



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Untersuchung des therapeutischen Effekts einer oralen  
Supplementation von Arginin auf die nicht-alkoholbedingte  
Fettlebererkrankung

verfasst von / submitted by  
Eva-Maria Stix, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2019 / Vienna 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim, Privatdoz.



## **Danksagung**

Ich möchte mich in dieser Form ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Vielen Dank, dass Sie mir mit zahlreichen wertvollen und konstruktiven Anregungen und Tipps stets zur Seite standen und die Durchführung und Erstellung meiner Arbeit ermöglicht haben.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe für die liebe Aufnahme ins Team und die große Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt hiermit Anja Baumann, die mir bei allen wissenschaftlichen Fragen immer mit einem guten Rat zur Seite stand. Danke auch für die aufbauenden Worte, wenn ein Versuch mehr als einen Anlauf brauchte und dadurch länger dauerte. Danke!

Danke auch an Dragana Rajčić, Annette Brandt, Beate Gärtner, Finn Jung, Anika Nier, Elisabeth Kaufmann, Vincent Winkler, Natalie Gray, Esther Pilar, Špela Kotar und Doris Sachata für das Beantworten meiner Fragen und die Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern Christa und Heimo, als auch bei meiner Schwester Barbara, und auch allen meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums bedanken. Danke für die stets motivierenden Worte, die Geduld und das Verständnis, welches ihr mir während meiner gesamten Universitätszeit, aber vor allem während meiner Masterarbeitsphase, entgegengebracht habt. Danke! Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Prävalenz und Pathogenese der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung .....	1
1.2 Behandlungsmöglichkeiten der NAFLD .....	6
1.2.1 Rolle von Arginin in der Prävention und Therapie der NAFLD .....	7
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	11
<b>2. Material</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Aufbau des Tierversuchs, Haltung .....	19
3.2 Gewebepräparation .....	20
3.3 Histologische Färbungen des Lebergewebes .....	21
3.4 Triglyceridisolierung aus der Mausleber nach Folch .....	27
3.5 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	29
3.6 ALT- & AST-Bestimmung .....	30
3.7 Statistische Auswertung .....	30
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1 Einfluss der oralen Gabe von L-Arginin auf die Nahrungsaufnahme und die hepatische Fetteinlagerung, sowie Parameter der Leberschädigung .	31
4.2 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Triglyceridkonzentration in der Leber .....	33
4.3 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von L- Arginin auf die hepatische Fetteinlagerung .....	33
4.4 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Leber .....	36
4.5 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Anzahl der F4/80-positiven Zellen in der Leber .....	37

<b>5. Diskussion</b> .....	39
5.1 Einfluss der Aufnahme einer Western-Style Diät mit Supplementierung von Arginin auf die Leberhistologie, die Leberverfettung und klinisch-chemische Parameter der Leberschädigung .....	40
5.2 Wirkung der kombinierten oralen Gabe einer Western-Style Diät und Arginin auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und F4/80-positiven Zellen .....	42
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	44
<b>7. Abstract/Summary</b> .....	46
Referenzen .....	VI
Anhang .....	
.....	XVI

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CV	Zentralvene
°C	Grad Celsius
ca.	circa
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFS	freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
g	Gramm
Gly-3P	Glyceraldehyd-3-Phosphat
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
IU	internationale Einheit ( <i>international unit</i> )
K	Kontrolle
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

L	Liter
LBP	Lipopolysaccharid-binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
MJ	Megajoule
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MS	metabolisches Syndrom
MW	Mittelwert
NAFLD	nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung ( <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NAS	NAFLD-Activity Score
NASH	nicht-alkoholbedingte Fettleberhepatitis ( <i>non-alcoholic steatohepatitis</i> )
NfE	stickstoff-freie Extraktstoffe ( <i>nitrogen-free extract</i> )
NFκB	Nuclear-Factor kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PT	Portalfeld
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure ( <i>phosphate buffered saline</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
sec	Sekunde
SPF	spezifisch pathogenfrei ( <i>specific pathogen free</i> )

TG	Triglycerid
TGR5	G-Protein gekoppelter Gallensalzrezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor – $\alpha$
versch.	verschiedene
WSD	Western-Style Diät

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Progression einer NAFLD-Erkrankung.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Harnstoff-Zyklus .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Schema des Versuchsaufbaus.....	20
<b>Abbildung 4:</b> Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Triglyceridkonzentration in der Leber.....	33
<b>Abbildung 5:</b> Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die hepatische Fettakkumulation.....	35
<b>Abbildung 6:</b> Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Zahl der Neutrophilen Granulozyten in der Leber.....	37
<b>Abbildung 7:</b> Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Anzahl der Makrophagen in der Leber ..	38

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Gruppeneinteilung der Versuchstiere .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Schritte der Paraffineinbettung .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Entparaffinierungs- und anschließende Rehydrierungsschritte bei der H&E-Färbung .....	22
<b>Tabelle 4:</b> Dehydrierung und Eosinfärbung .....	23
<b>Tabelle 5:</b> Semiquantitative Auswertung der Steatose nach dem NAS .....	23
<b>Tabelle 6:</b> Entparaffinierung, Rehydrierung, Fixierung und Färbung neutrophiler Granulozyten .....	24
<b>Tabelle 7:</b> Schritte der Makrophagen-Färbung .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Standardverdünnungsreihe des Bradford-Assays.....	29
<b>Tabelle 9:</b> Mittlere Nahrungsaufnahme, Start- und Endgewicht sowie Lebergewicht und weitere Parameter der Leberschädigung der Versuchstiere .....	32
<b>Tabelle 10:</b> Detaillierte Zusammensetzung der zwei Diäten .....	XVI

# 1. Einleitung

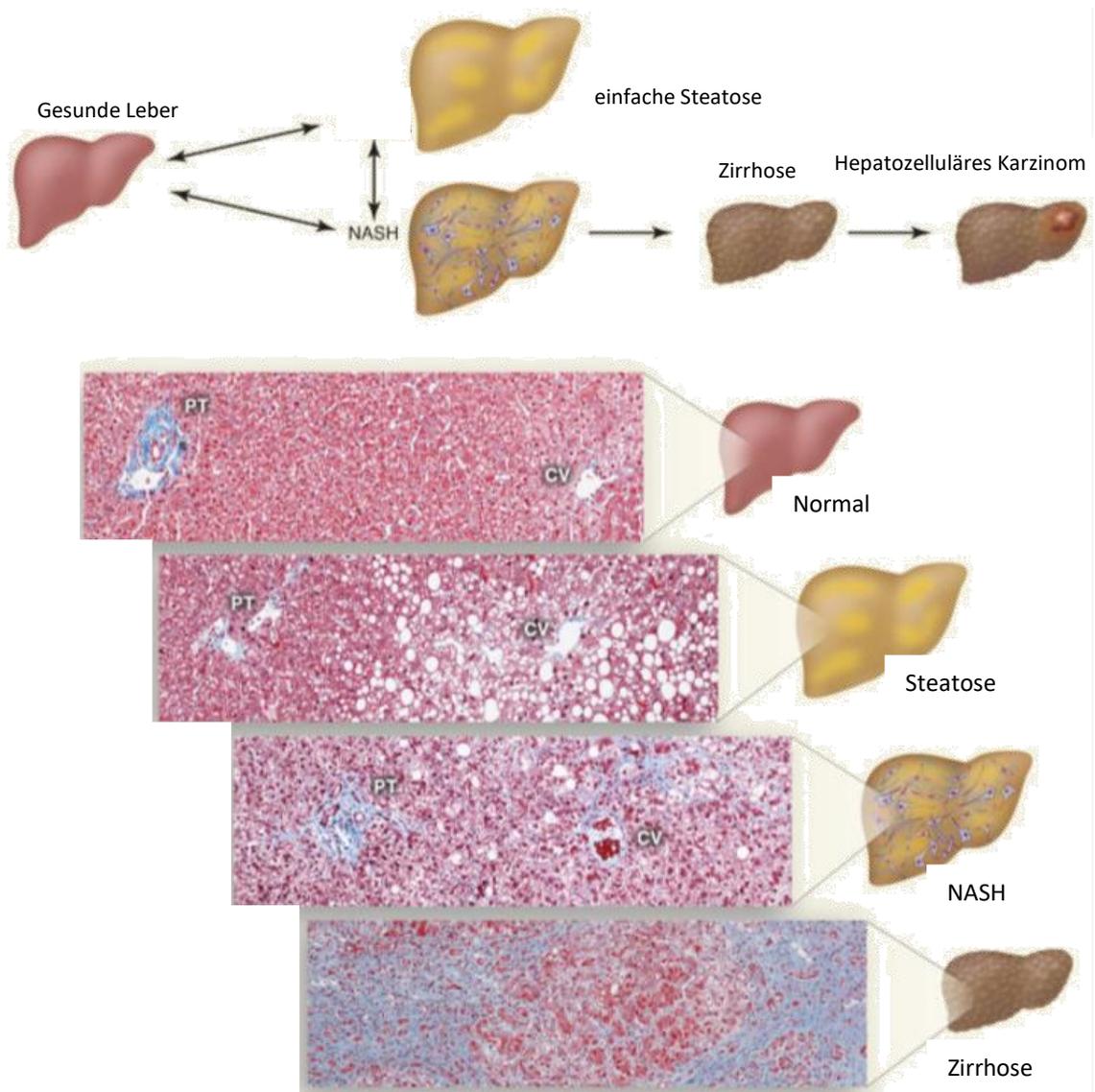
## 1.1 Prävalenz und Pathogenese der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung

### Definition und Prävalenz der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung

Im Jahr 1980 wurde der Begriff der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung (engl.: non-alcoholic fatty liver disease = NAFLD) erstmals in einer Publikation von Ludwig *et al.* erwähnt [1]. Dieser Begriff wurde verwendet, um das Krankheitsbild der NAFLD mit verstärkter Triglyceridakkumulation und fibrotischen Einlagerungen bei nicht vorhandenem Alkoholkonsum zu charakterisieren. Bei einem Alkoholkonsum von weniger als 20 g pro Tag sind hierbei mehr als 5% der Hepatozyten von einer Ansammlung von Triglyceriden (TG) betroffen, wobei die Ursachen von Medikamenten, Alkoholabusus und Hepatitis C-Infektion ausschließbar sind [2, 3].

Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung gilt in Europa, wie auch in den USA und Kanada, als die häufigste chronische Lebererkrankung [4]. Etwa 25% der Bevölkerung der westlichen Industrienationen leiden an einer NAFLD, die Prävalenz steigt jährlich rapide an [5, 6]. Die NAFLD schließt eine Vielzahl an Leberveränderungen ein, beginnend von der einfachen, reversiblen Steatose zur Steatohepatitis und Fibrose, bis zur irreversiblen Zirrhose und in weiterer Folge bis hin zum Leberkarzinom [7, 8].

In Abb. 1 ist das Spektrum der NAFLD zu sehen.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Progression einer NAFLD-Erkrankung** modifiziert nach Cohen *et al.* [9]. Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs einer NAFLD. Histologische Schnitte zeigen die einzelnen Stadien der NAFLD. Fetteinlagerungen in Form von Triglyceridansammlungen im Zytoplasma der Hepatozyten kennzeichnen die Steatose, wobei eine Steatose, die zusammen mit Inflammationen auftritt, als NASH bezeichnet wird. Eine NASH kann sich wiederum zu einer Zirrhose weiterentwickeln. Das Risiko für die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms ist bei Zirrhosepatienten deutlich gesteigert. Kollagenfasern sind blau eingefärbt.

Abkürzungen: CV = Zentralvene, PT = Portaltrakt, welches aus Arterie, Vene & Gallengang besteht

Die Steatose ist gekennzeichnet durch Fetteinlagerungen in der Leber. Die Steatohepatitis (= nicht-alkoholbedingte Fettleberhepatitis = engl.: non-alcoholic steatohepatitis = NASH) ist eine weiterführende Differenzierung der NAFLD. Bei

dieser reversiblen Form der Leberschädigung treten zusätzlich zur Fettansammlung in den Leberzellen, den so genannten Hepatozyten, auch noch inflammatorische Infiltrate auf. Etwa ein Fünftel bis ein Viertel der Patienten, welche an der einfachen Steatose leiden, entwickeln in Folge eine NASH [10, 11]. Zusätzlich kann es zu einer Fibrotisierung der Leber kommen, welche deren Funktionen weiter einschränken kann [10]. Das letzte Stadium der chronischen Leberkrankheiten stellt die Leberzirrhose dar. Bei etwa 2-10% der Patienten tritt diese Art der irreversiblen Leberschädigung auf. Begleitet wird die Fibrotisierung der Leber auch noch durch eine Gewebsnekrose [11, 12]. Mit jedem Stadium steigt auch das Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Ca. 2% aller Zirrhosepatienten entwickeln in späterer Folge ein solches Karzinom [8, 13].

Weltweit geht man von einer Prävalenz der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung von ca. 25% aus [2, 5]. Vor allem bei Kindern und Jugendlichen ist die Prävalenz, vorrangig auch in Kombination mit Adipositas und Insulinresistenz, sehr stark im Steigen [14-16].

Für die Entstehung der NAFLD entscheidende Risikofaktoren stellen beispielsweise genetische Faktoren, jedoch auch Adipositas, Übergewicht, das metabolische Syndrom (MS), die Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Hypertonie dar. Die Ergebnisse diverser Studien sind abhängig von Geschlecht, Studienpopulationsgröße, ethnischen Gruppen und Religion. Auch mit zunehmendem Alter steigt das Risiko der Entstehung einer nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung [2, 17-19].

Einzelne Risikofaktoren und Symptome für das metabolische Syndrom nehmen weltweit sehr rasant zu. Sie sind auch mit ausschlaggebend für die Verbreitung der NAFLD als hepatische Manifestation des MS [20, 21]. Außerdem steht der moderne westliche Ernährungsstil – reich an Kohlenhydraten, Fett und Cholesterin – sowie ein Mangel an Bewegung und gleichzeitig eine Überernährung in Verbindung mit der Manifestation der NAFLD [22].

## Pathogenese der NAFLD

Die Leber als zentrales Organ des gesamten Stoffwechsels ist unter anderem für die Verwertung von Nahrungsbestandteilen, die Produktion von Gerinnungsfaktoren, den Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen, die Galleproduktion etc. verantwortlich. Auch der enterohepatische Kreislauf stellt eine sehr essenzielle Funktion der Leber dar. Da die Leber diese große Anzahl an Aufgaben erfüllen muss, kann der Lipidmetabolismus von einer Vielzahl an Ursachen beeinflusst werden [23].

Die NAFLD wird charakterisiert durch einen erhöhten Zufluss freier Fettsäuren (FFS) und eine Akkumulation an Triglyceriden in der Leber. Dies führt zur reversiblen Steatose, ausgelöst durch Insulinresistenz und Übergewicht beziehungsweise Adipositas [24]. Bei der so genannten „de novo-Lipogenese“, bei welcher neue Fettsäuren synthetisiert werden, wird überschüssige Energie in Leberfett umgewandelt. Die FFS gehen über die Blutbahn in die Leber, die Folge ist eine erhöhte Konzentration an Fettsäuren [25]. Dies wiederum führt zu chronischen Entzündungsreaktionen, wobei es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und oxidativem Stress kommt [23].

Auch Adipokinen und Endotoxinen wird eine große Rolle in der Pathogenese der NAFLD zugeschrieben [26]. Die NAFLD geht mit einer erhöhten Darmpermeabilität einher, was wiederum einen erhöhten Übertritt von Endotoxinen ins portale Blut zur Folge hat [27]. Endotoxine sind in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommende Lipopolysaccharide (= LPS). Bei der Zerstörung von Bakterien werden diese freigesetzt und wirken dadurch toxisch. Durch eine bakterielle Fehlbesiedelung des Dünndarms sowie einer erhöhten Darmpermeabilität werden vermehrt LPS in das Pfortaderblut transportiert, was wiederum mit einer erhöhten Freisetzung von Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) assoziiert ist [28]. Lipopolysaccharide binden an das Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP) und in weiterer Folge an den TLR-4-assoziierten Cluster of

Differentiation 14. Dadurch werden Kupfferzellen, spezifische Makrophagen in der Leber, aktiviert [29]. Als Toll-like Rezeptoren werden eine Gruppe an Proteinen im angeborenen Nervensystem bezeichnet. Strukturen auf Krankheitserregern, so genannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs), werden dadurch erkannt und in weiterer Folge Gene aktiviert. Dadurch wird die Aktivierung des erworbenen Immunsystems eingeleitet. Die Toll-like Rezeptoren machen eine Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „nicht körpereigen“ für das angeborene Immunsystem möglich. TLRs können Signalkaskaden in Zellen auslösen, welche in weiterer Folge die Abwehr der Krankheitserreger einleiten [30].

Die Western-Style Diät (WSD), reich an Fett, Cholesterin und Fructose, kann zur Induktion einer NAFLD angewendet werden. Durch eine WSD kann es im Darm zu einer Reduzierung der Tight Junction Proteine, wie beispielsweise Occludin, kommen [31]. Tight Junction Proteine sind Membranproteine, welche eine Diffusionsbarriere für Moleküle im Zellzwischenraum bilden [32,33].

### Ursachen der NAFLD

Vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen konnte ein Zusammenhang zwischen der westlichen Ernährung, welche reich an Fett, Cholesterin und Zucker ist, einem gleichzeitig auftretenden Bewegungsmangel und der NAFLD festgestellt werden [34]. Auffällig ist auch, dass Patienten, welche an einer NAFLD leiden, häufig einen sehr geringen Konsum an Milch- und Vollkornprodukten sowie an Gemüse vorweisen, jedoch sehr viel Fleisch, Fett und Süßigkeiten zu sich nehmen. Dies kann bei übermäßiger Aufnahme zu einer positiven Energiebilanz beitragen [35, 36].

Die Fructose, welche durch die Nahrung aufgenommen wird, wird von der Leber mit Hilfe der Glukosetransporter 2 aufgenommen, durch die Fructokinase zu Fructose-1-Phosphat phosphoryliert und danach in Dihydroxyacetonphosphat

(DHAP) und Glyceraldehyd umgewandelt, wofür die Aldolase zuständig ist. Des Weiteren entsteht Glyceraldehyd-3-Phosphat (Gly-3P) aus der DHAP, sowie auch durch Übertragung der Phosphatgruppen des Glyceraldehyds. Im weiteren Schritt wird Gly-3P in Acetyl-Coenzym A abgebaut. Dadurch geht Gly-3P in die Fettsäuresynthese, die sogenannte Lipogenese, ein [37]. Der Konsum von Fruktose, verglichen mit der gleichen Menge an aufgenommener Glukose, ist mit einer erhöhten Lipogenese assoziiert [38,39]. Dies ist vor allem bei Personen bemerkbar, welche an Übergewicht oder Adipositas leiden und sich zwei Wochen lang von gesüßten Getränken ernähren, welche große Mengen an Glukose beinhalten [39]. Eine Studie von Teff *et al.* aus dem Jahr 2004 bestätigte jedoch auch, dass die Plasmatriglyceridspiegel von Erwachsenen nach nur einem Tag fructose-gesüßter Getränke anstiegen [40].

In mehreren Studien, welche teilweise von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Bergheim an der Universität Wien durchgeführt wurden, konnte man nachweisen, dass die durch Western-Style Diät induzierte hepatische Steatose, welche durch einen erhöhten Fructose- und Fettgehalt in der Nahrung zustande kommt, mit erhöhten Plasmaendotoxinspiegeln assoziiert ist und in weiterer Folge zu einer Induktion der TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) Expression und NF $\kappa$ B-Aktivität (Nuclear-Factor kappa B-Aktivität) führt [17,41,42]. Eine weitere Studie bestätigte, dass eine Western-Style Diät auch bei gesunden Personen zu einer Erhöhung des Plasmaendoxinspiegels von rund 71% führen kann [43]. Bei einem Versuch von Lieber *et al.* konnte durch die Fütterung einer WSD eine NASH mit den typischen Symptomen von Fettakkumulationen in den Hepatozyten, sowie auch Inflammationen, nachgewiesen werden [44].

## **1.2 Behandlungsmöglichkeiten der NAFLD**

Es gibt zum heutigen Stand der Wissenschaft keine spezifischen Therapieansätze zur Behandlung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung [45]. Die genauen Mechanismen zur Entstehung und zum Fortschreiten der

Erkrankung sind noch nicht vollständig erforscht, weswegen die aktuelle Forschung umso mehr darum bemüht ist, Therapie- und Behandlungsmöglichkeiten für NAFLD-Patienten zu finden [46].

Der erste und wichtigste Schritt bei der Behandlung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung ist eine Gewichtsabnahme mittels geeigneter Ernährung und sportlicher Aktivität, um die Verbesserung der Insulinresistenz zu erzielen. Auch die mit der NAFLD assoziierten metabolischen Erkrankungen und ihre Symptome, wie beispielsweise Diabetes, Hyperlipidämie oder das metabolische Syndrom, sollten behandelt werden, um einen Rückgang der Steatohepatitis zu bewirken [47].

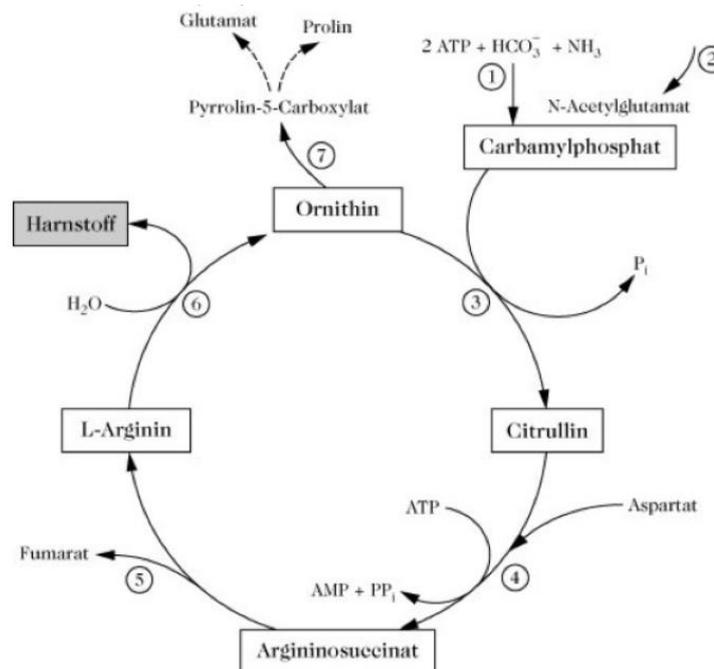
Da die Insulinresistenz eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der NAFLD spielt, haben insulinresistente Personen einen gesteigerten Einstrom freier Fettsäuren in die Leber. In weiterer Folge beginnt die Aktivierung der Lipogenese in der Leber, wodurch die Entwicklung einer Steatose möglich wird [48]. Ein essenzielles Medikament bei der Behandlung von Diabetes stellt Metformin dar, indem es die periphere Insulinsensitivität bei Diabetikern verbessert. Dadurch kann auch eine Verbesserung der NAFLD erzielt werden.

Auch die Aminosäure Arginin soll eine Wirkung auf sowohl die Prävention als auch die Therapie einer NAFLD haben. Eine Studie von Sellmann *et al.* aus dem Jahr 2017 bestätigt diese Annahme [42].

### **1.2.1 Rolle von Arginin in der Prävention und Therapie der NAFLD**

Arginin (Arg) gehört zur Gruppe der proteinogenen Aminosäuren (AS), welche in einer großen Anzahl von Nahrungsmitteln enthalten sind. Zu diesen zählen beispielsweise Milchprodukte, Meeresfrüchte, Fisch, diverse Getreidearten sowie auch Hülsenfrüchte, Nüsse und Wassermelonen [49]. Für Menschen gilt die basische Aminosäure Arginin als semi-essenziell, da gesunde Personen Arginin mit proteinhaltigen Nahrungsmitteln aufnehmen und die Aminosäure im menschlichen Körper auch aus Glutamin durch Citrullin synthetisiert werden

kann. Allerdings sind die Mengen der Eigensynthese nicht ausreichend, um den Bedarf vollständig zu decken [50]. Für Säuglinge ist Arginin jedoch essenziell, da sie nicht in der Lage sind, es selbstständig zu synthetisieren oder zu produzieren [51]. Arginin kann im Harnstoffzyklus aus Aspartat, Ornithin und Carbamoylphosphat synthetisiert werden (siehe Abbildung 2) [52].



**Abb. 2: Harnstoff-Zyklus** modifiziert nach Bol *et al.* [53]. Harnstoffsynthese und angrenzende Stoffwechselwege. Citrullin wird ATP-abhängig zu Argininosuccinat katalysiert, Argininosuccinat reagiert daraufhin unter Abspaltung von Fumarat zu Arginin. Im letzten Schritt katalysiert das Enzym Arginase die Reaktion von Arginin zu Ornithin, wobei unter Verbrauch von H<sub>2</sub>O Isoharnstoff entsteht, welcher mit Harnstoff im Gleichgewicht steht. 1: Carbam(o)ylphosphatsynthetase I, 2: Carbam(o)yl-phosphatase II (= N-Acetyl-glutamat-synthetase), 3: Ornithin-Transcarbam(o)ylase, 4: Argininosuccinatsynthetase, 5: Argininosuccinatlase, 6: Arginase, 7: Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase.

Stickstoffmonoxid (NO) wird während des Prozesses der Umwandlung im Zuge der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) gebildet und ist wichtig bei Entzündungsprozessen. Ornithin wird durch Arginase, ein Enzym, welches den letzten Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert, gebildet und ist Vorprodukt von

Prolin, einer nicht-essenziellen sekundären AS. Diese wiederum ist an den Vorgängen der Zellproliferation und Wundheilung beteiligt [54].

Arginin, welches aus der Nahrung aufgenommen wird, wird aktiv in den Enterozyten verstoffwechselt. Es ist beteiligt an diversen Funktionen im Darm, vermutlich sowohl unter Stress als auch bei Vorliegen von Entzündungen. Arginin kann bei Darmentzündungen den negativen Effekt minimieren [55]. Einige Studien weisen darauf hin, dass eine bakterielle Translokation durch eine orale Supplementation mit Arginin wieder ins Gleichgewicht gebracht werden kann [56, 57]. Diese Effekte von Arginin sind zurückzuführen auf ihre Metabolite NO und Polyamine. In oben genannten Studien konnte eine Supplementation von Arginin einen Anstieg an Bakterien in Lymphknoten nach der Gabe eines Stickstoffmonoxid-Inhibitors erzielen. NO ist auch ein wichtiges intra- und interzelluläres Signalmolekül, welches in der Regulation verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen beteiligt ist [58].

Polyamine sind fetthaltige Moleküle mit Aminogruppen. Vertreter davon sind unter anderem Putrescin, Spermidin und Spermin. Sie können aus Ornithin durch das Enzym Ornithindecaboxylase synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu kann Arginin durch Arginase zu Ornithin hergestellt werden. Studien haben ergeben, dass Polyamine für das Wachstum als auch die Wiederherstellung der gastrointestinalen Mukosa notwendig sind [59].

Immer mehr Patienten, welche an Adipositas, Diabetes oder einer Kombination aus beiden Krankheiten leiden, bekommen als Folgeerscheinung auch eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung. Oral aufgenommenes Arginin kann Entzündungsreaktionen und oxidativen Stress, welche bei einem hohen Konsum an Kohlenhydraten und Fett auftreten können, reduzieren [60]. Arginin agiert sowohl bei kranken als auch gesunden Personen als wichtige Aminosäure. Vor allem das kardiovaskuläre System profitiert davon. Patienten mit Risikofaktoren für Atherosklerose, wie beispielsweise Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabetes, wird deshalb eine orale Supplementation von Arginin empfohlen, da sich dadurch das Risiko, an Adipositas und Diabetes zu erkranken, verringern kann [60].

Eine Studie von Sellmann *et al.* aus dem Jahr 2007 untersuchte die Mechanismen von Arginin in der Prävention einer NAFLD im Mausmodell. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten einen positiven Effekt der Arginin-Supplementation bezüglich der Inflammation und Steatose des Gewebes der mit WSD gefütterten Mäuse [42]. Auch in einer weiteren Studie, welche die Auswirkungen einer Supplementation von Arginin untersuchte, konnten positive Effekte verzeichnet werden [61].

Nicht nur in der Prävention der NAFLD konnten Erfolge mithilfe einer Supplementation von Arginin erreicht werden, auch in der Therapie wurden bereits positive Ergebnisse, beispielsweise in Verbindung mit Gallensäuren, nachgewiesen [62].

Auch Butterworth *et al.* konnten einen positiven therapeutischen Effekt von Arginin bei bereits manifestierter nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung verzeichnen [63].

In einer Studie aus dem Jahr 1975 wurde Arginin als ein Konjugat der Cholsäure, einer Gallensäure, untersucht. Die Versuche zeigten in Tiermodellen gute Ergebnisse [64]. Diesem Beispiel folgten weitere Studien. Die Untersuchung von Arginin zur Behandlung von Lebererkrankungen, insbesondere der NAFLD, ist auch heute noch ein beliebtes Forschungsobjekt.

### 1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Weltweit zählt die NAFLD inzwischen zu den häufigsten chronischen Lebererkrankungen [65]. In den westlichen Ländern liegt die Inzidenz bei 20-30%, in Asien mittlerweile zwischen 5 und 18% [66]. Diabetes, Adipositas und das metabolische Syndrom zählen zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung [67].

Vor allem der Konsum einer fett-, cholesterin- und fructosereichen Ernährung wird mit der Pathogenese der NAFLD in Zusammenhang gebracht [68]. Ergebnisse mehrerer Studien weisen darauf hin, dass sich Änderungen der intestinalen Mikrobiota negativ auf die Entstehung einer nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung auswirken können [69]. Die NAFLD kann bei Patienten in jedem Alter auftreten, einige Studien lassen jedoch vermuten, dass die Prävalenz einer NAFLD mit zunehmendem Alter ansteigt [70].

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass die NAFLD bis 2020 in den USA die Hauptursache von Lebertransplantationen, Mortalität, sowie auch Morbidität in Hinsicht auf Lebererkrankungen sein wird [71]. Abgesehen von Gewichtsreduktion, Lebensstilveränderungen und gesteigerter körperlicher Aktivität sind die Therapiemöglichkeiten jedoch zum heutigen Stand der Wissenschaft begrenzt.

Eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe weist darauf hin, dass eine Supplementation mit Arginin das Risiko, an einer nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung zu erkranken, verringern kann [42].

Ausgehend von diesem Hintergrund liegt die zentrale Bedeutung der vorliegenden Arbeit in folgender Fragestellung:

- Kann eine orale Supplementation von Arginin als Therapie bei einer nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung eingesetzt werden?

## 2. Material

### Versuchstierhaltung und Probenentnahme

Weibliche C57BL/6J Mäuse	Janvier S.A.S., Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich
Experimentalfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Kontrolldiät (S0514-E770)	
Western-Style Diät (S0514-E760)	
Pellettfutter, V1534-300	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trinkflaschen	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Ketamin (C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ClNO)	BelaPharm GmbH, Fechta
Xylazin (C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> S)	Bayer AG, Leverkusen
Käfige	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fragmin p Forte	PFIZER Pharma GmbH, Berlin
Formaldehyd 37%ig	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

### Gewebepräparation (Einbettung und Gewebeschnitte)

Formalin (4%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) ≥ 99,8%, vergällt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Paraffin Paraplast®Plus™ Heizschrank für Paraffin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
EinbettSchälchen, Cryomold Intermediate Einbettkassetten Filterpapier für Einbettkassette	Weckert Labortechnik, Kitzingen Sanova Pharma GesmbH, Wien Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Streckbad GFR 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Objektträger Superfrost® plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Wärmeschrank Hera Therm IGS100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einbettstation: Cryo Console, Dispensing Console, Thermal Console (AP 250) Formalin 37%ig (PBS-gepuffert) Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) ≥ 99,8%, vergällt Mikrotom Leica RM 2245	Microm International GmbH, Walldorf Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar

## **Histologische und immunohistochemische Färbungen**

### Allgemeine Materialien und Geräte für Färbungen:

Digital Orbital Shaker	Benchmark Scientific, Waltham, USA
Entellan	VWR International GmbH, Darmstadt
Deckgläschen	VWR International GmbH, Darmstadt
Deckglas-Pinzette	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glasstab	Laborbestand
Färbetrog Glas	Sanova Pharma GesmbH, Wien

Färbegestell Kunststoff  
Färbeküvette Kunststoff  
Färbebox Kunststoff (feuchte Kammer)

Medite GmbH, Burgdorf  
Laborbestand  
Simport Scientific Inc., Saint-  
Mathieu-de-Beloeil, Kanada

Hämatoxylin & Eosin (H&E) – Färbung:

Hämatoxylin Lösung, Gill No. 2

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

Eosin Y Lösung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) ≥ 99,8%, vergällt

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Roti-Histol

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase – Färbung:

Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase Kit

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

Roti-Histol

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) ≥ 99,8%, vergällt

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Aceton

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Formalin 37%ig

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Wärmeschrank Hera Therm IGS100

Thermo Fisher Scientific,  
Waltham, USA

Hämatoxylin Lösung, Gill No. 2

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

wässriges Eindeckmedium

Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
Steinheim

Färbung von Makrophagen (F4/80):

Roti-Histol

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) ≥ 99,8%, vergällt Dako Real™ Peroxidase Block	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Anti-F4/80 Antikörper (ab6640)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Biotinylierter Sekundärantikörper (ab6733)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Dako Real™ Streptavidin – HRP	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Dako Real™ Substrat + DAB	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Albumin Fraktion V (BSA) > 98%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hämatoxylin Lösung, Gill No. 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PAP Pen	GeneTex Inc, Irvine, USA

Auswertung Färbungen:

Mikroskop AXIO Lab.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Mikroskop Leica DM6 B	Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar
Kamera Leica DMC 4500	Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar
Leica Application Suite X (LAS X)	Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar

### **Triglyceridisololation nach FOLCH**

Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Aluminiumblock zum Kühlen	Laborbestand
TRIGS – Triglycerid Kit (TR210)	RANDOX Laboratories limited, Crumlin, United Kingdom
Trichlormethan/Chloroform (CHCl <sub>3</sub> ) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol (CH <sub>4</sub> O) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Concentrator plus (Vakuumzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallhomogenisator Sono Plus	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Ultraschallbad Sonorex Digitec	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Homogenisator MICCRA D9	ART Prozess & Labortechnik GmbH, Müllheim-Hügelheim
Albumin Fraktion V (BSA) > 98%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Mixing Block MB 102	Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
96-well Platte, durchsichtig	VWR International GmbH, Darmstadt
Pufferwanne Kunststoff	Laborbestand
Microplate Reader SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, Biberbach an der Riß

### **Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Albumin Fraktion V (BSA) > 98%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

96-well Platte, durchsichtig	VWR International GmbH, Darmstadt
Pufferwanne Kunststoff	Laborbestand
Microplate Reader SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, Biberbach an der Riß

### **Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte**

Safe Seal Micro Tubes (0,5 ml; 1 ml; 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safe Seal Tubes für Blut/Plasma (0,5 ml und 1 ml, endotoxinfrei)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kolbenhubpipetten Research Plus (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenständer	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenhubpipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mehrkanalpipette Research Plus (150 µl; 300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schraubröhre/Falcon Tube (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
Vortexer REAX 2000	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Serologische Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierball macro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe LEVO	DLAB Scientific Inc., Agoura Hills, USA
Analysewaage RC 210S	Sartorius AG, Göttingen
Flüssigstickstoffbehälter	KGW Isotherm GmbH, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Laborbestand

Flockeneisbereiter EF103	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, USA
Magnetheizrührer RSM 10HS	Phoenix Instrument GmbH, Grabsen
ROTILABO® Economy-Magnetstäbchen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Alufolie	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Eppirack, versch. Größen	Laborbestand
Wägeschälchen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Pinzetten, Rasierklingen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Handschuhe XCEED Nitril	STARLAB GmbH, Hamburg
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Labortücher KIMTECH Science	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
dest. H <sub>2</sub> O	Laborbestand
pH-Meter Orion Star 420A	Orion Research Inc., Jacksonville, USA
Laborstifte Micronova	VWR International GmbH, Darmstadt
Papierhandtücher, Styroporboxen	Laborbestand

### **Software**

Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
SoftMax Pro 7 Software	Molecular Devices GmbH, Biberbach an der Riß
Leica Application Suite X (LAS X)	Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar

### 3. Methoden

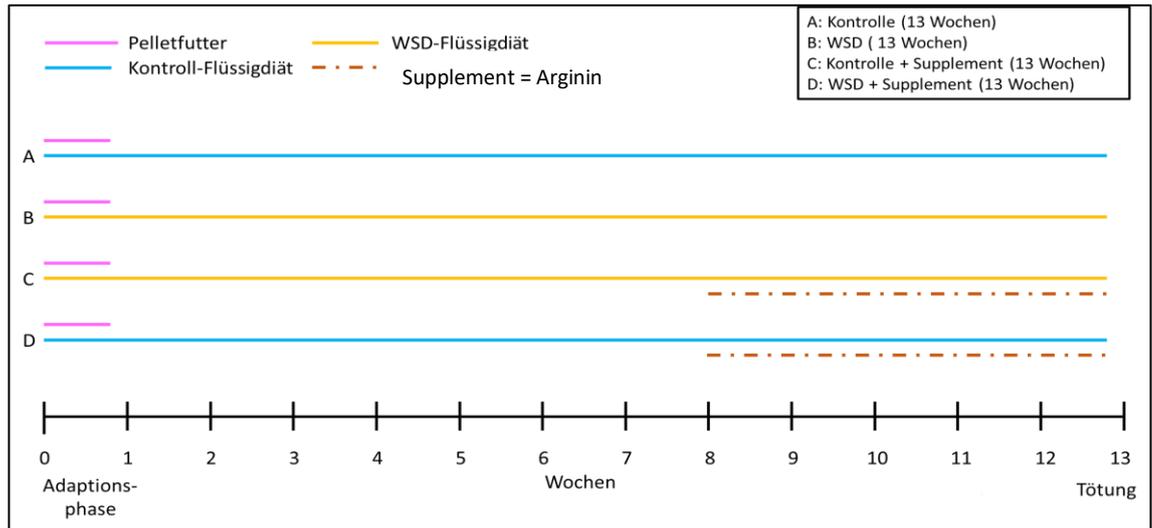
#### 3.1 Aufbau des Tierversuchs, Haltung

Die für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben wurden im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aus der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Universität Wien durchgeführt.

Sämtliche Proben für diese Arbeit lagen bereits vor Beginn des Versuchs vor. Aus diesem Grund wird im Folgenden der Versuchsaufbau nur kurz dargestellt: Alle Tiere hatten während des gesamten Versuchs ad libitum Zugang zu Wasser. Nach einer Adaptationsphase an den Verzehr der Flüssigdiät wurden die Tiere zunächst für acht Wochen entweder mit einer flüssigen Kontrolldiät oder einer fett-, fructose- und cholesterinreichen Diät isokalorisch ernährt (Zusammensetzung der Nahrung siehe Anhang Tabelle 10). Nach acht Wochen, in denen jene Tiere mit der fett-, fructose- und cholesterinreichen Ernährung eine Steatose mit beginnender Entzündung entwickelten, erhielt ein Teil der Tiere für weitere fünf Wochen eine Kontrolldiät oder Western-Style Diät, die mit Arginin (2,49 g/kg Körpergewicht) angereichert war oder die unangereicherte Diät (siehe Tabelle 1). Am Ende des Versuchs, nach Woche 13, wurden den Tieren unter terminaler Narkose Blut- und Gewebeproben entnommen, um die weiterführenden Untersuchungen zu ermöglichen.

**Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere**

Versuchsgruppe	Tieranzahl pro Gruppe	Fütterung und Behandlung
Kontrolle (K)	8	Kontrolldiät flüssig
Western-Style Diät (WSD)	8	WSD flüssig
K + Arginin (Arg)	8	Kontrolldiät flüssig + 2,49 g/kg Körpergewicht Arginin
WSD + Arg	8	WSD flüssig + 2,49 g/kg Körpergewicht Arginin



**Abbildung 3: Schema des Versuchsaufbaus.** Die Kontrollgruppe und die WSD-Gruppe bekamen eine standardisierte Flüssigdiät über die gesamte Versuchsdauer. Bei der WSD handelte es sich um eine fett-, fructose und cholesterinreiche Flüssigdiät. Die Kontrollgruppe + Arginin und die WSD-Gruppe + Arginin erhielt die letzten fünf Wochen eine Flüssigdiät, welche mit Arginin (2,49 g/kg Körpergewicht) angereichert war. Abkürzungen: WSD – Western-Style Diät

### 3.2 Gewebepreparation

Für die vorliegende Arbeit wurden histologische Schnitte angefertigt. Das Gewebe war hierfür zuvor wie folgt präpariert worden:

#### Einbetten der Leber in Paraffin und Anfertigung histologischer Gewebeschnitte

Zur Anfertigung von Gewebepreparaten wurden die entnommenen Gewebeproben in 4% PBS-gepuffertem Formalin (vgl. Anhang Lösung 3) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dies ermöglichte die Anfertigung von Gewebeschnitten, um Färbungen durchführen zu können. Eine detaillierte Durchführung des Einbettverfahrens ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Schritte der Paraffineinbettung**

<b>Inkubationszeit</b>	<b>Behandlung</b>
≥ 48 h	4% PBS-gepuffertes Formalin*
15 min	Spülen unter fließendem, kaltem Leitungswasser
≥ 1 h	75% Ethanol
≥ 1 h	85% Ethanol
über Nacht	95% Ethanol
≥ 3 h	100% Ethanol
30 min	100% Ethanol + Roti-Histol (1:1)
≥ 2 h	Roti-Histol
30 min	Paraffin I (60°C)
30 min	Paraffin II (60°C)
30 min	Paraffin III (60°C)

\* Zusammensetzung vgl. Anhang Lösung 3

Nach dreimaliger Inkubation in Paraffin für je 30 Minuten (min) wurden die Proben in Paraffinblöcke eingebettet und über Nacht gehärtet.

Im Vorfeld der immunohistologischen Färbung wurden zunächst 4 µm dicke Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und diese Schnitte dann in weitere Folge auf einen Objektträger übertragen. Vor der weiteren Verwendung wurden die Schnitte für drei Tage in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

### **3.3 Histologische Färbungen des Lebergewebes**

#### Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung

Die Hämatoxylin & Eosin-Färbung ist ein häufig angewandtes Färbeverfahren in der Histologie, welche einen histologischen Überblick mittels Kontrastfärbung des Gewebes liefert. Die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA sowie das Plasma, welches reich an rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) ist, werden bei der Färbung mit Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin ist ein roter, natürlicher

Farbstoff. Um seine färbende Wirkung zu erzielen, ist eine Oxidation zu Hämatein notwendig [72].

Die Eosinfärbung dient dazu, alle Zytoplasmateile, welche reich an glattem ER sind, sowie faserige extrazelluläre Komponenten, rosa bis rot zu färben. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff, der alle acidophilen, basischen Strukturen, vor allem Zellplasmaproteine, Mitochondrien, glattes ER, Kollagen, Erythrozyten und Keratin rot färbt. Die Zellkerne erscheinen aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung rotbraun. Die Senkung des pH-Wertes durch Leitungswasser führt zu einem Farbumschlag und somit zur Fixierung des Hämatoxylins. Dieses Phänomen ist auch unter dem Begriff „Bläuen“ bekannt, da der Farbton der Zellkerne von rotbraun in blauviolett wechselt [73].

Vor Beginn der Färbung wurden die zuvor bei 37°C getrockneten Leberschnitte zunächst mit Roti-Histol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Entparaffinierungs- und anschließende Rehydrierungsschritte bei der H&E-Färbung**

Inkubationszeit	Behandlung
20 min	Roti-Histol
10 min	100% Ethanol
10 min	95% Ethanol
10 min	85% Ethanol
10 min	70% Ethanol
10 min	30% Ethanol
2 x 10 min	dest. H <sub>2</sub> O

Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 30 sec (Sekunden) in Hämatoxylin inkubiert und anschließend für 30 sec zum „Bläuen“ in Leitungswasser geschwenkt. Dieser Vorgang wurde noch ein zweites Mal mit

frischem Leitungswasser wiederholt. Um die Hämatoxylin-Färbung abzustoppen wurden die Präparate kurz für ca. 1 min in destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss daran folgte die Färbung mit Eosin. Dafür wurden die Objektträger mit den Leberschnitten zunächst dehydriert und dann die Eosinlösung mit einer Pipette für zirka ein bis zwei Sekunden aufgetragen (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Dehydrierung und Eosinfärbung**

<b>Inkubationszeit</b>	<b>Behandlung</b>
10 min	75% Ethanol
10 min	85% Ethanol
1-2 sec	Eosin Y Lösung
10-20 sec	in 95% Ethanol spülen
10-20 sec	in 100% Ethanol spülen
20 min	Roti-Histol

Anschließend wurden die Präparate mit Alkohol und Roti-Histol inkubiert, wodurch das Wasser aus den Schnitten verdrängt wurde. Die Präparate wurden abschließend mittels Entellan und mit einem Deckgläschen möglichst luftblasenfrei eingedeckt und unter einem Abzug über Nacht getrocknet.

Die Befundung der Leberhistologie wurde mit dem Mikroskop unter Anwendung des so genannten NAFLD-Activity Score (NAS) durchgeführt [74]. Zu diesem Zweck wurden von jedem Schnitt acht Bildausschnitte gewählt und der Grad der Steatose sowie der Inflammation wurde von Frau Prof. Dr. Bergheim semiquantitativ ausgewertet (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Semiquantitative Auswertung der Steatose nach dem NAS**

<b>Grad der Steatose/Inflammation</b>	<b>Fettanteil in Flächenprozent</b>	<b>Inflammationen (Herde) pro Gesichtsfeld</b>
0	< 5%	Abwesend
1	5% - 33%	< 2

2	34% - 66%	2 - 4
3	> 66%	> 4

### Naphtol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung

Die Naphtol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung dient dem histologischen Nachweis von neutrophilen Granulozyten im Gewebe. Die Hydrolysierung von AS-D Chloroacetat erfolgt enzymatisch durch spezifische Esterasen, wobei Naphtolverbindungen frei werden. Diese binden an Diazoniumsalze, wodurch an Enzymaktivitätsstellen pinkfarbene Ablagerungen entstehen. Verläuft die Färbung erfolgreich, sind neutrophile Granulozyten im Anschluss durch pinkfarbene Ablagerungen im Zytoplasma mikroskopisch erkennbar. Die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA werden wie bei der H&E-Färbung durch Hämatoxylin kenntlich gemacht [75].

Diese Färbung wurde nach den Angaben des Herstellers des Naphtol AS-D Chloroacetate Esterase Kits durchgeführt. Wie bereits oben angeführt wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 6).

Anschließend wurden die Präparate mit der CAF-Fixierlösung (siehe Anhang Lösung 5) für 30 Sekunden inkubiert. Die eigentliche Färbung mit der frisch hergestellten Färbelösung (siehe Anhang Lösung 6) wurde im Anschluss lichtgeschützt bei 37°C für 15 Minuten durchgeführt.

**Tabelle 6: Entparaffinierung, Rehydrierung, Fixierung und Färbung neutrophiler Granulozyten**

Inkubationszeit	Behandlung
10 min	Roti-Histol
5 min	100% Ethanol
5 min	95% Ethanol
5 min	70% Ethanol
2 x 5 min	dest. H <sub>2</sub> O
30 sec	1- 4 Tropfen der CAF-Lösung**

60 sec	Spülen in dest. H <sub>2</sub> O
15 min	1- 4 Tropfen Färbelösung ***
2 min	Spülen in dest. H <sub>2</sub> O

\*\* Zusammensetzung siehe Anhang Lösung 5

\*\*\* Zusammensetzung siehe Anhang Lösung 6

Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Färbeporgang wurde wiederum mit Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser gestoppt. Letztendlich wurden die fertig gefärbten Schnitte mit einem wässrigen Eindeckmedium eingedeckt und über Nacht getrocknet.

Zur Auswertung der Färbung der neutrophilen Granulozyten wurden bei 200-facher Vergrößerung mit Hilfe des Mikroskops pro Objektträger acht Bildausschnitte gewählt und davon repräsentative Bilder angefertigt. In jedem dieser Bilder wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ausgezählt. Am Ende wurde ein Mittelwert der Anzahl neutrophiler Granulozyten jeder Probe gebildet.

#### Färbung von Makrophagen (F4/80)

Makrophagen sind Leukozyten und dadurch Teil des Immunsystems. Kommen Makrophagen in Kontakt mit Infektionen, können sie, ähnlich den neutrophilen Granulozyten, in das betroffene Gewebe einwandern und körperfremde, sowie auch körpereigene Substanzen abbauen [76]. Makrophagen können in allen Organen vorkommen, in der Leber werden sie auch Kupffer-Sternzellen genannt. Makrophagen können körperfremde Proteine und Glykoproteine erkennen, aber auch gealterte, zerstörte sowie apoptotische körpereigene Zellen beseitigen [77]. Mithilfe der Färbung der F4/80-positiven Zellen werden in der Leber die Kupfferzellen als Gewebemakrophagen dargestellt. Sie weisen eine starke braune Membranfärbung auf. Je mehr Lipopolysaccharide in der Zellwand von gramnegativen Bakterien vorhanden sind, desto mehr Botenstoffe werden freigesetzt. Dadurch erscheint die Braunfärbung der Membran stärker ausgeprägt [78].

Im ersten Schritt der Färbung von F4/80-positiven Zellen wurden die Leberschnitte entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Peroxidase-Block für 20 min in einer Färbebox inkubiert, bevor 1x PBS (siehe Anhang Lösung 2), sowie 5% BSA/PBS (siehe Anhang Lösung 8) aufgetragen wurde. Danach wurden die Schnitte mit Primär-AK (Primär-Antikörper) ab6640, Sekundär-AK ab6733, Streptavidin-HRP, Substrat + DAB, sowie auch erneut mit 1x PBS inkubiert (siehe Tabelle 7). Die Schnitte wurden vor den Behandlungen einmalig mit einem PAP Pen umrandet, um das Auslaufen der Flüssigkeiten zu verhindern.

**Tabelle 7: Schritte der Makrophagen-Färbung**

<b>Inkubationszeit</b>	<b>Behandlung</b>
10 min	Roti-Histol
5 min	100% Ethanol
5 min	95% Ethanol
5 min	70% Ethanol
5 min	dest. H <sub>2</sub> O
20 min	Peroxidase-Block
2 x 5 min	1x PBS
25 min	5% BSA/PBS
2 x 5 min	1x PBS
1,5 h	Primär-AK Anti-F4/80
3 x 5 min	1x PBS
30 min	Biotinylierter Sekundär-AK
3 x 5 min	1x PBS
20 min	Streptavidin-HRP
3 x 5 min	1x PBS
1 min 10 sec	Substrat + DAB

Anschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Auch hier wurde der Färbeporgang mit Leitungswasser sowie mit destilliertem Wasser gestoppt. Danach wurden die Schnitte noch jeweils für ca. 10 sec in eine aufsteigende

Alkoholreihe (70%, 95% und 100%) und Roti-Histol gelegt, um das Wasser aus den Schnitten zu verdrängen. Letztendlich wurden die fertig gefärbten Schnitte noch mit Entellan sowie einem Deckgläschen eingedeckt und über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gelegt.

Zur Auswertung der Färbung der Makrophagen wurden bei 200-facher Vergrößerung mit Hilfe des Mikroskops pro Objektträger acht Bildausschnitte gewählt und davon repräsentative Bilder angefertigt. In jedem dieser Bilder wurde die Anzahl der Makrophagen gezählt und am Ende ein Mittelwert der Makrophagenanzahl jedes Objektträgers gebildet.

### **3.4 Triglycerid isolation aus der Mausleber nach Folch**

Um die Triglyceridkonzentration in der Leber zu bestimmen, wurde die Triglyceridextraktion nach Folch et al. durchgeführt [79]. Dabei wird die Gewebeprobe mit Methanol und Chloroform behandelt, wodurch es zu einer Phasentrennung kommt, bei der die Lipide in der unteren Chloroformphase zu finden sind.

Zunächst wurden von jeder Mausleberprobe ca. 70-80 mg tiefgefrorenes Lebergewebe in eiskaltem 2x PBS (vgl. Anhang Lösung 4) homogenisiert und im Anschluss daran zwei Mal mit dem Ultraschallhomogenisator für 20 sec mit einer Amplitude von 100% und 0,7 Zyklen behandelt. Die Proben wurden mit einem Vortexer gemischt und von jedem Homogenisat wurden 500 µl für die Triglyceridbestimmung entnommen. Der Rest des Homogenisates wurde für die Proteinbestimmung (siehe Kapitel 3.5 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford) auf Eis gelegt.

Die Proben für die Triglyceridbestimmung wurden auf 80°C erhitzt und verblieben dann für 5 min bei 80°C im Mixing Block. Danach wurden sie auf Raumtemperatur (= RT) abgekühlt. Nach Erreichen der RT wurde 250 µl Methanol zugesetzt und 2x für 10 sec mit dem Vortexer durchgemischt bevor die Proben für drei Minuten

in ein Ultraschallbad gegeben wurden. Im nächsten Schritt wurden 500 µl Chloroform hinzugefügt, die Proben wieder gut durchgemischt und für 10 min in einem Ultraschallbad belassen, bevor sie für 2h inkubiert wurden. Die nachfolgende Zentrifugation wurde für 5 min bei 4°C durchgeführt. 200 µl der unteren Chloroformphase wurden abgenommen, indem man durch das beim Zentrifugieren entstandene Pellet stach und die untere Phase mittels Pipette abnahm. Diese 200 µl Chloroform wurden mittels Vakuumkonzentrator abgedampft. Im Anschluss daran wurden 200 µl 5% BSA (vgl. Anhang Lösung 7) zu den konzentrierten, abgedampften Proben hinzugefügt und danach für 10 min auf 55°C erhitzt. Es folgten zwei weitere Ultraschallhomogenisationen für je 20 sec mit einer Amplitude von 100% und 0,7 Zyklen bevor die Proben für 1h in den auf 55°C erhitzten Mixing Block gestellt wurden. Im letzten Schritt wurden sie über Nacht bei -80°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min auf 55°C erhitzt, wiederum zwei Mal mit dem Ultraschallhomogenisator für 20 sec mit einer Amplitude von 100% und 0,7 Zyklen behandelt und ein letztes Mal für 1h im 55°C warmen Mixing Block gehalten. Die Messung der TG erfolgte nach Angaben des Herstellers des TRIGS Triglycerid Kits wie folgt:

Für die Pufferlösung wurden 15 ml des Puffers mit dem im Kit vorhandenen Enzymreagenz vermischt. Je 2 µl der Proben, des Blanks (5% BSA) sowie auch des Standards wurden in Dreifachbestimmung pro Well in einer durchsichtigen 96-well Platte aufgetragen. Diese 2 µl wurden mit je 200 µl des Enzymreagenzes versetzt, im vorgeheizten Photometer bei 37°C für 10 min inkubiert und danach bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Die Proben, wie auch der Standard wurden vor dem Auftragen gut durchgemischt. Die TG-Konzentration in der Leber wurde wie folgt berechnet und als Triglyceride [µg/mg Protein] angegeben:

$$\text{TG – Konzentration} = \frac{(\text{Probe} - \text{Blank})}{(\text{Standard} - \text{Blank}) \cdot 195}$$

$$\text{Standardkonzentration} = 190 \text{ [mg/dl]}$$

$$\text{Triglyceride [µg/mg]} = \text{TG – Konzentration} / \text{Proteinkonzentration}$$

### 3.5 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben, die zur Bestimmung des Triglyceridgehalts in der Leber verwendet wurden, wurde die Proteinnachweismethode nach Bradford herangezogen [80]. Hierbei verschiebt der Farbstoff Coomassie-Blau das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm, indem er mit basischen Aminosäuren reagiert und von der kationischen in die anionische Form übergeht [81]. Die Proteinkonzentration kann dann mithilfe einer Absorptionsmessung bei 595 nm im Vergleich zu einer Standardgeraden gemessen werden. Die Proteinstandardreihe (vgl. Tabelle 8) wurde dabei aus einer BSA-Stammlösung (100 µl BSA/ml Extraktionspuffer) und dem Extraktionspuffer hergestellt. Zur Herstellung des Extraktionspuffer wurden 25 µl 2x PBS (vgl. Anhang Lösung 4) mit 975 µl destilliertem Wasser gemischt. Die Standardreihe sowie die 1:40 mit destilliertem Wasser verdünnten Proben wurden als Dreifachbestimmung mit 200 µl Farbreagenz versetzt. Dabei wurden je 5 µl der Probenverdünnung, sowie auch der Standardreihe pro Well einer durchsichtigen 96-well Platte aufgetragen. Das Farbreagenz wurde aus 8 ml destilliertem Wasser und 2ml Dye Reagent Concentrate hergestellt. Im Anschluss daran konnte die Absorption mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Der Blank wurde anschließend von den Proben abgezogen, um die Proteinkonzentration ausrechnen zu können. Mithilfe der Standardreihe wurde eine Standardgerade erstellt. Somit erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration (in mg/ml) der Proben unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors.

**Tabelle 8: Standardverdünnungsreihe des Bradford-Assays**

	<b>Protein</b>	<b>1:40 verdünnter Probenpuffer [µl]</b>	<b>Konzentration [mg BSA/ml]</b>
<b>A</b>	2 µl Stammlösung	198 µl	1,0
<b>B</b>	100 µl A	100 µl	0,5
<b>C</b>	100 µl B	100 µl	0,25
<b>D</b>	100 µl C	100 µl	0,125

<b>E</b>	100 µl D	100 µl	0,0625
<b>F</b>		100 µl	0

### 3.6 ALT- & AST-Bestimmung

Die Bestimmung der Aktivität der ALT (= Alanin-Transferase) und AST (= Aspartat-Aminotransferase) im Plasma wurde in einem Routinelabor des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität in Jena durchgeführt.

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den tierexperimentellen Untersuchungen sowie die grafische Darstellung der hier beschriebenen Daten erfolgte ausschließlich mittels GraphPad Prism 7.0.

Die Ergebnisse der Gruppen werden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Mögliche Ausreißer wurden mithilfe des Grubbs-Tests eliminiert. Bei Normalverteilung, getestet mithilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests, sowie auch bei Varianzhomogenität, getestet mit einem Barlett-Test und einem Brown-Forsythe-Test, wurde eine Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Test nach Turkey herangezogen. Bei fehlender Varianzhomogenität wurden die Daten transformiert. Als signifikant wurden nur jene Unterschiede bezeichnet, bei welchen ein p-Wert von  $\leq 0,05$  ermittelt wurde.

## **4. Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeproben aus einem im Vorfeld der Arbeit von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuch verwendet.

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse wurden dafür neben den Messergebnissen, die im Rahmen der Arbeit erhoben wurden, auch Daten der Fütterung, wie beispielsweise die Nahrungsaufnahme und der Gewichtsverlauf, mit ausgewertet.

### **4.1 Einfluss der oralen Gabe von L-Arginin auf die Nahrungsaufnahme und die hepatische Fetteinlagerung, sowie Parameter der Leberschädigung**

Die mittlere Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen wird in Tabelle 9 zusammengefasst.

Um den Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät, sowie die orale Behandlung mit L-Arginin in den letzten fünf Wochen des Versuchs auf den Leberstatus beurteilen zu können, wurden bei der Probenentnahme sowohl das Körpergewicht als auch das Gewicht der Leber bestimmt, um daraus die Leber-/Körpergewichts-Ratio (%) zu ermitteln. Weiterhin wurden die Aktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Plasma des Pfortaderblutes aller vier Versuchsgruppen in einem Routinelabor gemessen (siehe Tabelle 9).

Da die Tiere über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb der Kontrollgruppe bzw. der WSD-Gruppe paargefüttert wurden, unterschied sich die Futteraufnahme zwischen verschiedenen Versuchstiergruppen nicht signifikant. Das Lebergewicht und die Leber-/Körpergewichts-Ratio waren bei den Western-Style Diät- gefütterten Tieren, verglichen mit den Kontrolltieren, signifikant erhöht.

Das Körpergewicht, das sich zu Beginn des Versuchs nicht zwischen den Gruppen unterschied, war auch am Ende des Versuchszeitraums nicht signifikant unterschiedlich.

Die Werte des Lebergewichts und der Leber-Körpergewichts-Ratio sind in beiden WSD-Gruppen signifikant höher als in den zwei Kontrollgruppen.

Die Aktivität der ALT und AST im Plasma unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, jedoch streuten die Werte deutlich innerhalb der Gruppen.

**Tabelle 9: Mittlere Nahrungsaufnahme, Start- und Endgewicht sowie Lebergewicht und weitere Parameter der Leberschädigung der Versuchstiere**

<b>Diätgruppe</b>				
	<b>K</b>	<b>K + Arg</b>	<b>WSD</b>	<b>WSD + Arg</b>
<b>n</b>	8	8	8	8
<b>Nahrungsaufnahme (kcal/Maus/Tag)</b>	9,0 ± 0,7	9,2 ± 0,7	9,2 ± 0,8	9,2 ± 0,9
<b>Startgewicht (g)</b>	17,9 ± 0,8	18,1 ± 0,3	18,0 ± 0,8	17,7 ± 0,4
<b>Endgewicht (g)</b>	23,4 ± 2,8	25,1 ± 1,4	22,9 ± 0,5	23,0 ± 0,7
<b>absolute Gewichtszunahme (g)</b>	5,5 ± 2,1	6,9 ± 1,3	4,6 ± 0,9	5,0 ± 1,1
<b>Lebergewicht (g)</b>	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>a,b</sup>
<b>Leber-/Körpergewichts-Ratio (%)</b>	4,7 ± 0,2	5 ± 0,2	6,8 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	6,7 ± 0,4 <sup>a,b</sup>
<b>AST (U/L)</b>	51,9 ± 14,7	63,3 ± 17,4	77,6 ± 17,4	58,1 ± 15,2
<b>ALT (U/L)</b>	23,1 ± 11,2	29,6 ± 8,7	36,6 ± 6,5	27,0 ± 8,0

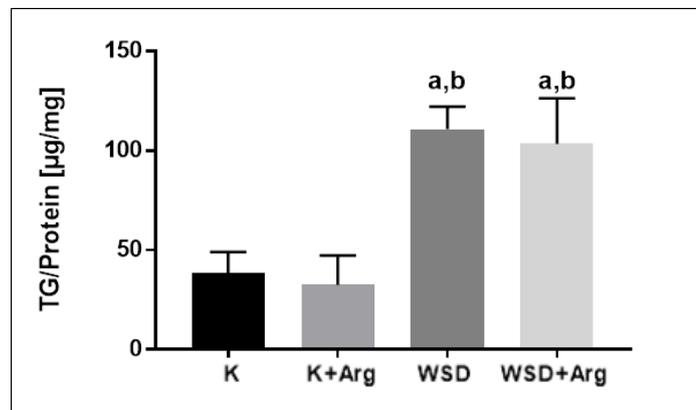
<sup>a</sup> p < 0,05 im Vergleich zur K, <sup>b</sup> p < 0,05 im Vergleich zur K + Arg, Abkürzungen: K – Kontrolldiät, WSD – Western-Style Diät, Arg – Arginin, AST – Aspartat-Aminotransferase, ALT – Alanin-Aminotransferase, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben

## 4.2 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Triglyceridkonzentration in der Leber

Um die Konzentration an Triglyceriden in der Leber bestimmen zu können, wurde die Triglyceridextraktion nach Folch et al. durchgeführt [79].

Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Kontrollgruppe + Arginin war die Triglyceridkonzentration bei der Gruppe mit Western-Style Diät, als auch bei der Western-Style Diät + Arginin-Gruppe signifikant höher (Abb. 4).

Jedoch unterschieden sich weder die Kontrollgruppen noch die WSD-Gruppen innerhalb der Gruppen signifikant.



**Abbildung 4: Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Triglyceridkonzentration in der Leber** (n=5-8); Statistische Auswertung der Anzahl der Triglyceridkonzentration, K = Kontrolldiät, WSD = Western-Style Diät, Arg = Arginin, TG = Triglyceride, <sup>a</sup>p<0,05 im Vergleich mit K, <sup>b</sup>p<0,05 im Vergleich mit K+Arg, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben

## 4.3 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von L-Arginin auf die hepatische Fetteinlagerung

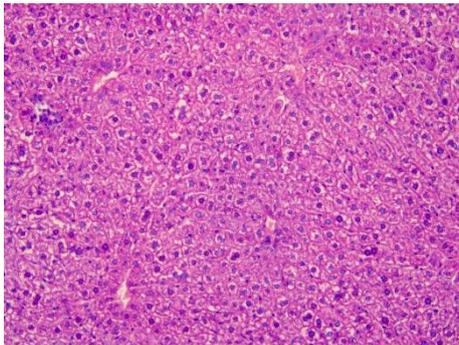
Um den Grad der Leberschädigung beziehungsweise den therapeutischen Effekt der Behandlung mit Arginin auf die Leber zu erfassen, wurden histologische

Präparate der Leber mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und unter Verwendung des NAFLD-Activity Score (NAS) befundet [74].

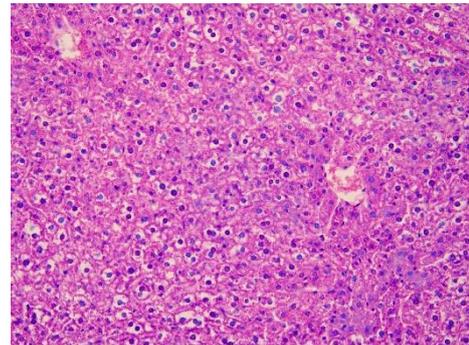
Weder bei den Kontrolltieren noch bei den mit Kontrolldiät + Arginin gefütterten Tieren zeigte sich eine Verfettung oder Entzündung. Bei den WSD gefütterten Tieren fand sich eine deutlich höhere Fettakkumulation als bei den Kontrolltieren ( $p= 0,0014$ ) (Abb. 5). Der Grad der Steatose war sowohl bei der Gruppe der WSD-Mäuse als auch der mit WSD + Arginin gefütterten Tiere signifikant höher als bei den Tieren der beiden Kontrollgruppen (Abb. 5). Der NAS war sowohl in der WSD- als auch in der WSD + Arginin-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Zusätzlich dazu war der Score der mit WSD gefütterten Mäuse auch signifikant erhöht im Vergleich zur WSD + Arginin Gruppe und zur Kontrollgruppe, welche zusätzlich Arginin bekam ( $p=0,0009$  bzw.  $p=0,00001$ ). Außerdem unterschied sich die Art der Verfettung zwischen den Tieren, welche mit Western-Style Diät gefüttert wurden und jenen, die zusätzlich die Aminosäure Arginin aufnahmen. Bei den mit WSD gefütterten Tieren lag größtenteils eine makrovesikuläre Verfettung der Hepatozyen vor (Abb. 5A).

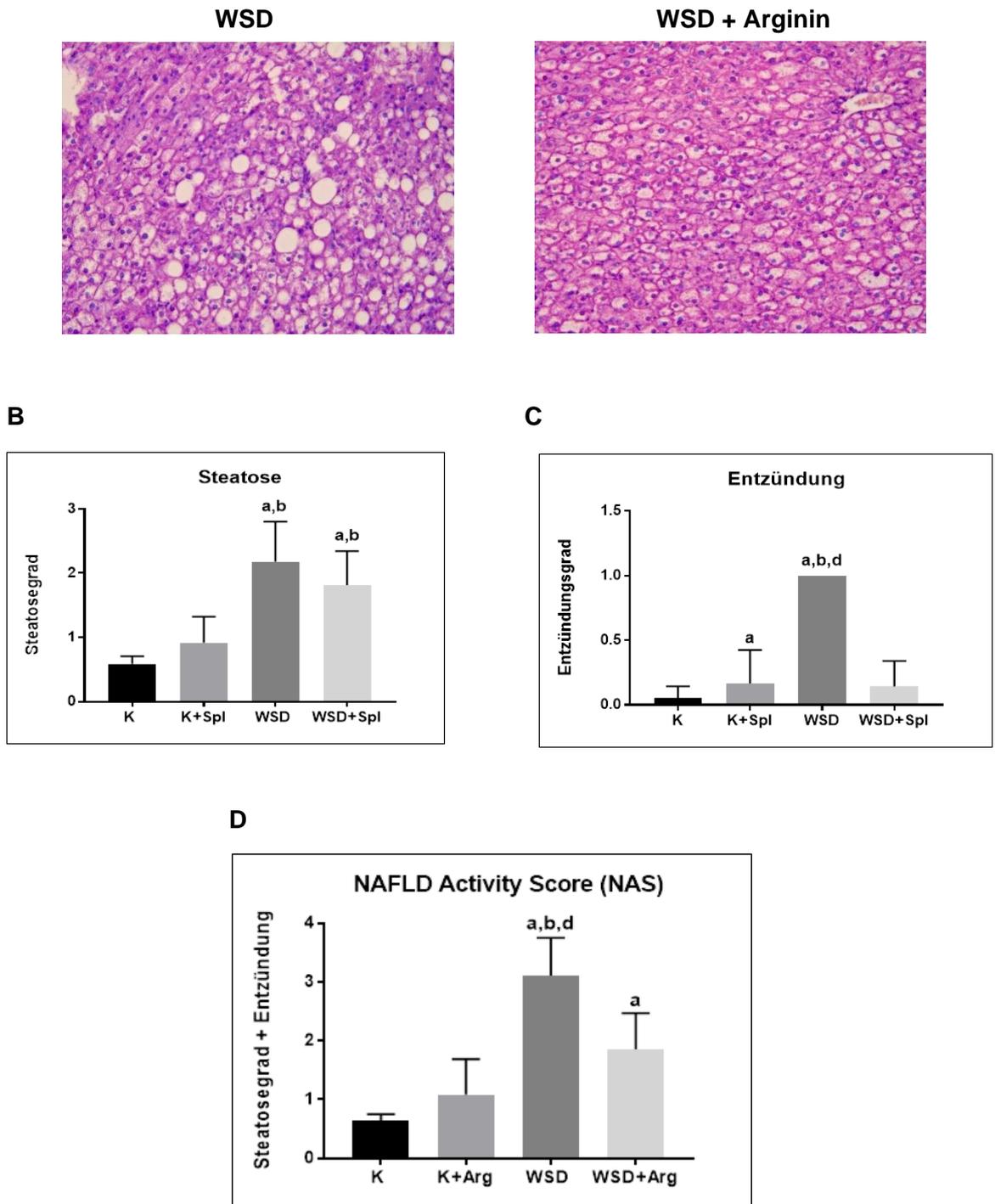
**A**

**Kontrolle**



**Kontrolle + Arginin**



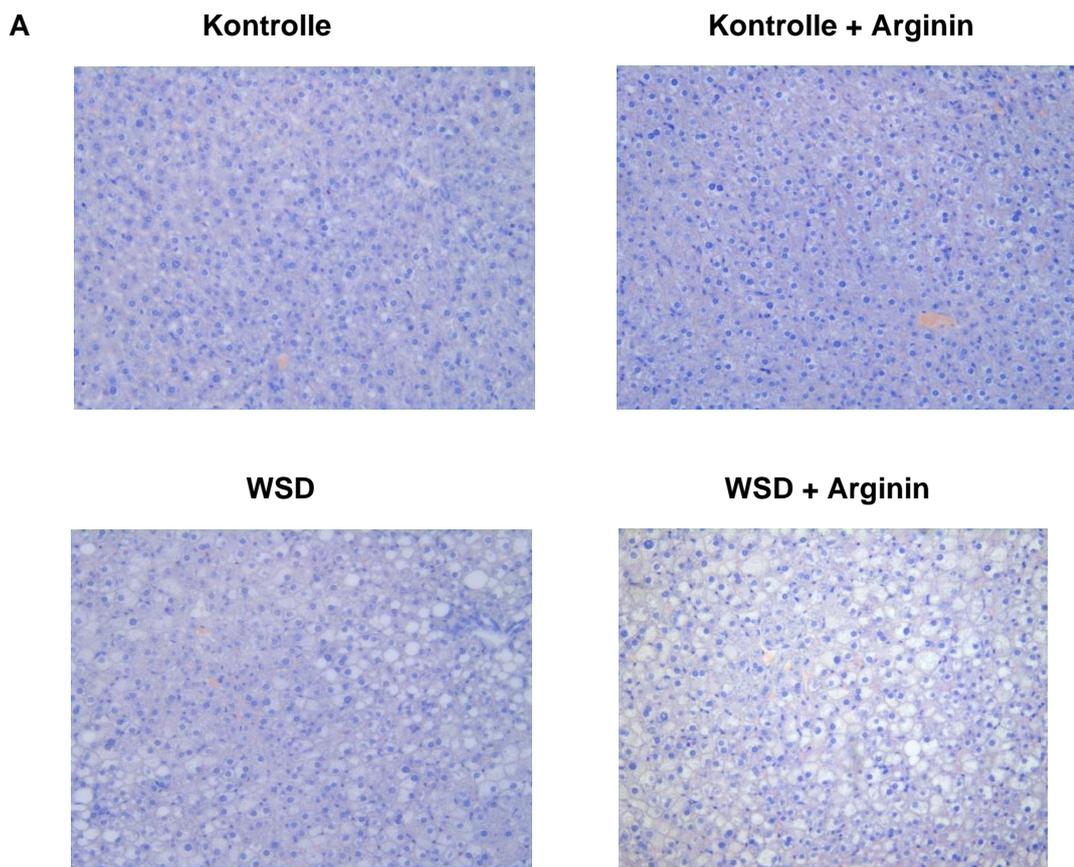


**Abbildung 5: Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die hepatische Fettakkumulation (n=6-8); A) Repräsentative Bilder der H&E-Färbung in 200-facher Vergrößerung, B) Statistische Auswertung des Steatose-Grades der H&E-Färbung, C) statistische Auswertung des Entzündungsgrades der Leber, D) statistische Auswertung des NAS, K = Kontrolldiät, WSD = Western-Style Diät, Arg = Arginin, <sup>a</sup> p<0,05 im Vergleich mit K, <sup>b</sup> p<0,05 im Vergleich mit K+Arg, <sup>d</sup> p<0,05 im Vergleich mit WSD+Arg, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben**

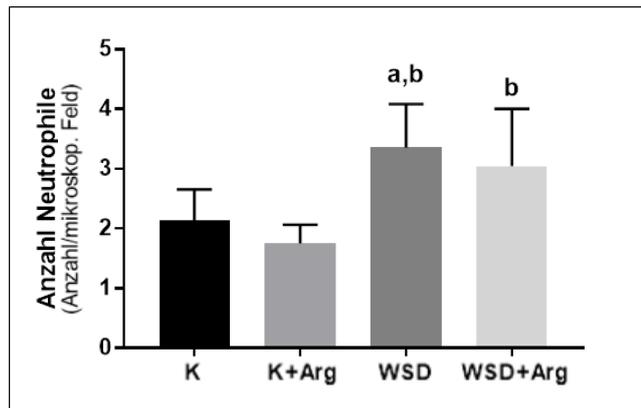
#### 4.4 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Leber

Für die Auszählung der neutrophilen Granulozyten wurden pro Objektträger acht unabhängige Bildausschnitte gewählt.

Wie in Abb. 6 zu sehen, wiesen die mit einer Kontrolldiät + Arginin gefütterten Mäuse eine geringere Anzahl an Neutrophilen Granulozyten auf, als die Gruppe der mit Western-Style Diät und der mit WSD + Arginin gefütterten Mäuse. Sowohl in den Lebern der Kontrolltiere als auch jener Tiere, welche mit Kontrolldiät + Arginin gefüttert wurden, war die Zahl der Neutrophilen signifikant geringer als in der WSD-Gruppe. Die Anzahl der Neutrophilen in der Gruppe der mit WSD gefütterten Mäuse unterschied sich jedoch nicht signifikant von jenen Mäusen, welche mit einer WSD + Arginin gefüttert wurden.



**B**

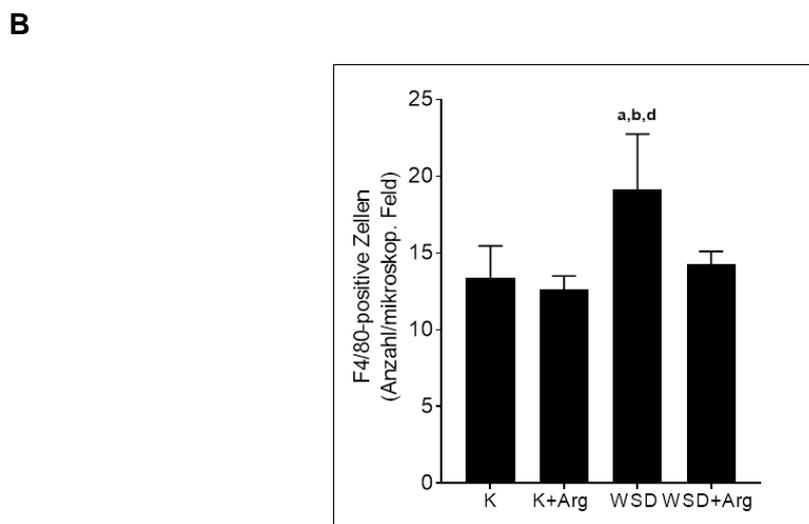
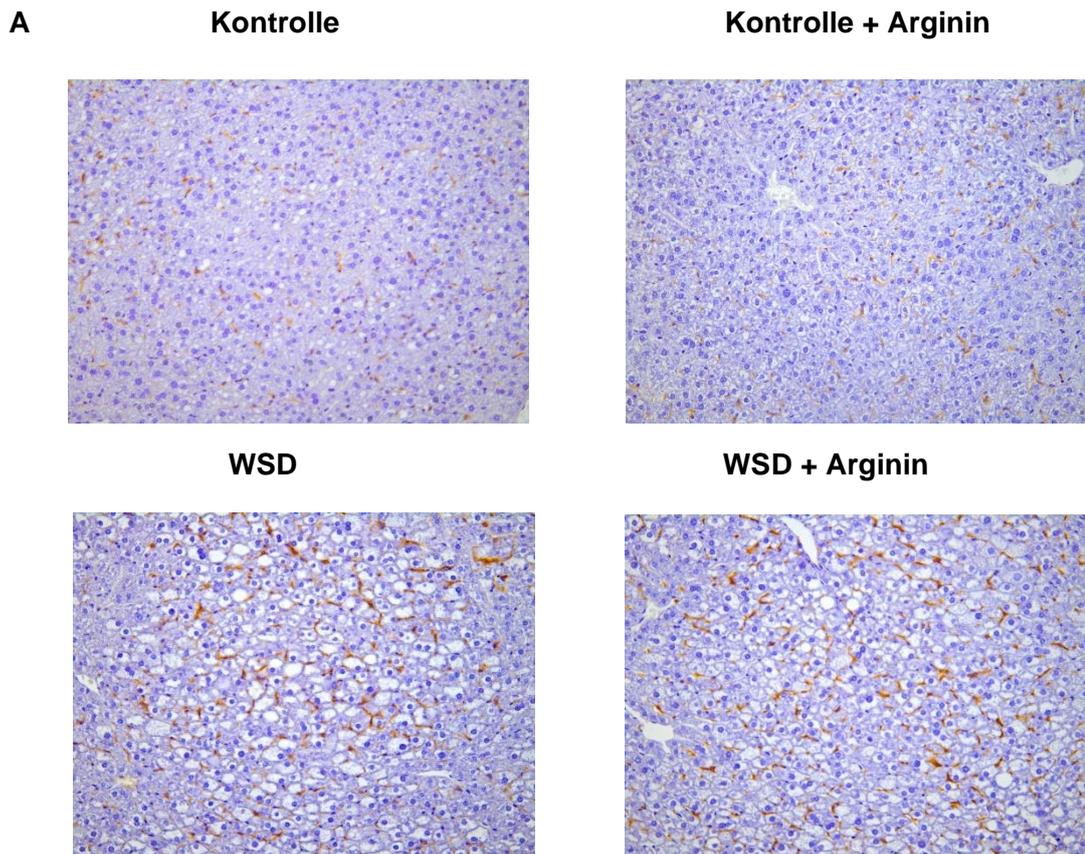


**Abbildung 6: Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Zahl der Neutrophilen Granulozyten in der Leber** (n=6-8); A) Repräsentative Bilder der Naphtol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung (Neutrophile Granulozyten-Färbung) in 200-facher Vergrößerung, B) Statistische Auswertung der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten, K = Kontrolldiät, WSD = Western-Style Diät, Arg = Arginin, <sup>a</sup>p<0,05 im Vergleich mit K, <sup>b</sup>p<0,05 im Vergleich mit K+Spl, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben

#### **4.5 Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und oralen Gabe von Arginin auf die Anzahl der F4/80-positiven Zellen in der Leber**

Um zu untersuchen, ob sich die Behandlung mit Arginin auf die Anzahl an F4/80-positiven Zellen der Versuchstiere auswirkt, wurden die histologische Präparate der Leber mit einem spezifischen Antikörper gefärbt.

Die Anzahl der F4/80 positiven Zellen in diesem Versuch zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der WSD-Gruppe und den beiden Kontrollgruppen, sowie auch der mit WSD + Arginin gefütterten Gruppe (Abb. 7). Die WSD + Arginin Gruppe unterschied sich nicht signifikant zu den beiden Kontrollgruppen.



**Abbildung 7: Einfluss der Fütterung einer Western-Style Diät und des Supplementes Arginin auf die Anzahl der Makrophagen in der Leber (n=6-8); A) Repräsentative Bilder der Makrophagen-Färbung in 200-facher Vergrößerung, B) Statistische Auswertung der Anzahl der Makrophagenfärbung, K = Kontrolldiät, WSD = Western-Style Diät, Arg = Arginin, <sup>a</sup> p<0,05 im Vergleich mit K, <sup>b</sup> p<0,05 im Vergleich mit K+Arg, <sup>d</sup> p<0,05 im Vergleich mit WSD+Arg, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben**

## 5. Diskussion

In den westlichen Industrieländern zählt die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) zu den häufigsten chronischen Lebererkrankungen. Nicht nur bei Erwachsenen, sondern vor allem bei Kindern und Jugendlichen steigt die Prävalenz beachtlich an [14]. Noch ist nicht eindeutig geklärt, welche Mechanismen zur Pathogenese der NAFLD beitragen. Epidemiologische Studien lassen jedoch darauf schließen, dass neben Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und Hyperlipidämien vor allem eine hyperkalorische Ernährungsweise, welche einen erhöhten Konsum an Kohlenhydraten und Fett, sowie einen Mangel an Bewegung mit sich bringt, Hauptrisikofaktoren an der Entstehung der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung darstellen [82]. Durch eine Beeinträchtigung des hepatischen Lipidmetabolismus sollte ein erhöhter Export der Lipide die Folge sein. Dies dient dem Ausgleich einer ansteigenden Triglyceridkonzentration in der Leber. Vorangegangene Ergebnisse mehrerer Studien zeigen jedoch, dass die untersuchten Versuchsmäuse, bei welchen durch eine mit Fructose angereicherten Diät eine NAFLD induziert wurde, signifikant mehr Triglyceride akkumulierten [4,83]. Auch Ter Horst *et al.* (2017) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass die Aufnahme von viel Fructose zu einer Erhöhung der Triglycerid-Konzentration beitragen kann [84]. Die Wirkungsweisen von Arginin bezüglich einer Therapie der NAFLD sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. In früheren Untersuchungen konnten bereits teilweise Erfolge in Hinblick auf die präventiven Funktionen der Aminosäure auf die Entstehung einer NAFLD gezeigt werden [42,85]. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, den therapeutischen Effekt einer Supplementation von Arginin auf die Entstehung der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung im Mausmodell zu untersuchen.

## **5.1 Einfluss der Aufnahme einer Western-Style Diät mit Supplementierung von Arginin auf die Leberhistologie, die Leberverfettung und klinisch-chemische Parameter der Leberschädigung**

Bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsmodell wurden weibliche C57BL/6J Mäuse 13 Wochen lang mit einer Western-Style Diät oder einer Kontrolldiät gefüttert. In den letzten fünf Wochen des Versuchs bekam ein Teil der Mäuse zusätzlich Arginin mit der Nahrung verabreicht. Das Lebergewicht der WSD-gefütterten Mäuse zeigte, verglichen mit den Kontrolltieren, etwas erhöhte Werte auf. Auch die Leber-/ Körpergewichtsration der WSD-Mäuse war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht. Diese Parameter bestätigen die Entwicklung einer durch Western-Style Diät induzierten Hepatomegalie, welche auf eine Steatose hinweist. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie an Mäusen, welche ebenso eine WSD erhielten [86].

Ein Anstieg der Aktivität der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) wird oftmals als Marker für die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung angenommen [87]. Inzwischen wurden jedoch auch einige Humanstudien an übergewichtigen beziehungsweise adipösen Patienten durchgeführt, bei denen kein Aktivitätsanstieg oben genannter Enzyme nachgewiesen werden konnte [88,89]. Bei einer Studie mit Nagetieren, welche mit einer kalorienreichen und sehr zucker- und fetthaltigen Cafeteria-Diät, ähnlich der WSD, gefüttert wurden, nimmt die Aktivität der ALT ab, während die der AST unverändert bleibt [90]. Auch bei einer anderen Studie konnte nach einer 6-wöchigen Gabe einer Western-Style Diät keine Veränderung der ALT-Aktivität beobachtet werden [86]. Grund dafür dürften eine verminderte Glucosetoleranz sowie eine beeinträchtigte Insulinsignalübertragung sein. In vorliegender Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der ALT- und AST-Aktivität der WSD- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Arginin konnte die Erhöhung der AST und ALT in der Leber durch die Western-Style Diät nicht signifikant verbessern, vermutlich der Tatsache geschuldet, dass die Versuchsmäuse lediglich frühe Anzeichen einer Fettlebererkrankung entwickelten. Auch in vorangegangenen Studien zum Thema NAFLD und Arginin

konnte nicht immer ein positiver Effekt der Aminosäure auf das Körpergewicht erzielt werden [52].

Im Gegensatz zur Gruppe jener Mäuse, welche eine Kontrolldiät erhielten, zeigt sich bei den mit Western-Style Diät gefütterten Mäusen eine signifikant höhere Triglyceridkonzentration. Eine signifikante Erhöhung der Konzentration der Triglyceride um mehr als die doppelte Menge Triglyceride/mg Protein findet sich von den Kontrollgruppen zu den WSD-gefütterten Tieren. Der Unterschied zeigt sich auch zwischen den WSD-Tieren und den mit Arginin behandelten Tieren mit Western-Style Diät, nicht jedoch zwischen den Kontrolltieren und den Kontrolltieren mit Arginin-Behandlung. Höhere Mengen an Triglyceriden und Proteinen in der Leber dienen der Beurteilung der Steatose in der Leber [91]. Diese Parameter bestätigen die Pathogenese der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung durch die Western-Style Diät.

Die geschnittenen Proben des Lebergewebes wurden mithilfe von Hämatoxylin & Eosin gefärbt, um die Zellkerne und Zytoplasmateile in verschiedenen Farben sichtbar zu machen. Anschließend wurden Bilder der gefärbten Proben angefertigt und diese ausgewertet, um den Grad der Steatose, der Entzündung und mit Hilfe dessen der NAFLD-Activity Score (NAS) befundet. Bei den mit WSD gefütterten Mäusen ist der Grad der Steatose und der Inflammation signifikant stärker ausgeprägt als bei den Tieren mit Kontrolldiät. In Folge dessen findet sich bei den WSD-Tieren auch ein signifikant höherer NAS verglichen mit den Kontrolltieren. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine anderen Studie, welche sich mit der Aufnahme einer WSD beschäftigte [92]. Die Ergebnisse dieser Färbung zeigen ebenso, dass jene Tiere, welche eine WSD bekamen und zusätzlich mit Arginin behandelt wurden, einen signifikant niedrigeren NAS aufweisen als jene Western-Style Diät-Tiere ohne Arginin-Supplementation. Auch der Grad der Steatose und der Entzündung ist bei den Tieren mit Arginin signifikant niedriger, verglichen mit der WSD-Gruppe. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren wurde bei jenen WSD-Tieren mit Arginin-Behandlung jedoch ein höherer NAS befundet. Eine Studie von Sellmann *et al.* (2017) kam zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Supplementation mit Arginin [42].

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine Supplementation mit Arginin bei einer bestehenden NAFLD, ausgelöst durch eine Western-Style Diät, therapeutisches Potential besitzt.

## **5.2 Wirkung der kombinierten oralen Gabe einer Western-Style Diät und Arginin auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und F4/80-positiven Zellen**

Eine weitere Färbung liefert den histologischen Nachweis von Entzündungsmarkern, so genannten neutrophilen Granulozyten, im Lebergewebe. Die mit Western-Style Diät gefütterten Tiere dieses Versuches weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten auf. Dies deutet auf eine hohe Anzahl an Entzündungsmarkern im Gewebe hin. Auch Jin *et al.* (2017) haben bereits in einem Versuchsmodell, welches sich mit Western-Style Diät beschäftigte, eine signifikant höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der WSD-Tiere, verglichen mit den Kontrolltieren, nachgewiesen [93]. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten der mit Arginin behandelten Mäuse der WSD-Gruppe ist signifikant höher als die jener WSD-Mäuse ohne Supplement. Ebenso signifikant ist der Unterschied der mit WSD-gefütterten Mäuse mit Arginin-Gabe verglichen mit jenen Kontrolltieren, welche auch Arginin als Supplement erhielten. Zu gleichem Ergebnis kamen auch schon Sellmann *et al.* (2017) [86]. Makrophagen sind Leukozyten, welche einen Teil des Immunsystems bilden. Eine der Aufgaben der Makrophagen ist es, körperfremde Substanzen zu erkennen, aber auch körpereigene Zellen zu beseitigen [76]. Bei einer Schädigung oder auch der Apoptose von verfetteten Leberzellen, wie es beispielsweise bei der NAFLD der Fall ist, steigt die Anzahl der Makrophagen. Je stärker eine NAFLD ausgeprägt ist, umso mehr Makrophagen finden sich also im Körper. Die Anzahl der Makrophagen der WSD-gefütterten Tiere ist im Gegensatz zu den Kontrolltieren signifikant höher. Dies bestätigt die Theorie, dass in Geweben von Organismen mit einer NAFLD die Makrophagenanzahl

höher ist als in gesunden Individuen. Zu dieser Erkenntnis kamen auch schon Dong *et al.* (2019) [94]. Auch die Anzahl der Makrophagen der Western-Style Diät-Tiere ist, verglichen mit den WSD-gefütterten Tieren mit Gabe von Arginin, signifikant erhöht. Dieses Ergebnis bestätigt den Verdacht, dass Arginin in der Therapie einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung eingesetzt werden kann.

Zusammenfassend wird deutlich, dass eine Fütterung mit WSD auch bei nicht hyperkalorischer Ernährung zu einer Steatose und beginnenden entzündlichen Veränderungen führt, sowie dass die Gabe von Arginin bei einer Western-Style Diät-Fütterung einen positiven Einfluss auf die Leber und bestimmte Leberparameter haben kann. Um spezifische Aussagen zu den Wirkungsweisen und Effekten der Behandlung treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist eine weltweit verbreitete Lebererkrankung mit noch immer zunehmender Prävalenz. Fettstoffwechselerkrankungen, Adipositas oder Insulinresistenz, hervorgerufen durch eine Fehl- beziehungsweise Überernährung, stellen wesentliche Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer NAFLD dar. Das Spektrum der Erkrankung reicht von einer einfachen Leberverfettung über die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) bis hin zur Leberzirrhose. Die Pathophysiologie der NAFLD ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig erforscht.

Derzeit gibt es keine speziell auf die NASH oder NAFLD abgestimmte medikamentöse Therapie. Aus diesem Grund ist die Adaptierung des Lebensstils mit Fokus auf eine Gewichtsreduktion, Steigerung der körperlichen Aktivität und Umstellung der Ernährung die wichtigste Interventionsmaßnahme in Bezug auf eine Therapie der NAFLD. Studien haben nachgewiesen, dass die Behandlung mit der Aminosäure Arginin ein möglicher Therapieansatz bei bestehender NAFLD sein kann. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Masterarbeit die Rolle von Arginin in der Therapie bei einer Fütterung mit Western-Style Diät im Tiermodell untersucht.

Für die Untersuchung der Wirkung einer fett-, fructose- und cholesterinreichen Western-Style Diät (WSD) und Arginin auf die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung wurden vorhandene Proben weiblicher C57BL/6J-Mäuse analysiert. Nach acht Wochen, in welchen die Mäuse entweder mit einer flüssigen Kontrolldiät oder einer flüssigen Western-Style Diät isokalorisch ernährt wurden, erhielt ein Teil der Tiere für weitere fünf Wochen eine Kontrolldiät oder eine WSD, die mit dem Supplement Arginin (2,49 g/kg Körpergewicht) angereichert wurde. Anschließend wurden das Körper- und Lebergewicht sowie Parameter der Leberschädigung bestimmt.

Wenngleich die Mäuse in allen Gruppen die gleiche tägliche Kalorienaufnahme aufwiesen, führte die Fütterung mit der Western-Style Diät zur Ausbildung einer Steatose. Dies spiegelte sich in einem erhöhten Körper- und Lebergewicht, sowie einer vermehrten Anzahl an neutrophilen Granulozyten, F4/80 positiven Zellen und einem erhöhten NAFLD-Activity Score (NAS), dem Grad der Steatose und der Inflammation, in der Leber der WSD-gefütterten Tiere wider. Bei den Tieren, welche in den letzten fünf Wochen des Versuchs zusätzlich mit Arginin behandelt wurden, konnten, verglichen mit der Kontrollgruppe, neben dem erhöhtem Körper- und Lebergewicht ebenfalls ein erhöhter NAS, sowie eine gesteigerte Anzahl an neutrophilen Granulozyten und F4/80-positiven Zellen nachgewiesen werden. Auch die Triglyceridkonzentrationen waren bei den WSD-Tieren und den mit Arginin behandelten Mäusen höher als bei den Kontrolltieren ohne Arginin-Gabe. Im Vergleich zur WSD-Gruppe konnte man jedoch in der Gruppe jener Mäuse, welche die WSD mit Arginin-Behandlung gefüttert bekamen, einen niedrigeren NAS, sowie eine geringere Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen erzielen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Arginin eventuell einen therapeutischen Effekt auf die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung haben könnte. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um die Mechanismen dahinter vollständig zu klären.

## 7. Abstract/Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver diseases in the Western world. The prevalence of NAFLD is increasing worldwide. Genetic predisposition, obesity, and insulin resistance are high risk factors for the development of NAFLD. Nutrition is another risk factor for the onset of chronic liver disease; especially supernutrition and malnutrition.

The spectrum of these indispositions spreads from a fatty degeneration of the liver, over non-alcoholic steatohepatitis, to an irreversible cirrhosis of the liver. NAFLD's pathophysiology is yet to be researched.

No medicinal therapy has been discovered so far, therefore the most important intervention measures in treating NAFLD are lifestyle adaptations such as a reduction of body weight, increased physical activity and adjustments to one's diet.

Previous research indicates a potential therapeutic treatment with the amino acid arginine. Due to its frequent association with NAFLD, arginine's possible effects were researched during this thesis study.

In order to investigate the effect of arginine on NAFLD and the Western-Style Diet (WSD), tests were conducted on female C57BL/6J mice. The mice were divided into four groups: The first received a WSD, rich in cholesterol, fat and fructose, the second a control diet and the third and fourth group were fed with either the WSD or control diet as well as an arginine supplement (2,49 g/ kg body weight). Afterwards the liver and body weight, as well as several liver parameters were determined.

The results of the study show that the administration of the Western-Style Diet causes steatosis, increasing the body and liver weight and the amounts of neutrophils, F4/80-positive macrophages and a higher NAFLD-Activity Score (NAS) in the liver of the WSD-fed mice. The mice that received additional arginine also scored a higher NAS as well as higher amounts of neutrophils and F4/80-positive macrophages. Furthermore, the concentration of triglycerides in the liver

tissue was higher in the WSD-fed mice, with or without the administration of arginine.

Altogether, the results of this thesis indicate a therapeutic effect on the liver by the amino acid arginine after consuming a Western-Style Diet. In order to evaluate the effect of arginine on the human body, further studies are required.

## Referenzen

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proc.* 1980; 55(7):434-438.
2. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010; 28(1):155-161.
3. Neuschwander-Tetri, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003; 37(5):1202-1219.
4. Weiß J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt.* 2014; 111:447-52.
5. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease – meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016; 64:73-84.
6. Veena J, Muragundla A, Sidgiddi S, Subramaniam S. Non-alcoholic fatty liver disease: need for a balanced nutritional source. *Br J Nutr.* 2014; 112(11):1858-72.
7. Roeb E. SHM S2k Leitlinie: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen. AMWF Register Nr. 021-025; 2015.
8. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012; 56:1384-1391.
9. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011; 332:1519-23.
10. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009; 13(4):511-31.
11. Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F. Fibrosis in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011; 25:231-44.
12. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant.* 2004; 4:686-93.

13. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2004; 40:578-84.
14. Schwimmer JB, Pardee PE, Lavine JE, Blumkin AK, Cook S. Cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Circulation.* 2008; 118(3):277-283.
15. Berardis S, Sokal E. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: an increasing public health issue. *Eur J Pediatr.* 2014; 173:131-9.
16. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006; 45(4):600-606.
17. Sellmann C, Baumann A, Brandt A, Jin CJ, Nier A, Bergheim A. Oral supplementation of glutamine attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6J mice. *The Journal of Nutrition.* 2017; 147(11):2041-2049.
18. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011; 140:124-31.
19. Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2014; 6:274-83.
20. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, Srishord M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011; 9:524-30.
21. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Malchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003; 37(4):917-23.
22. de Wit NJ, Afman LA, Mensink M, Muller M. Phenotyping the effect of diet on non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2012; 57(6):1370-1373.

23. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am.* 2010; 90(4):643-53.
24. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology.* 1998; 114(4):842-5.
25. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2014; 146(3):726-735.
26. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009; 49(6):1877-87.
27. Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286(6):G881-4.
28. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002; 4(8):837-51.
29. Pradere JP, KLuwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, Jang MK, Guenther ND, Mederacke I, Friedmann R, Dragomir AC, Aloman C, Schwabe RF. Hepatic macrophages but not dendritic cell contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology.* 2013; 58(4): 1461-73.
30. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DVR, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol.* 2013; 4:248.
31. Engstler AJ, Sellmann C, Jin CJ, Brandt A, Herz K, Priebs J, Bergheim I. Treatment with alpha-galactosylceramide protects mice from early onset of nonalcoholic steatohepatitis: Role of intestinal barrier function. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61(5):1600985.
32. Sellmann C, Priebs J, Landmann M, Degen C, Engstler AJ, Jin CJ, Garttner S, Spruss A, Huber O, Bergheim I. Diets rich in fructose, fat or fructose and

- fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem*. 2015; 26(11):1183-92.
33. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58(8):1091-103.
  34. Oddy WH, Herbison C, Jacoby P, Ambronsini GL, O'Sullivan TA, Ayonrinde OT, Olynyk JK, Black LJ, Beilin LJ, Mori TA, Hands B, Adams LA. The Western dietary pattern is prospectively associated with non-alcoholic fatty liver disease in adolescents. *Eur J Clin Nutr* 2008;631:1251-9.
  35. Shi L, Liu ZW, Li Y, Gong C, Zhang H, Song LJ, Huang CY, Li M. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. *Biomed Environ Sci*. 2012; 25:383-91.
  36. Hashemi KA, Alavian SM, Haghghatdoost F, Azadbakht L. Diet macronutrients composition in nonalcoholic fatty liver disease: a review on the related documents. *Hepat Mon*. 2014;14(2):e10939.
  37. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab*. 2011; 22(2):60-65.
  38. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2963-2972.
  39. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beyesen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. Consuming fructose-sweetened, not-glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009; 119(5):1322-1334.

40. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsed RR, Keim NL, D'Allessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2963-2972.
41. Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol.* 2008; 48(6):983-992.
42. Sellmann C, Degen C, Jin CJ, Nier A, Engstler AJ, Hasan Alkhatib D, De Bandt JP, Bergheim I. Oral arginine supplementation protects female mice from the onset of non-alcoholic steatohepatitis. *Amino Acids.* 2017; 49(7):1215-1225.
43. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology.* 2012; 142(5):1100-1101.
44. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(3):502-509.
45. Garinis GA, Fruci B, Mazza A, De Siena M, Abenavoli S, Gulletta E, Ventura V, Greco M, Abenavoli L, Belfiore A. Metformin versus dietary treatment in nonalcoholic hepatic steatosis: a randomized study. *International Journal of Obesity.* 2010; 34:1255-1264.
46. Mahady SE, George J. Exercise and diet in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016; 65(8):1172-82.
47. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017; 67(4):829-846.
48. Mazza A, Fruci B, Garinis GA, Giuliano S, Malaguarnera R, Belfiore A. The role of metformin in the management of NAFLD. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:716404.
49. Hou Y, Wu G. Nutritionally nonessential amino acids: a misnomer in nutritional sciences. *Adv Nutr.* 2017; 8:137-139.
50. Morris SM. Enzymes of arginine metabolism. *Journal of Nutrition.* 2004; 134(10):2743S-2747S.

51. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine deficiency in preterm infants: Biochemical mechanisms and nutritional implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2004; 15(8):442-51.
52. Dong JY, Qin LQ, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Arigoni F, Zhang W. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am Heart J*. 2011; 162(6):959-65.
53. Bol S, Bunnik EM. Lysine supplementation is not effective for the prevention or treatment of feline herpesvirus 1 infection in cats: A systematic review. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11(1):284.
54. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol*. 2014; 5:532.
55. Sukhotnik I, Mogilner J, Krausz MM, Lurie M, Hirsh M, Coran AG, Shiloni E. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxemia in rat. *J Surg Res*. 2004; 122(2):256-62.
56. Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, Buke C, Yilmaz M, Telefoncu A, Kose T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res*. 2000; 89(2):121-5.
57. Gurbuz AT, Kunzelmann J, Ratzer EE. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *J Surg Res*. 1998; 74(2):149-52.
58. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004; 75(6):639-53.
59. Larqué E, Sabater-Molina M, Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*. 2007; 23(1):87-95.
60. Hassan SM. Role of L-arginine supplementation in preventing obesity “ultrahistochemical studies”. *European Scientific Journal*. 2013; 9(36):387-403.

61. Tan J, Liu S, Guo Y, Applegate TJ, Eicher SD. Dietary L-arginine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 2014; 111:1394-1404.
62. Myher JJ, Marai L, Kuksis A, Yousef IM, Fisher MM. Identification of ornithine and arginine conjugates of cholic acid by mass spectrometry. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1975; 53:583-590.
63. Butterworth RF, Canbay A. Hepatoprotection by L-Ornithine L-Aspartate in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases*. 2019; 37:63.68.
64. Myher JJ, Marai L, Kuksis A, Yousef IM, Fisher MM. Identification of ornithine and arginine conjugates of cholic acid by mass spectrometry. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1975; 53:583-590.
65. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. *World J Hepatol*. 2017; 9(16):715-732.
66. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younoussi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clin Liver Dis*. 2016; 20(2):205-14.
67. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(5): pii:E774.
68. Dai X, Wang B. Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2015; 2015:287348.
69. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, Guy CD, Seed PC, Rawls JF, David LA, Hunault G, Oberti F, Calés P, Diehl AM. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016; 63(3):764-75.
70. Brea A, Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol*. 2013; 167(4):1109-17.
71. Ray K. NAFDL – the next global epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10(11):621.

72. Lang G. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer Wien New York; 2006.
73. Haggerty JM, Wang XN, Dickinson A, O'Malley CJ, Martin EB. Segmentation of epidermal tissue with histopathological damage in images of haematoxylin and eosin stained human skin. BMC medical imaging. 2014; 14:7.
74. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2010; 16(42):5286-5296.
75. Leder LD. Akute myelo-monozytäre Leukämie mit atypischen Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-positiven Eosinophilen. Acta haemat. 1970; 44(1):52-62.
76. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. Journal of Experimental Medicine. 2005; 201(10):1615-1625.
77. Gordon S, Lawson L, Rabinowitz S, Crocker PR, Morris L, Perry VH. Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. Curr Top Microbiol Immunol. 1992; 181:1-37.
78. Lee J, French B, Morgan T, French SW. The liver is populated by a broad spectrum of markers for macrophages. In alcoholic hepatitis the macrophages are M1 and M2. Exp Mol Pathol. 2014; 96(1):118-125.
79. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 1956; 226:497-509.
80. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72:248-254.
81. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal Biochem. 1985;151(2):369-74.
82. Souza MR, Diniz MF, Medeiros-Filho JE, Araújo MS. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. Arg Gastroenterol. 2012; 49(1):89-96.

83. Kanuri G, Spruss A, Wagenberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Fructose-induced steatosis in mice: role of plasminogen activator inhibitor-1, microsomal triglyceride transfer protein and NKT cells. *Lab Invest.* 2011; 91(6):885-895.
84. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017; 9(9):981.
85. Voloshin I, Hahn-Obercyger M, Anavi S, Tirosh. L-arginine conjugates of bile acids-a possible treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2014; 13:69.
86. Sellmann C, Jin CJ, Degen C, De Brandt JP, Bergheim I. Oral Glutamine Supplementation Protects Female Mice from Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Nutr.* 2015; 145(10):2280-6.
87. Hassan K, Bhalla V, El Regal ME, A-Kader H. Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(34):12082-12101.
88. Francanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, Bertelli C, Fatta E, Bignamini D, Marchesini G, Fargion S. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology.* 2008; 48(3):792-8.
89. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004; 40(6):1387-95.
90. MacQueen HA, Sadler DA, Moore SA, Daya S, Brown JY, Shuker DEG, Seaman M, Wassif WS. Deleterious effects of a cafeteria diet on the livers of nonobese rats. *Nutrition Research.* 2007; 27:38-47.
91. Stephenson K, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Thomson J, Alpini G, Francis H. Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expr.* 2018; 18(1):5-17.
92. Schneider KM, Mohs A, Kilic K, Candels LS, Elfers C, Bennek E, Schneider LB, Heymann F, Gassler N, Penders J, Trautwein C. Intestinal Microbiota

Protects against MCD Diet-Induced Steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2):308.

93. Jin CJ, Engstler AJ, Ziegenhardt D, Bischoff SC, Trautwein C, Bergheim I. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017; 32(3):708-715.
94. Dong X, Liu J, Xu Y, Cao H. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Exp Ther Med.* 2019; 17(5):3835-3847.

## Anhang

### Anhang 1: Zusammensetzung der Kontrolldiät und der WSD

Tabelle 10: Detaillierte Zusammensetzung der zwei Diäten

		Kontrolldiät flüssig S0514-E770	Modifizierte Western-Style Diät flüssig S0514-E760
Casein	%	19,500	18,000
Quellmaisstärke	%	36,000	5,100
Maltodextrin	%	16,590	–
Fruktose	%	–	50,000
Dextrose/Glukose	%	–	5,000
Saccharose	%	10,000	–
Cellulose Pulver	%	5,000	2,000
DL-Methionin	%	0,100	0,300
L-Cystin	%	0,200	–
Vitamin Vorgemisch	%	1,000	1,000
Mineralstoffe und Spurenelemente	%	4,600	4,835
Cholinchlorid (50%)	%	0,200	0,200
Ascorbinsäure	%	0,100	0,100
Butylhydroxytoluol	%	0,010	0,010
Xanthangummi	%	1,700	1,630
Fe-(III)Citrat · H <sub>2</sub> O	%	–	0,070
Cholesterin	%	–	0,155
Sojabohnenöl	%	5,000	–
Butterfett	%	–	11,600
Roh-Protein	%	17,4	16,0
Roh-Fett	%	5,1	11,7
Roh-Faser	%	5,0	2,0
Roh-Asche	%	4,2	4,3
Stärke	%	34,6	5,0
Saccharose	%	11,0	–
Glukose	%	–	5,0
Fruktose	%	–	50,0
NfE (Kohlenhydrate)	%	64,7	63,6
Lysin	%	1,43	1,32
Methionin	%	0,73	0,89
Cystein		0,27	0,07
Methionin + Cystein		1,00	0,96
Threonin	%	0,75	0,69
Eisen	mg/kg	49	190

		<b>Kontrolldiät flüssig S0514-E770</b>	<b>Modifizierte Western-Style Diät flüssig S0514-E760</b>
<b>Vitamin A</b>	<b>IU/kg</b>	15,000	15,000
<b>Vitamin D</b>	<b>IU/kg</b>	1,500	1,500
<b>Vitamin E</b>	<b>IU/kg</b>	150	150
<b>Fettsäuren, % in der Diät</b>			
<b>C 4:0</b>		–	0,44
<b>C 6:0</b>		–	0,29
<b>C 8:0</b>		–	0,16
<b>C 10:0</b>		–	0,35
<b>C 12:0</b>		–	0,40
<b>C 14:0</b>		0,02	1,23
<b>C 16:0</b>		0,60	3,10
<b>C 17:0</b>		–	0,07
<b>C 18:0</b>		0,18	1,14
<b>C 16:1</b>		0,01	0,21
<b>C 18:1</b>		1,27	2,58
<b>C 18:2</b>		2,63	0,21
<b>C 18:3</b>		0,29	0,06
<b>ME (klass. Atwater) MJ/kg</b>		15,7	17,8
<b>kcal % Roh-Protein</b>		19	15
<b>kcal % Roh-Fett</b>		12	25
<b>kcal % Kohlenhydrate</b>		69	60

## Anhang 2: Zusammensetzung genutzter Arbeitslösungen und Puffer

### Lösung 1

#### 10x PBS

80 g Natriumchlorid (NaCl)

2 g Kaliumchlorid (KCl)

7,62 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

0,77 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

→ in ca. 800 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen

→ pH-Wert mit Hilfe von konzentrierter Salzsäure (HCl) auf 7,4 einstellen

→ mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1L auffüllen

## **Lösung 2**

### **1x PBS**

100 ml 10x PBS + 900 ml dest. H<sub>2</sub>O

## **Lösung 3**

### **4% PBS-gepuffertes Formalin**

892 ml 1x PBS + 108 ml 37%ige Formaldehydlösung

## **Lösung 4**

### **2x PBS**

200 ml 10x PBS + 800 ml dest. H<sub>2</sub>O

## **Lösung 5**

### **Fixierlösung (CAF-Lösung) für Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase – Färbung**

Die Fixierlösung wurde nach den Angaben des Herstellers des Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbekits frisch hergestellt.

2,5 ml Citratlösung  
6,5 ml Aceton  
0,8 ml 37%iges Formalin

→ gut vermischen

## **Lösung 6**

### **Färbelösung für Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase – Färbung**

Die Färbelösung wurde nach den Angaben des Herstellers des Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbekits frisch hergestellt.

1 ml Natriumnitrit-Lösung  
1 ml Fast Red Violet LB Standardlösung

→ gut mischen (vortexen) und 2 min stehen lassen, danach hinzufügen:

40 ml 37°C warmes dest. H<sub>2</sub>O  
5 ml TRIZMAL 6,3 Pufferkonzentrat  
1 ml Naphtol-AS-D Chloroacetat-Lösung

## **Lösung 7**

### **5% BSA**

2,5 g Albumin Fraktion V (BSA) in 50 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen

## **Lösung 8**

### **5% BSA/PBS**

0,5 g Albumin Fraktion V (BSA) in 10 ml 1x PBS lösen

