



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Phosphatidylcholin in der Prävention der Non-alcoholic  
Fatty Liver Disease im Mausmodell“

verfasst von / submitted by

Sophie Haselsteiner, BSc

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

Wien, 2022 / Vienna, 2022

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

UA 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 bei Prof. Dr. Ina Bergheim bedanken für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe mitzuarbeiten und im Rahmen dessen meine Masterarbeit zu verfassen. Vor allem bin ich dankbar für die ausgezeichnete Betreuung, die motivierenden Worte und das Vertrauen in meine Fähigkeiten sowie das Verständnis und die Flexibilität, was meine Lebenssituation betrifft.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Annette Brandt, die mich in allen Phasen des Schreibens unterstützt und mir stets wertvolle Tipps gegeben hat, Victor Sánchez Juárez, an dessen Projekt ich mitarbeiten durfte und der mir vor allem im Labor tatkräftig zur Seite stand, Raphaela Staltner, die mich ausgezeichnet in die Methodik der Zellkultur einführte, ebenso wie dem gesamten Forschungsteam der Molekularen Ernährung, Anja Baumann, Finn Jung, Franziska Kromm, Beate Gärtner, Katharina Burger, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen.

Meinen Studienkollegen, vor allem Katja Csarman, Julia Jelleschitz, Elisabeth Habersatter, Nora Havlínova und Markus Oberlercher, bin ich dankbar für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor, den gegenseitigen Austausch und die schönen Erinnerungen an die Studienzeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Freunden und Arbeitskollegen – allen voran Kristina Kubarth – die es mir ermöglicht haben, das Studium und diese Arbeit neben Beruf und Leistungssport abzuschließen.



## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

*„Phosphatidylcholin in der Prävention der Non-alcoholic Fatty Liver Disease im Mausmodell“*

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe von mir verfasst wurde. Ich versichere, keine anderen als die angeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und alle aus gedruckter Literatur oder dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Stellen entsprechend der Richtlinien des wissenschaftlichen Arbeitens zitiert bzw. mit exakter Quellenangabe kenntlich gemacht zu haben.

Des Weiteren versichere ich, die Arbeit weder zur Gänze noch im wesentlichen Teil an einer anderen Stelle zur Prüfung vorgelegt zu haben.

Wien, Juli 2022



# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).....	1
1.1.1 Prävalenz und Pathogenese der NAFLD.....	1
1.2 Phosphatidylcholin.....	6
1.2.1 Aufbau, Klassifizierung und Funktionen von Phospholipiden mit Fokus auf Phosphatidylcholin.....	6
1.2.2 Endogene Synthese und exogene Quellen für Phosphatidylcholin .....	9
1.2.3 Therapiemöglichkeiten der NAFLD mit Bezugnahme auf Phosphatidylcholin .....	12
1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 Materialien.....</b>	<b>15</b>
2.1 Tierversuch.....	15
2.2 Gewebepräparation: Einparaffinieren und Herstellung histologischer Gewebeschnitte .....	15
2.3 Färbemethoden: histologisch, immunhistochemisch.....	16
2.4 Zellkulturen: mTLR2 und mTLR4.....	19
2.5 Statistische Auswertung, Sonstige Software .....	21
<b>3 Methodik .....</b>	<b>22</b>
3.1 Tierversuch: Versuchsaufbau.....	22
3.2 Paraffineinbettung der Gewebeproben und Herstellung von histologischen Schnitten.....	24
3.3 Methoden zur histologischen Befundung der Leberparameter .....	24
3.3.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung und Befundung.....	24
3.3.3 Färbung und Zählung neutrophiler Granulozyten mittels Naphthol AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung .....	27
3.3.4 Färbung und Zählung F4/80 positiver Makrophagen in Leberschnitten .....	29
3.4 Messung der TLR2 und TLR4-Aktivität mithilfe kommerziell erhältlicher HEK-Blue™ mTLR2 und mTLR4-Zellen.....	31
3.5 Statistische Auswertung .....	34

<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1 Kalorienaufnahme, Körpergewicht und NAFLD-Parameter .....	35
4.2 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel .....	37
4.3 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf Fettakkumulation und Entzündungszeichen in der Leber (NAFLD-Activity-Score) .....	38
4.4 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf die Zahl Neutrophiler Granulozyten und F4/80 positiver Makrophagen in der Leber .....	38
4.4 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf die Konzentration von TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderblut (mTLR2/4-Zellkulturassay) .....	42
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>43</b>
5.1 Das FFC-Fütterungsmodell zur Induktion einer NAFLD .....	43
5.2 Einfluss der PC-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel .....	46
5.3 Einfluss der PC-Supplementation auf Steatose, Inflammation und NAFLD-Aktivität (NAS) .....	47
5.4 Fazit .....	52
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>55</b>
<b>Summary</b> .....	<b>56</b>
<b>Literatur</b> .....	<b>57</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>71</b>



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Überblick über die Phospholipidzusammensetzung verschiedener Lebensmittel .....	12
<b>Tabelle 2:</b> Makronährstoffzusammensetzung der Flüssigdiäten .....	22
<b>Tabelle 3:</b> Entparaffinierung und Rehydrierung H&E-Färbung .....	24
<b>Tabelle 4:</b> Hämatoxylin-Färbung .....	25
<b>Tabelle 5:</b> Dehydrierung H&E-Färbung.....	25
<b>Tabelle 6:</b> Eosin-Färbung .....	25
<b>Tabelle 7:</b> Beurteilungsgrundlagen für die Erstellung des NAS .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Entparaffinierung und Rehydrierung AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung.....	27
<b>Tabelle 9:</b> Herstellung der CAF-Fixierlösung, AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung .....	27
<b>Tabelle 10:</b> Herstellung der Färbelösung, AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung .....	28
<b>Tabelle 11:</b> Hämatoxylin-Färbung, AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung .....	28
<b>Tabelle 12:</b> Herstellung der Blockierlösung für die F4/80+ Färbung.....	30
<b>Tabelle 13:</b> Mischverhältnis der Chromogenlösung für die F4/80+ Färbung.....	30
<b>Tabelle 14:</b> Überblick über die Inkubationszeiten und Waschvorgänge bei der F4/80+ Färbung .....	31
<b>Tabelle 15:</b> Übersicht über die Zusammensetzung des Nährmediums bei den HEK-Blue™-Kulturen.....	32
<b>Tabelle 16:</b> Kalorienaufnahme, Körpergewicht und NAFLD-Parameter.....	36
<b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung der Kontroll- sowie der Fett-, Fructose- und Cholesterinreichen Flüssigdiät (TD88137 mod.).....	71
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung des Phosphatidylcholin-Supplements (Lipoid E PC) .....	72

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Vermutete Pathophysiologische Vorgänge bei der Entwicklung einer Fettleber sowie pharmakologische Therapieansätze.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Struktur eines Glycerophospholipids .....	7
<b>Abbildung 3:</b> De-Novo-Synthesewege von Phosphatidylcholin (PC) beim Menschen .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Schematischer Überblick über den Versuchsablauf.....	23
<b>Abbildung 5:</b> Reaktionsschema der F4/80+ immunhistochemischen Färbung .....	29
<b>Abbildung 6:</b> Repräsentative Bilder der Leberhistologie .....	36
<b>Abbildung 7:</b> Einfluss einer PC-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel.....	37
<b>Abbildung 8:</b> Einfluss einer PC-Supplementation auf den NAFLD-Activity-Score.....	38
<b>Abbildung 9:</b> Einfluss einer PC-Supplementation auf die Zahl Neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe.....	40
<b>Abbildung 10:</b> Einfluss einer PC-Supplementation auf die Zahl F4/80 positiver Makrophagen im Lebergewebe .....	41
<b>Abbildung 11:</b> Einfluss einer PC-Supplementation auf die Konzentration von TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderblut.....	42
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung des möglichen Effektes einer PC-Supplementation auf die Entstehung und Progression der NAFLD .....	54

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	Activator Protein 1
ApoB	Apolipoprotein B
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BMBWF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
CAF	Citrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
CD14	Cluster of differentiation 14
CDP-Cholin	Cytidin-5'-Diphosphocholin
ChREBP	Carbohydrate response-element binding protein
CK	Cholinkinase
CLD	Chronic Liver Disease, chronische Lebererkrankung
CPT	1,2-Diacylglycerol-Cholinphosphotransferase
CT	Phosphocholin-Cytidyltransferase
CTP-1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1
CU	Colitis ulcerosa
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DGLA	Dihomogammalinolensäure
DHA	Docosahexaensäure
DLPC	1,2-Dilinoleoylphosphatidylcholin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline

E%	Energieprozent
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EPA	Eicosapentaensäure
EPL	Essenzielle Phospholipide
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum, Fetales Rinderserum
FFA	Free Fatty Acids, freie Fettsäuren
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GPL	Glycerophospholipide
hCLS	hepatic crown-like structures
HFD	High Fat Diet
HDL	High Density Lipoprotein
HEK	Human Embryonic Kidney Cells, Humane embryonale Nierenzellen
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSC	Hepatischen Sternzellen
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
IR	Insulinresistenz
IRS-1	insulin receptor substrate 1
KC	Kupffer-Cells, Kupffer-Zellen
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cells
LT	Leukotriene
LTA	Lipoteichonsäure
MD-2	Myeloid differentiation protein 2
MPO	Myeloperoxidase
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NAFL	Non-alcoholic Fatty Liver

NAS	NAFLD-Activity Score
NASH	Non-alcoholic Steatohepatitis, nicht-alkoholische Steatohepatitis
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
n3	Omega-3
n6	Omega-6
n9	Omega-9
NHS	Nurses Health Study
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PDME	Phosphatidylmethylethanolamin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEMT	Phosphatidylethanolamin <i>N</i> -Methyltransferase
PG	Prostaglandine
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Novel Protein Kinase C
PL	Phospholipid
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
PMME	Phosphatidylmonomethylethanolamin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS	Phosphatidylserin
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SAF	Steatosis, Activity, Fibrosis
SAM	S-Adenosylmethionin
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase

SFA	Saturated Fatty Acids, gesättigte Fettsäuren
SPF	Specific pathogen free
SPM	Sphingomyelin
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein-1c
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TG	Triglyzeride
TLR	Toll-like Receptor
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TX	Thromboxane
VLDL	Very-low Density Lipoprotein

# 1 Einleitung

## 1.1 Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

### 1.1.1 Prävalenz und Pathogenese der NAFLD

Mit zunehmender Häufigkeit der Zivilisationskrankheiten Adipositas und Diabetes mellitus Typ II (T2DM) stiegen in den letzten Jahrzehnten auch die Fälle an NAFLD, welche auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms (MetS) beschrieben wird [1]. Weltweit geht man daher derzeit von einer NAFLD-Prävalenz von 29.8% aus [2], jedoch mit regionalen Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Anfälligkeit mancher Ethnizitäten. Auch europäische Staaten unterscheiden sich je nach geographischer Lage in den NAFLD-Zahlen, die World Gastroenterology Organisation (WGO) schätzt die Prävalenz für die allgemeine Bevölkerung zwischen 20-30% [3].

Von einer wesentlich höheren NAFLD-Prävalenz geht man jedoch bei gleichzeitigem Vorliegen von Adipositas aus (75-92%) und bei krankhaft Adipösen wird sie sogar zwischen 90-95% vermutet [4]. Auch bei Diabetikern ist mit einer sehr viel höheren NAFLD-Prävalenz von etwa 59.7% [5] zu rechnen. Daten einer Metaanalyse aus dem Jahr 2016 [1] weisen darauf hin, dass NAFLD meist mit einer Reihe von Komorbiditäten einhergeht, so waren hier 51% der Patienten adipös, 22,5% litten an T2DM, 69% an Hyperlipidämie, 39% an Bluthochdruck und 42,5% an MetS. Allerdings betrifft „Lean-NAFLD“ auch normalgewichtige Personen ohne Neben-erkrankungen und mit normalen Leberenzymen [6], wobei man hier in Europa und den USA von einer Prävalenz zwischen 10-20% ausgeht [7].

NAFLD gilt als eine der wesentlichen Ursachen für chronische Lebererkrankung (CLD) [8], welche für die Patienten nicht nur zu einem Verlust an Lebensqualität und Arbeitsfähigkeit führt, sondern auch das Mortalitätsrisiko erhöht. Für Europa kam es Daten der WHO zufolge im Zeitraum von 1990 bis 2019 zu einem 25%igen Anstieg der Todesfälle infolge von CLD [4]. NAFLD und ihre progressive Form Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) zeigen sich außerdem anhand von Analysen der Global Burden of Disease Studie 2017 für eine steigende Inzidenz von hepatozellulären Karzinomen (HCC) und Zirrhose sowie damit verbundene Todesfälle verantwortlich. [9] Die Daten lassen vermuten, dass NAFLD und NASH einen steigenden Prozentsatz von CLD und damit verbundene Todesfälle verursachen und dass dieser Trend sich fortsetzen wird [4, 9].

Während epidemiologische Studien vermuten lassen, dass NAFLD-Patienten mit reiner Steatose vor allem ein gesteigertes Risiko für kardiovaskulär bedingte Mortalität aufweisen [10], erhöht sich Daten der WGO zufolge bei Vorliegen einer Steatohepatitis das Risiko für

Fibrose, Zirrhose und HCC. So entwickeln 3-15% der NASH-Patienten im Lauf von 10-20 Jahren eine Zirrhose mit den weiteren Folgen eines Leberversagens (38-45% nach 7-10 Jahren) oder HCC (2-5% pro Jahr) [3]. Wie in Beobachtungsstudien festgestellt wurde, vermindern sich dadurch insgesamt nicht nur die Lebenserwartung [11] von NAFLD/NASH-Patienten, sondern auch die in Gesundheit verbrachten Lebensjahre [10].

### *Definition und Pathogenese der NAFLD*

Bei NAFLD handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, die eine Reihe von pathophysiologischen Veränderungen der Leber umfasst. Im frühen Stadium der Non-alcoholic Fatty Liver (NAFL) findet man eine Steatose vor, bei der es zum Auftreten zytoplasmatischer Lipidtröpfchen in mehr als 5% der Hepatozyten kommt [12]. Um NAFLD diagnostizieren zu können, müssen zudem sämtliche alternative Ursachen, wie virale Erkrankungen, und ein Alkoholkonsum über 30 g pro Tag für Männer bzw. über 20 g pro Tag für Frauen ausgeschlossen werden [13].

Die hepatische Fettakkumulation kann auf mehrere Mechanismen zurückgeführt werden, wobei es primär zu einem vermehrten Einstrom an freien Fettsäuren (FFA) in die Leber kommt. Hier spielt vor allem Insulinresistenz (IR) eine zentrale Rolle in den pathophysiologischen Vorgängen, denn ohne hemmende Wirkung von Insulin auf die Lipolyse werden verstärkt FFA aus dem Fettgewebe freigesetzt, von der Leber aufgenommen und dort in Form von Triglyzeriden (TG) gespeichert [14]. Zum übermäßigen Angebot an FFA kann aber auch die Ernährung beitragen, vor allem die unter dem Begriff „Western Diets“ bekannten Ernährungsformen, reich an gesättigten Fettsäuren und Zucker, werden basierend auf Beobachtungsstudien mit der Entstehung von Übergewicht, IR und NAFLD in Zusammenhang gebracht [15, 16].

Zusätzlich spielt die *De novo* Lipogenese (DNL) eine Rolle bei der hepatischen Fettakkumulation. Bei diesem Vorgang werden überschüssige Kohlenhydrate aus der Nahrung umgewandelt in Fettsäuren (vor allem Palmitin- und Stearinsäure) und diese in Form von TG gespeichert [17]. Dabei haben Studien ergeben, dass Monosaccharide, wie Glucose, vor allem aber Fructose [18], die Expression lipogenetischer Enzyme verstärkt induzieren können [19].

Eine Regulation der DNL erfolgt hauptsächlich über die beiden Transkriptionsfaktoren Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) und Carbohydrate response-element binding protein (ChREBP), welche durch Insulin bzw. Glucose aktiviert werden [20]. Eine verstärkte Aktivierung, wie bei Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, hat die erhöhte



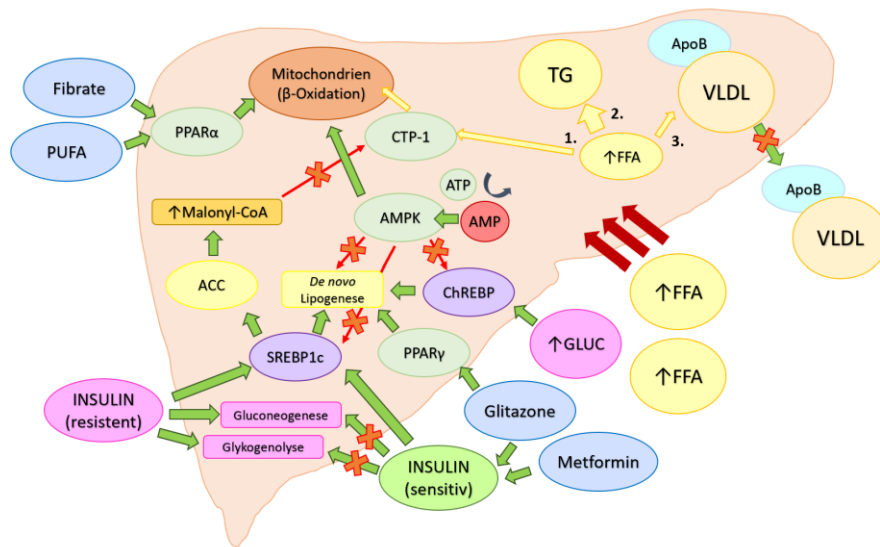
Expression von lipogenetischen Enzymen, wie Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) oder Fettsäuresynthase (FAS) zur Folge [21]. ACC katalysiert die Bildung von Fettsäuren über die Zwischenstufe Malonyl-CoA. Studien weisen darauf hin, dass erhöhte Malonyl-CoA-Konzentrationen das für den Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien zuständige Enzym Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1 (CTP-1) hemmen [20], was die Fettsäureoxidation beeinträchtigen könnte.

Untersuchungen zufolge kommt es bei metabolischen Erkrankungen, wie NAFLD, zu einer Dysregulation der DNL, wobei Hyperinsulinämie und IR eine wesentliche Rolle spielen [17]. Problematisch bezüglich IR ist vor allem die Annahme, dass die lipogenetische Wirkung des Hormons über SREBP-1c aufrecht bleibt, während seine hemmende Wirkung auf gluconeogenetische und lipolytische Mechanismen resistent wird [22]. IR wird damit zu einem treibenden Faktor der Steatose.

An der Regulation des Fettstoffwechsels ist außerdem die Nuklearrezeptorfamilie der Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) mit ihren 3 Isoformen PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  beteiligt [23]. PPAR $\alpha$  wird verstärkt in der Leber exprimiert und reguliert unter anderem die Fettsäureoxidation [24], weshalb PPAR $\alpha$ -Agonisten (Fibrate) zur Therapie von Hypertriglyzeridämie eingesetzt werden [25], Studien weisen aber auch auf mögliche positive Effekte bei der NASH-Behandlung hin [26]. PPAR $\gamma$  reguliert verschiedenste Gene des Lipid- und Glucosestoffwechsels und es wird ihm einerseits ein Insulinsensitivität verbessernder Effekt zugeschrieben, aber auch eine steigernde Wirkung auf die Lipideinspeicherung ins Fettgewebe [23]. PPAR $\gamma$ -Agonisten (Glitazone, auch Thiazolidindione) werden deshalb als mögliche Therapeutika bei NAFLD diskutiert [27], allerdings ist die Datenlage sehr kontrovers, und so gibt es auch aktuelle Studien, die einen positiven Effekt von PPAR $\gamma$ -Antagonisten bei NAFLD belegen [28].

Zusätzlich liegen Hinweise vor, dass das Enzym AMP-activated protein kinase (AMPK) auf molekularer Ebene ebenfalls eine Rolle spielen könnte, da es bei steigender AMP-Konzentration in der Zelle (gleichbedeutend mit einem Energiemangel) aktiviert wird und daraufhin die ATP-verbrauchende Lipogenese hemmt sowie die  $\beta$ -Oxidation zur Gewinnung von ATP steigert [20].

Neben vermehrtem Einstrom von FFA und abnormal gesteigerter DNL kann des Weiteren ein gestörter Lipidexport über Very-Low Density Lipoprotein (VLDL) zu vermehrter hepatischer Fettakkumulation beitragen.



**Abbildung 1: Vermutete pathophysiologische Vorgänge bei der Entwicklung einer Fettleber sowie pharmakologische Therapieansätze.** Gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe infolge von IR sowie erhöhtes Angebot aus der Nahrung führen zu einem übermäßigen FFA-Einstrom in die Leber. FFA werden (1.) via CTP-1 in die Mitochondrien eingeschleust und oxidiert, (2.) re-verestert und in Form von TG gespeichert oder (3.) in VLDL inkorporiert und aus der Leber ausgeschleust. Bei NAFLD geht man von einer Insuffizienz von (1.) und (3.) sowie einer gesteigerten (2.) aus. Zusätzlich liegt eine Dysregulation der DNL vor durch Wirkung von Insulin und Glucose via SREBP1c bzw. ChREBP sowie fehlender hemmender Wirkung von AMPK. ACC erhöht die Malonyl-CoA-Konzentration, was wiederum CTP-1 hemmt. Therapieansätze stellen die Antidiabetika Metformin und Glitazone sowie die lipidsenkenden Fibrate dar. Abkürzungen: Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CTP-1), Triglyzeriden (TG), Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Sterol regulatory-element binding protein 1c (SREBP1c), Carbohydrate regulatory-element binding protein (ChREBP), AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), freie Fettsäuren (FFA), Apolipoprotein B (ApoB), Peroxisome proliferator-activated protein  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ); Grafik adaptiert nach Vorlage von [20]

### Definition und Pathogenese der NASH

Eine Progression von NAFLD zu NASH ist laut Daten der WGO bei 10-20% der Patienten zu erwarten, bei gleichzeitigem Vorliegen einer hochgradigen Adipositas sogar bei 37% [3]. Zwar wird eine reine Steatose an sich weniger kritisch beurteilt, kommt es jedoch zur Akkumulation schädlicher Lipide (Lipotoxizität), kann dies zu chronischer Inflammation führen und damit die Progression zur NASH begünstigen [29]. Vor allem gesättigte Fettsäuren werden in Untersuchungen mit lipotoxischer [30] und mit über Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelter pro-inflammatorischer Wirkung in Zusammenhang gebracht [31]. Studien weisen darauf hin, dass toxische Lipide die Funktion von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum (ER) sowie intrazelluläre Signalwege stören können [21, 32, 33], was in weiterer Folge zu Apoptose von Leberzellen, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer Beeinträchtigung der  $\beta$ -Oxidation führt [34].

ROS wiederum können die Lipidperoxidation einleiten, wodurch Schäden an DNA, Membranen und toxische Aldehyde entstehen [20, 34]. Alle diese Mechanismen fördern die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, v.a. der Interleukine 1 $\beta$  und 6 (IL-1 $\beta$ /6) und

Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), welche wiederum verschiedenste Zellen des Immunsystems rekrutieren und aktivieren [34]. Deshalb wird oxidativer Stress nach der aktuell proklamierten „Multiple-Hit-Hypothese“ [35] als ein wichtiger Faktor beim bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus der Progression zur NASH diskutiert.

Einen zentralen Beitrag zur Entwicklung und Progression der NAFLD leistet nach aktuellen Erkenntnissen auch die Leber-Darm-Achse [36]. Die Leber ist erste Anlaufstelle für nährstoffreiches Blut aus dem Darm und kommt dadurch auch in regen Kontakt mit Toxinen und Metaboliten der Darmbakterien sowie bakteriellen Zellwandbestandteilen [37], wie z.B. Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) gram-negativer Bakterien [38] oder Lipoteichonsäure (LTA) gram-positiver Bakterien [39].

Diese beinhalten Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMP), welche von Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) erkannt werden [40]. Die zu den PRR zählenden Toll-like Rezeptoren (TLR) werden Untersuchungen zufolge vor allem von residenten Leber-Makrophagen (Kupffer-Zellen, KC) [41], aber auch Hepatozyten, sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) [42] und hepatischen Sternzellen (HSC) [34] exprimiert und setzen über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B pro-inflammatorische Signal-kaskaden mit Endprodukten wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Gang [34, 43].

Endotoxin tritt bei erhöhter Durchlässigkeit der Darmbarriere verstärkt ins Pfortaderblut und die Leber über. Nahrungskomponenten können die Darmpermeabilität positiv oder negativ beeinflussen [44], wobei Alkohol [45], fettreiche Ernährung im Sinne einer „Western Style Diet“ [46] und Fructose [47] in vielen Untersuchungen zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität führten. Eine intakte Epithelzell- und Mucusschicht im Darm schützen vor einem verstärkten Übertritt von Toxinen in den Blutkreislauf [37] und eine unzureichende Barrierefunktion wird mittlerweile mit vielen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, bei denen „low-grade“ Inflammation eine Rolle spielt [48].

Studiendaten weisen darauf hin, dass auch ein großer Teil der NAFLD- und ein noch größerer der NASH-Patienten eine erhöhte Darmpermeabilität [49] und Endotoxin-Konzentration im Blut (Endotoxinämie) aufweisen [50-53]. Untersuchungen zufolge stehen vor allem TLR2 [54], TLR4 [55] und TLR9 [56] mit der Entwicklung von NAFLD in Verbindung. Während in der gesunden Leber die Reaktion auf TLR-Liganden gemäßigt ausfällt, ist die Sensibilität und pro-inflammatorische Antwort im Zustand der chronischen „low-grade“ Inflammation deutlich erhöht [57]. Durch TLR2, TLR4 und TLR9 vermittelte Aktivierung von KC und die folgende Rekrutierung von Neutrophilen [58] trägt daher nach aktuellem Wissensstand wesentlich zur Pathogenese und Progression von NAFLD bei.

Durch TLR-vermittelte Signale kommt es außerdem zur Aktivierung von Inflammasomen, welche wiederum pro-inflammatorische und pro-fibrotische Kaskaden in Gang setzen, welche die Progression zu NASH und zum HCC fördern könnten [21]. Eine direkte Aktivierung von TLR4 durch FFA wurde ebenfalls beobachtet und könnte zur Entzündung beitragen [31]. Hinweise gibt es zusätzlich für eine veränderte Zusammensetzung der Darmflora bei NAFLD-Patienten im Sinne einer Dysbiose, mit prozentueller Zunahme gram-negativer, LPS-produzierender Bakterien [59].

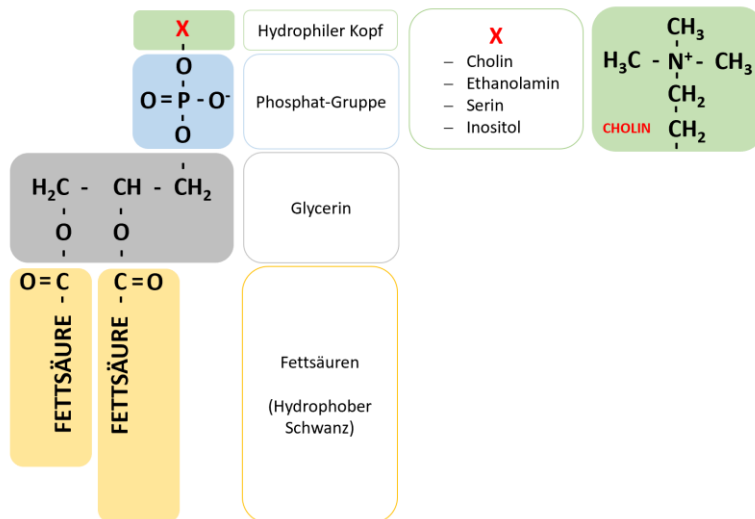
Histologisch müssen für die Diagnose einer NASH zusätzlich zur Steatose lobuläre Inflammation und Ballooning der Hepatozyten vorhanden sein [60], darüber hinaus können Mallory-Denk-Körper auftreten [13], welche auf degenerative Veränderungen der Leber hinweisen [61]. In diesem Stadium kommt es häufig auch zu perisinusoidaler Fibrose. Untersuchungen weisen darauf hin, dass es durch Entzündungsmediatoren im Rahmen der chronischen Inflammation zur Umfunktionierung der Vitamin A speichernden HSC kommt, welche dann extrazelluläre Matrixproteine (ECM) und Kollagen produzieren und so die Fibrosierung des Gewebes einleiten. Vor allem das Cytokin Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) wird mit der Aktivierung von HSC zu ECM produzierenden Zellen in Verbindung gebracht [34]. Das Auftreten von Fibrose ist Studien zufolge ausschlaggebend für die weitere Prognose des Patienten hinsichtlich Zirrhose und HCC und korreliert auch mit der Mortalität [62].

## **1.2 Phosphatidylcholin**

### **1.2.1 Aufbau, Klassifizierung und Funktionen von Phospholipiden mit Fokus auf Phosphatidylcholin**

Phosphatidylcholin (PC), auch bekannt unter dem Namen Lecithin (vom griechischen *lekithos* für Eidotter), zählt zu den Phospholipiden (PL). Sie unterscheiden sich von der anderen Fraktion der Lipide (unpolare Neutralfette, wie Triglyzeride), durch ihren polaren Anteil. PL gelten als amphiphil aufgrund ihrer hydrophoben Fettsäureketten und hydrophilen Kopfgruppe. Diese Eigenschaft macht sie zu einem wesentlichen Bestandteil aller physiologischen Membranen [63].

Innerhalb der PL finden sich weitere Subklassen: PC zählt zu den Glycerophospholipiden (GPL), deren Struktur auf einem Molekül Glycerol mit zwei Fettsäuremolekülen an seiner *sn*-1 und *sn*-2-Position sowie einem Phosphorsäureester mit hydrophiler Kopfgruppe an seiner *sn*-3-Position basiert.



**Abbildung 2: Struktur eines Glycerophospholipids:** Grundgerüst ist ein Molekül Glycerin, an den Positionen *sn*-1 und *sn*-2 bindet jeweils eine Fettsäure, welche den hydrophoben Schwanz bilden, an der *sn*-3-Position ist über eine Phosphatgruppe Cholin (PC), Ethanolamin (PE), Serin (PS) oder Inositol (PI) gebunden und bildet den hydrophilen Kopf des amphiphilen Moleküls; Grafik erstellt und adaptiert nach Vorlage von [64]

PC zählt zu den häufigsten GPL und ist ubiquitär in allen biologischen Membranen vertreten. Aufgrund des amphiphilen Charakters ermöglicht dies einerseits die Abgrenzung von Zellen und Organellen gegenüber ihrer Umwelt und andererseits auch selektive Transportvorgänge. Es gibt Hinweise dafür, dass die Art der PL und deren Fettsäurezusammensetzung die Integrität, Fluidität und Funktion einer Membran beeinflussen [63]. Eine Veränderung des PC/PE-Ratios in den Hepatozyten-Membranen steht in Verdacht, die Entwicklung einer NAFLD zu fördern und die Regenerationsfähigkeit der Leber herabzusetzen. So konnte etwa in Studien festgestellt werden, dass eine Vielzahl an NAFLD- und NASH-Patienten ein vermindertes PC/PE-Ratio in den Leberzellen aufweisen [65], was auf die Wichtigkeit eines ausreichenden PC-Gehalts in der Leber hindeutet.

Außerdem ist PC als wichtigster Phospholipid-Bestandteil (70%) der Mucin-Schicht im Darm vermutlich essenziell für deren Barrierefunktion [66]. Man geht davon aus, dass durch eine unzureichende Mucin-Barriere vermehrt bakterielle Toxine, wie LTA oder LPS, über die Pfortader in die Leber gelangen, wo sie über TLR erkannt werden und in weiterer Folge pro-inflammatorische Signalkaskaden auslösen. Diese Vermutung bekräftigt beispielsweise die Studie von *Kanuri et al.*, in der eine verstärkte Expression der TLR 1-5, des TLR-Adapterproteins MyD88 sowie erhöhte Level an TNF $\alpha$  in der Leber von NAFLD-Patienten nachgewiesen werden konnten [67]. Bei Patienten mit der entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa kann Untersuchungen zufolge der PC-Gehalt im Mucus bis zu 70% reduziert und die Integrität damit erheblich beeinträchtigt sein [68]. Hier erzielten *Stremmel et al.* durch orale PC-Supplemente Erfolge bei der Wiederherstellung einer adäquaten PC-Konzentration und der Remission der

Erkrankung [68]. Ein vergleichbarer Effekt bei NAFLD wird diskutiert.

Die ungesättigten Fettsäuren von Membran-PL dienen weiters als Vorläufer für Eicosanoide, wie Prostaglandine (PG), Thromboxane (TX) und Leukotriene (LT), die unter anderem in die Regelung von Entzündungsprozessen und kardiovaskulären Vorgängen involviert sind [63]. Nach derzeitiger Datenlage geht man davon aus, dass die aus Arachidonsäure entstehende PG-Serie 2 eher entzündungsfördernd wirkt, während die aus Dihomogammalinolensäure (DGLA) bzw. Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) abgeleiteten PG-Serien 1 bzw. 3 der Entzündung eher entgegenwirken [69]. Positive Effekte durch Krill-Öl, das reich an EPA- und DHA-haltigem PC ist, wurden im Rahmen einer Humanstudie bei arthritischen Erkrankungen gezeigt [70]. Eine anti-inflammatorische Wirkung von PC über die Beeinflussung der Eicosanoid-Synthese ist vorstellbar, scheint allerdings von dessen Fettsäurezusammensetzung abzuhängen.

Auch die Enterozytenmembran enthält größere Mengen an PC, welches für die Bildung von Chylomikronen nach der Fettabsorption entscheidend ist. Es wird aktuell vermutet, dass PC zunächst für den initialen Zusammenbau der Chylomikronen-Partikel im Enterozyten notwendig ist [71] und danach für die Stabilisierung des Lipidkerns aus TG [72]. Auch für den Weitertransport nach Metabolisierung in der Leber greift der Körper für die Bildung von Lipoproteinen auf PL zurück. TG und Cholesterinester werden für den Export aus der Leber in VLDL-Partikel verpackt, deren Phospholipidhülle zu 60-80% aus PC besteht. Steht PC nicht ausreichend zur Verfügung, wird davon ausgegangen, dass es zur Degradierung von VLDL und Akkumulation von TG in der Leber kommt [65]. Dies zeigt sich beispielsweise im NAFLD-Tiermodell bei Cholin- und Methionin-Mangelernährung, bei der es durch unzureichende PC-Synthese zur Behinderung der VLDL-Sekretion und Verfettung der Leber kommt [73].

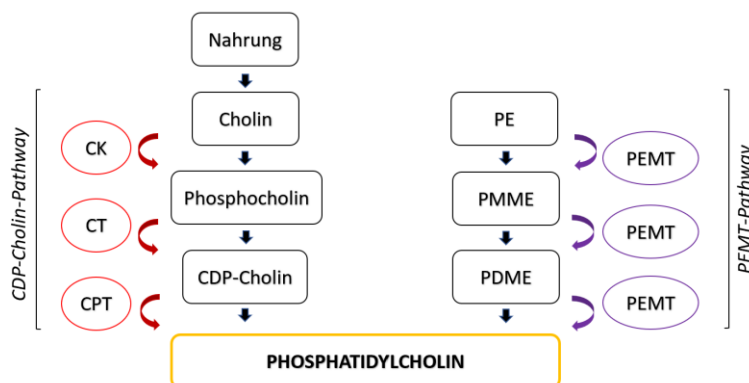
Auch die Hülle von High Density Lipoprotein (HDL) besteht Untersuchungen zufolge zu etwa 80% aus PC [74]. Verschiedene Studienergebnisse, die auf einen bevorzugten Einbau von Nahrungs-PC in HDL hinweisen [63], lassen einen HDL-steigernden Effekt von PC vermuten. Dies wird als positive Eigenschaft von PC diskutiert, da HDL im Rahmen des reversen Cholesterin-Transports Cholesterin und Lipide aus der Peripherie sowie aus Schaumzellen aufnehmen kann [75]. Das könnte sich günstig auf das Lipidprofil auswirken und das Risiko einer fehlgeleiteten Immunreaktion durch oxidiertes Low-Density Lipoprotein (LDL) vermindern. Überschüssiges LDL, das durch ROS oxidiert und dann verstärkt von Makrophagen aufgenommen wird (Schaumzellenbildung), wird in aktuellen Untersuchungen nicht nur als Initiator der Atherosklerose [76], sondern auch als potenzieller Faktor bei der

Progression von NAFLD zu NASH diskutiert [3]. So stellten *Andersen et al.* im Rahmen einer Interventionsstudie fest, dass durch eine regelmäßige Zufuhr von Eigelb über 12 Wochen bei Männern und Frauen mit diagnostiziertem MetS gegenüber der Kontrollgruppe einerseits der HDL-Spiegel gesenkt und andererseits der Cholesterin-Efflux aus Schaumzellen signifikant erhöht werden konnte [74].

Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass Nahrungs-PC die intestinale Cholesterinabsorption reduzieren könnte, was bisher hauptsächlich in Tierexperimenten [77] bewiesen wurde, aber auch beim Menschen vorstellbar ist [78]. Möglicherweise ist das zurückzuführen auf eine veränderte Mizellen-Zusammensetzung durch das supplementierte PC [79].

### 1.2.2 Endogene Synthese und exogene Quellen für Phosphatidylcholin

Prinzipiell kann die *De novo* Synthese von PC beim Menschen über zwei Wege erfolgen: Der als Kennedy-Pathway oder CDP-Cholin-Pathway bekannte Hauptsyntheseweg ist abhängig von Cholin. Aus Cholin wird dabei über drei verschiedene Enzyme (siehe Abbildung 3) PC gebildet. Während diese Synthese in allen kernhaltigen Körperzellen stattfinden kann, ist der alternative Weg Untersuchungen zufolge nur in der Leber von Bedeutung. Hier dient PE als Ausgangssubstanz, welche durch das Enzym Phosphatidylethanolamin *N*-Methyltransferase (PEMT) dreimal hintereinander methyliert wird. Als Methylgruppendonator dient dabei *S*-Adenosyl-methionin (SAM). Basierend auf Analysen trägt dieser Weg in der Leber zu etwa 30% des endogen gebildeten PC bei [80].



**Abbildung 3: De-Novo-Synthesewege von Phosphatidylcholin (PC) beim Menschen.**

Abkürzungen: Cholinase (CK), Phosphocholin-Cytidyltransferase (CT), 1,2-Diacylglycerol-Cholinphosphotransferase (CPT), Phosphatidylethanolamin *N*-Methyltransferase (PEMT), Phosphatidylmonomethylethanolamin (PMME), Phosphatidyl dimethylethanolamin (PDME), Cytidin-5'-Diphosphocholin (CDP-Cholin); Grafik adaptiert nach [80]

CT $\alpha$  gilt als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der PC-Synthese im Kennedy-Pathway und wird durch das Gen *PCyt1 $\alpha$*  codiert. Bei Mäusen hat sich gezeigt, dass eine Loss-of-Function-Mutation sowohl im *PCyt1 $\alpha$*  Gen als auch im *PEMT*-Gen unter fettreicher Diät rasch zur Entwicklung einer Steatose führt. Auch beim Menschen sind vergleichbare Mutationen bekannt, bei denen ein homozygoter Genotyp mit einer schweren Leberverfettung in Verbindung steht [65]. Dies liefert weitere Hinweise für die Bedeutung von PC für eine funktionsfähige Leber.

Es wird davon ausgegangen, dass Cholin für den Menschen nicht essenziell ist, da es endogen in der Leber gebildet werden kann. Allerdings liegen Hinweise dafür vor, dass diese Mengen nicht ausreichend sind, sodass es mittlerweile auch Stimmen gibt, die eine Zufuhr von Cholin über die Nahrung, entweder in freier Form oder gebunden in PC, doch als notwendig ansehen [81]. Als exogene Quellen für PC stehen in der menschlichen Ernährung sowohl tierische als auch pflanzliche Lebensmittel zur Verfügung.

Untersuchungen zufolge wird in der Nahrung enthaltenes PC äußerst effizient absorbiert (>90 %) und daraufhin durch pankreatische Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) im Dünndarm verdaut, welche die an der *sn*-2 Position gebundene Fettsäure abspaltet und Lyso-PC übriglässt. In dieser Form wird als weiterer Weg die Aufnahme in Enterozyten und eine anschließende Re-Veresterung und Einbau in die Hülle von Chylomikronen angenommen [79].

Je nachdem, aus welchem Nahrungsmittel sie stammen, dürften sich Phospholipide, was die Art ihrer gebundenen Fettsäuren betrifft, voneinander unterscheiden. Analysen ergaben, dass sich meist eine gesättigte Fettsäure (SFA) an der *sn*-1 und eine ungesättigte Fettsäure an der *sn*-2 Position des Glycerins befindet [82]. Tierische Produkte, wie Fleisch, Eier, Fisch und Meeresfrüchte, sind von Natur aus reich an Phospholipiden und vor allem an PC. PC aus tierischen Quellen liefern Studienergebnissen zufolge hauptsächlich SFA und die Omega-6 (n6) Fettsäure Arachidonsäure als mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA) [63].

PC ist nach Analyse mariner Quellen, wie Fischen, Meeresfrüchten, Algen und Krill, auch hier die vorherrschende PL-Form, und scheint dabei vor allem eine hohe Konzentration an langkettigen Omega-3 (n3) PUFA, vor allem EPA und DHA, aufzuweisen. Da für diese n3-PUFA eine anti-inflammatorische Wirkung auf die Eicosanoid-Synthese und gute Resorbierbarkeit angenommen wird, besitzt PC aus diesen Quellen möglicherweise besonders gute anti-inflammatorische Eigenschaften [63, 82].

Milch und Milchprodukte weisen Untersuchungen zufolge mit einem Anteil von maximal 1% aller Lipide einen geringeren PL-Gehalt auf [63]. Als häufigste Fettsäuren werden hier



einerseits ungesättigte Fettsäuren (v.a. Ölsäure) und andererseits langkettige (Palmitin- und Stearinsäure) sowie mittelkettige SFA vermutet [82].

In Eiern findet sich PC hauptsächlich im Dotter, wo Analyseergebnisse darauf schließen lassen, dass es ca. 72% aller PL ausmacht. Die Fettsäurezusammensetzung variiert in Abhängigkeit der Umweltbedingungen und Ernährung der Henne, man geht aber basierend auf Analysen davon aus, dass das Verhältnis an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren relativ ausgeglichen ist (46% zu 54%). Palmitinsäure findet sich in den Untersuchungen als häufigste gesättigte Fettsäure, gefolgt von Stearinsäure und bei den ungesättigten Fettsäuren machen Ölsäure (n9) und Linolsäure (n6) den Hauptanteil aus [82]. Einen nennenswerten Gehalt an langkettigen n3-PUFA erreicht Eigelb in der Regel nur durch Anreicherung des Legehennenfutters, wie es beispielsweise der Versuch von *Schreiner et al.* [83] zeigt.

Als pflanzliche Quelle für PC sind vor allem Sojabohnen erwähnenswert, bei denen Daten darauf hinweisen, dass ungesättigte Fettsäuren (vor allem Linolsäure, Ölsäure und  $\alpha$ -Linolensäure) den Hauptanteil ausmachen [82].

Zellbasierte Studien [84, 85] weisen auf unterschiedliche Wirkung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf Hepatozyten hin, daher kommt es zu der Annahme, dass sich PC-Supplemente je nach ihrer Quelle bzw. Art und Zusammensetzung ihrer Fettsäuren auf unterschiedliche Weise und mit unterschiedlicher Potenz auf die Lebergesundheit auswirken könnten.

**Tabelle 1: Überblick über die Phospholipidzusammensetzung verschiedener Lebensmittel** bezüglich Gesamtlipid-Gehalt [% der Gesamtlipide], PC-, PE- und SPM-Gehalt [% der Gesamtlipide] sowie ihrer Fettsäureverteilung.

	Eidotter (1)		Eidotter (2)		Milch (-prod.)	Sojabohnen	marine Quellen
Phospholipidgehalt [%]	28-33 <sup>1</sup>		28-33 <sup>1</sup>		0.3-1.1 <sup>1</sup>	NV	NV
PC-Gehalt [%]	65-70 <sup>2</sup>		65-70 <sup>2</sup>		26 <sup>2</sup>	10-15 <sup>2</sup>	87.5 <sup>2</sup>
PE-Gehalt [%]	9-13 <sup>2</sup>		9-13 <sup>2</sup>		30 <sup>2</sup>	9-12 <sup>2</sup>	5.8 <sup>2</sup>
SPM-Gehalt [%]	2-3 <sup>2</sup>		2-3 <sup>2</sup>		22 <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	3.4 <sup>2</sup>
<b>Fettsäurezusammensetzung</b>							
	<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>			
<b>Gesättigte Fettsäuren</b>							
kurzkettig (C4-C14)	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	24.1 <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>
C 16:0 (Palmitinsäure)	62.80 <sup>3</sup>	6.0 <sup>3</sup>	66.75 <sup>3</sup>	4.28 <sup>3</sup>	31.8 <sup>2</sup>	18.4 <sup>2</sup>	14.1 <sup>2</sup>
C 18:0 (Stearinsäure)	27.2 <sup>3</sup>	2.04 <sup>3</sup>	23.72 <sup>3</sup>	1.46 <sup>3</sup>	15 <sup>2</sup>	4.0 <sup>2</sup>	2.9 <sup>2</sup>
<b>Monoenfettsäuren</b>							
C 18:1 (Ölsäure), n9	6.52 <sup>3</sup>	55.96 <sup>3</sup>	5.81 <sup>3</sup>	53.53 <sup>3</sup>	20 <sup>2</sup>	10.7 <sup>2</sup>	29.2 <sup>2</sup>
<b>Polyenfettsäuren</b>							
C 18:2 (Linolsäure), n6	0.78 <sup>3</sup>	24.47 <sup>3</sup>	0.62 <sup>3</sup>	22.66 <sup>3</sup>	2.2 <sup>2</sup>	58.0 <sup>2</sup>	2.5 <sup>2</sup>
C 18:3 (α-Linolensäure), n3	Spuren <sup>3</sup>	0.25 <sup>3</sup>	Spuren <sup>3</sup>	0.22 <sup>3</sup>	0.5 <sup>2</sup>	6.8 <sup>2</sup>	2.7 <sup>2</sup>
C 20:4 (Arachidonsäure), n6	Spuren <sup>3</sup>	5.61 <sup>3</sup>	Spuren <sup>3</sup>	3.47 <sup>3</sup>	0.1 <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	1.9 <sup>2</sup>
C 20:5 (EPA), n3	ND <sup>3</sup>	Spuren <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	1.08 <sup>3</sup>	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	18.8 <sup>2</sup>
C 22:6 (DHA), n3	ND <sup>3</sup>	2.91 <sup>3</sup>	Spuren <sup>3</sup>	10.26 <sup>3</sup>	~ <sup>2</sup>	~ <sup>2</sup>	22.8 <sup>2</sup>

Die Spalten 1 und 2 zeigen die typische Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylcholin im Eidotter an der *sn-1* und *sn-2* Position des Glycerins bei (1) Standardernährung der Hennen bzw. (2) Anreicherung des Futters mit 1,25% n3-Säure-haltigem Robben-Blubber. (Angabe in mol%, Spuren: < 0.1 %, ND = nicht detektierbar).  
Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, SPM = Sphingomyelin.  
Grafik adaptiert nach [63]<sup>1</sup> [82]<sup>2</sup> [83]<sup>3</sup>

### 1.2.3 Therapiemöglichkeiten der NAFLD mit Bezugnahme auf Phosphatidylcholin

Durch das breite Spektrum an Symptomen sowie Komorbiditäten verläuft die NAFLD bei jedem Patienten anders, was auch die Therapie erschwert [3, 86]. Zudem gelten derzeit Lebensstilmodifikationen im Sinne von Ernährungsumstellung, Gewichtsverlust und körperlicher Aktivität als einzige evidenzbasierte Behandlungsoption für NAFLD [3, 87]. Da epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einem ungesunden Lebensstil vermuten lassen [88], gilt als aktuelle Empfehlung für alle NAFLD-Patienten eine moderate Gewichtsreduktion von 7-10%, körperliche Bewegung und Vermeidung von Lebensmittelbestandteilen, die mit NAFLD-Entstehung in Verbindung gebracht werden [13].

Bei Personen mit diagnostizierter NASH, auch im anfänglichen Stadium, sollte zusätzlich eine medikamentöse Therapie in Erwägung gezogen werden, jedoch gibt es zum aktuellen Zeitpunkt kein offiziell zugelassenes Therapeutikum [13, 89] und eine medikamentöse

Behandlung gilt als herausfordernd, da je nach Ausprägung der NAFLD-Symptome Medikamente mit verschiedenen Wirkmechanismen notwendig wären und es mit einem einzelnen Wirkstoff oft nicht getan ist. Potenziell hilfreiche Medikamente wirken meist einer Insulinresistenz, Entzündung oder Hyperlipidämie entgegen und zeigen bis dato gemischte Erfolge [86]. Das Antidiabetikum Metformin beispielsweise konnte in Studien zwar die Transaminase-Aktivität senken, nicht jedoch die Steatose oder Leberhistologie verbessern, weshalb sein Effekt auf die Leber gering zu sein scheint [90, 91]. Auch PPAR $\gamma$ -Agonisten (z.B. Pioglitazon, Rosiglitazon) sollen Untersuchungen zufolge die Insulinsensitivität erhöhen [92, 93], sind aber mit Nebenwirkungen, wie Gewichtszunahme verbunden [13]. Außerdem weisen experimentelle Tierstudien auch auf einen möglichen positiven Effekt von PPAR $\gamma$ -Antagonisten [28] hin, was die Datenlage sehr konträr macht.

Diskutiert werden außerdem lipidsenkende PPAR $\alpha$ -Agonisten (Fibrate) und Statine sowie antioxidative und anti-inflammatorische Substanzen, wie Vitamin E [94] und Omega-3-Fettsäuren, wobei kontrollierte Interventionsstudien letzteren keine Wirkung in Bezug auf NASH zuschreiben [95]. Bisher konnte sich keines dieser Pharmaka bezüglich seines Nutzen-Risiko-Profiles bewähren, weshalb der dringende Bedarf an einem neuen Therapeutikum oder Adjuvans besteht.

Der positive Effekt einer oralen Supplementation von Phosphatidylcholin zur Therapie von NAFLD und NASH wurde erstmals im Rahmen einer alkoholischen Fettlebererkrankung beobachtet. In der Tierstudie mit Pavianen konnte oral zugeführtes PC eine Ethanol-induzierte Fettleber vor allem an der Progression zu Fibrose und Zirrhose hindern [96].

Durch alleinige PC-Supplementation oder Anwendung als adjuvante Therapie zusammen mit oralen Antidiabetika konnte jedoch auch bei NAFLD-Patienten in randomisierten kontrollierten Studien eine Verbesserung der Transaminase-Aktivität, Leberhistologie und Fibrose gezeigt werden (einen Überblick bieten [97, 98]).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

NAFLD entwickelt sich Studien zufolge gleichzeitig mit Adipositas und Typ II Diabetes zu einem zunehmenden Gesundheitsproblem in Industriestaaten, mit steigender Tendenz aber ebenfalls in Entwicklungsländern. Untersuchungen haben ergeben, dass die Erkrankung mittlerweile auch immer öfter bei Personen jüngeren Alters und sogar bei Kindern unter zehn Jahren in Erscheinung tritt. Jedoch gibt es derzeit abgesehen von Lebensstilmodifikationen und einigen medikamentösen Ansätzen mit teilweise unerwünschten Nebenwirkungen, keine evidenzbasierten Therapiemöglichkeiten [3].

Phosphatidylcholin ist ein natürlicher Bestandteil tierischer und pflanzlicher Nahrungsmittel und orale Supplemente werden gut toleriert [82, 97]. Auf mehreren Ebenen könnten PC-Supplemente dabei bei der Prävention und Behandlung von NAFLD helfen: Studien weisen darauf hin, dass PC-Supplemente einen im Rahmen der NAFLD beobachteten verminderten PC-Gehalt von Membranen korrigieren und einer Akkumulation von Fett in der Leber über die Aufrechterhaltung des Lipidexports via Lipoproteine entgegenwirken könnten [65]. Untersuchungen zum HDL-erhöhenden [74] und Cholesterin-senkenden [78] Effekt einer PC-Supplementation lassen außerdem einen positiven Einfluss auf die oftmals auftretende Dyslipidämie bei NAFLD-Patienten vermuten.

Darüber hinaus liegen Hinweise für eine positive Wirkung einer PC-Supplementation auf das Entzündungsgeschehen und die ROS-Bildung sowie eine günstige Beeinflussung der Eicosanoid-Synthese vor [82]. Die anti-inflammatorische Wirkung könnte unter anderem mit einer Wiederherstellung der Darmbarriere in Zusammenhang stehen [66].

Die Fettsäurezusammensetzung von PC unterscheidet sich je nach Quelle und wirkt sich vermutlich auf dessen Eigenschaften aus. Neben den in vielen bisherigen Studien verwendeten Supplementen aus Linolsäure-reichem Sojabohnen-PC, ist Eidotter eine interessante Quelle für PC mit einem relativ ausgeglichenen Verhältnis an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und hoher Ölsäure-Konzentration [82], deren Effekt auf NAFLD bisher weniger untersucht wurde.

Basierend auf dieser Ausgangslage lautet die zentrale Fragestellung dieser Arbeit:

Hat die orale Supplementation von Phosphatidylcholin aus Eidotter einen protektiven Effekt auf die Entstehung einer NAFLD?

## 2 Materialien

### 2.1 Tierversuch

C57BL/6J Mäuse (weiblich)	Janvier S.A.S., Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich
Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche Flüssigdiät (SE0514-E760)	SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Kontroll-Flüssigdiät (S0514-E770)	SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Phosphatidylcholin (Lipoid E PC-S) CAS-No. 97281-44-2	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland

### 2.2 Gewebepräparation: Einparaffinieren und Herstellung histologischer Gewebeschnitte

Abzug	Laborbestand
Brutschrank	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland
Einbettkassetten	Sanova Pharma GmbH, Wien, Österreich
Einbettgeschälchen	Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland
Einbettstation: Cryo Console, Dispensing Console, Thermal Console AP250	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O), 100%, 95%, 85%, 75%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Formalin 4%, PBS-gepuffert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gefrierschrank (-20° C)	Laborbestand

Microtom Leica RM2245	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Labxperts GmbH, Klosterneuburg, Österreich
Paraffin (Paraplast® Plus™)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pinzette, spitz	Laborbestand
Roti-Histol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SB Einwegklingen	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Wasserbad GFL 1052	LAUDA Ges. für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wärmeschrank Thermo Scientific™ Heratherm™ Compact	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

## 2.3 Färbemethoden: histologisch, immunhistochemisch

### Generell benötigte Geräte und Materialien

Abzug	Laborbestand
CC/Mount Tissue Mounting Medium (C9368-30ML), wässriges Eindickmedium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Deckgläser 22x22 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Digital Orbital Shaker	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Entellan™ Eindickmedium (HX60567161)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O), 100%, 95%, 85%, 75%, 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Färbeküvette aus Kunststoff	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbeküvette aus Glas	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbeküvetten-Einsatz für Objektträger aus Kunststoff	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbeküvetten-Einsatz für Objektträger aus Glas	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbeschale M920 Stain Tray™ aus Kunststoff	Simport Scientific Inc., Quebec, Kanada
Färbeschalendeckel für M920 Stain Tray™ aus Kunststoff	Simport Scientific Inc., Quebec, Kanada
Glasstab	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kimtech Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Kolbenhubpipette für Färbungen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl, 500 µl, 200 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Roti-Histol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand

#### **Geräte und Materialien spezifisch für die Hämatoxylin & Eosin-Färbung**

Eosin-Lösung (HT 110116-500 ML)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung (GHS 232-1L)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

### **Geräte und Materialien spezifisch für die Naphthol-AS-D-Chloroacetat-Esterase-Färbung**

Aceton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Falcon (25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Färbekit #91C-1KT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fast-Red-Violet-LB Standardlösung (912-10ML) 15 mg/ml in 0,4 mol/l Salzsäure, Stabilisatoren	
Naphthol-AS-D-Chloroacetat-Lösung (911-10ML) 8 mg/l und Stabilisator	
Natriumnitrit-Lösung (914-10ML) 0,1 mol/l	
Trizmal™ 6.3 Pufferkonzentrat (913-50ML) TRIZMA™ Maleat 1 mol/l mit Surfactant	
Formaldehydlösung, säurefrei 37%ig	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung (GHS 232-1L)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ofen	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

### **Geräte und Materialien spezifisch für die F4/80+ Makrophagen-Färbung**

Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Biotinylierter Sekundärantikörper (abcam ab6733)	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Dako EnVision® + System HRP-Labelled Polymer Anti-Rabbit	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich



Dako Liquid DAB + Substrat Chromogen System	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich
Dako REAL Peroxidase Blockierlösung	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich
Dako Streptavidin-HRP	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich
Falcon (15 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung (GHS 232-1L)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PAP Pen Hydrophobic Slide Marker Super HT	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Primärantikörper F4/80 (abcam ab6640)	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien

#### **Mikroskopische Auswertung**

Leica DM6 B	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
ZEISS AxioLab 5	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
ZEN Imaging-Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland

#### **2.4 Zellkulturen: mTLR2 und mTLR4**

CO <sub>2</sub> -Inkubator Panasonic MCO-170AICUV	Laborbestand
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4,5g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, steril	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DBPS) Phosphat-gepufferte Salzlösung, steril	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Falcon (50 ml, 15 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

Fetal Bovine Serum (FBS), 10% (v/v)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Filter (d = 0,2 µm)	Laborbestand
Handzähler	Laborbestand
Hämatocytometer (Neubauer improved)	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, Großbritannien
HEK-Blue™ Detection, Detektionsmedium	Invivogen, Toulouse, Frankreich
HEK-Blue™ mTLR2 Zellen	Invivogen, Toulouse, Frankreich
HEK-Blue™ mTLR4 Zellen	Invivogen, Toulouse, Frankreich
HEK-Blue™ Selection (250x), Antibiotika	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Kolbenhubpipette (100 µl, 20 µl)	Eppendorf AG, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Lipoteichonsäure (LTA)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Mikroskop Primovert 415510-1100-000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf AG, Karlsruhe, Deutschland
96-Mikrowell-Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Normocin™ (50 mg/ml)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Penicillin (100 U/ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Photometer SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Pipettenspitzen (100 µl, 20 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Pipettierhilfe	Laborbestand
Serologische Pipette (10 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

Spritze (20 ml)	Laborbestand
Sterile Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars	Laborgene, Allerød, Dänemark
Streptomycin (100 µg/ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Vakuumpumpe	Laborbestand
Wasserbad F019	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ) TC-Flasche T75, steril	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber aus Kunststoff	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

## **2.5 Statistische Auswertung, Sonstige Software**

GraphPad Prism 9.2.0	GraphPad Software, San Diego, USA
SoftMax Pro 7	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland

## 3 Methodik

### 3.1 Tierversuch: Versuchsaufbau

Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Proben lagen zum Start der Untersuchungen bereits vor, deshalb folgt nur eine kurze Beschreibung des Versuchsaufbaus. Bei den Versuchstieren handelte es sich um 6-8 Wochen alte weibliche C57BL/6J Mäuse von Janvier Labs mit SPF-Hygiestatus (specific-pathogen free). Die weitere Haltung erfolgte in der Tierhaltung der Universität Wien im Department für Molekulare Ernährung. Der Tierversuch wurde vor Beginn durch das österreichische Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) genehmigt (2020-0.345.544).

Die Standard-Haltungsbedingungen umfassten eine Raumtemperatur von 24-25° C, eine Luftfeuchtigkeit von ca. 55% sowie einen Zyklus von je 12 Stunden Licht gefolgt von 12 Stunden Dunkelheit. Darüber hinaus stand den Versuchstieren über die gesamte Laufzeit Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Jede der vier Interventionsgruppen umfasste acht Mäuse. Nach einer einwöchigen Adaptionsphase an die Flüssigdiät erhielten die Mäuse entweder für acht Wochen eine isokalorische Flüssig-Kontrolldiät (C) mit 15.7 MJ/kg Energiegehalt (davon 69 E% Kohlenhydrate, 12 E% Fette und 19 E% Proteine), eine Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche Diät (FFC) mit 17.8 MJ/kg Energiegehalt (davon 60 E% Kohlenhydrate, 25 E% Fette und 19 E% Proteine mit 50% wt/wt Fructose- und 0.16% wt/wt Cholesterin-Gehalt), die Kontrolldiät mit Phosphatidylcholin-Supplement (C+PC) oder die FFC-Diät mit PC-Supplement (FFC+PC).

In Tabelle 2 findet sich ein Überblick über die Makronährstoffverteilung der jeweiligen Flüssigdiäten, die genaue Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet.

**Tabelle 2: Makronährstoffzusammensetzung der Flüssigdiäten**

	C	FFC	C + PC	FFC + PC
Kohlenhydrate [Energie-%] - davon Fructose [% wt/wt]	69	60 50	69	60 50
Lipide [Energie-%] - davon Cholesterin [% wt/wt]	12	25 0.16	12	25 0.16
Protein [Energie-%]	19	19	19	19
Phosphatidylcholin [mg/g Nahrung]	-	-	12.5	12.5

Beide Flüssigdiäten von SSniff Spezialdiäten wurden den Mäusen über eine Kugeltränke zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Paarfütterung durchgeführt, wie beschrieben bei *Sellmann et al.* [99]. Das Körpergewicht der Mäuse wurde wöchentlich gemessen und dokumentiert.

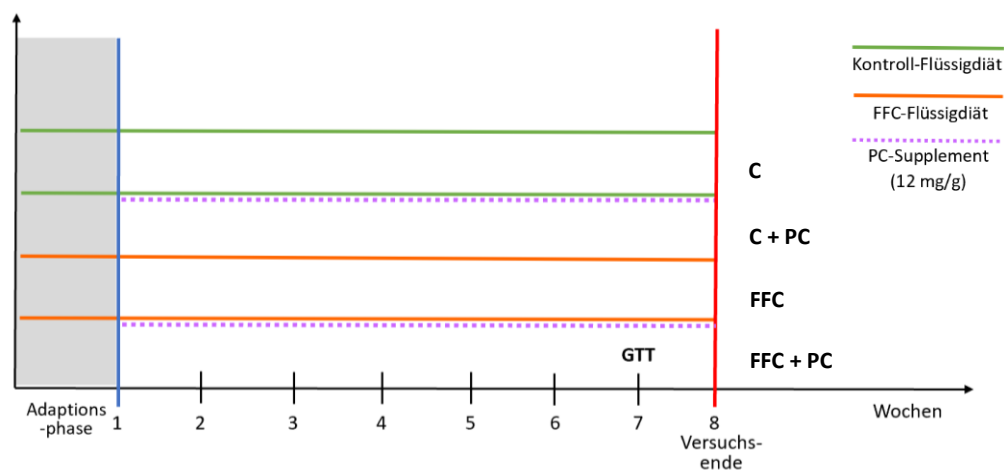
Phosphatidylcholin wurde bei den entsprechenden Interventionsgruppen in einer Dosierung von 12.5 mg pro Gramm Futter zugefügt. Das Supplement von Lipoid GmbH setzte sich zusammen aus Eidotter-PC und D, L- $\alpha$ -Tocopherol ( $\geq 96$  % Phosphatidylcholin-Gehalt). Die exakten Daten zur Zusammensetzung und Reinheit des Supplements finden sich im Anhang.

### Glucose-Toleranztest

Nach sieben Wochen Versuchslaufzeit wurde von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe nach sechsständiger Nahrungskarenz zunächst der Nüchternblutzuckerspiegel gemessen [100]. Eine darüber hinausgehende nächtliche Nahrungskarenz würde für die schneller metabolisierenden Mäuse, die noch dazu einen Großteil ihres Tagesbedarfs in der Nacht konsumieren, eine verhältnismäßig viel längere Fastenperiode als für einen Menschen bedeuten und daher möglicherweise die Nüchternblutzuckerwerte verfälschen [101]. Im Anschluss wurde jeder Maus 2 g Glucose/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert und in weiterer Folge der Blutzuckerspiegel in Abständen von 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten gemessen.

### Versuchsende

Der Versuch endete nach acht Wochen wie beschrieben bei *Jin et al.* [100]. Es wurden Blut- und Gewebeproben gewonnen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse gelagert.



**Abbildung 4: Schematischer Überblick über den Versuchsablauf.** Die Adaptionsphase betrug eine Woche, danach erhielten die vier Interventionsgruppen ihre jeweilige Flüssigdiät mit bzw. ohne PC-Supplement. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 2 bzw. im Anhang beschrieben. In der siebten Woche wurde ein Glucosetoleranztest (GTT) durchgeführt.

### 3.2 Paraffineinbettung der Gewebeproben und Herstellung von histologischen Schnitten

Zu Beginn der Arbeit lagen die Gewebeschnitte bereits fertig vor. Diese waren zunächst in Formalin fixiert, anschließend mit Alkohol und Roti-Histol behandelt und dann in Paraffin eingebettet worden. Vor dem Schneiden wurden die Gewebeblöcke zunächst für mindestens 10 Minuten bei -20° C gekühlt. Mit dem Mikrotom wurden 4 µm dicke Leberschnitte angefertigt und diese mit einer Pinzette in ein 20° C warmes Wasserbad zum Glätten überführt. Von dort wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und anschließend für eine Dauer von drei Tagen (72 h) bei einer Temperatur von 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

### 3.3 Methoden zur histologischen Befundung der Leberparameter

#### 3.3.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung und Befundung

Es wurde eine Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H&E) angewendet, um die Präparate zu färben und die Leberhistologie anschließend mittels NAFLD-Activity-Score (NAS) zu bewerten. Dabei haben negative geladene Zellstrukturen, wie Nukleinsäuren, eine hohe Affinität zu dem basischen, positiv geladenen Hämatoxylin-Farbstoff und erscheinen blau, während der azide, negativ geladene Eosin-Farbstoff Cytoplasma und extrazelluläre Matrix pink färbt. [102]

#### Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Leberschnitte wurden mittels folgender Alkohol-Reihe auf dem Orbital-Schüttler (80 rpm) entparaffiniert und schließlich mit Aqua dest. rehydriert:

**Tabelle 3: Entparaffinierung und Rehydrierung H&E-Färbung**

Dauer	Reagenz
20 Minuten	Roti-Histol
10 Minuten	100% Ethanol
10 Minuten	95% Ethanol
10 Minuten	85% Ethanol
10 Minuten	70% Ethanol
10 Minuten	30% Ethanol
10 Minuten	Aqua dest. I
10 Minuten	Aqua dest. II

### Hämatoxylin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Färbung wurden eine Glasküvette mit Hämatoxylin-Lösung, zwei Glasküvetten mit Leitungswasser sowie eine Glasküvette mit Aqua dest. unter dem Abzug vorbereitet. Die Schnitte wurden eine Minute lang in die Hämatoxylin-Lösung getaucht und dann für jeweils 30 Sekunden in den beiden Leitungswasser-Behältern gebläut. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit Aqua dest.

**Tabelle 4: Hämatoxylin-Färbung**

Dauer	Reagenz
1 Minute	Hämatoxylin-Lösung
30 Sekunden	Leitungswasser I
30 Sekunden	Leitungswasser II
Abstoppen	Aqua dest.

### Dehydrierung

Direkt nach dem Abstoppen wurden die Leberschnitte in 70% Ethanol überführt und unter dem Abzug auf dem Orbital-Schüttler (80 rpm) zunächst in diesem für sieben Minuten und danach in 85% Ethanol für ebenfalls sieben Minuten dehydriert.

**Tabelle 5: Dehydrierung H&E-Färbung**

Dauer	Reagenz
7 Minuten	70% Ethanol
7 Minuten	85% Ethanol

### Eosin-Färbung

Auf jeden Schnitt wurden 1-2 Tropfen Eosin-Lösung pipettiert und nach einer Einwirkzeit von einer Sekunde sofort wieder abgeklopft. Direkt danach wurden sie für jeweils zehn Sekunden zuerst in 95% Ethanol und dann in 100% Ethanol kräftig geschwenkt. Anschließend wurden die Schnitte in Roti-Histol überführt und für 20 Minuten auf den Orbital-Schüttler (80 rpm) gestellt.

**Tabelle 6: Eosin-Färbung**

Dauer	Reagenz
1 Sekunde	Eosin-Lösung
10 Sekunden	95% Ethanol
10 Sekunden	100% Ethanol
20 Minuten	Roti-Histol

## Eindecken und Trocknung

Nach sorgfältigem Trocknen der Objektträger wurde ein Tropfen Entellan pro Schnitt aufgetragen und der Schnitt mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden dann 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

## Befundung der Leberschnitte mittels NAS

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Leberschnitte wurden schließlich mithilfe des NAFLD-Activity-Scores [103] befundet. Im Folgenden wird der Score kurz beschrieben:

Bewertet werden dabei der Grad der Steatose anhand fettgefüllter Hepatozyten [104] und der Grad der Inflammation anhand entzündlicher Infiltrate und hepatozellulären Schäden (meist in Form von Ballooning) [105, 106]. Tabelle 7 fasst die Beurteilungsgrundlagen für das Scoring zusammen. Der Grad der Fibrose wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bewertet, da für die korrekte Beurteilung eine für Kollagene geeignete Färbemethode (Masson Trichome oder Sirius Red) erforderlich ist. [107]

Die NAFLD-Aktivität ergibt sich schließlich durch eine Kombination der Grade für Steatose und Inflammation.

**Tabelle 7: Beurteilungsgrundlagen für die Erstellung des NAS** (erstellt und adaptiert nach [103-108])

NAFLD-Activity-Score							
Steatose		Lobuläre Inflammation		Hepatozelluläres Ballooning		Fibrose	
Grad	Definition	Grad	Definition	Grad	Definition	Grad	Definition
0	< 5%	0	keine	0	keine	0	keine
1	5-33 %	1	< 2 Foci/20x mikroskopischem Feld	1	mild, wenige Hepatozyten	1a 1b 1c	mild, perisinusoidal moderat, perisinudoidal nur portal/periportal
2	34-66 %	2	2-4 Foci/20x Feld	2	moderat, viele Hepatozyten	2	perisinusoidale Fibrose mit portaler/periportaler
3	> 66%	3	> 4 Foci/20x Feld	-		3	Überbrückende Fibrose
-		-		-		4	Zirrhose



### 3.3.3 Färbung und Zählung neutrophiler Granulozyten mittels Naphthol AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung

Mittels dieser Färbemethode kann die Aktivität eines Enzyms (spezifische Esterase) in den Lysosomen neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. [109] Die neutrophilen Granulozyten werden bei der Reaktion pink gefärbt und können im Anschluss unter dem Mikroskop gezählt werden, um die entzündliche Infiltration im Lebergewebe zu beurteilen.

Für die Färbung wurde dabei ein spezielles Färbekit (Sigma Aldrich, #91C-1KT) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Im Folgenden sind die wesentlichen Schritte der Färbung kurz zusammengefasst:

#### Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Leberschnitte wurden mittels folgender Alkohol-Reihe auf dem Orbital-Schüttler (80 rpm) entparaffiniert und anschließend mit Aqua dest. rehydriert:

**Tabelle 8: Entparaffinierung und Rehydrierung AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung**

Dauer	Reagenz
10 Minuten	Roti-Histol
5 Minuten	100% Ethanol
5 Minuten	95% Ethanol
5 Minuten	70% Ethanol
10 Minuten	Aqua dest.

#### Fixieren

Nach der Rehydrierung wurden die Schnitte je nach Größe mit 1-4 Tropfen der zuvor hergestellten Citrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung (CAF) unter exakter Einhaltung der Einwirkdauer von 30 Sekunden fixiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Aqua dest. abgestoppt.

**Tabelle 9: Herstellung der CAF-Fixierlösung für die AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung**

Menge	Reagenz
2,5 ml	Citrat-Lösung
6,5 ml	Aceton
0,8 ml	37% Formalin

## Färbung

Eine frische Färbelösung wurde vor jedem Färbedurchgang angefertigt (siehe Tabelle 10) und nach Vorwärmung im Ofen bei 37° C auf die Leberschnitte pipettiert. Danach fand eine Inkubation für 20 Minuten im Ofen bei 37° C statt und nach Ablauf dieser Zeit wurden die Präparate für eine Dauer von zwei Minuten auf dem Orbital-Schüttler (80 rpm) mit destilliertem Wasser gespült.

**Tabelle 10: Herstellung der Färbelösung für die AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung**

Menge	Reagenz
100 µl	Natriumnitrit-Lösung
100 µl	Fast-Red-Violet-LB-Base Lösung
Vortexen, 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur	
4 ml	Aqua dest. (39° C)
500 µl	Trizmal 6.3 Pufferkonzentrat
100 µl	Naphthol-AS-D-Chloroacetat-Lösung
Vortexen, ≥ 2 Minuten Inkubation bei 39° C	

## Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung

Die Hämatoxylin-Gegenfärbung wurde nach dem in Tabelle 11 angeführten Schema durchgeführt.

**Tabelle 11: Hämatoxylin-Färbung für die AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung**

Dauer	Reagenz
20 Sekunden	Hämatoxylin-Lösung
10 Sekunden	Leitungswasser I
10 Sekunden	Leitungswasser II
Abstoppen	Aqua dest.

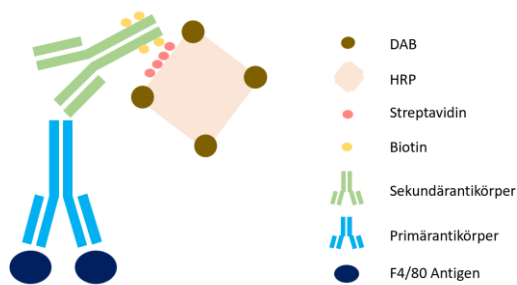
## Eindecken und Auswertung

Die Objektträger wurden getrocknet und die Schnitte mit 1-2 Tropfen wässrigem Eindeckmedium versehen. Im Anschluss erfolgte die Trocknung für 24 Stunden unter dem Abzug bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden für die Auswertung verblindet. Die Zählung der neutrophilen Granulozyten erfolgte unter dem Mikroskop mit 200-facher Vergrößerung. Pro Schnitt wurden acht Bilder herangezogen und aus diesen der Mittelwert gebildet.

### 3.3.4 Färbung und Zählung F4/80 positiver Makrophagen in Leberschnitten

Das F4/80-Oberflächenantigen wird auf der Oberfläche von Maus-Makrophagen exprimiert, nicht jedoch von anderen Leukozyten [110], weshalb diese Methode zur weiteren Charakterisierung der entzündlichen Vorgänge in der Leber herangezogen wurde.

Die immunhistochemische Färbung bedient sich der Streptavidin-Biotin-Methodik, welche auf der Affinität von Streptavidin zu Biotin basiert und einen Primärantikörper, einen biotinylierten Sekundärantikörper, Enzym-gekoppeltes Streptavidin sowie eine entsprechende Substratlösung beinhaltet. Als Enzym wird in diesem Fall Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP) verwendet. Als chromogenes Substrat wird bei der angewandten Färbemethode 3,3'-Diamino-benzidin (DAB) eingesetzt, das zur Produktion eines braunen, unlöslichen Farbstoffs führt. [111]



**Abbildung 5: Reaktionsschema der F4/80+ immunhistochemischen Färbung.**

1. Primärantikörper bindet an das F4/80-Oberflächenantigen von Makrophagen.
2. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper.
3. An HRP gekoppeltes Streptavidin reagiert mit dem Biotin des Sekundärantikörpers.
4. DAB-Enzymsubstrat wird durch HRP zu einem braunen Farbstoff umgesetzt.

[adaptiert nach 111]

Im folgenden Abschnitt ist das Vorgehen bei der Färbung kurz zusammengefasst:

#### Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert wie bereits bei der Färbung der neutrophilen Granulozyten beschrieben (siehe Schema Tabelle 8). Danach wurden sie mit einem PAP-Fettstift umrandet, um ein Verlaufen der in weiterer Folge aufgetragenen Reagenzien zu vermeiden.

#### Peroxidase-Block

Um eine endogene Peroxidaseaktivität zu verhindern, wurden die Schnitte zunächst für 20 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur mit einer Peroxidase-Blockierlösung inkubiert und anschließend in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 10 Minuten auf dem Orbital-

Schüttler (80 rpm) gewaschen. Zwischen der Inkubation mit den nachfolgenden Reagenzien fanden weitere Waschvorgänge mit PBS statt, welche in Tabelle 14 beschrieben sind.

### Blockieren

Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde eine 5% BSA in PBS-Lösung auf die Schnitte aufgetragen und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

**Tabelle 12: Herstellung der Blockierlösung für die F4/80+ Färbung**

Menge	Reagenz
1 g	BSA
20 ml	PBS
vortexen, Zwischenkühlung bei 4° C	

### Primärer und sekundärer Antikörper

Der F4/80-Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:200 in 5% BSA in PBS verdünnt und nach einem weiteren Waschvorgang auf die Präparate pipettiert. Die Inkubationszeit unter Lichtschutz bei Raumtemperatur betrug 1,5 Stunden. Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls im Verhältnis 1:200 in 5% BSA in PBS verdünnt und die Schnitte unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

### Streptavidin-HRP und DAB/Substrat-Chromogensystem

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Leberschnitte mit Streptavidin-gekoppelter HRP für 20 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur und nach einem letzten Waschvorgang in PBS wurde die frisch hergestellte Chromogenlösung (siehe Tabelle 16) auf die Präparate aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 7 Minuten 30 Sekunden kam es zu einer sichtbaren Braunfärbung der Leberschnitte, woraufhin die Reaktion mit Aqua dest. abgestoppt wurde.

**Tabelle 13: Mischverhältnis der Chromogenlösung für die F4/80+ Färbung**

Menge	Reagenz
1 Tropfen	DAB + Chromogen-Lösung
1 ml	DAB + Substratpuffer

### Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung erfolgte nach dem in Tabelle 11 angegebenen Schema. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils 10 Sekunden kräftig in 70%, 96% und 100% Ethanol geschwenkt und für 10 Minuten in Roti-Histol auf dem Orbital-Schüttler (80 rpm) belassen.

## Eindecken und Auswertung

Das Eindecken und Trocknen wurde durchgeführt wie bei der H&E-Färbung beschrieben, die Zählung erfolgte wie bei der Färbung neutrophiler Granulozyten. Gezählt wurden ausschließlich braun gefärbte Makrophagen, bei denen eindeutig ein Zellkern erkennbar war.

**Tabelle 14: Überblick über die Inkubationszeiten und Waschvorgänge bei der F4/80+ Färbung**

Dauer	Reagenz
20 Minuten	Peroxidase-Block
10 Minuten	Waschen mit PBS
25 Minuten	5% BSA in PBS (Blockieren)
10 Minuten	Waschen mit PBS
90 Minuten	Primärantikörper F4/80+ (1:200 in 5% BSA in PBS)
15 Minuten	Waschen mit PBS
30 Minuten	Sekundärantikörper (1:200 in 5% BSA in PBS)
15 Minuten	Waschen mit PBS
20 Minuten	Streptavidin-HRP (Enzym)
15 Minuten	Waschen mit PBS
7,5 Minuten	DAB + Substrat Chromogen-System (Substrat)
Abstoppen mit Aqua dest.	
20 Sekunden	Hämatoxylin
20 Sekunden	Leitungswasser I
10 Sekunden	Leitungswasser II
Abstoppen mit Aqua dest.	
10 Sekunden	70% Ethanol
10 Sekunden	96% Ethanol
10 Sekunden	100% Ethanol
10 Minuten	Roti-Histol

## 3.4 Messung der TLR2 und TLR4-Aktivität mithilfe kommerziell erhältlicher HEK-Blue™ mTLR2 und mTLR4-Zellen

Im Rahmen der Arbeit wurden kommerziell erhältliche HEK-Blue™ mTLR2- und HEK-Blue™ mTLR4-Zellen der Firma Invivogen eingesetzt und mit zu Versuchsbeginn bereits zur Verfügung stehenden Plasmaproben nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Methode beruht auf dem SEAP-Reporter-System [112], wobei es durch die TLR2 bzw. TLR4 Liganden LTA bzw. LPS [113] zu einer Stimulation der SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase)-

Expression kommt. Durch farbliche Umsetzung des SEAP-Substrates im Detektionsmediums können die direkt korrelierten Level an LTA bzw. LPS quantifiziert werden.

Im folgenden Abschnitt sind die wesentlichen Schritte des zellbasierten Nachweises von TLR2 und TLR4-Liganden im Mausplasma kurz zusammengefasst:

#### *Vorbereitung und Handhabung der Zellkulturen*

Sämtliche Arbeitsschritte mit den Zellkulturen fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 statt. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums sowie der antibiotischen Abschirmung.

**Tabelle 15: Übersicht über die Zusammensetzung des Nährmediums bei den HEK-Blue™-Kulturen**

<b>Reagenzien</b>	<b>Konzentration</b>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	4,5 g/L Glucose, 2 mM L-Glutamin
Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Normocin	50 mg/ml
HEK-Blue™ Selection	1:250 Verdünnung

#### *Durchführung des Zellkultur-Assays*

Zunächst wurde das pulverförmige HEK-Blue™ Detektionsmedium in autoklaviertem Wasser gelöst, im Wasserbad (37° C) erwärmt und anschließend gefiltert.

Die Plasmaproben der Versuchstiere waren bereits durch Mitglieder der Arbeitsgruppe gewonnen und bei -80° C gelagert worden. Als Blank wurden 10 µl DPBS (gepufferte Salzlösung) verwendet, als Positivkontrolle LTA (10.000 ng/ml) im Fall von mTLR2 und LPS (50.000 ng/ml) im Fall von mTLR4.

Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die Zellen in DPBS verdünnt und mithilfe eines Hämocytometers vom Typ *Neubauer improved* unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung gezählt. Zur Berechnung der erforderlichen Zellzahl für das Assay kam folgendes Berechnungsschema zur Anwendung:

1. Mittelwert der Zellen aus den 4 Quadranten

$$\bar{x} = \frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4}{4}$$

2. Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Neubauer-Faktors

$$\bar{x} * 5 * 10^4$$

3. Zellsuspension-Berechnungsfaktor

$$\text{Zellsuspension-Berechnungsfaktor} = \frac{\bar{x} * 5 * 10^4 \text{ [Zellen/ml Zellsuspension]}}{\text{Erforderliche Zellkonzentration [Zellen/ml Detektionsmedium]}^*}$$

\* mTLR2 = 280.000, mTLR4 = 140.000

4. Erforderliche Gesamtmenge an Zellsuspensions-Detektionslösung ( $V_G$ )

$$V_G = 180 \mu^1 * \text{Probenanzahl} + \text{Sicherheitszuschlag}$$

<sup>1</sup> erforderliche Menge pro Well

5. Erforderliche Menge an Zellsuspension ( $V_Z$ )

$$V_Z = \frac{V_G}{\text{Zellsuspension-Berechnungsfaktor}}$$

6. Erforderliche Menge an Detektionsmedium ( $V_D$ )

$$V_D = V_G - V_Z$$

Pro Well wurden 180  $\mu$ l der Mischung aus Zellsuspension und Detektionsmedium verwendet.

### **Inkubation und Auswertung**

Es folgte eine mindestens zwölfstündige Inkubation bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. Da es durch Umsetzung des SEAP-spezifischen Substrats zu einem Farbumschlag von rot zu blau/violett kommt und die Konzentration des Farbstoffs mit den Leveln an TLR2- bzw. TLR4-Liganden korreliert, wurde direkt im Anschluss an die Inkubation eine photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 620/635/655 nm Wellenlänge durchgeführt. Die Auswertung der OD erfolgte schließlich bei 655 nm.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wie auch die grafische Abbildung der Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware PRISM (Version 9.2.0, GraphPad Software Inc.). Ausreißer wurden mittels Ausreißertest nach Grubbs bestimmt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde nach Überprüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt, um auf einen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte zu prüfen. Um auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Interventionsgruppen zu testen, wurde ein Post Hoc Test (Tukey's) angewendet. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert < 0.05.



## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss einer oralen Phosphatidylcholin-Supplementation auf verschiedene Parameter der Lebergesundheit bzw. NAFLD. Zusätzlich zu den selbst erhobenen Ergebnissen werden hier zum besseren Gesamtverständnis ergänzende Daten dargestellt, die bereits im Rahmen des Tierversuchs erhoben wurden, wie das Körpergewicht der Mäuse, die durchschnittliche Kalorienaufnahme und die Daten aus dem Glucose-Toleranztest.

### 4.1 Kalorienaufnahme, Körpergewicht und NAFLD-Parameter

Die Kalorienaufnahme unterschied sich nicht zwischen den Kontrollgruppen und den FFC-Gruppen, die FFC-Gruppen nahmen allerdings verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant mehr Kalorien ( $p < 0.05$ ) zu sich.

Weder das Körpergewicht zu Beginn noch am Ende des Versuchs unterschied sich zwischen den Interventionsgruppen, es gab daher auch keine wesentlichen Unterschiede in der durchschnittlichen Gewichtszunahme der Mäuse. Die Menge an zugeführtem PC unterschied sich nicht zwischen der C+PC und der FFC+PC-Gruppe.

Bei den Mäusen mit FFC-Futter traten deutliche makrovesikuläre Fetteinlagerungen und Zeichen für Infiltration von Immunzellen auf (siehe Abbildung 6). Der Grad an Steatose unterschied sich nicht zwischen den FFC-Gruppen (FFC  $2.1 \pm 0.2$  gegenüber FFC+PC  $1.8 \pm 0.3$ ), das PC-Supplement im FFC-Futter konnte die Fettakkumulation in der Leber nicht verhindern.

Einen signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) bezüglich Steatose gab es zwischen den FFC-Gruppen und den Kontrollgruppen, deren durchschnittlicher Steatose-Grad bei 0.2 lag. Was die mithilfe des NAS bewerteten Entzündungszeichen in der Leber betrifft, wies die FFC-Gruppe einen signifikant erhöhten Inflammations-Score ( $p < 0.05$ ) verglichen mit den Mäusen in der Kontrollgruppe sowie in der FFC+PC-Gruppe auf.

Tabelle 16 fasst die Daten zur Kalorien- und Phosphatidylcholin-Zufuhr, zum Körpergewicht sowie zum Grad der Steatose und Inflammation zusammen:

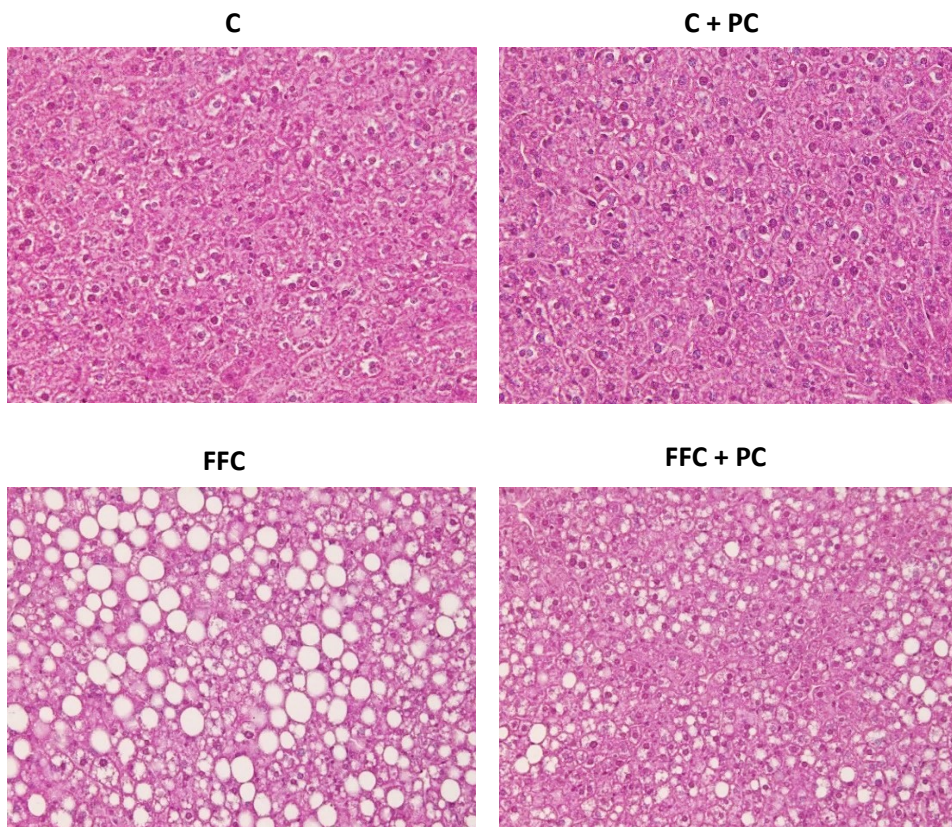
**Tabelle 16: Kalorienaufnahme, Körpergewicht und NAFLD-Parameter** der Versuchstiere mit Kontrolldiät (C), Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) mit und ohne Phosphatidylcholin-Supplementation (PC)

Parameter	Interventionsgruppen			
	C	C + PC	FFC	FFC + PC
Kalorienaufnahme (kcal/Maus/Tag)	8.3 ± 1.1	8.1 ± 1.3	9.5 ± 0.8 <sup>a, b</sup>	9.1 ± 0.1 <sup>a, b</sup>
Kalorienaufnahme inkl. PC (kcal + kcal PC /Maus/Tag)	8.3 ± 1.1	8.4 ± 1.3	9.5 ± 0.8 <sup>a, b</sup>	9.3 ± 0.1 <sup>a, b</sup>
PC-Aufnahme (mg PC/Maus)		27.2 ± 0.1		26.5 ± 0.3
Startgewicht (g)	19.4 ± 0.3	19.3 ± 1.0	19.4 ± 0.5	19.5 ± 0.2
Endgewicht (g)	21.8 ± 0.3	22.5 ± 1.2	22.6 ± 0.6	22.7 ± 0.7
Gewichtszunahme (g)	2.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.4
Steatose*	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2 <sup>a, b</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>a, b</sup>
Inflammation*	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1 <sup>b, d</sup>	0.2 ± 0.1

Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts

<sup>a</sup>p < 0.05 verglichen mit C, <sup>b</sup>p < 0.05 verglichen mit C + PC; <sup>c</sup>p < 0.05 verglichen mit FFC + PC.

\* NAFLD-Activity-Score.



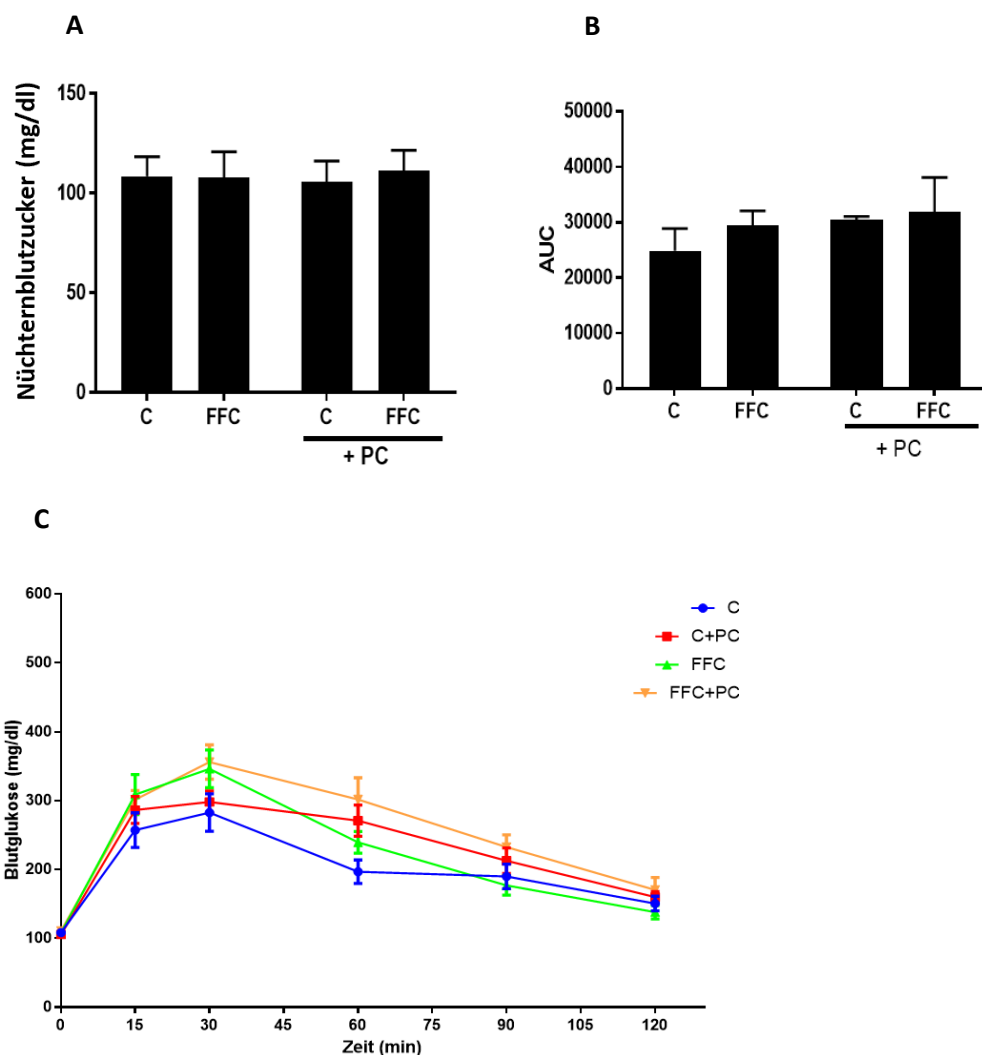
**Abbildung 6: Repräsentative Bilder der Leberhistologie** der vier Interventionsgruppen: Kontrolle (C), Kontrolle + PC (C+PC), Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche Ernährung (FFC), Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche Ernährung + PC (FFC+PC); Färbung mittels Hämatoxylin & Eosin-Färbung (Vergrößerung 400-fach)

## 4.2 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel

Der Nüchternblutzucker gemessen nach sechsständiger Nahrungskarenz unterschied sich nicht zwischen den Interventionsgruppen (siehe Abbildung 7A).

Nach intraperitonealer Injektion einer Dosis von 2 g/kg Körpergewicht Glucose erreichte der Blutzuckerspiegel bei allen Gruppen nach 30 Minuten seinen Peak (siehe Abbildung 7C). Dieser lag bei der FFC-Gruppe mit und ohne PC tendenziell ( $p > 0.05$ ) höher als bei den Gruppen mit Kontrolldiät.

Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der AUC des Blutzuckerspiegels zwischen den Interventionsgruppen (siehe Abbildung 7B).

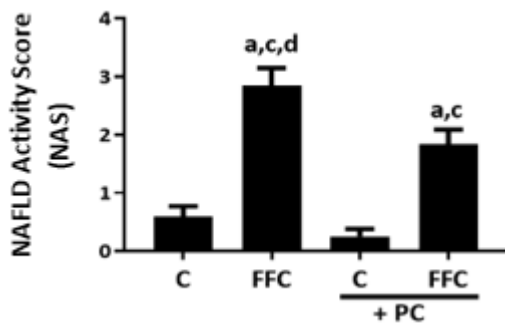


**Abbildung 7: Einfluss einer PC-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel. A) Nüchternblutzuckerspiegel in mg/dl.** Durchschnittlicher Nüchternblutzuckerspiegel der Mäuse in der Kontrollgruppe (C), in der Gruppe mit Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) sowie C und FFC mit Phosphatidylcholin-Supplement (+ PC) nach einer 6-stündigen Nahrungskarenz. **B) Area under the curve (AUC)** berechnet aus dem Blutzuckerlauf über 120 Minuten. **C) Verlauf des Blutzuckerspiegels** in mg/dl nach intraperitonealer Applikation von 2 g/kg Körpergewicht Glucose. Die Messungen wurden im Abstand von 15 Minuten über eine Gesamtdauer von 120 Minuten durchgeführt. Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ .

### 4.3 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf Fettakkumulation und Entzündungs-zeichen in der Leber (NAFLD-Activity-Score)

Obwohl sich Gewichtszunahme und Körpergewicht der FFC-Gruppe am Ende der Studie nicht signifikant von den drei anderen Gruppen unterschied, kam es bei Fett-, Fructose- und Cholesterin-reicher Ernährung zu einer Fettleber mit beginnender Entzündung im Sinne einer frühen NASH wie bei vorangegangenen Studien. [99-100 und 114-115].

Der NAFLD-Activity-Score, welcher Steatose und Inflammation kombiniert betrachtet, war in der FFC-Gruppe signifikant höher ( $p < 0.05$ ) verglichen mit den Kontrollgruppen sowie der FFC+PC-Gruppe (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Einfluss einer PC-Supplementation auf den NAFLD-Activity-Score:** Durchschnittlicher NAFLD-Activity Score (NAS) in der Kontrollgruppe (C), bei Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) sowie C und FFC mit Phosphatidylcholin-Supplement (+ PC). Angabe als Mittelwert  $\pm$  SEM; <sup>a</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu C, <sup>c</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu C+PC, <sup>d</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu FFC+PC.

### 4.4 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf die Zahl Neutrophiler Granulozyten und F4/80 positiver Makrophagen in der Leber

Um das Entzündungsgeschehen in der Leber weiter beurteilen zu können, wurden mittels Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung Infiltrate neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe sichtbar gemacht. Des Weiteren wurden F4/80 positive Zellen gefärbt und gezählt.

Wie die Beispielbilder in Abbildung 9A zeigen, kam es in der Gruppe mit FFC-Diät zu einem vermehrten Auftreten von gehäuftem neutrophilen Granulozyten, vor allem im Umfeld von Hepatozyten mit makrovesikulären Fetteinlagerungen.

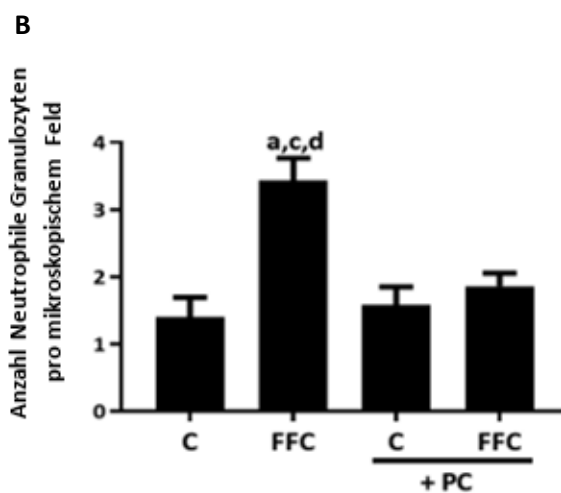
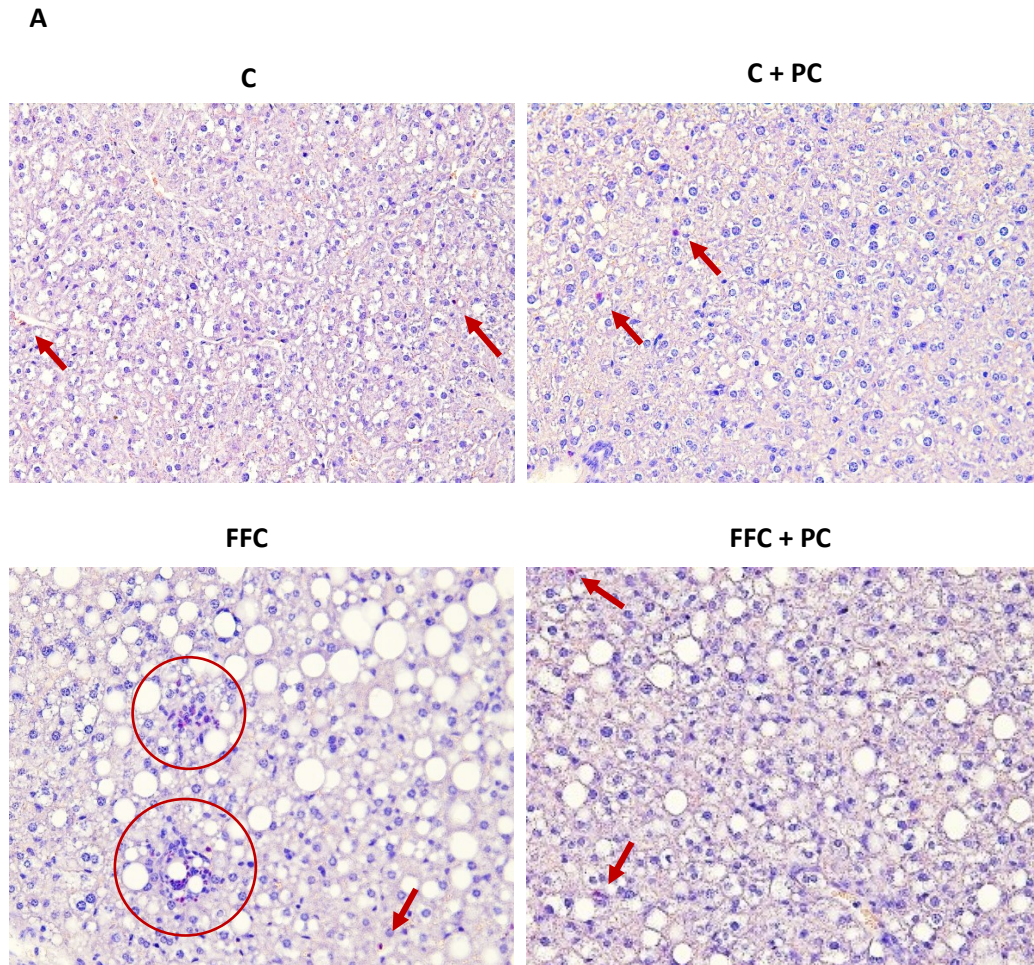
Dies spiegelt sich auch in der absoluten Zahl wider, wo die FFC-Gruppe im Durchschnitt eine signifikant höhere Zahl neutrophiler Granulozyten ( $p < 0.05$ ) pro mikroskopischem Feld im Vergleich zu den anderen Gruppen aufwies (siehe Abbildung 9B).

Zwischen den beiden Kontrollgruppen (C und C+PC) und der FFC-Gruppe mit PC-Supplement gab es keine Unterschiede in der durchschnittlichen Zahl neutrophiler Granulozyten pro mikroskopischem Feld.

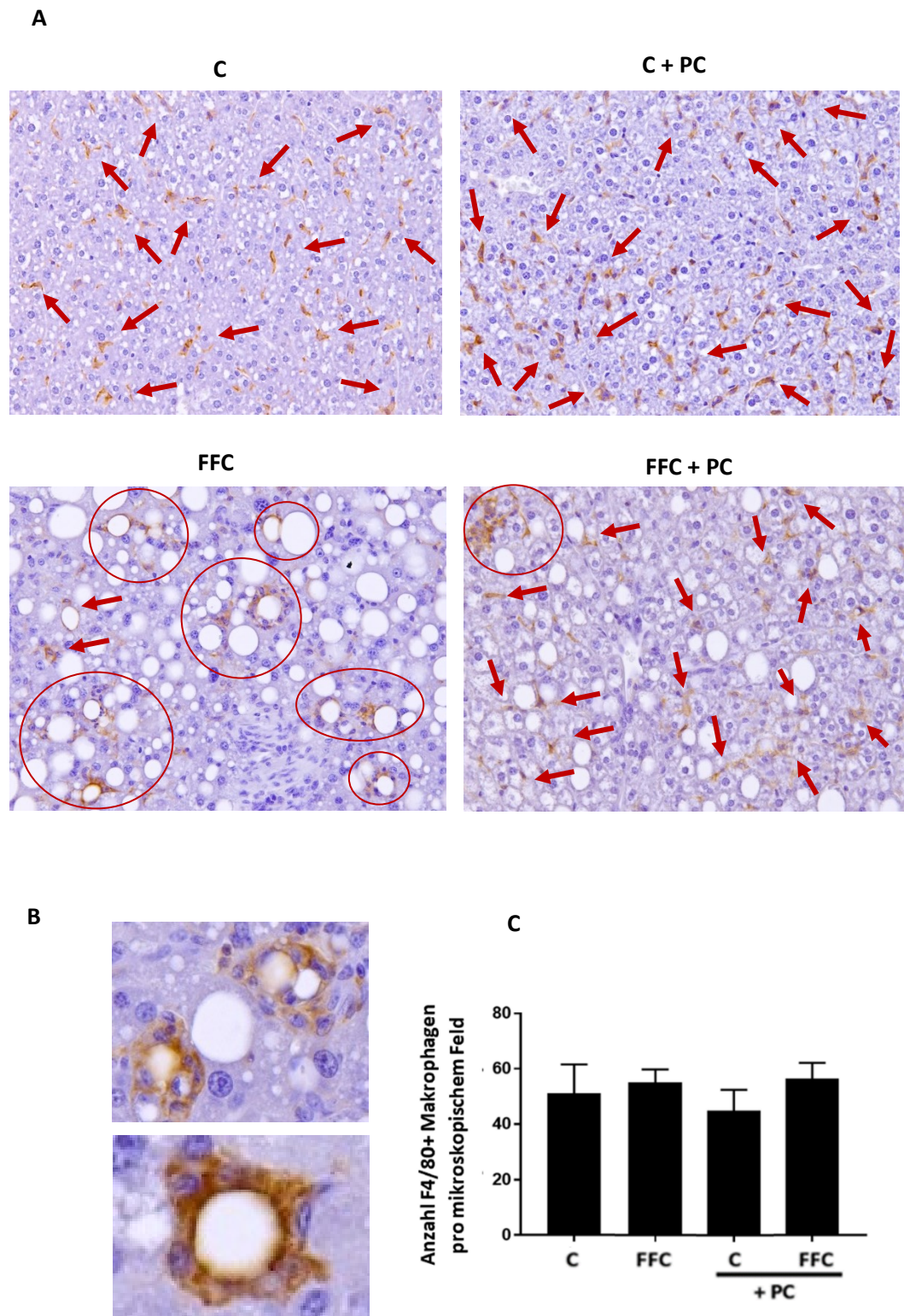
Um die Entzündungsprozesse und die Immunzellpopulationen in der Leber weiter charakterisieren zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung der F4/80 positiven Makrophagen durchgeführt.

Die repräsentativen Bilder der Färbung zeigen F4/80+ Makrophagen in allen vier Interventionsgruppen (siehe Abbildung 10A). In der FFC-Gruppe fanden sich histologisch für NASH typische hepatic crown-like structures (hCLS) [116, 117] im Sinne von kreisförmigen Akkumulationen von F4/80+ Makrophagen um steatotische Hepatozyten (siehe Abbildung 10B). Vereinzelt fanden sich diese Strukturen aber auch in der FFC+PC-Gruppe.

Was die durchschnittliche absolute Zahl an F4/80+ Makrophagen pro mikroskopischem Feld im Lebergewebe betrifft, gab es keine signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Interventionsgruppen (siehe Abbildung 10 C).



**Abbildung 9: Einfluss einer PC-Supplementation auf die Zahl Neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe von FFC-gefütterten Mäusen und Kontrollen. A) Repräsentative Bilder** der mit Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase Methode gefärbten Leberschnitte. Pfeile und Kreise markieren die pink gefärbten neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe. **B) Durchschnittliche Zahl neutrophiler Granulozyten** pro mikroskopischem Feld bei 200-facher Vergrößerung in der Kontrollgruppe (C), bei Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) sowie bei C und FFC mit Phosphatidylcholin-Supplement (+ PC); Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM, n = 5-8; <sup>a</sup>p < 0.05 im Vergleich zu C, <sup>c</sup>p < 0.05 im Vergleich zu C + PC, <sup>d</sup>p < 0.05 im Vergleich zu FFC + PC.



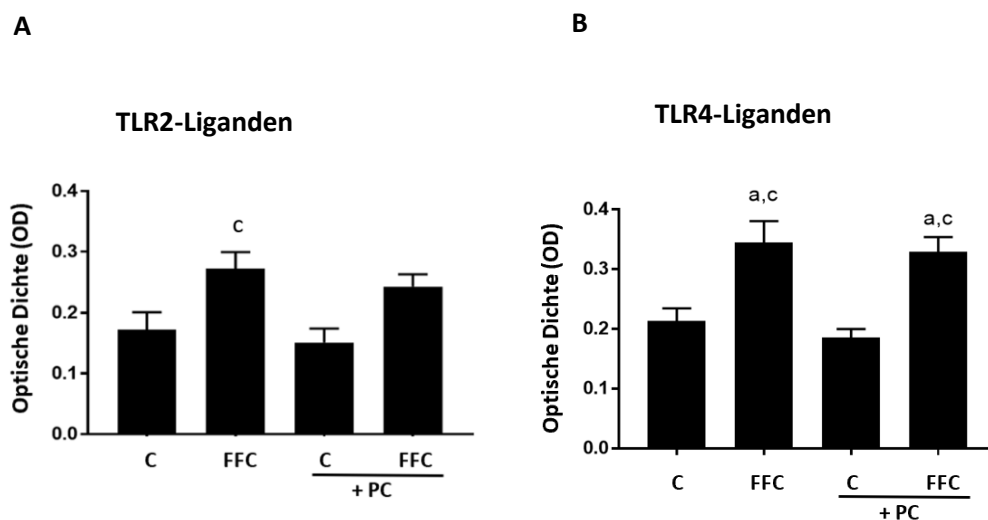
**Abbildung 10: Einfluss einer PC-Supplementation auf die Zahl F4/80 positiver Makrophagen im Lebergewebe von FFC-gefütterten Mäusen und Kontrollen. A) Repräsentative Bilder der immunhistochemisch gefärbten F4/80+ Makrophagen in den Leberschnitten. Pfeile und Kreise markieren die braun gefärbten F4/80+ Makrophagen. B) Repräsentative Bilder für Hepatic crown-like structures (hCLS) um steatotische Hepatozyten. C) Durchschnittliche Zahl an F4/80+ Makrophagen pro mikroskopischem Feld bei 200-facher Vergrößerung in der Kontrollgruppe (C), bei Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) und C bzw. FFC mit Phosphatidylcholin-Supplement (+PC). Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5-8.**

#### 4.4 Einfluss der Phosphatidylcholin-Supplementation auf die Konzentration von TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderblut (mTLR2/4-Zellkulturassay)

Über die Aktivität des SEAP-Reportergens und die Expression von mTLR2 und mTLR4 wurde die Konzentration der TLR2- und TLR4-Liganden bestimmt.

Sowohl die Konzentration von TLR2 als auch TLR4-Liganden war im Pfortaderblut der FFC-gefütterten Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (TLR2: C vs. FFC =  $p > 0.05$ ; C+PC vs. FFC =  $p < 0.05$ , TLR 4: C vs. FFC =  $p < 0.05$ ; C+PC vs. FFC =  $p < 0.05$ ).

Ähnlich verhielt es sich auch für die FFC+PC-gefütterten Tiere, wobei hier nur der Vergleich für TLR4-Liganden das signifikante Niveau erreichte (TLR4: C vs. FFC+PC =  $p < 0.05$ ; C+PC vs. FFC+PC =  $p < 0.05$ ).



**Abbildung 11: Einfluss einer PC-Supplementation auf die Konzentration von TLR2- und TLR4-Liganden im Pfortaderblut von FFC-gefütterten Mäusen und Kontrollen. A) Konzentration von TLR2-Liganden:** Photometrische Messung der optischen Dichte (OD) des HEK-Blue™ Farbreagenz bei 655 nm nach Inkubation der mTLR2-Zellsuspension mit Plasma der Kontrollgruppe (C), der Gruppe mit Fett-, Fructose- und Cholesterinreicher Ernährung (FFC) sowie der Gruppen C und FFC mit Phosphatidylcholin-Supplement (+PC); <sup>c</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu C+PC. **B) Konzentration von TLR4-Liganden:** Photometrische Messung der optischen Dichte (OD) des HEK-Blue™ Farbreagenz bei 655 nm nach Inkubation der mTLR4-Zellsuspension mit Plasma der C, FFC sowie C und FFC+PC-Gruppen; <sup>a</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu C, <sup>c</sup> $p < 0.05$  im Vergleich zu C + PC. Angabe der OD als Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ .



## 5 Diskussion

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass die Prävalenz der NAFLD weltweit nach wie vor steigt und für einen zunehmenden größeren Anteil der chronischen Lebererkrankungen verantwortlich ist [1-3]. Diesen Untersuchungen zufolge erhöht sich für NAFLD-Patienten nicht nur das allgemeine Mortalitätsrisiko [11], sondern auch das Risiko, an Leberversagen, HCC [1] oder kardiovaskulären Ereignissen [118] zu versterben. Das Krankheitsbild ist sehr komplex und kann sich in verschiedensten Symptomen äußern. Zusätzlich kommt es oft zum Auftreten von Begleiterkrankungen, wie Insulinresistenz und T2DM, Übergewicht, MetS, Hypertonie und Hyperlipidämie. Vor allem Insulinresistenz weist ähnliche pathophysiologische Mechanismen auf [20] und wird mittlerweile als einer der Hauptrisikofaktoren für NAFLD und NASH angesehen. Bisher konnte mit Ausnahme von Lebensstilmodifikationen keine Therapie mit ausreichender Evidenz bzw. ohne unerwünschte Nebenwirkungen gefunden werden [86], weshalb großer Bedarf an einem neuen Mittel besteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den möglichen therapeutischen Effekt eines PC-Supplements aus Eidotter bei NAFLD und NASH im Frühstadium zu untersuchen, da bisherige Studien auf eine positive Wirkung bezüglich Steatose und Inflammation hinweisen. Als zugrundeliegende Mechanismen werden dabei unter anderem eine Wiederherstellung verminderter PC-Konzentrationen in Hepatozyten und im Mucus der Darmbarriere, ein Einfluss auf den Lipidstoffwechsel sowie eine anti-inflammatorische Wirkung diskutiert [66, 97].

### 5.1 Das FFC-Fütterungsmodell zur Induktion einer NAFLD

Aus der Reihe möglicher NAFLD-Modelle wurde für die vorliegende Studie ein Fett-, Fructose- und Cholesterinreiches (FFC) Fütterungsmodell ausgewählt, da es hier nicht zum Ausschluss von Nährstoffen aus der Nahrung oder Gewichtsverlust kommt, sondern die komplette Bandbreite an metabolischen und histologischen Veränderungen bei NAFLD in Erscheinung tritt [119]. Als Fettkomponente (25 E%) wurde dabei Butterfett verwendet, welches reich an gesättigten Fettsäuren ist, ergänzt um 0.16 E% Cholesterin, welches Untersuchungen zufolge zu deutlicheren Leberschäden führt und NAFLD-Aktivität und Fibrose fördert [120], sowie Fructose. Ein hoher Fructosegehalt in der Nahrung wird als Risikofaktor für die Entstehung und einen schwereren Verlauf von NAFLD angesehen [121]. Dies liegt vermutlich an ihrer unkontrollierten Metabolisierung in der Leber durch Fructokinase C [122], ihrer stimulierenden Wirkung auf die *De novo* Lipogenese [123] sowie ihrer hemmenden Wirkung auf die  $\beta$ -Oxidation [124]. Außerdem gibt es vermehrt Hinweise aus Studien dafür, dass Fructose zu einer Dysbiose und erhöhter Durchlässigkeit der Darmbarriere für bakterielle

Toxine, wie LPS, führt [125]. Durch diese metabolischen Effekte auf Leber und Darm leistet Fructose in der Nahrung einen wesentlichen Beitrag zur Progression der NAFLD im Mausmodell zum Stadium einer NASH mit Inflammation, ER-Stress, oxidativem Stress, Apoptose und möglicherweise auch Fibrose [126].

Dies gilt als wesentlicher Vorteil im Gegensatz zu einer reinen High-Fat Ernährung (HFD), wo mit einem Fettanteil in der Nahrung zwischen 45-75 E% gearbeitet wird [127]. Dabei entwickeln die Mäuse zwar typische Symptome eines metabolischen Syndroms mit Übergewicht, Insulinresistenz und Fettakkumulation in der Leber [128], jedoch in der Regel keine Inflammation und Fibrose bzw. diese möglicherweise erst nach einer längeren Fütterungsdauer von mindestens sechs Monaten [129]. Die Entwicklung einer NAFLD durch HFD scheint außerdem abhängig zu sein von genetischen [130] sowie geschlechtsspezifischen [131] Unterschieden der Tiere, was das HFD-Modell nicht zur optimalen Wahl für Studien bezüglich NAFLD und NASH macht [126].

Gegenüber den Mangeldiäten, wie der Methionin- und Cholin-Mangeldiät (MCD), bietet die FFC-Ernährung den Vorteil, dass die Mäuse an Gewicht zunehmen und eine Insulinresistenz entwickeln, welche als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer NAFLD beim Menschen angesehen wird [132]. Diesen Vorteil bietet die FFC-Ernährung auch verglichen mit genetischen NAFLD-Tiermodellen, wie den Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen oder den Leptin-Rezeptor-defizienten *db/db*-Mäusen, welche zwar Übergewicht, Insulinresistenz und Steatose entwickeln [133], aber nicht die volle Bandbreite einer menschlichen NASH mit Inflammation und Fibrose [126]. Auch atherogene Diäten, wie z.B. die PAIGEN-Diät, mit hohen Konzentrationen an Cholesterin (1-1.25%) und Cholsäure (0.5%) [134], induzieren zwar Steatose, Inflammation, hepatozelluläres Ballooning und auch Fibrose, nicht jedoch viszerale Adipositas und Insulinresistenz, was definitiv als Nachteil gegenüber der FFC-Ernährung betrachtet werden kann [135]. Eine Ernährung reich an Fett, Fructose und Cholesterin spiegelt die pathophysiologischen Mechanismen der menschlichen NAFLD im Mausmodell daher gut wider, ein möglicher Nachteil dieser Ernährungsform ist jedoch, dass die Komponenten der Nahrung nicht standardisiert sind [126].

Zu bedenken ist, dass artspezifische und metabolische Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen bestehen [101]. Auch bei Ratten kann mittels Ernährung eine NAFLD hervorgerufen werden, sie gelten im Vergleich zu Mäusen als anfälliger für eine spontane Progression zu Hepatitis und Fibrose, sind aber etwas aufwändiger in der Haltung [131]. Bei anderen Tierarten, wie Hasen, Minischweinen oder Primaten, die der menschlichen Physiologie mehr ähneln, lässt sich zwar durch entsprechende Fütterungsmodelle ebenfalls eine NAFLD induzieren, allerdings sind hier eine weniger gut aufgeklärte Genetik, der Kosten- und

Raumfaktor bei größeren Tieren sowie die ethische Problematik zu beachten [136]. Ein weiterer Faktor ist die längere Lebensdauer, was einerseits Langzeitstudien ermöglicht, aber auch eine längere Studiendauer notwendig macht.

Alternativ gibt es die Möglichkeit von *in vitro* Modellen, die meist auf hepatischen Tumorzelllinien basieren, bei denen durch Einsatz von FFA eine intrazelluläre Fettakkumulation, ER-Stress und Apoptose induziert werden. Diese können jedoch aufgrund ihrer tumorösen Abstammung im Vergleich zu humanen Leberzellen einen veränderten Metabolismus aufweisen, was Vergleiche schwierig macht. Zudem fehlen bei reinen Leberzellkulturen die Interaktionen mit nicht-parenchymalen Zellen, wie LSEC oder HSC, die aber für die Progression der NAFLD entscheidend sind [126]. Zwar gibt es Ansätze in Richtung Co-Kultur mit verschiedenen Leberzellarten, diese sind jedoch sehr aufwändig, schwer reproduzierbar und die Leber-Darm-Achse, von der man davon ausgeht, dass sie bei der NAFLD-Entstehung und Progression eine bedeutende Rolle spielt, wird nicht berücksichtigt. *In vivo* Modelle repräsentieren die komplexe Erkrankung daher in der Regel besser.

Als Modelltiere kamen im durchgeführten Versuch deshalb C57BL/6J Mäuse zum Einsatz. Diese Unterart der C57BL/6-Mäuse gilt als anfälliger für Hyperglykämie und Insulinresistenz [137]. Zudem wurde mit weiblichen Tieren gearbeitet, da diese als anfälliger für die Entwicklung einer NAFLD gelten [138]. Aufgrund hormoneller Faktoren ist bei weiblichen Mäusen allerdings auch von einer geringeren Gewichtszunahme auszugehen [139]. Die Leber zählt zu jenen Organen, bei denen geschlechtlich bedingte Unterschiede im Metabolismus und der Expression bestimmter Gene besonders deutlich zutage kommen [140]. Sexualhormone, vor allem Östrogen und Testosteron, nehmen bedeutenden Einfluss auf den Lipidmetabolismus in der Leber, wobei Studien darauf hindeuten, dass Östrogen eine protektive Wirkung in Bezug auf NAFLD und NASH haben könnte [141]. Der Großteil aller Studien im Tier- sowie Humanbereich wurde mit Männern durchgeführt [142], in diesem Versuch wurde aber mit weiblichen Mäusen gearbeitet, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte.

Die FFC- und Kontroll-Nahrung wurde den Mäusen in flüssiger Form verabreicht, was eine exakte Dokumentation der Kalorienaufnahme und eine isokalorische Ernährung der Interventionsgruppen ermöglicht, allerdings nicht der natürlichen Art der Nahrungsaufnahme eines Nagetiers entspricht.

Das PC-Supplement wurde der Flüssignahrung beigemischt und nicht in Form einer Gavage verabreicht. Dadurch könnte zwar die rasche und vollständige Applikation des Supplements garantiert werden, jedoch bedeutet dies erhöhten Stress für die Tiere und nimmt möglicherweise Einfluss auf Hormonspiegel und Entzündungsmarker [143]. Durch die orale

Supplementation mittels Flüssignahrung wird eine realitätsnahe Aufnahme von PC widergespiegelt und die genaue Aufzeichnung der konsumierten Menge ist ebenfalls möglich. Diese betrug für beide PC-Gruppen etwa 1.3 g/kg Körpergewicht, was einer Dosierung im höheren Bereich entspricht, verglichen beispielsweise mit [144], wo eine Dosis von 10 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen eine Wirkung zeigte. Höhere PC-Dosierungen von bis zu 2.5 g/kg Körpergewicht wurden in der Studie von *Lee et al.* erforscht, wobei hier jedoch kein zusätzlicher dosisabhängiger Effekt im Vergleich zu 1 g/kg Körpergewicht PC festzustellen war [145].

Bezüglich Glucosetoleranztest ist beim Mausmodell anzumerken, dass bei der im vorliegenden Versuch durchgeführten intraperitonealen Verabreichung der Glucose eine Verfälschung der Blutzuckerwerte nicht auszuschließen ist. Eine Glucoseinjektion ist Untersuchungen zufolge weniger sensitiv im Vergleich zum oralen Glucosetoleranztest aufgrund einer 10-20%igen Fehlerrate bei der Verabreichung [101, 146] und eines fehlenden Inkretin-Effekts. Dieser ist nicht zu vernachlässigen, da er bei Mäusen zu ca. 50% der Insulinsekretion nach Glucoseaufnahme beiträgt und die Tiere bei HFD-Ernährung einen noch ausgeprägteren Inkretin-Effekt aufweisen [147].

Insgesamt eignet sich das Tiermodell einer FFC-Diät bei C57BL/6J Mäusen sehr gut, um ein realitätsnahes Krankheitsbild der NAFLD und NASH mit all ihren Ausprägungen (Gewichtszunahme, Insulinresistenz, Steatose, Inflammation und Fibrose) hervorzurufen. Im Gegensatz zu den durch Chemikalien verursachten Leberschäden ist hier nicht mit der Entwicklung eines HCC zu rechnen [35], Zweck der Untersuchung war jedoch der Effekt von PC auf das anfängliche NAFLD-Stadium der Steatose und die Progression zur NASH.

## **5.2 Einfluss der PC-Supplementation auf den Glucosestoffwechsel**

Im aktuellen Versuch unterschieden sich weder der Nüchternblutzuckerspiegel noch die AUC des Blutzuckerspiegels über 120 Minuten zwischen den vier Interventionsgruppen, Eidotter-PC hatte hier im vorliegenden Versuchsansatz keinen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel.

Zur Wirkung einer oralen PC-Supplementation auf die Entwicklung von T2DM liegen derzeit sehr widersprüchliche Daten vor. Eine große Kohortenstudie aus Finnland stellte ein geringeres Diabetesrisiko bei höherem PC-Konsum fest, wobei der Großteil des konsumierten PC aus Eiern stammte [148]. In der zweiten großen Beobachtungsstudie basierend auf der Kohorte der Nurses Health Study (NHS), NHS II und der Health Professionals Follow-up Study steigerte sich je 100 mg PC-Zufuhr das T2DM Risiko um 17% [149]. Die Autoren führten dies zurück auf die Metabolisierung von Cholin durch Darmbakterien zu Trimethylamin, welches in

der Leber zu Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) umgewandelt wird und als Risikofaktor für die Entwicklung von T2DM gilt [150]. Allerdings scheint es bei der Konvertierung von Cholin zu TMAO Unterschiede zu geben je nach vorherrschenden Bakterienarten im Mikrobiom [151], weshalb der Einfluss von Cholin bzw. PC auf das Diabetesrisiko schwer zu verallgemeinern ist. Weitere Studien zur Untersuchung des Effektes einer oralen PC-Supplementation auf den Glucose- und Insulinstoffwechsel sind daher notwendig.

Die Art der in PC enthaltenen Fettsäuren könnte bezüglich Insulinresistenz ebenfalls eine Rolle spielen, so haben Untersuchungen ergeben, dass SFA, und dabei vor allem Palmitinsäure, die Insulinsignalkaskade stören können, weil ihr Metabolit Diacylglycerol (DAG) gleichzeitig als Second Messenger Molekül dient und erhöhte DAG-Level in der Zelle zur Aktivierung von Novel Protein Kinase C (PKC) führt, welche die Insulinsignalkaskade durch Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS-1) unterbricht. Ölsäure hingegen wird Analysen zufolge eher zu TAG als DAG metabolisiert und hat bezüglich Insulinresistenz vermutlich einen protektiven Effekt [152]. Da Eidotter-PC sowohl Ölsäure als auch Palmitinsäure in den Zellmembranen anreichert, ist seine Wirkung bezüglich Glucosestoffwechsel nicht endgültig geklärt.

Insgesamt konnte im Rahmen des vorliegenden Versuchs der Effekt einer oralen Supplementation von Eidotter-PC auf den Glucosestoffwechsel nicht geklärt werden. Weiterführende Untersuchungen, vor allem auch, was die in PC gebundenen Fettsäuren und deren Einfluss auf Glucose- und Insulinstoffwechsel betrifft, sind hier unbedingt erforderlich.

### **5.3 Einfluss der PC-Supplementation auf Steatose, Inflammation und NAFLD-Aktivität (NAS)**

Was das Körpergewicht der Mäuse betraf, unterschieden sich die Interventionsgruppen nicht voneinander, obwohl die Tiere in den beiden FFC-Gruppen signifikant mehr Kalorien pro Tag zu sich nahmen. Trotz ähnlicher Gewichtszunahme und Kalorienaufnahme wiesen die Tiere der FFC-Gruppe bei der histologischen Begutachtung der Leberschnitte im Vergleich zu den Kontrollgruppen makrovesikuläre Lipideinlagerungen in zahlreichen Hepatozyten auf. Ein ähnlicher Befund ergab sich aber auch für die FFC+PC-Gruppe. Das PC-Supplement konnte im aktuellen Versuch die durch FFC-Diät hervorgerufene Leberverfettung also nicht verhindern.

Dies steht im Gegensatz zu zwei Tierstudien von *Buang et al.*, in der PC nicht genannten Ursprungs einer durch Orotsäure induzierten Steatose bei Ratten entgegenwirken konnte [153], und *Lee et al.*, wo eine durch HFD verursachte Fettleber bei C57BL/6 Mäusen durch PC signifikant reduziert werden konnte [145].

Auch Humanstudien (zusammengefasst in [98]) weisen auf einen Rückgang der Leberverfettung und Verbesserung der Struktur des Lebergewebes durch orale PC-Supplementation hin, gemeinsam ist diesen Studien allerdings allen, dass sie mit „essenziellen Phospholipiden“ (EPL) aus Sojabohnen arbeiten, die sich von Eidotter-PC durch ihren hohen Gehalt an 1,2-Dilinoleoylphosphatidylcholin (DLPC) unterscheiden [97].

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Fettsäurezusammensetzung der PC-Subtypen liefern. Das im aktuellen Versuch verwendete Supplement aus Eidotter enthielt als Hauptkomponenten die einfach ungesättigte Ölsäure zu 27-32% sowie die gesättigte Palmitinsäure zu 30-33%. Ölsäure wirkte in Zellkulturversuchen verglichen mit Palmitinsäure weniger lipotoxisch auf Hepatozyten, führte allerdings zu einer stärkeren Fettakkumulation in Leberzellen [84, 85]. Ölsäure zeigte im Rahmen von Zellkulturversuchen im Gegensatz zu Palmitinsäure auch keinen störenden Einfluss auf die Insulinsignalkaskade [84] und die Mitochondrienfunktion. *In vitro* sowie *in vivo* konnte Ölsäure zudem den lipotoxischen und Insulinresistenz fördernden Effekt von Palmitinsäure abschwächen, und das, obwohl sie zu vermehrter Steatose führte [85]. Diskutiert wird ein schützender Effekt durch Akkumulation ungesättigter Fettsäuren, da diese offenbar eher als unreaktive Triglyzeride gespeichert werden und daher nicht im gleichen Ausmaß zu Lipotoxizität, Apoptose, Insulinresistenz und Entzündung beitragen können wie die Metabolite gesättigter Fettsäuren, z.B. Diacyglyzeride (DAG), welche als Signalmoleküle fungieren [152].

Fraglich bleibt, inwiefern Fettsäuren aus den mit der Nahrung zugeführten Phospholipiden diese Prozesse beeinflussen können. Die auf Nahrungszufuhr, Absorption und Verdauung folgenden Stoffwechselwege von Fettsäuren aus Phospholipiden sind weitaus weniger untersucht als jene von Fettsäuren aus Triglyzeriden, da diese normalerweise den Hauptanteil der Nahrungsfette ausmachen. Im Darm wird PC hauptsächlich durch Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hydrolysiert. Analysen weisen darauf hin, dass durch PLA<sub>2</sub> vorzugsweise eine Fettsäure von der *sn*-2-Position abgespalten wird und *sn*-1-Acyl-Lyso-PC als weiteres Spaltprodukt übrigbleibt [154]. Dafür sprechen auch Studien mit radioaktiver Markierung, wo die *sn*-2-gebundene Fettsäure nach der Spaltung häufiger in freier Form vorgefunden wurde [155]. Bei dem im aktuellen Versuch eingesetzten Eidotter-PC findet sich Untersuchungen zufolge hauptsächlich Palmitinsäure an der *sn*-1-Position und Ölsäure an der *sn*-2-Position, was für eine vermehrte Verfügbarkeit von Ölsäure aus Eidotter-PC sprechen könnte. In den Enterozyten werden FFA und Lyso-PC entweder zu TG oder PC verestert oder Lyso-PC weiter hydrolysiert, um Cholin zu gewinnen. Aus Untersuchungen mit radioaktiver Markierung [155, 156] wird vermutet, dass etwa die Hälfte des über die Nahrung zugeführten PC wieder zu PC synthetisiert wird, während die anderen 50% zu TG oder Cholin umgewandelt werden.

FFA und TG stammen vermutlich zu einem gewissen Teil auch aus mit der Nahrung zugeführtem PC, ob sich mit Fettsäuren aus oral zugeführten PC-Supplementen jedoch gezielt Prozesse in der Leber beeinflussen lassen, bleibt aufgrund mangelnder Untersuchungen zur genauen Metabolisierung und weiteren Verwendung im Körper fraglich und konnte auch in dieser Studie nicht geklärt werden.

Über die Re-Veresterung zu PC nach der Verdauung nimmt die Art der Fettsäuren im Nahrungs-PC wahrscheinlich aber Einfluss auf die Konstitution von Membranen. Dabei führt ein vermehrter Einbau von PL mit SFA zu starrereren Membranen, während einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Fluidität erhöhen. [157]. Die jeweilige Fettsäurezusammensetzung der Membran-PL macht sie auch unterschiedlich anfällig für Lipidperoxidation, wobei die Anfälligkeit mit zunehmender Zahl der Doppelbindungen steigt. Peroxidation führt einerseits zur Bildung von Lipid-Signalmolekülen und andererseits zu veränderter Fluidität, Permeabilität und Funktion der Membran [158]. Die als Metabolite entstehenden Hydroperoxide können allerdings auch Apoptose einleiten. Im Zellkulturversuch [159] bewies dabei Ölsäure die beste protektive Wirkung gegen Zelltod, indem sie milde Peroxidation und dadurch eine Anpassung der antioxidativen Kapazitäten der Zellen bewirkte.

Es ist denkbar, dass es durch das Ölsäure-reiche Eidotter-PC-Supplement zu einer Anreicherung der einfach ungesättigten Fettsäure in den Membranen der Hepatozyten und dadurch zu einem positiven Einfluss auf Membrankonstitution, Signalmoleküle und Lipidperoxidation kommt. Insgesamt kam es zwar im aktuell durchgeführten Versuch trotz PC-Zufuhr zu steatotischen Veränderungen in der Leber, jedoch war dies im Vergleich zur FFC-Gruppe nicht im selben Ausmaß mit Leberzellschäden und Inflammation verbunden.

Chronische Inflammation in der Leber wird nach derzeitigem Wissensstand als eine der Hallmarks der NASH angesehen [35]. Die hauptsächlich lobulären Entzündungsherde [61] entstehen dabei durch Infiltration verschiedener Immunzellen, vor allem Makrophagen und neutrophiler Granulozyten [117]. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems wurden deshalb auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Die Subpopulation der F4/80 positiven [160] residenten Makrophagen (Kupffer-Zellen) findet sich in den Sinusoiden der Leber [161] und gilt als Masterregulator der hepatischen Immunantwort [162]. Sie sind daher von besonderem Interesse bezüglich NAFLD und NASH, da sie durch Reize, wie Fettsäuren, Endotoxin oder Signalmoleküle bei Zellschädigung aktiviert und zur Produktion pro-inflammatorischer Cytokine, wie TNF $\alpha$  stimuliert werden [163]. Über Chemokine, wie CCL2 (CC-Chemokin-Ligand 2) [164], werden im Rahmen des Krankheitsverlaufs weitere, ebenfalls F4/80 positive, Monozyten aus der Zirkulation angelockt [165]. Aufgrund von Daten

aus Tier- und Humanstudien wird vermutet, dass es bei NAFLD zu einer verstärkten Rekrutierung von Monozyten kommt und diese in Richtung des pro-inflammatorischen M1-Phänotyps differenzieren [166].

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bezüglich F4/80 positiver Makrophagen in der Leber kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen. Allerdings war histologisch ein gehäuftes Auftreten von hepatic crown-like structures (hCLS) in den Leberschnitten der FFC-Mäuse zu beobachten. Dabei handelt es sich um dichte Akkumulationen von Makrophagen um steatotische bzw. apoptotische Hepatozyten [116]. In Studien konnte beobachtet werden, dass die Anzahl an hCLS bei NASH-Patienten mit dem Ausmaß an Leberzellschäden, hepatozellulärem Ballooning und Fibrosierung korreliert [167]. Vereinzelt kam es auch in der FFC+PC-Gruppe zum Auftreten von hCLS, jedoch in geringerem Ausmaß. Anzumerken ist, dass die dicht gedrängten Makrophagen um die steatotischen Hepatozyten das Zählen der einzelnen Zellen in der FFC-Gruppe erschwerten bzw. die voluminösen Fetteinlagerungen im mikroskopischen Feld viel Platz einnahmen und daher möglicherweise die absolute Zahl an F4/80+ Makrophagen verfälschten.

Makrophagen machen 20-25% aller nicht-parenchymalen Zellen in der Mausleber aus [160] und sind aufgrund ihrer immunregulierenden Funktion grundsätzlich auch in der gesunden Leber stark vertreten, was möglicherweise die nicht signifikanten Unterschiede der Makrophagenzahl in der vorliegenden Arbeit erklärt. Des Weiteren spielt die Polarisation der Makrophagen eine wesentliche Rolle für das Cytokinprofil und den Verlauf der Entzündung [161], wobei pro-inflammatorische M1-Makrophagen verstärkt TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und ROS freisetzen, während M2-Makrophagen eher immunsuppressiv wirken und die Gewebereparatur bzw. Fibrogenese fördern [168]. Im aktuellen Versuch wurde nur die Zahl F4/80 positiver Makrophagen in der Leber gemessen, für fortführende Studien wäre es empfehlenswert, die Wirkung einer PC-Supplementierung auf die Zahlen der einzelnen Makrophagen-Subpopulationen und deren Polarisierung genauer zu untersuchen.

Während vermutet wird, dass die portale Infiltration von Makrophagen eher das anfängliche Stadium der NAFLD charakterisieren [169], kommt es bei weiterer Progression durch TNF $\alpha$  und Chemokine, wie G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), zur Anlockung Neutrophiler [170], welche die Entzündung durch Freisetzung pro-oxidativer Granulaproteine, wie Myeloperoxidase (MPO), vorantreiben [171, 172].

In der aktuellen Studie war die Zahl an neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe der FFC-Mäuse signifikant erhöht verglichen mit den Kontrollgruppen sowie der FFC+PC-Gruppe, was für ein verstärktes Entzündungsgeschehen spricht und mit dem histologischen Befund des



NAS korreliert. Die Supplementierung von PC konnte die Neutrophilen-Infiltration deutlich abschwächen, was einen protektiven Effekt bezüglich NAFLD-Progression und NASH nahelegt, da diese Untersuchungen zufolge einen wesentlichen Beitrag zur Progression von NAFLD zu NASH leistet [173] und auch mit dem Schweregrad der NASH in Zusammenhang zu stehen scheint [174].

Eine ähnliche entzündungshemmende Wirkung über verminderte Neutrophilen-Infiltration zeigte sich durch Supplementation von Sojabohnen-PC im Tiermodell der Arthritis [175]. Eidotter-PC verminderte bei Mäusen außerdem den Zelltod infolge von ROS- und Peroxid-Bildung in der Leber nach Behandlung mit dem Hepatotoxin CCl<sub>4</sub> [144]. Eine mögliche Erklärung für die anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkung von PC liefert ein Zellkultur-Experiment, in dem PC eine durch TNF $\alpha$  ausgelöste Transkription von NF $\kappa$ B inhibieren konnte [176]. Da TNF $\alpha$  zu ROS-Produktion [177] und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten führt, könnte PC die Progression zur NASH an dieser Stelle stoppen. Die verminderte Neutrophilen-Infiltration könnte zusätzlich auch einen positiven Effekt auf die IR bewirken, da ein Überschuss ihrer Granulaproteine die Insulinsignalkaskade durch Hemmung des Insulinrezeptors und Degradierung von IRS-1 stören kann [178, 179].

Eine anti-inflammatorische Wirkung einer PC-Supplementation ist auch über einen protektiven Effekt auf die Darmbarriere denkbar, da Phospholipide einen wesentlichen Bestandteil der Mucusschicht ausmachen. Davon entfallen bis zu 90% auf PC und als vorherrschende Form findet sich Analysen zufolge PC mit der Fettsäurezusammensetzung 16:0/18:1 [180], was auch als häufigste Form des im aktuellen Versuch verwendeten Eidotter-PC gilt. Auch wenn die Funktionen von PC im Mucus nicht lückenlos geklärt sind, ist davon auszugehen, dass PC aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften an der Bildung einer abweisenden hydrophoben Oberfläche beteiligt ist [176] und damit wesentlich zur intakten Darmbarriere beiträgt [66]. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) konnte eine PC-Supplementation die verminderte PC-Konzentration im Darm wiederherstellen sowie Symptome lindern [68, 181].

In der aktuellen Untersuchung wurde deshalb auch der Effekt einer oralen Eidotter-PC Supplementation auf die Konzentration der bakteriellen Toxine LTA und LPS im Pfortaderblut als Zeichen erhöhter Darmpermeabilität untersucht. Dabei kam es sowohl bei der FFC-Gruppe mit als auch ohne PC-Supplement zu einer signifikant erhöhten Konzentration an TLR4-Liganden verglichen mit den beiden Kontrollgruppen, was für die Darmpermeabilität erhöhende Wirkung der FFC-Diät spricht. Auch was die Konzentration an TLR2-Liganden betraf, konnte PC diese verglichen mit der FFC-Gruppe nicht signifikant vermindern. Das PC-Supplement konnte im aktuellen Versuch also die Darmpermeabilität erhöhende Wirkung

einer FFC-Ernährung nicht abschwächen. Eine ähnliche Beobachtung machten *Okiyama et al.* Im ALD-Modell, wo eine Gabe von DLPC die LPS-Konzentration im Pfortaderblut nicht senkte. Allerdings war die PC-Supplementierung in dieser Studie verbunden mit verminderten Zellschäden und oxidativem Stress [182].

Insgesamt zeigte das im aktuellen Versuch verwendete Eidotter-PC-Supplement einen deutlich abschwächenden Effekt auf das Ausmaß der hepatischen Inflammation und konnte die durch FFC-Ernährung hervorgerufenen Entzündungszeichen, und dabei vor allem die Infiltration neutrophiler Granulozyten, vermindern. Dies ergab kombiniert betrachtet auch eine signifikant niedrigere NAFLD-Aktivität. Die orale PC-Supplementation konnte damit zwar die Steatose nicht verhindern, jedoch in die Progression zur NASH eingreifen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen jedoch darauf hin, dass der anti-entzündliche Effekt der oralen PC-Supplementation nicht mit der Integrität der Darmbarriere in Zusammenhang steht. Eher könnte der Effekt darauf begründet sein, dass weiterführende pro-inflammatorische Prozesse gehemmt werden, wie beispielsweise die bereits erwähnte potenzielle Hemmung der TNF $\alpha$  und damit ROS-Produktion. Hier wäre es für weiterführende Arbeiten unbedingt erforderlich, die "Downstream-Prozesse" nach der TLR2 bzw. TLR4-Aktivierung genauer zu untersuchen.

#### **5.4 Fazit**

Insgesamt weist die vorliegende Arbeit darauf hin, dass eine orale PC-Supplementierung basierend auf Eidotter die durch FFC-Diät hervorgerufene hepatische Inflammation vermindern kann. Hierbei scheint zwar auch die Verfettung der Leber reduziert zu sein, jedoch war in der vorliegenden Arbeit der Effekt auf Entzündungsprozesse deutlich zu sehen. Dies äußerte sich hauptsächlich in einer deutlich geringeren Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Leber, während die Zahl der Makrophagen unbeeinflusst blieb. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung wurden allerdings Makrophagen-Subtypen und deren Polarisation nicht genauer klassifiziert. Die Permeabilität der Darmbarriere hatte im aktuellen Versuch keinen Einfluss auf NAFLD-Progression und Entzündung, da eine PC-Zufuhr hier nicht protektiv wirken konnte, ebenso blieb der Glucosestoffwechsel unbeeinflusst. Anzudenken wäre eine Erhöhung der PC-Dosis in weiterführenden Untersuchungen, wodurch sich möglicherweise auch hier eine Wirkung zeigen könnten, allerdings lag die im aktuellen Tierversuch eingesetzte Dosis bereits im oberen Bereich und ein zusätzlicher Effekt durch höhere PC-Konzentrationen ist im Hinblick auf aktuelle Studien nicht gesichert.

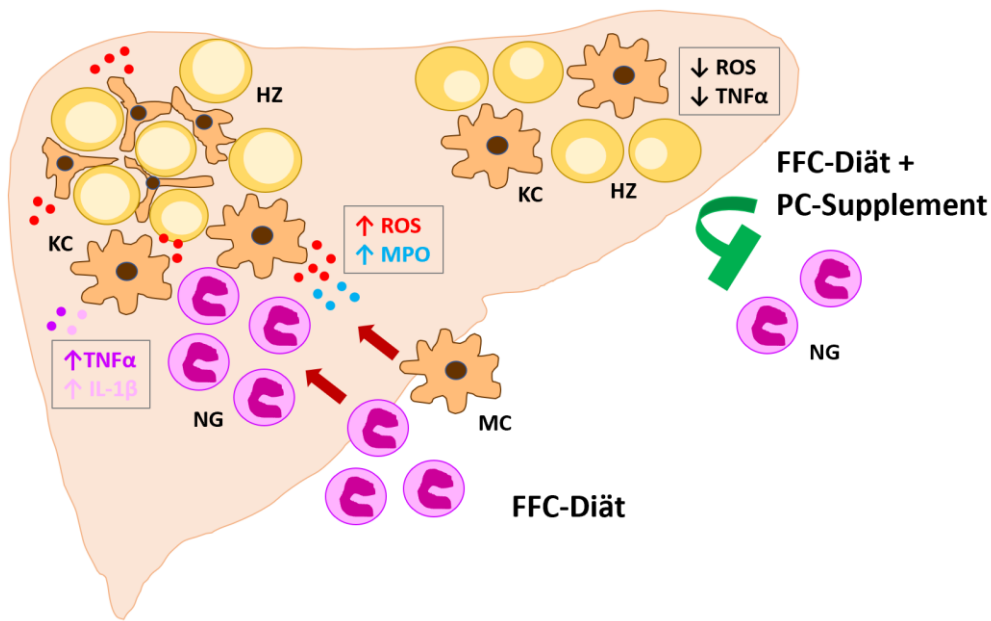
Weiter erforscht werden sollte jedenfalls der genaue Mechanismus, wie die orale PC-Supplementation zu einer Abschwächung der hepatischen Inflammation beitragen kann, da

dies in der aktuellen Untersuchung nicht näher aufgeklärt werden konnte. Dabei sollte die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Phosphatidylcholin-Supplemente bedacht werden, da diese einen Einfluss auf die hepatoprotektive Wirkung haben könnte.

Aufgrund des im aktuellen Versuch eingesetzten Mausmodells war einerseits die Laufzeit mit acht Wochen eher kurz bemessen und andererseits sind Rückschlüsse auf den Menschen aufgrund von Unterschieden im Metabolismus mit Vorsicht zu betrachten. Bisher wurden bei Studien mit NAFLD-Patienten hauptsächlich PC-Supplemente auf Sojabohnen-Basis getestet. Die im durchgeführten Tierversuch anti-inflammatorische Wirkung eines Eidotter-PC-Supplements mit abweichender Fettsäurezusammensetzung sollte daher unbedingt auch im Rahmen von Humanstudien erforscht werden. Hierbei könnte auch eine längere Studienlaufzeit angedacht werden, da NAFLD beim Menschen meist eine langsam progrediente Erkrankung ist, die sich über viele Jahre hinweg entwickelt.

Im aktuellen Versuch zeigte sich eine deutliche Verbesserung der entzündlichen Vorgänge in der Leber durch das orale Eidotter-PC-Supplement. Da die chronische „low-grade“ Inflammation im Rahmen einer NASH die Progression zur Fibrose und Zirrhose zu begünstigen scheint und diese wiederum wesentlich über die Prognose des Patienten entscheiden, könnte der Einsatz von PC hier möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur Therapie in der Anfangsphase der NAFLD leisten. Für fortführende Studien wäre es aber auch empfehlenswert, den Einfluss eines Eidotter-PC-Supplements auf den Prozess der Fibrogenese und die Krankheitsstadien der Fibrose und Zirrhose selbst zu untersuchen, da es auch hier Hinweise für eine protektive Wirkung aus Tierstudien gibt.

NAFLD ist eine äußerst komplexe Erkrankung, die vermutlich nicht mit einem einzelnen Wirkstoff geheilt werden kann. Jedoch könnte das ungefährliche und leicht verfügbare PC, möglicherweise auch als Adjuvans, einen wesentlichen Beitrag zur Therapie leisten.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des möglichen Effektes einer PC-Supplementation auf die Entstehung und Progression der NAFLD.** Durch eine Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche (FFC) Ernährung kommt es zu verstärkter Fettakkumulation in den Hepatozyten (HZ) und Inflammation in der Leber, welche gekennzeichnet ist durch erhöhte Aktivierung von residenten Kupfer-Zellen (KC), Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten (MC) sowie neutrophilen Granulozyten (NG) aus der Blutzirkulation. Durch verstärkte Freisetzung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Myeloperoxidase (MPO) kommt es zu chronischer Entzündung und Gewebszerstörung. Phosphatidylcholin (PC) wirkt dem v.a. durch verminderte Rekrutierung von NG entgegen und zeigt damit anti-inflammatorische Wirkung bei NAFLD.

## Zusammenfassung

Die Non-alcoholic Liver Disease entwickelt sich global zu einem immer größeren Gesundheitsproblem. Während es im anfänglichen Stadium der Erkrankung zur Fettakkumulation in der Leber kommt, führt chronische Entzündung zur Steatohepatitis, welche mit erhöhtem Risiko für Fibrose, Zirrhose und HCC und einer verminderten Lebenserwartung einhergeht. Als einzige evidenzbasierte Therapie gelten derzeit Lebensstilmodifikationen, da Medikamente meist unerwünschte Nebenwirkungen entfalten. Phosphatidylcholin, das in Lebensmitteln, wie Eiern, Fleisch, Milchprodukten und Sojabohnen vor-kommt, gilt als vielversprechendes Therapeutikum. Je nach Quelle unterscheidet sich PC jedoch in seiner Fettsäurezusammensetzung, was möglicherweise seine hepatoprotektive Wirkung beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Effekt von Eidotter-PC auf die hepatische Fettakkumulation und Entzündungsvorgänge, den Glucosestoffwechsel sowie die Konzentration von TLR2- und TLR4-Liganden als Folge bakterieller Toxin-Translokation aus dem Darm. Zu diesem Zweck wurde weiblichen C57BL/6J-Mäusen für die Dauer von acht Wochen eine flüssige Kontrolldiät oder Fett-, Fructose- und Cholesterinreiche Diät jeweils mit und ohne PC-Supplement verabreicht sowie ein Glucosetoleranztest in der siebten Woche durchgeführt. Nach Abschluss der Studienlaufzeit wurden die Leberhistologie mittels NAFLD-Activity-Scores bewertet und F4/80+ Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten gezählt. Die Bestimmung der Konzentration bakterieller Toxine im Pfortaderblut erfolgte über ein spezifisches Zellkulturassay.

Die orale PC-Supplementierung zeigte keinen Effekt auf den Glucosestoffwechsel, TLR-Liganden oder die hepatische Fettakkumulation, konnte jedoch Entzündungsvorgänge in der Leber verglichen mit der FFC-Ernährung signifikant vermindern. Das zeigte sich vor allem anhand deutlich geringerer Neutrophilen-Infiltrate und einer verbesserten Leberhistologie, wodurch auch die NAFLD-Aktivität geringer ausfiel. Phosphatidylcholin konnte damit vor allem durch anti-inflammatorische Wirkung protektiv in den Prozess der chronischen Inflammation bei NAFLD eingreifen.

## Summary

Non-alcoholic fatty liver disease has evolved into the major cause of chronic liver diseases over the last decades and is therefore a growing global health problem. While hepatic fat accumulation is considered as the first stage of the disease, multiple factors can lead to steatohepatitis and further progression to fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Altogether NAFLD-patients have an increased risk of overall mortality and reduced lifespan. Lifestyle modifications are considered the only evidence-based treatment as pharmaceuticals show detrimental side effects. Phosphatidylcholine, which can be found in foods like eggs, meat, dairy, or soybean, is a promising treatment. Depending on the source PC is composed of different fatty acids, which potentially influence its properties.

The aim of this trial was to determine the protective effect of egg yolk PC on hepatic steatosis and inflammation, glucose metabolism and bacterial toxin translocation from the gut. Female C57BL/6J mice were fed either a liquid control or fat, fructose and cholesterol rich diet with or without PC for eight weeks. A glucose tolerance test was performed and liver samples were taken for NAFLD-activity assessment and counting of F4/80+ macrophages and neutrophil granulocytes. TLR2 and TLR4 ligands were measured using a specific cell culture assay.

Steatosis and glucose metabolism were unaffected by PC supplementation, but inflammation improved considerably compared to the FFC diet. This was displayed by a decreased number of neutrophil granulocytes in the liver and improved histological features. Overall, the supplementation led to a significantly lower NAFLD-activity and attenuated the chronic inflammation in NAFLD.

## Literatur

- 1 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 Jul;64(1):73-84. doi: 10.1002/hep.28431. Epub 2016 Feb 22.
- 2 Le MH, Yeo HY, Li X, Li J, Zou B, Wu Y, Ye Q, Huang DQ, Zhao C, Zhang J et al.** 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Dec 7;S1542-3565(21)01280-5. doi: 10.1016/j.cgh.2021.12.002. Online ahead of print.
- 3 World Gastroenterology Organisation (WGO):** World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, June 2012. <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/naflid-nash/naflid-nash-english> (letzter Zugriff am 09.01.2022)
- 4 Karlsen TH, Sheron N, Zelber-Sagi S, Carrieri P, Dusheiko G, Bugianesi E, Pryke R, Hutchinson SJ, Sangro B, Martin NK et al.** The EASL-Lancet Liver Commission: protecting the next generation of Europeans against liver disease complications and premature mortality. *Lancet*. 2022 Jan 1;399(10319):61-116. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01701-3. Epub 2021 Dec 2.
- 5 Dai W, Ye L, Liu A, Wen SW, Deng J, Wu X, Lai Z.** Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Sep;96(39): e8179. doi: 10.1097/MD.00000000000008179.
- 6 Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, Srishord M.** Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012 Nov;91(6):319-327. doi: 10.1097/MD.0b013e3182779d49.
- 7 Younossi ZM, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E.** Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jan;15(1):11-20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109. Epub 2017 Sep 20.
- 8 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 Jun;9(6):524-530.e1; doi: 10.1016/j.cgh.2011.03.020.
- 9 Paik JM, Golabi P, Younossi Y, Mishra A, Younossi ZM.** Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of NAFLD. *Hepatology*. 2020 Nov;72(5):1605-1616. doi: 10.1002/hep.31173. Epub 2020 Oct 27.
- 10 Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS.** Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019 Jan;70(1):151-171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014. Epub 2018 Sep 26.
- 11 Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, Coward A, Somers VK, Kamath PS.** Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. *Hepatology*. 2018 May;67(5):1726-1736. doi: 10.1002/hep.29546. Epub 2018 Mar 23.
- 12 Chalasani N, Younossi ZM, Lavine J, Diehl AM, Brunt E, CusiK, et al.** The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):2005-23. doi: 10.1002/hep.25762.

- 13 European Association for the Study of Liver (EASL)**, European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*. 2016 Jun;59(6):1121-40. doi: 10.1007/s00125-016-3902-y.
- 14 Samuel VT**, Shulman GI. Mechanisms for Insuline Resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.
- 15 Barrera F**, George J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis*. 2014 Feb;18(1):91-112. doi: 10.1016/j.cld.2013.09.009. Epub 2013 Oct 24.
- 16 Fan JG**, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Dec;28 Suppl 4:81-7. doi: 10.1111/jgh.12244.
- 17 Ameer F**, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014 Jul;63(7):895-902. doi: 10.1016/j.metabol.2014.04.003. Epub 2014 Apr 12.
- 18 Todoric J**, Di Caro G, Reibe S, Henstridge DC, Green CR, Vrbanac A, Ceteci F, Conche C, McNulty R, Shalpour S et al. Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat Metab*. 2020 Oct;2(10):1034-1045. doi: 10.1038/s42255-020-0261-2. Epub 2020 Aug 24.
- 19 Aarsland A**, Chinkes D, Wolfe RR. Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jun;65(6):1774-82. doi: 10.1093/ajcn/65.6.1774.
- 20 Browning JD**, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):147-52. doi: 10.1172/JCI22422.
- 21 Pierantonelli I**, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019 Jan;103(1):e1-e13. doi: 10.1097/TP.0000000000002480.
- 22 Hassan K**, Bhalla V, Ezz El Regal M, Hesham A-Kader H. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 14;20(34):12082-101. doi: 10.3748/wjg.v20.i34.12082
- 23 Gross B**, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):36-49. doi: 10.1038/nrendo.2016.135. Epub 2016 Sep 16.
- 24 Pawlak M**, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2015 Mar;62(3):720-33. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039. Epub 2014 Nov 1.
- 25 Steals B**, Maes M, Zambon A. Fibrates and future PPAR $\alpha$  agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 Sep;5(9):542-53. doi: 10.1038/ncpcardio1278. Epub 2008 Jul 15.
- 26 Ip E**, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR $\alpha$  agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2004 May;39(5):1286-96. doi: 10.1002/hep.20170.



- 27 Skat-Rørdam J**, Højland Ipsen D, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. A role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in non-alcoholic fatty liver disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019 May;124(5):528-537. doi: 10.1111/bcpt.13190. Epub 2019 Jan 22.
- 28 Baumann A**, Burger K, Brandt A, Staltner R, Jung F, Rajcic D, Lorenzo Pisarello MJ, Bergheim I. GW9662, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist, attenuates the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2022 Aug;133:155233. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155233. Epub 2022 May 30.
- 29 Marra F**, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol*. 2018 Feb;68(2):280-295. doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.014. Epub 2017 Nov 14.
- 30 Leamy AK**, Egnatchik RA, Shiota M, Ivanova PT, Myers DS, Brown HA, Young JD. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *J Lipid Res*. 2014 Jul;55(7):1478-88. doi: 10.1194/jlr.M050237. Epub 2014 May 23.
- 31 Fuchs M**, Sanyal AJ. Lipotoxicity in NASH. *J Hepatol*. 2012 Jan;56(1):291-3. doi: 10.1016/j.jhep.2011.05.019. Epub 2011 Jul 8.
- 32 Simões ICM**, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018 Feb; 95:93-99. doi: 10.1016/j.biocel.2017.12.019. Epub 2017 Dec 26.
- 33 Lebeauvin C**, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018 Oct;69(4):927-947. doi: 10.1016/j.jhep.2018.06.008. Epub 2018 Jun 27.
- 34 Yu Y**, Cai J, She Z, Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Adv Sci (Weinh)*. 2019 Feb 20; 6(4): 1801585. Published online 2018 Dec 12. doi: 10.1002/advs.201801585
- 35 Martin-Grau M**, Marrachelli VG, Monleon D. Rodent models and metabolomics in non-alcoholic fatty liver disease: What can we learn? *World J Hepatol*. 2022 Feb 27; 14(2): 304-318. Published online 2022 Feb 27. doi: 10.4254/wjh.v14.i2.304
- 36 Safari Zahra**, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019 Apr;76(8):1541-1558. doi: 10.1007/s00018-019-03011-w. Epub 2019 Jan 25.
- 37 Ohtani N**, Hara E. Gut-liver axis-mediated mechanism of liver cancer: A special focus on the role of gut microbiota. *Cancer Sci*. 2021 Nov; 112(11): 4433–4443. Published online 2021 Sep 27. doi: 10.1111/cas.15142
- 38 Wang X**, Quinn PJ. Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Subcell Biochem*. 2010;53:3-25. doi: 10.1007/978-90-481-9078-2\_1.
- 39 Reichmann NT**, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Jun; 319(2): 97–105. Published online 2011 Mar 25. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02260.x
- 40 Takeuchi O**, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 41 Zhou W**, Zhang Q, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21; 20(23): 7312–7324. Published online 2014 Jun 21. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7312

**42 Wilkinson** AL, Qurashi M, Shetty S. The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. *Front Physiol.* 2020 Aug 28; 11:990. doi: 10.3389/fphys.2020.00990. eCollection 2020.

**43 Kiziltas** S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases. *World J Hepatol.* 2016 Nov 18;8(32):1354-1369. doi: 10.4254/wjh.v8.i32.1354.

**44 Khoshbin** K, Camilleri M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020 Nov 1; 319(5): G589–G608. Published online 2020 Sep 9. doi: 10.1152/ajpgi.00245.2020

**45 Elamin** EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev* 71: 483–499, 2013. doi: 10.1111/nure.12027.

**46 Pendyala** W, Walker JM, Holt PR. A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology.* 2012 May; 142(5): 1100–1101.e2. Published online 2012 Feb 8. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.034

**47 Spruss** A, Kanuri G, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest* 92: 1020–1032, 2012. doi: 10.1038/labinvest.2012.75.

**48 Camilleri** M. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. *Gut.* 2019 Aug; 68(8): 1516–1526. Published online 2019 May 10. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427

**49 Luther** J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, Motola DL, Luther S, Bohr S, Jeoung SW et al. Hepatic injury in nonalcoholic steatohepatitis contributes to altered intestinal permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015 Mar;1(2):222-232. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.001.

**50 Alisi** A, Manco M, Devito R, Piemonte F, Nobili V. Endotoxin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels associated with nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Jun;50(6):645-9. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181c7bdf1.

**51 Thuy** S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr.* 2008 Aug;138(8):1452-5. doi: 10.1093/jn/138.8.1452.

**52 Volynets** V, Küper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, Königsrainer A, Bischoff SC, Bergheim I. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci.* 2012 Jul;57(7):1932-41. doi: 10.1007/s10620-012-2112-9. Epub 2012 Mar 17.

**53 Carpino** G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, Francis H, Cardinale V, Onori P, Safarikia S et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. *Hepatology.* 2020 Aug;72(2):470-485. doi: 10.1002/hep.31056. Epub 2020 May 22.

**54 Miura** K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology.* 2013 Feb;57(2):577-89. doi: 10.1002/hep.26081.

- 55 Spruss A**, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1094-104. doi: 10.1002/hep.23122.
- 56 Miura K**, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010 Jul;139(1):323-34.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.052. Epub 2010 Mar 27.
- 57 Chen Y**, Sun R. Toll-like receptors in acute liver injury and regeneration. *Int Immunopharmacol*. 2011 Oct;11(10):1433-41. doi: 10.1016/j.intimp.2011.04.023. Epub 2011 May 19.
- 58 Roh YS**, Zhang B, Loomba R, Seki E. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015 Jul 1;309(1):G30-41. doi: 10.1152/ajpgi.00031.2015. Epub 2015 Apr 30.
- 59 Wang B**, Jiang X, Cao M, Ge J, Bao Q, Tang L, Chen Y, Li L. Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2016 Aug 23;6:32002. doi: 10.1038/srep32002.
- 60 Kleiner DE**, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathological patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis*. 2012 Feb;32(1):3-13. doi: 10.1055/s-0032-1306421. Epub 2012 Mar 13.
- 61 Sakamoto M**, Tsujikawa H, Effendi K, Ojima H, Harada K, Zen Y, Kondo F, Nakano M, Kage M, Sumida Y, Hashimoto E, Yamada G, Okanoue T, Koike K. Pathological findings of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. *Pathol Int*. 2017 Jan;67(1):1-7. doi: 10.1111/pin.12485. Epub 2016 Dec 20.
- 62 Ekstedt M**, Hagstrom N, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, Hultcrantz R. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1547-54. doi: 10.1002/hep.27368. Epub 2015 Mar 23.
- 63 Lordan R**, Tsoupras A, Zabetakis I. Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*. 2017 Nov 14;22(11):1964. doi: 10.3390/molecules22111964.
- 64 Löffler**. *Basiswissen der Biochemie mit Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008, S.93
- 65 van der Veen JN**, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017 Sep;1859(9 Pt B):1558-1572. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006. Epub 2017 Apr 11.
- 66 Ehehalt R**, Braun A, Karner M, Füllekrug J, Stremmel W. Phosphatidylcholine as a constituent in the colonic mucosal barrier-physiological and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Sep;1801(9):983-93. doi: 10.1016/j.bbailip.2010.05.014.
- 67 Kanuri G**, Ladurner R, Skibovskaya J, Spruss A, Königsrainer A, Bischoff SC, Bergheim I. Expression of toll-like receptors 1–5 but not TLR 6–10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver*, 12 Jan 2014, 35(2):562-568

- 68 Stremmel W**, Eehalt R, Staffer S, Stoffels S, Mohr A, Karner M, Braun A. Mucosal protection by phosphatidylcholine. *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 3:85-91. doi: 10.1159/000342729. Epub 2013 Jan 3.
- 69 Wang W**, Zhong X, Guo J. Role of 2-series prostaglandins in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Jun;47(6):114. doi: 10.3892/ijmm.2021.4947. Epub 2021 Apr 28.
- 70 Deutsch L**. Evaluation of the effect of Neptune Krill Oil on chronic inflammation and arthritic symptoms. *J Am Coll Nutr*. 2007 Feb;26(1):39-48. doi: 10.1080/07315724.2007.10719584.
- 71 Ko CW**, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar;17(3):169-183. doi: 10.1038/s41575-019-0250-7. Epub 2020 Feb 3.
- 72 Hussain MM**. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2000 Jan;148(1):1-15. doi: 10.1016/s0021-9150(99)00397-4.
- 73 Yao ZM**, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1988 Feb 25;263(6):2998-3004.
- 74 Andersen CJ**, Blesso CN, Lee J, Barona J, Shah D, Thomas MJ, Fernandez ML. Egg Consumption Modulates HDL Lipid Composition and Increases the Cholesterol-Accepting Capacity of Serum in Metabolic Syndrome. *Lipids*. 2013 Jun;48(6):557-67. doi: 10.1007/s11745-013-3780-8. Epub 2013 Mar 15.
- 75 Rader DJ**, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S189-94. doi: 10.1194/jlr.R800088-JLR200. Epub 2008 Dec 8.
- 76 Khatana C**, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK. Mechanistic insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Sep 15;2020:5245308. doi: 10.1155/2020/5245308. eCollection 2020.
- 77 Jiang Y**, Noh SK, Koo SI. Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. *J Nutr*. 2001 Sep;131(9):2358-63. doi: 10.1093/jn/131.9.2358.
- 78 Kesaniemi YA**, Grundy SM. Effects of dietary polyenylphosphatidylcholine on metabolism of cholesterol and triglycerides in hypertriglyceridemic patients. *Am J Clin Nutr*. 1986 Jan;43(1):98-107. doi: 10.1093/ajcn/43.1.98.
- 79 Cohn JS**, Kamili A, Wat E, Chung RWS, Tandy S. Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption. *Nutrients*. 2010 Feb; 2(2): 116–127. Published online 2010 Feb 8. doi: 10.3390/nu2020116
- 80 Cole LK**, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1821(5):754-61. doi: 10.1016/j.bbali.2011.09.009. Epub 2011 Sep 25.
- 81 Canty DJ**, Zeisel SH. Lecithin and Choline in Human Health and Disease. *Nutr Rev*. 1994 Oct;52(10):327-39. doi: 10.1111/j.1753-4887.1994.tb01357.x.
- 82 Küllenberg D**, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis*. 2012 Jan 5;11:3. doi: 10.1186/1476-511X-11-3.

- 83 Schreiner M**, Hulan HW, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Iben C. Feeding Laying Hens Seal Blubber Oil: Effects on Egg Yolk Incorporation, Stereospecific Distribution of Omega-3 Fatty Acids, and Sensory Aspects. *Poult Sci.* 2004 Mar;83(3):462-73. doi: 10.1093/ps/83.3.462.
- 84 Ricchi M**, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 May;24(5):830-40. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x. Epub 2009 Jan 13.
- 85 Chen X**, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, Liu J, Cheng J, Lu Y, Chen Y. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 2018 Jun 15;203:291-304. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.022. Epub 2018 Apr 27
- 86 Tanaka N**, Kimura T, Fujimori N, Nagaya T, Komatsu M, Tanaka E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol.* 2019 Jan 14;25(2):163-177. doi: 10.3748/wjg.v25.i2.163.
- 87 Romero-Gómez M**, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017 Oct;67(4):829-846. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.016. Epub 2017 May 23.
- 88 Zelber-Sagi S**, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol.* 2011 Aug 7;17(29):3377-89. doi: 10.3748/wjg.v17.i29.3377.
- 89 Niederseer D**, Wernly B, Aigner E, Stickel F, Datz C. NAFLD and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Mechanistic and Therapeutic Considerations. *J Clin Med.* 2021 Feb; 10(3): 467. Published online 2021 Jan 26. doi: 10.3390/jcm10030467
- 90 Haukeland JW**, Konopski Z, Eggesbo HB, von Volkmann HL, Raschpichler G, Bjørø K, Haaland T, Løberg EM, Birkeland K. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(7):853-60. doi: 10.1080/00365520902845268.
- 91 Harrison SA**, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized prospective trial. *Hepatology.* 2009 Jan;49(1):80-6. doi: 10.1002/hep.22575.
- 92 Cusi K**, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, Tio F, Hardies J, Darland C, Musi N et al. Long-term pioglitazone treatment for patients with non-alcoholic steatohepatitis and prediabetes or type 2 diabetes mellitus: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2016 Sep 6;165(5):305-15. doi: 10.7326/M15-1774. Epub 2016 Jun 21.
- 93 Ratziu V**, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, LaNaour G, Hartmenn-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T, LIDO Study Group. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology.* 2010 Feb;51(2):445-53. doi: 10.1002/hep.23270.
- 94 Sanyal AJ**, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A et al. Pioglitazone, vitamin E or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010 May 6;362(18):1675-85. doi: 10.1056/NEJMoa0907929. Epub 2010 Apr 28.

- 95 Argo** CK, Patrie JT, Lackner C, Henry TD, de Lange EE, Weltmann AL, Sha N, Al-Osaimi AM, Pramoonjago P, Jayakumar S et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Hepatol.* 2015 Jan;62(1):190-7. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.036. Epub 2014 Sep 6.
- 96 Lieber** CS, DeCarli LM, Mak KM, Kim CI, Leo MA. Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatology.* 1990 Dec;12(6):1390-8. doi: 10.1002/hep.1840120621.
- 97 Gundermann** KJ, Kuenker A, Kuntz E, Drozdik M. Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases. *Pharmacol Rep.* 2011;63(3):643-59. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70576-x.
- 98 Maev** IV, Samsonov AA, Palgova LK, Pavlov CS, Vovk EI, Shirokova EN, Starostin KM. Effectiveness of phosphatidylcholine in alleviating steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease and cardiometabolic comorbidities (MANPOWER study). *BMJ Open Gastroenterol.* 2020 Jan 13;7(1):e000341. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000341.
- 99 Sellmann** C, Jin CJ, Degen C, De Brandt JP, Bergheim I. Oral Glutamine Supplementation Protects Female Mice from Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Nutr.* 2015 Oct;145(10):2280-6. doi: 10.3945/jn.115.215517. Epub 2015 Aug 5
- 100 Jin** CJ, Sellmann C, Engstler AJ, Ziegenhardt D, Bergheim I. Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Br J Nutr.* 2015 Dec 14;114(11):1745-55. doi: 10.1017/S0007114515003621. Epub 2015 Oct 9
- 101 Andrikopoulos** S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Dec;295(6):E1323-32. doi: 10.1152/ajpendo.90617.2008. Epub 2008 Sep 23.
- 102 Chan** JKC. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* 2014 Feb;22(1):12-32. doi: 10.1177/1066896913517939. Epub 2014 Jan 9.
- 103 Brunt** EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999 Sep;94(9):2467-74. doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
- 104 Bedossa** P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012;56:1751–1759.
- 105 Tiniakos** DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:145-71. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102132.
- 106 Brown** GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1080-6. doi: 10.1016/j.metabol.2015.11.008. Epub 2015 Dec 2.
- 107 Bedossa** P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2017 Jan;37 Suppl 1:85-89. doi: 10.1111/liv.13301.
- 108 Kleiner** DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41:1313–1321.

- 109 Kass L.** Cytochemistry of esterases. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1979;10(2):205-23. doi: 10.3109/10408367909147134.
- 110 Austyn JM, Gordon S.** F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 1981; 11:805–815
- 111 Dako Handbook** Immunochemical Staining Methods, 3<sup>rd</sup> Edition. 2001 DAKO Corporation. Carpinteria, California. S 13; 26-27  
[http://www.ihcworld.com/\\_books/Dako\\_Handbook.pdf](http://www.ihcworld.com/_books/Dako_Handbook.pdf) (letzter Zugriff: 30.01.2022)
- 112 Bowdish Lab:** The Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) Reporter System.  
<http://www.bowdish.ca/lab/wp-content/uploads/2014/11/SEAP-NFkB-Reporter-System.pdf>  
 (letzter Zugriff: 30.01.2022)
- 113 Janssens S, Beyaert R.** Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Oct; 16(4): 637–646. doi: 10.1128/CMR.16.4.637-646.2003
- 114 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 May;61(5). doi: 10.1002/mnfr.201600985. Epub 2017 Feb 22
- 115 Brandt A, Nier A, Jin CJ, Baumann A, Jung F, Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Bergheim I.** Consumption of decaffeinated coffee protects against the development of early non-alcoholic steatohepatitis: Role of intestinal barrier function. *Redox Biol.* 2019 Feb; 21:101092. doi: 10.1016/j.redox.2018.101092. Epub 2018 Dec 23.
- 116 Itoh M, Kato H, Suganami T, Konuma K, Marumoto Y, Terai S, Sakugawa H, Kanai S, Hamaguchi M, Takahiro F et al.** Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One.* 2013 Dec 11;8(12):e82163. doi: 10.1371/journal.pone.0082163. eCollection 2013.
- 117 Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, Møller HJ, Vilstrup H, George J, Schuppan D, Grønbaek H.** The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Mar;16(3):145-159. doi: 10.1038/s41575-018-0082-x.
- 118 Niederseer D, Wernly B, Aigner E, Stickel F, Datz C.** NAFLD and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Mechanistic and Therapeutic Considerations. *J Clin Med.* 2021 Feb; 10(3): 467. Published online 2021 Jan 26. doi: 10.3390/jcm10030467
- 119 Bertola A.** Rodent models of fatty liver diseases. *Liver Res.* 2018 Mar;2: 3-13. doi: 10.1016/j.livres.2018.03.001.
- 120 Mells JE, Fu PP, Kumar P, Smith T, Karpen SJ, Anania FA.** Saturated fat and cholesterol are critical to inducing murine metabolic syndrome with robust non-alcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem.* 2015 Mar;26(3):285-92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.002. Epub 2014 Dec 6.
- 121 Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH et al.** Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol.* 2018 May; 68(5): 1063–1075. Published online 2018 Feb 2. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019

- 122 Ishimoto T**, Lanaspa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, McMahan RH, Abdelmalek MF, Rosen HR, Jackman MR et al. High Fat and High Sucrose (Western) Diet Induce Steatohepatitis that is Dependent on Fructokinase. *Hepatology*. 2013 Nov; 58(5): 1632–1643. Published online 2013 Oct 8. doi: 10.1002/hep.26594
- 123 Softic S**, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic de novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016 May; 61(5): 1282–1293. Published online 2016 Feb 8. doi: 10.1007/s10620-016-4054-0
- 124 Cox CL**, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC, Bremer AA, Berglund L, McGahan JP, Havel PJ, Keim NL. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks reduces net fat oxidation and energy expenditure in overweight/obese men and women. *Eur J Clin Nutr*. 2012 Feb; 66(2): 201–208. Published online 2011 Sep 28. doi: 10.1038/ejcn.2011.159
- 125 Bergheim I**, Weber S, Vos M, Krämer 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 Jun;48(6):983-92. doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.035. Epub 2008 Mar 14.
- 126 Soret PA**, Magusto J, Housset C, Gautheron J. In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal. *J Clin Med*. 2020 Dec 24;10(1):36. doi: 10.3390/jcm10010036.
- 127 Hariri N**, Thibault L. High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):270-99. doi: 10.1017/S0954422410000168. Epub 2010 Oct 27.
- 128 Winzell MS**, Ahrén B. The High-Fat Diet-Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S215-9. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl\_3.s215.
- 129 Nevzorova YA**, Boyer-Diaz Z, Cubero FJ, Gracia-Sancho J. Animal Models for Liver Disease – A Practical Approach for Translational Research. *J Hepatol*. 2020 Aug;73(2):423-440. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.011. Epub 2020 Apr 21.
- 130 Asgharpour A**, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, Kumar DP, Daita K, Min-HK, Mirshahi F et al. A Diet-Induced Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Cancer. *J Hepatol*. 2016 Sep;65(3):579-88. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.005. Epub 2016 May 31.
- 131 Ibrahim SH**, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci*. 2016 May;61(5):1325-36. doi: 10.1007/s10620-015-3977-1. Epub 2015 Dec 1.
- 132 Rinella ME**, Green RM. The Methionine-Choline Deficient Dietary Model of Steatohepatitis Does Not Exhibit Insulin Resistance. *J Hepatol*. 2004 Jan;40(1):47-51. doi: 10.1016/j.jhep.2003.09.020.
- 133 Wang B**, Charukeshi Chandrasekera P, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014 Mar;10(2):131-45. doi: 10.2174/1573399810666140508121012.
- 134 Nishina PM**, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res*. 1990 May;31(5):859-69.



- 135 Chusyd** DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front Nutr.* 2016 Apr 19;3:10. doi: 10.3389/fnut.2016.00010. eCollection 2016.
- 136 Jahn** D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 May 1;1865(5):943-953. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.06.023. Epub 2018 Jul 7.
- 137 Fontaine** DA, Davis DB. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes.* 2016 Jan;65(1):25-33. doi: 10.2337/db15-0982.
- 138 Spruss** A, Henkel J, Kanuri G, Blank D, Püschel GP, Bischoff SC, Bergheim I. Female Mice Are More Susceptible to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Sex-Specific Regulation of the Hepatic AMP-Activated Protein-Kinase-Plasminogen Activator Inhibitor 1 Cascade, but Not the Hepatic Endotoxin Response. *Mol Med.* 2012 Dec 6;18(1):1346-55. doi: 10.2119/molmed.2012.00223.
- 139 Ribeiro Fernandes** M, Vieira de Lima N, Silva Rezende K, Marques Santos IC, Schettert Silva I, de Cássia Avellaneda Guimaraes R. Animal models of obesity in rodents. An integrative review. *Acta Cir Bras.* 2016 Dec;31(12):840-844. doi: 10.1590/S0102-865020160120000010.
- 140 Schiffrin** M, Winkler C, Quignodon L, Naldi A, Trötz Müller M, Köfeler H, Henry H, Parini P, Desvergne B, Gilardi F. Sex Dimorphism of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Pparg-Null Mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 15;22(18):9969. doi: 10.3390/ijms22189969.
- 141 Palmisano** BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab.* 2018 Sep;15:45-55. doi: 10.1016/j.molmet.2018.05.008. Epub 2018 May 16.
- 142 Beery** A, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Jan;35(3):565-72. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002. Epub 2010 Jul 8.
- 143 Kinder** JM, Then JE, Hansel PM, Molinero LL, Bruns HA. Long-Term Repeated Daily Use of Intra-gastric Gavage Hinders Induction of Oral Tolerance to Ovalbumin in Mice. *Comp Med.* 2014 Oct;64(5):369-76.
- 144 Na** JY, Song K, Kim S, Kwon J. Hepatoprotective effect of phosphatidylcholine against carbon tetrachloride liver damage in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 May 1;460(2):308-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.031. Epub 2015 Mar 14.
- 145 Lee** HS, Nam Y, Chung YH, Kim HR, Park ES, Chung SJ, Kim JH, Sohn DU, Kim HC, Oh KW, Jeong JH. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice. *Life Sci.* 2014 Nov 18;118(1):7-14. doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.027. Epub 2014 Oct 16.
- 146 Miner** NA, Koehler J, Greenaway L. Interaperitoneal injection of mice. *Appl Microbiol.* 1969 Feb;17(2):250-1. doi: 10.1128/am.17.2.250-251.1969.
- 147 Ahrén** B, Winzell MS, Pacini G. The augmenting effect on insulin secretion by oral versus intravenous glucose is exaggerated by high-fat diet in mice. *J Endocrinol.* 2008 Apr;197(1):181-7. doi: 10.1677/JOE-07-0460.

- 148 Virtanen JK**, Tuomainen TP, Voutilainen S. Dietary intake of choline and phosphatidylcholine and risk of type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Eur J Nutr.* 2020 Dec;59(8):3857-3861. doi: 10.1007/s00394-020-02223-2. Epub 2020 Mar 20.
- 149 Li Y**, Wang DD, Chiuvè SE, Manson JE, Willett WC, Hu FB, Qi L. Dietary Phosphatidylcholine Intake and Type 2 Diabetes in Men and Women. *Diabetes Care.* 2015 Feb;38(2):e13-4. doi: 10.2337/dc14-2093.
- 150 Shan Z**, Sun T, Huang H, Chen S, Chen L, Luo C, Yang W, Yang X, Yao P, Cheng J, Hu FB, Liu L. Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2017 Sep;106(3):888-894. doi: 10.3945/ajcn.117.157107. Epub 2017 Jul 19.
- 151 Cho CE**, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, Sutter JL, Caudill MA. Trimethylamin-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: a randomized controlled trial. *Mol Nutr Food Res.* 2017 Jan;61(1). doi: 10.1002/mnfr.201600324. Epub 2016 Aug 3.
- 152 Palomer X**, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Mar;29(3):178-190. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.009. Epub 2017 Dec 28.
- 153 Buang Y**, Wang YM, Cha JY, Nagao K, Yanagita T. Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver induced by orotic acid. *Nutrition.* Jul-Aug 2005;21(7-8):867-73. doi: 10.1016/j.nut.2004.11.019.
- 154 Murota K**. Digestion and absorption of dietary glycerophospholipids in the small intestine: Their significance as carrier molecules of choline and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* May 2020; 26:101633. doi:10.1016/j.bcab.2020.101633
- 155 Parthasarathy S**, Subbaiah PV, Ganguly J. The mechanism of intestinal absorption of phosphatidylcholine in rats. *Biochem J.* 1974 Jun;140(3):503-8. doi: 10.1042/bj1400503.
- 156 Ikeda I**, Imaizumi K, Sugano M. Absorption and transport of base moieties of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Sep 25;921(2):245-53.
- 157 Ibarguren M**, López DJ, Escribá PV. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1518-28. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.12.021. Epub 2014 Jan 3.
- 158 Gaschler MM**, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 15; 482(3): 419–425. Published online 2017 Feb 3. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- 159 Haeiwa H**, Fujita T, Saitoh Y, Miwa N. Oleic acid promotes adaptability against oxidative stress in 3T3-L1 cells through lipohormesis. *Mol Cell Biochem.* 2014 Jan;386(1-2):73-83. doi: 10.1007/s11010-013-1846-9.
- 160 Dou L**, Shi X, He X, Gao Y. Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Front Immunol.* 2020 Jan 28; 10:3112. doi: 10.3389/fimmu.2019.03112. eCollection 2019.

- 161 Krenkel O, Tacke F.** Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017 May;17(5):306-321. doi: 10.1038/nri.2017.11. Epub 2017 Mar 20.
- 162 Wu L, Gao X, Guo Q, Li J, Yao J, Yan K, Xu Y, Jiang X, Ye D, Guo J.** The role of neutrophils in innate immunity-driven nonalcoholic steatohepatitis: lessons learned and future promise. *Hepatol Int.* 2020 Sep;14(5):652-666. doi: 10.1007/s12072-020-10081-7. Epub 2020 Sep 2.
- 163 Tosello-Trampont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS.** Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J Biol Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40161-72. doi: 10.1074/jbc.M112.417014. Epub 2012 Oct 12.
- 164 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26. doi: 10.1089/jir.2008.0027.
- 165 Tacke F, Zimmermann HW.** Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol.* 2014 May;60(5):1090-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025. Epub 2014 Jan 8.
- 166 Krenkel O, Puengel T, Govaere O, Abdallah AT, Mossanen JC, Kohlhepp M, Liepelt A, Lefebvre E, Luedde T, Hellerbrand C et al.** Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology.* 2018 Apr;67(4):1270-1283. doi: 10.1002/hep.29544. Epub 2018 Feb 19.
- 167 Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C.** Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res.* 2013 May;54(5):1326-34. doi: 10.1194/jlr.M034876. Epub 2013 Feb 17.
- 168 Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A.** Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429. Epub 2018 Mar 1.
- 169 Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, Irvine K, Clouston AD.** The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014 Apr;59(4):1393-405. doi: 10.1002/hep.26937. Epub 2014 Mar 1.
- 170 Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong C.** Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* 2018 Mar;371(3):551-565. doi: 10.1007/s00441-017-2753-2. Epub 2018 Jan 31.
- 171 Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E.** Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol.* 2022 Feb;19(2):177-191. doi: 10.1038/s41423-021-00832-3. Epub 2022 Jan 17.
- 172 Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, Malle E, Greve JW, Buurman WA.** Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2009 Oct;175(4):1473-82. doi: 10.2353/ajpath.2009.080999. Epub 2009 Sep 3.
- 173 Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang FS.** The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol.* 2014 May;11(3):224-31. doi: 10.1038/cmi.2014.2. Epub 2014 Mar 17.

- 174 Antonucci L**, Porcu C, Timperi E, Santini SJ, Iannucci G, Balsano C. Circulating Neutrophils of Nonalcoholic Steatohepatitis Patients Show an Activated Phenotype and Suppress T Lymphocytes Activity. *J Immunol Res*. 2020 Jun 30;2020:4570219. doi: 10.1155/2020/4570219. eCollection 2020.
- 175 Hartmann P**, Szabó A, Eros G, Gurabi D, Horváth G, Németh I, Ghyczy M, Boros M. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009 Nov 10;622(1-3):58-64. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.012. Epub 2009 Sep 18.
- 176 Treede I**, Braun A, Sparla R, Kühnel M, Giese T, Turner JR, Anes E, Kulaksiz H, Füllekrug J, Stremmel W, Griffiths G, Ehehalt R. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27155-27164. doi: 10.1074/jbc.M704408200. Epub 2007 Jul 18.
- 177 Blaser H**, Dostert C, Wak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol*. 2016 Apr;26(4):249-261. doi: 10.1016/j.tcb.2015.12.002. Epub 2016 Jan 12.
- 178 Wang Q**, Xie Z, Zhang W, Zhou J, Wu Y, Zhang M, Zhu H, Zou MH. Myeloperoxidase deletion prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2014 Dec;63(12):4172-85. doi: 10.2337/db14-0026. Epub 2014 Jul 14.
- 179 Talukdar S**, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1407-12. doi: 10.1038/nm.2885.
- 180 Bernhard W**, Postle AD, Linck M, Sewing KF. Composition of phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species of gastric mucosa and mucus. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Mar 16;1255(2):99-104. doi: 10.1016/0005-2760(94)00221-j.
- 181 Stremmel W**, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Ehehalt R. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut*. 2005 Jul; 54(7): 966–971. doi: 10.1136/gut.2004.052316
- 182 Okiyama W**, Tanaka N, Nakajima T, Tanaka E, Kiyosawa K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Polyene-phosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR $\alpha$ -null mice through attenuation in oxidative stress. *J Hepatol*. 2009 Jun;50(6):1236-46. doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.025. Epub 2009 Apr 2.

## Anhang

**Tabelle 17: Zusammensetzung der Kontroll- sowie der Fett-, Fructose- und Cholesterinreichen Flüssigdiät (TD88137 mod.)**

		<b>Kontroll- Flüssigdiät (S0514-E770)</b>	<b>FFC- Flüssigdiät (S0514-E760)</b>
Casein	%	19.5	18.0
Fructose	%		50.0
Maltodextrin	%	16.6	
Saccharose	%	10.0	
Glucose	%		5.0
Maisstärke	%	36.0	5.1
Cellulosepulver	%	5.0	2.0
D, L-Methionin	%	0.1	0.3
L-Cystin	%	0.2	
Vitamin Premix	%	1.0*	1.0*
Mineralien & Spurenelemente	%	4.6	4.84
Cholin-Chlorid (50%)	%	0.2	0.2
Ascorbinsäure	%	0.1	0.1
Butylhydroxytoluol (BHT)	%	0.2	0.2
Xanthan Gum	%	1.7	1.63
Fe-(III)citrat • H <sub>2</sub> O	%		0.07
Cholesterin	%		0.16
Sojaöl	%	5.0	
Butterfett	%		11.6
<b>Geschätzte Inhalte</b>			
Rohprotein	%	17,4	16,0
Rohfett	%	5,1	11,8
Rohballaststoffe	%	5,0	2,0
Rohasche	%	4,1	4,2
Stärke	%	34,6	5,0
Saccharose	%	11,0	
Glucose	%		5,0
Fructose	%		50,0
NfE (Kohlenhydrate)	%	64,7	63,6
Eisen	mg/kg	49	193
ME (umsetzbare Energie, nach Atwater)	MJ/kg	15,7	17,8
kJ% Protein		19	15
kJ% Fett		12	25
kJ% Kohlenhydrate		69	60

\* Vitamin Premix enthält Saccharose

**Tabelle 18: Zusammensetzung des Phosphatidylcholin-Supplements (Lipoid E PC)**

<b>Phospholipide (in % des wasserfreien Gewichts)</b>		
Phosphatidylcholin	[%]	≥ 98
Sphingomyelin	[%]	≤ 1.0
Lysophosphatidylcholin	[%]	≤ 0.2
Phosphatidylethanolamin	[%]	≤ 0.1
<b>Fettsäurezusammensetzung (in % der gesamten Fettsäuren)</b>		
Palmitinsäure	[%]	30-33
Palmitoleinsäure	[%]	≤ 3.0
Stearinsäure	[%]	11-15
Ölsäure	[%]	27-32
Linolsäure	[%]	4-18
Arachidonsäure	[%]	3-4
PUFA C22	[%]	2-5
<b>Reinheit</b>		
<b>Anteil unpolarer Lipide</b>		
Triglyzeride	[%]	≤ 0.5
Cholesterin	[%]	≤ 0.5
Freie Fettsäuren	[%]	≤ 0.2
D, L- $\alpha$ -Tocopherol	[%]	0.1-0.2
<b>Mikrobiologische Kontaminanten</b>		
Endotoxin	[EU/g]	≤ 6
Aerobe Mikroorganismen (total aerobic microbial counts, TAMC)	[cfu/g]	≤ 100
Hefen	[cfu/g]	≤ 10
Schimmelpilze	[cfu/g]	≤ 10
Escherichia coli	[/10 g]	n.v.
Salmonella	[/10 g]	n.v.
Staphylococcus aureus	[/10 g]	n.v.
Pseudomonas aeruginosa	[/10 g]	n.v.