

Universität Rostock  
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie  
Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio



**IN VIVO ANALYSE DER HEPATISCHEN  
MIKROZIRKULATION UND INFLAMMATION IM  
NASH-FIBROSE-TUMOR MAUSMODELL**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

**Malte Werner Kämmerling**  
geboren am 22.07.1990 in Oelde, Kreis Warendorf

Lübeck, 14. Januar 2021

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

**1. Gutachter:**

Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg, Sektion Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten  
im Zentrum für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock

**2. Gutachter:**

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Schemmer, Klinische Abteilung für Transplantationschirurgie  
in der Universitätsklinik für Chirurgie, LKH-Universitätsklinikum Graz

**3. Gutachter:**

Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie und  
Zentrale Versuchstierhaltung, Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

*Wenn du das Leben begreifen willst,  
glaube nicht, was man sagt und was man schreibt,  
sondern beobachte selbst und denke nach.*

Anton Pawlowitsch Tschechow (1860-1904)





# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis . . . . .	III
Tabellenverzeichnis . . . . .	IV
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	V
Zusammenfassung . . . . .	VI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Stoffwechselkraftwerk . . . . .	1
1.2 Metabolisches Syndrom . . . . .	4
1.3 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung . . . . .	5
1.3.1 Pathogenese der NAFLD . . . . .	8
1.3.2 Steatose . . . . .	10
1.3.3 NASH . . . . .	11
1.3.4 Leberfibrose . . . . .	12
1.3.5 Leberzirrhose . . . . .	12
1.3.6 Hepatozelluläres Karzinom . . . . .	12
1.4 Klinik fortgeschrittener Lebererkrankungen . . . . .	13
1.5 NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell . . . . .	14
<b>2 Zielstellung</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>16</b>
3.1 Experimentelles Tiermodell . . . . .	16
3.1.1 Versuchsgruppen . . . . .	16
3.1.2 Haltung der Tiere . . . . .	17
3.2 Chirurgische Präparation . . . . .	17
3.2.1 Anästhesie . . . . .	17
3.2.2 Vorbereitung . . . . .	17
3.2.3 Leberauslagerung . . . . .	18
3.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	20
3.3.1 Grundlagen . . . . .	20
3.3.2 Technik . . . . .	22
3.3.3 Bestimmung funktioneller und mikrohämodynamischer Parameter . . . . .	23
3.4 Körpergewicht . . . . .	31
3.5 Blutzucker . . . . .	31
3.6 Finale Blut- und Gewebeentnahme . . . . .	31

3.7	Statistische Analyse . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1	Allgemeinzustand, Gewicht und Blutzucker . . . . .	32
4.2	Leberschaden . . . . .	33
4.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	35
4.3.1	Hepatische Mikrozirkulation und Mikrohämodynamik . . . . .	35
4.3.2	Fibrose . . . . .	39
4.3.3	Inflammation . . . . .	41
4.3.4	Tabellarische Zusammenfassung . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
5.1	Diskussion von Material und Methodik . . . . .	46
5.1.1	Experimentelles Tiermodell . . . . .	46
5.1.2	Chirurgische Präparation . . . . .	49
5.1.3	Intravitalmikroskopie . . . . .	49
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	52
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	59
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Thesen zur Dissertation</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Schaubild der Leberdegeneration . . . . .	6
2	Pathophysiologie der NAFLD . . . . .	10
3	Experimentelles Modell . . . . .	17
4	Materialien für die Präparation der Leber . . . . .	18
5	Präparation der Maus für die IVM . . . . .	19
6	Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops . . . . .	22
7	Aufbau des aufrechten Epifluoreszenzmikroskops . . . . .	23
8	Fluoreszierende Farbstoffe . . . . .	24
9	Detektion der hepatischen Sternzellen . . . . .	25
10	Bestimmung der sinusoidalen Perfusion . . . . .	26
11	Bestimmung der sinusoidalen Dichte . . . . .	26
12	Bestimmung des Gefäßdurchmessers . . . . .	27
13	Line-Shift-Diagramm-Methode . . . . .	28
14	Detektion der venulären Leukozyten . . . . .	29
15	Detektion der sinusoidalen Leukozyten . . . . .	30
16	Detektion der hepatozellulären Apoptose . . . . .	30
17	Gewichtsverlauf . . . . .	32
18	Blutzuckerungsverlauf . . . . .	33
19	Leber-/Körpergewichts-Index . . . . .	33
20	Aktivität der Leberenzyme . . . . .	34
21	Sinusoidale Perfusion . . . . .	35
22	Sinusoidale Dichte . . . . .	36
23	Sinusoidaler und venulärer Gefäßdurchmesser . . . . .	37
24	Venuläre Mikrohämodynamik . . . . .	38
25	Sinusoidale Mikrohämodynamik . . . . .	39
26	Hepatische Sternzellen . . . . .	40
27	Apoptotische Hepatozyten . . . . .	41
28	Venuläre Leukozyten-Adhärenz . . . . .	42
29	Venuläres Leukozytenrollen . . . . .	43
30	Sinusoidale Leukozytenstase . . . . .	44

## Tabellenverzeichnis

1	Aufgaben der Leber . . . . .	3
2	Definition des Metabolischen Syndroms . . . . .	5
3	Risikofaktoren der NAFLD . . . . .	7
4	Zeichen fortgeschrittener Lebererkrankungen . . . . .	14
5	Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analyse . . . . .	45

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria/Arterie
<b>AFL</b>	Alkoholische Fettleber
<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index/Körpermasseindex
<b>CCD</b>	charge-coupled device/ladungsgekoppeltes Bauelement
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>eNOS</b>	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>GF</b>	Gesichtsfeld
<b>GLDH</b>	Glutamatdehydrogenase
<b>HCC</b>	Hepatozelluläres Karzinom
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein/Lipoprotein mit hoher Dichte
<b>HFD</b>	Hoch-Fett-Diät
<b>HSC</b>	Hepatic stellate cells/Hepatische Sternzellen
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LSD</b>	Line-Shift-Diagramm
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid, Kochsalz
<b>NAFL</b>	Nicht-alkoholische Fettleber
<b>NAFLD</b>	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
<b>NASH</b>	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PPAR</b>	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
<b>SEM</b>	Standard error of the mean/Standardfehler des Mittelwerts
<b>STZ</b>	Streptozotozin
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor
<b>V.</b>	Vena/Vene
<b>vRBC</b>	velocity of red blood cells/Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutzellen
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Patienten mit einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), welche in enger Verbindung mit dem metabolischen Syndrom steht, haben ein erhöhtes Risiko an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken. Das HCC ist das häufigste primäre Leberzellkarzinom mit einer steigenden Inzidenz von 2,7 - 9 pro 100.000 Einwohner in Deutschland. Leberkrebs ist weltweit der zweithäufigste todesverursachende Krebs mit 788.000 Fällen im Jahr 2015. Um die Pathomechanismen besser zu verstehen, untersuchten wir in einem Tiermodell die morphologischen, mikrovaskulären und zellulären Aspekte der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und deren Progression.

**Methoden:** Das NASH-Fibrose-Tumor Modell wurde erstmalig vom Stelic Institut in Japan beschrieben. Männlichen C57BL6/J Mäusen wird am 2. postnatalen Tag 200 µg Streptozotocin (STZ) intraperitoneal injiziert. Ab dem 28. Tag erhalten die Mäuse eine Hochfettdiät (HFD; 60 kJ %). In der hier präsentierten Studie analysierten wir im NASH-Fibrose-Tumor Modell die Architektur und Mikrozirkulation der Leber in verschiedenen Krankheitsstadien. Wir untersuchten die Mäuse im Alter von 6, 8, 12 und 20 Wochen mit Hilfe der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie. Die Tiere erhielten eine intravenöse Injektion von Natrium-Fluoreszein, Bisbenzimid und Rhodamin-6G.

**Ergebnisse:** Während des gesamten Beobachtungszeitraumes konnten markante Veränderungen und Einschränkungen in der hepatischen Mikrozirkulation beobachtet werden. Sowohl die sinusoidale Perfusion, als auch die morphologische sinusoidale Dichte nahmen in den STZ/HFD-behandelten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren signifikant ab. Der apoptotische Zelltod sowie die Anzahl der in Venolen adhärrierender Leukozyten stieg im Verlauf des Krankheitsprogresses signifikant an. Außerdem nahm mit der Erkrankungsdauer die venuläre Blutfließgeschwindigkeit ab, während sich gleichzeitig eine kontinuierliche Zunahme der Durchmesser in den Venolen zeigte. Dies könnte ein Zeichen für die Neoangiogenese im Rahmen der Karzinogenese sein.

**Schlussfolgerung:** Diese Daten tragen zum besseren Verständnis der komplexen vaskulären und zellulären Mechanismen während der Progression einer Steatose bis zur Entstehung eines HCC bei.

## 1 Einleitung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) - als multifaktorielle chronische Lebererkrankung - ist eine immer präsenter werdende internationale medizinische Herausforderung, mit hoher sozioökonomischer Bedeutung. Jeder vierte Mensch auf der Welt hat Schätzungen zufolge eine NAFLD [Araújo et al., 2018], wobei eine enge Korrelation mit Fettleibigkeit sowie Diabetes mellitus (DM) beschrieben wird [Younossi et al., 2016]. Hepatische Erkrankungen sind unter den häufigsten Todesursachen weltweit, mit Leberkrebs als zweithäufigste krebsbezogene Todesursache [WHO, 2015]. Die NAFLD umfasst verschiedene Leber-Abnormalitäten ausgehend von einer simplen Steatose in frühen Stadien hin zu der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), welche sich weiter bis zum Endstadium der Erkrankung in Form einer Zirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) entwickeln kann [White et al., 2012]. Meist haben die Patienten keine Symptome oder zeigen über einen langen Zeitraum unspezifische klinische Ausprägungen, wie z. B. Müdigkeit. Daher ist die Diagnose einer NAFLD häufig nicht gestellt, bevor im Rahmen dieser Erkrankungen fortgeschrittene Leberschädigungen auftreten. Obwohl das Vorliegen der Multiple-Hit-Theorie bereits mehrfach bestätigt wurde [Day und James, 1998; Tilg und Moschen, 2010], sind die pathophysiologischen Prozesse, welche zur Progression der NAFLD beitragen, noch nicht vollständig geklärt. Zahlreiche Tiermodelle werden bereits verwendet, um unterschiedliche Zustände der Leberdegeneration zu untersuchen. Die meisten Tiermodelle spiegeln jedoch nur ein oder zwei Stadien der NAFLD wider und unterscheiden sich in der Strategie der Krankheitsinduktion sowie in der Zeit des Auftretens. Nur wenige Modelle reflektieren die NAFLD-Progression von frühen bis hin zu fortgeschrittenen Stadien. Die NAFLD geht mit pathologischen Veränderungen in der Leberarchitektur einher, welche letztendlich auch zu Störungen der Mikrohämodynamik führen. Die Dysfunktion der hepatischen Mikrozirkulation ist ein Schlüsselprozess, der die Progredienz von chronischen Lebererkrankungen fördern kann [Gracia-Sancho et al., 2018]. Es fehlen jedoch umfassende Untersuchungen der verschiedenen Krankheitszustände in Bezug auf die mikrozirkulatorischen Veränderungen. Um in Zukunft die NAFLD und ihre Progression zu verhindern, zu behandeln sowie frühzeitig erkennen zu können, sind tiefgehende Kenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen und mikrohämodynamischen Veränderungen in diesem Krankheitsprozess zwingend notwendig.

### 1.1 Das Stoffwechselkraftwerk

Die Leber ist das schwerste Organ im menschlichen Körper; ihr Gewicht beträgt etwa 2,5 % des Körpergewichtes, dabei besteht sie zu 80 % aus Leberepithelzellen [Krams et al., 2010]. Dennoch verbraucht sie nur ca. 20 % der gesamten Sauerstoffzufuhr und verwendet ca. 25 % des Herz-Zeit-Volumens, was bei einem normalen Herz-Zeit-Volumen in Ruhe von 5 l/min etwa 1,25 l/min

allein für die Leber sind [Vollmar und Menger, 2009]. Die Leber ist das zentrale Stoffwechsellorgan und die wichtigste Entgiftungsstation im menschlichen Körper. Ohne die Leber oder ohne ihre regelrechte Funktion wäre ein Leben nicht möglich. Sie liegt im rechten Oberbauch und gilt als die größte Drüse im menschlichen Organismus. Die Leber ist ein wichtiges Bindeglied vielfältiger lebenswichtiger Vorgänge im Organismus (Tab. 1), wie z.B. dem Glukose-, Fett-, Vitamin-, Mineralstoff- und Eiweißmetabolismus. Außerdem dient sie auch als Speicherort einiger dieser Stoffe und produziert neben zahlreichen anderen Proteinen, die für den Körper lebenswichtigen Gerinnungsfaktoren (Tab. 1) sowie das C-reaktive Protein (CRP), welches bei Entzündungsvorgängen eine große Rolle spielt. Viele Medikamente und Gifte, wie z.B. Paracetamol und Alkohol, werden über die Leber abgebaut bzw. verstoffwechselt. Das Organ verteilt die vom Darm aufgenommenen und von der Pfortader zur Leber transportierten Nährstoffe an den Körper. Sie ist außerdem in der Lage das für den Aminosäuremetabolismus notwendige, aber giftige Ammoniak in wasserlöslichen und ungiftigen Harnstoff umzuwandeln (Tab. 1), welcher nachfolgend ausgeschieden werden kann. Desweiteren produziert sie Gallenflüssigkeit, die für die Verdauung von Fett, Aufnahme von den Vitaminen E, D, K und A sowie als Ausscheidungsstoff notwendig ist. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT), sowie die Glutamatdehydrogenase (GLDH) sind Enzyme, welche als Katalysatoren für bestimmte Stoffwechselprozesse eine wichtige Rolle spielen. Ihre Konzentration ist in der Leber, im Herzen als auch im Muskel sehr hoch, wodurch im Rahmen von diagnostischen Methoden verschiedener Krankheiten ihre Aktivität bestimmt werden kann. AST kommt im Herzen, in der quergestreiften Muskulatur und in der Leber vor, während ALT und GLDH leberspezifische Enzyme sind [Herold, 2017]. Bei leichten Leberschädigungen kann es durch Permeabilitätsverlust der Zellmembranen zur Freisetzung von AST und ALT in die Blutbahn kommen und somit zu einem Anstieg der Laborparameter führen. Ein Abfall dieser Werte im Blut kann ein Regenerationszeichen sein, es kann aber auch im Rahmen eines beginnenden Leberversagens durch den Untergang von Hepatozyten in Erscheinung treten. Bei der GLDH kommt es im Gegensatz zu den Aminotransferasen erst zu einer Steigerung der Aktivität im Blut, sobald die parenchymatösen Zellen der Leber komplett zerstört sind.



<b>Bildung von:</b>
Glukose
Aminosäuren
Ketonkörper
Cholesterin
Proteine (Albumin, Gerinnungsfaktoren, etc.)
Gallenflüssigkeit
<b>Speicherung von:</b>
Glukose in Form von Glykogen
Fett
Vitaminen
<b>Abbau/Entgiftung von:</b>
geschädigten und alten Erythrozyten
Bilirubin (Abbauprodukt des Hämoglobins)
Ammoniak
Steroidhormonen
Alkohol
Medikamente

*Tabelle 1 Zusammenfassung der wichtigsten Aufgaben der Leber, modifiziert nach Berufsverband Deutscher Internisten e.V.*

Die Leber wird in zwei Lappen unterteilt. Der Franzose Claude Couinaud beschrieb 1957 erstmals durch Zuflüsse der Vena (V.) portae die Lebereinteilung in 8 Segmente, was ein deutlicher Fortschritt für die erfolgreiche Leberchirurgie war. Die funktionale Grenze zwischen rechtem und linkem Leberlappen liegt senkrecht auf Höhe der Gallenblase. Die kleinste Unterteilung der Leber beinhaltet nach den Leberlappen die Leberläppchen, welche aus einer Zentralvene, balkenförmig angeordneten Hepatozyten und den Lebersinusoiden bestehen. An ihren Eckpunkten liegen die Portalfelder mit dem Glissonschen Dreieck, bestehend aus Arteria (A.) interlobularis, V. interlobularis und einem Gallengang. Das Blut wird vom Portalfeld aus zur Zentralvene geleitet und dabei entgiftet. Der Gallenfluss läuft in konträrer Richtung über die Gallekanälchen in Richtung der Portalfelder. Eine besondere Eigenschaft der Leber ist die gleichzeitige arterielle sowie portal-venöse Gefäßversorgung [Abshagen, 2008]. Das venöse und nährstoffreiche Blut gelangt von den unpaaren Bauchorganen über die Pfortader (V. portae) zu den terminalen Strombahnen in der Leber, den Sinusoiden. Danach führen sie das venöse Blut über die großen Äste der V. hepatica in die V. cava. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut erhält die Leber über die Leberarterie (A. hepatica propria), einer Fortsetzung von der A. hepatica communis, welche aus einem Abgang des Truncus coeliacus entsteht [Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Die Pfortader und die Leberarterie münden an der Leberpforte, wo der Gallengang die Leber verlässt. Neben der Gefäßversorgung spielen in der Leber die hohe Dichte an Kupffer-Zellen, das spezialisierte Gefäßbett mit den Lebersinusoiden und das diskontinuierliche Endothel eine entscheidende Rolle [Oda et al., 2006].

Das Endstromgebiet der Leber mit den Arteriolen, Sinusoiden und Venolen ist eines der größten im Menschen, deren Einzeldurchmesser nur 30-50  $\mu\text{m}$  beträgt [Oda et al., 2003]. Das Lebergewebe wird zu 80 % aus parenchymatösen Zellen - den Hepatozyten - gebildet, der Rest bildet sich aus den nicht-parenchymatösen Zellen [Krams et al., 2010]. Die Hepatozyten sind zuständig für Entgiftungsvorgänge, der Synthese von Fettsäuren und Gallensäuren sowie der Proteinsynthese. Zu den nicht-parenchymatösen Zellen werden Gallengangsepithelzellen, Endothelzellen, Kupffer-Zellen, und hepatische Sternzellen (HSC; Englisch: hepatic stellate cells) gezählt. Die Endothelzellen kleiden die Innenseite der Blutgefäße aus und sorgen für eine diskontinuierliche Verbindung zwischen Blutgefäß und Extravasalraum, wodurch leichter freie und flüssige Partikel vom Gefäßlumen zu den Hepatozyten gelangen können [Aird, 2007]. Wie schon von Abshagen [2008] dargestellt wurde, bezieht sich die entscheidende Funktion der leberspezifischen Sinusoide auf den ausführlichen Stoff- und Gasaustausch, wodurch die nutritive Perfusion des Organs gewährleistet wird. Die Kupffer-Zellen sind spezialisierte hepatische Gewebsmakrophagen, die aus Monozyten entstehen, welche sich an der sinusoidalen Innenwand befinden [Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Die im Spaltraum zwischen Endothelzellen und Hepatozyten lokalisierten HSC speichern Vitamin A und sind an der Synthese der Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt.

Es gibt eine Reihe von akuten und chronischen Lebererkrankungen, welche u. a. durch Alkoholmissbrauch, Infektionen, immunologische Erkrankungen, Vererbung, Traumata, Medikamente, Gifte, metabolische Erkrankungen oder durch fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel in Erscheinung treten können. Zu den häufigsten Ursachen einer Entzündung der Leber (Hepatitis) gehören noch vor der viralen Pathogenese, die Ausbildung einer Fettleber durch Übergewicht, Stoffwechselerkrankungen (wie z.B. DM) oder Alkoholabusus [Deutsche-Leberstiftung, 2016].

## 1.2 Metabolisches Syndrom

Das metabolische Syndrom ist eine Kombination von vernetzten physiologischen, biochemischen, klinischen und metabolischen Faktoren. Klinische Manifestationen dieser Stoffwechselkrankheit sind abdominelle Adipositas, gestörter Fettstoffwechsel, Bluthochdruck sowie eine gestörte Glukosetoleranz.

Die Grundzüge dieser Erkrankung wurden 1989 mit dem Begriff des tödlichen Quartetts durch Kaplan geprägt [Kaplan, 1989]. Die aktuelle Definition der International Diabetes Federation (IDF) von 2007 verlangt neben der viszeralen Adipositas mit einem erhöhten Taillenumfang mindestens zwei der folgenden Veränderungen (Tab. 2): Triglyzeride  $\uparrow$ , High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin-Werte  $\downarrow$ , Blutdruck-Werte  $\geq 130/85$  mmHg und Nüchtern-Plasmaglukose-Werte  $\uparrow$  oder ein diagnostizierter DM Typ 2. Einige der pathophysiologischen Schlüsselprozesse im Rahmen dieses Syndroms, welche die enge Assoziation zur NAFLD verdeutlichen, sind ein chronischer Entzündungszustand, Insulinresistenz, endotheliale Dysfunktion und eine überschießen-

de Anhäufung freier Fettsäuren [Miles und Jensen, 2005; Wong et al., 2015]. Das metabolische Syndrom kann durch Überernährung, Bewegungsmangel oder körperliche Inaktivität, chronischen Stress, Nikotinkonsum, erhöhte Kochsalzzufuhr und auch durch genetische Faktoren in Erscheinung treten. Die ungesunden Lebens- und Ernährungsgewohnheiten als Folge der Industrialisierung gehören zu den wichtigsten Faktoren, die das metabolische Syndrom zu einem sehr wichtigen alltäglichen Problem der heutigen Medizin machen. Das Vorhandensein eines metabolischen Syndroms erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, für DM Typ 2 sowie für chronische Lebererkrankungen und deren Progression zum HCC.

<b>Voraussetzung für die Diagnosestellung ist:</b>	
<b>Taillenumfang</b>	Männer: $\geq 94$ cm
	Frauen: $\geq 80$ cm
<b>und mindestens 2 der folgenden 4 Faktoren:</b>	
<b>Nüchternblutzuckerwert</b>	$> 100$ mg/dl ( $> 5,6$ mmol/l) oder Diabetes mellitus
<b>Serum-Triglyceride</b>	$> 150$ mg/dl ( $> 1,7$ mmol/l) oder medikamentöse Behandlung
<b>HDL-Cholesterol</b>	Männer: $< 40$ mg/dl ( $< 1,03$ mmol/l) Frauen: $< 50$ mg/dl ( $< 1,29$ mmol/l) oder medikamentöse Behandlung
<b>Bluthochdruck</b>	systolisch: $\geq 130$ mmHg diastolisch: $\geq 80$ mmHg oder Antihypertensiva

Tabelle 2 Definition des Metabolischen Syndroms, *modifiziert nach der IDF (2007)*.

Die Prävalenz des metabolischen Syndroms in der Weltbevölkerung ist abhängig vom Geschlecht und variiert bei Männern zwischen 8 und 43 %, bei Frauen zwischen 7 und 56 % [Cameron et al., 2004]. Im Zeitraum zwischen dem 20. und dem 60. Lebensjahr [Park et al., 2003] sowie bei Frauen in der Postmenopause [Ponholzer et al., 2007] konnte ein Anstieg der Prävalenz festgestellt werden.

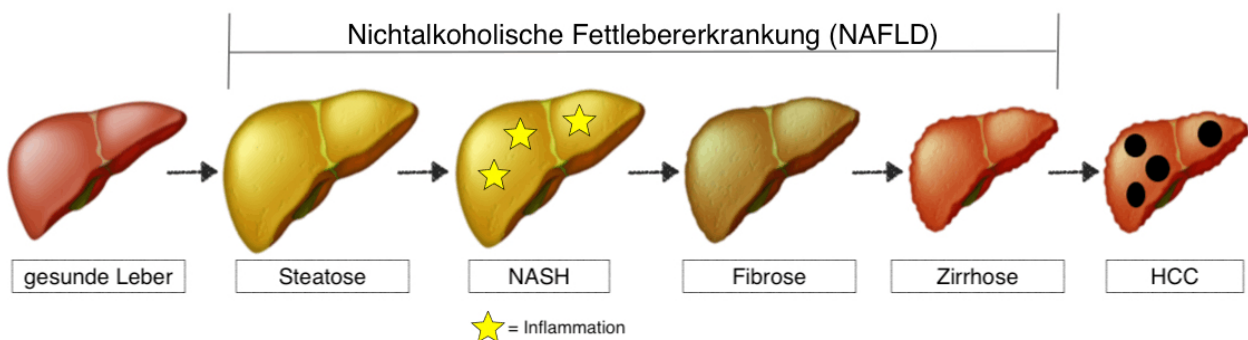
### 1.3 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Die NAFLD, welche oft als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen wird, ist mit steigenden Inzidenzen eine der häufigsten Ursachen einer chronischen Lebererkrankung in der westlichen Welt [Calzadilla Bertot und Adams, 2016; Younossi et al., 2011]. Bei einer alkoholischen Fettlebererkrankung (AFLD) ist zur Abgrenzung ein Alkoholkonsum von  $> 20$  g Alkohol/Tag bei Frauen und von  $> 60$  g Alkohol/Tag bei Männern für die Diagnosestellung notwendig [Krams et al., 2010]. Durch steigenden Bewegungsmangel, sowie fett- und kohlenhydratreiche Ernährung haben in den westlichen Industrienationen bis zu 30 % der erwachsenen Bevölkerung eine NAFLD [Herold, 2017].

Die NAFLD umfasst vier Stadien:

1. Nicht-alkoholische Fettleber (Steatose)
2. Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH, Nicht-alkoholische Fettleberentzündung)
3. Fibrose
4. Zirrhose (Fettzirrhose)

Das erste Stadium, die Steatose, zeichnet sich durch Fetteinlagerungen in die Hepatozyten aus. Im Rahmen der Fetteinlagerung kommt es auch zu einer makroskopischen Größenveränderung der Leber (Abb. 1, *Steatose*). Es werden drei Schweregrade anhand der betroffenen Hepatozyten unterschieden: mild, mäßig und schwer. Das zweite Stadium ist die NASH, hier kommt es zu einer Entzündung und somit zu einem Zellschaden. Dieser zeichnet sich durch mikrovesikuläre Verfettung, Ballonierung der Hepatozyten und Zelltod aus. Außerdem können sich entzündliche Zellinfiltrate bilden, welche mit klassischen Zeichen einer lokalen Inflammation einhergehen (Abb. 1, *NASH*). Das dritte Stadium, die Fibrose, zeigt Narbenbildungen ohne den Verlust der regelrechten Leberfunktion. Bis zu diesem Stadium ist die hepatische Degeneration noch reversibel. Das vierte Stadium ist die Leberzirrhose, welche in der Literatur auch als Endstadium der Fibrose bezeichnet wird. Sie ist begleitet von einem irreversiblen Untergang der Hepatozyten und einem Verlust der Leberarchitektur. Zusätzlich tritt aufgrund des Gewebeuntergangs eine makroskopische Verkleinerung der Leber auf, man spricht umgangssprachlich von einer "Schrumpfleber" (Abb. 1, *Zirrhose*). Es wurde von Ascha et al. auch die Möglichkeit eines direkten Übergangs von einer Steatose in eine Zirrhose beschrieben [Ascha et al., 2010]. Die globale Prävalenz der NAFLD liegt bei etwa 25 % mit den höchsten Werten in Ost- und Südamerika gefolgt von Asien, den USA und Europa [Younossi et al., 2016].



**Abbildung 1 Schaubild der Leberdegeneration, modifiziert nach Atlas of Science (2018; <https://atlasofscience.org>).** Im Verlauf der NAFLD kann es zu folgender Progression kommen: Aus einer gesunden Leber kann sich durch Fetteinlagerung eine Steatose entwickeln. Infolge weiterer Entzündungsvorgänge kann sich eine NASH, durch Progress eine Fibrose und letztendlich eine Zirrhose entwickeln. In dem Endstadium der NAFLD ist das Risiko der Bildung eines HCC erhöht. Verdeutlicht werden hier auch die Veränderungen der Lebergröße: in den früheren Stadien kann die Leber abhängig von der Fetteinlagerung an Größe zunehmen, wobei sie in den Endstadien aufgrund des Gewebeuntergangs und des Funktionsverlustes eher schrumpft.

Zu den Risikofaktoren für die Ausbildung einer NAFLD (Tab. 3) gehören u. a. neben dem Alter, ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI), Bewegungsmangel, Bluthochdruck, genetische Prädisposition, erhöhte Kalorienzufuhr, fettreiche Ernährung sowie Insulinresistenz [Prashanth et al., 2009; Singh et al., 2015]. Eine umfassende Auflistung der Risikofaktoren ist in Tab. 3 dargestellt.

<b>Risikofaktoren für die NAFLD</b>
Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus
Metabolisches Syndrom
(insbesondere abdominelle) Adipositas
Bewegungsmangel
Bluthochdruck
erhöhte Kalorienzufuhr
reichhaltiger Fleischkonsum
fettreiche Ernährung
Fettstoffwechselstörung
Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
genetische Prädisposition
männliches Geschlecht
steigendes Alter

*Tabelle 3 Risikofaktoren der NAFLD, modifiziert nach Prashanth et al. [2009]; Singh et al. [2015].*

Bei Patienten mit positivem Risikoprofil liegt die Prävalenz für eine NAFLD zwischen 70 und 90 % [Williams et al., 2011]. Die Klinik dieser Erkrankung ist häufig unspezifisch und asymptomatisch. Es kann zu Müdigkeit und Druckgefühl im rechten Epigastrium kommen, jedoch hat die Mehrheit der Patienten zur Diagnosestellung keine Beschwerden. In der klinischen Untersuchung kann sich eine zentrale Fettleibigkeit und eine Hepatomegalie zeigen. Pathologisch erhöhte Werte der ALT bzw. der AST, als auch die Ultraschalluntersuchung können Hinweise auf eine Leberverfettung geben. Kälsch et al. [2015] fanden jedoch heraus, dass trotz einer ausgeprägten Lebererkrankung oder eines metabolischen Risikoprofils die Transaminasen im Normbereich sein können. Auch initial erhöhte Werte sind bei Ausbildung einer NASH teilweise wieder normalisiert [Fracanzani et al., 2008]. Die Ultraschalluntersuchung ist eine einfache, schnell verfügbare, strahlenfreie, sichere und auch günstige Methode zur Detektion einer Fettlebererkrankung. Die Sensitivität, eine hepatische Steatose zu detektieren, liegt zwischen 60 und 94 %, die Spezifität zwischen 84 und 95 % [Joseph et al., 1991; Singh et al., 2013]. Jedoch hat die Ultraschalluntersuchung ihre Grenzen bei der Unterscheidung bzw. Differenzierung zwischen den mildereren NAFLD-Formen und einer Steatose [Saadeh et al., 2002]. Die Zeichen für eine Fettleber sind erhöhte Echogenität, Verlust der Schallenergie, Abrundung der Leberränder sowie stumpfere Randwinkel [Singh et al., 2013]. Die Leberbiopsie ist als invasive Diagnostikmethode trotz höherem Aufwand und Komplikationspotenzial [Ratziu et al., 2005] die beste Methode zur Diagnose und zum Staging der NAFLD. 2008 wurde ein histologisches Scoring-System etabliert, welches zur Beurteilung der NAFLD-Aktivität

und dem Grad der Fibrosierung dient [Nobili et al., 2008]. In diese Bewertung gehen jeweils Zahlenwerte der Steatose, der lobulären Inflammation und des Hepatozyten-Ballooning ein.

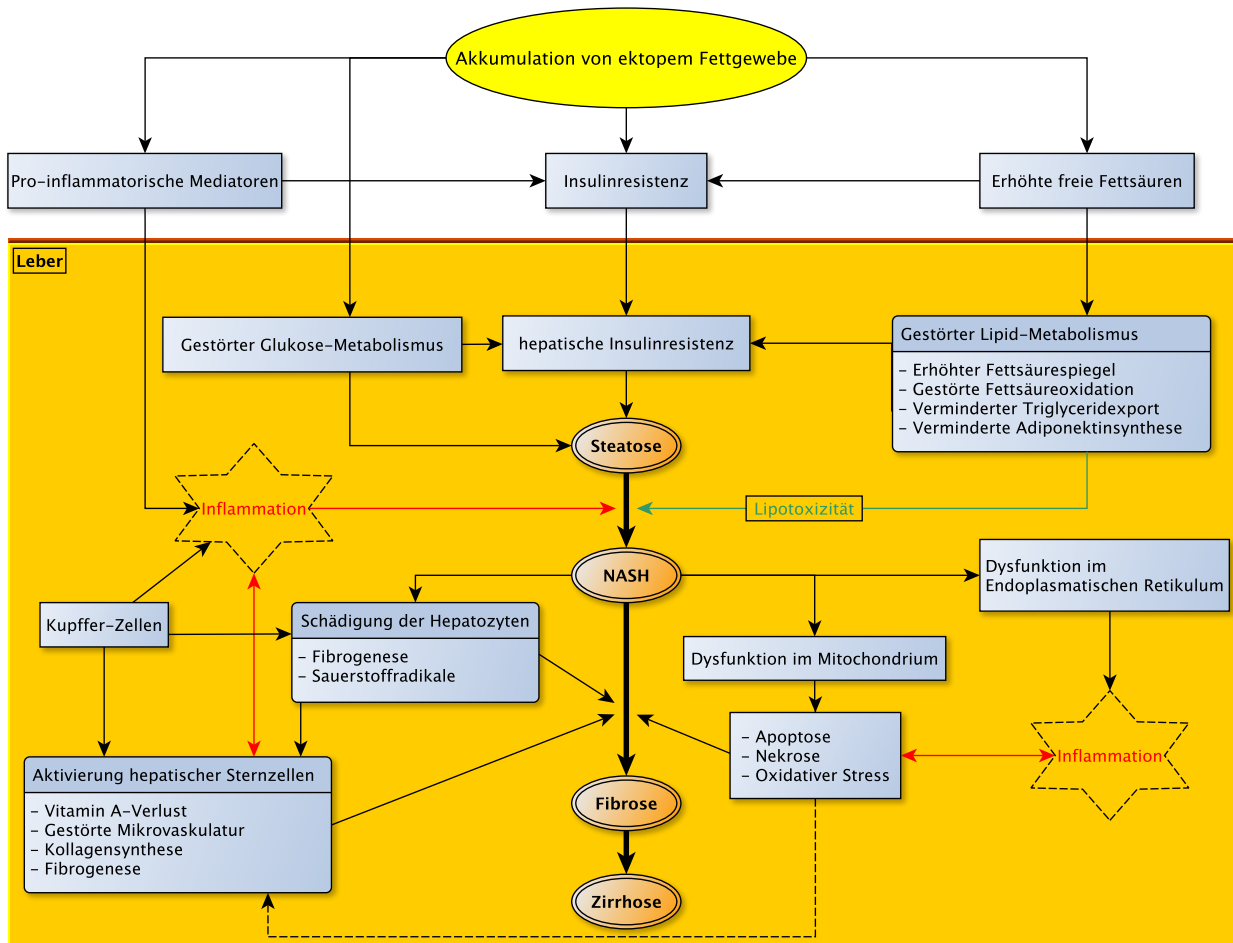
Die Therapie der NAFLD und der NASH beschränkt sich zur Zeit auf Lebensstiländerung [Eckard et al., 2013], Ernährungsumstellung und Bewegungssteigerung mit Gewichtsabnahme [Younossi et al., 2011] oder der Therapie einer möglichen zugrundeliegenden Erkrankung. Es wurde gezeigt, dass sportliches Training nur auf hohem Intensitätslevel einen Einfluss auf metabolische Parameter und die hepatische Fetteinlagerung hat [Oh et al., 2015]. Eine weitere Therapieoption für stark übergewichtige Patienten, welche erfolglos versuchen abzunehmen, ist die bariatrische Chirurgie. Hier zeigt sich eine Verbesserung und sogar eine Umkehr der Fettlebererkrankung oder der Fibrose nach dem chirurgischem Eingriff [Mathurin et al., 2009; Taitano et al., 2015]. Bei fortgeschrittener Zirrhose besteht nur noch die Möglichkeit einer Leber- oder Teillebertransplantation sowie einer Splitlebertransplantation. Aufgrund der Organmangelsituation ist die Warteliste jedoch sehr lang. Derzeit warten allein in Deutschland mehr als 10.000 Patienten auf eine Spenderleber. Im Jahr 2016 wurden 888 Lebertransplantationen durchgeführt [Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2016], was einen Anteil von nur etwa 9 % der Patienten auf der Warteliste entspricht.

### 1.3.1 Pathogenese der NAFLD

Die Pathophysiologie der NAFLD ist durch eine Reihe von Mechanismen gekennzeichnet. Die Grundlage hierfür sind u. a. oxidativer Stress, Anhäufung von Triglyceriden und freien Fettsäuren, Umbau von Extrazellulärmatrix sowie Freisetzung von Endotoxinen und durch Makrophagen und Adipozyten produzierte Zytokine [Day, 2010]. Initial lässt sich eine Akkumulation von ektopem Fettgewebe feststellen (Abb. 2), was mit einer erhöhten Sekretion von Zytokinen und leberspezifischen Hepatokinen [Kantartzis et al., 2010], erhöhter Glukoneogenese, verminderter Glykogensynthese sowie einer Unterdrückung von Insulin-Signalwegen verbunden ist [Samuel et al., 2004]. Es besteht eine enge Verbindung zwischen dem Fettgewebe und dem Lebermetabolismus, denn nahezu zwei Drittel der freien Fettsäuren für die Triglyceridsynthese in der Leber stammen aus Adipozyten [Barrows und Parks, 2006]. Durch die erhöhte Fettsäureablagerung im freien Fettgewebe bildet sich zuerst eine ortsständige und daraufhin eine hepatische Insulinresistenz [Svedberg et al., 1990; Wiesenthal et al., 1999]. Bei der Mehrheit der Patienten mit einer NAFLD entwickelt sich eine Insulinresistenz im Fettgewebe, unabhängig davon, ob die Patienten adipös sind oder nicht [Bugianesi et al., 2005]. Infolgedessen zeigt sich auch eine progressive Verschlechterung der Plasmatriglycerid-Werte, des HDL-Cholesteroll-Levels, der hepatischen Insulinresistenz und der Leberfibrose [Lomonaco et al., 2012]. Die dadurch erhöhte Konzentration von Insulin und Glukagon vermittelt zunächst eine verstärkte Freisetzung von freien Fettsäuren aus Adipozyten und Muskelzellen, welche die Leber aufnimmt. Diese erhöhten Fettsäurespiegel zeigen negative Effekte, welche durch Lipotoxizität näher bezeichnet werden. Die hepatische Insulinresistenz wird verstärkt und es werden Metabolite produziert, welche zu einer Dysfunktion

im Mitochondrium und im endoplasmatischen Retikulum führen [Feldstein et al., 2004; Wei et al., 2007]. Hierdurch werden weitere inflammatorische Kaskaden aktiviert, welche zur Aktivierung der HSC beitragen (Abb. 2, *Aktivierung hepatischer Sternzellen*). Die Hepatozyten spielen ebenso eine wichtige Rolle bei der hepatischen Degeneration. Im Rahmen der NAFLD kommt es zur gezielten Apoptose dieser Zellen oder zur Einschränkung ihrer Regeneration. Geschädigte Hepatozyten sind fähig Sauerstoffradikale zu bilden, pro-fibrogene Mediatoren auszuschütten und HSC zu aktivieren [Canbay et al., 2004]. Durch Umwandlung in kontraktile Myofibroblasten-ähnliche Zellen fördern die HSC durch überschießende Bildung von Wachstumsfaktoren die Fibrogenese, was zu Störungen und Resistenzbildungen in der Mikrovaskulatur führt [Puche et al., 2011]. So stellen sie einen wichtigen Pfeiler für die Bildung bzw. die Progression einer Leberfibrose dar [Wandzioch et al., 2004]. Außerdem spielt die Aktivierung der Kupffer-Zellen eine zentrale Rolle in der hepatischen Degeneration; sie können Einfluss nehmen auf die Inflammation, die Aktivierung der HSC und die Schädigung der Hepatozyten (Abb. 2, *Kupffer-Zellen*). Diese Zellen sind leberspezifische Gewebemakrophagen, die sich aus Monozyten entwickeln und die Progredienz einer Fettleberdegeneration unterstützen. Experimentelle Studien zeigten, dass durch eine verminderte Anzahl von Kupffer-Zellen die Bildung einer hepatischen Steatose und Inflammation verhindert werden konnte [Huang et al., 2010]. Es gibt zwei Typen von Makrophagen (M1 und M2), M1-Makrophagen haben eher pro-inflammatorische Eigenschaften, während M2-Makrophagen anti-inflammatorisches Potenzial besitzen [Lumeng et al., 2006]. Durch Aktivierung der Kupffer-Zellen können verschiedene Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden, welche die Bildung und die Progression einer NAFLD fördern können [Duval et al., 2010]. Freie Fettsäuren und Lipopolysaccharide können die Kupffer-Zellen über Toll-like-Rezeptoren (TLR) der Klasse 2 und 4 aktivieren, wodurch u. a. die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  und IL (Interleukin) 1- $\beta$  stimuliert wird [Stienstra et al., 2010]. Als Folge wird die Expression von bestimmten Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) reduziert, woraus eine verminderte  $\beta$ -Oxidation und Ketonkörpersynthese resultiert. Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  eine steatotische Leberdegeneration reduziert [Stienstra et al., 2010]. Die Unterdrückung der Expression von PPAR- $\alpha$  kann somit die Progression einer Fettlebererkrankung fördern. TNF- $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, welches verschiedene Signalwege aktivieren kann. Hierzu zählt die Aktivierung der hepatozellulären Apoptose und der HSC sowie die Zunahme inflammatorischer Zellen [Ruan und Lodish, 2003]. Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Progress der NAFLD bzw. der Insulinresistenz und einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Aktivität [Uysal et al., 1998]. Die sinusoidalen Endothelzellen bilden das strukturelle Gerüst für die Fenestrierung der Endotheloberfläche, damit die von den Hepatozyten produzierten Metabolite ungehindert in die Blutbahn gelangen können [Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012]. Studien bewiesen, dass auch sinusoidale Endothelzellen den Prozess der Fibrosierung und damit die Progression der NAFLD fördern können, indem sie über Zytokine die HSC aktivieren [Marvie et al., 2010]. Aktuelle Studien zeigten zusätzlich, dass auch das

intestinale Mikrobiom, die Gesamtheit aller Mikroorganismen im Magen-Darm-Trakt, einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Entstehung und Progredienz der NAFLD [Mouzaki et al., 2013; Raman et al., 2013] sowie die Entstehung eines HCC hat [Yoshimoto et al., 2013].



**Abbildung 2 Schaubild der Pathophysiologie, modifiziert nach Rinella [2015].** Die Akkumulation von ektope Fettgewebe erzeugt Störungen im hepatischen Lipid- und Glukose-Metabolismus, welche auch zu übermäßiger Erhöhung der hepatischen Fettspeicher führen. Es werden pro-inflammatorische Mediatoren gebildet, welche die Progression der NAFLD im Rahmen von Entzündungskaskaden fördern. Entscheidende Schlüsselprozesse im Rahmen der NAFLD sind die Entstehung der hepatischen Insulinresistenz, Inflammation und Aktivierung der hepatischen Sternzellen.

### 1.3.2 Steatose

Die Steatose bezeichnet einen nicht-inflammatorischen Zustand der Leber, bei dem es zu einer übermäßigen Akkumulation von Triglyceriden in Hepatozyten kommt, resultierend aus einem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Verbrauch. Man spricht von einer Fettleber, wenn der Fettgehalt der Leber mehr als 5 % des Lebergewichtes beträgt [Krams et al., 2010]. Anhand der S2k-Leitlinie für nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen der deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie von 2015 werden drei Schweregrade der Steatose differenziert: geringgradige - (weniger als ein Drittel der Hepatozyten betroffen), mittelgradige - (zwei Drittel der Hepatozyten betroffen),



und eine hochgradige Steatose (mehr als zwei Drittel der Hepatozyten betroffen). Makroskopisch sieht man eine vergrößerte, gelblich veränderte Leber mit glatter Oberfläche (Abb. 1, *Steatose*). Veränderungen bzw. eine Hemmung der Insulin-Signalkaskade innerhalb des Fett- und Lebergewebes sind weitere sehr frühe Zeichen dieser Leberdegeneration [Anstee et al., 2013]. Ferreira et al. [2011] konnten zeigen, dass es einen engen Zusammenhang zwischen dem Grad der Insulinresistenz und dem Schweregrad der NAFLD gibt. Mit steigender Inzidenz von Fettleibigkeit sowie DM Typ 2 kommt es besonders in den industrialisierten Ländern zum vermehrten Auftreten dieser Fettlebererkrankung und dessen Progression [Schuppan und Schattenberg, 2013]. In einer amerikanischen Studie von 2011 mit 400 Fallzahlen und einem mittleren Alter von 55 Jahren wurde eine Prävalenz der Steatose mit 46 % angegeben, dabei zeigten 45 % dieser Patienten eine Fettleibigkeit [Williams et al., 2011]. Die Progression der Steatose verläuft aggressiver und schneller bei Kindern als bei Erwachsenen [Marin et al., 2016]. Ferner hat die Prävalenz der NAFLD sowie der Adipositas bei Kindern und Jugendlichen weiter zugenommen [Dunn und Schwimmer, 2008]. Studien haben belegt, dass der Konsum von Nikotin die Progredienz einer Steatose vorantreiben kann [Zein et al., 2011]. In etwa einem Drittel kommt es zu einer Progression der Lebererkrankung und somit zur Bildung einer NASH [Arab et al., 2018]. Das Stadium der Steatose ist prinzipiell vollkommen reversibel und kann über mehrere Jahre stagnieren oder erst nach Jahrzehnten progredient verlaufen.

### 1.3.3 NASH

Durch oxidativen Stress und Bildung toxischer Lipide kann es im weiteren Verlauf zur Dysbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Schädigung der Hepatozyten kommen [Neuschwander-Tetri, 2010]. Die chronische lobuläre Inflammation ist ein besonderer Schlüsselprozess im Rahmen einer NASH. Die allgemeinen Kennzeichen der NASH sind Zellschäden bis hin zum Zelltod, Inflammation sowie im fortgeschrittenen Zustand die Fibrogenese. Prognosefaktoren, die in der Klinik für den Patientenverlauf herangezogen werden können, sind daher histologische Nachweise von Entzündungen oder Fibrosierungen in der Leber. Während das Steatose-Stadium bei der überwiegenden Anzahl der NAFLD-Patienten vorkommt, entwickeln nur 5 bis 20 % der Patienten mit einer NAFLD im Verlauf eine NASH [Bataller et al., 2011]. Unter erwachsenen Patienten in den USA, welche auf eine Lebertransplantation warten, ist die NASH die zweithäufigste Ursache [Charlton et al., 2011]. Aufgrund steigender Prävalenzen der Risikofaktoren wird davon ausgegangen, dass die NASH innerhalb der nächsten Dekade die Hauptursache für eine Lebertransplantation sein könnte [Siow et al., 2016]. Etwa 20 % der Patienten mit einer NASH entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Zirrhose [Youssef und McCullough, 2002].

### 1.3.4 Leberfibrose

In rund 10 bis 20 % der Fälle bilden Patienten mit einer NASH eine höhergradige Fibrose aus [Battaller et al., 2011], wodurch der Weg der Progression zu einer Zirrhose geebnet wird. Hier kommt es zu einer Zunahme des Bindegewebigen Anteils der Leber, ohne dass es zu einem weitreichenden Funktionsverlust kommt. Durch die Stimulation kollagenproduzierender Zellen (HSC) kommt es im Rahmen einer Reparatur zu einer ungleichmäßigen, überschießenden Bindegewebsproduktion und damit einer Narbenbildung. Die Fibrose wird in drei unterschiedliche Grade eingeteilt, morphologische Befunde können periportale Bindegewebsexpansionen und Bildung portoportaler Septen sein. Dies zeigt sich auch im Rahmen makroskopischer Veränderungen. Die Leber verliert die glatte und weiche Erscheinungsform und wird rau, fest und zeigt deutlich narbige Strukturen. Die Leber erscheint gräulich verblasst (Abb. 1, *Fibrose*).

### 1.3.5 Leberzirrhose

Das Endstadium der Bindegewebsvermehrung wird als Zirrhose bezeichnet. Die Fibrose ist damit ein unabdingbarer Wegbereiter der Zirrhose. Die Zirrhose ist neben der NAFLD auch Endzustand anderer chronisch-progredienter Lebererkrankungen, wie z.B. einer Virushepatitis. Hier kommt es zu weiteren Kollagenablagerungen im Disse-Raum [Rastogi et al., 2013], zur verstärkten lobulären Inflammation und hepatozellulären Apoptose. Histologische Zeichen der Leberzirrhose sind eine veränderte Gefäßarchitektur, portozentrale Kurzschlüsse, enorme Vermehrung des Bindegewebes zu breiten Septen und Veränderungen der Sinusoid-Endothel-Struktur [Lüllmann-Rauch, 2009]. Ab dem Stadium der Zirrhose ist die Lebererkrankung im Allgemeinen nicht mehr heilbar und das betroffene Lebergewebe ist in seiner Funktion stark beeinträchtigt. Durch die ungeordnete Proliferation des restlichen Gewebes, welche durch den Verlust der Leberläppchenstruktur und Gefäßarchitektur angetrieben wird, entstehen knotige Veränderungen in Form von spezifischen Regeneratknoten [Krams et al., 2010]. Makroskopisch kommt es zu einer starken Größenabnahme der Leber, die Oberfläche wird höckrig und die Konsistenz ist derb (Abb. 1, *Zirrhose*). Typisch für dieses Stadium ist die Umwandlung des vitalen Leberparenchyms in narbiges Gewebe bis hin zum kompletten Umbau der ursprünglichen Läppchenarchitektur. Dadurch kommt es zu einem gestörten Blutfluss innerhalb der Leber und final zu einer irreversiblen Leberinsuffizienz. In zirrhotischen Lebern beobachtet man die Defenestrierung des sinusoidalen Endothels und die Bildung einer subendothelialen Basalmembran [Mori et al., 1993].

### 1.3.6 Hepatozelluläres Karzinom

Etwa 90 % der primären Leberkarzinome sind HCC, die Inzidenz beträgt in Europa 3/100.000 Menschen pro Jahr [Krams et al., 2010]. Das Auftreten dieses Tumors ist solitär oder multilokulär, es zeigt sich ein gelb-weißlicher Schnittrand. Bei unterschiedlichen Wachstumsmustern sind die

Tumorzellen histologisch den Hepatozyten sehr ähnlich und zeigen am häufigsten trabekuläre Anordnungsstrukturen [Solaß und Tannapfel, 2013]. Durch unzureichenden Blutfluss im Inneren des Tumors kann es zu nekrotischen Veränderungen kommen. HCC wachsen generell langsam, zeigen aber eine relativ schnelle hämatogene Metastasierung. Die Bildung eines HCC ist auch ohne Zirrhose - auf Grundlage einer NASH - möglich [Wong et al., 2016]. In einigen Fällen wird sogar der Übergang in ein HCC vom Anfangsstadium der NAFLD, der Steatose, beschrieben [Paradis et al., 2009]. Ascha et al. [2010] haben herausgefunden, dass die Inzidenz ein HCC auf dem Boden einer NASH-Zirrhose zu bilden bei 2,6 % liegt. Bis zu ein Fünftel der HCC-Fälle der westlichen Bevölkerung entstehen auf dem Boden einer NAFLD [Michelotti et al., 2013]. Studien zeigten weiterhin, dass Fettleibigkeit das Risiko für die Entstehung eines HCC verdoppeln kann [Rosmorduc und Fartoux, 2012].

#### **1.4 Klinik fortgeschrittener Lebererkrankungen**

Das klinische Erscheinungsbild von Lebererkrankungen im Endstadium ist aufgrund der weitreichenden hepatischen Funktionen vielfältig, aber dennoch spezifisch. Viele Patienten bleiben jedoch eine lange Zeit klinisch asymptomatisch. Durch die Verlangsamung der Bilirubin-Aufnahme in die Leber kommt es zur Ablagerung dieser Stoffe in der Haut und in der Sklera des Auges, sodass ein Ikterus (Gelbfärbung) entsteht (Tab. 4). Durch die Widerstandserhöhung im hepatischen Stromgebiet ist die Leber im Stande eine portale Hypertension (Pfortaderhochdruck) mit weitreichendem Risikopotenzial auszubilden. Dadurch kann es zur Bildung von portokavalen Anastomosen in Form von Krampfadern (Varizen) im Magen, in der Speiseröhre (Ösophagusvarizen), über den rektalen Venenplexus und im Bereich der Nabelvenen (Caput medusae) kommen. Durch Blutrückstau entlang der V. lienalis ist eine Milzvenenthrombose möglich und es kann zu einer Splenomegalie kommen. Aufgrund der hydrostatischen Druckerhöhung im Bauchraum bildet sich ein Aszites (Tab. 4). Durch den Funktionsverlust der Leber und dem daraus resultierenden Albuminmangel können weitere Ödeme entstehen und zu einer weiteren Zunahme des Aszites führen. Im Rahmen einer verminderten Syntheseleistung der Gerinnungsfaktoren kommt es außerdem zu einer erhöhten Blutungsneigung. Durch die mangelhafte Entgiftung von Ammoniak kommt es zu Funktionsstörungen im ZNS (Zentrales Nervensystem). Hier spricht man von einer hepatischen Enzephalopathie, die mit kognitiven Defiziten, Reizbarkeit, Antriebsstörungen, Ataxien und Bewusstseinsstörungen einhergehen kann. Der Verlust vasoaktiver Substanzen vermindert die Perfusion der Niere: die potenzielle Bildung eines hepatorenalen Syndroms mit der Gefahr des Nierenversagens stellt eine weitere Folge der Lebererkrankung dar. Für die klinische Untersuchung im Rahmen der allgemeinen Inspektion von Patienten gibt es eine Reihe bestimmter Merkmale, die auf fortgeschrittene Lebererkrankungen hinweisen können. Diese Merkmale werden u. a. auch als Leberhautzeichen beschrieben. Die untersuchenden Ärzte sollten bei möglicher Prädisposition

(Risikofaktoren der NAFLD, Tab. 3) zur Früherkennung oder bei bereits bestehender Lebererkrankung zur Verlaufskontrolle auf die in Tabelle 4 genannten Merkmale gesondert achten.

<b>Merkmale fortgeschrittener Lebererkrankungen</b>
Teleangiektasien (insbesondere Spider naevi)
Ikterus
Mundwinkelrhagaden
Lacklippen
Lackzunge
fehlende männliche Sekundärbehaarung
Gynäkomastie
Weißnägel
Palmarerythem
Dupuytren-Kontraktur
Striae
vermehrte Venenzeichnung der Bauchhaut
Hodenatrophie
Aszites
Pruritus
Ödeme
Hauteinblutungen

Tabelle 4 Zeichen fortgeschrittener Lebererkrankungen, *modifiziert nach [Herold, 2017].*

## 1.5 NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell

Im Februar 2013 wurde von Fujii et al. (Stellic Institute & Co., Japan) ein neues Tiermodell (auch "STAM mice" genannt) beschrieben. Diese Mäuse zeigen durch fettreiche Ernährung und erhöhte Blutzucker-Werte eine Krankheitsprogression von der Steatose über die NASH und Fibrose bis hin zum HCC in einer relativ kurzen Zeitspanne von 20 Wochen [Fujii et al., 2013]. Die Mäuse bekommen am zweiten postnatalen Tag Streptozotizin (STZ) intraperitoneal injiziert, wodurch eine Hyperglykämie induziert wird. Ab dem Alter von 4 Wochen wird mit einer kontinuierlichen Hoch-Fett Diät (HFD) begonnen. Durch diese Kombination entwickeln die Mäuse eine progressive NAFLD. In dieser Studie stellten Fujii et al. [2013] fest, dass die Progression zur NASH der Schlüsselprozess in der Bildung eines HCC auf Grundlage eines DM ist. Durch histologische, makroskopische und biochemische Analysen gelang es ihnen nachzuweisen, dass es bei allen Untersuchungstieren zur Ausbildung eines HCC kam. Bisher wurde dieses Modell in unterschiedlichen Studien verwendet, um die Pathophysiologie der NASH, der Tumorgenese [Thomson et al., 2016] sowie der HCC-Entstehung zu erforschen und mögliche therapeutische Ansätze zu etablieren [Jojima et al., 2016; Saito et al., 2015].

## 2 Zielstellung

Da die NAFLD eine weit verbreitete Erkrankung des 21. Jahrhunderts ist und die Inzidenz von Jahr zu Jahr - besonders in den Entwicklungsländern [Kelly et al., 2008] - steigt, ist die Kenntnis über die genauen pathophysiologischen Mechanismen für eine frühzeitige Diagnosestellung und mögliche therapeutische Interventionen notwendig. Ziel dieser Studie war es daher, das NASH-Fibrose-Tumor Modell zu nutzen, um mikrohämodynamische und morphologische Veränderungen während der Progression der NAFLD umfassend zu analysieren. Unter Verwendung der Intravitalmikroskopie ist eine genaue *in vivo* Beobachtung der Mikrozirkulation und Mikrohämodynamik in den verschiedenen Erkrankungsstadien möglich. Der Allgemeinzustand, das Gewicht, der Blutzucker und die Aktivitäten der Leberenzyme wurden zur weiteren Beurteilung bestimmt. Durch zusätzliche histologische, immunhistochemische sowie laborchemische Analysen sollte die Progression der NAFLD näher analysiert und intravitalmikroskopische Untersuchungsergebnisse verifiziert und vervollständigt werden.

In dieser Studie konzentrierten wir uns auf folgende Sachverhalte:

1. Welchen Einfluss hat die Fettleberdegeneration auf die hepatische Perfusion?
2. Wie äußern sich die Umbauprozesse im Rahmen einer Fibrose auf die hepatische Mikrohämodynamik?
3. Welche mikrozirkulatorischen Charakteristika zeigen die einzelnen Erkrankungsstadien der NAFLD?
4. Gelingt es durch die folgende Studie die mikrovaskulären Prozesse im Rahmen der Progression einer Fettleber zum HCC besser zu verstehen?
5. Kann mit der folgenden Studie ein neuer Meilenstein für pharmakologische oder therapeutische Interventionen gesetzt werden?

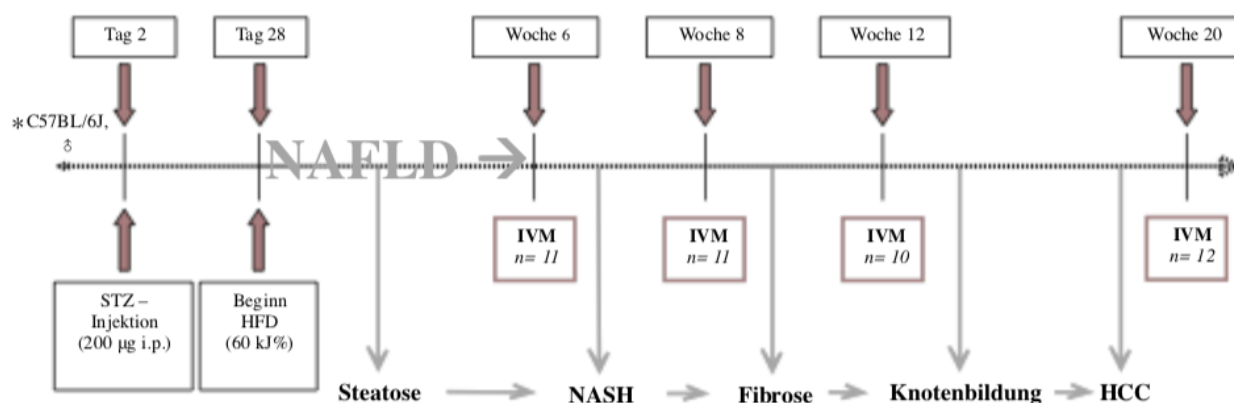
## 3 Material und Methodik

### 3.1 Experimentelles Tiermodell

Für die Studie wurden männliche C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tierexperimente wurden vom "Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern" genehmigt (7221.3-1-039/14) und orientierten sich an den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 2 sowie § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes nach deutscher Rechtsordnung und an der EU-Richtlinie 2010/63/EU. Die Tierversuche wurden am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Es wurde das bereits am Institut etablierte NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell, welches 2013 erstmalig von Fujii et al. beschrieben wurde [Fujii et al., 2013], verwendet. Das Modell beinhaltet zwei voneinander unabhängige Behandlungen, wodurch es mit einer hohen Inzidenz in einer Zeitspanne von 20 Wochen zu einer progressiven NAFLD kommt. Durch die intraperitoneale Injektion von 200 µg STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 10 µl 0,05 mol Natriumcitrat (pH 4.5; Merck, Darmstadt, Deutschland) am zweiten postnatalen Tag wird bei den Versuchstieren ein DM induziert. STZ ist ein Zytostatikum, welches das Pankreas anschwellen lässt und spezifisch degenerativ auf die pankreatischen β-Zellen in den Langerhansschen-Inseln wirkt [Akbarzadeh et al., 2007]. Da die pankreatischen β-Zellen Insulin produzieren, kommt es zu einem Insulinmangel. Als weitere Folge des Insulinmangels wird Glukose nicht mehr in die Zellen aufgenommen und Glykogen vermehrt abgebaut, es kommt u. a. zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellage. Ab dem 28. Lebenstag erhielten die Mäuse eine kontinuierliche HFD mit einem Fettgehalt von 60 kJ % (D12492(II), Ssniff, Soest, Deutschland). Hierdurch steigt die hepatische Fettakkumulation und es zeigt sich eine erhöhte lobuläre Entzündungsreaktion mit Schaumzellen-Makrophagen und Bildung einer NASH [Fujii et al., 2013].

#### 3.1.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt. Im Alter von 6, 8, 12 und 20 Wochen wurden bei STZ/HFD-behandelten Mäusen (n = 10-12 pro Zeitpunkt, Abb. 3) sowie gesunden Kontrolltieren (n = 10) intravitalmikroskopische Untersuchungen der Leber durchgeführt.



**Abbildung 3 Experimentelles Tiermodell, modifiziert nach Fujii et al., 2013:** Es wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet, welche am 2. Tag postnatal eine STZ-Injektion erhielten und ab dem 28. Tag einer hyperkalorischen Ernährung (HFD) unterzogen wurden. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine progrediente NAFLD. Eine umfassende intravitalmikroskopische Untersuchung (IVM) der Leber wurde zu den finalen Untersuchungszeitpunkten 6, 8, 12 und 20 Wochen durchgeführt.

### 3.1.2 Haltung der Tiere

Die Untersuchungstiere wurden zu je maximal 5 Mäusen pro Käfig in einem temperaturüberwachten Raum ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) mit einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Der allgemeine Gesundheitszustand wurde täglich überprüft. Im Rahmen der wöchentlichen Kontrolluntersuchungen wurde der Blutglukose-Wert sowie das Körpergewicht bestimmt.

## 3.2 Chirurgische Präparation

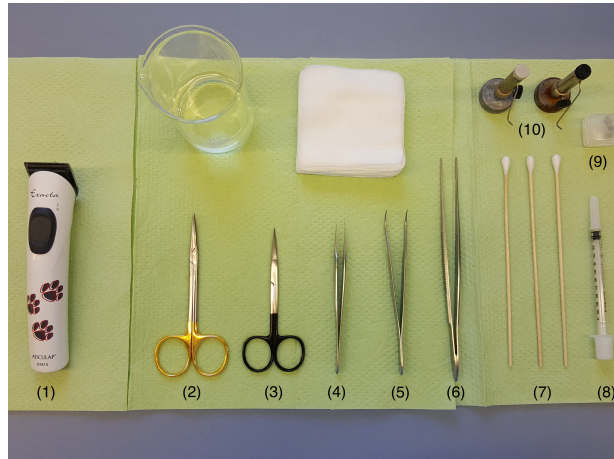
### 3.2.1 Anästhesie

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (90 mg/kg) und Xylazin (7 mg/kg) anästhesiert. Für die initiale Narkose wurde eine Stammlösung aus Ketamin 10 % (100 mg/ml, Belapharm, Vechta, D) und Xylazin 2 % (20 mg/ml, Rompun, Bayer Healthcare, Leverkusen, D) in einer 1 ml Spritze (0,2 ml Xylazin und 0,6 ml Ketamin) hergestellt. Der Maus wurden 0,01 ml pro 10 g Körpergewicht von der Stammlösung injiziert. Der gleiche Ansatz wurde 1:10 mit Natriumchlorid (NaCl, Kochsalz) verdünnt und bei Bedarf zur Aufrechterhaltung der Anästhesie während der mikroskopischen Beobachtung verwendet.

### 3.2.2 Vorbereitung

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung wurden die Versuchstiere zunächst gewogen und gewichtsadaptiert anästhesiert (3.2.1. *Anästhesie*). Nach einer Wartezeit von etwa zehn Minuten und anschließender Überprüfung der Narkosetiefe wurden die Halsregion, der untere Bauchbereich sowie die Flanken beidseits mit einem Elektrorasierer (Exacta GT415, AESCULAP®, Tuttlin-

gen, Deutschland; Abb. 4) großflächig rasiert (Abb. 5, (a)). Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C wurden die Mäuse auf eine Wärmeplatte gelegt und mit Hilfe von Pflasterstreifen fixiert. Die Fixierung erfolgte, um bewegungsabhängige Artefakte während der Mikroskopie zu reduzieren. Der Kopf wurde in Reklinationsstellung in Vorbereitung auf die Präparation der V. jugularis ebenfalls fixiert.



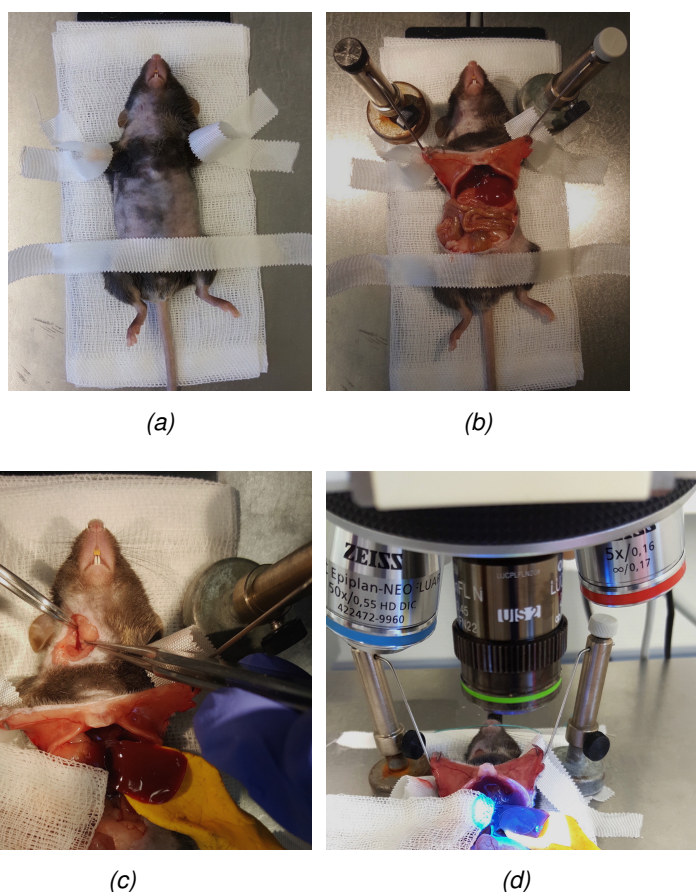
**Abbildung 4 Materialien für die Präparation und Untersuchungsdurchführung.** Rasierer (1), stumpfe Präparierschere (2), spitze Präparierschere (3), gerade Mikropinzette (4), gebogene Mikropinzette (5), anatomische Pinzette (6), Wattestäbchen (7), 1 ml-Spritze mit integrierter Kanüle 29 G (8), Deckgläser (9), magnetische Halterungsstände (10) zum Fixieren von Hautlappen sowie Kompressen und 0,9 %-ige NaCl-Lösung zum Schutz vor Gewebeaustrocknung.

### 3.2.3 Leberauslagerung

Nach Rasur und Desinfektion wurde zunächst die Haut der rechten Halsseite von kranial nach kaudal mittels scharfer Präparierschere ca. 2-3 cm inzidiert. Daraufhin erfolgte die stumpfe Präparation der V. jugularis unter mikroskopischer Sicht mit Hilfe einer gebogenen und einer geraden Mikropinzette (Abb. 4). Für die Blickfeldvergrößerung wurde ein Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) verwendet. Zum Schutz vor Austrocknung der V. jugularis wurde eine in warme 0,9 %-ige NaCl-Lösung getränkte Komresse auf die frei präparierte Stelle gelegt. Im weiteren Verlauf folgte die Mobilisierung der Leber. Hierzu wurde zunächst nach Rasur und Desinfektion der unteren Bauch- und beidseitigen Flankenregion eine mediane Laparotomie (ca. 3-5 cm) und eine quere Unterbauchlaparotomie (ca. 2-4 cm) durchgeführt. Nun wurden die Hautlappen, welche die Sicht auf den Situs einschränkten, mit Hilfe von magnetischen Halterungsständen seitlich fixiert (Abb. 4, (10); Abb. 5, (b)). Es erfolgte das Aufsuchen und Durchtrennen der Leberbänder, welche für die Verbindung des linken Leberlappens mit dem Zwerchfell, dem rechten Leberlappen als auch dem Magen zuständig sind. Nun wurde der linke Leberlappen vorsichtig auf eine individuell für jedes Tier geformte Plattform aus Knetmasse ausgelagert. Die Leber wurde so rotiert und auf die Plattform ausgelagert, dass die anatomisch dorsale Seite des linken Leberlappens, welche vorher zum Situs zeigte, mit einem Deckgläschen (12 mm Durchmes-



ser) bedeckt werden konnte (Abb. 5, (c)). Für die Auslagerung der Leber auf die Plattform wurden stets feuchte Wattestäbchen verwendet. Der zu untersuchende Leberlappen wurde mit Hilfe der "No-Touch"-Technik korrekt und in optimaler, möglichst planer, Position auf die Plattform umgelagert. Schädigungen durch Manipulation oder das Eröffnen von Gefäßen während der Operation bzw. der Leberauslagerung waren zu vermeiden, um die hepatische Mikrozirkulation nicht zu beeinträchtigen [Abshagen, 2008]. Außerdem wurden die übrigen abdominalen Organe mit Hilfe einer in warmer 0,9 %-iger NaCl-Lösung getränkten Kompresse abgedeckt und so vor Austrocknung und einer möglicherweise veränderten Organdurchblutung geschützt. Ziel der Auslagerung aus dem abdominalen Raum war die schonende Fixierung der Leber auf eine plane Ebene und somit die Minimierung des Rauschens der durch das Zwerchfell entstehenden Atembewegungen. Während der gesamten Untersuchung wurde die restliche Leber am Zwerchfell aufgestellt und durch warme 0,9 %-ige NaCl-Lösung vor Austrocknung geschützt. Im weiteren Verlauf erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leber (Abb. 5, (d)).



**Abbildung 5 Präparation der Maus für die IVM.** Zunächst wurde die Hals-, Bauch- und Flankenregion sorgfältig rasiert und desinfiziert (a). Danach erfolgte die Eröffnung der Cavitas abdominalis und die Fixierung der Hautlappen mittels Magnetständer (b). Im weiteren Verlauf wurde die Leber schonend, in "No-Touch"-Technik, ausgelagert. Danach erfolgte die Injektion von Farbstoffen in die zuvor freipräparierte - hier dargestellte - Vena jugularis (c). Nach Injektion verschiedener Farbstoffe erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung (d).

### 3.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

”Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist ein ideales Hilfsmittel zur umfassenden Analyse dynamischer biologischer Interaktionen und komplexer hepatischer Erkrankungsmechanismen, welche sich durch mikrozirkulatorische und mikrovaskuläre Störungen im Rahmen von Leberpathologien erkenntlich machen” [Vollmar und Menger, 2009].

Im Jahre 1904 entdeckte August Köhler als Mitarbeiter bei Carl Zeiss durch Zufall das Fluoreszenzlicht, indem er ein Mikroskop für UV-Licht verwendete, als er lediglich die lichtmikroskopische Auflösungskraft erhöhen wollte. Er konnte das Bild jedoch bis dahin nur fotografisch festhalten und nicht direkt mit den Augen beobachten [Köhler, 1904]. Im Jahr 1910 entwickelte Oskar Heimstädt das erste wirtschaftliche Fluoreszenzmikroskop [Heimstädt, 1911] der Firma Reichert mit Anwendung des kurz zuvor entwickelten Filters für UV-Licht von Hans Lehmann [Lehmann, 1910]. Ab 1965 entwickelte und veröffentlichte der Niederländer Johann Sebastiaan Ploem an der Universität von Amsterdam Arbeiten über dichroitische Strahlteiler zur Anregung von UV-, violetterem, blauem und grünem Licht. Damit konnte in Westeuropa erstmals die Anregung über das Objektiv geleistet und die jeweiligen Interferenzfilter manuell gewechselt werden, um z. B. verstärkte Autofluoreszenz zu verhindern [Gerlach, 2009; Ploem, 1971]. Damit war der wissenschaftliche Grundpfeiler der heute noch verwendeten Fluoreszenzmikroskope gesetzt.

#### 3.3.1 Grundlagen

Eine entscheidende Rolle in der Progression und Entstehung im Rahmen der NAFLD spielen die mikrozirkulatorischen Aspekte und die mikrovaskulären Zell-Zell-Interaktionen (Abb. 2, [Day, 2010]). Ein regelrechtes Zusammenspiel von Zellen der hepatischen sinusoidalen Strukturen ist für die Verhinderung von Leberkrankheiten essentiell, hierzu gehören u. a. die Hepatozyten, die sinusoidalen Endothelzellen und die hepatischen Sternzellen [Tacke und Weiskirchen, 2010].

Im Mittelpunkt dieser Studie stand daher die intravitalmikroskopische Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 8, 12 und 20 Wochen) im NASH-Fibrose-Tumor Modell. Die Mikroskopie an lebendigen Organismen wird als Intravitalmikroskopie bezeichnet (vom lateinischen: *intra vital* - im Leben). Das Fluoreszenzmikroskop ist eine Sonderform des Lichtmikroskops, bei dem die physikalischen Auswirkungen der Emission von Licht durch elektronische Übergänge eine große Rolle spielen. Fluoreszenz ist die Emission von Licht nach Anregung eines Materials. Bei Anregung von fluoreszierenden Stoffen, auch Fluorophore genannt, mit Licht bestimmter Wellenlänge, emittieren diese Licht. Bei Präparaten, die von sich aus selbst fluoreszieren, spricht man von Autofluoreszenz oder Primärfluoreszenz. Dies kann z. B. in Sprossachsen von Samenpflanzen, oder wie im Rahmen dieser Studie gezeigt wird, bei Vitamin A beobachtet werden [Abshagen et al., 2006]. Daneben

lässt sich eine im Versuchsaufbau künstlich erzeugte Fluoreszenz im Präparat durch Verwendung von Fluorochromen (Farbstoffen) abgrenzen, was als sekundäre Fluoreszenz bezeichnet wird. Es können natürliche oder synthetische Farbstoffe verwendet werden. Der Farbstoff muss sich an eine Struktur binden oder sich in einem bestimmten Kompartiment anreichern, um seine gewünschte Wirkung zu erzeugen. Ein Beispiel dafür ist der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid, welcher zum Anfärben von DNA verwendet wird. Er reichert sich in Thymin- und Adenin-reichen Basenpaaren der DNA an, sodass diese stärker sichtbar werden. Durch das abgestrahlte Fluoreszenzlicht von veränderter Wellenlänge wird bei der Fluoreszenzmikroskopie das mikroskopische Bild des selektiven Gewebekompartiments im Präparat erzeugt. Nach Abgabe von Wärme und Licht ist diese Abstrahlung langwelliger, also energieärmer, als das Anregungslicht. Dieser Sachverhalt ist als *Stokesches Gesetz* bekannt. Es gibt unterschiedliche Interferenzfilter, welche nur Licht bestimmter Wellenlängen durchlassen und das Anregungslicht neutralisieren können. In diesen Untersuchungsreihen wurde ein aufrechtes Epifluoreszenzmikroskop verwendet (Abb. 6), welches mit einer charge-coupled device (CCD, ladungsgekoppeltes Bauelement) Video-Kamera (Abb. 7, (3)) und mit einem Video-Rekorder verbunden war. Der Anregungsfilter, Strahlteiler und Emissionsfilter waren zu einem Filterblock zusammengefasst (Abb. 7, (2)). Mit dieser Schaltstelle konnte die IVM für verschiedene Exzitations- und Emissionswellenlängen genutzt werden. Somit war eine simultane Darstellung der hepatischen mikrovaskulären Perfusion, zellulären Interaktionen und immunologischen Reaktionen in der lebendigen Maus im Entstehungs- und Entwicklungsprozess der chronischen Fettlebererkrankung möglich. Die gesamte *in vivo* Analyse der Mikrozirkulation und der Mikrohämodynamik wurde über den Video-Recorder (Abb. 7, (7)) aufgenommen und später offline analysiert [Abshagen, 2008].

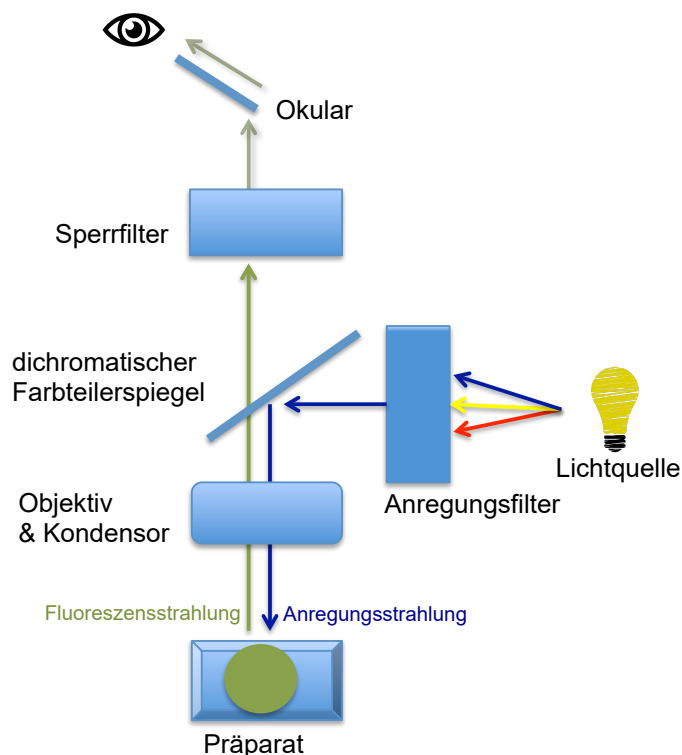


Abbildung 6 Grundsätzlicher Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops, modifiziert nach *Spektrum der Wissenschaft* (2019; <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fluoreszenzmikroskopie/25361>.)

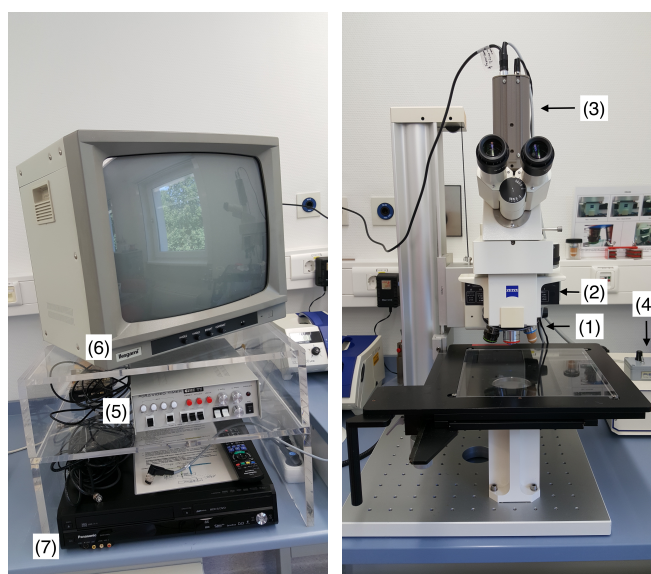
Von der Lichtquelle geht Licht in Richtung Objektiv aus und wird vom Anregungsfilter zu einer bestimmten Wellenlänge, welche das Präparat zur Anregung und somit zur Fluoreszenz benötigt, gefiltert. Die durch den dichromatischen Farbteilerspiegel entstehende Spiegelung des Anregungslichtes zum Objektiv, welches als Kondensator funktioniert, lässt die Fluoreszenz im Präparat entstehen. Die Fluoreszenz geht über Objektiv und Farbteilerspiegel zum Sperrfilter, welcher das restliche vom Präparat reflektierte Anregungslicht eliminiert. Nun ist das vergrößerte Bild auf dem Okular zu sehen und kann beobachtet werden.

### 3.3.2 Technik

Im Rahmen der intravitalmikroskopischen Video-Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende technische Hilfsmittel verwendet:

- Epifluoreszenzmikroskop: Axiotech<sup>®</sup> Vario 100, Carl Zeiss, Oberkochen, D
- Belichtungssteuerung: FluoArc N HBO 103, Carl Zeiss, Oberkochen, D
- Lichtquelle: 100 W Gasentladungslampe mit Quecksilberdampffüllung
- Okulare: Nr. 455043 W-PI 10 x Mikroskop-Okulare, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
- Objektiv für *Detail-Aufnahmen*: Wasser-Immersion Objektiv, Achromat IR, 40 x 0,8 W, Carl Zeiss, Oberkochen, D
- Objektiv für *Übersichtsaufnahmen*: LUC Plan FLN, 20 x 0,45, Olympus GmbH, Hamburg, D

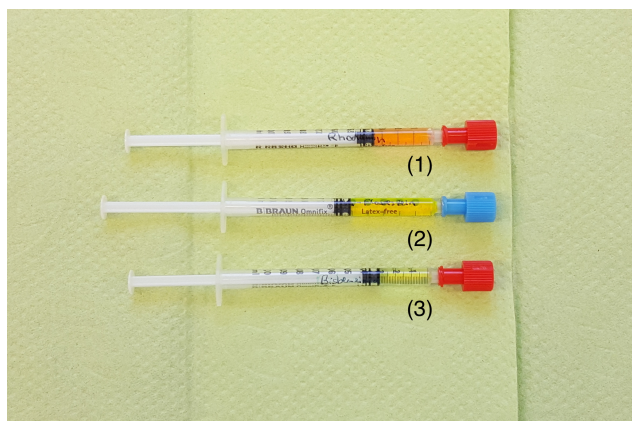
- Reflektorfilter: Filter für UV, violettes, blaues und grünes Anregungslicht, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
- Video-Kamera: Schwarz-Weiß - CCD - Kamera, FK 6990/AIQ, Pieper, Berlin, D
- Video-Rekorder: DMR-EX99V, Panasonic, Wiesbaden, D
- Video-Timer: For.I Video Timer, CINE TV, Berlin, D
- Monitor: PM-J20, Ikegami Electronics GmbH, Neuss, D



**Abbildung 7 Aufbau des aufrechten Epifluoreszenzmikroskops.** Objektiv-Revolver (1), eine Filterschaltstelle mit Filterwürfel für verschiedene Exzitations- und Emissionswellenlängen (2), das Mikroskop mit einer CCD-Kamera (3) sowie eine Steuerung der Belichtungseinheit (4). Die CCD-Kamera ist über einen Video-Timer (5) an den Monitor (6) und den Videorecorder (7) angeschlossen.

### 3.3.3 Bestimmung funktioneller und mikrohämodynamischer Parameter

Unter Verwendung unterschiedlicher Filtersätze im Mikroskop wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern verschiedene Parameter zur Bestimmung der Mikrozirkulation und Hämodynamik bestimmt. Nach der Präparation der V. jugularis und der planen Auslagerung der Leber wurde zuerst mit der intravitalmikroskopischen Darstellung der HSC begonnen. Hierfür nutzt man die Autofluoreszenz des in den HSC gespeicherten Vitamin A nach Anregung mit UV-Licht (330 - 380 nm Wellenlänge) [Abshagen et al., 2006]. Danach erfolgte die intravenöse Injektion von Rhodamin 6G (1  $\mu\text{mol/kg}$ ), Natrium-Fluorescein (2  $\mu\text{mol/kg}$ ), und Bisbenzimid (10  $\mu\text{mol/kg}$ ) in die V. jugularis der Maus.



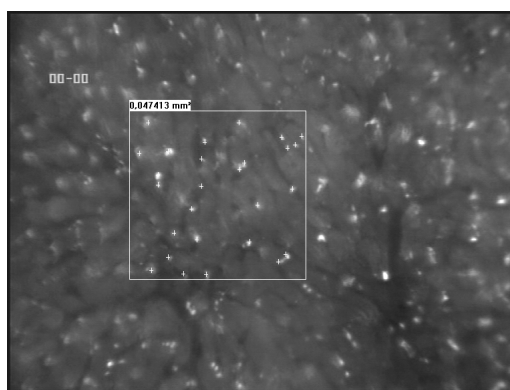
**Abbildung 8** **Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.** Rhodamin 6G zur Leukozytendarstellung (1), Natrium-Fluorescein für die Perfusionsanalyse (2) und Bisbenzimid zur Quantifizierung der hepatozellulären Apoptose (3).

Die direkte Färbung von Leukozyten mittels Rhodamin 6G ( $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ ; Abb. 8, (1)), einem Xanthen-Derivat, wird durch die vom Membranpotenzial abhängige Akkumulation des Farbstoffes in den Mitochondrien der Leukozyten ermöglicht. Unter Verwendung von grünem Auflicht (530 - 560 nm) wurde das venuläre und sinusoidale Leukozytenverhalten analysiert. Natrium-Fluorescein ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ; Abb. 8, (2)) ist ein wasserlösliches Natriumsalz des Xanthen-Farbstoffs Fluorescein, welches auch den Namen Uranin trägt. Nach intravasaler Gabe kommt es durch das fenestrierte Leberendothel zur Diffusion von Na-Fluorescein in den Extravasalraum. Dadurch akkumuliert dieser Farbstoff in den perizentralen Hepatozyten als auch im Zytoplasma. Unter Verwendung von blauem Auflicht (450 - 490 nm) lässt sich dieser Gewebekontrast darstellen, d. h. die Sinusoide werden als dunkle Bereiche und die Hepatozytenstränge als helle Areale dargestellt. Somit kann die Perfusion untersucht werden. Mit Hilfe von Bisbenzimid ( $C_{27}H_{31}Cl_3N_6O$ ; Abb. 8, (3)) wurden unter UV-Epiillumination apoptotische Hepatozyten analysiert, da dieses Fluorochrom DNA anfärbt. Dieser membran-permeable Farbstoff reichert sich in Thymin-Adenin Regionen der DNA-Struktur an. Apoptotische Zellkerne lassen sich so durch eine stärkere Anfärbung des Zellkerns aufgrund von Kondensation und Fragmentation des Chromatins im Vergleich zu gesunden Zellen darstellen. Das computer-assistierte Bildanalyse-Programm Cap-Image (Cap-Image, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) wurde für die quantitative off-line Analyse der Video-Dateien verwendet. Dieses Bildanalyzesystem gehört zu den Standard-Programmen, welche in der Mikrozirkulationsforschung benutzt werden. Die Ergebnisse sind daher vergleichbar mit anderen Studien auf diesem Gebiet. Die verschiedenen Parameter wurden durch Analyse der jeweiligen Videosequenzen und Einzelbilder erhoben. Die Gesamtmikroskopiezeit pro Versuchstier betrug ca. 60 bis 90 Minuten. Die Auswertung aller Videobänder wurde zeitnah off-line am Computer durchgeführt. Insbesondere während der mikroskopischen Untersuchung wurde stets berücksichtigt, die zu mikroskopierende Stelle wiederholt mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung zu umspülen, um eine Gewebebeeinträchtigung durch warmes, anregendes Auflicht zu unterbinden.



### 3.3.3.1 Hepatische Sternzellen

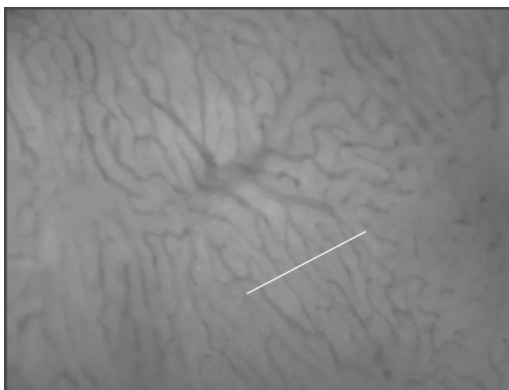
Ein besonderes Merkmal von HSC ist die Speicherung von Vitamin A in Lipidtropfen. HSC lassen sich nach UV-Epiillumination als helle Spots durch dessen Vitamin A-Autofluoreszenz darstellen (Abb. 9). Da die Autofluoreszenz nach längerer Anregung mit UV-Licht mit der Zeit abnimmt, war hier besondere Sorgfalt und zügiges Arbeiten vonnöten. Für die quantitative Analyse der HSC wurden jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (GF) für ungefähr 15 s untersucht. Es wurde die Anzahl an hellen Spots in einer zufällig ausgewählten Fläche gezählt und als  $n/\text{mm}^2$  angegeben. Es wurde darauf geachtet, annähernd gleich große Areale zu analysieren.



*Abbildung 9* **Detektion der hepatischen Sternzellen.** Nach UV-Anregung zeigen sich helle Spots, welche besonders im Bereich der Gefäßwände nahe der Endothelzellen lokalisiert sind - dies sind Vitamin A-autofluoreszierende HSC. In zufällig ausgewählten, gleich großen Flächen wurden die HSC gezählt und danach ins Verhältnis zur Fläche gesetzt.

### 3.3.3.2 Sinusoidale Perfusion

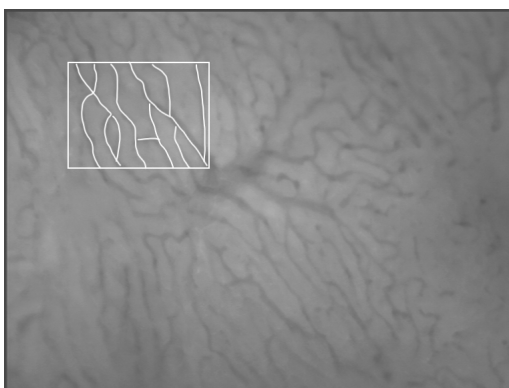
Als eines der größten sinusoidalen Gefäßnetzwerke im menschlichen Körper sind die hepatischen Sinusoide dafür zuständig, Blutdruckschwankungen innerhalb der Leber auszugleichen und für einen ungestörten Blutfluss im hepatischen Gefäßbett zu sorgen [Crawford, 2010]. Mittels blauem Auflicht und dem Fluorochrom Natrium-Fluorescein konnte der Gewebekontrast verstärkt und die vaskulären Strukturen besser von der Umgebung differenziert werden. Für die Beurteilung der sinusoidalen Perfusion wurden jeweils mindestens 10 midzonale GF für 25 s untersucht. Bei der off-line Analyse wurde in einem statischen Bild manuell eine 200  $\mu\text{m}$  lange Linie midzonal im rechten Winkel über den Verlauf zufällig ausgewählter Kapillaren gezogen (Abb. 10). Nun wurde mittels der Video-Aufnahme circa 25 s objektiviert, wieviele von den Sinusoiden, welche die Linie überqueren, perfundiert bzw. nicht perfundiert waren. Es wurde daraus die Anzahl der perfundierten Gefäße von den insgesamt analysierten Gefäßen in % berechnet.



*Abbildung 10* **Bestimmung der sinusoidalen Perfusion.** Nach Natrium-Fluorescein Gabe wurde der Gewebekontrast unter blauem Auflicht verstärkt. Durch manuelles Ziehen einer 200  $\mu\text{m}$  langen Linie horizontal zu den Gefäßverläufen konnte der Anteil perfundierter zu gesamt gesehener sinusoidaler GefäÙe entlang der Linie bestimmt werden.

### 3.3.3.3 Sinusoidale Dichte

In den gleichen midzonalen GF wurde die sinusoidale Dichte bestimmt. Dabei wurden die Sinusoi-  
de in einer definierten Fläche mit Hilfe des oben beschriebenen Auswertungsprogramms manuell  
nachgezeichnet (Abb. 11) und automatisch daraus die sinusoidale Dichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  berechnet.



*Abbildung 11* **Bestimmung der sinusoidalen Dichte.** In einer für das midzonale GF repräsentativen definierten Fläche wurden die nach Kontrastverstärkung mit Natrium-Fluorescein sichtbaren Gefäßverläufe nachgezeichnet und daraus die sinusoidale Dichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  berechnet.

### 3.3.3.4 Gefäßdurchmesser

Von jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählten Venolen und Sinusoiden wurde der Durchmesser in  $\mu\text{m}$  gemessen. Pro GF wurden mehrere Durchmesser bestimmt und ein Mittelwert gebildet. Der Durchmesser wurde automatisch durch Zeichnen einer quer zum Gefäß verlaufenden Linie mit Einschluss der Gefäßränder bestimmt (Abb. 12). Unter Nutzung der unterschiedlichen Kontrastierung von Gefäß und Extravasalraum bestimmte das Bildanalyse-Programm durch Zeichnen weiterer Linien einen Durchmesserwert für das jeweilige Gefäß.



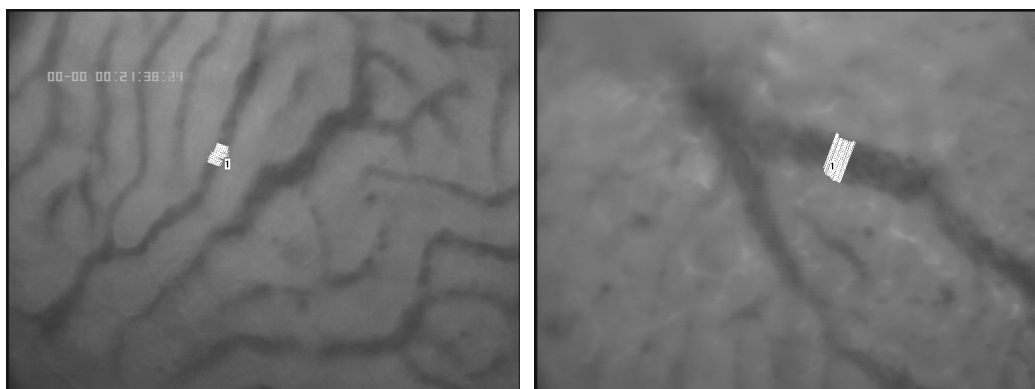
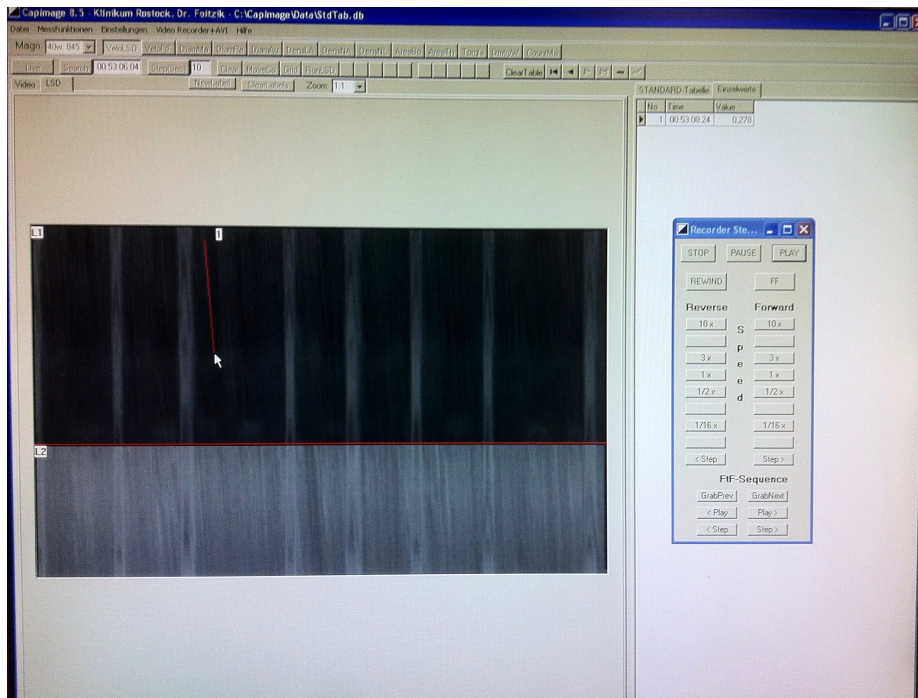


Abbildung 12 **Bestimmung des Gefäßdurchmessers.** Durch Zeichnen einer Linie quer zum Gefäß wurde vom Programm der mittlere Durchmesser durch Erstellung weiterer Linien automatisch bestimmt. Links: Sinusoide, 20-fache Vergrößerung. Rechts: Venolen, 40-fache Vergrößerung.

### 3.3.3.5 Mikrohämodynamik

#### Blutfließgeschwindigkeit

Mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode (LSD-Methode), einer halbautomatischen Geschwindigkeitsmessmethode von Cap-Image, wurde die Blutfließgeschwindigkeit  $v_{RBC}$  (velocity of red blood cells, z. Dt. Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutzellen) in  $\mu\text{m/s}$  sowohl in den Sinusoiden als auch in den Venolen bestimmt. Für diesen Zweck wurde für etwa 30 s der sinusoidale und venuläre Blutfluss in jeweils mindestens 10 verschiedenen GF aufgenommen. Für die off-line Analyse mittels LSD-Methode wurden mehrere der Gefäßwand parallel liegende Messlinien in das Intravasallumen gezeichnet. Nun wurde die Messung der LSD-Methode gestartet und das mit dem Programm verbundene aufgenommene Videomaterial ebenfalls für 10 s abgespielt. Im Rahmen der Messung werden verschiedene Grauwerte innerhalb des Gefäßlumens erfasst und dadurch ein sog. Line-Shift-Diagramm erzeugt. Für jede ins Gefäß gezeichnete Messlinie gibt das Programm einen Streifen aus, in welchem die Grauwerte entlang der Linie in einem x-y-Diagramm ( $x=\text{Zeit}$ ,  $y=\text{Länge der jeweiligen Messlinie}$ ) dargestellt werden (Abb. 13). Jede sichtbare Zelle, die sich entlang der Messlinie in der Messung bewegt, sorgt für eine schräge weiße Linie im Diagramm. Aus der Steigung der verschiedenen ausgewählten Linien kann das Programm die Geschwindigkeit berechnen. Nun wurden diese Messwerte gemittelt und anschließend in  $\mu\text{m/s}$  bestimmt. Diese Analyse wurde für Venolen und Sinusoide identisch durchgeführt.



**Abbildung 13 Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit.** Mit Hilfe der LSD-Methode konnte die vRBC bestimmt werden. Es wurden dem Gefäß parallel liegende Messlinien gezeichnet und die Messung gestartet. Daraufhin öffnete sich ein Diagramm-Fenster, hier ist x die Zeit und y die Länge der Messlinien. Im Rahmen der Messung werden verschiedene Grauwerte erfasst. Eine schräge Linie ist ein Zeichen für eine Zelle, welche sich entlang der Messlinie in der Aufnahme bewegt hat. Diese Linien können mit dem Mauszeiger ausgewählt werden und anhand der Steigung berechnet das Programm die Geschwindigkeit.

### Volumetrischer Blutfluss und Scherstress

Die an der Innenseite der Gefäßwände lokalisierten Endothelzellen sind fähig, Veränderungen der Wandspannungen und der Scherkräfte durch z. B. Blutdruckänderungen zu registrieren. Dementsprechend können mikrohämodynamische Prozesse wie die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) über die Aktivierung der endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) eingeleitet werden, um bei Blutdruckschwankungen gegenzuregulieren [Sriram et al., 2016]. Durch strömungsbedingte Scherkräfte, welche auf Gefäßwände einwirken, kann also bei intakter Endothelzellfunktion der Gefäßdurchmesser verändert werden.

Der volumetrische Blutfluss  $VQ$  (sinusoidal und venulär, Formel (3.1)) und der Scherstress  $\tau$  (sinusoidal und venulär, Formel (3.2)) wurden aus der vRBC und dem Gefäß-Radius ( $r$ ) bestimmt.

$$VQ = vRBC * \pi * r^2 \quad (3.1)$$

$$\tau = \frac{4 * n * VQ}{\pi * r^3} \quad (3.2)$$

### 3.3.3.6 Inflammation

#### Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Zur Beurteilung der venulären Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählte GF für ungefähr 40 s aufgenommen. Freifließende, rollende und adhärenente Leukozyten wurden durch Anfärbung mit Rhodamin 6G in einer Videosequenz von ca. 20 s in der jeweiligen postsinusoidalen Venole manuell gezählt (Abb. 14). Durch Verwendung des Grünfilters differenzierten sich deutlich sichtbare weißlich gefärbte Zellen. Als rollende Leukozyten wurden die Zellen definiert, die sich mit einer deutlich geringeren Fließgeschwindigkeit im Vergleich zu anderen Zellen in der Gefäßmitte von postsinusoidalen Venolen fortbewegten [Vollmar et al., 2002]. Sie bewegen sich langsam am Gefäßendothel fort und können so sukzessive mit den Endothelzellen in Kontakt treten. Die rollenden Leukozyten wurden als Anteil der gesamt-gesehenen Leukozyten in % angegeben. Freifließende Leukozyten waren alle anderen mobilen Leukozyten, die keinen Kontakt zum Endothel zeigten und eine stetige Fließgeschwindigkeit zeigten. Leukozyten, welche immobil am sinusoidalen und venulären Endothel für mehr als 15 s hafteten, wurden als adhärenente Leukozyten definiert. Die adhärenente Leukozyten wurden durch zusätzliche Erfassung der Länge und des Durchmessers der Venole als Anzahl pro Fläche ( $n/mm^2$ ) angegeben. Es wurden alle frei passierenden und rollenden Leukozyten, welche einen definierten Gefäßbereich im Zeitraum von 20 s überquerten, eingeschlossen.



**Abbildung 14 Detektion der venulären Leukozyten.** Mit Hilfe von Videosequenzen wurden jeweils in einem Zeitraum von 20 s freifließende, rollende und adhärenente Leukozyten (weiße Kreise) nach Anfärbung mit Rhodamin 6G in einer Venole manuell gezählt.

#### Sinusoidale Leukozytenstase

Für die Ermittlung der sinusoidalen Leukozytenstase, d. h. Leukozyten, welche in den Sinusoiden adhärenieren, wurden im Grünfilter jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählte midzonale GF für ungefähr 15 s aufgenommen. Es erfolgte eine manuelle Auszählung der Anzahl von weißen Leukozyten, welche innerhalb einer bestimmten Fläche ( $n/mm^2$ ) in den Sinusoiden adhärenierten (Abb. 15).

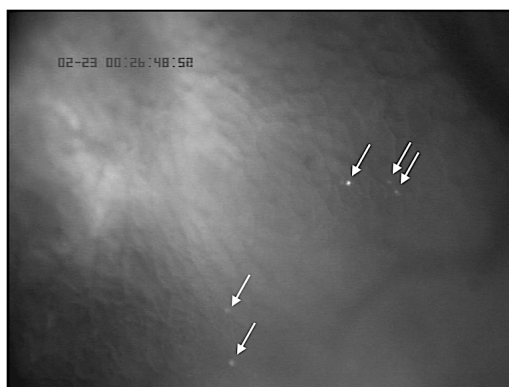


Abbildung 15 **Detektion der sinusoidalen Leukozyten.** Nach Anfärbung mit Rhodamin 6G und unter Verwendung von grünem Auflicht wurden die GF für 15 s beobachtet, die Anzahl an gesehenen sinusoidalen Leukozyten (weiße Pfeile) gezählt und in  $n/mm^2$  angegeben.

### 3.3.3.7 Hepatozelluläre Apoptose

Apoptose ist die kontrollierte Selbsterstörung von Zellen (programmierter Zelltod), wobei normalerweise keine Nekrose oder Inflammation beobachtet wird. Es kommt u. a. zur Zellkernkondensation, Schrumpfung der Zelle und Fragmentierung der DNA. Um das Ausmaß der hepatischen Apoptose zu bestimmen, wurden jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählte GF unter UV-Epiillumination für ungefähr 15 s aufgenommen. Unter Verwendung des DNA-Farbstoffes Bisbenzimid (Abb. 8, (3)) zeigten die apoptotischen Zellkerne aufgrund des kondensierten Chromatins ein stärkeres Fluoreszenzverhalten als gesunde Zellkerne. Es ließen sich helle Spots im Bereich der Leberepithelzellen detektieren, welche manuell ausgezählt werden konnten (Abb. 16). Im Anschluss wurde die Anzahl apoptotischer Zellen des GF im Verhältnis zur Fläche in  $n/mm^2$  bestimmt. Um die Daten vergleichbar zu gestalten, wurden erneut annähernd gleiche Areale verwendet.

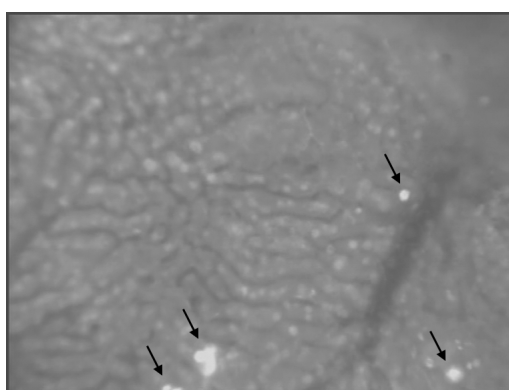


Abbildung 16 **Detektion von apoptotischen Hepatozyten.** Apoptotische Hepatozyten zeigten nach Anfärbung mit Bisbenzimid aufgrund der Zellkernkondensation ein stärkeres Fluoreszenzverhalten (schwarze Pfeile) als gesunde Zellkerne unter UV-Epiillumination. Die hellen Spots wurden ins Verhältnis zur Fläche gesetzt und als  $n/mm^2$  angegeben.

### 3.4 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde wöchentlich und zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchung dokumentiert. Zusätzlich wurde *post mortem* das Lebergewicht bestimmt und der Leber-/Körpergewichts-Index berechnet.

### 3.5 Blutzucker

Die Blutzucker-Werte jeder Maus wurden wöchentlich mit Hilfe des Contour Blut-Glucose-Messgerätes (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) nach farbbrikinterner Anweisung mit einem Tropfen Blut aus der Schwanz-Vene bestimmt.

### 3.6 Finale Blut- und Gewebeentnahme

Im Anschluss an die IVM erfolgte eine Blutentnahme von ca. 500  $\mu$ l aus der V. jugularis. Anschließend wurde das Tier durch eine Überdosis Ketamin und mittels cervikaler Dislokation euthanasiert. Nach 10-minütiger Zentrifugierung bei 3.000 Umdrehungen pro Minute wurde das Blutplasma vom Sediment getrennt. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -20 °C gelagert. Als Marker für den Leberschaden wurde die Aktivität der Enzyme ALT, AST und GLDH im Blutplasma bestimmt. Die Messung der Aktivitäten von ALT, AST und GLDH im Plasma erfolgte spektrophotometrisch nach Bergmeyer et al. unter Verwendung des cobas c111 analyzers und den entsprechenden Reagenzien (Roche, Mannheim, Deutschland) [Bergmeyer et al., 1978]. Nach der Blutentnahme wurde die Leber entnommen und für die histologische Nachbearbeitung anderer Studien in Formalin fixiert.

### 3.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden alle gesammelten Daten in Excel-Tabellen (Microsoft Corporation, Washington, USA) eingetragen. Für die statistische Analyse wurde für jede Gruppe pro Zeitpunkt der Mittelwert und der standard error of the mean (SEM) - bei normalverteilten Datensätzen - bzw. der Median, bei nicht normalverteilten Daten angegeben. In normalverteilten Datensätzen mit mehr als 9 Datenpunkten, wurden Ausreißer mittels Grubbs Test identifiziert und ausgeschlossen, falls die Signifikanz  $p < 0,05$  betrug. Statistische Analysen wurden mit SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Die Software SigmaPlot 12.0 und GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) dienten der graphischen Darstellungen der Ergebnisse. Nach der Testung auf Normalverteilung, wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe von "one-way ANOVA" bestimmt, gefolgt vom dazugehörigen *post hoc* Test. Falls die Daten nicht-normalverteilt waren, wurde "one-way ANOVA on Ranks" durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

Auf den folgenden Abbildungen sind die entsprechenden Parameter für die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) bzw. für die STZ/HFD-behandelten Versuchstiere zu den Untersuchungszeitpunkten 6, 8, 12 und 20 Wochen dargestellt.

### 4.1 Allgemeinzustand, Gewicht und Blutzucker

Der Allgemeinzustand der Mäuse wurde täglich kontrolliert. Bis zu einem Alter von 12 Wochen zeigten nahezu alle STZ/HFD-behandelten Mäuse ein normales Putz- und Fluchtverhalten. Ab der 12. Woche verschlechterte sich bei der überwiegenden Anzahl der Versuchstiere der Allgemeinzustand, was sich in einem verringerten Flucht- sowie mangelndem Putzverhalten widerspiegelte. Im Endstadium der Lebererkrankung nahmen einige Mäuse stark an Gewicht ab und zeigten eine deutlich verminderte allgemeine Agilität. Insbesondere im Alter von 16 bis 19 Wochen sind Versuchstiere vermehrt frühzeitig verstorben oder mussten unter Einhaltung der Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen, sprich euthanasiert werden. Insgesamt wurden in dieser Studie 107 Mäuse mit STZ/HFD behandelt, wovon 65 Tiere mittels IVM untersucht wurden. Im Verlauf sind 26 Versuchstiere bereits vor der finalen Mikroskopie verstorben, was eine Mortalitätsrate von 28,57 % ergibt. Das Körpergewicht von STZ/HFD-behandelten Mäusen stieg im Verlauf der 20 Wochen langsam fortlaufend an (Abb. 17). Die Behandlung der Mäuse mit STZ/HFD führte im gesamten Beobachtungszeitraum durchweg zu erhöhten Blutzucker-Werten bis zu 26 mmol/L (Abb. 18). 16 Mäuse mit normaler Glukosekonzentration im Blut nach initialer STZ-Injektion wurden von der Studie ausgeschlossen; diese wurden als "STZ-Versager" definiert.

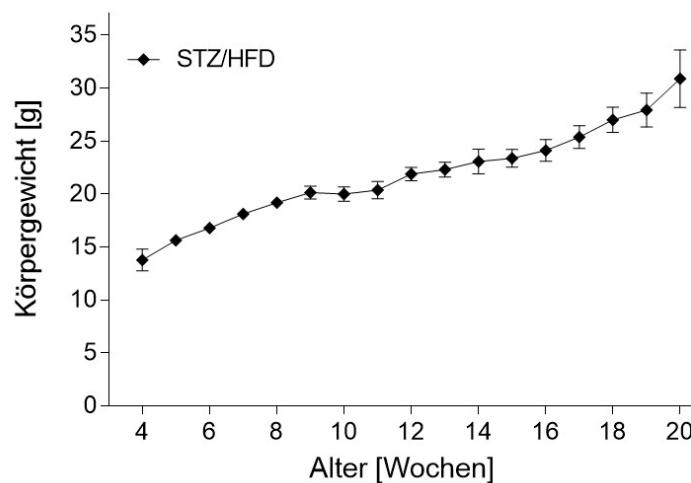


Abbildung 17 **Gewichtsverlauf der STZ/HFD-behandelten Tiere über 20 Wochen.** Die Mäuse nahmen langsam, aber stetig an Gewicht zu, von ca. 14 g im Alter von 4 Wochen auf bis zu ca. 30 g im Alter von 20 Wochen. MW $\pm$ SEM; n=10-25 pro Zeitpunkt

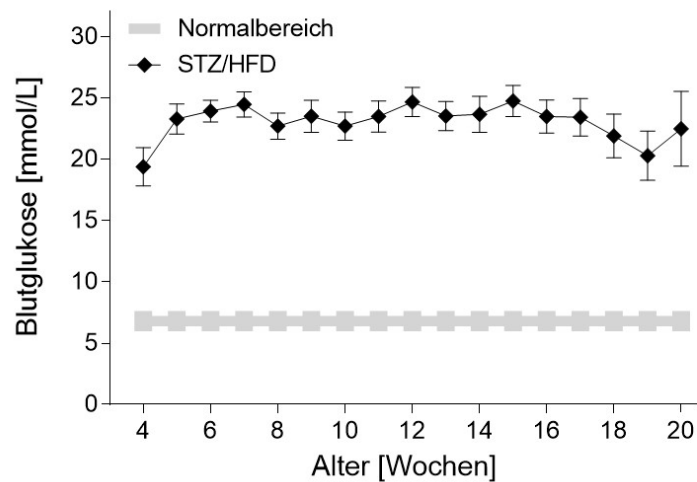


Abbildung 18 **Blutzuckerungsverlauf von STZ/HFD-behandelten Mäusen (schwarz)**. Die graue Linie repräsentiert den Bereich der Blutglukose-Spiegel gesunder Mäuse [Berglund et al., 2008]. MW $\pm$ SEM; n=10-25 pro Zeitpunkt

## 4.2 Leberschaden

**Leber-/Körpergewichts-Index.** Infolge von Fetteinlagerungen und Tumorbildung kann es zu einer Vergrößerung der Leber kommen. Als Maß für die Ausprägung der Leberschädigung wurde der Leber-/Körpergewichts-Index bestimmt. In STZ/HFD-behandelten Tieren stieg das Lebergewicht disproportional zum Körpergewicht an, was zu einem kontinuierlichen Anstieg des Leber-/Körpergewichts-Index über die Zeit führte. So stieg der Leber-/Körpergewichts-Index von 4 % in der Kontrollgruppe auf bis zu 10 % in 20-Wochen alten STZ/HFD-behandelten Mäusen signifikant an (Abb. 19).

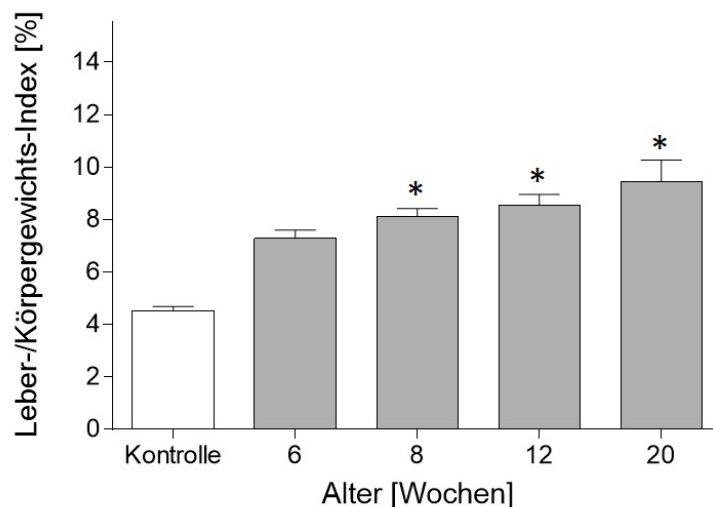
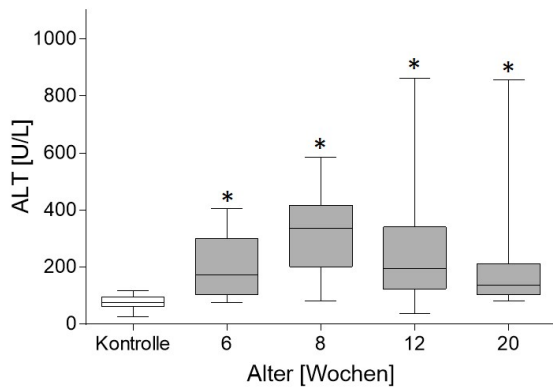
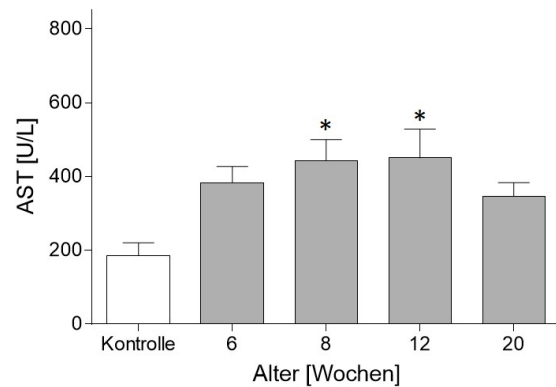


Abbildung 19 **Bestimmung des Leber-/Körpergewichts-Index**. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Leber-/Körpergewichts-Index auf bis zu 10 % in 20-Wochen alten STZ/HFD-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. MW $\pm$ SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=10-16 pro Zeitpunkt

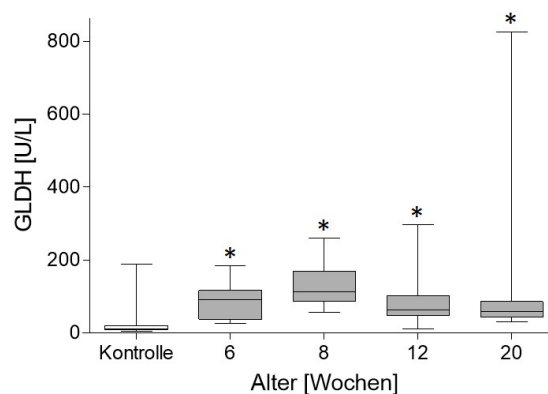
**Leberenzyme.** Als weitere Marker für den Leberschaden wurde die Aktivität der Enzyme ALT, AST und GLDH im Blutplasma bestimmt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum waren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe in den STZ/HFD-behandelten Mäusen die Aktivitäten der Leberenzyme ALT (Abb. 20 (a)) sowie GLDH (Abb. 20 (c)) signifikant erhöht. Im Alter von 8 Wochen war ein Maximum erkennbar, danach sanken die Werte aufgrund eines hepatischen Gewebeuntergangs wieder etwas. Für das Leberenzym AST (Abb. 20 (b)) war ebenfalls ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, wobei im Alter von 12 Wochen die höchsten Werte auftraten und diese nach 20 Wochen wieder leicht abfielen.



(a) Alanin-Aminotransferase-Aktivität



(b) Aspartat-Aminotransferase-Aktivität



(c) Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität

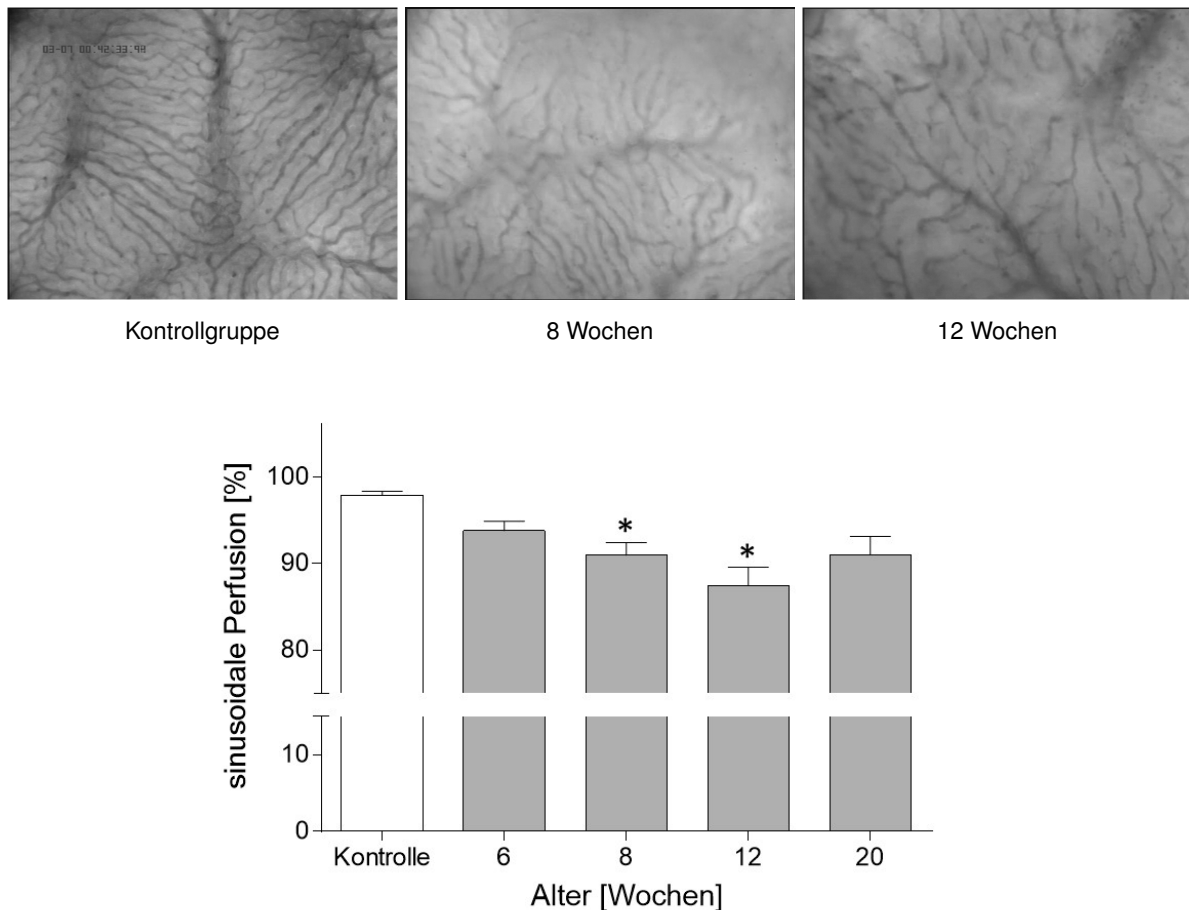
**Abbildung 20 Aktivitäten der Leberenzyme im Plasma.** Zum Vergleich der STZ/HFD-behandelten Mäuse diente eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die Aktivitäten der Leberenzyme zeigten im 8 Wochen Stadium (ALT und GLDH) bzw. 12-Wochen Stadium (AST) die höchsten Werte. MW±SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=7-16 pro Zeitpunkt



### 4.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

#### 4.3.1 Hepatische Mikrozirkulation und Mikrohämodynamik

**Sinusoidale Perfusion und Dichte** Durch Fetteinlagerungen und den Umbau der EZM zeichnete sich die hepatische Mikrovaskulatur bei STZ/HFD-behandelten Mäusen durch eine eingeschränkte nutritive Durchblutung mit einer großen Anzahl von nicht-durchbluteten Sinusoiden aus. Die sinusoidale Perfusion nahm signifikant von nahezu 100 % in der Kontrollgruppe auf bis zu 93 % im 8-Wochen Stadium bzw. bis zu 89 % im 12-Wochen Stadium ab (Abb. 21). In Ergänzung zu diesen Veränderungen konnten in den späteren Erkrankungsstadien stark obstruierte Gefäße beobachtet werden. Es kam zu einem partiellen Verlust der sinusoidalen Strukturen (Abb. 21, 12 Wochen IVM-Aufnahme). Das Parenchym zeigte sich im weiteren Verlauf deutlich minderperfundiert.

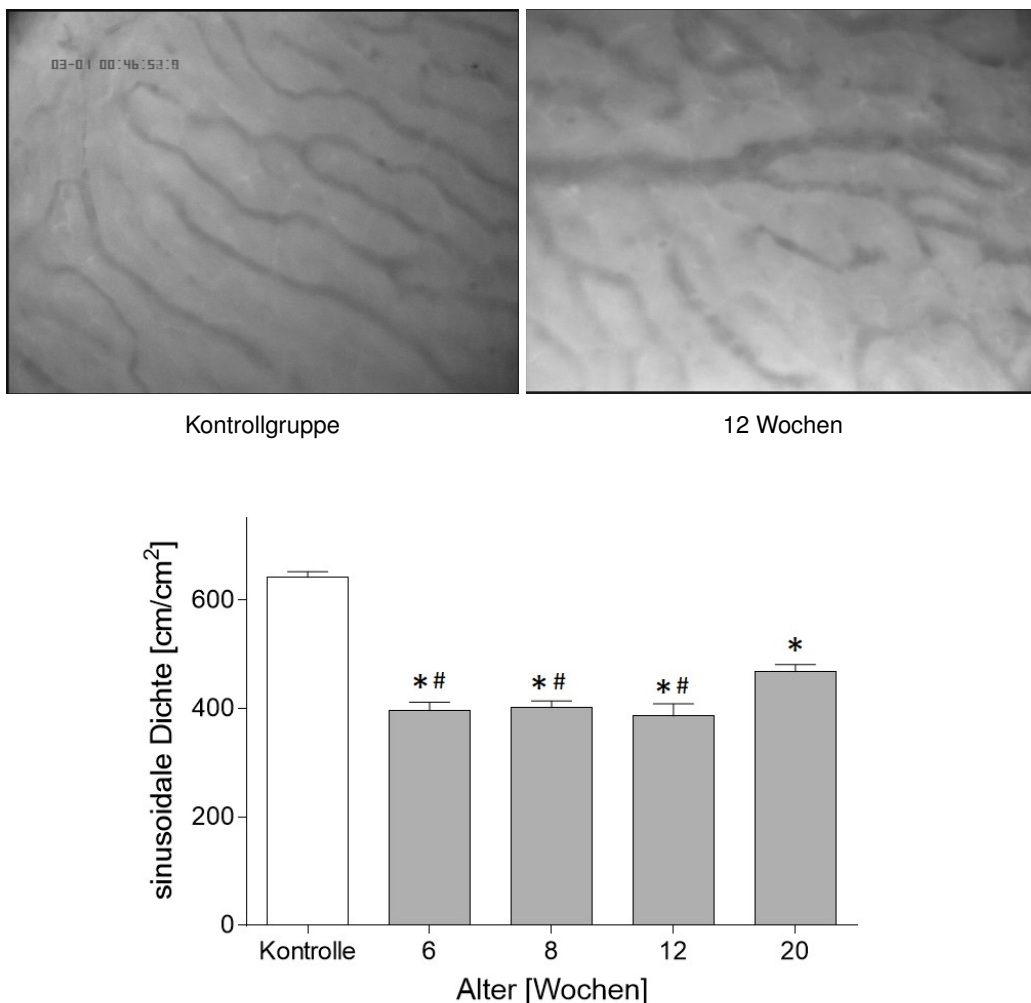


**Abbildung 21** Quantitative Analyse der nutritiven sinusoidalen Perfusion sowie repräsentative IVM-Aufnahmen (20-fache Vergrößerung). Nach i.v. Injektion von Natrium-Fluorescein konnte mittels blauem Auflicht die sinusoidale Perfusion analysiert werden. MW $\pm$ SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=10-12 pro Zeitpunkt

Gleichzeitig war die morphologische Dichte der Sinusoide im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollmäusen zu allen Zeitpunkten in den STZ/HFD-Tieren signifikant reduziert (Abb. 22). In

Korrelation zum Ausprägungsgrad der Krankheit ging die normale Gefäßarchitektur mit parallel angeordneten Sinusoiden mehr und mehr verloren und es bildete sich ein uneinheitliches und verzerrtes sinusoidales Netzwerk.

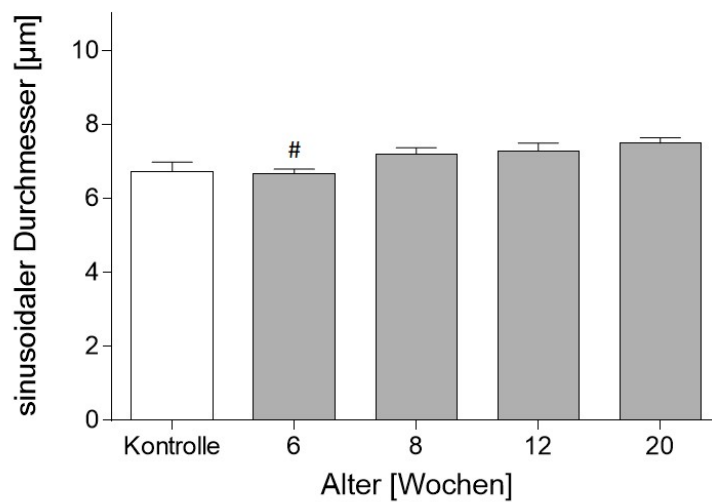
Insbesondere im Tumor-Stadium war eine Vielzahl oberflächlicher Gefäße und stark vaskularisierter Zonen auffallend, wodurch hier eine insgesamt höhere sinusoidale Dichte im Vergleich zu den anderen Erkrankungsstadien resultierte (Abb. 22, 20 Wochen).



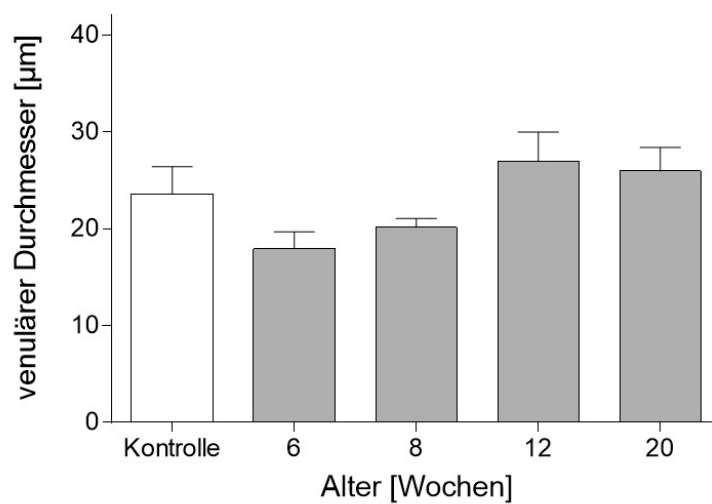
**Abbildung 22 Quantitative Analyse der sinusoidalen Dichte sowie repräsentative IVM-Aufnahmen (40-fache Vergrößerung).** Nach i.v. Injektion von Natrium-Fluorescein konnte mittels blauem Auflicht die sinusoidale Dichte ermittelt werden. Es zeigte sich zu allen Zeitpunkten nach STZ/HFD-Behandlung eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Dichte. MW±SEM; One Way ANOVA, \*p<0,0001 vs. Kontrolle; #p<0,05 vs. 20 Wochen; n=10-12 pro Zeitpunkt

**Gefäßdurchmesser** Der Gefäßdurchmesser diente als objektiver Messwert für die Fähigkeit den intrahepatischen Blutfluss konstant zu halten. Es wurde eine minimale Zunahme der sinusoidalen Durchmesser über den gesamten Zeitraum beobachtet (Abb. 23, (a)). Im Gegensatz dazu verringerte sich in 6 bzw. 8 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen der venuläre Durchmesser leicht, während dieser jedoch im weiteren Verlauf der Erkrankung wieder auf Kontrollwerte anstieg (Abb.

23, (b)).



(a) Sinusoidaler Durchmesser

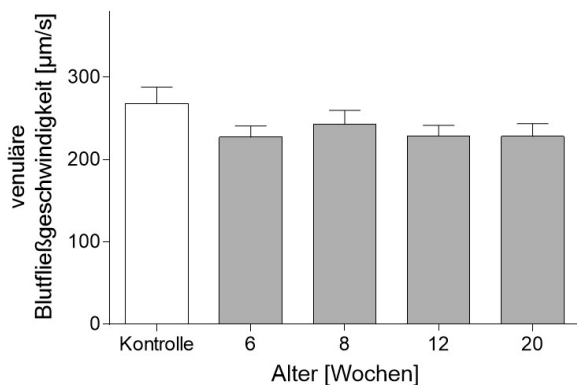


(b) Venulärer Durchmesser

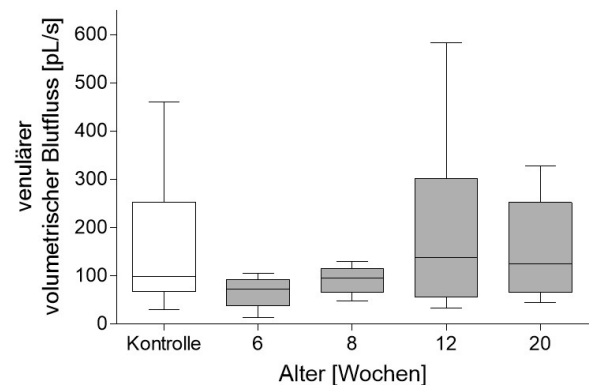
**Abbildung 23 Quantitative Analyse sinusoidaler und venulärer Gefäßdurchmesser.** Durch den Fluoreszenzfarbstoff Natrium-Fluorescein vergrößerte sich der Gewebe-Kontrast und es konnten die verschiedenen Gefäßdurchmesser bestimmt werden.  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ; One Way ANOVA, # $p < 0,05$  vs. 20 Wochen;  $n = 10-12$  pro Zeitpunkt

**Mikrohämodynamik** Sowohl bei der Analyse der venulären als auch der sinusoidalen Mikrohämodynamik wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

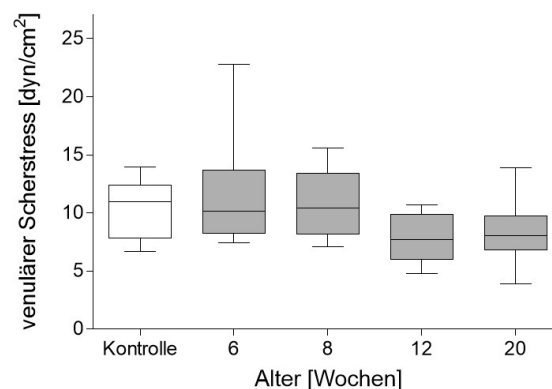
In den Venolen kam es zu nur marginal verringerten Blutfließgeschwindigkeiten während der Progression der NAFLD im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 24, (a)). Der volumetrische Blutfluss zeigte sich generell mit hohen Varianzen und geringen Unterschieden zwischen den Gruppen (Abb. 24, (b)). Die Berechnung des venulären Scherstress ergab eine leichte Verringerung im 12- bzw. 20-Wochen-Stadium im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (Abb. 24, (c)).



(a) Venuläre Blutfließgeschwindigkeit



(b) Venulärer volumetrischer Blutfluss

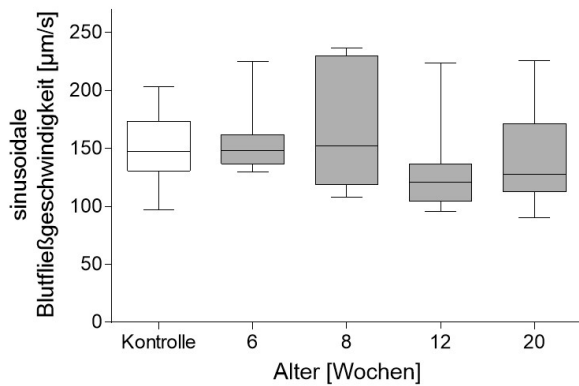


(c) Venulärer Scherstress

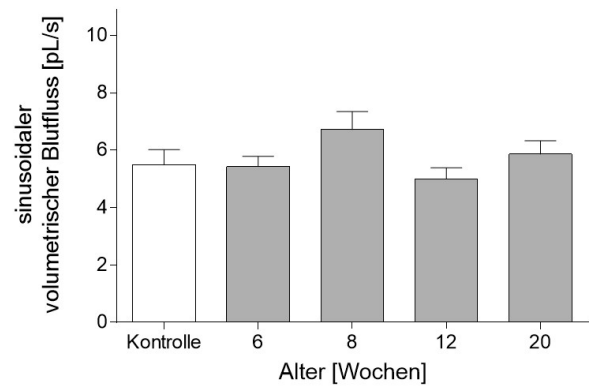
**Abbildung 24 Quantitative Analysen der venulären Mikrohämodynamik.** Mit Hilfe der LSD-Methode wurde die Blutfließgeschwindigkeit sowohl in Sinusoiden als auch in postsinusoidalen Venolen bestimmt. Die Werte des volumetrischen Blutflusses und des Scherstress errechneten sich u. a. aus der Blutfließgeschwindigkeit und dem Gefäßradius. MW $\pm$ SEM; n=10-12 pro Zeitpunkt

In den Sinusoiden zeigte sich ein ähnliches Bild mit schwankenden Werten, aber dennoch nicht signifikanten Veränderungen während des Progresses der NAFLD. So waren die Blutfließgeschwindigkeiten in den Sinusoiden der 12 und 20 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen im Vergleich zu gesunden Tieren leicht reduziert (Abb. 25, (a)) und der volumetrische Blutfluss in 8 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren leicht erhöht (Abb. 25, (b)). Des

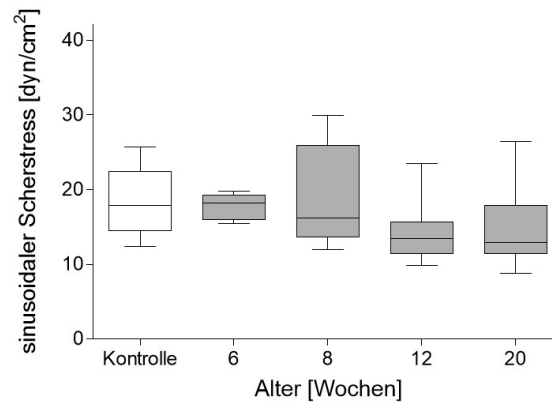
Weiteren zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine zunehmende Verringerung des Scherstresses in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Abb. 25, (c)).



(a) Sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit



(b) Sinusoidaler volumetrischer Blutfluss

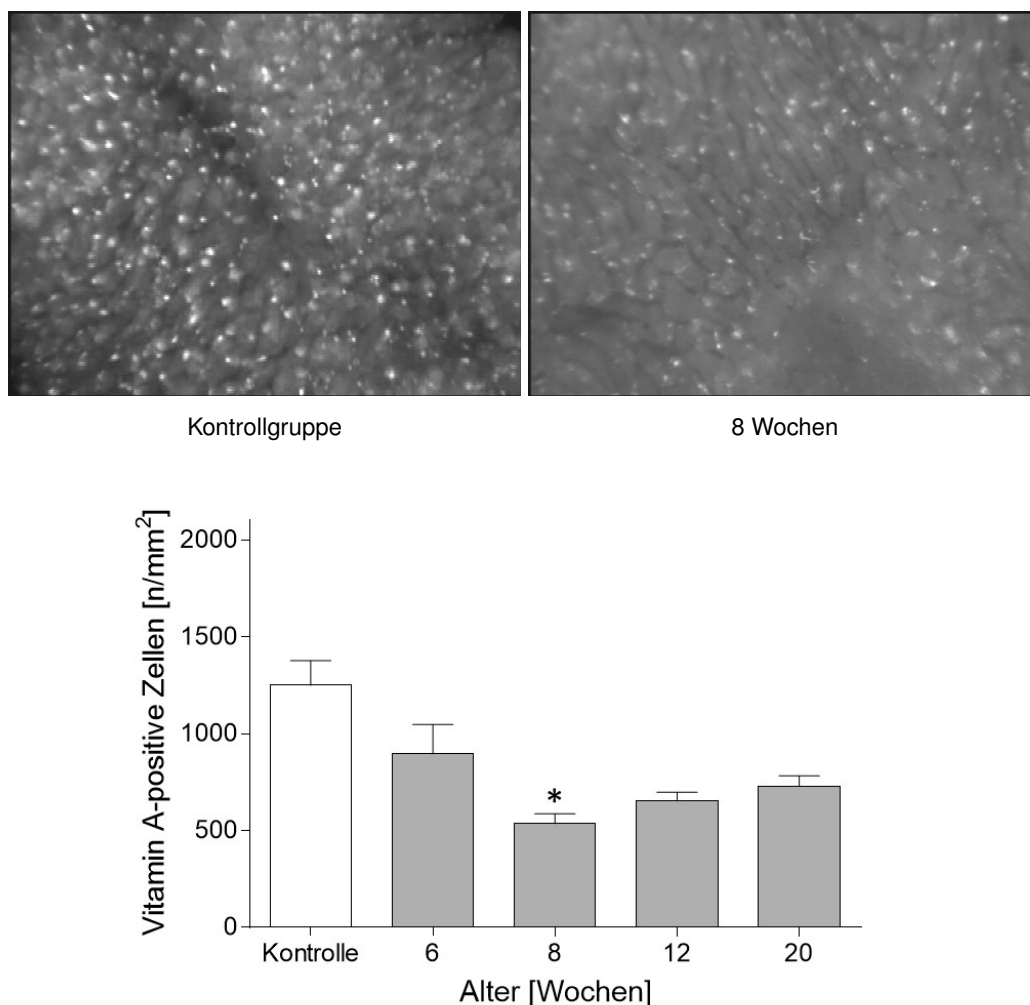


(c) Sinusoidaler Scherstress

**Abbildung 25 Quantitative Analyse der sinusoidalen Mikrohämodynamik.** Mit Hilfe der LSD-Methode wurde die Blutfließgeschwindigkeit sowohl in Sinusoiden als auch in postsinusoidalen Venolen bestimmt. Die Werte des volumetrischen Blutflusses und des Scherstresses errechneten sich u. a. aus der Blutfließgeschwindigkeit und dem Gefäßradius.  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ;  $n=10-12$  pro Zeitpunkt.

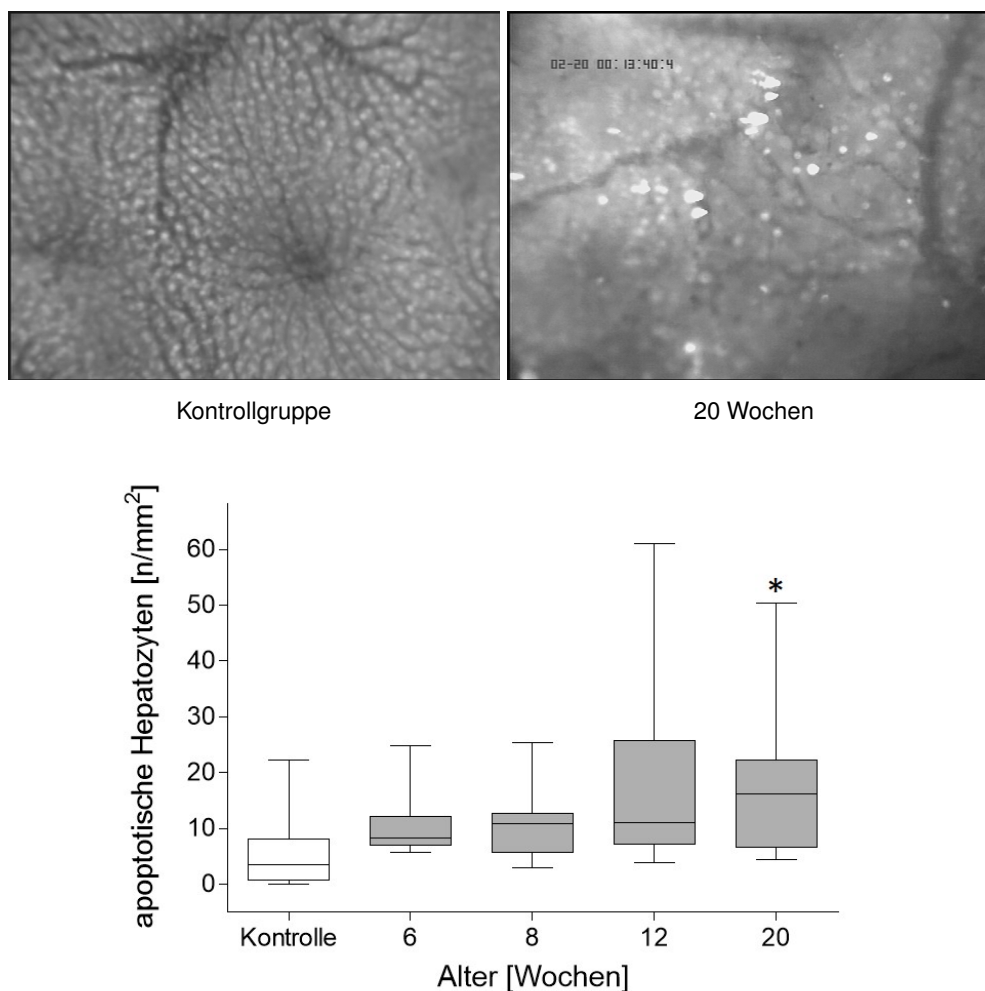
### 4.3.2 Fibrose

**Hepatische Sternzellen** Durch permanente Aktivierung der HSC im Rahmen der Lebererkrankung und deren Umwandlung in profibrogene Myofibroblasten kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten zum Verlust der Vitamin A-Autofluoreszenz in HSC (Abb. 26) mit einer signifikant reduzierten Anzahl Vitamin-A-positiver Zellen in 8 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen.



**Abbildung 26 Quantitative Analyse Vitamin A-positiver Zellen sowie repräsentative IVM-Aufnahmen (20-fache Vergrößerung).** Mit Hilfe des UV-Auflichtes konnten die hepatische Sternzellen aufgrund ihrer Vitamin A-Autofluoreszenz als weiße Spots detektiert werden. Durch die STZ/HFD-Behandlung zeigte sich im Alter von 8 Wochen eine signifikante Reduktion Vitamin A-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle. MW±SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=11-13 pro Zeitpunkt

**Hepatozelluläre Apoptose** Als Folge einer massiven irreversiblen Leberfibrose oder auch im Rahmen einer progressiven NASH können hepatische Zellen im Rahmen einer Apoptose in die gezielte Selbstelimination übergehen. Es zeigte sich zu allen Zeitpunkten nach STZ/HFD-Behandlung eine progrediente Zunahme der mit Bisbenzimid gefärbten Zellkompartimente. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollmäusen war in 20 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen die Anzahl apoptotischer Hepatozyten signifikant erhöht (Abb. 27).

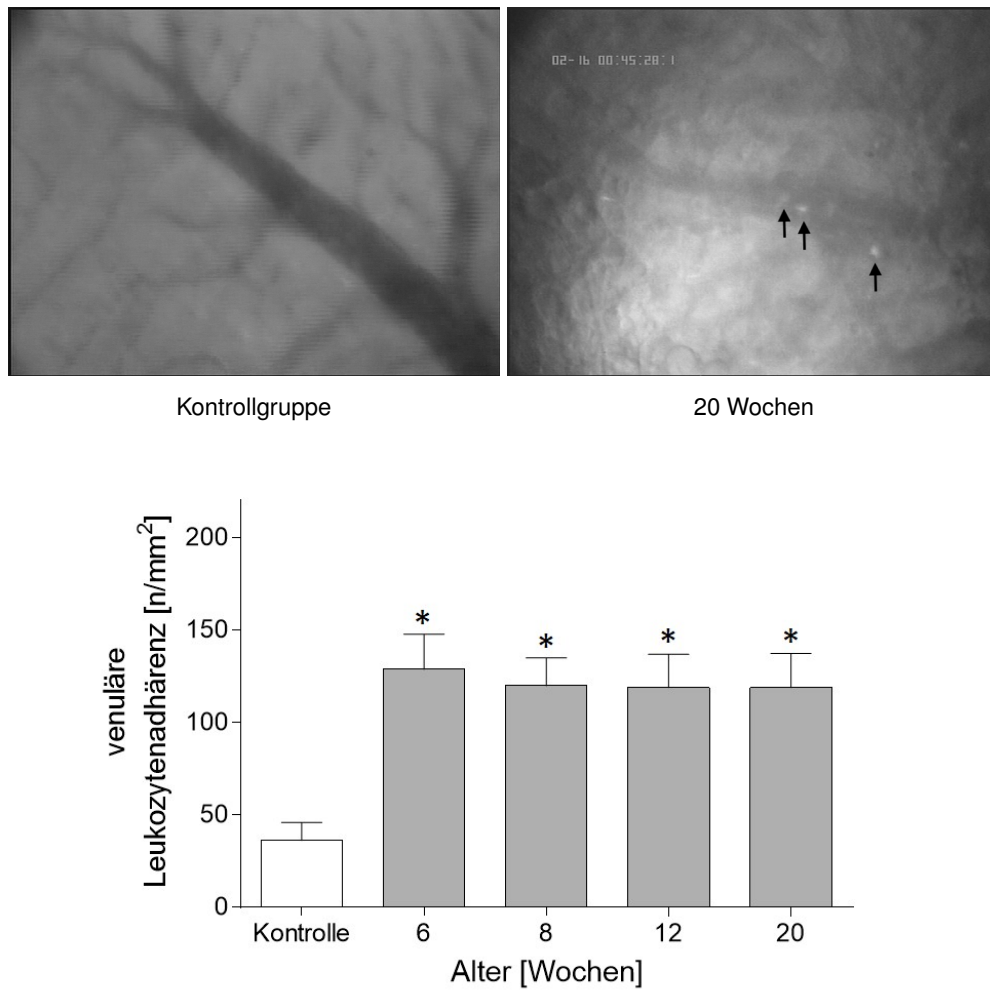


**Abbildung 27 Quantitative Analyse apoptotischer Hepatozyten sowie repräsentative IVM-Aufnahmen (20-fache Vergrößerung).** Durch die i.v. Injektion von Bisbenzimid und UV-Auflicht wurden DNA-Fragmente angefärbt und es konnte manuell die Anzahl apoptotischer Hepatozyten erfasst werden. Ein signifikanter Anstieg der angefärbten DNA-Fragmente konnte nach STZ/HFD-Behandlung im Alter von 20 Wochen vergleichend zur Kontrolle festgestellt werden. MW $\pm$ SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=10-12 pro Zeitpunkt

### 4.3.3 Inflammation

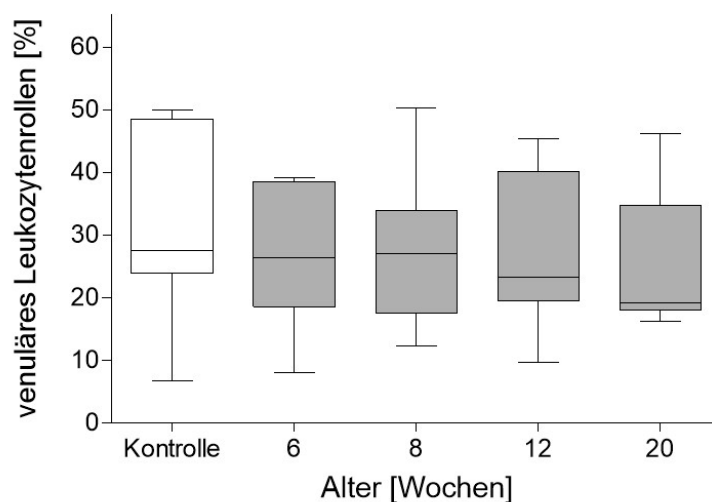
Die Inflammation ist als körpereigene Reaktion auf schädliche Reize im Rahmen der NAFLD-Entstehung und deren Progression einer der entscheidenden Schlüsselprozesse (Abb. 2, Schaubild der Pathophysiologie). Es wurde daher die venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die sinusoidale Leukozytenstase untersucht.

**Venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion** Die intravitalmikroskopische Analyse der Leukozyteninteraktion mit dem mikrovaskulären Endothel ergab einen massiven und signifikanten Anstieg temporär adhärierender Leukozyten in postsinusoidalen Venolen zu allen Zeitpunkten in STZ/HFD-behandelten Mäusen (Abb. 28). Die Anzahl am Endothel rollender Leukozyten war über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant verändert (Abb. 29).



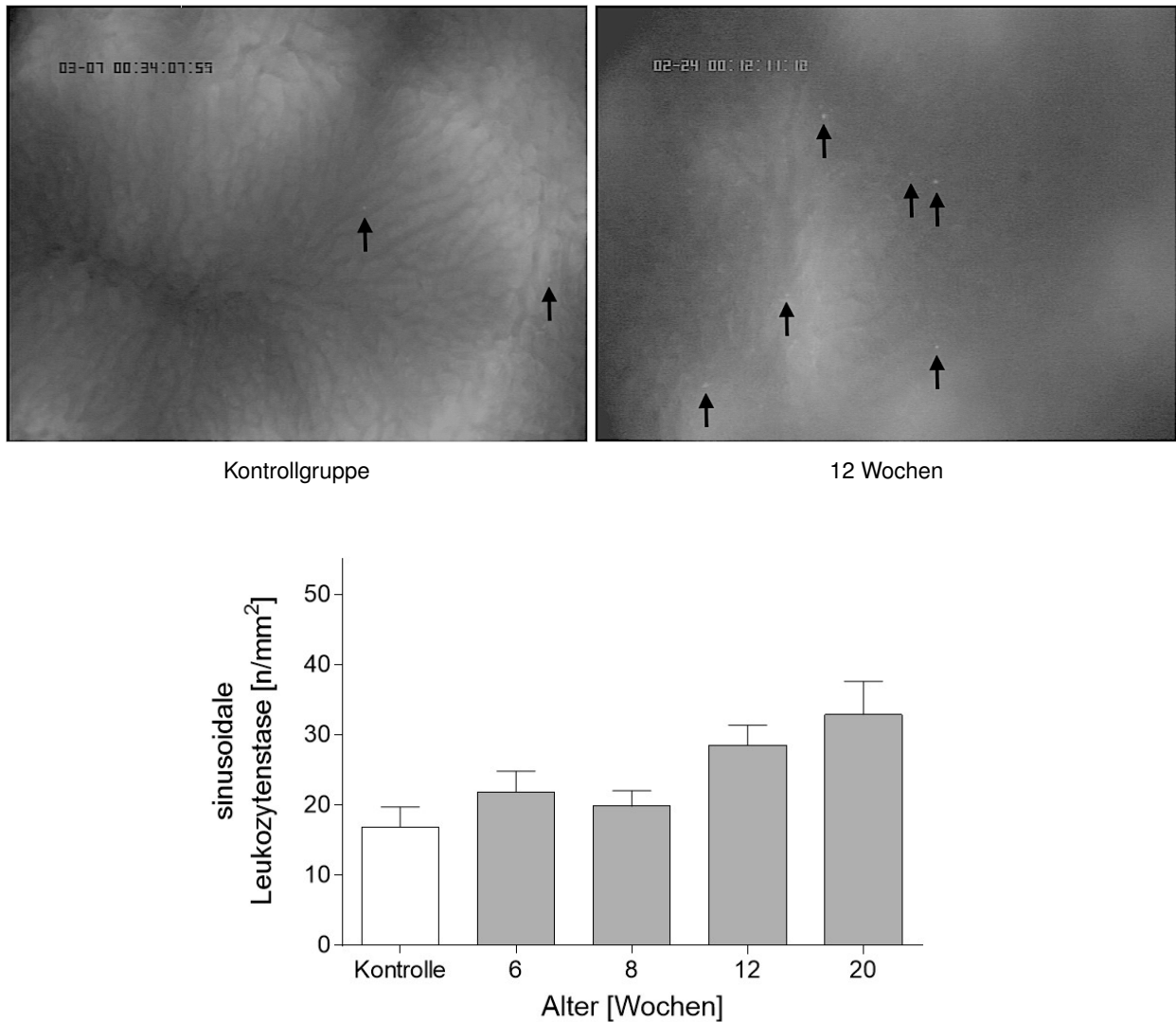
**Abbildung 28** Quantitative Analyse der venulären Leukozytenadhärenz sowie repräsentative IVM-Aufnahmen (40-fache Vergrößerung). Nach der i.v. Injektion von Rhodamin 6G werden Leukozyten unter grünem Auflicht sichtbar. Hierdurch gelang die Quantifizierung von Leukozyten in postsinusoidalen Venolen. Im Zeitraffer von 30 Sekunden wurden die adhärierenden, freifließenden und rollenden Leukozyten in den jeweiligen Videosequenzen gezählt. Dabei zeigte sich eine auffällig signifikante Zunahme der temporär adhärierenden Leukozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten nach STZ/HFD-Behandlung. MW±SEM; One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; n=9-12 pro Zeitpunkt





**Abbildung 29 Quantitative Analyse des venulären Leukozytenrollens.** Nach der i.v. Injektion von Rhodamin 6G werden Leukozyten unter grünem Auflicht sichtbar. Hierdurch gelang die Quantifizierung von Leukozyten in postsinusoidalen Venolen. Im Zeitraffer von 30 Sekunden wurden die adhärierenden, freifließenden und rollenden Leukozyten in den jeweiligen Videosequenzen gezählt. Innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des venulären Leukozytenrollens.  $MW \pm SEM$ ; One Way ANOVA;  $n=9-12$  pro Zeitpunkt

**Sinusoidale Leukozytenstase** Eine verstärkte venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde von einer gesteigerten sinusoidalen Leukozytenstase begleitet. Bei der näheren Betrachtung des Leberparenchyms (midzonale Bereiche) unter Grünlicht-Epiillumination konnten vor allem in 12 und 20 Wochen alten STZ/HFD-behandelten Mäusen vermehrt Leukozyten beobachtet werden, welche entweder mechanisch in den Sinusoiden steckten oder ins Leberparenchym migrierten (Abb. 30).



**Abbildung 30 Quantitative Analyse der sinusoidalen Leukozytenstase sowie repräsentative IVM-Bilder (20-fache Vergrößerung).** Durch Akkumulation von Rhodamin 6G in den Mitochondrien der Leukozyten gelang die intravitalmikroskopische Detektion von parenchymatösen, sinusoidalen Leukozyten. In den repräsentativen Bildern stellen die weißen Spots, welche mit Pfeilen gekennzeichnet sind, die mechanisch - hauptsächlich in den Sinusoiden lokalisierten - fixierten Leukozyten dar. Die Anzahl der sinusoidal fixierten Leukozyten stieg durch die STZ/HFD-Behandlung im Alter von 12 und 20 Wochen an. MW $\pm$ SEM; n=10-12 pro Zeitpunkt

#### 4.3.4 Tabellarische Zusammenfassung

Abschließend zeigt sich eine tabellarische Zusammenfassung der in dieser Studie erhobenen Daten im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zum direkten Vergleich und schnelleren Überblick.

Tabellarische Zusammenfassung der erhobenen Parameter

Parameter	Kontrolle	6 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	20 Wochen
Vitamin A-Autofluoreszenz (n/mm <sup>2</sup> )	1249,5±121,9	895,6±145,2	535,0±49,4 *	655,0±40,5	728,1±52,5
Sinusoidale Perfusion (%)	97,9±0,4	93,77±1,0	90,9±1,4 *	87,4±2,1 *	90,9±2,0
Sinusoidale Dichte (cm/cm <sup>2</sup> )	650,5±14,6	396,0±14,9 ** #	401,7±11,4 ** #	386,3±21,5 ** #	467,6±12,9 **
Sinusoidaler Durchmesser (µm)	6,7±0,2	6,7±0,1 #	7,2±0,2	7,3±0,2	7,5±0,2
Venulärer Durchmesser (µm)	23,6±2,7	17,9±1,6	20,2±0,9	27,0±2,9	26,0±2,3
Venuläre Blutfließgeschwindigkeit (µm/s)	268,2±19,0	227,1±12,8	242,7±16,4	228,6±12,3	228,2±14,6
Venulärer volumetrischer Blutfluss (pL/s)	98,2 (29,4/460,5)	72,4 (13,7/105,3)	94,7 (46,8/130,3)	137,7 (32,7/583,7)	124,0 (44,5/326,9)
Venulärer Scherstress (dyn/cm <sup>2</sup> )	10,9 (6,7/14,0)	10,2 (7,4/22,8)	10,4 (7,1/15,6)	7,7 (4,8/10,7)	8,0 (3,9/13,9)
Sinusoidale Blutfließgeschwindigkeit (µm/s)	147,3 (96,7/203,5)	148,4 (129,6/224,7)	152,5 (108,0/236,5)	121,0 (95,9/223,5)	127,6 (90,0/225,6)
Sinusoidaler volumetrischer Blutfluss (pL/s)	5,5±0,5	5,4±0,3	6,7±0,6	5,0±0,4	5,9±0,4
Sinusoidaler Scherstress (dyn/cm <sup>2</sup> )	17,9 (12,3/25,7)	18,3 (15,5/19,8)	16,1 (11,9/29,9)	13,4 (9,8/23,5)	12,9 (8,8/26,5)
Venuläre Leukozytenadhärenz (n/mm <sup>2</sup> )	36,2±9,2	128,8±18,0 *	119,9±14,3 *	119,0±17,0 *	118,9±17,6 *
Venuläres Leukozytenrollen (%)	27,4 (6,7/50,0)	26,4 (8,1/39,2)	27,0 (12,4/50,2)	23,2 (9,6/45,3)	19,2 (16,2/46,1)
Sinusoidale Leukozytenstase (n/mm <sup>2</sup> )	16,9±2,7	21,9±2,8	21,6±1,5	28,5±2,7	32,9±4,5
Hepatozelluläre Apoptose (n/mm <sup>2</sup> )	3,5 (0,0/22,2)	8,23 (5,7/24,7)	10,74 (2,9/25,3)	11,9 (3,8/61,1)	16,2 (4,4/50,4) *

**Tabelle 5 Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analyse.** Die Ergebnisse sind als MW±SEM angegeben, wenn es sich um eine Normalverteilung handelt und als Median mit Minimalwert/Maximalwert, falls keine Normalverteilung vorliegt.

One Way ANOVA, \*p<0,05 vs. Kontrolle; \*\*p<0,0001 vs. Kontrolle; #p<0,05 vs. 20 Wochen; n=10-12 pro Zeitpunkt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion von Material und Methodik

Die Entwicklung und Progression von fortgeschrittenen Lebererkrankungen ist bezüglich des vermehrten Vorkommens des metabolischen Syndroms gerade im Rahmen der NAFLD klinisch mehr und mehr präsent [Rahman et al., 2013]. Da chronische Lebererkrankungen nicht rasch symptomatisch werden, kann die Steatose unbemerkt in eine Steatohepatitis, Fibrose, Zirrhose und zuletzt in ein prognostisch äußerst schlechtes HCC übergehen. Aufgrund mikrozirkulatorischer Veränderungen während der Progression von Fettlebererkrankungen [Seifalian et al., 1998; Sun et al., 2001] ist ihre Untersuchung fundamental für das tiefere Verständnis und den zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozessen und daraus folgernd für die Entwicklung innovativer Therapeutika gegen den Progress der NAFLD.

#### 5.1.1 Experimentelles Tiermodell

Eine große Vielzahl experimenteller Mausmodelle, welche die NAFLD, ihre Progression oder die Bildung eines HCC nachahmen, existieren bereits. Aus den derzeit verfügbaren NAFLD Studien wird ersichtlich, dass u. a. Lipotoxizität und damit oxidativer Stress [Fuchs und Sanyal, 2012; Tanaka et al., 2013], ER-Stress [Runge et al., 2014], Autophagie [Li et al., 2015], oder eine Immunmodulation [Wolf et al., 2014] die Entwicklung der NASH beeinflussen und damit maßgeblich die Krankheitsprogression vorantreiben können. Zu den verschiedenen murinen Modellen zählt das *ob/ob*- bzw. das *db/db*-Mausmodell, welche durch Leptin-Gen-Mutationen oder veränderte Leptin-Rezeptoren in den Lipid-Metabolismus eingreifen [Trak-Smayra et al., 2011]. Dieses Modell reproduziert sehr gut das metabolische Syndrom sowie die NAFLD, jedoch kommt es ohne eine zusätzliche HFD nicht zu einer Progression der hepatischen Fettlebererkrankung und sie zeigen teilweise sogar Resistenzen gegenüber der Bildung einer hepatischen Fibrose. Ein anderes ernährungsbedingtes Modell ist das MCD (*Methionine-Choline deficient*)-Modell, welches ein häufig genutztes und leicht reproduzierbares Mausmodell zur Erforschung der NASH ist [Corbin und Zeisel, 2012]. Es werden trotzdem Unterschiede zum metabolischen Profil des Menschen mit einer NASH deutlich: die Tiere zeigen im Verlauf - teilweise bis zur Kachexie reichende - Gewichtsverluste, sie bilden keine Insulinresistenzen aus und es zeigen sich gleichmäßige Glukose- und Triglycerid-Level. Dennoch ist das MCD-Modell geeignet, histologische Prozesse, Inflammationskaskaden oder die Fibrosebildung im Rahmen der NASH zu analysieren. Auch andere Diät-bezogene Modelle wie z. B. das HFHC (*high-fat-high-cholesterol diet*)-Mausmodell [Zheng et al., 2008] oder das HFHF (*high-fat-high-fructose diet*)-Mausmodell [Kohli et al., 2010] versuchen sich an den westlichen und modernen Lebens- und Ernährungsstil zu richten und vermischen die HFD

mit eben einer der o. g. zusätzlichen Eigenschaft. Nach Durchführung einer 7-monatigen HFHC-Diät zeigten die Versuchstiere neben einem erhöhten Körpergewicht, erhöhte Leberenzyme sowie verschiedene hepatische Degenerationen, wie z. B. Hepatomegalie, Steatose und verschiedene Grade der Leberfibrose [Zheng et al., 2008]. Der hohe Fruktosegehalt in Lebensmitteln korreliert mit der Entwicklung von Fettleibigkeit und der NAFLD. Die HFHF-Diät führt bei nicht genetisch veränderten C57BL/6 Mäusen nach 16 Wochen zu einer Fettleibigkeit, Insulinresistenz und NASH-Bildung [Kohli et al., 2010]. Ein weiteres Modell ist das *foz/foz*-Mausmodell [Bell-Anderson et al., 2011], bei dem die Mäuse eine Mutation im ALMS-1 Gen vorweisen und zusätzlich eine HFD erhalten. ALMS-1 spielt eine Rolle im intrazellulären Transport und in der Appetit-Regulation. Die Mäuse bilden eine morbide Adipositas sowie Steatose aus, außerdem zeigen sie neben der Insulinresistenz, reduzierte Adiponektinwerte und erhöhte Cholesterolvereinerungen [Bell-Anderson et al., 2011]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NAFLD im murinen Modell nicht nur alleine durch eine spezielle Diät oder eine genetische Mutation ausgelöst werden kann, sondern meist eine Kombination von verschiedenen Herangehensweisen ein sinnvolles und reproduzierbares Modell für pathophysiologische Informationen in einem human-äquivalenten Krankheitsprozess darstellt. Es zeigt sich, dass eine zu langsame Induktion der NAFLD-Progression, eine zu geringe Inzidenz von hepatischen Fibrosen oder das fehlende Auftreten dieser in der Literatur als Kritikpunkte einiger NAFLD-Modelle angesehen werden [Anstee und Goldin, 2006; Nakagawa, 2015]. Diese Modelle befähigen sich somit nicht, valide Studien über mögliche pathognomonische Auswirkungen der Fettlebererkrankung und damit Aspekte therapeutischer Ziele zu untersuchen.

Das in dieser Studie verwendete NASH-Fibrose-Tumor Modell wurde initial von Fuji et al. beschrieben und durchläuft die NAFLD-Progression von einer Steatose, über die NASH bei 8 Wochen, bis zur Fibrose und Ausprägung von hepatischen Tumoren innerhalb von nur 16-20 Wochen [Fujii et al., 2013]. Ein Vorteil dieses Modells ist, dass die diabetischen Versuchstiere die natürliche Progression von der Steatose über die Fibrose in einer relativ kurzen Periode und in einem gut kontrollierbaren Setting durchleben. Aufgrund der hohen Inzidenz und der kurzen Zeitspanne bis zum Auftreten von Lebertumoren ist dieser Versuchsansatz ein ideales Modell für die Erforschung von neuen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten und weiterer möglicher Tumorentitäten. Ein Kritikpunkt besteht jedoch darin, dass die Mäuse im Gegensatz zu der menschlichen Fettleberdegeneration nicht adipös sind. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich die STZ/HFD-Mäuse sogar geringgradig untergewichtig [Fujii et al., 2013]. In der Literatur wird dieses Maus-Modell auch als STAM NASH-HCC Modell beschrieben und wurde schon in einigen Studien eingesetzt. Eine Studie zeigte, dass bestimmte Fibroblastentypen Lebertumor-induzierende Zellen regulieren können und diese gleichzeitig mit einem Anstieg des humanen Wachstumsfaktors während der hepatischen Fibroseentwicklung im STAM NASH-HCC Modell zunehmen [Lau et al., 2016]. Prabhavathi et al. [2016] fanden heraus, dass Solithromycin, ein Makrolidantibiotikum, die Progression der NAFLD in diesem Modell unterdrücken kann. Es wirkte regulatorisch an der

Proteinkinase C und verringerte dadurch morphologische Merkmale wie z. B. die Hepatozyten-Degeneration, Inflammationsbildung und HCC-Progression [Prabhavathi et al., 2016]. Wie schon mehrfach von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt, steht die NAFLD Progression mit metabolischen Varianzen der hepatischen Lipidhomöostase in Zusammenhang. Pogribny et al. [2018] zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Dysregulation der 1-Kohlenstoff-Hämestase zu einer S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH)-Erhöhung und damit zu einer gleichzeitigen Progression der NAFLD im NASH-HCC Modell führen kann. Eine weitere Studie beschreibt den engen Zusammenhang des Lipidmetabolismus mit dem NAFLD-Krankheitsprogress des NASH-HCC Modells durch Charakterisierung des hepatischen Lipidprofils [Saito et al., 2015]. In der vorliegenden Studie war es nicht möglich, die Krankheitsstadien vor der finalen Observation durch allgemeine Krankheitszeichen oder durch diagnostische Maßnahmen zu verifizieren, die Einteilung geschah durch den Zeitverlauf. Dennoch bestätigten die erhobenen Daten die durch den Zeitverlauf bestimmten Krankheitsstadien und deren Progression, wie schon von Fujii et al. [2013] beschrieben. Weiterhin ist zu erwähnen, dass der Erfolg und die Reproduzierbarkeit dieses NASH-HCC Modells nur bei männlichen Mäusen beobachtet wurde. Es wird vermutet, dass es bei weiblichen Mäusen durch mögliche schützende Östrogen-Effekte zu einer deutlichen Widerstandsfähigkeit gegenüber der NAFLD-Bildung und deren Progression kommt [Fujii et al., 2013].

Die in dieser Studie verwendeten Versuchstiere waren männliche Mäuse des weit verbreiteten Inzucht-Stammes C57BL/6J (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die Nomenklatur C57BL/6 steht für den Hauptstamm und das J steht für das Jackson Laboratorium, im welchem die Züchtung stattgefunden hat. Dieser Stamm wird u. a. empfohlen für Diät-induzierte Obesitasforschungen, Inflammationsforschungen und andere allgemeine Sicherheits- und Wirksamkeitstestungen (<https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse>, 10/2019). Aktuelle experimentelle Modelle außerhalb der Hepatologie, welche sich diesem Stamm bedienen, kamen u. a. aus dem Bereich der Osteogenese [Montalvany-Antonucci et al., 2018], der Reproduktionsmedizin [Winship et al., 2018], der Neurochirurgie [Bouley et al., 2018], der Obesitasforschung [Paschoal et al., 2018], der Atheroskleroseforschung [Jarrett Kelsey et al., 2018], aus der allgemeinen Traumatologie [Le et al., 2018] sowie aus der Nephrologie [Matthews et al., 2018]. In Bezug auf die NAFLD und ihre Progression findet dieser Mausstamm eine breite Verwendung in der experimentellen Forschung [Brachs et al., 2016; Cichocki et al., 2017; Duval et al., 2010; Farrell et al., 2014; Han et al., 2018; Jahn et al., 2019a; Lee et al., 2013; Wan et al., 2014]. Außerdem stellte sich heraus, dass Mäuse des C57BL/6-Stammes im Gegensatz zu anderen Stämmen empfänglicher bezüglich Leberschäden reagieren [Shpyleva et al., 2014; Tsuchiya et al., 2012]. Hiermit lässt sich eine allgemeine Popularität und damit einhergehend eine gute Vergleichbarkeit in Bezug auf andere murine Studien über die NAFLD-Progression mit dem C57BL/6-Stamm schlussfolgern.

### 5.1.2 Chirurgische Präparation

Es gibt unterschiedliche Operationsmöglichkeiten für die *in vivo* Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation und Mikrohämodynamik. Eine Studie von Ritsma et al. [2013] zeigte die abdominale intravitalmikroskopische Untersuchung mittels chirurgischer Implantation eines statischen Fensters, hierdurch konnte eine IVM-Untersuchung an der identischen Maus repetitiv zu verschiedenen Zeitpunkten stattfinden. Diese Methode verlangt ein hohes Maß an chirurgischer Präzision und aufwendige technische Hardware. Sie ist sinnvoll für Langzeituntersuchungen von Wochen bis Monaten. Eine neuere Methode ist die Multicolor-Multiphoton-Intravitalmikroskopie, bei der die Leber ebenfalls nach Präparation und vorsichtiger Fixierung ohne schädliche phototoxische Effekte über einen längeren Zeitraum von bis zu 6 Stunden observiert werden kann [Heymann et al., 2015]. Heymann et al. [2015] konnten neben der Leukozyten-Interaktion mittels Monitoring die allgemeine Durchblutung, Vitalparameter und den Gas-Austausch untersuchen. Für kürzere Untersuchungszeiten und einer höheren Fallzahl ist die Durchführung einer medianen Laparotomie, Eröffnung des Peritoneums mit Auslagerung und anschließender Fixierung eines Leberlappens zu empfehlen. Hier ist die Operationszeit deutlich verkürzt und die chirurgische Präparation dieser Prozedur nicht so aufwendig [Hickey und Westhorpe, 2013; Marques et al., 2015a; McDonald et al., 2008; Vollmar und Menger, 2009]. Die zuletzt genannte chirurgische Präparation wurde ebenfalls im Rahmen dieser Studie verwendet, da es innerhalb der Arbeitsgruppe ein bereits gut etabliertes und mehrfach durchgeführtes chirurgisches Präparationsmodell zur intravitalmikroskopischen Darstellung der Leber ist [Abshagen et al., 2006]. Ein möglicher Nachteil besteht darin, dass die Untersuchungstiere nach dieser Präparation euthanasiert werden und eine weitere Untersuchung erst mit einem zusätzlichen Tier möglich ist. Die in dieser Studie untersuchten Versuchstiere zeigten bei der Narkose-Einleitung oder während der Operation interindividuelle Unterschiede in der allgemeinen Vitalität, was die Versuchsdurchführung und damit die *in vivo* Beobachtungen teilweise erschwerte. Es zeigte sich also, dass die chirurgische Präparation als auch die darauf folgende intravitalmikroskopische Untersuchung ein nicht zu vernachlässigender Stressfaktor für die Versuchstiere war.

### 5.1.3 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie ist die Hauptuntersuchungstechnik dieser Studie. Diese Untersuchung ist bezüglich der fließenden, dynamischen Veränderungen im Rahmen progressiver hepatischer Erkrankungen und mit der Intention diese Beobachtungen visuell festhalten zu können, eine sinnvolle Darstellungsmöglichkeit muriner Leberpathologien [Uhlmann et al., 1999].

Gegenüber anderen bildgebenden Verfahren bei Lebererkrankungen, wie z. B. die Ultraschalluntersuchung, die Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie, bietet die IVM einzigartige Vorteile. Neben einem deutlich tiefen Fokus auf die Lebermorphologie können

gleichzeitig auch zelluläre Aspekte sowie das Mikrozirkulationssystem nahezu vollständig visualisiert werden [Menger et al., 1991]. Durch einen großen Fortschritt mit dem Einsatz von Epiluminationstechnik und der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen erreichte die *in vivo* Observation eine hohe wissenschaftliche Stellung in der Methodik der Mikrozirkulationsforschung [Lehr et al., 1999]. Es können somit größere hepatische Abschnitte und auch das zentrale Kapillarbett der Leber untersucht werden [Menger et al., 1991]. Schon nach der Durchführung der ersten großen intravitalmikroskopischen Studie über die hepatische Degeneration bis zur Zirrhose zeigten sich deutliche Zusammenhänge zwischen der hepatischen Mikrozirkulation und den pathologischen Leberveränderungen im Rahmen einer Leberzirrhose, wie z. B. der Verminderung der hepatischen Blutzirkulation und der Reduktion der sinusoidalen Dichte [Vollmar et al., 1998]. Schon in dieser Arbeit wurde deutlich, welche Vorteile die IVM als simultane und aufeinanderfolgende Darstellungsmethode morphologischer, mikrovaskulärer und zellulärer Aspekte im Rahmen von Lebererkrankungen hat [Vollmar et al., 1998]. Durch die *in vivo* Mikroskopie und deren Analyse konnten - in statischen Bildern oder histopathologischen Präparaten nicht festzuhaltende - dynamische Informationen, wie z. B. die Blutfließgeschwindigkeit [Pires et al., 2014; Rosenstengel et al., 2011], die Bestimmung der Scherkräfte [Yu et al., 2015], die Perfusionsdichte [Seifalian et al., 1998], oder auch einzelne Parameter der Immunaktivität gewonnen und untersucht werden. Insbesondere ermöglicht die IVM die Darstellung von Gallenkanälchen [Li et al., 2009], sinusoidalen Endothelzellen [Marques et al., 2012], extrazellulären Matrixproteinen [Güc et al., 2014], Hepatozyten [Hsu et al., 2012], Kupffer-Zellen [Marques et al., 2015b], HSC [Zhang et al., 2000], neutrophilen Granulozyten [McDonald et al., 2010], Lymphozyten [Siegmond et al., 2013], natürlichen Killerzellen [Lee et al., 2010], Thrombozyten [Hoffmeister et al., 2003] und anderen chromosomalen Bestandteilen wie der DNA [Marques et al., 2015b]. Außerdem ist es möglich, die Vitalität der Leber zu beurteilen [Liebig et al., 2018; Pires et al., 2014]. Die IVM hat als Untersuchungsmethode in der experimentellen Hepatologie eine breite Verwendung. So fand sie z. B. Anwendung im Rahmen von Studien über Tumorgenese [Ellenbroek und van Rheenen, 2014], Angiogenese [Brown et al., 2001], hepatische Ischämie und Reperfusion [Peralta et al., 2013], Leukozyten-Interaktionen [Rock et al., 2010], hepatische Stoffwechsel-Redoxreaktionen während eines hämorrhagischen Schocks [Vollmar et al., 1997], akute Leber-Schädigungen [Hinson et al., 2010], fokale Leberverletzung und Leberregeneration [Abshagen et al., 2006; Saederup et al., 2010] und hepatische Reaktionen auf bakterielle Infektionen [Wong et al., 2013]. Die Verwendung der IVM in der Erforschung von degenerativen Prozessen ist in der Hepatologie sehr sinnvoll, da sich die Mikrohämodynamik der Leber unterhalb des Peritoneums schwierig mit anderen Bildgebungsverfahren umfassend darstellen lässt. Während mikrozirkulatorische Analysen von Fettlebern bereits von unzähligen Studiengruppen untersucht wurden [Ijaz et al., 2003; McCuskey et al., 2004; Schleicher et al., 2014; Sun et al., 2001], existiert keine Studie, welche den Progress bis hin zum Leberkrebs beschreibt. Mit Hilfe der IVM wurden die progressiven Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation und Mikrohämody-



namik im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell detailliert analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Modell sowohl mikrohämodynamische, als auch mikrozirkulatorische Charakteristika aufweist, welche in ähnlicher Art auch im Menschen beschrieben sind. Eine Schwierigkeit der Technik war, dass es trotz sorgfältiger Leberauslagerung vereinzelt zu Bewegungsartefakten während der IVM-Aufnahmen gekommen ist. Dieses Problem führte zu einer erschwerten und teilweise verlängerten offline Analyse der Videosequenzen mit dem Bildanalyseprogramm Cap Image. Des Weiteren sind die bekannten Farbstoffartefakte in der Fluoreszenz-Mikroskopie nicht vollkommen zu verhindern. Zwei differenzierte Typen von Artefakten können bei der Verwendung von 2 oder mehr Fluorochromen unterschieden werden. Es können Emissionswellen von Fluorochrom 1 mit der Anregungswellenlänge von Fluorochrom 2 abfallen. Dies kann durch Verwendung von Farbstoffen mit verschiedenen Emissions- und Exzitationsspektren verhindert werden [Price und Jerome, 2011]. Außerdem kann bei Überlappung verschiedener Emissionsspektren die spezifische Nachweisgrenze der unterschiedlichen Fluorochrome fälschlicherweise erhöht werden [Price und Jerome, 2011]. Hier kann durch Verwendung bestimmter Emissionsfilter der Effekt reduziert, aber nicht komplett verhindert werden. Eine bessere Alternative zur Fehlerbehebung ist die spezifische Anregung eines einzelnen Fluorochroms während der Untersuchung anstatt mehrere gleichzeitig anzuregen [Price und Jerome, 2011]. In dieser Studie wurde daher, um mögliche Störartefakte zu reduzieren, zuerst die Autofluoreszenz des in den HSC enthaltenen Vitamin A detektiert, bevor die Fluorochrome injiziert wurden. Auch das Farbstoff-Bleaching und andere phototoxische Schäden wurden in der Literatur als mögliche Problemquellen beschrieben [Mayer et al., 2018]. Das Bleaching beschreibt einen natürlichen Effekt des Fluoreszenzverlustes eines Farbstoffes durch eine erhöhte Bestrahlung oder deren Anregung [Song et al., 1995]. Daher wurde auch in dieser Studie auf die korrekte Menge der injizierten Farbstoffe, auf Verhinderung von möglichen Überbelichtungsphasen und auf eine kurze Mikroskopiezeit unter Verwendung von möglichst geringer Lichtintensität geachtet. Die Anwendung der klassischen IVM ist bisher eher im Bereich experimenteller Arbeiten angeordnet, da Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Rodamine karzinogene und mutagene Eigenschaften aufweisen [Nestmann et al., 1979] und eine isolierte Darstellung von Organen erschwert ist. Es gibt jedoch bereits einige vergleichbare klinische Darstellungsmöglichkeiten der Mikrozirkulation. Das "orthogonal polarisation spectral imaging" (OPS-Imaging) ist eine nicht-invasive, transdermale Technik zur direkten Darstellung der Mikrozirkulation verschiedener Organe im Menschen [Schießler et al., 2002], welche bereits in der hepatischen Mikrozirkulation klinische Anwendung gefunden hat [Rauchfuss et al., 2010]. Mittels OPS-Imaging kann der Gefäßdurchmesser, die Erythrozytengeschwindigkeit, die Leukozytenaktivierung sowie die Kapillardichte am Menschen beurteilt werden [Schießler et al., 2002]. Ein weiteres, häufig verwendetes klinisches Verfahren zur Darstellung der Mikrozirkulation ist die Laser Doppler Flussmessung. Hiermit wird mittels Frequenzverschiebung des durch den Doppler-Effekt veränderten Laserlichtes der Gewebefluss bestimmt [Oberg et al., 1979]. Anwendung findet dieses Verfahren unter ande-

rem in der Dermatologie bei psoriasiformen Hautveränderungen [Murray et al., 2005], in der plastischen Chirurgie im Rahmen von Vitalitätsbeurteilungen von Hautlappen [Payette et al., 2005] und in der Verbrennungsmedizin zur Tiefenbeurteilung der Verletzungen [Sharma et al., 2011]. Andere anerkannte klinische Verfahren sind die Nagelpfalz-Kapillaroskopie zur Detektion von Mikroangiopathien [Cutolo et al., 2010] bei spezifischen Bindegewebserkrankungen, die Infrarot-Thermographie zur Bestimmung der Hauttemperatur als indirektes Zeichen für die Perfusion nach chirurgischen Interventionen [de Weerd et al., 2009] und die Photoplethysmographie zur Darstellung kardiovaskulärer Pulswellen [Allen, 2007]. Eine spezialisierte Form der Photoplethysmographie ist die Pulsoxymetrie [Nitzan et al., 2014], welche durch die einfache perkutane Darstellung der arteriellen Sauerstoffsättigung und die Pulskontrolle ein wichtiges Diagnoseinstrument in der heutigen klinischen Medizin darstellt.

Es lässt sich zusammenfassen, dass ein besseres Verständnis der Vorgänge, die in der Leber als Reaktion auf bestimmte negative Reize entstehen, für die Erforschung und Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten - insbesondere im Rahmen von chronisch-progressiven Lebererkrankungen - notwendig ist. Diese fundamentalen Ergebnisse und Wissensgewinne können durch Verwendung verschiedener Techniken gewonnen werden. Die dynamische Bildgebung mittels IVM erweist sich als ein sehr effektives Verfahren zu Forschungszwecken in der experimentellen Hepatologie [Marques et al., 2015c]. Gerade in der Pathophysiologie der NAFLD-Progression, in welcher diverse Aspekte der intrahepatischen Mikrohämodynamik, Mikrozirkulation und zellulärer Veränderungen eine Rolle spielen, gehört die IVM zu den derzeit besten und gut reproduzierbaren Darstellungsoptionen im Kontext wissenschaftlicher Arbeiten.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie zeigte sich ein progredienter Anstieg des Körpergewichtes. Dies passt zur Theorie der Umbauprozesse des Leberparenchyms, sowie zur Bildung von intra- und extrahepatischen Fettdepots im Rahmen der Krankheitsprogression. Die fortlaufende Gewichtszunahme sowie die DM-Induktion repräsentieren einzelne Aspekte des metabolischen Syndroms, welches in enger Assoziation mit der NAFLD bei Menschen steht [Stephenson et al., 2018]. Es gibt bereits viele Studien, welche mit Hilfe der Hochfett-Diät in murinen Modellen verschiedene Aspekte des metabolischen Syndroms untersuchen [Moreno-Fernández et al., 2018; Nascimento et al., 2019]. Moreno-Fernández et al. [2018] gehen davon aus, dass Übergewicht eine der ätiologischen Schlüsselprozesse im Rahmen der Pathogenese des metabolischen Syndroms ist. Es zeigt sich ferner, dass durch die kontinuierliche HFD und die gleichzeitige DM-Induktion begleitend mit einem progredienten Gewichtsanstieg und einer Hyperglykämie eine menschenähnliche NAFLD Progression nachgeahmt werden konnte. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass das Körpergewicht STZ/HFD-behandelter Mäuse insgesamt 10-20 % geringer ist, als das Körpergewicht

gesunder C57BL/6J Mäuse vergleichbaren Alters [Liebig et al., 2018]. Durch die STZ induzierte Reduktion von  $\beta$ -Zellen entwickeln die Mäuse einen nicht insulinabhängigen DM [Fujii et al., 2013] mit erhöhten Blutglukose-Spiegeln über alle Stadien hinweg. Dementsprechend wiesen die STZ/HFD-Tiere auch keine extrahepatischen Fettdepots auf. Patienten mit einer NAFLD haben eine erhöhte Prävalenz von DM und vice versa [Dai et al., 2017; Leite et al., 2014]. Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, ein gestörter Lipid-Stoffwechsel, erhöhter oxidativer Stress und Inflammation sind pathologische Determinanten, welche die Progression der NAFLD mit dem DM verbinden [Leite et al., 2014]. Es ist nicht sicher darzulegen, dass die Mäuse ebenfalls eine Insulinresistenz bilden, allerdings wurde ein relativer Insulinmangel von Saito et al. [2015] beobachtet. Adipositas, DM Typ 2 und Dyslipidämie gehören zu den häufigsten metabolischen Risikofaktoren, welche mit der NAFLD assoziiert sind [Streba et al., 2015]. Aktuelle Studien zufolge hat sich in den letzten 4 Dekaden die Anzahl adipöser Kinder und Jugendlicher von 11 auf 124 Millionen verzehnfacht [Schikora, 2017] und etwa 13 % der erwachsenen Bevölkerung, das heißt mehr als 640 Millionen Erwachsene sind nach Definition der WHO adipös [Ezzati, 2016]. Neben Ursachenforschung und Prävention der Entstehung von pathologischem Übergewicht ist bei einer solch hohen Prävalenz auch die Erforschung von Komplikationserkrankungen und damit der NAFLD und deren Progression notwendig. Die im Rahmen der Erkrankung entstehenden Veränderungen der hepatischen Morphologie und Struktur macht sich auch im signifikant ansteigenden Leber-Körpergewichts-Index bemerkbar. Um das Maß der Leberschädigung näher quantifizieren zu können, wurden die Leberenzyme AST, ALT und GLDH bestimmt. Eine amerikanische Studie schlussfolgert, dass eine unerwartete Erhöhung von Leberenzymen in enger Korrelation zu Adipositas und anderen Faktoren des Metabolischen Syndroms steht [Clark et al., 2003]. AST kommt neben der Leber auch im Herzen und in der Skelettmuskulatur vor. ALT- und GLDH-Aktivitätserhöhungen sind leberspezifische Krankheitsparameter. GLDH gilt als Indikator für den Leberzelluntergang, da er in Hepatozyten ausschließlich intramitochondrial aufzufinden ist. Es gibt bereits eine Anzahl an Arbeiten die belegen, dass es im Rahmen einer Fettlebererkrankung und deren Progression zu einer Erhöhung der Leberenzyme, insbesondere AST und ALT kommt [Itagaki et al., 2013; Sutti et al., 2014; Wehr et al., 2014]. Daneben wird auch ein Anstieg von GLDH im Rahmen der hepatischen Fettakkumulation gezeigt [Martius et al., 2014] und er wird als weiterer Biomarker für Leberschäden empfohlen [Thulin et al., 2017]. In dieser Studie kommt es zunächst im Rahmen des Krankheitsprozesses zu einem Anstieg der Leberenzyme, wobei in den späten Stadien die Werte wieder abfallen. Ein Wiederabflachen der zuvor gestiegenen Leberenzyme wird auch im Modell der cholestatischen Leberfibrose beobachtet [Abshagen et al., 2015; Dondorf et al., 2017]. Bei fortschreitender Leberzellzerstörung spiegelt die Konzentration der Leberenzyme eventuell nicht mehr den Krankheitsverlauf wieder, da nur noch wenig gesundes Lebergewebe vorhanden ist. Desweiteren könnte der Abfall der Enzym-Aktivitäten auch als Zeichen für ein Ausbrennen des Organs im Progress der chronischen Lebererkrankung gedeutet werden. Erhöhte Leberenzym-

me findet man häufig in nekro-inflammatorischen hepatischen Erkrankungen [Dufour et al., 2000]. Allerdings zeigten sich im Rahmen apoptotischer Prozesse sowohl normale, als auch erhöhte Leberenzyme, diese korrelieren jedoch häufig nicht mit dem Grad der Lebererkrankung [Williams et al., 2014]. Im Rahmen der chronischen Krankheitsentwicklung haben u. a. Sun et al. [2001] und Ijaz et al. [2003] herausgefunden, dass es zu Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation kommt. Auch andere Studien belegten mittels Farbdoppler, dass es bei Spenderorganen mit einer Fettleber im Vergleich zu gesunden Organen zu einer reduzierten sinusoidalen Perfusion kommt [Seifalian et al., 1998]. Außerdem zeigten Seifalian et al. [1999] in einer anderen Studie, dass die Reduktion der Perfusion in engem Zusammenhang mit dem Grad der Fettakkumulation steht. Rosenstengel et al. [2011] untersuchten mittels IVM ebenfalls hepatische Parameter bei einer durch Hochfett-Diät-induzierten Steatose. Hier konnte gezeigt werden, dass mit dem Grad der Steatose die Blutfließgeschwindigkeit in den Zentralvenen und in den Sinusoiden und teilweise auch die Dichte von Hepatozyten und Sternzellen abnimmt [Rosenstengel et al., 2011]. Die Analyse der nutritiven Perfusion von Sinusoiden dieser Studie zeigte im Krankheitsverlauf des NASH-Fibrose-Tumor Modells auch einen signifikanten Abfall der Perfusion von über 10 %. Begleitend dazu zeigten sich in den fortgeschrittenen Stadien die Gefäße stark obstruiert und sichtbare Strukturverluste im Sinusoidalsystem wurden beobachtet. Die Beobachtung der Reduktion perfundierter Sinusoide im Mikroskopiefeld bestätigten auch bereits andere Arbeitsgruppen, welche sich mit der Mikrozirkulation bei NAFLD beschäftigten [McCuskey et al., 2004; Sun et al., 2001]. Die in dieser Studie beobachtete Abnahme der sinusoidalen Dichte unterstreicht den strukturellen Umbauprozess im Progress der chronischen Lebererkrankung. Durch die überschießende EZM-Bildung - ausgelöst u. a. durch aktivierte HSC [Puche et al., 2011] - und die Vernarbung von ehemals vitalem Leberparenchym können die Sinusoide eingeengt werden und verlieren dadurch die eigentliche Funktion als stoffaustauschende Endstromgebiete. Eine häufige und kritische Komplikation chronischer Lebererkrankungen, insbesondere der NAFLD, ist die portale Hypertension, welche auf dem Boden erhöhter intrahepatischer Gefäßresistenzen entstehen kann [Baffy, 2018]. Die Aufgabe den hepatischen Blutstrom konstant zu halten und damit Resistenzen zu verhindern trägt u. a. das Kapillarsystem. Die Beobachtung einer reduzierten sinusoidalen Dichte mit begleitender Unregelmäßigkeit sowie Umstrukturierung des sinusoidalen Netzwerkes kann also als ätiologischer Aspekt einer portalen Hypertension im Rahmen der NAFLD gedeutet werden. Außerdem wurde im Rahmen der Steatose und der Steatohepatitis festgestellt, dass sich die Sinusoide, aufgrund der anschwellenden und mit Fett gefüllten Hepatozyten, komprimiert zeigen [Ijaz et al., 2003; McCuskey et al., 2004]. Somit wird der sinusoidale Zwischenraum verschmälert und die hepatische Mikrozirkulation reduziert [Schleicher et al., 2014]. Demgegenüber konnte keine deutliche Veränderung der sinusoidalen Durchmesser in dieser Studie beobachtet werden, es zeigten sich eher variierende venuläre Durchmesser. Gleichzeitig beobachteten Sun et al. [2001] breiter gewordene hepatische Bänder und eine reduzierte funktionelle sinusoidale Dichte bei Fettlebererkrankungen,

wohingegen es zu keiner signifikanten Veränderung der sinusoidalen Durchmesser kam. Andere Studien zeigten bei Fettlebererkrankungen das gleichzeitige Auftreten einer sinusoidalen Stauung mit anfallenden Perfusionsdefiziten [McCuskey et al., 2004; Seifalian et al., 1998]. Als Folge von Mikrozirkulationsstörungen konnte auch eine hepatische Minderfunktion im Rahmen einer Leberzirrhose sowie einer Steatose beobachtet werden [Ijaz et al., 2003; Villeneuve et al., 1996]. In 20-Wochen alten STZ-/HFD-behandelten Mäusen zeigte sich makroskopisch eine partiell hohe Vaskularisation der Leberoberfläche und mikroskopisch eine erhöhte sinusoidale Dichte. Diese Beobachtungen können auf eine angiogene Antwort im Rahmen einer Tumorerkrankung hindeuten und wurden bereits bei der Leberfibrose beobachtet [Vanheule et al., 2008]. Auch in anderen Studien konnte mittels *in vivo* Mikroskopie die veränderte sinusoidale Netzwerkarchitektur erfasst werden, welche in enger Korrelation zum Schweregrad der Erkrankung steht [Rosenstengel et al., 2011; Schleicher et al., 2014]. So wird im zeitlichen Rahmen der Untersuchung eine steigende unregelmäßige Anordnung und Deformation von Sinusoiden und eine dichtere hepatische Morphologie sichtbar. Diese Beobachtung waren am deutlichsten im Endstadium des NASH-Fibrose-Tumor Modells, d. h. im Alter von 20 Wochen, zu sehen. Zusammenfassend unterstützen die mikrozirkulatorischen Analysen der vorliegenden Studie während der NAFLD-Progression bereits veröffentlichte Ergebnisse zu den einzelnen Erkrankungsstadien. Eine verminderte nutritive Sauerstoffversorgung des hepatischen Gewebes kann somit weitere fibrotische Umbauprozesse in der Leber im Rahmen der NAFLD initiieren [Ijaz et al., 2003; Vanheule et al., 2008]. Während Ijaz et al. [2003] und Seifalian et al. [1999] eine Reduktion des volumetrischen Blutflusses und der Blutfließgeschwindigkeit und damit einhergehend eine inverse Korrelation mit dem Grad der Fettinfiltration im Rahmen der NAFLD zeigte, konnte dies in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Es zeigten sich nur marginal verringerte sinusoidale und venuläre Blutfließgeschwindigkeiten im Verlauf der Krankheitsprogression. Die Werte des venulären und sinusoidalen volumetrischen Blutstromes zeigten keine eindeutige Korrelation zum Fortschritt der hepatischen Fettlebererkrankung. Der Scherstress, der auf die Oberfläche der Endothelzellen der Blutgefäße wirkt, zeigte in den späten Stadien die niedrigsten Werte. Yu et al. [2015] stellten dem gegenüber im Verlauf der NAFLD bei Patienten steigende Scherstress-Werte fest [Yu et al., 2015]. Es wurde beobachtet, dass gerade in den früheren Phasen der NAFLD vaskuläre Veränderungen ein Fortschreiten der Erkrankung provozieren, indem eine Hypoxie in der Leber durch erhöhte hepatische, vaskuläre Widerstände entsteht [van der Graaff et al., 2019]. Ein nicht zu vernachlässigender Faktor kann also daher die Veränderung der intrahepatischen Wandspannung im Rahmen der Erkrankung, insbesondere in den früheren Stadien, sein.

Ruhende HSC speichern Vitamin A und gelten als außergewöhnlich vielseitige mesenchymale Zellen, welche notwendig für die physiologische Funktion der Leber sowie für dessen Antwort auf Verletzungen sind. Als historische Meilensteine gelten die Erforschung funktioneller Eigenschaften der HSC in Bezug auf Leberregenerationsvorgänge [Kent et al., 1976] und die Korrelation

zwischen den HSC und der EZM, welche u. a. durch Isolation der Zellen beobachtet werden konnte [Knook et al., 1982]. Außerdem können HSC Chemokine bilden, wodurch sie eine relevante Rolle im Rahmen von Zell-Zell-Kontakten erringen [Melton und Yee, 2007]. HSC sind fähig, das Leukozytenverhalten zu modulieren, wodurch sie auch eine Rolle in der hepatischen Inflammation spielen [Safadi et al., 2004]. In unserer Studie zeigte sich während der Progression der NAFLD eine signifikante Abnahme Vitamin A-positiver Zellen als Zeichen für die Aktivierung der HSC. Es wurde belegt, dass die HSC durch Aktivierung in proliferative Myofibroblasten zu Veränderungen in der Mikrovaskulatur beitragen [Puche et al., 2011] und dadurch eine wichtige Rolle im Progress von Lebererkrankungen und der Bildung einer Fibrose spielen [Reetz et al., 2013; Wandzioch et al., 2004]. Außerdem zeigte sich, dass durch Aktivierung der HSC deren Kontraktibilität erhöht wird, wodurch sie sinusoidale Durchmesser und den hepatischen Blutfluss regulieren können [Bauer et al., 1995; Zhang et al., 1994]. Damit bestätigt sich, dass die HSC durch Aktivierung ihr zuvor gespeichertes Vitamin A verlieren und durch Ausschüttung von Kollagenen die EZM-Produktion verstärken [Friedman, 2008]. Studien zeigten diesbezüglich, dass HSC reaktive Sauerstoffradikale bilden [Guimaraes et al., 2010] und dadurch über die Bildung von oxidativem Stress zum Progress der NAFLD beitragen [Shin et al., 2019].

Die gezielte Selbsteliminierung vereinzelter Zellen, ohne gleichzeitigen Arealschaden durch nekrotische oder inflammatorische Reize, ist auch im Rahmen der NAFLD möglich. In dieser Studie wurde ein progredienter Anstieg apoptotischer Hepatozyten im Laufe der Fettleberdegeneration beobachtet. Dass die Apoptose eine Rolle bei NAFLD spielt, zeigen Studien zur Inhibition der Apoptose. Die mit dem Inhibitor pan-Caspase VX-166 behandelten Mäuse mit einer NASH zeigten eine reduzierte Fibroseentwicklung [Witek et al., 2009]. Aktuelle Studien verdeutlichen auch einen fließenden Übergang zwischen Apoptose und Nekrose, was als Nekroptose bezeichnet wird und auch in der Progression der NAFLD ein relevanter Prozess ist [Schwabe und Luedde, 2018]. Somit kann die verstärkt beobachtete Apoptose im Progress der Steatose zur Fibrose aus der vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale [Guimaraes et al., 2010], erhöhtem oxidativen Stress [Shin et al., 2019] und auch ER-Stress [Feldstein et al., 2004] resultieren. Viele Prozesse im Rahmen der NAFLD potenzieren sich gegenseitig. So werden auch durch die Apoptose HSC aktiviert und Immunzellen moduliert, wodurch es zusätzlich zum Krankheitsprogress kommt.

In den meisten Fällen spielt bei einer frühen Fettlebererkrankung die Inflammation noch keine Rolle. Bei bis zu 20 % der Patienten mit einer NAFLD kommt es jedoch durch die intrahepatischen chronischen inflammatorischen Reize zu dem Progress der Erkrankung und zu der Bildung einer NASH bzw. einer Fibrose [Bataller et al., 2011]. In dem STZ/HFD-Modell gehört die hepatische Inflammation zu den Kernprozessen der Fettleberdegeneration. Hepatische Entzündungen - gleich welcher Genese - führen zu Stressreaktionen der Hepatozyten, welche die Fettakkumulation unterstützen und den Progress der NAFLD vorantreiben können. Entzündungen werden als ein wesentlicher Bestandteil der hepatischen Wundheilungsreaktion gesehen und sind zweifellos von

temporärem Vorteil. Die weißen Blutkörperchen sind die Abwehr des Immunsystems im Blutstrom und durchqueren das gesamte Blutgefäßnetzwerk, dabei halten oder stoppen sie an Gefäßwandstellen, wo sich mögliche Fremdstoffe oder Krebszellen befinden. Außerdem wandern sie aktiv in das Gewebeinnere zu Bereichen, wo es zu einem Defekt gekommen ist oder sich eine Entzündung entwickelt. Sie können diese Fremdstoffe durch Aktivierung auffressen, zerstören oder mittels Botenstoffen markieren und eliminieren bzw. ausscheiden [Krams et al., 2010]. Das Leukozytenrollen am Rande der Gefäßwände erlaubt den Leukozyten mit immobilisierten Chemokinen eine Interaktion zu bilden, damit sie daraufhin ins Gewebe emigrieren und die Fremdkörper bekämpfen können [McEver, 2015]. Das Leukozytenrollen, die Leukozytenadhäsion, das Wandern der Leukozyten durch die Gefäßwände und auch das intraluminale Fortbewegen von Leukozyten sind teilweise sowohl selbstständige als auch kaskadenartige Schritte im Rahmen der Inflammation [Ley et al., 2007]. Die Leber ist eine Schaltstelle zwischen Darminhalt und systemischem Kreislauf, denn der Großteil der hepatischen Blutversorgung kommt aus der Pfortader und damit aus dem Magen-Darm-Trakt. Daher ist ein physiologisches Gleichgewicht zwischen immunologischen Belastungen, bösartigen Stoffen und akuten pathogenen Infektionen im Rahmen der hepatischen Inflammation notwendig. Die Inflammation entsteht durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen und wird durch die Aktivierung von HSC und Dysfunktionen im ER getriggert. Eine entscheidende Rolle spielen auch die hepatischen Kupferzellen [Huang et al., 2010], welche ebenfalls pro-inflammatorische Mediatoren ausschütten und den Progress der NAFLD fördern [Duval et al., 2010]. Außerdem wurde beobachtet, dass HSC sich durch bestimmte Reize in pro-inflammatorische Phänotypen umwandeln können und so ihre beschriebene Wirkung im Rahmen der hepatischen Inflammation erzielen [Maina et al., 2012; Reid et al., 2016]. Auch durch Apoptose, Nekrose und oxidativen Stress im Rahmen der Steatohepatitis können wechselseitig inflammatorische Reaktionen verstärkt werden [Rinella, 2015]. Als Reaktion auf Hepatozytenstress kann die Inflammation im Leberparenchym zu einer Lipidakkumulation führen und gilt als ein Kennzeichen der Steatohepatitis und NAFLD-Progression. Entzündungen der Leber führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozytenpopulationen und können fibrotische Prozesse am Ursprungsort induzieren [Pellicoro et al., 2014]. Diese induzierte Fibrose schützt die restlichen Hepatozyten, indem pro-apoptotische Signale reduziert und Resistenzbildungen unterstützt werden [Bourbonnais et al., 2012]. Dieser wichtige Prozess wird durch lokoregionäre Leukozyten freigesetzt, die im Rahmen von inflammatorischen Signalen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert und mobilisiert werden. Das Bild verschiedener inflammatorischer Zellreaktionen ist im Rahmen der NAFLD von ortsständigen Hepatozyten, eindringenden von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten geprägt [Tannapfel et al., 2011; Xia et al., 2014]. Dementsprechend wurde in dieser Studie eine kontinuierlich hohe venuläre Leukozytenadhärenz und steigende sinusoidale Leukozytenstase während der Progression der NAFLD beobachtet. Diese inflammatorische Reaktion wurde teilweise schon in

anderen *in vivo* Modellen beschrieben [McCuskey et al., 2004; Sun et al., 2001]. Durch das speziell in der Leber aufzufindende diskontinuierliche Endothel können Leukozyten durch Endothelzell-Interaktion leichter in das hepatische Parenchym übertreten [Kowalewska et al., 2011]. Ein konstanter inflammatorischer Stimulus ist dabei ein wichtiger Wegbereiter für die Verhinderung von Regenerationsprozessen und damit für die Progression der Lebererkrankung. Die Feststellung der marginalen Abnahme rollender Leukozyten kann der Grund eines möglichen Lebergewebeuntergangs im Endstadium der hepatischen Erkrankung sein. Studien zeigten, dass die Inflammation auch im Rahmen der Lipotoxizität vom Fettgewebe ausgehen kann [Cusi, 2012]. Es stellte sich heraus, dass zirkulierende pro-inflammatorische hepatische Zellen, Chemokine, Zytokine als auch die Magen-Darm-Flora [Wigg et al., 2001] potenzielle Auslöser für die beobachtete Inflammation in der NASH sind [Farrell et al., 2012].

Interessanterweise zeigte sich, dass sich Leber-Tumore im NASH-Fibrose-Tumor Modell ohne Zeichen einer Zirrhose oder einer fortgeschrittenen Fibrose bildeten [Liebig et al., 2018]. Das HCC ist mit etwa 90 % der häufigste primäre Leberzelltumor [Krams et al., 2010] und er gehört laut dem WHO Cancer Report 2018 zu den vier häufigsten Krebs-bezogenen Todesursachen weltweit. Auch bei Menschen wird die Entstehung eines HCC ohne vorheriges Auftreten einer Zirrhose oder einer Fibrose beobachtet [Calzadilla Bertot und Adams, 2016]. Weiterhin können Analysen der Tumorgenese im NASH-Fibrose-Tumor Maus-Modell helfen, die zugrundeliegenden Mechanismen der HCC-Entstehung ohne vorherige Zirrhose besser zu verstehen. Die deutlich höheren Durchmesser-Werte der postsinusoidalen Venolen in den späteren Krankheitsstadien weisen auf den Prozess der Neoangiogenese im Rahmen der Tumorbildung hin. Durch Tumor-Microenvironment Untersuchungen wurde gezeigt, dass u. a. die Neoangiogenese von Anfang an eine zentrale Rolle in der Hepatokarzinogenese spielt [Hernandez-Gea et al., 2013]. Hernandez-Gea et al. [2013] zeigten in ihrer Studie zusätzlich, dass die Inflammation als ein wesentlicher Bestandteil der Tumorbilogie des HCC anzusehen ist. Dies unterstützt die Relevanz und Notwendigkeit der Inflamationsuntersuchungen im Rahmen von NAFLD Studien. Es lässt sich also schlussfolgern, dass das NASH-Fibrose-Tumor Modell eine hohe Anwendbarkeit für die Beurteilung und Charakterisierung der Mikrozirkulation im Progress der NAFLD mit zugrundeliegendem DM hat. Die beobachteten typischen mikrozirkulatorischen Störungen auf funktioneller, morphologischer und zellulärer Ebene während der NAFLD-Progression unterstützen diese These. Die vorliegende Arbeit zeigt einige relevante Ergebnisse bezüglich der Erforschung neuer therapeutischer Aspekte im Bereich der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der sinusoidalen Strukturen im Rahmen der chronischen Lebererkrankung. Allerdings muss erwähnt werden, dass neben der ausführlichen und intensiven intravitalmikroskopischen Analyse mit einer Vielzahl von funktionellen und dynamischen Parametern im Rahmen der NAFLD-Progression nicht alle metabolischen Determinanten, die zusätzlich in der Pathophysiologie der NAFLD eine Rolle spielen können, untersucht wurden.



### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die NAFLD als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms ist eine chronische Erkrankung mit steigender Prävalenz und weitreichendem Risikopotenzial, welche ab dem Stadium der Zirrhose irreversibel ist. Aufgrund der zunehmenden sitzenden Tätigkeiten, des steigenden Bewegungsmangels und einer zu fettreichen und fleischhaltigen Ernährung spielt die NAFLD in den Industrienationen eine immer wichtigere Rolle. In der vorliegenden *in vivo* Studie bestätigte sich, dass das NASH-Fibrose-Tumor Modell ein valides murines Modell zur Erforschung der Pathophysiologie und möglicher therapeutischer Interventionen einer NAFLD sein kann. Die verschiedenen NAFLD-Stadien zeigten charakteristische mikrohämodynamische und mikrozirkulatorische Aspekte. Die hepatische Perfusion nahm im Verlauf der Fettleberdegeneration signifikant ab. Mikroskopisch präsentierten sich immer stärker sichtbar werdende Veränderungen des Leberparenchyms. Die gesamten Gefäßstrukturen zeigten sich zunehmend ungeordnet und es wurden Parenchymumstrukturierungen deutlich, welche sich negativ auf das hepatische Kapillarsystem auswirkten. Gefäßverläufe wurden im Krankheitsprogress zunehmend unterbrochen und die sinusoidale Dichte sank kontinuierlich. Die reine Steatose ist eine symptomarme und relativ untypische Leberveränderung mit einer Fettgewebezunahme ohne relevante mikrozirkulatorisch sichtbare Funktionseinschränkungen. Im Rahmen der NASH zeigte sich hingegen eine verstärkte Inflammation. Die Fibrose und letztendlich die Zirrhose sind durch eine Umstrukturierung des klassischen Leberparenchyms gekennzeichnet und sorgen für bleibende intrahepatische Veränderungen mit einer eingeschränkten nutritiven Perfusion und einer erhöhten hepatozellulären Apoptose. Die NAFLD-Endstadien präsentierten teils typische tumoröse Prozesse wie Neoangiogenese, Akkumulation von Leukozyten im Parenchym und auch eine Abnahme der funktionalen Durchblutung. Das NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell basiert auf der artifiziellen Induktion eines DM. Im Gegensatz zur menschlichen NAFLD, in welcher der DM bzw. die Insulinresistenz ein Kofaktor im Rahmen der Progression ist, werden in diesem Modell einige relevante pathophysiologische metabolische Prozesse übersprungen. Zu den wichtigsten metabolischen Vorgängen im Rahmen der NAFLD im Menschen gehören neben der Fettleibigkeit, Insulinresistenz bzw. Hyperglykämie und Hyperlipidämie [Jahn et al., 2019b]. Es zeigten sich viele Gemeinsamkeiten zu anderen bisher veröffentlichten Studien, wodurch ein umfassender Gesamtüberblick der Leberdegeneration ermöglicht wurde. Es wird deutlich, dass es auch im Rahmen einer NAFLD-Progression zu einer Anhäufung von immunologisch aktiven Zellen kommt und die sterile hepatische Entzündung eine Art Wendepunkt im Rahmen des Krankheitsprozesses darstellt. Mögliche therapeutische Ansätze wären z. B. die Entstehung der NASH durch intrahepatische anti-inflammatorische Vorgänge zu verhindern, spezifische Rezeptoren der HSC zu blockieren um die Kollagen-Produktion zu reduzieren und immunmodulatorische und durchblutungsfördernde Substanzen zu verwenden. Desweiteren konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass die im Rahmen dieses

murinen Modells beobachteten Veränderungen der Progression chronischer Lebererkrankung im Menschen ähneln. Hier sollten pharmakologische Studien in großen randomisierten Populationen durchgeführt werden. Außerdem werden weitere Validierungsprozesse und Re-Evaluationen für eine mögliche Übertragung von der Maus auf den Menschen benötigt.

## 6 Literaturverzeichnis

- [Abshagen 2008] ABSHAGEN, Kerstin: *Kupfferzell-abhängige Regulation der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie*, Institut für experimentelle Chirurgie der medizinischen Fakultät der Universität Rostock, Dissertation, 2008
- [Abshagen et al. 2006] ABSHAGEN, Kerstin ; EIPEL, Christian ; MENGER, Michael D. ; VOLLMAR, Brigitte: Comprehensive Analysis of the Regenerating Mouse Liver: An In Vivo Fluorescence Microscopic and Immunohistological Study. In: *Journal of Surgical Research* 134 (2006), Nr. 2, S. 354–362
- [Abshagen et al. 2015] ABSHAGEN, Kerstin ; KÖNIG, Matthias ; HOPPE, Andreas ; MÜLLER, Isabell ; EBERT, Matthias ; WENG, Honglei ; HOLZHÜTTER, Herrmann-Georg ; ZANGER, Ulrich M. ; BODE, Johannes ; VOLLMAR, Brigitte ; THOMAS, Maria ; DOOLEY, Steven: Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice. In: *BMC systems biology* 9 (2015), 11, S. 83–83
- [Aird 2007] AIRD, William C.: Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. In: *Circulation Research* 100 (2007), Nr. 2, S. 174–190
- [Akbarzadeh et al. 2007] AKBARZADEH, A. ; NOROUZIAN, D. ; MEHRABI, M. R. ; JAMSHIDI, Sh ; FARHANGI, A. ; VERDI, A. A. ; MOFIDIAN, S. M. A. ; RAD, B. L.: Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. In: *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22 (2007), Nr. 2, S. 60–64
- [Allen 2007] ALLEN, John: Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. In: *Physiological Measurement* 28 (2007), 04
- [Anstee und Goldin 2006] ANSTEE, Quentin M. ; GOLDIN, Robert D.: Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. In: *International Journal of Experimental Pathology* 87 (2006), Nr. 1, S. 1–16
- [Anstee et al. 2013] ANSTEE, Quentin M. ; TARGHER, Giovanni ; DAY, Christopher P.: Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10 (2013), 03, S. 330
- [Arab et al. 2018] ARAB, Juan P. ; ARRESE, Marco ; TRAUNER, Michael: Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 13 (2018), Nr. 1, S. 321–350
- [Araújo et al. 2018] ARAÚJO, Ana R. ; ROSSO, Natalia ; BEDOGNI, Giorgio ; TIRIBELLI, Claudio ; BELLENTANI, Stefano: Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. In: *Liver International* 38 (2018), S. 47–51

- [Ascha et al. 2010] ASCHA, Mustafa S. ; HANOUNEH, Ibrahim A. ; LOPEZ, Rocio ; TAMIMI, Tarek Abu-Rajab ; FELDSTEIN, Ariel F. ; ZEIN, Nizar N.: The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology* 51 (2010), Nr. 6, S. 1972–1978
- [Baffy 2018] BAFFY, Gyorgy: Origins of portal hypertension in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Digestive Diseases and Sciences* 63 (2018), Nr. 3, S. 563–576
- [Barrows und Parks 2006] BARROWS, Brian R. ; PARKS, Elizabeth J.: Contributions of Different Fatty Acid Sources to Very Low-Density Lipoprotein-Triacylglycerol in the Fasted and Fed States. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (2006), Nr. 4, S. 1446
- [Bataller et al. 2011] BATALLER, Ramon ; ROMBOUTS, Krista ; ALTAMIRANO, José ; MARRA, Fabio: Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25 (2011), Nr. 2, S. 231–244
- [Bauer et al. 1995] BAUER, Michael ; PAQUETTE, Nicole C. ; ZHANG, Jian X. ; BAUER, Inge ; PAN-NEN, Benedikt H. J. ; KLEEBERGER, Steven R. ; CLEMENS, Mark G.: Chronic ethanol consumption increases hepatic sinusoidal contractile response to endothelin-1 in the rat. In: *Hepatology* 22 (1995), 2019/01/26, Nr. 5, S. 1565–1576
- [Bell-Anderson et al. 2011] BELL-ANDERSON, K. S. ; AOUAD, L. ; WILLIAMS, H. ; SANZ, F. R. ; PHUYAL, J. ; LARTER, C. Z. ; FARRELL, G. C. ; CATERSON, I. D.: Coordinated improvement in glucose tolerance, liver steatosis and obesity-associated inflammation by cannabinoid 1 receptor antagonism in fat Aussie mice. In: *International Journal Of Obesity* 35 (2011), 03, S. 1539
- [Berglund et al. 2008] BERGLUND, Eric D. ; LI, Candice Y. ; POFFENBERGER, Greg ; AYALA, Julio E. ; FUEGER, Patrick T. ; WILLIS, Shannon E. ; JEWELL, Marybeth M. ; POWERS, Alvin C. ; WASSERMAN, David H.: Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. In: *Diabetes* 57 (2008), 07, Nr. 7, S. 1790–1799
- [Bergmeyer et al. 1978] BERGMAYER, H. U. ; SCHEIBE, P. ; WAHLEFELD, A. W.: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. In: *Clinical Chemistry* 24 (1978), 01, Nr. 1, S. 58
- [Bouley et al. 2018] BOULEY, James ; CHUNG, David Y. ; AYATA, Cenk ; BROWN, Robert H. ; HENNINGER, Nils: Cortical spreading depression denotes concussion injury. In: *Journal of Neurotrauma* (2018), 2019/01/25
- [Bourbonnais et al. 2012] BOURBONNAIS, Eric ; RAYMOND, Valerie-Ann ; ETHIER, Chantal ; NGUYEN, Bich N. ; EL-LEIL, Marc S. ; MELOCHE, Sylvain ; BILODEAU, Marc: Liver fibrosis

- protects mice from acute hepatocellular injury. In: *Gastroenterology* 142 (2012), Nr. 1, S. 130–139
- [Brachs et al. 2016] BRACHS, Sebastian ; WINKEL, Angelika F. ; TANG, Hui ; BIRKENFELD, Andreas L. ; BRUNNER, Bodo ; JAHN-HOFMANN, Kerstin ; MARGERIE, Daniel ; RUETTEN, Hartmut ; SCHMOLL, Dieter ; SPRANGER, Joachim: Inhibition of citrate cotransporter slc13a5/mindy by rnaï improves hepatic insulin sensitivity and prevents diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. In: *Molecular metabolism* 5 (2016), 08, Nr. 11, S. 1072–1082
- [Brown et al. 2001] BROWN, Edward B. ; CAMPBELL, Robert B. ; TSUZUKI, Yoshikazu ; XU, Lei ; CARMELIET, Peter ; FUKUMURA, Dai ; JAIN, Rakesh K.: In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. In: *Nature Medicine* 7 (2001), 07, S. 864
- [Bugianesi et al. 2005] BUGIANESI, E. ; GASTALDELLI, A. ; VANNI, E. ; GAMBINO, R. ; CASSADER, M. ; BALDI, S. ; PONTI, V. ; PAGANO, G. ; FERRANNINI, E. ; RIZZETTO, M.: Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. In: *Diabetologia* 48 (2005), Nr. 4, S. 634–642
- [Calzadilla Bertot und Adams 2016] CALZADILLA BERTOT, Luis ; ADAMS, Leon A.: The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17 (2016), 05, Nr. 5, S. 774
- [Cameron et al. 2004] CAMERON, Adrian J. ; SHAW, Jonathan E. ; ZIMMET, Paul Z.: The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 33 (2004), Nr. 2, S. 351–375
- [Canbay et al. 2004] CANBAY, Ali ; FRIEDMAN, Scott ; GORES, Gregory J.: Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. In: *Hepatology* 39 (2004), Nr. 2, S. 273–278
- [Charlton et al. 2011] CHARLTON, Michael R. ; BURNS, Justin M. ; PEDERSEN, Rachel A. ; WATT, Kymberly D. ; HEIMBACH, Julie K. ; DIERKHISING, Ross A.: Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the united states. In: *Gastroenterology* 141 (2011), Nr. 4, S. 1249–1253
- [Cichocki et al. 2017] CICHOCKI, Joseph A. ; FURUYA, Shinji ; LUO, Yu-Syuan ; IWATA, Yasuhiro ; KONGANTI, Kranti ; CHIU, Weihsueh A. ; THREADGILL, David W. ; POGRIBNY, Igor P. ; RUSYN, Ivan: Nonalcoholic fatty liver disease is a susceptibility factor for perchloroethylene-induced liver effects in mice. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 159 (2017), 09, Nr. 1, S. 102–113

- [Clark et al. 2003] CLARK, Jeanne M. ; BRANCATI, Frederick L. ; DIEHL, Anna M.: The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the united states. In: *American Journal Of Gastroenterology* 98 (2003), 05, S. 960
- [Corbin und Zeisel 2012] CORBIN, Karen D. ; ZEISEL, Steven H.: Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. In: *Current opinion in gastroenterology* 28 (2012), 03, Nr. 2, S. 159–165
- [Crawford 2010] CRAWFORD, James M.: Vascular disorders of the liver. In: *Clinics in Liver Disease* 14 (2010), Nr. 4, S. 635–650
- [Cusi 2012] CUSI, Kenneth: Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. In: *Gastroenterology* 142 (2012), Nr. 4, S. 711–725
- [Cutolo et al. 2010] CUTOLO, Maurizio ; SULLI, Alberto ; SMITH, Vanessa: Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. In: *Nature Reviews Rheumatology* 6 (2010), 08, S. 578
- [Dai et al. 2017] DAI, Wenjie ; YE, Ling ; LIU, Aizhong ; WEN, Shi W. ; DENG, Jing ; WU, Xin ; LAI, Zhiwei: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. In: *Medicine* 96 (2017), 09, Nr. 39, S. 8179
- [Day 2010] DAY, C. P.: Genetic and Environmental Susceptibility to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *Digestive Diseases* 28 (2010), Nr. 1, S. 255–260
- [Day und James 1998] DAY, Christopher P. ; JAMES, Oliver F. W.: Steatohepatitis: A tale of two "hits"? In: *Gastroenterology* 114 (1998), Nr. 4, S. 842–845
- [Deutsche-Leberstiftung 2016] DEUTSCHE-LEBERSTIFTUNG: [www.deutsche-leberstiftung.de](http://www.deutsche-leberstiftung.de). Carl-Neuberg-Straße 1 Hannover: , 2016
- [Deutsche Stiftung Organtransplantation 2016] DEUTSCHE STIFTUNG ORGANTRANSPLANTATION: [www.dso.de](http://www.dso.de). Deutschherrnufer 52 Frankfurt am Main: , 2016
- [Dondorf et al. 2017] DONDORF, Felix ; FAHRNER, René ; ARDEL, Michael ; PATSENKER, Eleonora ; STICKEL, Felix ; DAHMEN, Uta ; SETTMACHER, Utz ; RAUCHFUSS, Falk: Induction of chronic cholestasis without liver cirrhosis - creation of an animal model. In: *World journal of gastroenterology* 23 (2017), 06, Nr. 23, S. 4191–4199
- [Dufour et al. 2000] DUFOUR, D. R. ; LOTT, John A. ; NOLTE, Frederick S. ; GRETCH, David R. ; KOFF, Raymond S. ; SEEFF, Leonard B.: Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. II. Recommendations for Use of Laboratory Tests in Screening, Diagnosis, and Monitoring. In: *Clinical Chemistry* 46 (2000), 12, Nr. 12, S. 2050

- [Dunn und Schwimmer 2008] DUNN, Winston ; SCHWIMMER, Jeffrey B.: The obesity epidemic and nonalcoholic fatty liver disease in children. In: *Curr Gastroenterol Rep* 10 (2008), Feb, Nr. 1, S. 67–72
- [Duval et al. 2010] DUVAL, Caroline ; THISSEN, Uwe ; KESHTKAR, Shohreh ; ACCART, Bertrand ; STIENSTRA, Rinke ; BOEKSCHOTEN, Mark V. ; ROSKAMS, Tania ; KERSTEN, Sander ; MÜLLER, Michael: Adipose Tissue Dysfunction Signals Progression of Hepatic Steatosis Towards Nonalcoholic Steatohepatitis in C57Bl/6 Mice. In: *Diabetes* 59 (2010), 12, Nr. 12, S. 3181–3191
- [Eckard et al. 2013] ECKARD, Carly ; COLE, Renee ; LOCKWOOD, Joshua ; TORRES, Dawn M. ; WILLIAMS, Christopher D. ; SHAW, Janet C. ; HARRISON, Stephen A.: Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. In: *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6 (2013), 07, Nr. 4, S. 249–259
- [Ellenbroek und van Rheenen 2014] ELLENBROEK, Saskia I. J. ; RHEENEN, Jacco van: Imaging hallmarks of cancer in living mice. In: *Nature Reviews Cancer* 14 (2014), 05, S. 406
- [Ezzati 2016] EZZATI, Majid: Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. In: *The Lancet* 387 (2016), 2019/02/27, Nr. 10026, S. 1377–1396
- [Farrell et al. 2014] FARRELL, Geoffrey C. ; MRIDHA, Auvro R. ; YEH, Matthew M. ; ARSOV, Todor ; VAN ROOYEN, Derrick M. ; BROOLING, John ; NGUYEN, Tori ; HEYDET, Deborah ; DELGHINGARO-AUGUSTO, Viviane ; NOLAN, Christopher J. ; SHACKEL, Nicholas A. ; MCLENNAN, Susan V. ; TEOH, Narci C. ; LARTER, Claire Z.: Strain dependence of diet-induced nash and liver fibrosis in obese mice is linked to diabetes and inflammatory phenotype. In: *Liver International* 34 (2014), 2019/01/25, Nr. 7, S. 1084–1093
- [Farrell et al. 2012] FARRELL, Geoffrey C. ; ROOYEN, Derrick van ; GAN, Lay ; CHITTURI, Shivra-kumar: NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. In: *Gut and Liver* 6 (2012), 04, Nr. 2, S. 149–171
- [Feldstein et al. 2004] FELDSTEIN, Ariel E. ; WERNEBURG, Nathan W. ; CANBAY, Ali ; GUICCIARDI, Maria E. ; BRONK, Steven F. ; RYDZEWSKI, Robert ; BURGART, Laurence J. ; GORES, Gregory J.: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. In: *Hepatology* 40 (2004), Nr. 1, S. 185–194
- [Ferreira et al. 2011] FERREIRA, D. M. S. ; CASTRO, R. E. ; MACHADO, M. V. ; EVANGELISTA, T. ; SILVESTRE, A. ; COSTA, A. ; COUTINHO, J. ; CAREPA, F. ; CORTEZ-PINTO, H. ; RODRIGUES, C. M. P.: Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease. In: *Diabetologia* 54 (2011), Jul, Nr. 7, S. 1788–1798

- [Fracanzani et al. 2008] FRACANZANI, Anna L. ; VALENTI, Luca ; BUGIANESI, Elisabetta ; ANDREOLETTI, Marco ; COLLI, Agostino ; VANNI, Ester ; BERTELLI, Cristina ; FATTA, Erika ; BIGNAMINI, Daniela ; MARCHESINI, Giulio ; FARGION, Silvia: Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: A role for insulin resistance and diabetes. In: *Hepatology* 48 (2008), Nr. 3, S. 792–798
- [Friedman 2008] FRIEDMAN, Scott L.: Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. In: *Physiological reviews* 88 (2008), Nr. 1, S. 125–172
- [Fuchs und Sanyal 2012] FUCHS, Michael ; SANYAL, Arun J.: Lipotoxicity in NASH. In: *Journal of Hepatology* 56 (2012), Nr. 1, S. 291–293
- [Fujii et al. 2013] FUJII, Masato ; SHIBAZAKI, Yuichiro ; WAKAMATSU, Kyoko ; HONDA, Yutaka ; KAWAUCHI, Yusuke ; SUZUKI, Kenji ; ARUMUGAM, Somasundaram ; WATANABE, Kenichi ; ICHIDA, Takafumi ; ASAKURA, Hitoshi ; YONEYAMA, Hiroyuki: A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. In: *Medical Molecular Morphology* 46 (2013), Sep, Nr. 3, S. 141–152
- [Gerlach 2009] GERLACH, Dieter: Geschichte der Mikroskopie. In: *Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main* (2009), S. 625–657
- [van der Graaff et al. 2019] GRAAFF, D. van der ; KWANTEN, W. J. ; FRANQUE, S. M.: The potential role of vascular alterations and subsequent impaired liver blood flow and hepatic hypoxia in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. In: *Medical Hypotheses* 122 (2019), S. 188–197
- [Gracia-Sancho et al. 2018] GRACIA-SANCHO, Jordi ; MARRONE, Giusi ; FERNANDEZ-IGLESIAS, Anabel: Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2018)
- [Guimaraes et al. 2010] GUIMARAES, Eduardo L. M. ; EMPSEN, Christophe ; GEERTS, Albert ; GRUNSVEN, Leo A. van: Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. In: *Journal of Hepatology* 52 (2010), 2019/01/26, Nr. 3, S. 389–397
- [Güc et al. 2014] GÜC, Esra ; FANKHAUSER, Manuel ; LUND, Amanda W. ; SWARTZ, Melody A. ; KILARSKI, Witold W.: Long-term intravital immunofluorescence imaging of tissue matrix components with epifluorescence and two-photon microscopy. In: *Journal of Visualized Experiments* (2014), Nr. 86
- [Han et al. 2018] HAN, Mingnuan ; ZHANG, Ting ; GU, Wen ; YANG, Xingxin ; ZHAO, Ronghua ; YU, Jie: 2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-o- $\beta$ -d-glucoside attenuates methionine and choline-



- deficient diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. In: *Experimental and therapeutic medicine* 16 (2018), 08, Nr. 2, S. 1087–1094
- [Heimstädt 1911] HEIMSTÄDT, Oskar: Das Fluoreszenzmikroskop. In: *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*. 28 (1911), S. 330—337
- [Hernandez-Gea et al. 2013] HERNANDEZ-GEA, Virginia ; TOFFANIN, Sara ; FRIEDMAN, Scott L. ; LLOVET, Josep M.: Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Gastroenterology* 144 (2013), 03, Nr. 3, S. 512–527
- [Herold 2017] HEROLD, Gerd ; GERD HEROLD, 50737 K. Dr. med. (Hrsg.): *Innere Medizin*. Herold, 2017. – Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis
- [Heymann et al. 2015] HEYMAN, Felix ; NIEMIETZ, Patricia M. ; PEUSQUENS, Julia ; ERGEN, Can ; KOHLHEPP, Marlene ; MOSSANEN, Jana C. ; SCHNEIDER, Carlo ; VOGT, Michael ; TOLBA, Rene H. ; TRAUTWEIN, Christian ; MARTIN, Christian ; TACKE, Frank: Long term intravital multiphoton microscopy imaging of immune cells in healthy and diseased liver using CXCR6.Gfp reporter mice. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (2015), 03, Nr. 97, S. 52607
- [Hickey und Westhorpe 2013] HICKEY, Michael J. ; WESTHORPE, Clare L. V.: Imaging inflammatory leukocyte recruitment in kidney, lung and liver – Challenges to the multi-step paradigm. In: *Immunology and Cell Biology* 91 (2013)
- [Hinson et al. 2010] HINSON, Jack A. ; ROBERTS, Dean W. ; JAMES, Laura P.: *Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis*. S. 369–405. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2010
- [Hoffmeister et al. 2003] HOFFMEISTER, Karin M. ; FELBINGER, Thomas W. ; FALET, Herve ; DENIS, Cecile V. ; BERGMEIER, Wolfgang ; MAYADAS, Tanya N. ; ANDRIAN, Ulrich H. von ; WAGNER, Denisa D. ; STOSSEL, Thomas P. ; HARTWIG, John H.: The clearance mechanism of chilled blood platelets. In: *Cell* 112 (2003), Nr. 1, S. 87–97
- [Hsu et al. 2012] HSU, Yu-Chen ; HUANG, Hsiang-Po ; YU, I.-Shing ; SU, Kang-Yi ; LIN, Shu-Rung ; LIN, Wei-Chou ; WU, Hua-Lin ; SHI, Guey-Yueh ; TAO, Mi-Hua ; KAO, Cheng-Heng ; WU, Yao-Ming ; MARTIN, Patricia E. ; LIN, Shih-Yao ; YANG, Pan-Chyr ; LIN, Shu-Wha: Serine protease hepsin regulates hepatocyte size and hemodynamic retention of tumor cells by hepatocyte growth factor signaling in mice. In: *Hepatology* 56 (2012), 2019/03/02, Nr. 5, S. 1913–1923
- [Huang et al. 2010] HUANG, Wan ; METLAKUNTA, Anantha ; DEDOUSIS, Nikolaos ; ZHANG, Pili ; SIPULA, Ian ; DUBE, John J. ; SCOTT, Donald K. ; O'DOHERTY, Robert M.: Depletion of Liver

- Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. In: *Diabetes* 59 (2010), 02, Nr. 2, S. 347–357
- [Ijaz et al. 2003] IJAZ, Samia ; YANG, Wenxuan ; WINSLET, Marc C. ; SEIFALIAN, Alexander M.: Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. In: *Microcirculation* 10 (2003), Nr. 6, S. 447–456
- [Itagaki et al. 2013] ITAGAKI, Hiroko ; SHIMIZU, Kazuhiko ; MORIKAWA, Shunichi ; OGAWA, Kenji ; EZAKI, Taichi: Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 6 (2013), 11, Nr. 12, S. 2683–2696
- [Jahn et al. 2019a] JAHN, Daniel ; DORBATH, Donata ; KIRCHER, Stefan ; NIER, Anika ; BERGHEIM, Ina ; LENAERTS, Kaatje ; HERMANNNS, Heike M. ; GEIER, Andreas: Beneficial effects of vitamin d treatment in an obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. In: *Nutrients* 11 (2019), Nr. 1
- [Jahn et al. 2019b] JAHN, Daniel ; KIRCHER, Stefan ; HERMANNNS, Heike M. ; GEIER, Andreas: Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865 (2019), Nr. 5, S. 943–953
- [Jarrett Kelsey et al. 2018] JARRETT KELSEY, E. ; CIARAN, Lee ; MARCO, De G. ; AYREA, Hurley ; GILLARD BAIBA, K. ; DOERFLER ALEXANDRIA, M. ; ANG, Li ; POWNALL HENRY, J. ; GANG, Bao ; LAGOR WILLIAM, R.: Somatic editing of *Ildr* with adeno-associated viral-crispr is an efficient tool for atherosclerosis research. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (2018), Nr. 9, S. 1997–2006
- [Jojima et al. 2016] JOJIMA, Teruo ; TOMOTSUNE, Takanori ; IJIMA, Toshie ; AKIMOTO, Kazumi ; SUZUKI, Kunihiro ; ASO, Yoshimasa: Empagliflozin (an SGLT2 inhibitor), alone or in combination with linagliptin (a DPP-4 inhibitor), prevents steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and diabetes. In: *Diabetology & Metabolic Syndrome* 8 (2016), S. 45
- [Joseph et al. 1991] JOSEPH, A. E. ; SAVERYMUTTU, S. H. ; AL-SAM, S. ; COOK, M. G. ; MAXWELL, J. D.: Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. In: *Clinical Radiology* 43 (1991), Nr. 1, S. 26–31
- [Kantartzis et al. 2010] KANTARTZIS, K. ; MACHANN, J. ; SCHICK, F. ; FRITSCHKE, A. ; HÄRING, H.-U. ; STEFAN, N.: The impact of liver fat vs visceral fat in determining categories of prediabetes. In: *Diabetologia* 53 (2010), Nr. 5, S. 882–889
- [Kaplan 1989] KAPLAN, N. M.: The deadly quartet: Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. In: *Archives of Internal Medicine* 149 (1989), Nr. 7, S. 1514–1520

- [Kelly et al. 2008] KELLY, T. ; YANG, W. ; CHEN, C.-S. ; REYNOLDS, K. ; HE, J.: Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. In: *International Journal Of Obesity* 32 (2008), 07, S. 1431
- [Kent et al. 1976] KENT, G. ; GAY, S. ; INOUE, T. ; BAHU, R. ; MINICK, O. T. ; POPPER, H.: Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (1976), 10, Nr. 10, S. 3719–3722
- [Knook et al. 1982] KNOOK, D. L. ; SEFFELAAR, A. M. ; LEEUW, A. M. de: Fat-storing cells of the rat liver: Their isolation and purification. In: *Experimental Cell Research* 139 (1982), Nr. 2, S. 468–471
- [Kohli et al. 2010] KOHLI, Rohit ; KIRBY, Michelle ; XANTHAKOS, Stavra A. ; SOFTIC, Samir ; FELDSTEIN, Ariel E. ; SAXENA, Vijay ; TANG, Peter H. ; MILES, Lili ; MILES, Michael V. ; BALISTRERI, William F. ; WOODS, Stephen C. ; SEELEY, Randy J.: High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology* 52 (2010), 09, Nr. 3, S. 934–944
- [Kowalewska et al. 2011] KOWALEWSKA, Paulina M. ; PATRICK, Amanda L. ; FOX-ROBICHAUD, Alison E.: Innate immunity of the liver microcirculation. In: *Cell and Tissue Research* 343 (2011), Jan, Nr. 1, S. 85–96
- [Krams et al. 2010] KRAMS, M. ; FRAHM S., O. ; KELLNER, U. ; MAWRIN, C. ; KG, Georg Thieme V. (Hrsg.): *Kurzlehrbuch Pathologie*. Georg Thieme Verlag KG, 2010
- [Kälsch et al. 2015] KÄLSCH, Julia ; BECHMANN, Lars P. ; HEIDER, Dominik ; BEST, Jan ; MANKA, Paul ; KÄLSCH, Hagen ; SOWA, Jan-Peter ; MOEBUS, Susanne ; SLOMIANY, Uta ; JÖCKEL, Karl-Heinz ; ERBEL, Raimund ; GERKEN, Guido ; CANBAY, Ali: Normal liver enzymes are correlated with severity of metabolic syndrome in a large population based cohort. In: *Scientific Reports* 5 (2015)
- [Köhler 1904] KÖHLER, August: Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. In: *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie* (1904), Nr. 21:128–165 und 273–304
- [Lau et al. 2016] LAU, Eunice Yuen T. ; LO, Jessica ; CHENG, Bowie Yik L. ; MA, Mark Kin F. ; LEE, Joyce Man F. ; NG, Johnson Kai Y. ; CHAI, Stella ; LIN, Chi H. ; TSANG, Suk Y. ; MA, Stephanie ; NG, Irene Oi L. ; LEE, Terence Kin W.: Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. In: *Cell Reports* 15 (2016), 2019/01/24, Nr. 6, S. 1175–1189

- [Le et al. 2018] LE, Gengyun ; NOVOTNY, Susan A. ; MADER, Tara L. ; GREISING, Sarah M. ; CHAN, Sunny S. K. ; KYBA, Michael ; LOWE, Dawn A. ; WARREN, Gordon L.: A moderate oestradiol level enhances neutrophil number and activity in muscle after traumatic injury but strength recovery is accelerated. In: *The Journal of Physiology* 596 (2018), 2019/01/25, Nr. 19, S. 4665–4680
- [Lee et al. 2013] LEE, Su J. ; KANG, Jeong H. ; CHOI, Soo Y. ; SUK, Ki T. ; KIM, Dong J. ; KWON, Oh-Shin: Pkc $\delta$  as a regulator for tgfb $\beta$ 1-induced  $\alpha$ -sma production in a murine nonalcoholic steatohepatitis model. In: *Plos One* 8 (2013), 02, Nr. 2, S. 55979
- [Lee et al. 2010] LEE, Woo-Yong ; MORIARTY, Tara J. ; WONG, Connie H. Y. ; ZHOU, Hong ; STRIETER, Robert M. ; ROOIJEN, Nico van ; CHACONAS, George ; KUBES, Paul: An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. In: *Nature Immunology* 11 (2010), 03, S. 295
- [Lehmann 1910] LEHMANN, Hans: Über einen Filter für Ultraviolette Strahlungen und seine Anwendungen. In: *Berichte der deutschen Physikalischen Gesellschaft* 21 (1910)
- [Lehr et al. 1999] LEHR, Hans-Anton ; VOLLMAR, Brigitte ; VAJKOCZY, Peter ; MENGER, Michael D.: *Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells*. Bd. 300. Academic Press, 1999. – 462–481 S
- [Leite et al. 2014] LEITE, Nathalie C. ; VILLELA-NOGUEIRA, Cristiane A. ; CARDOSO, Claudia R. L. ; SALLES, Gil F.: Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopathological interplay to diagnosis and treatment. In: *World journal of gastroenterology* 20 (2014), 07, Nr. 26, S. 8377–8392
- [Ley et al. 2007] LEY, Klaus ; LAUDANNA, Carlo ; CYBULSKY, Myron I. ; NOURSHARGH, Sussan: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (2007), 09, S. 678
- [Li et al. 2009] LI, Feng-Chieh ; LIU, Yuan ; HUANG, Guan-Tarn ; CHIOU, Ling-Ling ; LIANG, Jhih-Huei ; SUN, Tzu-Lin ; DONG, Chen-Yuan ; LEE, Hsuan-Shu: In vivo dynamic metabolic imaging of obstructive cholestasis in mice. In: *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296 (2009), 2019/03/02, Nr. 5, S. 1091–1097
- [Li et al. 2015] LI, Linhao ; LI, Haishan ; GARZEL, Brandy ; YANG, Hui ; SUEYOSHI, Tatsuya ; LI, Qing ; SHU, Yan ; ZHANG, Junran ; HU, Bingfang ; HEYWARD, Scott ; MOELLER, Timothy ; XIE, Wen ; NEGISHI, Masahiko ; WANG, Hongbing: SLC13A5 is a novel transcriptional target of the pregnane X receptor and sensitizes drug-induced steatosis in human liver. In: *Molecular pharmacology* 87 (2015), 04, Nr. 4, S. 674–682

- [Liebig et al. 2018] LIEBIG, Marie ; HASSANZADA, Alireza ; KÄMMERLING, Malte ; GENZ, Berit ; VOLLMAR, Brigitte ; ABSHAGEN, Kerstin: Microcirculatory disturbances and cellular changes during progression of hepatic steatosis to liver tumors. In: *Experimental Biology and Medicine* 243 (2018), Nr. 1, S. 1–12
- [Lomonaco et al. 2012] LOMONACO, Romina ; ORTIZ-LOPEZ, Carolina ; ORSAK, Beverly ; WEBB, Amy ; HARDIES, Jean ; DARLAND, Celia ; FINCH, Joan ; GASTALDELLI, Amalia ; HARRISON, Stephen ; TIO, Fermin ; CUSI, Kenneth: Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 55 (2012), Nr. 5, S. 1389–1397
- [Lumeng et al. 2006] LUMENG, Carey N. ; DEYOUNG, Stephanie M. ; BODZIN, Jennifer L. ; SALTIEL, Alan R.: Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. In: *Diabetes* 56 (2006), Nr. 1, S. 16–23
- [Lüllmann-Rauch 2009] LÜLLMANN-RAUCH, R. ; THIEME-VERLAGSGRUPPE (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage*. Bd. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, 2009
- [Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012] LÜLLMANN-RAUCH, R. ; PAULSEN, F. ; THIEME-VERLAGSGRUPPE (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage*. Georg Thieme Verlag KG, 2012
- [Maina et al. 2012] MAINA, Virginia ; SUTTI, Salvatore ; LOCATELLI, Irene ; VIDALI, Matteo ; MOMBELLO, Cristina ; BOZZOLA, Cristina ; ALBANO, Emanuele: Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. In: *Clinical Science* 122 (2012), Nr. 11, S. 545–554
- [Marin et al. 2016] MARIN, Veronica ; ROSSO, Natalia ; DAL BEN, Matteo ; RASENI, Alan ; BOSCHELLE, Manuela ; DEGRASSI, Cristina ; NEMECKOVA, Ivana ; NACHTIGAL, Petr ; AVELLINI, Claudio ; TIRIBELLI, Claudio ; GAZZIN, Silvia: An animal model for the juvenile non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. In: *PLoS ONE* 11 (2016), Nr. 7
- [Marques et al. 2012] MARQUES, Pedro E. ; AMARAL, Sylvia S. ; PIRES, Daniele A. ; NOGUEIRA, Laura L. ; SORIANI, Frederico M. ; LIMA, Bráulio H. F. ; LOPES, Gabriel A. O. ; RUSSO, Remo C. ; AVILA, Thiago V. ; MELGACCO, Juliana G. ; OLIVEIRA, Andre G. ; PINTO, Marcelo A. ; LIMA, Cristiano X. ; DE PAULA, Ana M. ; CARA, Denise C. ; LEITE, Maria F. ; TEIXEIRA, Mauro M. ; MENEZES, Gustavo B.: Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. In: *Hepatology* 56 (2012), 2019/03/02, Nr. 5, S. 1971–1982

- [Marques et al. 2015a] MARQUES, Pedro E. ; ANTUNES, Maísa M. ; DAVID, Bruna A. ; PEREIRA, Rafaela V. ; MENEZES, Mauro M. T. ; GUSTAVO, B.: Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. In: *Nature Protocols* 10 (2015)
- [Marques et al. 2015b] MARQUES, Pedro E. ; OLIVEIRA, Andre G. ; PEREIRA, Rafaela V. ; DAVID, Bruna A. ; GOMIDES, Lindisley F. ; SARAIVA, Adriana M. ; PIRES, Daniele A. ; NOVAES, Julia T. ; PATRICIO, Daniel O. ; CISALPINO, Daniel ; MENEZES-GARCIA, Zelia ; LEEVY, W. M. ; CHAPMAN, Sarah E. ; MAHECHA, German A. ; MARQUES, Rafael E. ; GUABIRABA, Rodrigo ; MARTINS, Vicente P. ; SOUZA, Danielle G. ; MANSUR, Daniel S. ; TEIXEIRA, Mauro M. ; LEITE, M. F. ; MENEZES, Gustavo B.: Hepatic dna deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. In: *Hepatology* 61 (2015), 2019/03/02, Nr. 1, S. 348–360
- [Marques et al. 2015c] MARQUES, Pedro E. ; OLIVEIRA, André G. ; CHANG, Lynne ; PAULANETO, Heitor A. ; MENEZES, Gustavo B.: Understanding liver immunology using intravital microscopy. In: *Journal of Hepatology* 63 (2015), Nr. 3, S. 733–742
- [Martius et al. 2014] MARTIUS, Gesa ; ALWAHSH, Salamah M. ; RAVE-FRÄNK, Margret ; HESS, Clemens F. ; CHRISTIANSEN, Hans ; RAMADORI, Giuliano ; MALIK, Ihtzaz A.: Hepatic fat accumulation and regulation of FAT/CD36: an effect of hepatic irradiation. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (2014), 07, Nr. 8, S. 5379–5392
- [Marvie et al. 2010] MARVIE, Pierrick ; LISBONNE, Mariette ; LHELGOUALCH, Annie ; RAUCH, Michel ; TURLIN, Bruno ; PREISSER, Laurence ; BOURD-BOITTIN, Katia ; THERET, Nathalie ; GASCAN, Hugues ; PIQUET-PELLORCE, Claire ; SAMSON, Michel: Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (2010), Nr. 6b, S. 1726–1739
- [Mathurin et al. 2009] MATHURIN, Philippe ; HOLLEBECQUE, Antoine ; ARNALSTEEN, Laurent ; BUOB, David ; LETEURTRE, Emmanuelle ; CAIAZZO, Robert ; PIGEYRE, Marie ; VERKINDT, Hélène ; DHARANCY, Sébastien ; LOUVET, Alexandre ; ROMON, Monique ; PATTOU, François: Prospective Study of the Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Liver Injury in Patients Without Advanced Disease. In: *Gastroenterology* 137 (2009), Nr. 2, S. 532–540
- [Matthews et al. 2018] MATTHEWS, Vance B. ; RUDNICKA, Caroline ; SCHLAICH, Markus P.: A cautionary note for researchers treating mice with the neurotransmitter norepinephrine. In: *Biochemistry and biophysics reports* 15 (2018), S. 103–106
- [Mayer et al. 2018] MAYER, Jürgen ; ROBERT-MORENO, Alexandre ; SHARPE, James ; SWOGER, Jim: Attenuation artifacts in light sheet fluorescence microscopy corrected by OPTiSPIM. In: *Light: Science & Applications* 7 (2018), Nr. 1, S. 70

- [McCuskey et al. 2004] MCCUSKEY, Robert S. ; ITO, Yoshiya ; ROBERTSON, Graham R. ; MCCUSKEY, Margaret K. ; PERRY, Michael ; FARRELL, Geoffrey C.: Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. In: *Hepatology* 40 (2004), Nr. 2, S. 386–393
- [McDonald et al. 2008] MCDONALD, Braedon ; MCAVOY, Erin F. ; LAM, Florence ; GILL, Varinder ; MOTTE, Carol de la ; SAVANI, Rashmin C. ; KUBES, Paul: Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. In: *Journal of Experimental Medicine* (2008)
- [McDonald et al. 2010] MCDONALD, Braedon ; PITTMAN, Keir ; MENEZES, Gustavo B. ; HIROTA, Simon A. ; SLABA, Ingrid ; WATERHOUSE, Christopher C. M. ; BECK, Paul L. ; MURUVE, Daniel A. ; KUBES, Paul: Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. In: *Science* 330 (2010), 10, Nr. 6002, S. 362
- [McEver 2015] MCEVER, Rodger P.: Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. In: *Cardiovascular Research* 107 (2015), Nr. 3, S. 331–339
- [Melton und Yee 2007] MELTON, Andrew C. ; YEE, Hal F.: Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. In: *Hepatology* 45 (2007), 2019/01/26, Nr. 6, S. 1446–1453
- [Menger et al. 1991] MENGER, M. D. ; MARZI, I. ; MESSMER, K.: In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. In: *European Surgical Research* 23 (1991), Nr. 3-4, S. 158–169
- [Michelotti et al. 2013] MICHELOTTI, Gregory A. ; MACHADO, Mariana V. ; DIEHL, Anna M.: NAFLD, NASH and liver cancer. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10 (2013), Nr. 11, S. 656–665
- [Miles und Jensen 2005] MILES, John M. ; JENSEN, Michael D.: Counterpoint: Visceral Adiposity Is Not Causally Related to Insulin Resistance. In: *Diabetes Care* 28 (2005), Nr. 9, S. 2326–2328
- [Montalvany-Antonucci et al. 2018] MONTALVANY-ANTONUCCI, Carina C. ; ZICKER, Marina C. ; FERREIRA, Adaliene Versiani M. ; MACARI, Soraia ; RAMOS-JUNIOR, Erivan S. ; GOMEZ, Ricardo S. ; PEREIRA, Thaís Santos F. ; MADEIRA, Mila Fernandes M. ; FUKADA, Sandra Y. ; ANDRADE, Ildeu ; SILVA, Tarcília A.: High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 59 (2018), S. 93–103
- [Moreno-Fernández et al. 2018] MORENO-FERNÁNDEZ, Silvia ; GARCÉS-RIMÓN, Marta ; VERA, Gema ; ASTIER, Julien ; LANDRIER, Jean F. ; MIGUEL, Marta: High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. In: *Nutrients* 10 (2018), Nr. 10

- [Mori et al. 1993] MORI, Takashi ; OKANOUE, Takeshi ; SAWA, Yoshihiko ; HORI, Naoki ; OHTA, Masaharu ; KAGAWA, Keizo: Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. In: *Hepatology* 17 (1993), Nr. 5, S. 891–897
- [Mouzaki et al. 2013] MOUZAKI, Marialena ; COMELLI, Elena M. ; ARENDT, Bianca M. ; BONEN- GEL, Julia ; FUNG, Scott K. ; FISCHER, Sandra E. ; MCGILVRAY, Ian D. ; ALLARD, Johane P.: Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 58 (2013), Nr. 1, S. 120–127
- [Murray et al. 2005] MURRAY, A. K. ; HERRICK, A. L. ; MOORE, T. L. ; KING, T. A. ; GRIFFITHS, C. E. M.: Dual wavelength (532 and 633 nm) laser Doppler imaging of plaque psoriasis. In: *British Journal of Dermatology* 152 (2005), 2019/05/26, Nr. 6, S. 1182–1186
- [Nakagawa 2015] NAKAGAWA, Hayato: Recent advances in mouse models of obesity- and nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis. In: *World Journal of Hepatology* 7 (2015), 08, Nr. 17, S. 2110–2118
- [Nascimento et al. 2019] NASCIMENTO, Alessandro R. ; GOMES, Fabiana ; MACHADO, Marcus V. ; ALBUQUERQUE, Cassiano Goncalves-de ; BOUSQUET, Pascal ; TIBIRICA, Eduardo: I<sub>1</sub>-imidazoline receptor-mediated cardiovascular and metabolic effects in high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. In: *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 217 (2019), S. 18–25
- [Nestmann et al. 1979] NESTMANN, Earle R. ; DOUGLAS, George R. ; MATULA, Tibor I. ; GRANT, Caroline E. ; KOWBEL, David J.: Mutagenic Activity of Rhodamine Dyes and Their Impurities as Detected by Mutation Induction in Salmonella and DNA Damage in Chinese Hamster Ovary Cells. In: *Cancer Research* 39 (1979), 11, Nr. 11, S. 4412
- [Neuschwander-Tetri 2010] NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A.: Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. In: *Hepatology* 52 (2010), Nr. 2, S. 774–788
- [Nitzan et al. 2014] NITZAN, Meir ; ROMEM, Ayal ; KOPPEL, Robert: Pulse oximetry: fundamentals and technology update. In: *Medical devices* 7 (2014), 07, S. 231–239
- [Nobili et al. 2008] NOBILI, Valerio ; MANCO, Melania ; DEVITO, Rita ; DI CIOMMO, Vincenzo ; COMPARCOLA, Donatella ; SARTORELLI, Maria R. ; PIEMONTE, Fiorella ; MARCELLINI, Matilde ; ANGULO, Paul: Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial. In: *Hepatology* 48 (2008), Nr. 1, S. 119–128
- [Oberg et al. 1979] OBERG, Ake ; NILSSON, Gert ; TENLAND, T. ; HOLMSTROM, A. ; LEWIS, D. H.: Use of new laser Doppler flow meter for measurement of capillary blood flow in skeletal muscle after bullet wounding. Bd. 489. *Acta chirurgica scandinavica*, 02 1979



- [Oda et al. 2003] ODA, M. ; YOKOMORI, H. ; HAN, J. Y.: Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. In: *Clin Hemorheol Microcirc.* 29(3-4) (2003)
- [Oda et al. 2006] ODA, Masaya ; YOKOMORI, Hiroaki ; HAN, Jing-Yan: Regulatory mechanisms of hepatic microcirculatory hemodynamics: Hepatic arterial system. In: *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 34 (2006), S. 11–26
- [Oh et al. 2015] OH, Sechang ; SHIDA, Takashi ; YAMAGISHI, Kazumasa ; TANAKA, Kiyoji ; SO, Rina ; TSUJIMOTO, Takehiko ; SHODA, Junichi: Moderate to vigorous physical activity volume is an important factor for managing nonalcoholic fatty liver disease: A retrospective study. In: *Hepatology* 61 (2015), Nr. 4, S. 1205–1215
- [Paradis et al. 2009] PARADIS, Valérie ; ZALINSKI, Stéphane ; CHELBI, Emna ; GUEDJ, Nathalie ; DEGOS, Françoise ; VILGRAIN, Valérie ; BEDOSSA, Pierre ; BELGHITI, Jacques: Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: A pathological analysis. In: *Hepatology* 49 (2009), Nr. 3, S. 851–859
- [Park et al. 2003] PARK, Yong-Woo ; ZHU, Shankuan ; PALANIAPPAN, Latha ; HESHKA, Stanley ; CARNETHON, Mercedes R. ; HEYMSFIELD, Steven B.: The Metabolic Syndrome: Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. In: *Archives of internal medicine* 163 (2003), 02, Nr. 4, S. 427–436
- [Paschoal et al. 2018] PASCHOAL, Vivian A. ; BELCHIOR, Thiago ; AMANO, Mariane T. ; BURGOS-SILVA, Marina ; PEIXOTO, Albert S. ; MAGDALON, Juliana ; VIEIRA, Thayna S. ; ANDRADE, Maynara L. ; MORENO, Mayara F. ; CHIMIN, Patricia ; CÂMARA, Niels O. ; FESTUCCIA, William T.: Constitutive activation of the nutrient sensor mtorc1 in myeloid cells induced by tsc1 deletion protects mice from diet-induced obesity. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 62 (2018), 2019/01/25, Nr. 17, S. 1800283
- [Payette et al. 2005] PAYETTE, J. R. ; KOHLENBERG, Elicia ; LEONARDI, Lorenzo ; PABBIES, Arone ; KERR, Paul ; LIU, Kan-Zhi ; SOWA, Michael: Assessment of Skin Flaps Using Optically Based Methods for Measuring Blood Flow and Oxygenation. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 115 (2005), März
- [Pellicoro et al. 2014] PELLICORO, Antonella ; RAMACHANDRAN, Prakash ; IREDALE, John P. ; FALLOWFIELD, Jonathan A.: Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. In: *Nature Reviews Immunology* 14 (2014), 02, S. 181 EP –
- [Peralta et al. 2013] PERALTA, Carmen ; JIMÉNEZ-CASTRO, Mónica B. ; GRACIA-SANCHO, Jordi: Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. In: *Journal of Hepatology* 59 (2013), Nr. 5, S. 1094–1106

- [Pires et al. 2014] PIRES, Daniele A. ; MARQUES, Pedro E. ; PEREIRA, Rafaela V. ; DAVID, Bruna A. ; GOMIDES, Lindisley F. ; DIAS, Ana Carolina F. ; NUNES-SILVA, Albená ; PINHO, Vanessa ; CARA, Denise C. ; VIEIRA, Leda Q. ; TEIXEIRA, Mauro M. ; MENEZES, Gustavo B.: Interleukin-4 deficiency protects mice from acetaminophen-induced liver injury and inflammation by prevention of glutathione depletion. In: *Inflammation Research* 63 (2014), Nr. 1, S. 61–69
- [Ploem 1971] PLOEM, Johan S.: A study of filters and light sources in immunofluorescence microscopy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 177 (1971), S. 414–429
- [Pogribny et al. 2018] POGRIBNY, Igor P. ; DREVAL, Kostiantyn ; KINDRAT, Iryna ; MELNYK, Stepan ; JIMENEZ, Leandro ; CONTI, Aline de ; TRYNDYAK, Volodymyr ; POGRIBNA, Marta ; ORTEGA, Juliana F. ; JAMES, S. J. ; RUSYN, Ivan ; BELAND, Frederick A.: Epigenetically mediated inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase and the associated dysregulation of 1-carbon metabolism in nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. In: *The FASEB Journal* 32 (2018), Nr. 3, S. 1591–1601
- [Ponholzer et al. 2007] PONHOLZER, A. ; TEMML, C. ; RAUCHENWALD, M. ; MARSZALEK, M. ; MADERSBACHER, S.: Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? In: *Int J Impot Res* 20 (2007), 09, Nr. 1, S. 100–104
- [Prabhavathi et al. 2016] PRABHAVATHI, Fernandes ; OLDACH, David ; TAISHI, Hashiguchi ; YUKA, Shirakata ; HIROYUKI, Yoneyama ; GHOLAM, Pierre M.: Solithromycin Diminishes Steatohepatitis by Modulating Gluconeogenesis and Inhibits Tumor Growth in a Diabetic Mouse Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis. In: *Journal of Immunology, Infection & Inflammatory Diseases* 1 (2016), S. 1–14
- [Prashanth et al. 2009] PRASHANTH, M. ; GANESH, H. K. ; VIMA, M. V. ; JOHN, M. ; BANDGAR, T. ; JOSHI, S. R. ; SHAH, S. R. ; RATHI, P. M. ; JOSHI, A. S. ; THAKKAR, H. ; MENON, P. S. ; SHAH, N. S.: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. In: *J Assoc Physicians India* 57 (2009), S. 205–210
- [Price und Jerome 2011] PRICE, Robert L. ; JEROME, W. Gray J.: *Basic Confocal Microscopy*. Berlin Heidelberg : Springer Science & Business Media, 2011
- [Puche et al. 2011] PUCHE, Juan E. ; SAIMAN, Yedidya ; FRIEDMAN, Scott L.: Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. In: *Comprehensive Physiology* (2011)
- [Rahman et al. 2013] RAHMAN, Rubayat ; HAMMOUD, Ghassan M. ; ALMASHHRAWI, Ashraf A. ; AHMED, Khulood T. ; IBDAH, Jamal A.: Primary hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: An update. In: *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 5 (2013), 09, Nr. 9, S. 186–194

- [Raman et al. 2013] RAMAN, Maitreyi ; AHMED, Iftikhar ; GILLEVET, Patrick M. ; PROBERT, Chris S. ; RATCLIFFE, Norman M. ; SMITH, Steve ; GREENWOOD, Rosemary ; SIKAROODI, Masoumeh ; LAM, Victor ; CROTTY, Pam ; BAILEY, Jennifer ; MYERS, Robert P. ; RIOUX, Kevin P.: Fecal Microbiome and Volatile Organic Compound Metabolome in Obese Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 11 (2013), Nr. 7, S. 868–875
- [Rastogi et al. 2013] RASTOGI, Archana ; MAIWALL, Rakhi ; BIHARI, Chhagan ; AHUJA, Arvind ; KUMAR, Ashish ; SINGH, Tarandeep ; WANI, Zeeshan A. ; SARIN, Shiv K.: Cirrhosis histology and Laennec staging system correlate with high portal pressure. In: *Histopathology* 62 (2013), Nr. 5, S. 731–741
- [Ratziu et al. 2005] RATZIU, Vlad ; CHARLOTTE, Frédéric ; HEURTIER, Agnès ; GOMBERT, Sophie ; GIRAL, Philippe ; BRUCKERT, Eric ; GRIMALDI, André ; CAPRON, Frédérique ; POYNARD, Thierry: Sampling Variability of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Gastroenterology* 128 (2005), Nr. 7, S. 1898–1906
- [Rauchfuss et al. 2010] RAUCHFUSS, Falk ; SCHEUERLEIN, Hubert ; LUDEWIG, Stefan ; ÜBERRÜCK, Torsten ; HEISE, Michael ; ZANOW, Jürgen ; SETTMACHER, Utz: In vivo assessment of the hepatic microcirculation after mesenterico-portal bypass (REX-shunt) using orthogonal polarization spectral imaging. In: *Liver International* 30 (2010), 2019/05/26, Nr. 9, S. 1339–1345
- [Reetz et al. 2013] REETZ, Julia ; GENZ, Berit ; MEIER, Claudia ; KOWTHARAPU, Bhavani S. ; TIMM, Franziska ; VOLLMAR, Brigitte ; HERCHENRÖDER, Ottmar ; ABSHAGEN, Kerstin ; PÜTZER, Brigitte M.: Development of Adenoviral Delivery Systems to Target Hepatic Stellate Cells In Vivo. In: *Plos One* 8 (2013), 06, Nr. 6, S. 67091
- [Reid et al. 2016] REID, D. T. ; REYES, J. L. ; McDONALD, B. A. ; VO, T. ; REIMER, R. A. ; EKSTEEN, B.: Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. In: *Plos One* 11 (2016), Nr. 7
- [Rinella 2015] RINELLA, M.: Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review. In: *JAMA* 313 (2015), Nr. 22, S. 2263–2273
- [Ritsma et al. 2013] RITSMA, L. ; STELLER, E. J. ; ELLENBROEK, S. I. ; KRANENBURG, O. ; RINKES, I. H. B. ; RHEENEN, J. van: Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. In: *Nature Protocols* 8 (2013), S. 583–594
- [Rock et al. 2010] ROCK, Kenneth L. ; LATZ, Eicke ; ONTIVEROS, Fernando ; KONO, Hajime: The Sterile Inflammatory Response. In: *Annual Review of Immunology* 28 (2010), Nr. 1, S. 321–342

- [Rosenstengel et al. 2011] ROSENSTENGEL, Stephan ; STOEPPELER, Sandra ; BAHDE, Ralf ; SPIEGEL, Hans-Ullrich ; PALMES, Daniel: Type of Steatosis Influences Microcirculation and Fibrogenesis in Different Rat Strains. In: *Journal of Investigative Surgery* 24 (2011), Nr. 6, S. 273–282
- [Rosmorduc und Fartoux 2012] ROSMORDUC, O. ; FARTOUX, L.: HCC and NASH: How strong is the clinical demonstration? In: *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 36 (2012), Nr. 3, S. 202–208
- [Ruan und Lodish 2003] RUAN, Hong ; LODISH, Harvey F.: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14 (2003), Nr. 5, S. 447–455
- [Runge et al. 2014] RUNGE, Jurgen H. ; BAKKER, Pieter. J. ; GAEMERS, Ingrid. C. ; VERHEIJ, Joanne ; HAKVOORT, Theo B. M. ; OTTENHOFF, Roelof ; STOKER, Jaap ; NEDERVEEN, Aart J.: Quantitative Determination of Liver Triglyceride Levels with  $3T\ ^1H$ -MR Spectroscopy in Mice with Moderately Elevated Liver Fat Content. In: *Academic Radiology* 21 (2014), 2019/01/24, Nr. 11, S. 1446–1454
- [Saadeh et al. 2002] SAADEH, Sherif ; YOUNOSSI, Zobair M. ; REMER, Erick M. ; GRAMLICH, Terry ; ONG, Janus P. ; HURLEY, Maja ; MULLEN, Kevin D. ; COOPER, James N. ; SHERIDAN, Michael J.: The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Gastroenterology* 123 (2002), Nr. 3, S. 745–750
- [Saederup et al. 2010] SAEDERUP, Noah ; CARDONA, Astrid E. ; CROFT, Kelsey ; MIZUTANI, Makiko ; COTLEUR, Anne C. ; TSOU, Chia-Lin ; RANSOHOFF, Richard M. ; CHARO, Israel F.: Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in *ccr2*-red fluorescent protein knock-in mice. In: *Plos One* 5 (2010), Nr. 10, S. 1–12
- [Safadi et al. 2004] SAFADI, Rifaat ; OHTA, Masayuki ; ALVAREZ, Carlos E. ; FIEL, M. I. ; BANSAL, Meena ; MEHAL, Wajahat Z. ; FRIEDMAN, Scott L.: Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. In: *Gastroenterology* 127 (2004), 2019/01/26, Nr. 3, S. 870–882
- [Saito et al. 2015] SAITO, Kosuke ; UEBANSO, Takashi ; MAEKAWA, Keiko ; ISHIKAWA, Masaki ; TAGUCHI, Ryo ; NAMMO, Takao ; NISHIMAKI-MOGAMI, Tomoko ; UDAGAWA, Haruhide ; FUJII, Masato ; SHIBAZAKI, Yuichiro ; YONEYAMA, Hiroyuki ; YASUDA, Kazuki ; SAITO, Yoshiro: Characterization of hepatic lipid profiles in a mouse model with nonalcoholic steatohepatitis and subsequent fibrosis. In: *Scientific Reports* 5 (2015), S. 12466
- [Samuel et al. 2004] SAMUEL, Varman T. ; LIU, Zhen-Xiang ; QU, Xianqin ; ELDER, Benjamin D. ; BILZ, Stefan ; BEFROY, Douglas ; ROMANELLI, Anthony J. ; SHULMAN, Gerald I.: Mechanism of

- Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. In: *The Journal of Biological Chemistry* (2004)
- [Schießler et al. 2002] SCHIESSLER, C. ; SCHAUDIG, S. ; HARRIS, A. G. ; CHRIST, F.: „Orthogonal polarization spectral imaging“ Eine neue klinische Methode für das Monitoring der Mikrozirkulation. In: *Der Anaesthesist* 51 (2002), Nr. 7, S. 576–579
- [Schikora 2017] SCHIKORA, Stephanie: Alarmierende Daten - WHO-Studie: Immer mehr Kinder und Jugendliche sind fettleibig. In: *Diabetes aktuell* 15 (2017), Nr. 07, S. 282–282
- [Schleicher et al. 2014] SCHLEICHER, J. ; GUTHKE, R. ; DAHMEN, U. ; DIRSCH, O. ; HOLZHUETTER, H. G. ; SCHUSTER, S.: A theoretical study of lipid accumulation in the liver—implications for nonalcoholic fatty liver disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (2014), Nr. 1, S. 62–69
- [Schuppan und Schattenberg 2013] SCHUPPAN, Detlef ; SCHATTEBERG, Jörn M.: Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 (2013), S. 68–76
- [Schwabe und Luedde 2018] SCHWABE, Robert F. ; LUEDDE, Tom: Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15 (2018), Nr. 12, S. 738–752
- [Seifalian et al. 1999] SEIFALIAN, A. M. ; PIASECKI, C. ; AGARWAL, A. ; DAVIDSON, B. R.: The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. In: *Transplantation* 68 (1999), Nr. 6, S. 780–784
- [Seifalian et al. 1998] SEIFALIAN, Alexander M. ; CHIDAMBARAM, Veeraraghavan ; ROLLES, Keith ; DAVIDSON, Brian R.: In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. In: *Liver Transplantation and Surgery* 4 (1998), Nr. 1, S. 71–77
- [Sharma et al. 2011] SHARMA, Vikram ; O'BOYLE, Ciaran ; JEFFERY, Steven: Man or Machine? The Clinimetric Properties of Laser Doppler Imaging in Burn Depth Assessment. In: *Journal of burn care & research* 32 (2011), 01
- [Shin et al. 2019] SHIN, Su-Kyung ; CHO, Hyun-Woo ; SONG, Seung-Eun ; BAE, Jae-Hoon ; IM, Seung-Soon ; HWANG, Inha ; HA, Hunjoo ; SONG, Dae-Kyu: Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. In: *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* (2019)
- [Shpyleva et al. 2014] SHPYLEVA, Svitlana I. ; POGRIBNA, Marta ; COZART, Christy R. ; BRYANT, Matthew S. ; MUSKHELISHVILI, Levan ; TRYNDYAK, Volodymyr P. ; ROSS, Sharon A. ; BELAND,

- Frederick A. ; POGRIBNY, Igor P.: Interstrain differences in the progression of nonalcoholic steatohepatitis to fibrosis in mice are associated with altered hepatic iron metabolism. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 25 (2014)
- [Siegmond et al. 2013] SIEGMUND, Kerstin ; LEE, Woo-Yong ; TCHANG, Vincent S. ; STIESS, Michael ; TERRACCIANO, Luigi ; KUBES, Paul ; PIETERS, Jean: Coronin 1 is dispensable for leukocyte recruitment and liver injury in concanavalin A-induced hepatitis. In: *Immunology Letters* 153 (2013), Nr. 1, S. 62–70
- [Singh et al. 2013] SINGH, Divya ; DAS, Chandan J. ; BARUAH, Manas P.: Imaging of non alcoholic fatty liver disease: A road less travelled. In: *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 17 (2013), Nov-Dec, Nr. 6, S. 990–995
- [Singh et al. 2015] SINGH, Shivaram P. ; SINGH, Ayaskanta ; MISRA, Debasis ; MISRA, Bijay ; PATI, Girish K. ; PANIGRAHI, Manas K. ; KAR, Sanjib K. ; BHUYAN, Pallavi ; PATNAIK, Kaurmudee ; MEHER, Chudamani ; AGRAWAL, Omprakash ; ROUT, Niranjan ; SWAIN, Manorama ; AICH, Palok: Risk Factors Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Indians: A Case Control Study. In: *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 5 (2015), Nr. 4, S. 295–302
- [Siow et al. 2016] SIOW, Way ; POORTEN, David van der ; GEORGE, Jacob: Epidemiological Trends in NASH as a Cause for Liver Transplant. In: *Current Hepatology Reports* 15 (2016), Nr. 2, S. 67–74
- [Solaß und Tannapfel 2013] SOLASS, W. ; TANNAPFEL, A.: Histopathologie und Leberbiopsie des hepatozellulären Karzinoms. In: *Visceral Medicine* 29 (2013), Nr. 2, S. 78–83
- [Song et al. 1995] SONG, L. ; HENNINK, E. J. ; YOUNG, I. T. ; TANKE, H. J.: Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. In: *Biophysical journal* 68 (1995), 06, Nr. 6, S. 2588–2600
- [Sriram et al. 2016] SRIRAM, Krishna ; LAUGHLIN, Justin G. ; RANGAMANI, Padmini ; TARTAKOVSKY, Daniel M.: Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells. In: *Biophysical journal* 111 (2016), 07, Nr. 1, S. 208–221
- [Stephenson et al. 2018] STEPHENSON, Kristen ; KENNEDY, Lindsey ; HARGROVE, Laura ; DEMIEVILLE, Jennifer ; THOMSON, Joanne ; ALPINI, Gianfranco ; FRANCIS, Heather: Updates on dietary models of nonalcoholic fatty liver disease: current studies and insights. In: *Gene expression* 18 (2018), 03, Nr. 1, S. 5–17
- [Stienstra et al. 2010] STIENSTRA, Rinke ; SAUDALE, Fredy ; DUVAL, Caroline ; KESHTKAR, Shohreh ; GROENER, Johanna E. M. ; ROOIJEN, Nico van ; STAELS, Bart ; KERSTEN, Sander ; MÜLLER, Michael: Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 $\beta$ -dependent

- suppression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activity. In: *Hepatology* 51 (2010), Nr. 2, S. 511–522
- [Streba et al. 2015] STREBA, Letiția Adela M. ; VERE, Cristin C. ; ROGOVEANU, Ion ; STREBA, Costin T.: Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. In: *World journal of gastroenterology* 21 (2015), 04, Nr. 14, S. 4103–4110
- [Sun et al. 2001] SUN, Cheuk-Kwan ; ZHANG, Xing-Yi ; ZIMMERMANN, Arthur ; DAVIS, Gerard ; WHEATLEY, Antony M.: Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the zucker rat1. In: *Transplantation* 72 (2001), Nr. 10
- [Sutti et al. 2014] SUTTI, Salvatore ; JINDAL, Aastha ; LOCATELLI, Irene ; VACCHIANO, Marco ; GIGLIOTTI, Luca ; BOZZOLA, Cristina ; ALBANO, Emanuele: Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in nash. In: *Hepatology* 59 (2014), 2019/01/25, Nr. 3, S. 886–897
- [Svedberg et al. 1990] SVEDBERG, Jan ; BJÖRNTORP, Per ; SMITH, Ulf ; LÖNNROTH, Peter: Free-Fatty Acid Inhibition of Insulin Binding, Degradation, and Action in Isolated Rat Hepatocytes. In: *Diabetes* 39 (1990), Nr. 5, S. 570–574
- [Tacke und Weiskirchen 2010] TACKE, F. ; WEISKIRCHEN, R.: Pathophysiologie der Leberfibrose. In: *Der Internist* 51 (2010), Nr. 1, S. 21–29
- [Taitano et al. 2015] TAITANO, Andrew A. ; MARKOW, Michael ; FINAN, Jon E. ; WHEELER, Donald E. ; GONZALVO, John P. ; MURR, Michel M.: Bariatric surgery improves histological features of nonalcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. In: *Journal of Gastrointestinal Surgery* 19 (2015), Nr. 3, S. 429–437
- [Tanaka et al. 2013] TANAKA, Shingo ; MIYANISHI, Koji ; KOBUNE, Masayoshi ; KAWANO, Yutaka ; HOKI, Toshifumi ; KUBO, Tomohiro ; HAYASHI, Tsuyoshi ; SATO, Tsutomu ; SATO, Yasushi ; TAKIMOTO, Rishu ; KATO, Junji: Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Gastroenterology* 48 (2013), Nov, Nr. 11, S. 1249–1258
- [Tannapfel et al. 2011] TANNAPFEL, Andrea ; DENK, Helmut ; DIENES, Hans-Peter ; LANGNER, Cord ; SCHIRMACHER, Peter ; TRAUNER, Michael ; FLOTT-RAHMEL, Berenike: Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. In: *Virchows Archiv* 458 (2011), May, Nr. 5, S. 511–523
- [Thomson et al. 2016] THOMSON, John P. ; OTTAVIANO, Raffaele ; UNTERBERGER, Elif ; LEMPIÄINEN, Harri ; MULLER, Arne ; TERRANOVA, Remi ; ILLINGWORTH, Robert S. ; WEBB, Shaun ; KERR, Alastair R. W. ; LYALL, Marcus J. ; DRAKE, Amanda J. ; WOLF, C. R. ;

- MOGGS, Jonathan G. ; SCHWARZ, Michael ; MEEHAN, Richard R.: Loss of Tet1 associated 5-hydroxymethylcytosine is concomitant with aberrant promoter hypermethylation in liver cancer. In: *Cancer research* 76 (2016), 05, Nr. 10, S. 3097–3108
- [Thulin et al. 2017] THULIN, Petra ; HORNBY, Robert J. ; AULI, Mariona ; NORDAHL, Gunnar ; ANTOINE, Daniel J. ; STARKEY LEWIS, Philip ; GOLDRING, Christopher E. ; PARK, B. K. ; PRATS, Neus ; GLINGHAMMAR, Björn ; SCHUPPE-KOISTINEN, Ina: A longitudinal assessment of miR-122 and GLDH as biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. In: *Biomarkers* 22 (2017), 07, Nr. 5, S. 461–469
- [Tilg und Moschen 2010] TILG, Herbert ; MOSCHEN, Alexander R.: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. In: *Hepatology* 52 (2010), Nr. 5, S. 1836–1846
- [Trak-Smayra et al. 2011] TRAK-SMAYRA, Viviane ; PARADIS, Valerie ; MASSART, Julie ; NASSER, Selim ; JEBARA, Victor ; FROMENTY, Bernard: Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. In: *International journal of experimental pathology* 92 (2011), 12, Nr. 6, S. 413–421
- [Tsuchiya et al. 2012] TSUCHIYA, Masato ; JI, Cheng ; KOSYK, Oksana ; SHYMONYAK, Svitlana ; MELNYK, Stepan ; KONO, Hiroshi ; TRYNDYAK, Volodymyr ; MUSKHELISHVILI, Levan ; POGRIBNY, Igor P. ; KAPLOWITZ, Neil ; RUSYN, Ivan: Interstrain differences in liver injury and one-carbon metabolism in alcohol-fed mice. In: *Hepatology* 56 (2012), 07, Nr. 1, S. 130–139
- [Uhlmann et al. 1999] UHLMANN, Susann ; UHLMANN, Dirk ; SPIEGEL, Hans-Ullrich: Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. In: *Journal of Investigative Surgery* 12 (1999), Nr. 4, S. 179–193
- [Uysal et al. 1998] UYSAL, K. T. ; WIESBROCK, Sarah M. ; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.: Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- $\alpha$ -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity. In: *Endocrinology* 139 (1998), Nr. 12, S. 4832
- [Vanheule et al. 2008] VANHEULE, Eline ; GEERTS, Anja M. ; VAN HUYSSSE, Jacques ; SCHELFHOUT, Daphne ; PRAET, Marleen ; VAN VLIERBERGHE, Hans ; DE VOS, Martine ; COLLE, Isabelle: An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. In: *International Journal of Experimental Pathology* 89 (2008), 12, Nr. 6, S. 419–432
- [Villeneuve et al. 1996] VILLENEUVE, J. ; DAGENAIS, M. ; HUET, P. ; ROY, A. ; LAPOINTE, R. ; MARLEAU, D.: The hepatic microcirculation in the isolated perfused human liver. In: *Hepatology* 23 (1996), Nr. 1, S. 24–31



- [Vollmar et al. 2002] VOLLMAR, Brigitte ; BAUER, Claudia ; MENGER, Michael D.: n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia\*. In: *Critical Care Medicine* 30 (2002), Nr. 5
- [Vollmar et al. 1997] VOLLMAR, Brigitte ; BURKHARDT, Markus ; MINOR, Thomas ; KLAUKE, Hiltrud ; MENGER, Michael D.: High-resolution microscopic determination of hepatic nadh fluorescence forin vivomonitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. In: *Microvascular Research* 54 (1997), Nr. 2, S. 164–173
- [Vollmar und Menger 2009] VOLLMAR, Brigitte ; MENGER, Michael D.: The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. In: *Physiological Reviews* 89 (2009), Nr. 4, S. 1269–1339
- [Vollmar et al. 1998] VOLLMAR, Brigitte ; SIEGMUND, Sören ; MENGER, Michael D.: An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats. In: *Hepatology* 27 (1998), 2019/03/11, Nr. 6, S. 1544–1553
- [Wan et al. 2014] WAN, Jinghong ; BENKDANE, Merieme ; TEIXEIRA-CLERC, Fatima ; BONNAFOUS, Stephanie ; LOUVET, Alexandre ; LAFDIL, Fouad ; PECKER, Francoise ; TRAN, Albert ; GUAL, Philippe ; MALLAT, Ariane ; LOTERSZTAJN, Sophie ; PAVOINE, Catherine: M2 kupffer cells promote m1 kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 59 (2014), 2019/01/25, Nr. 1, S. 130–142
- [Wandzioch et al. 2004] WANDZIOCH, Ewa ; KOLTERUD, Åsa ; JACOBSSON, Maria ; FRIEDMAN, Scott L. ; CARLSSON, Leif: Lhx2–/– mice develop liver fibrosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 47, S. 16549–16554
- [de Weerd et al. 2009] WEERD, Louis de ; MILAND, Ashild ; MERCER, James: Perfusion Dynamics of Free DIEP and SIEA Flaps During the First Postoperative Week Monitored With Dynamic Infrared Thermography. In: *Annals of plastic surgery* 62 (2009), 02
- [Wehr et al. 2014] WEHR, Alexander ; BAECK, Christer ; ULMER, Florian ; GASSLER, Nikolaus ; HITTATIYA, Kanishka ; LUEDDE, Tom ; NEUMANN, Ulf P. ; TRAUTWEIN, Christian ; TACKE, Frank: Pharmacological inhibition of the chemokine CXCL16 diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. In: *Plos One* 9 (2014), 11, Nr. 11, S. 112327
- [Wei et al. 2007] WEI, Yuren ; WANG, Dong ; PAGLIASSOTTI, Michael J.: Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 303 (2007), Nr. 1, S. 105–113

- [White et al. 2012] WHITE, Donna L. ; KANWAL, Fasiha ; EL-SERAG, Hashem B.: Association Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk for Hepatocellular Cancer, Based on Systematic Review. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10 (2012), Nr. 12, S. 1342–1359
- [WHO 2015] WHO: *Global health estimates 2015: deaths by cause, age, sex, by country and by region*. Geneva: World Health Organization (Veranst.), 2015
- [Wiesenthal et al. 1999] WIESENTHAL, S. R. ; SANDHU, H. ; MCCALL, R. H. ; TCHIPASHVILI, V. ; YOSHII, H. ; POLONSKY, K. ; SHI, Z. Q. ; LEWIS, G. F. ; MARI, A. ; GIACCA, A.: Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. In: *Diabetes* 48 (1999), Nr. 4, S. 766–774
- [Wigg et al. 2001] WIGG, A. ; ROBERTS-THOMSON, I. ; DYMOCK, R. ; MCCARTHY, P. ; GROSE, R. ; CUMMINS, A.: The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. In: *Gut* 48 (2001), 02, Nr. 2, S. 206–211
- [Williams et al. 2011] WILLIAMS, Christopher D. ; STENGEL, Joel ; ASIKE, Michael I. ; TORRES, Dawn M. ; SHAW, Janet ; CONTRERAS, Maricela ; LANDT, Cristy L. ; HARRISON, Stephen A.: Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. In: *Gastroenterology* 140 (2011), Nr. 1, S. 124–131
- [Williams et al. 2014] WILLIAMS, Roger ; ASPINALL, Richard ; BELLIS, Mark ; CAMPS-WALSH, Ginette ; CRAMP, Matthew ; DHAWAN, Anil ; FERGUSON, James ; FORTON, Dan ; FOSTER, Graham ; GILMORE, Sir I. ; HICKMAN, Matthew ; HUDSON, Mark ; KELLY, Deirdre ; LANGFORD, Andrew ; LOMBARD, Martin ; LONGWORTH, Louise ; MARTIN, Natasha ; MORIARTY, Kieran ; NEWSOME, Philip ; O'GRADY, John ; PRYKE, Rachel ; RUTTER, Harry ; RYDER, Stephen ; SHEERON, Nick ; SMITH, Tom: Addressing liver disease in the UK: a blueprint for attaining excellence in health care and reducing premature mortality from lifestyle issues of excess consumption of alcohol, obesity, and viral hepatitis. In: *The Lancet* 384 (2014), 2019/01/25, Nr. 9958, S. 1953–1997
- [Winship et al. 2018] WINSHIP, Amy L. ; GAZZARD, Sarah E. ; CULLEN-McEWEN, Luise A. ; BERTRAM, John F. ; HUTT, Karla J.: Maternal low-protein diet programmes low ovarian reserve in offspring. In: *Reproduction* 156 (2018), Nr. 4, S. 299–311
- [Witek et al. 2009] WITEK, Rafal P. ; STONE, W. C. ; KARACA, F. G. ; SYN, Wing-Kin ; PEREIRA, Thiago A. ; AGBOOLA, Kolade M. ; OMENETTI, Alessia ; JUNG, Youngmi ; TEABERRY, Vanessa ; CHOI, Steve S. ; GUY, Cynthia D. ; POLLARD, John ; CHARLTON, Peter ; DIEHL, Anna M.: Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology* 50 (2009), 2019/01/26, Nr. 5, S. 1421–1430

- [Wolf et al. 2014] WOLF, Monika J. ; ADILI, Arlind ; PIOTROWITZ, Kira ; ABDULLAH, Zeinab ; BOEGE, Yannick ; STEMMER, Kerstin ; RINGELHAN, Marc ; SIMONAVICIUS, Nicole ; EGGER, Michele ; WOHLLEBER, Dirk ; LORENTZEN, Anna ; EINER, Claudia ; SCHULZ, Sabine ; CLAVEL, Thomas ; PROTZER, Ulrike ; THIELE, Christoph ; ZISCHKA, Hans ; MOCH, Holger ; TSCHÖP, Matthias ; TUMANOV, Alexei V. ; HALLER, Dirk ; UNGER, Kristian ; KARIN, Michael ; KOPF, Manfred ; KNOLLE, Percy ; WEBER, Achim ; HEIKENWALDER, Mathias: Metabolic Activation of Intrahepatic CD8<sup>+</sup> T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. In: *Cancer Cell* 26 (2014), 2019/01/24, Nr. 4, S. 549–564
- [Wong et al. 2016] WONG, Carrie R. ; NGUYEN, Mindie H. ; LIM, Joseph K.: Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. In: *World Journal of Gastroenterology* 22 (2016), Nr. 37, S. 8294–8303
- [Wong et al. 2013] WONG, Connie H. Y. ; JENNE, Craig N. ; PETRI, Björn ; CHROBOK, Navina L. ; KUBES, Paul: Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. In: *Nature Immunology* 14 (2013), 06, S. 785
- [Wong et al. 2015] WONG, Yee V. ; COOK, Paul ; SOMANI, Bhaskar K.: The Association of Metabolic Syndrome and Urolithiasis. In: *International Journal of Endocrinology* 2015 (2015), S. 570674
- [Xia et al. 2014] XIA, Jihan ; YUAN, Jing ; XIN, Leilei ; ZHANG, Yuanyuan ; KONG, Siyuan ; CHEN, Yaoxing ; YANG, Shulin ; LI, Kui: Transcriptome Analysis on the Inflammatory Cell Infiltration of Nonalcoholic Steatohepatitis in Bama Minipigs Induced by a Long-Term High-Fat, High-Sucrose Diet. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 11, S. 113724
- [Yoshimoto et al. 2013] YOSHIMOTO, Shin ; LOO, Tze M. ; ATARASHI, Koji ; KANDA, Hiroaki ; SATO, Seidai ; OYADOMARI, Seiichi ; IWAKURA, Yoichiro ; OSHIMA, Kenshiro ; MORITA, Hidetoshi ; HATTORI, Masahira ; HONDA, Kenya ; ISHIKAWA, Yuichi ; HARA, Eiji ; OHTANI, Naoko: Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. In: *Nature* 499 (2013), 06, S. 97
- [Younossi et al. 2016] YOUNOSSI, Zobair M. ; KOENIG, Aaron B. ; ABDELATIF, Dinan ; FAZEL, Yousef ; HENRY, Linda ; WYMER, Mark: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease — Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. In: *Hepatology* 64 (2016), Nr. 1, S. 73–84
- [Younossi et al. 2011] YOUNOSSI, Zobair M. ; STEPANOVA, Maria ; AFENDY, Mariam ; FANG, Yun ; YOUNOSSI, Youssef ; MIR, Hesham ; SRISHORD, Manirath: Changes in the Prevalence of

- the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 9 (2011), Nr. 6, S. 524–530
- [Youssef und McCullough 2002] YOUSSEF, Wael I. ; MCCULLOUGH, Arthur J.: Steatohepatitis in obese individuals. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16 (2002), Nr. 5, S. 733–747
- [Yu et al. 2015] YU, Xin-Yang ; LI, Ying ; LIU, Tiemin ; WANG, Rui-Tao ; LIBRARY, IOS Press C. (Hrsg.): *Association of whole blood viscosity with non-alcoholic fatty liver disease*. Bd. 62. Clinical hemorheology and microcirculation, 10 2015
- [Zein et al. 2011] ZEIN, Claudia O. ; UNALP, Aynur ; COLVIN, Ryan ; LIU, Yao-Chang ; MCCULLOUGH, Arthur J.: Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Journal of Hepatology* 54 (2011), Nr. 4, S. 753–759
- [Zhang et al. 1994] ZHANG, J. X. ; PEGOLI, W. ; CLEMENS, M. G.: Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. In: *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 266 (1994), 2019/01/26, Nr. 4, S. 624–632
- [Zhang et al. 2000] ZHANG, X. Y. ; SUN, C. K. ; WHEATLEY, A. M.: A novel approach to the quantification of hepatic stellate cells in intravital fluorescence microscopy of the liver using a computerized image analysis system. In: *Microvascular Research* 60 (2000), Nr. 3, S. 232–240
- [Zheng et al. 2008] ZHENG, Shuqin ; HOOS, Lizbeth ; COOK, John ; TETZLOFF, Glen ; DAVIS, Harry ; HEEK, Margaret van ; HWA, Joyce J.: Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. In: *European Journal of Pharmacology* 584 (2008), Nr. 1, S. 118–124



## 7 Thesen zur Dissertation

1. Das Metabolische Syndrom ist eine multifaktorielle metabolische Erkrankung mit hoher Prävalenz, welche sich durch viszerale Adipositas, Bluthochdruck, Dyslipidämie und Insulinresistenz auszeichnet. Aufgrund des steigenden Überflusses an Nahrung und Konsumgüter sowie vorwiegend sitzenden beruflichen Tätigkeiten steigt die Prävalenz dieser Erkrankung in den letzten Jahren immer weiter an.
2. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms. Sie durchläuft verschiedene hepatische Krankheitsstadien beginnend mit einer Steatose, über die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) zur Fibrose bis hin zur Leberzirrhose. Ab dem Stadium der Zirrhose ist die Leberdegeneration irreversibel und das Risiko ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln steigt deutlich an.
3. Die Intravitalmikroskopie (IVM) ist eine dynamische Untersuchungsmethode, welche die zeitgleiche Aufnahme der hepatischen Strukturen, der Mikrohämodynamik und der zellulären Prozesse sowie Interaktionen im Rahmen der NAFLD-Progression am lebenden Organismus ermöglicht. Sie erweist sich als ein sehr effektives Verfahren zur Erforschung und Beschreibung der hepatischen Degenerationsvorgänge.
4. Das NASH-Fibrose-Tumor Modell ist ein Mausmodell, in welchem die Mäuse am 2. postnatalen Tag mit Streptozotozin (STZ) behandelt werden und anschließend eine kontinuierliche Hoch-Fett Diät (HFD) erhalten. Die Mäuse zeigen bereits nach einigen Wochen Anzeichen einer NAFLD mit einer hohen Prävalenz von knotigen Veränderungen in den Endstadien.
5. Zu den pathophysiologischen Schlüsselprozessen während der Bildung und Progredienz einer NAFLD gehören die hepatische Insulinresistenz, die Lipotoxizität, die Inflammation sowie die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSC).

6. In der vorliegenden Studie wurden die mikrohämodynamischen, mikrozirkulatorischen und pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der NAFLD und die Bildung von Lebertumoren *in vivo* mittels IVM charakterisiert. Hierfür wurden die STZ/HFD-Mäuse in einem Alter von 6, 8, 12 und 20 Wochen intravitalmikroskopisch untersucht.
7. In dieser *in vivo* Studie konnte eine signifikante Abnahme der nutritiven sinusoidalen Perfusion sowie der sinusoidalen Dichte im Rahmen des Fortschreitens der NAFLD beobachtet werden.
8. Die Analyse der Mikrohämodynamik ergab keine signifikanten Veränderungen in der Blutfließgeschwindigkeit, des volumetrischen Blutflusses sowie des Scherstress.
9. Die vermehrte Aktivierung von HSC im Rahmen der NAFLD-Progression spiegelte sich in einer reduzierten Anzahl Vitamin A-positiver Zellen, vor allem in 8 Wochen alten STZ/HFD-Mäusen wider.
10. In den Untersuchungen zur hepatischen Inflammation, als ein Schlüsselprozess der NAFLD-Progression, konnte eine verstärkte venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beobachtet werden. Dementsprechend wurden vermehrt Leukozyten detektiert, welche fest am venulären Endothel adhärten bzw. sich in den Sinusoiden im Leberparenchym befanden.
11. Weiterhin war die Progression der NAFLD von einer verstärkten hepatozellulären Apoptose begleitet. Vor allem im Tumorstadium (20 Wochen) waren signifikant vermehrte apoptotische Hepatozyten zu beobachten.
12. Die intravitalmikroskopischen Beobachtungen während der NAFLD-Progression im STZ/HFD-Modell bestätigten die verstärkte Inflammation, Mikrozirkulationsstörungen und die vermehrte Aktivierung der HSC und damit einhergehende fibrogene Umbauprozesse. Somit gehören zu möglichen therapeutischen Aspekten die Inaktivierung der HSC, die Inhibition der Fibrogenese, eine Hemmung der intrahepatischen Inflammation und lokal wirksame Vasodilatoren.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung und Fertigstellung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre.

In erster Linie danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen sowohl für die Vergabe des Promotionsthemas, die konsequente Unterstützung als auch für die gute Zusammenarbeit bei der Erarbeitung der Methodik und Fertigstellung der Dissertation. Weiterhin bedanke ich mich für die stetige Motivation sowie ihre Geduld.

Ein besonderer Dank geht außerdem an Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Institut durchzuführen. Ich möchte mich für die wissenschaftlichen Ratschläge, die außerordentliche Förderung und konstruktive Kritik im Rahmen der Durchführung und Auswertung der experimentellen Arbeit bedanken.

Danken möchte ich zusätzlich dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Chirurgie in Rostock für die freundliche Aufnahme im Team und die netten Ratschläge im Laboralltag. Insbesondere hervorheben möchte ich Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski und Eva Lorbeer für die wertvolle wissenschaftliche und technische Unterstützung.

Ferner möchte ich Ilona Klamfuß, Karin Gerber und Mareike Degener aufgrund der maßgeblichen Hilfe bei der Tierhaltung der Versuchsmäuse sowie den wöchentlichen BZ-Messungen während meiner Abwesenheit im Urlaub danken.

Darüber hinaus bin ich Marie Liebig für die angenehme Zusammenarbeit bei den Versuchen sowie der Auswertungsphase und für die Arbeit am Paper sehr dankbar.

Ein herzlicher und ganz besonderer Dank geht an meine Verlobte Gina Klee für die fortwährende Unterstützung, liebevolle Zuwendung sowie der unermüdlichen Motivation und Ablenkung während meiner Arbeiten im Rahmen dieser wissenschaftlichen Studie.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt bei der Bearbeitung der Dissertation geholfen und zur Fertigstellung beigetragen haben sowie nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden.



## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Malte Kämmerling

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.