen löst sich in den späteren Stadien weiter auf, während die GS weiterhin strikt auf (sofern beurteilbar) 1-3 Zellreihen rund um die CV begrenzt bleibt.

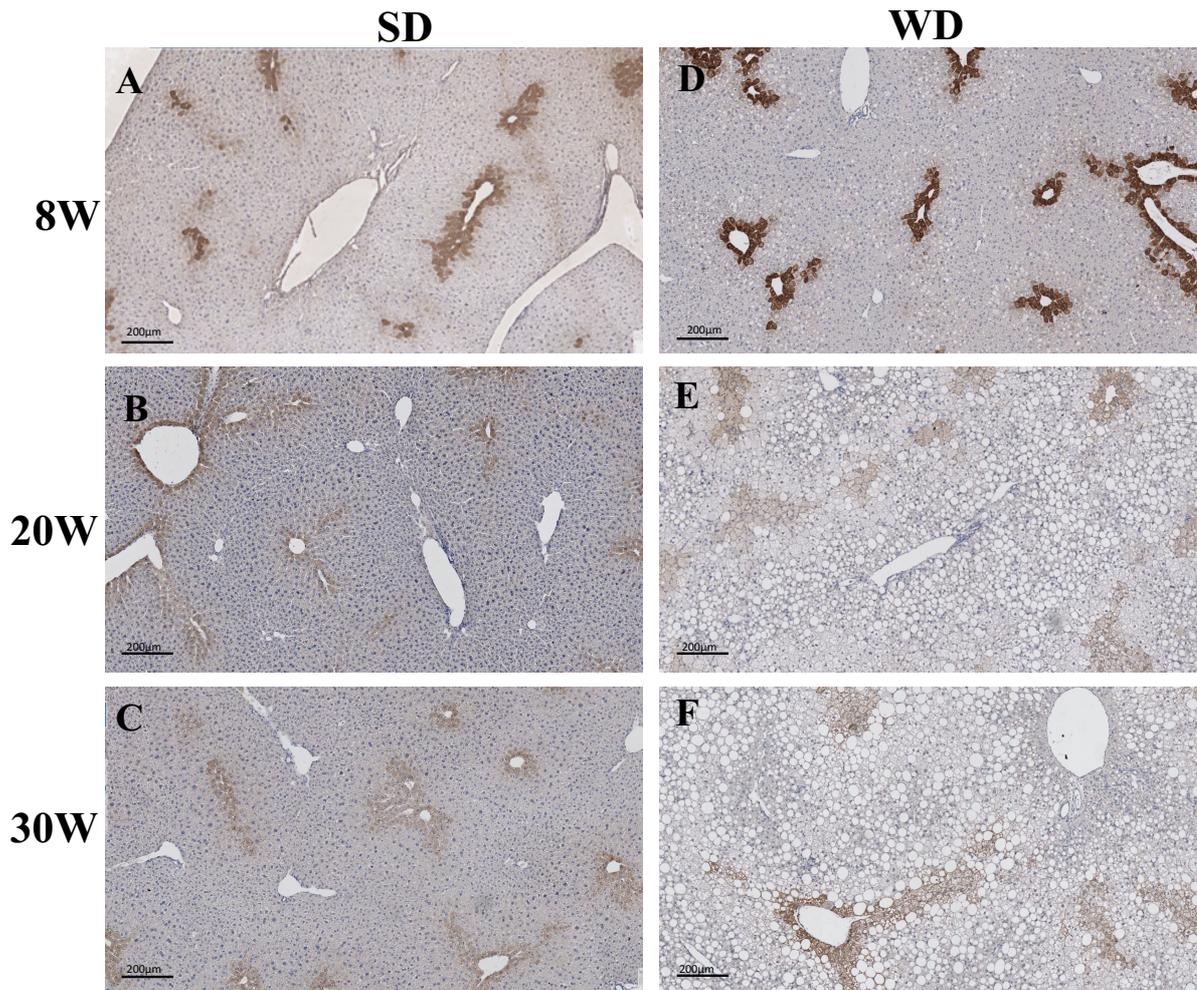


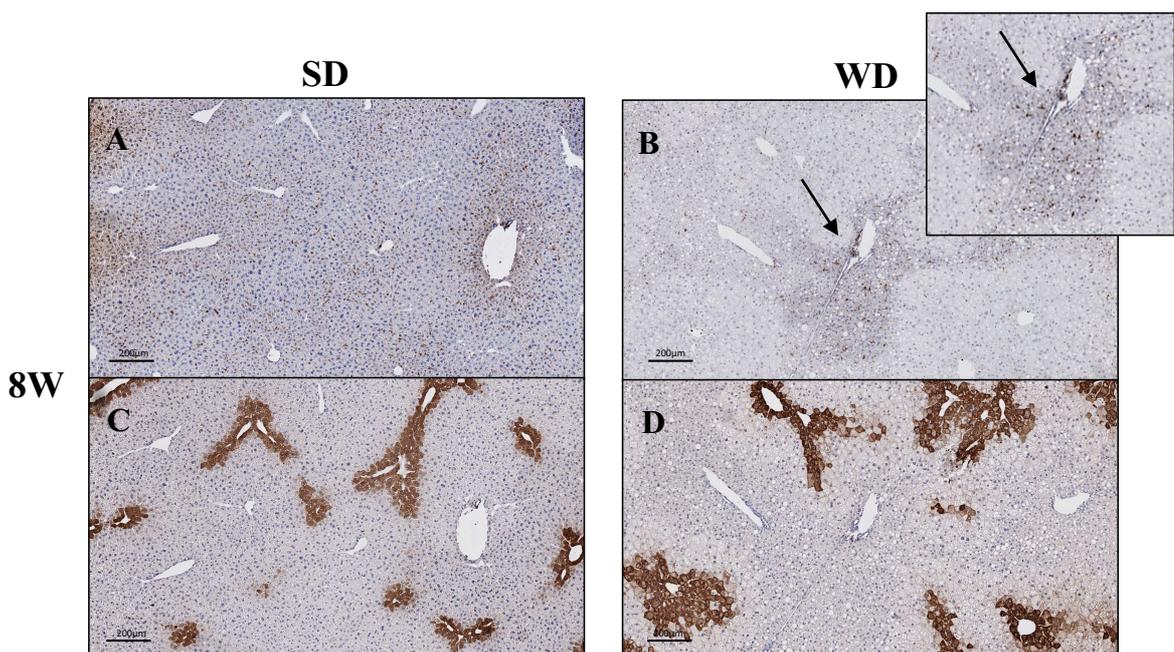
Abb. 16 Glutaminsynthetase-Färbung an Paraffinschnitten der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten der hochkalorischen Western Diät im Vergleich zur Standard Diät. **A-C** Glutaminsynthetase-Färbung nach SD. **D-F** Glutaminsynthetase-Färbung nach WD. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es sich um Ausschnitte aus *whole-slide* Scans. Jede Abbildung zeigt ein für den entsprechenden Zeitpunkt repräsentatives Bild. Der Maßstab beträgt 200µm, die Vergrößerung 5x.

3.3 MAKROPHAGEN

Ein weiteres wichtiges Anliegen dieser Arbeit ist es, die Veränderung der Makrophagenpopulationen bei der Entstehung und Progression der NAFLD zur NASH weitergehend zu charakterisieren. Dabei sollten anhand von zwei verschiedenen Färbungen resp. Färbetechniken quantitative und qualitative Veränderungen und insbesondere auch rekrutierte Monozyten/Makrophagen erfasst werden.

Mittels Mac2-Färbung konnte die Verteilung der Makrophagen im Lebergewebe während der Progression der NASH dargestellt werden. Die vorgesehene, computergestützte Zusammensetzung von zwei direkt aufeinanderfolgenden Schnitten mit Mac2- und GS-Färbung konnte leider bis zur schriftlichen Abfassung der Promotion noch nicht umgesetzt werden. Ziel dabei war die Erfassung von zonalen Veränderungen der Makrophagenpopulationen (CV oder PV). Dennoch beinhalten diese angefertigten *Slides* nennenswerte Informationen, welche anhand von exemplarisch manuell neben-/untereinander aufgeführten Bilddateien beider Färbungen an Leberschnitten gleicher Lokalisation besser dargelegt werden können. Neben der zuvor aufgeführten Beschreibung der GS-Bildreihen, ermöglicht die Abb. 17 dank Kombination mit der CV-spezifischen Zuordnung der GS, zusätzlich zu numerischen auch deskriptive Aussagen über die Lokalisation von Mac2 positiven Makrophagen.

Vor allem zu Beginn der Zeitreihe entsteht bei WD-gefütterten Tieren der Eindruck einer Zonierung der Makrophagen mit Akkumulation insbesondere im Bereich der Fettvakuolen, d.h. im Bereich der PV (Abb. 17B – Zoom Fenster, Abb. 17J).



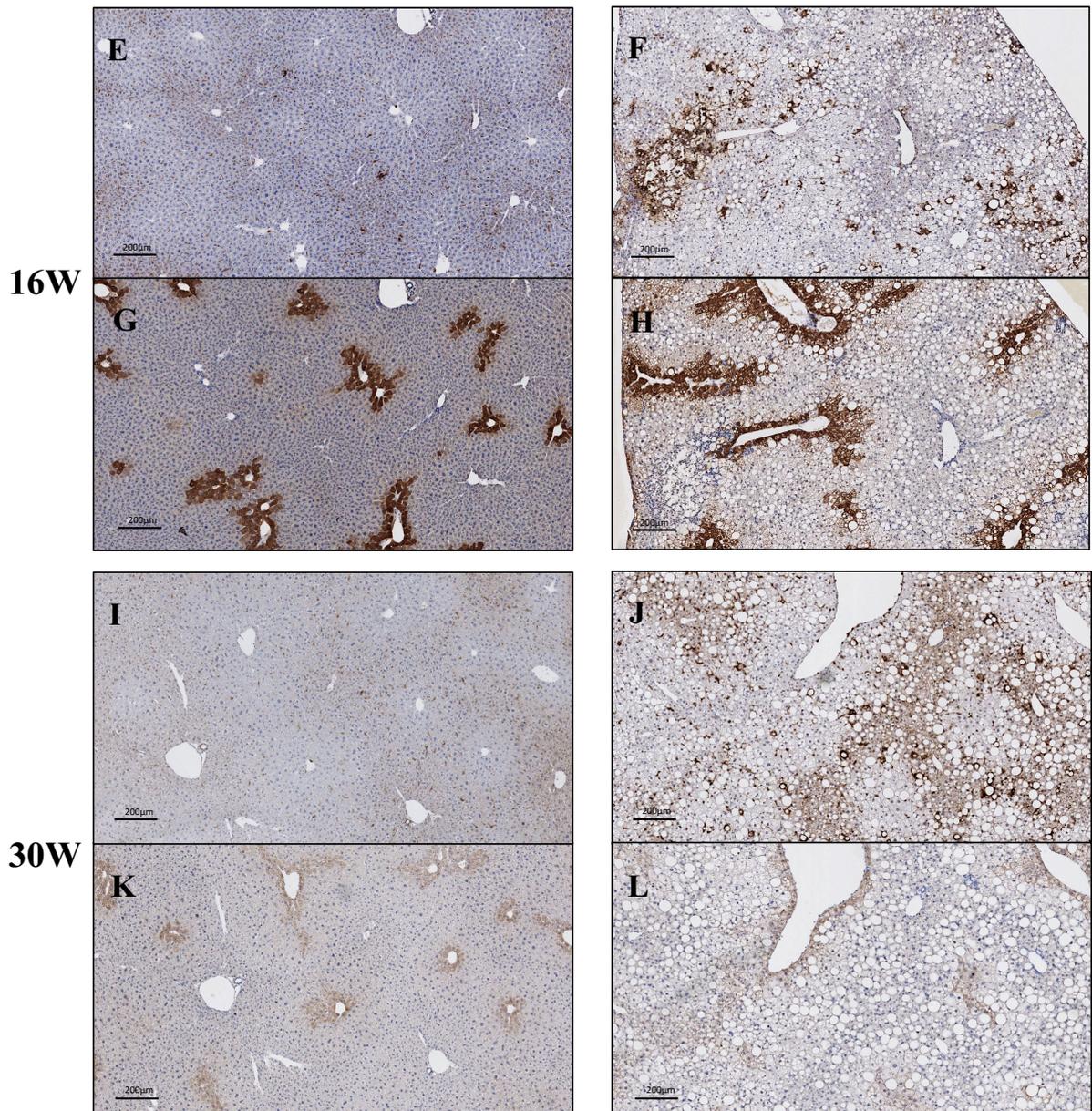


Abb. 17 Akkumulation von Mac2 positiven Makrophagen im Bereich von Fettvakuolen nach WD-Fütterung. A-B, E-F, I-J Mac2 positive Makrophagen und C-D, G-H, K-L Darstellung der CV mittels GS-Färbung im nachfolgenden Gewebeschnitt. Die zusammengehörenden Schnitte sind untereinander aufgeführt Die linke Spalte gibt dabei die SD-Fütterungsreihe wieder, die rechte die hochkalorische WD. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es sich um Ausschnitte aus *whole-slide* Scans. Der Maßstab entspricht 200µm, die Vergrößerung 5x.

Durch Auswertung der Mac2-Färbung hinsichtlich des Anteils positiv gefärbter Fläche konnte außerdem eine indirekte Aussage über relative quantitative Veränderungen der Makrophagen getroffen werden, welche in Kooperation mit der AG um Prof. Dr. rer. nat. Dooley (Mannheim) erfolgte. Der relative Mac2^{pos}-Flächenanteil WD-gefütterter Tiere ist dabei bereits nach 8 Wochen Fütterung gegenüber dem der SD-Tiere signifikant erhöht. Diese Differenz verhält sich bis zu einer Fütterungsdauer von einschließlich 26 Wochen relativ konstant, wenngleich eine kleine jedoch kontinuierliche Zunahme zu verzeichnen ist, danach kommt es zwischen Woche 26 und Woche 40 zu einem sprunghaften Anstieg der Mac2^{pos}-Fläche und damit der gesamten Makrophagen (Abb. 18).

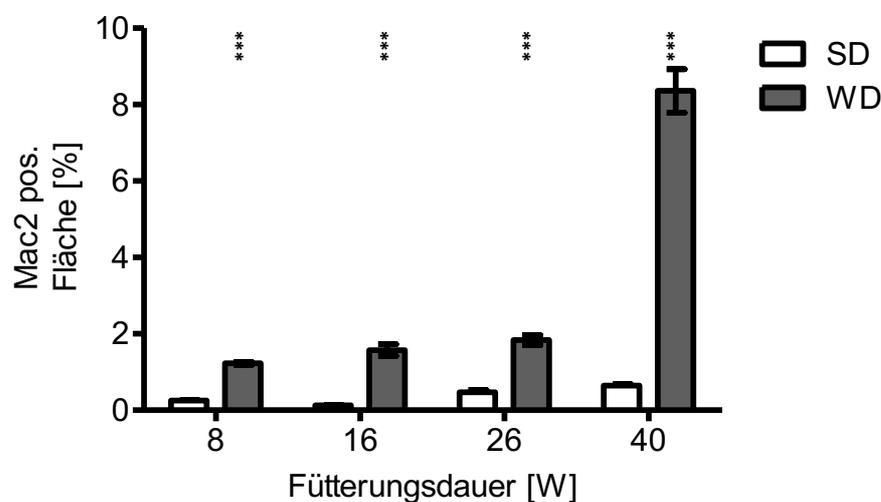


Abb. 18 Zunahme des Mac2 pos. gefärbten Flächenanteils nach Western Diät im Vergleich zur Standarddiät. Darstellung der Entwicklung des Mac2 positiv gefärbten Anteils nach SD-Diät (weiße Balken) und WD-Fütterung (graue Balken) über einen Zeitraum von bis zu 40 Wochen. Analysiert wurden 6 lichtmikroskopische Aufnahmen Mac2 gefärbter Paraffinschnitte je Tier und 6 Tiere je Zeitpunkt. Die Quantifizierung erfolgte in Kooperation mit Dr. Seddik Hammad aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Dooley (Mannheim). Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede mit *** für $p \leq 0.001$. Die Mittelwerte der Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

Im Zuge der Analyse der *whole-slide* Scans Mac2-gefärbten Paraffinschnitte fiel die Ausbildung von zirkulären Strukturen, die sich aus Makrophagen zusammensetzen, auf. In der Literatur werden diese als *crown-like structures*, kurz CLS beschrieben und konnten im vorliegenden Versuchsmodell nach bereits 8W Fütterungsdauer erstmalig beobachtet werden (Abb. 19). Diese sind im Bereich von Fettvakuolen angesiedelt und umschließen dabei als Formation mehrerer Makrophagen ringartig Hepatozyten.

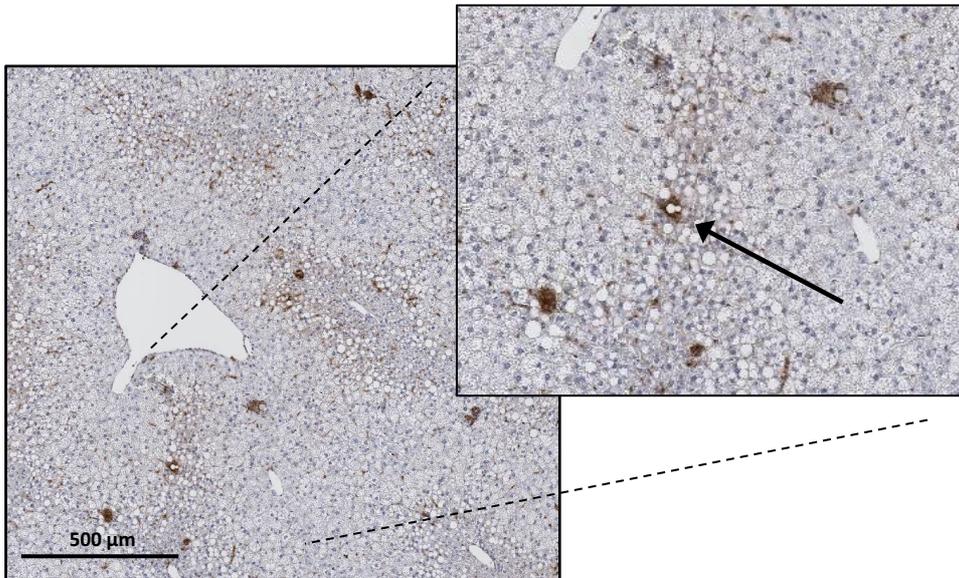
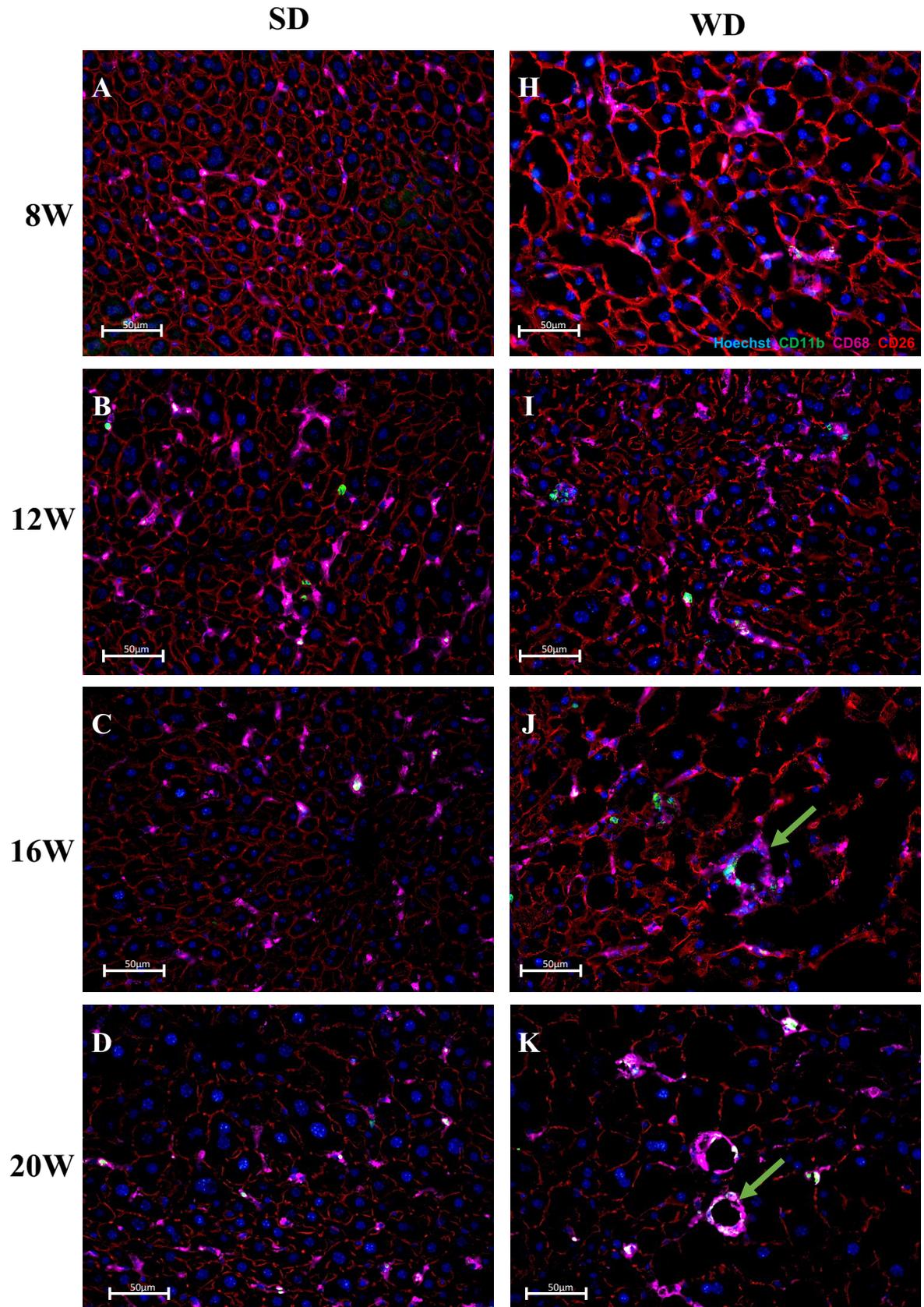


Abb. 19 Zirkuläre Akkumulation von Mac2 positiven Makrophagen - sog. CLS - im Bereich von Fettvakuolen nach 8 Wochen WD-Fütterung. Bei der gezeigten Aufnahme handelt es sich um einen Ausschnitt aus *whole-slide* Scans. Der Maßstab entspricht 500µm, die Vergrößerung 7x. Zusätzlich ist ein Bereich des Scans vergrößert in einem Zoom-Fenster dargestellt.

Für eine nähere Analyse der bereits in der Mac2-Färbung beobachteten CLS und die Unterscheidung von Makrophagen/Monozyten, die aus der Zirkulation rekrutiert wurden, erfolgte ferner eine Immunfluoreszenz-Färbereihe. Hier wurden CD26 als Marker der Hepatozytenmembran sowie Hoechst für das Anfärben der Zellkerne verwendet, um die Struktur zu visualisieren. Dabei entspricht CD26 der Dipeptidyl Peptidase, IV einem Glykoprotein, welches unter anderem von vielen Epithelzellen und entsprechend in der Leber vor allem von Hepatozyten exprimiert wird, aber auch von Lymphozytenpopulationen. Als Makrophagenmarker wurde ferner CD68 eingesetzt.

Als weiterer Marker wurden schließlich Antikörper gegen CD11b verwendet, welche einen Proteinkomplex aus Integrin α -M und Integrin β -2 erkennen, der an der Zelladhäsion und der Endozytose von Komplement-gebundenen Partikeln beteiligt ist. Dieses Zelladhäsionsmolekül wird prinzipiell von einer Vielzahl von Leukozyten wie unter anderem Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen gebildet. Dabei weisen vor allem Monozyten und aus der Zirkulation rekrutierte Makrophagen eine sehr hohe Oberflächenexpression dieser Moleküle auf, während zum Beispiel residente Makrophagen dies nur in sehr niedriger Konzentration exprimieren. Entsprechend wurden in den vorliegenden Untersuchungen Zellen, die CD68 und CD11b zusammen exprimierten, als rekrutierte Makrophagen (MdMs) gewertet.



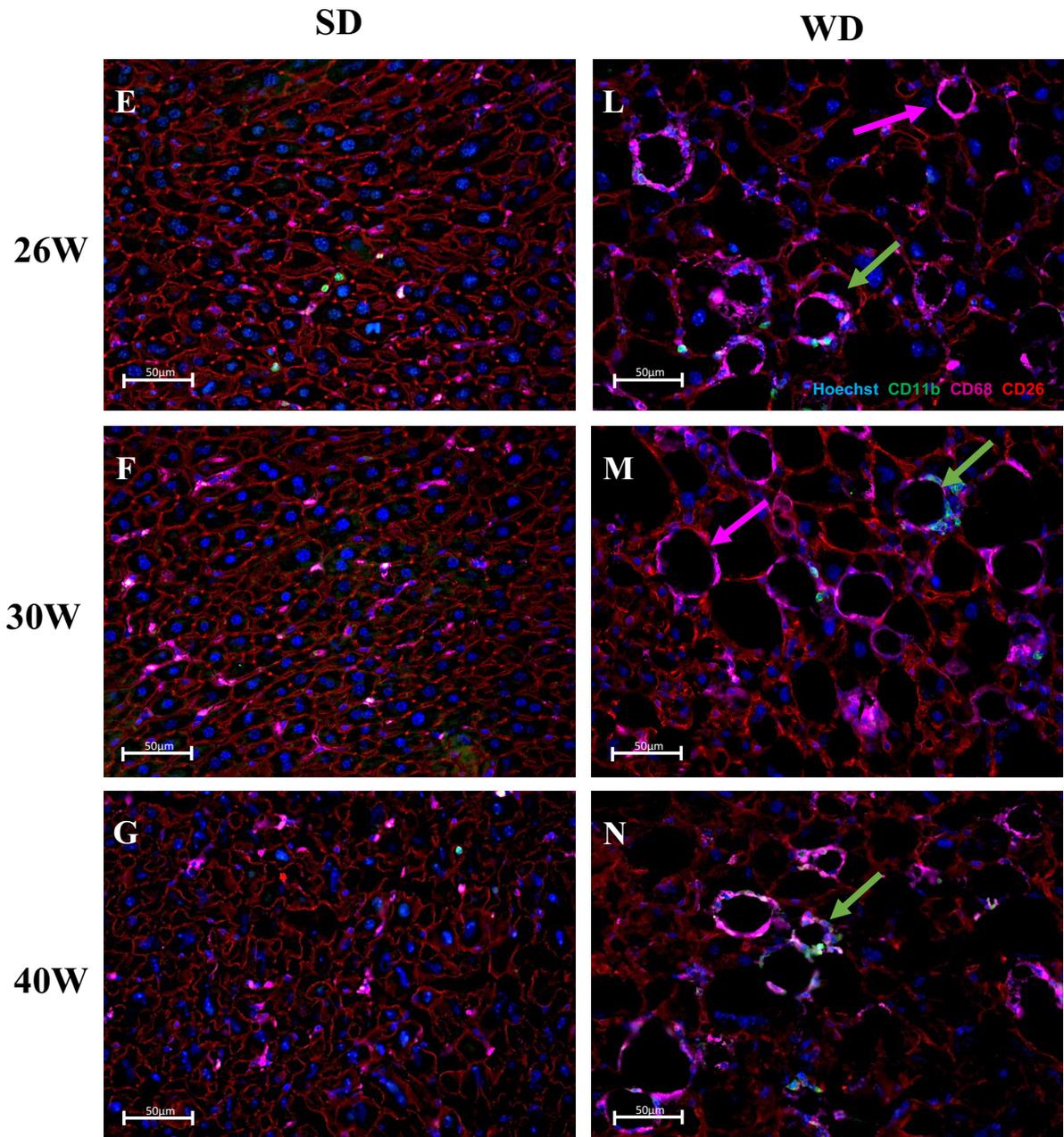


Abb. 20 Überwiegend CD11b positive Formationen von CLS in Immunfluoreszenz-Färbungen von Kryoschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten der hochkalorischen Western Diät. A-G IF-Färbung nach SD. H-N IF-Färbung nach WD. Die verwendeten AK (AK CD11b, CD68 und CD26 sowie Hoechst als Färbung der Zellkerne) und deren farbliche sekundäre Konjugationspartner sind unter **H** und **L** entsprechend hinterlegt. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es sich um *Cell-Observer* Aufnahmen. Der Maßstab beträgt 50µm, die Vergrößerung 25x. Rosa Pfeile markieren dabei CD11b negative CLS, grüne Pfeile CD11b positive CLS.

Bei Betrachtung der IF-Aufnahmen (Abb. 20 J-N) ist ersichtlich, dass die CLS vorwiegend im Bereich jener Hepatozyten auftreten, die durch besonders großvolumige Lipidtröpfchen charakterisiert sind, und dabei – wie aus der Namensgebung ersichtlich – die betreffenden Areale zirkulär einschließen, wenngleich diese Beurteilung im Verlauf durch die zunehmende Schädigung der Gewebsstruktur in Kombination mit der zunehmenden Anzahl an CLS hinsichtlich der Abgrenzbarkeit schwerfällt. Außerdem fällt bei genauer Betrachtung der Abbildungen auf, dass Zellkerne im Bereich der von CLS umgebenen Strukturen häufig fehlen.

In der quantitativen Analyse fällt auf, dass die Gruppe der CD68+/CD11b- Makrophagen sich im zeitlichen Verlauf kaum verändert (Abb. 21 A und B). Interessant ist, dass es bei den mit einer Standarddiät gefütterten Tieren in Woche 16 zu einer deutlichen und signifikanten Abnahme dieser Makrophagengruppe kommt. Diese, offensichtlich in diesem Zeitraum physiologische Abnahme CD68+/CD11b- Makrophagen lässt sich bei Tieren, die mit einer WD gefüttert wurden, nicht beobachten, wodurch sich die beobachteten signifikanten Differenzen zwischen SD und WD Tieren zur Woche 16 und 40 erklären.

Anders verhält es sich bei den CD68+/CD11b+ Zellen (Abb. 21 C und D). Auch hier kommt es in den ersten Wochen zwar in beiden Kohorten zu einem signifikanten Zuwachs der Populationen. Während diese Population sich unter SD dann jedoch im Verlauf, von leichten Schwankungen abgesehen, ab Woche 12 auf einem Plateau „einpendelt“, kommt es in den Tieren, die mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden, mehr oder weniger zu einer kontinuierlichen Zunahme bereits fluoroskopisch deutlich CD11b+ Zellen, so dass diese zu Woche 40 in Tieren mit einer WD signifikant höher waren, als zum vorangegangenen Zeitpunkt und auch als in entsprechenden, mit einer SD-gefütterten Kontrolltieren.

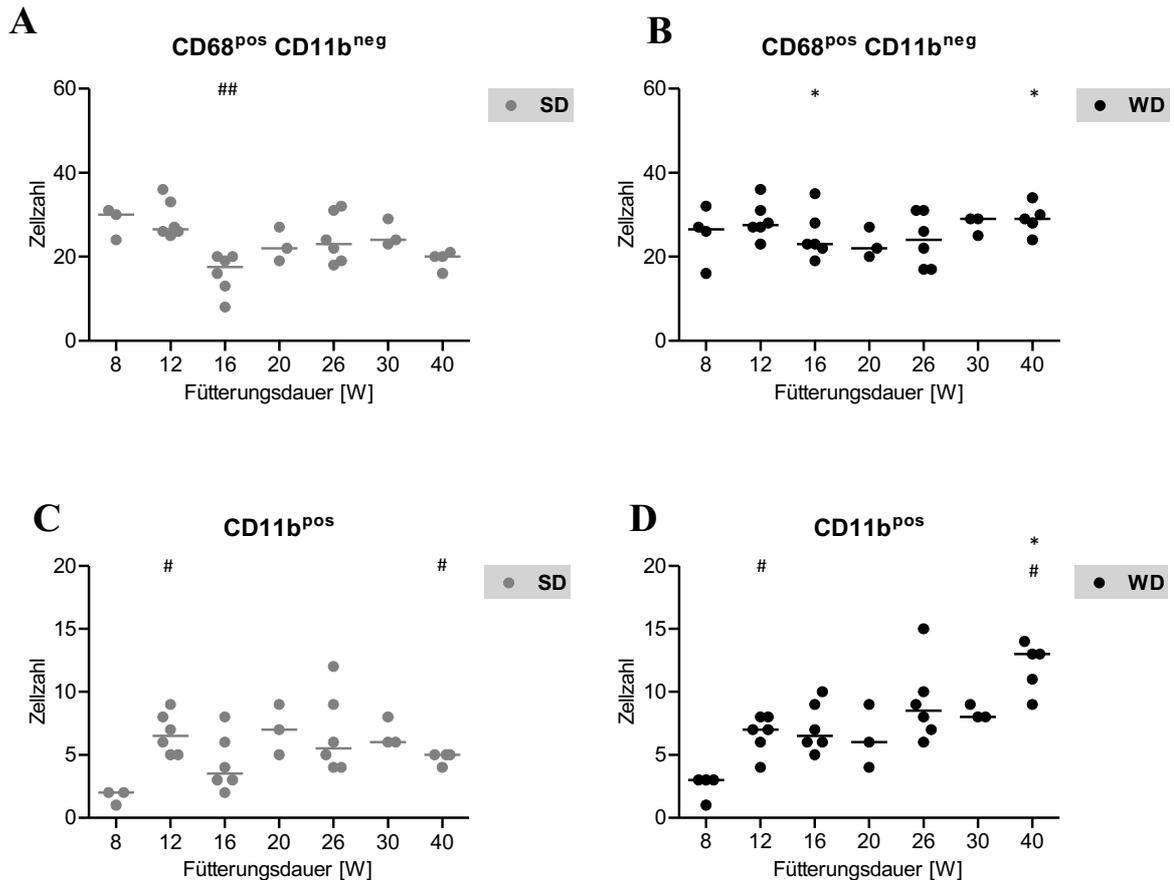


Abb. 21 Zunahme von CD11b positiver Zellen im Verlauf der hochkalorischen WD-Fütterung

A durchschn. Anzahl KC nach SD je Aufnahme und Tier (grau) **B** durchschn. Anzahl KC nach WD je Aufnahme und Tier (schwarz) **C** durchschn. Anzahl CD11b positiver Zellen nach SD je Aufnahme und Tier (grau) und **D** durchschn. Anzahl CD11b positiver Zellen nach WD Aufnahme und Tier (schwarz). Ausgewertet wurden die wie unter 2.2.4 und 2.2.5 beschriebenen angefertigten Immunfluoreszenz-Färbungen/-Aufnahmen. Dabei wurden je Tiere und min. 6 Aufnahmen analysiert und der Mittelwert gebildet. Anders als in vorangegangenen Abbildungen kann bei CD11b⁺-Zellen nicht von CD68⁺/CD11b⁺-Zellen gesprochen werden, da in der dieser Auswertung CD11b⁺/CD68⁻- Zellen nicht ausgeschlossen wurden. Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen SD und WD mit * für $p \leq 0.05$, Rauten markieren signifikante Unterschiede innerhalb der Kohorte zum vorangegangenen Zeitpunkt mit # für $p \leq 0.05$ und ## für $p \leq 0,01$.

Anzumerken ist, dass insbesondere in den mit einer hochkalorischen WD gefütterten Tieren eine exakte Aussage zu den numerischen Veränderungen der CD68- und/oder CD11b positiven Zellpopulationen auf der Basis von IF-Mikroskopie v.a. zu späteren Zeitpunkten der Fütterungsreihe nur sehr eingeschränkt möglich ist. Letzteres ist insbesondere durch das Zusammenschließen von Makrophagen zu zirkulären Makrophagenstrukturen (CLS), welches

im Verlauf der Progression der Lebererkrankung bei diesen Tieren zunehmend zu beobachten ist, kaum möglich, da hier eine genaue Festlegung der Zahl der an einer solchen CLS beteiligten MΦ nicht möglich ist. Da das Auftreten solcher CLS jedoch nur im Lebergewebe von Tieren zu beobachten ist, die mit einer WD gefüttert wurden, kann in diesen Tieren eine Aussage über die Anzahl der gebildeten CLS und die Veränderung derselben erfolgen.

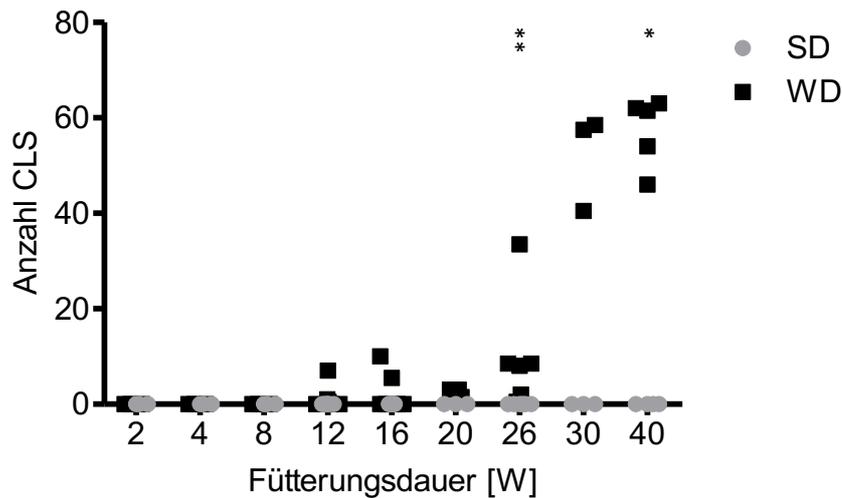


Abb. 22 Signifikante Zunahme der CLS-Gesamtanzahl nach WD-Fütterung

Entwicklung der Anzahl der CLS im Verlauf der Fütterungsdauer nach WD (schwarze Quadrate) bzw. SD (graue Kreise). Je Tier wurden die dazugehörigen 10 Aufnahmen in einer zufälligen Reihenfolge zweimal gezählt und der Mittelwert aus beiden Zählungen gebildet. Die „Gesamtanzahl“ bezieht sich dabei auf die Summe CD11b positiver und CD11b negativer CLS. Signifikanztests erfolgten mittels Mann-Whitney U Test, Sternchen markieren signifikante Unterschiede mit * für $p \leq 0,05$ und ** für $p \leq 0,01$.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, kommt es unter Fütterung mit einer hochkalorischen Diät (WD) spätestens ab Woche 26 zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl an CLS bei WD-gefütterten Tieren, wobei in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen erste CLS, anders als bei den *whole-slide* Scans der Mac2 Färbungen, erst nach 12W abzugrenzen sind. Wie oben bereits erwähnt, lassen sich im Lebergewebe von mit einer SD gefütterten Tieren keine Ausbildung vergleichbarer Strukturen beobachten.

Bei Betrachtung der zugrunde liegenden Immunfluoreszenz-Färbungen lässt sich erkennen, dass der bei weitem überwiegende Teil der CLS durch eine (Mit-)Beteiligung von CD11b positiven – also rekrutierten – Makrophagen charakterisiert ist (Abb. 20). Diese Beobachtung

legt nahe, dass CLS zumindest zum Teil rekrutierte Monozyten/Makrophagen beinhalten. Insbesondere zu Woche 30 und Woche 40 nimmt dabei vor allem der Anteil an CLS, an denen CD68⁺/CD11b⁺ Zellen beteiligt sind, zu, während die Zahl an CLS, die sich ausschließlich aus CD68⁺/CD11b⁻ Zellen zusammensetzen, im Verlauf nicht weiter zunimmt, sondern sogar wieder abnimmt (Abb. 23).

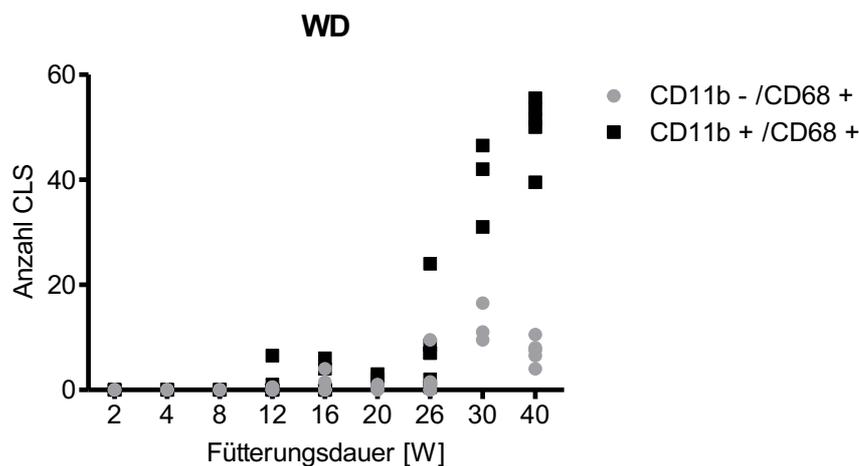


Abb. 23 Zunahme von CLS welche CD11b positive Makrophagen erhalten im Verlauf der WD Fütterungsreihe Anzahl CD11b negativer (graue Punkte) und CD11b positiver (schwarze Quadrate) CLS nach WD. Die Auswertung basiert auf IF-Aufnahmen. Dabei wurden je Zeitpunkt 6-12 Tiere und je Tier 10 Aufnahmen analysiert. Jedes Tier (und die dazugehörigen 10 Aufnahmen) wurde in einer zufälligen Reihenfolge zweimal gezählt und der Mittelwert aus beiden Zählungen gebildet. Dabei genügt ein positives CD11b Signal, um die entsprechende CLS in Gänze als CD11b⁺/CD68⁺ zu klassifizieren, d.h. CD11b⁻/CD68⁺ CLS enthalten ausschließlich CD68⁺ Makrophagen.

Bei Gegenüberstellung der CLS mit der Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 24) lässt sich ableiten, dass es zwar einzelne Tiere gibt, die trotz hohen Gewichts nur eine geringe Anzahl ^{+/+}CLS aufweisen, in Summe jedoch die Kumulierung von Makrophagen in einer solchen Art und Weise stark mit dem KG und dieses wie unter Abb. 5C gezeigt stark mit der WD korreliert (vgl. Abb. 24 und Abb. 25).

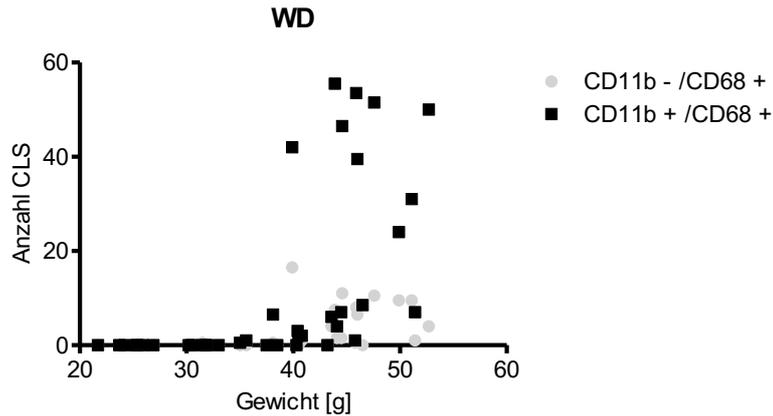


Abb. 24 Zunahme von CLS welche CD11b positive Makrophagen erhalten in Abhängigkeit vom Körpergewicht nach Western-Diät. Anzahl CD11b negativer (graue Punkte) und CD11b positiver (schwarze Quadrate) CLS nach WD. Die Auswertung basiert auf IF-Aufnahmen. Dabei wurden je Zeitpunkt 6-12 Tiere und je Tier 10 Aufnahmen analysiert. Jedes Tier (und die dazugehörigen 10 Aufnahmen) wurde in einer zufälligen Reihenfolge zweimal gezählt und der Mittelwert aus beiden Zählungen gebildet. Dabei genügt ein positives CD11b Signal, um die entsprechende CLS in Gänze als CD11b⁺/CD68⁺ zu klassifizieren, d.h. CD11b⁻/CD68⁺ CLS enthalten ausschließlich CD68⁺ Makrophagen.

3.4 KORRELATIONEN

Wie bereits eingangs mehrfach beschrieben, handelt es sich bei der NAFLD um einen Terminus, unter dem verschieden(st)e Ausprägungen eines breiten Krankheitsspektrums subsumiert sind, die durch das gemeinsame Merkmal einer übermäßigen Akkumulation von Fett in den Leberzellen gekennzeichnet sind.

Demnach ist es unter anderem der Tatsache, dass es sich bei diesen verschiedenen Ausprägungen womöglich um Stadien einer nicht linear verlaufenden Aneinanderreihung von Erkrankungsspektren mit gemeinsamem Ausgangspunkt handelt, geschuldet, dass für die Diagnose mehr erforderlich ist als ein einfacher Bluttest oder eine Ultraschallaufnahme ergo, dass die Antwort auf die Frage nach dem Vorliegen einer NAFLD kein binäres Antwortschema ermöglicht. Daher sind auch die Ergebnisse der vorgenommenen Einzelmethodiken nicht exklusiv, sondern stets gesamtheitlich zu betrachten.

So entwickelt sich das Körpergewicht der WD-Tiere innerhalb der ersten 8W der WD-Fütterung von ursprünglich \varnothing 23,56 g auf \varnothing 34,07 g und liegt damit bereits \varnothing 6,7 g bzw. 1,24-fach über dem der SD-Tiere (zum Vergleich: nach 40W beträgt das KG der WD-Tiere das 1,31-fache der SD-Tiere), die Oil-Red-O Färbungen zeugen von eindeutiger Verfettung des Lebergewebes, sowohl in Hinblick auf die optische Präsentation, als auch die ImageJ-basierte quantitative Auswertung (vgl. Abb. 11D und Abb. 12), auch in der Picrosirius-Red Färbung sind erste, minimale fibrotische Entwicklungen erkennbar (Abb. 8B) und erstmals kann in einer *whole-slide* Scan Aufnahme eine CLS-Formation beobachtet werden.

Dennoch zeigen sich nachhaltige Veränderungen von Enzymen und Biomarkern (Abb. 14) erst zu späteren Zeitpunkten und auch CLS können in der IF-Färbung bzw. in relevantem Ausmaß nach frühestens 12W erstmalig beobachtet werden (Abb. 22 und 23), was den Schluss zulässt, dass es in der Entwicklung der NASH bestimmte „Schlüsselzeitpunkte“ gibt, bei denen sich auf mehreren Ebenen parallel Veränderungen bemerkbar machen und die womöglich bis dahin wirksamen Kompensationsmechanismen kapazitiv überlastet sind.

Einer dieser Zeitpunkte scheint (im vorliegenden Versuchsmodell) 16W Fütterungsdauer zu sein, bei dem sowohl erstmalig das gesamte Spektrum des Fibrose- als auch Steatosiscores erreicht wird (Abb. 8 und 13). Zudem sind sowohl AST, ALT und LDH auf ein Niveau angestiegen, welches danach nicht wieder unterschritten wird, anders als zum Zeitpunkt 4W (Abb. 14 H, I, J) welcher a.e. durch zwei Ausreißertiere, welche trotz geringen KG und LG hohe Serumparameter aufweisen bedingt ist, und steigen bis zum Zeitpunkt von 30W

kontinuierlich weiter an. Auch auf immunologischer Ebene sind Reaktionen erkennbar, als dass sowohl die Anzahl CLS – sowohl CD11b^{neg} und CD11b^{pos} – (Abb. 23) deutlich ansteigen. So lässt das Gesamtbild in Summe die Vermutung zu, dass die Schädigung Leber im Bereich von ±12W kurzfristig stagniert, erkennbar an abnehmenden Werten von bspw. AST und LDH (Abb. 14), *Ballooning* und Steatosis, sowohl ausgewertet nach rel. Rotfläche/Gesamtfläche als auch anhand von Picosirius-Red-Schnitten, trotz weiter – wenn auch nur minimal – ansteigendem Körpergewicht. Erwähnt sei an dieser Stelle jedoch ebenfalls, dass das Lebergewicht zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt abnimmt, d.h. dass diese Prozesse inkl. der Reduzierung des Lebergewichts bei stagnierendem bis ansteigendem Körpergewicht entweder Folge eines kompensatorischen resp. regenerativen Prozesses oder schlicht Folge einer verminderten LG-Zunahme bei steigendem KG dieser Kohorte sind.

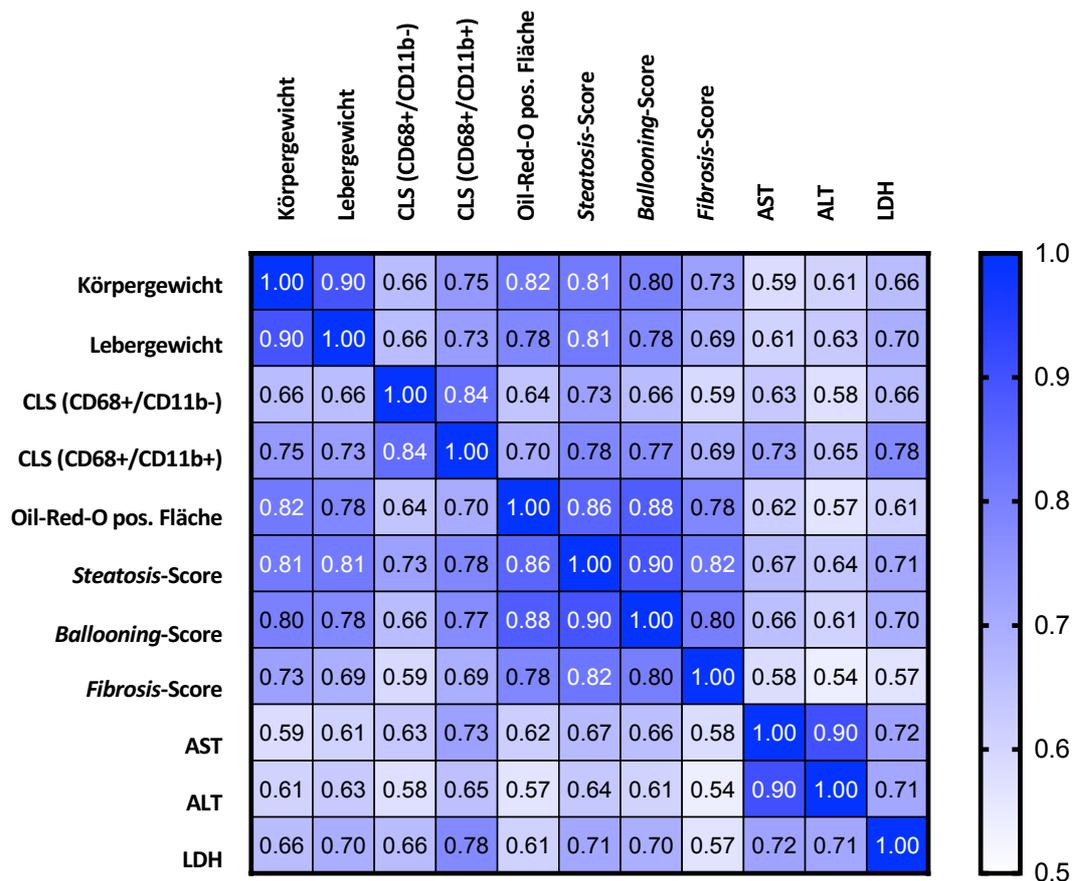


Abb. 25 Heat-Map einer signifikanten Korrelationsmatrix verschiedener Spearman'schen-Rangkorrelationskoeffizienten. Die Anzahl analysierter XY-Paare lag bei durchschnittlich 79 Paaren (Range: 66-93 Median: 83), alle p-Werte < 0.05. Die Rangkorrelationskoeffizienten sind entsprechend der Legende farbcodiert, wobei ein Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient von 1 einer vollständigen Übereinstimmung und damit perfekten Korrelation entspricht.

Zur Objektivierung der beobachteten Schädigungsparameter wurden verschiedene nicht-parametrische Spearman-Korrelationsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 25 und 26 dargelegt und halten die durchweg starke Korrelation des Körpergewichts (interpretiert nach Cohen bei einem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten > 0.5), unabhängig von dessen Diätzugehörigkeit, mit beinahe allen untersuchten Parametern eindeutig fest. Eine Unterscheidung zwischen Interventions- und Kontrollgruppe (SD-/WD-gefütterten Tieren) fand nicht statt, um eine eventuell vorliegende Korrelation nicht zu verzerren. Besonders eindrücklich und ähnlich ist diese v.a. bei strukturassoziierten Parametern (Scores für Steatosis, Fibrose und *Ballooning*, prozentualer Anteil der Rotfläche in Oil-Red-O Färbungen, s. Abb. 26 A-D). Schwächere Korrelationen ergeben sich für Teile der Laborparameter, insbesondere AST und ALT, was die zuvor umschriebene geringe Bedeutung in der Diagnostik der NAFLD unterstreicht.

Auffällig ist eine bei allen untersuchten Parametern festzustellende starke und signifikante Korrelation derer bei p-Werten < 0.0001 . Außerdem lassen sich Korridore bestimmter Parameter definieren, in denen sich die entsprechend ähnlichen Rangkorrelationskoeffizienten bewegen bspw. für ALT/AST oder für die *Ballooning*-/Steatosis-Scores, was sich der in Abb. 25 dargestellten Korrelationsmatrix gut entnehmen lässt.

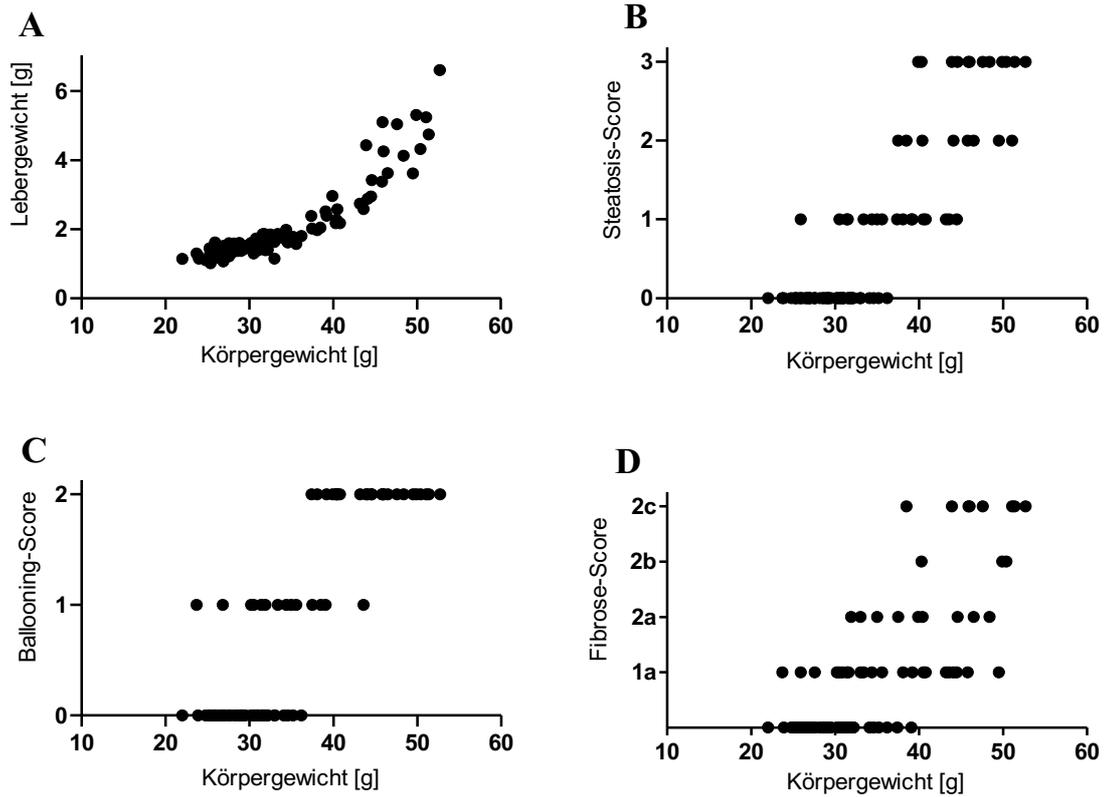


Abb. 26 Graphische Darstellung einiger signifikanter Auszüge der Korrelationsmatrix (Abb. 29)
A Korrelationsanalyse Körpergewicht und Lebergewicht. **B** Korrelationsanalyse Körpergewicht und Steatose **C** Korrelationsanalyse Körpergewicht und Ballonierung und **D** Korrelationsanalyse Körpergewicht und Fibrose der WD-gefütterten Tiere. Nicht-parametrische Spearman-Korrelationsanalysen mittels Prism 9. Signifikanzniveau stets mit $p < 0,0001$.

4. DISKUSSION

4.1 EINORDNUNG DER ERGEBNISSE

Die Definition und damit auch die Diagnose der NAFLD stützt sich, wie eingangs erläutert, auf eine histologisch oder bildgebend ermittelte Verfettung von mehr als 5 % des Gesamtgewichts der Leber bzw. der Hepatozyten in gleicher Größenordnung.

Die Induktion jener Verfettung und NASH erfolgte in der vorliegenden Studie resp. Versuchsaufbau einzig und allein durch eine hochkalorische fett- und kohlenhydratreiche Diät per Fütterung ad libitum, womit eine Übertragbarkeit auf eine Steatosis bzw. NASH, wie sie auch beim Menschen durch eine hochkalorische Diät hervorgerufen werden kann, mit deutlich geringeren Abstrichen einhergeht, als es womöglich bei anderen präklinischen Modellen der Fall ist [96]. Dies ist sicherlich als eine Stärke des hier gewählten Modells hervorzuheben, solange von einer ausschließlich durch eine hochkalorische Diät hervorgerufenen NAFLD ausgegangen wird. Zwar ermöglichen andere Modelle im Vergleich erhebliche Zeit- und damit Kostenersparnisse, da es sich bei der allein durch Ernährung bedingten Steatosis- bzw. NASH-Induktion mit Fütterungsdauern von $\geq 50W$ um einen vergleichsweise langwierigen Prozess [96] mit hohen Anforderungen an Vorbereitung und Logistik handelt, welcher beispielsweise durch Verwendungen von entsprechenden KO Tierlinien umgangen werden kann (vgl. beispielweise GNMT-KO mit Steatosis und Fibrose nach drei Monaten, HCC nach acht Monaten) [97], häufig jedoch mit Limitierung in der Übertragbarkeit bedingt durch bspw. fehlende IR oder Obesitas einhergehend. Ähnliches gilt für chemisch-induzierte Fibrose [81]. Allerdings geht dieses Fütterungsmodell, wie oben erwähnt, von einer ausschließlich durch eine hochkalorische Diät bedingten NAFLD in einem eindeutig definierten und einheitlichen genetischen Hintergrund aus. Dieses Modell berücksichtigt nicht, dass bei der beim Menschen zu beobachtenden NAFLD viel mehr Einflussgrößen zu beachten sind. So wird pathogenetisch zwischenzeitlich, im Sinne der „*multiple hit*“ Theorie, von einer Vielzahl von weiteren/zusätzlichen Faktoren ausgegangen, die für eine Progression einer Fettleber in eine NASH verantwortlich sind und für deren weitere Progression zu Fibrose, Zirrhose und HCC. Allen voran sind hier zum Beispiel ein regelmäßiger Alkoholkonsum in den für die Definition der NAFLD zulässigen Grenzen (die in der Literatur bislang sehr uneinheitlich festgelegt sind und eigentlich idealerweise gleich null sein sollte) zu nennen, wie auch genetische Faktoren oder Medikationen, wie Methotrexat, die ihrerseits leberschädigend sein können. Bei den genetischen Faktoren spielen beim Menschen neben Ethnie und Geschlecht auch Risikogene eine Rolle, allen voran z.B. PNPLA3 [98] aber auch andere wie TM6SF2 [99] oder HSD17B13 [100].

Die zuvor dargelegten Ergebnisse der Untersuchungen ermöglichen eine umfassende und detailreiche Charakterisierung der Veränderungen, welche im Rahmen der NAFLD und der Progression zur Steatohepatitis auf struktureller, zellulär-immunologischer und laborchemischer Ebene ablaufen.

Aus der Gesamtschau der Befunde lassen sich insbesondere zwei Hauptaussagen ableiten:

Fibrotische Läsionen stellen bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung resp. der Progression zur NASH das deutlichste strukturelle Merkmal eines fortgeschrittenen Erkrankungsstadiums dar, was im Hinblick auf Prognose und Gesamtsterblichkeit bekanntermaßen das Merkmal von bedeutendster Relevanz ist [101]. Im vorliegenden Versuchsmodell konnte eindeutig das Bild einer Steatohepatitis in verschiedenen Modalitäten der Erkrankung belegt werden, dennoch blieben die pathologischen Kollagenvermehrungen über den gesamten Beobachtungszeitraum trotz Zeiträumen von bis zu 40 W Fütterungsdauer hinter den zu Beginn der Untersuchung angenommenen Erwartungen zurück. Kein Versuchstier erreichte das Stadium einer *bridging fibrosis* (Stadium 3) oder einer Zirrhose (Stadium 4), in Einklang stehend mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen [102].

Dies ist insofern interessant, als dass es die Hypothese unterstützt, dass eine hochkalorische, fett- und kohlenhydratreiche Diät zwar langfristig zu einer Leberschädigung, Fibrosierung und Funktionseinschränkung führen kann, es aber in einem Gros der Patienten mit Steatosis zu keiner weiteren Progression kommt. So liegt, der aktuelleren Literatur zur Folge, die Prävalenz einer NAFLD in den westlichen Industrienationen wie den USA oder Deutschland bei 20 % bis 30 % [14, 23, 103], während die der NASH bei 3 % bis 5 % [23] und die einer NAFLD/NASH bedingten Zirrhose nur bei 0,5 bis 1,5% [104] liegt. Die Inzidenz für ein NASH-bedingtes HCC liegt je nach Studie bei 0,7-2,6 % [105].

Diese Zahlen verdeutlichen den bereits oben ausgeführten Punkt, dass auch beim Menschen zusätzliche Risikofaktoren oder „hits“ erforderlich sind, damit es zu einer Progression von einer harmloseren NAFLD zur aggressiveren NASH bzw. zur Entwicklung von Fibrose, Zirrhose und HCC kommt. Allen voran ist hier der Alkoholkonsum zu nennen, der bei der bislang gültigen Definition der NAFLD immer noch in den aufgeführten Grenzwerten zulässig ist, obgleich dieser Schwellenwert oberhalb jenem liegt, ab welchem die Deutsche Gesellschaft für Ernährung oder das Robert Koch Institut Alkoholkonsum als riskant einstufen. So liegt der durch die EASL definierte Grenzwert bei der Diagnose der NAFLD/NASH für Frauen bei 20 g Alkohol/Tag, bei Männern bei 30 g, während das RKI die Grenzen risikoreichen Konsums bei

10 g/Tag für Frauen bzw. 20 g beim Mann definiert. Wenngleich Studien existieren, die nahelegen, dass leichter bis moderater Alkoholkonsum statistisch gesehen positive Effekte hinsichtlich der Entwicklung einer Fettleber haben könnte – hauptsächlich bedingt durch eine Verbesserung der IR – kann dies nur in einem sehr spezifischen, eng definierten Rahmen gelten [106]. Das Querschnittsstudiendesign erlaubt, abgesehen von der statistischen Häufung von seltener auftretender Fettleber in einer Kohorte mit moderatem Weinkonsum, keinerlei Aussage hinsichtlich Kausalität oder ob es sich um präventive oder therapeutische Eigenschaften handelt. Eine weitere Querschnittsstudie aus dem Jahr 2012 ergab eine inverse Korrelation zwischen leichtem Alkoholkonsum und der Ausprägung der NAFLD [107]. Abgesehen von den zuvor genannten Einschränkungen war die Gruppe der *modest-drinkers* im Schnitt besser gebildet, wies ein höheres Netto-Einkommen sowie geringeren BMI, geringere Wahrscheinlichkeit für Diabetes mellitus und eine bessere Insulinsensitivität auf.

Demgegenüber stehen Studien, die auch bei geringem Alkoholkonsum, insbesondere bei einer durch eine hochkalorische Diät vorgeschädigten Leber, einen potenzierenden, negativen Effekt auf die Entwicklung und Ausprägung einer NAFLD nachweisen. Dabei scheint es gerade die Kombination aus übermäßiger Energiezufuhr und Alkohol zu sein, welche sich negativ auf die NAFLD auswirkt. Tierversuche belegen die synergistischen Effekte von Alkohol und hochkalorischer Diät, zeigen eine verstärkte inflammatorische Antwort, deutlich ausgeprägtere Fibrose und beschleunigte Progression, vermutlich vermittelt über den *Toll-like receptor 4*, als bei Alkohol oder high-fat Diät allein und unterstreichen damit die Tatsache, dass bei einer durch eine NASH vorgeschädigten Leber das Risiko eines HCCs in Kombination mit auch nur moderatem Alkoholkonsum signifikant erhöht ist [108]. Eine 2017 im *Hepatology* erschienene Studie bestätigt, dass Alkohol auch innerhalb der von der EASL vorgegebenen Grenzwerte der NAFLD-Definition das Risiko einer schweren Leberschädigung signifikant erhöht [109].

Die strittige Studienlage hinsichtlich des Effekts von Alkohol auf Lebererkrankungen wird jüngst oft mittels einer J-förmigen Kurve erklärt, bei der zu Beginn die positiven Effekte überwiegen, die Kurve nach Überschreiten des Extrempunktes (Tiefpunkt) jedoch rasch ansteigt und die schädigenden Einflüsse überwiegen. Dieser Punkt, auch als Punkt moderaten Alkoholkonsums, kurz MAC (von engl. *moderate alcohol consumption*) bezeichnet, ist dabei individuell unterschiedlich, uneinheitlich definiert und, genau wie die Konvexität der J-förmigen Kurve, zudem abhängig von multiplen Parametern wie Genetik, Konsumverhalten, Getränkewahl etc. [110].

Die zum aktuellen Zeitpunkt vorhandene Studienlage bezüglich Alkoholkonsum, auch in geringen bis moderaten Dosen, ist uneindeutig. Klare Empfehlungen, welche einen risikofreien oder sogar protektiven/therapeutischen Konsum unterhalb bestimmter Grenzwerte erlauben, können nicht gemacht werden. Es bedarf weiterer, hoch-qualitativer Längsschnittstudien, um die Effekte von Alkohol bei der NAFLD eindeutig zu charakterisieren [111]. Eine 2018 im *New England Journal of Medicine* erschienene Übersichtsarbeit zu Alkoholkonsum bei chronischen Lebererkrankungen resümiert, trotz einzelner Studien mit förderlichen Effekten, dass Patienten mit metabolischem Syndrom/NAFLD Abstinenz anstreben sollen, da bereits geringer Konsum mit einem beschleunigten Voranschreiten der Fibroseentwicklung verbunden ist [112].

Weitere zusätzliche Hits bzw. Risikofaktoren, die, schon allein aufgrund der Vielzahl durch das gewählte Tiermodell nicht reflektiert werden können, sind neben dem Alkoholkonsum und u.a. dadurch vermittelter vermehrter Expression von CYP2E1 und somit erhöhten ROS-Leveln [113] unter anderem Komorbiditäten (z.B. Diabetes mellitus) aber auch genetische Faktoren und zum Beispiel eine evtl. bestehende Medikation [114].

Modelle, welche dies berücksichtigen, sind Entwürfe, in welchen neben einer hyperkalorischen Diät zusätzliche, leberschädigende Substanzen wie CCL₄ appliziert werden [115].

Neben pathologischer Kollagenvermehrung und Fibrosierung sind es v.a. weitere strukturbezogene Charakteristika, die mit einem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert sind, was sich deutlich der Heat-Map unter Abb. 25 sowie gewichtskorrelierten Auszügen unter Abb. 26 entnehmen lässt. Diese Abbildung ermöglicht durch Zusammenführung praktisch fast aller erhobener Daten und Korrelation dieser untereinander, die Wertigkeit und Relevanz einzuschätzen und in einer einzigen Graphik darzustellen und repräsentiert damit die Essenz der Erkenntnisse dieser Arbeit. So korrelieren die für Steatosis und *Ballooning* erhobenen Scores sehr deutlich mit steigendem Gewicht (LG/KG) und damit der Krankheitsprogression. Im Hinblick auf die Korrelationsstärke könnte dies im Rahmen von Diagnostik und Screening von Risikopatienten sowie der Verlaufskontrolle womöglich stärker genutzt werden.

Es verwundert daher auch nicht, dass im Umkehrschluss die Reduktion des Körpergewichts die Maßnahme darstellt, welche am stärksten mit histologisch nachzuweisenden Verbesserungen der NASH einhergeht [116]. Eine Reduktion um > 7 % des Körpergewichts hat bereits eine Abnahme im *NAFLD Activity Score* zur Folge [117], ein Gewichtsverlust von > 10 % kann zum *Restitutio ad integrum* führen [118].

Laborparameter können zwar dabei helfen, Patienten, die einer bioptischen Sicherung oder bestimmten therapeutischen Option bedürfen, zu identifizieren [116], in der generellen Diagnostik spielen sie aber – dank vergleichsweise geringer Sensitivität und Spezifität (i.e. bei einem gängigen cutoff von $\geq 1,5$ ALT: Sens. 72 %, Spez. 51 % für Diagnose der NASH [119]) – nur eine untergeordnete Rolle. Dieser Sachverhalt wird auch beim Blick auf die Rangkorrelationskoeffizienten in Abb. 25 deutlich, rangieren selbige für ALT, AST und LDH im schwächeren Bereich, bei der Fibrose, dem – wie zuvor dargelegt – entscheidenden prognostischen Kriterium, zeigen diese sogar von allen untersuchten Korrelationen die schwächste Ausprägung. Angemerkt sei an dieser Stelle erneut, dass kein Tier höhergradige Fibrose-Scores erreicht (*bridging-fibrosis* oder Zirrhose), bei denen die Korrelationskoeffizienten mutmaßlich andere Ausprägungen zeigen - daher verwundert es nicht, dass die Leitlinie der NAFLD von April 2022 serologische Fibrose-Scores wie den FIB4-Score zum Ausschluss erst einer höhergradigen Fibrose (F3/F4) empfiehlt.

Für gewöhnlich zeigt sich bei der NAFLD/NASH ein DRQ < 1 [120, 121], was in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen steht. Interessanterweise korreliert das hs-CRP, obwohl primär in der Leber gebildet, nicht mit der NASH, sondern mit dem metabolischen Syndrom, was die Hypothese zulässt, dass die Fettakkumulation, unabhängig ob in Leber/Fettgewebe, und der generelle Entzündungszustand die erhöhten hs-CRP-Level bedingen, wodurch hs-CRP nicht als Marker des Schweregrades der NASH bei Adipositas taugt, jedoch als Indikator der Steatosis herangezogen werden kann [122, 123].

Auch in Bezug auf die beiden CLS-Subgruppen und den beteiligten Makrophagen liefern die Korrelationsmatrix und die dieser zugrundeliegenden Untersuchungen wertvolle Informationen. Wie einleitend beschrieben, sind Zusammensetzung beteiligter (Sub-) Population(en), exakte Funktion sowie zugrundeliegende zelluläre und molekulare Signalkaskaden Bestand aktueller Forschung und zeugen von gewisser Kontroverse.

Didaktisch vereinfacht eingeteilt lässt sich die Fragestellung hinsichtlich der Rolle von Makrophagen in der Entstehung, Progression und potentieller Reparatur der NASH in drei Kernaspekte gliedern: Ver-/Änderungen in puncto

- Quantität (d.h. die Numerik der Makrophagenpopulation(en) betreffend)
- Lokalisation, sowie
- Qualität (d.h. Makrophagen unterschiedlicher Herkunft/Polarisation/Funktion).

Die Komplexität, die bei der Klärung der zuvor genannten Sachverhalte auftritt, kann an jeder einzelnen dieser Dimensionen deutlich gemacht werden. So ist das lange geltende Dogma, KCs und somit auch die Gesamtanzahl der in der Leber befindlichen MΦ stiege an, bereits einleitend anhand von neueren Studien hinterfragt worden, weitere diskrepante Ergebnisse neueren Datums können angeführt werden: Morinaga et al. veröffentlichten 2015 eine Arbeit, in der sie nachweisen konnten, dass in fettleibigen Mäusen die Anzahl der eingewanderten Makrophagen (*referred to as recruited hepatic macrophages (RHMs)*) sechsmal höher als in der Vergleichsgruppe bei vergleichbaren KC-Anzahlen einzuordnen ist [89], welche darüber hinaus höhere Level an TNF-alpha und IL-6 sezernieren und neben dem Entzündungsgeschehen auch eine Schlüsselposition hinsichtlich hepatischer Insulinresistenz durch die durch sie sezernierten Faktoren einnehmen. Doch auch trotz gleichbleibender KC-Anzahl können diese durch Rekrutierung von RHMs am Inflammationsgeschehen teilhaben.

In den durchgeführten Experimenten konnte ebenfalls keine nennenswerte Veränderung im Hinblick auf die Zahl CD68^{pos} Makrophagen festgestellt werden (vgl. Abb 21 A und B).

Die Auswertung der quantitativen Veränderungen der Makrophagenpopulationen mittels händischer Auszählung von IF-gefärbten Bilddateien anhand zwei verschiedener AK-Nachweise erlaubt keine Aussage über die Gesamtanzahl aller in der Leber befindlichen Makrophagen, noch kann diese Methodik eine numerisch exakte Angabe ermöglichen, ein genereller Trend lässt sich aber dennoch erkennen. Eine methodische Unschärfe ist durch die fehlende Diskriminierung bei den CD11b⁺ Zellen bedingt. Bei der Verwendung von AK zum Nachweis bestimmter Zellpopulationen sind gewisse Kreuzreaktionen/-nachweise per se nicht vermeidbar. Im vorliegenden Falle sind neben Makrophagen unter anderem auch Monozyten und Granulozyten Bestandteil des Nachweisspektrums von CD11b, ebenso ist Macrosialin nicht 100 % spezifisch im Nachweis von Kupfferzellen. Um also bei CD11b⁺ Zellen in Abb. (21 D) von Makrophagen sprechen zu können, hätten andere CD11b⁺ Zellen stets durch Kombination mit anderen AK-Signalen auch in der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, indem jedes positive CD11 Signal hinsichtlich seiner Eigenschaften im CD68 Signal untersucht worden wäre. Dies ist nur bei der Auswertung der CLS erfolgt.

Übereinstimmend sind auch die Ergebnisse zu quantitativen Veränderungen der rekrutierten CD11b^{pos} Zellen, wenngleich der Anstieg im vorliegenden Fall nicht in gleicher Größenordnung anzusiedeln ist. Diesem Sachverhalt ist insofern Nachdruck zu verleihen, als

dass er die Hypothese unterstützt, dass nur Subpopulationen für die Entstehung und Progression der NAFLD/NASH von pathogenetischer Relevanz sind!

Dass die Rolle von Makrophagen jedoch nicht nur durch Ursprung und Polarisation determiniert wird, sondern womöglich auch vom *Timing* abhängt, ist dabei eine verhältnismäßig jüngere Erkenntnis [124]. Erfolgt eine Makrophagendepletion während der regenerativen Phase in persistierenden bzw. ausgedehnten fibrotischen Läsionen, wirkt sich die Depletion mit zeitlichem Bezug zur inflammatorischen Schädigung und Fibroseentstehung positiv auf die Fibrosierung aus [125]. Dass Veränderungen in der Makrophagenpopulation nicht zwingend gleichmäßig mit zunehmender Progression der NASH erfolgt, zeigt auch Abb. 18. Nach 26 W erfolgt ein nahezu sprunghafter Anstieg der Mac2 positiven Makrophagen, trotz bereits kontinuierlich voranschreitender Schädigung des Lebergewebes, was in zahlreichen untersuchten Methodiken dargelegt wurde. Dies steht in Einklang mit dem ab diesem Zeitpunkt steilen Anstieg der Formation von CLS (Abb. 22 und 23).

CLS:

Generell gesprochen ist zum aktuellen Stand der Wissenschaft wenig über CLS bekannt und weitere Forschung ist, insbesondere zur Funktion und Zusammensetzung dieser, als auch zur Klärung der Frage, ob CLS das Korrelat eines schädigenden oder adaptiven Prozesses darstellen, von Nöten [81].

Vermutlich organisieren sich die Makrophagen nicht um jede Hepatozyten in gleichem Maße, sondern insbesondere um jene, in welchen zum einen besonders großvolumige Lipidtröpfchen [81], zum anderen freies Cholesterin [88] vorliegen. In den vorliegenden IF-Aufnahmen (s. Abb. 20 J-N) konnte ebenfalls die Beobachtung gemacht werden, dass sich Makrophagen vorrangig um überdurchschnittlich voluminöse Hepatozyten als CLS zusammenschließen. Diese Erkenntnis unterstützt die Aussage, Makrophagen trügen auch auf Stoffwechselebene zur Entwicklung der NAFLD mit u.U. auto-potenzierenden Mechanismen bei, indem sie durch von ihnen sezernierte Zytokine die Stabilität der Lipidtröpfchen (...) beeinträchtigen und so die Lipolyse und damit den Zulauf von Lipiden zur Leber weiter erhöhen können [126].

Ioannou et al. messen freiem Cholesterin bei der Genese der NASH, v.a. bei der Transition von Steatosis → NASH, besonderen Wert bei. Die von ihnen aufgestellte Hypothese besagt, dass Makrophagen durch Aufnahme von Lipidtröpfchen sterbender Hepatozyten und der Metabolisation von Vorstufen freies Cholesterin zur Verfügung steht, welches jedoch nicht

weiter verstoffwechselt werden kann, wodurch es akkumuliert und Makrophagen in Schaumzellen übergehen, was letztendlich die Inflammation und Fibroseentwicklung auslöst. Eine Studie aus dem Jahr 2013 [81] lässt vermuten, dass CLS sowohl zeitlich als auch örtlich, das bedeutet im Bereich macrovesikulärer Steatosis, den Kollagenablagerungen und somit der Fibrose vorausgehen. Korrelationsanalysen legen einen Zusammenhang zwischen CLS und hepatozytärem *Ballooning*, nicht aber der Steatosis nahe, was die Vermutung zulässt, dass CLS insbesondere im Bereich lokal begrenzter Entzündung rund um die geschädigten Hepatozyten angesiedelt sind. Auch eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der *crown-like structures* und dem Ausmaß der Fibrose war festzustellen, wobei die meisten CLS im Fibrorestadium 2 (0-3) auszumachen waren.

Dass CLS Ausdruck einer fortgeschrittenen Leberschädigung sind und womöglich durch eine zeitliche Assoziation die Progression von Steatosis → NASH markieren [81], steht in Einklang mit der positiven Korrelation von CLS und entsprechenden Scores für *Ballooning*, sowohl in dieser, als auch in anderen Arbeiten, welche das gleiche Scoring-System für die Ballonierung der Hepatozyten verwendet haben [81, 95, 127].

Das Auftauchen der hepatischen *crown-like structures* wirft zwangsläufig die Frage nach deren Funktion sowie Rolle bei Entstehung und Entwicklung der NASH auf. Diese sind aktuell nicht in Gänze verstanden und können auch nicht durch diese Arbeit beantwortet werden, jedoch hilft sie bei Gewinnung eines besseren Verständnisses, insbesondere auch durch Legen eines Grundsteines für weitere Arbeiten, dank einer der bis dato am höchsten zeitaufgelösten und umfangreichsten WT-Fütterungsreihen.

In der Vergangenheit zeigte sich, dass die Frage der Typisierung von beteiligten Makrophagen-Subpopulationen sowie deren Herkunft als disputabel anzusehen ist [81, 84, 128]. Beschreiben Itoh et al. 2017 bspw. residente Makrophagen als Hauptzellquelle für CLS, kommen Daemen et al. 2021 zu der Schlussfolgerung, dass CCR-2^{pos} MDM essentiell für und vorrangig an der Bildung der CLS beteiligt sind. Letztere Überlegungen werden auch durch die Beobachtung dieser Arbeit gestützt. So legen die Ergebnisse einer zweifachen gemittelten Auswertung der Beteiligung von CD68^{pos}CD11b^{pos} Makrophagen an CLS nahe, dass letztere – und damit v.a. MDM – essentiell an der Formation eben jener Strukturen beteiligt sind (s. Abb. 23 und 24). Durch die belegte Signalantwort in beiden Kanälen und die nachgewiesene Co-Lokalisation der Marker kann hier auch eindeutig von CD11^{pos} Makrophagen gesprochen werden, da Monozyten und Dendriten durch die Berücksichtigung der AK-Kombination auch in der Auswertung

ausgeschlossen sind. Dies lässt darauf schließen, dass CD11b positive Zellen im Verlauf zunehmend rekrutiert werden, was sich durch eine numerische Auszählung der Zellpopulationen im vorliegenden Fall untermauern ließ (Abb. 21 D).

Ein weiteres Argument für die Relevanz von M_{DM} im Rahmen der NASH liefert auch die Auswertung der Korrelationsanalysen, bei der CD11b positive CLS stets stärkere Korrelationen mit allen untersuchten Parametern und dem Krankheitsprogress zeigen als CD11b negative CLS.

Gegenstand kontrovers geführter Debatten ist außerdem, ob CLS Ausdruck eines adaptiven/protektiven oder destruktiven Prozesses sind. 2013 konnte nebst parallelem, IF-basierten Anfärben von F4/80 und Kollagenablagerungen nicht nur eine interstrukturelle räumliche Beziehung nachgewiesen werden, sondern mittels Korrelationsanalysen auch ein Zusammenhang zwischen numerischem Anstieg von CLS und dem Ausmaß fibrotischer Läsionen belegt werden [81], wie zuvor bereits erwähnt, ebenfalls in Einklang stehend mit Ergebnissen dieser Arbeit. Auch durch räumliche Assoziation von CLS im Bereich von sternzellreichen Regionen, der primär für Kollagenproduktion unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie verantwortlichen Zelllinie der Leber [129], übernehmen CLS so regulative und modulierende Eigenschaften in Bezug auf Fibrosierung der Leber und gehen dieser auch räumlich voraus.

Die Vielschichtigkeit der Makrophagenpopulationen und -polarisationen resp. die Schwierigkeit bei der Bestimmung jener wird plastischer und mutmaßlich ersichtlicher, wenn es um Schlussfolgerungen aus diesem Sachverhalt geht. Nähme man an, CLS seien Ausdruck eines schädigenden Prozesses, so wäre *eine* logische und konsequente Folgerung, dass mit steigender Anzahl CLS auch das Ausmaß der Fibrose zunähme, vergleichbar mit oben genannten Ergebnissen, konkludiert ginge eine adaptive/protektive Rolle womöglich mit einer inversen Korrelation einher. So verwundert es im erstgenannten und in vorherigen Abschnitten umschriebenen Falle nicht, dass bei NASH-Pat. CCR2-Antagonisten als eine potentielle therapeutische Option hinsichtlich einer vorhandenen Leberfibrose in Erwägung gezogen werden [124] und bei Pat. mit Leberzirrhose eine erhöhte hepatische Expression von CCL2 (auch bekannt als MCP-1), dem Liganden von CCR2, nachgewiesen werden konnte [130].

4.2 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Gesamtschau der Befunde liefert ein detailliertes und umfassend charakterisiertes präklinisches Mausmodell einer durch eine hyperkalorische Diät bedingten Fettlebererkrankung. Bereits frühzeitig kommt es in diesem zu fassbaren Veränderungen der Leber und der Nachweis einer NAFLD resp. NASH, sowohl im engeren, definitorischen, als auch im weiteren Sinne, d.h. durch damit einhergehende Veränderungen laborchemischer oder zellulärer Parameter, konnte eindeutig erbracht werden.

Weiterhin histologisch belegt ist eine Modulation der Makrophagenpopulation der Leber, deren Auftreten mit der Progression einer Steatosis zur Steatohepatitis korreliert und die Hypothese einer vornehmlich von Subpopulationen ausgehenden pathogenetischen Relevanz untermauert. Von führender Bedeutung scheinen dabei eingewanderte Makrophagen zu sein, welche in aus Makrophagen gebildete Strukturen integriert werden, die im histologischen Anschnitt wie „Kronen“ imponieren und stark mit dem Auftreten von fibrotischen Läsionen einhergehen. In einer ausführlichen Korrelationsanalyse aller untersuchten Parameter ließen sich außerdem weitere Merkmale identifizieren, die besonders mit dem Voranschreiten der Erkrankung assoziiert sind.

Neben dem Auftreten der CLS, welche C68+/CD11b+ Zellen enthalten und der pathologischen Kollagenvermehrung, korrelieren insbesondere strukturbezogene Parameter wie Ballonierung und Steatosis-Score mit steigendem Körper- bzw. Lebergewicht und damit mit der Progression zur NASH.

Daraus ableitend ergeben sich potenzielle Fokusse für weiterführende Arbeiten. So muss geklärt werden, ob und wie sich die absolute Zahl aller in der Leber befindlichen Makrophagen im Zuge der Entwicklung der NAFLD/NASH und der Progression dieser verändert und wie sich jene im Hinblick auf Subpopulationen zusammensetzt. Ein Aspekt, der beispielsweise unter Verwendung von Tiermodellen, die ein *lineage tracing* ermöglichen, weiter analysiert werden kann. Untersucht werden muss außerdem, welcher eben jener Populationen essentielle Rollen bei Krankheitsprogression zuteilwerden und durch welche Signalkaskaden diese aktiviert und gesteuert werden. Basierend auf einer auf dieser Arbeit beruhenden Einschätzung gilt es dabei, besonderes Augenmerk auf rekrutierte Populationen zu richten, da erste, histologisch greifbare numerische und die Lokalisation betreffende Veränderung derer belegt werden konnten. Im Hinblick auf die Heterogenität könnte dies unter Hinzuziehung von Einzelzell-Sequenzierungen erfolgen. Relevant und demnach vordringlich zu untersuchen, scheinen dabei die Zeitpunkte 16 sowie 26 Wochen Fütterungsdauer zu sein.

Weiterhin gilt es, die Hypothese einer allein auf dem Boden einer hochkalorischen Western Diät bedingten, in ihrer Ausprägung limitierten, MAFLD durch Addition weiterer *hits* zu bestätigen, bspw. in Form von niedrigen, aber chronischen Alkoholdosen oder weiterer leberschädigender Einflüsse, was einem charakteristischen Bild einer westlichen Wohlstandsgesellschaft entspricht. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Ausprägung der Fibrose bis hin zum Vollbild einer Zirrhose sowie des zeitlichen Verlaufs im Vergleich zur alleinigen Western Diät interessant.

Abschließend geschlussfolgert werden darf, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, ein umfassendes Bild der vonstattengehenden Veränderungen auf zellulärer, struktureller sowie laborchemischer Ebene zu zeichnen und Charakteristika, die im Besonderen mit der Progression der NAFLD assoziiert sind, zu identifizieren. Hierdurch konnte eine für weitere Arbeiten umfassend charakterisierte Kontrollkohorte geschaffen werden, die, insbesondere im Hinblick auf derzeit laufende Untersuchungen an genetisch veränderten Mausmodellen, eine zentrale und wichtige Vergleichskohorte darstellt, für die eine entsprechend umfassende Gewebe- und Probenbank zur Verfügung steht. Darüber hinaus sind sie Basis für weitere laufende Untersuchungen zur Identifizierung molekularer, prädiktiver Signaturen, deren Übertragbarkeit auf zum Beispiel die menschliche Erkrankung im Weiteren aufgrund der hohen Standardisierung zuverlässig geprüft werden kann.

5. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. EASL-EASD-EASO, *Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1388-402.
2. Geh, D., Q.M. Anstee, and H.L. Reeves, *NAFLD-Associated HCC: Progress and Opportunities*. J Hepatocell Carcinoma, 2021. **8**: p. 223-239.
3. Liangpunsakul, S. and N. Chalasani, *What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use?* Am J Gastroenterol, 2012. **107**(7): p. 976-8.
4. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tsochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-48.
5. Hashimoto, E., M. Taniai, and K. Tokushige, *Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH*. J Gastroenterol Hepatol, 2013. **28 Suppl 4**: p. 64-70.
6. Bellentani, S., et al., *Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy*. Ann Intern Med, 2000. **132**(2): p. 112-7.
7. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases*. Hepatology, 2018. **67**(1): p. 328-357.
8. Younossi, Z.M., et al., *Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation*. Transplantation, 2019. **103**(1): p. 22-27.
9. Hart, C.L., et al., *Effect of body mass index and alcohol consumption on liver disease: analysis of data from two prospective cohort studies*. Bmj, 2010. **340**: p. c1240.
10. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
11. Eslam, M., A.J. Sanyal, and J. George, *MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2020. **158**(7): p. 1999-2014.e1.
12. Eslam, M., et al., *A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement*. J Hepatol, 2020. **73**(1): p. 202-209.
13. Bocatonda, A., et al., *From NAFLD to MAFLD: Definition, Pathophysiological Basis and Cardiovascular Implications*. Biomedicines, 2023. **11**(3).
14. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology, 2016. **64**(1): p. 73-84.
15. Perumpail, B.J., et al., *Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(47): p. 8263-8276.
16. Younossi, Z.M., et al., *The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe*. Hepatology, 2016. **64**(5): p. 1577-1586.
17. Targher, G., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis*. J Hepatol, 2016. **65**(3): p. 589-600.
18. Wong, R.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States*. Gastroenterology, 2015. **148**(3): p. 547-55.
19. Wong, R.J. and A.K. Singal, *Trends in Liver Disease Etiology Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States, 2014-2019*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(2): p. e1920294.
20. Nouredin, M., et al., *NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances*. Am J Gastroenterol, 2018. **113**(11): p. 1649-1659.
21. Younossi, Z., et al., *Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(1): p. 11-20.
22. Kudaravalli, P. and S. John, *Nonalcoholic Fatty Liver*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
23. Gadiparthi, C., et al., *NAFLD Epidemiology, Emerging Pharmacotherapy, Liver Transplantation Implications and the Trends in the United States*. J Clin Transl Hepatol, 2020. **8**(2): p. 215-221.

24. Li, Z., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in mainland of China: a meta-analysis of published studies*. J Gastroenterol Hepatol, 2014. **29**(1): p. 42-51.
25. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 44-52.
26. Angulo, P. and K.D. Lindor, *Non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17 Suppl**: p. S186-90.
27. Chang, Y., et al., *Weight gain within the normal weight range predicts ultrasonographically detected fatty liver in healthy Korean men*. Gut, 2009. **58**(10): p. 1419-25.
28. Zelber-Sagi, S., V. Ratziu, and R. Oren, *Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(29): p. 3377-89.
29. Barquera, S., et al., *Caloric beverage consumption patterns in Mexican children*. Nutr J, 2010. **9**: p. 47.
30. Gerber, L., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study*. Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(8): p. 772-81.
31. Paradis, V., et al., *Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 851-9.
32. Mittal, S., et al., *Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016. **14**(1): p. 124-31.e1.
33. Dongiovanni, P., S. Romeo, and L. Valenti, *Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(36): p. 12945-55.
34. Ekstedt, M., et al., *Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up*. Hepatology, 2015. **61**(5): p. 1547-54.
35. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
36. Stine, J.G., et al., *Systematic review with meta-analysis: risk of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis without cirrhosis compared to other liver diseases*. Aliment Pharmacol Ther, 2018. **48**(7): p. 696-703.
37. Mahady, S.E. and J. George, *Predicting the future burden of NAFLD and NASH*. J Hepatol, 2018. **69**(4): p. 774-775.
38. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1221-31.
39. Ratziu, V., et al., *Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1898-906.
40. Piazzolla, V.A. and A. Mangia, *Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH*. Cells, 2020. **9**(4).
41. Tannapfel, A., et al., *Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease*. Virchows Arch, 2011. **458**(5): p. 511-23.
42. Diehl, A.M., Z. Goodman, and K.G. Ishak, *Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury*. Gastroenterology, 1988. **95**(4): p. 1056-62.
43. Dufour, J.F. and C.M. Oneta, *[Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis]*. Ther Umsch, 2004. **61**(8): p. 505-12.
44. Rolo, A.P., J.S. Teodoro, and C.M. Palmeira, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 59-69.
45. Liu, W., et al., *Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(10): p. 1969-87.
46. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-s112.
47. Paradies, G., et al., *Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(39): p. 14205-18.
48. Videla, L.A., et al., *Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(3): p. 261-8.

49. Pessayre, D., A. Mansouri, and B. Fromenty, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **282**(2): p. G193-9.
50. Pigeolet, E., et al., *Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals*. *Mech Ageing Dev*, 1990. **51**(3): p. 283-97.
51. Cha, J.Y., D.H. Kim, and K.H. Chun, *The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis*. *Lab Anim Res*, 2018. **34**(4): p. 133-139.
52. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. *Liver Int*, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
53. Williams, G.M. and M.J. Iatropoulos, *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*. *Toxicol Pathol*, 2002. **30**(1): p. 41-53.
54. Krenkel, O. and F. Tacke, *Liver macrophages in tissue homeostasis and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2017. **17**(5): p. 306-321.
55. Karlmark, K.R., et al., *Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis*. *Hepatology*, 2009. **50**(1): p. 261-74.
56. Seki, E., et al., *CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice*. *Hepatology*, 2009. **50**(1): p. 185-97.
57. Zimmermann, H.W., et al., *Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11049.
58. Marra, F. and F. Tacke, *Roles for chemokines in liver disease*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(3): p. 577-594 e1.
59. Baeck, C., et al., *Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury*. *Gut*, 2012. **61**(3): p. 416-26.
60. Seki, E., et al., *CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(7): p. 1858-70.
61. Heymann, F., et al., *Hepatic macrophage migration and differentiation critical for liver fibrosis is mediated by the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 8 in mice*. *Hepatology*, 2012. **55**(3): p. 898-909.
62. Kazankov, K., et al., *The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. **16**(3): p. 145-159.
63. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
64. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 175-84.
65. Patel, U., et al., *Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation*. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(1): p. 186-193.
66. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 14-20.
67. Chávez-Galán, L., et al., *Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 263.
68. Navarro, L.A., et al., *Arginase 2 deficiency results in spontaneous steatohepatitis: a novel link between innate immune activation and hepatic de novo lipogenesis*. *J Hepatol*, 2015. **62**(2): p. 412-20.
69. Stienstra, R., et al., *Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 511-22.
70. Han, Y.H., et al., *RORα Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect against Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Cell Rep*, 2017. **20**(1): p. 124-135.
71. Schuppan, D., R. Surabattula, and X.Y. Wang, *Determinants of fibrosis progression and regression in NASH*. *J Hepatol*, 2018. **68**(2): p. 238-250.
72. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 209-18.
73. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(11): p. 2347-55.

74. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. *Diabetes*, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
75. Faria, S.S., et al., *Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy*. *J Breast Cancer*, 2020. **23**(3): p. 233-245.
76. Morris, P.G., et al., *Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(7): p. 1021-9.
77. Lees, T., et al., *Characterising the adipose-inflammatory microenvironment in male breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2018. **25**(7): p. 773-781.
78. Bernstein, L.M., et al., *Features of omental adipose tissue in endometrial cancer patients with 'standard' or 'metabolically healthy' obesity: associations with tumor process characteristics*. *Springerplus*, 2016. **5**(1): p. 1900.
79. Miyazawa, M., et al., *Pioglitazone Inhibits Periprostatic White Adipose Tissue Inflammation in Obese Mice*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2018. **11**(4): p. 215-226.
80. Iyengar, N.M., et al., *White adipose tissue inflammation and cancer-specific survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue*. *Cancer*, 2016. **122**(24): p. 3794-3802.
81. Itoh, M., et al., *Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e82163.
82. Park, J.W., et al., *Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22**(4): p. 491-7.
83. Devisscher, L., et al., *The role of macrophages in obesity-driven chronic liver disease*. *J Leukoc Biol*, 2016. **99**(5): p. 693-8.
84. Daemen, S., et al., *Dynamic Shifts in the Composition of Resident and Recruited Macrophages Influence Tissue Remodeling in NASH*. *Cell Rep*, 2021. **34**(2): p. 108626.
85. Scott, C.L., et al., *Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10321.
86. Bonnardel, J., et al., *Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche*. *Immunity*, 2019. **51**(4): p. 638-654.e9.
87. Kinoshita, M., et al., *Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice*. *J Hepatol*, 2010. **53**(5): p. 903-10.
88. Ioannou, G.N., et al., *Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(5): p. 1326-34.
89. Morinaga, H., et al., *Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice*. *Diabetes*, 2015. **64**(4): p. 1120-30.
90. Lefere, S. and F. Tacke, *Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism*. *JHEP Rep*, 2019. **1**(1): p. 30-43.
91. Holness, C.L. and D.L. Simmons, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. *Blood*, 1993. **81**(6): p. 1607-13.
92. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. *Lab Invest*, 2017. **97**(1): p. 4-13.
93. Movita, D., et al., *Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(4): p. 723-33.
94. Ju, C. and F. Tacke, *Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(3): p. 316-27.
95. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
96. Ibrahim, S.H., et al., *Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation*. *Dig Dis Sci*, 2016. **61**(5): p. 1325-36.
97. Varela-Rey, M., et al., *Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(5): p. 969-76.

98. Liu, Y.L., et al., *Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2014. **61**(1): p. 75-81.
99. Liu, Y.L., et al., *TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4309.
100. Su, W., et al., *Role of HSD17B13 in the liver physiology and pathophysiology*. Mol Cell Endocrinol, 2019. **489**: p. 119-125.
101. Angulo, P., et al., *Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 389-97.e10.
102. Tsuchida, T., et al., *A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer*. J Hepatol, 2018. **69**(2): p. 385-395.
103. Estes, C., et al., *Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030*. J Hepatol, 2018. **69**(4): p. 896-904.
104. Marengo, A., R.I. Jouness, and E. Bugianesi, *Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults*. Clin Liver Dis, 2016. **20**(2): p. 313-24.
105. Huang, D.Q., H.B. El-Serag, and R. Loomba, *Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(4): p. 223-238.
106. Dunn, W., R. Xu, and J.B. Schwimmer, *Modest wine drinking and decreased prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1947-54.
107. Dunn, W., et al., *Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. J Hepatol, 2012. **57**(2): p. 384-91.
108. Gäbele, E., et al., *A new model of interactive effects of alcohol and high-fat diet on hepatic fibrosis*. Alcohol Clin Exp Res, 2011. **35**(7): p. 1361-7.
109. Åberg, F., et al., *Interaction between alcohol consumption and metabolic syndrome in predicting severe liver disease in the general population*. Hepatology, 2018. **67**(6): p. 2141-2149.
110. Lodhi, M., J. Amin, and S. Eswaran, *Role of alcohol in nonalcoholic steatohepatitis: Rush university (Con) patients with nonalcoholic steatohepatitis should be abstinent from alcohol use*. Clin Liver Dis (Hoboken), 2018. **11**(2): p. 39-42.
111. Ajmera, V.H., N.A. Terrault, and S.A. Harrison, *Is moderate alcohol use in nonalcoholic fatty liver disease good or bad? A critical review*. Hepatology, 2017. **65**(6): p. 2090-2099.
112. Fuster, D. and J.H. Samet, *Alcohol Use in Patients with Chronic Liver Disease*. N Engl J Med, 2018. **379**(13): p. 1251-1261.
113. Minato, T., et al., *Binge alcohol consumption aggravates oxidative stress and promotes pathogenesis of NASH from obesity-induced simple steatosis*. Mol Med, 2014. **20**(1): p. 490-502.
114. Meunier, L. and D. Larrey, *Chemotherapy-associated steatohepatitis*. Ann Hepatol, 2020. **19**(6): p. 597-601.
115. Tsuchida, T. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic stellate cell activation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(7): p. 397-411.
116. Sheka, A.C., et al., *Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review*. Jama, 2020. **323**(12): p. 1175-1183.
117. Musso, G., et al., *Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 885-904.
118. Vilar-Gomez, E., et al., *Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis*. Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 367-78.e5; quiz e14-5.
119. Verma, S., et al., *Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Liver Int, 2013. **33**(9): p. 1398-405.

120. Sorbi, D., J. Boynton, and K.D. Lindor, *The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(4): p. 1018-22.
121. Aeschlimann, A.B., E.; Bassetti, C. L.; Battegay, E.; Battegay, M.; Bauerfeind, P.; Bloch, K. E.; Blum, H. E.; Bombeli, T.; Duru, F.; Eberli, F. R.; Fehr, J.; Fehr, T.; Fontana, A.; Fried, M.; Greminger, P.; Hess, K.; Hoffmann, U.; Hunziker, S.; Jäger, D.; Knuth, A.; Kraenzlin, M. E.; Kupferschmidt, H.; Lautenschlager, S.; Marti, H.-P.; Martina, B.; Michel, B. A.; Moradpour, D.; Müllhaupt, B.; Oechslin, E.; Ott, P.; Peghini, P. E.; Russi, E. W.; Schanz, U.; Scharf, C.; Schmid, C.; Schwarz, U.; Schwizer, W.; Spinas, G. A.; Tató, F.; Thumshirn, M.; von Eckardstein, A.; Weber, R.; Wüthrich, R. P., *Siegenthalers Differenzialdiagnose*. 2005: Siegenthaler, Walter.
122. Francque, S. and L. Vonghia, *The future of diagnosing NASH - could a simple blood test be the key?* Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **11**(11): p. 995-997.
123. Zimmermann, E., et al., *C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients*. J Hepatol, 2011. **55**(3): p. 660-665.
124. Lefere, S., L. Devisscher, and F. Tacke, *Targeting CCR2/5 in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis: opportunities and challenges*. Expert Opin Investig Drugs, 2020. **29**(2): p. 89-92.
125. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
126. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux*. J Clin Invest, 2016. **126**(1): p. 12-22.
127. Juluri, R., et al., *Generalizability of the nonalcoholic steatohepatitis Clinical Research Network histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Gastroenterol, 2011. **45**(1): p. 55-8.
128. Itoh, M., et al., *CD11c⁺ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis*. JCI Insight, 2017. **2**(22).
129. Mederacke, I., et al., *Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2823.
130. Marra, F., et al., *Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration*. Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 423-30.

DANKSAGUNG

Mein aufrichtigster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Johannes G. Bode. Herzlichen Dank für deine Anleitung, Begleitung und Unterstützung während der vergangenen vier Jahre. Deine herausragende Begeisterung für die Forschung und damit einhergehende Bereitschaft, Doktoranden für experimentelle Arbeiten zu gewinnen, sie während des gesamten Prozesses zu unterstützen, zu begleiten und nicht allein zu lassen, die hervorragende Betreuung und regelmäßigen Treffen, für die du viele Stunden deiner Freizeit geopfert hast, haben mich stets motiviert und angespornt. Auch möchte ich dir für deine vielen Hilfestellungen und wertvollen Ratschläge abseits der Doktorarbeit, seien sie beruflich oder privater Natur, welche du mir in zahlreichen Gesprächen mitgegeben hast, allerherzlichst danken. Ich werde sie in guter Erinnerung behalten und bin zuversichtlich, diesen Austausch auch in Zukunft gerne beizubehalten.

Ich danke Frau Professor Dr. Julia Reifenberger für die Übernahme meiner Co-Betreuung und die Rolle als Zweitgutachterin. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Seddik Hammad aus der AG um Prof. Dooley für die Unterstützung bei der Auswertung der Mac2-Färbung sowie der AG um Herrn Nils Grabe und Frau Krauthoff für die Erstellung der *whole-slide Scans*.

Im Besondern bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern im Labor, Dr. Christian Ehling und Dr. Stephanie Wolf. Durch die exzellente Einführung, konsequente Hilfestellung bei Bedarf sowie die stetige Bereitschaft, Methoden und Ergebnisse zu besprechen und Vorschläge und Alternativen stets als diskutabel anzusehen, war es mir möglich, meine Arbeit in diesem Maße zu realisieren. Besonderer Dank gilt dir, Dr. Stephanie Wolf auch für die differenzierte Korrektur meiner Niederschrift. Ich danke der gesamten AG Bode für die Unterstützung und nette Aufnahme im Labor. An die AG-Treffen und Events denke ich gerne zurück.

Hervorheben möchte ich außerdem Marijana Suzanj. Ohne dich, deine stetigen Hilfestellungen, Anleitungen, Erklärungen und Motivierungen hätte dieses Projekt nicht im gleichen Maße realisiert werden können.

Abschließend danke ich meinen Eltern für die stetige Unterstützung, die Ermöglichung der entsprechenden Rahmenbedingungen sowie der Hilfe dabei, den rechten Blickwinkel nicht zu verlieren.