

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entstehung von alkoholbedingten Lebererkrankungen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Ernährungsmedizin (180)

vorgelegt von

Sabine Wagnerberger
aus Prien am Chiemsee

2010

Dekan: Prof. Dr. H. Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Ch. Bode
2. berichtende Person: Prof. Dr. S.C. Bischoff
Eingereicht am: 08.07.2009
Mündliche Prüfung am: 17.12.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 29.10.2009 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	12
1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Alkoholkonsum, der Ernährung und in der Entstehung von alkoholinduzierten Lebererkrankungen (ALD).....	12
1.2 Bedeutung des Alkoholkonsums in Deutschland.....	13
1.3 Ethanolstoffwechsel.....	13
1.4 Pathogenese alkoholinduzierter Leberschäden.....	14
1.5 Die Leber als Immunorgan.....	19
1.6 Einfluss von Alkohol auf das Immunsystem.....	20
1.7 Geschlechtshormone und Immunsystem.....	21
1.8 Zielsetzungen der Arbeit.....	22
2. Material.....	23
2.1 Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD.....	23
2.1.1 Ernährungserhebung.....	23
2.1.2 Statistische Auswertung.....	23
2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzess-bedingten Lebersteatose im Mausmodell.....	23
2.2.1 Alkohol-/Toremifen-Gavage.....	23
2.2.2 Gewebeentnahme.....	23
2.2.3 Bestimmung des hepatischen Gesamtlipidgehalts mittels Oil Red O-Färbung.....	23
2.2.4 Triglyceridextraktion nach Folch.....	24
2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	24
2.2.6 Untersuchungen der Genexpression auf mRNA-Ebene.....	24
2.2.7 Bestimmung der MTP-Aktivität.....	25
2.2.8 Isolierung der Proteine aus Lebergesamthomogenat.....	25
2.2.9 Westernblot.....	25
2.3 Einfluss von Ethanol und Geschlechtshormonen auf die Interferon- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen.....	26

2.3.1	Inkubationsversuche.....	26
2.3.2	Messung der Zellviabilität.....	27
2.3.3	Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA	27
2.4	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	28
2.5	Software	28
3.	Methoden.....	29
3.1	Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD	29
3.1.1	Ein-/Ausschlusskriterien für Patienten mit ALD und für gesunde Kontrollen	29
3.1.2	Ernährungsanamnese bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen.....	32
3.1.3	Statistische Analyse.....	33
3.2	Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des MTP.....	34
3.2.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	34
3.2.2	Akute Alkoholexposition	34
3.2.3	Behandlung mit Toremifen	34
3.2.4	Gewebeentnahme	35
3.2.5	Bestimmung der Lipidakkumulation in der Leber mittels Oil Red O-Färbung	35
3.2.6	Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts.....	36
3.2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration im Lebergesamthomogenat nach Bradford	36
3.2.8	RNA-Isolation aus Lebergewebe	37
3.2.9	cDNA-Synthese.....	37
3.2.10	Realtime RT-PCR	38
3.2.11	Bestimmung der MTP-Aktivität.....	39
3.2.12	Bestimmung der Proteinexpression von MTP mittels Westernblot.....	40
3.2.13	Statistische Auswertung	43
3.3	Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ - Ausschüttung in NK-92-Zellen	44
3.3.1	Inkubationsversuche.....	44
3.3.2	Messung der Zellviabilität.....	46
3.3.3	Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA	47
3.3.4	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse	50

4.1 Ergebnisse der Untersuchung der geschlechtsspezifischen Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD	50
4.2 Ergebnisse der Untersuchungen der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der akuten alkoholexzess-bedingten Lebersteatose.....	61
4.2.1 Ergebnisse der Messung der Lipideinlagerung und der Triglyceridkonzentration in der Leber	61
4.2.2 Ergebnisse der Bestimmung des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins in der Leber	66
4.2.3 Ergebnisse der Bestimmung der mRNA-Expression von Apolipoprotein B.....	70
4.2.4 Einfluss der Behandlung mit Toremifen auf die akute alkoholexzessbedingte Lebersteatose.....	71
4.3 Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ - Ausschüttung in NK-92-Zellen	73
5 Diskussion.....	75
5.1 Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD	75
5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des MTP	80
5.3 Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen	86
6 Zusammenfassung.....	91
7 Summary	94
Literaturverzeichnis.....	96
Anhang	111
Curriculum Vitae.....	120
Publikationen.....	122
Kongressbeiträge/ Posterpräsentationen	123
Danksagung.....	124
Eidesstattliche Erklärung.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung möglicher Mechanismen in der Entstehung von ALD.....	18
Abbildung 1-2 Zusammensetzung der Zellen in einer gesunden Leber.....	19
Abbildung 3-1 Hormonverlauf während des weiblichen Zyklus.....	45
Abbildung 3-2 Versuchsbedingungen der Inkubationsversuche zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol und Geschlechtshormonen auf die Ausschüttung von IFN- γ in NK-92-Zellen.....	46
Abbildung 4-1 Klinisch-chemische Parameter von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen.....	50
Abbildung 4-2 Alkoholkonsum von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen.....	51
Abbildung 4-3 Relative tägliche Aufnahme von Vitamin C, Calcium, Eisen und Zink.....	54
Abbildung 4-4 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts im Lebergesamthomogenat von männlichen und weiblichen Mäusen.....	62
Abbildung 4-5 Repräsentative Bilder der Oil Red O Färbung der Lebern von männlichen und weiblichen Mäusen.....	63
Abbildung 4-6 Vergleich der hepatische Lipidakkumulation männlicher und weiblicher Mäuse.....	64
Abbildung 4-7 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 4-8 Vergleich der hepatischen Lipidakkumulation im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 4-9 Vergleich der relativen mRNA-Expression von MTP.....	67
Abbildung 4-10 Vergleich der MTP-Aktivität im Lebergesamthomogenat von männlichen und weiblichen Mäusen.....	68
Abbildung 4-11 Relativer Proteingehalt von MTP.....	69
Abbildung 4-12 Vergleich der relativen mRNA-Expression von ApoB.....	70
Abbildung 4-13 Vergleich der relativen mRNA-Expression von ApoB im zeitlichen Verlauf.....	71
Abbildung 4-14 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts von weiblichen Mäusen, die Toremifen und einmalig einen Bolus Ethanol oder isokalorische Maltodextrinlösung erhielten.....	72
Abbildung 4-15 Repräsentative Bilder der Oil Red O Färbung der Lebern von weiblichen Mäusen, die Toremifen und einmalig einen Bolus Ethanol erhielten.....	72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4-16 Prozentualer Anteil der lebenden Zellen nach 19-stündiger Prä-Inkubation mit verschiedenen Hormonen.....	73
Abbildung 4-17 INF- γ -Ausschüttung von NK-92-Zellen nach 19-stündiger Starvationphase und gleichzeitiger Prä-Inkubation mit Hormonen und anschließender Stimulation mit IL-12 und Co-Inkubation mit Alkohol (0-3 ‰) und Hormonen.....	74
Abbildung 5-1 Inhibierung des antifibrotischen Effekts von NK-Zellen durch Ethanol.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Allgemeine Ausschlusskriterien für Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen.....	32
Tabelle 3-2 Protokoll der cDNA-Synthese	38
Tabelle 3-3 Primersequenzen.....	38
Tabelle 3-4 Realtime-RT-PCR-Protokoll.....	39
Tabelle 3-5 Pufferzusammensetzung (MTP-Aktivitätsmessung)	39
Tabelle 3-6 Pipettierschema (MTP-Aktivitätsmessung).....	39
Tabelle 3-7 Zusammensetzung des Dignum A-Puffers	40
Tabelle 3-8 Zusammensetzung des Dignum C-Puffers.....	40
Tabelle 3-9 Zusammensetzung des 8%-igen Trenngels.....	41
Tabelle 3-10 Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels	41
Tabelle 3-11 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers (10x).....	42
Tabelle 3-12 Zusammensetzung des Transferpuffers	42
Tabelle 3-13 Zusammensetzung des TBST-Puffers.....	43
Tabelle 3-14 Eigenschaften der Zelllinie NK-92	44
Tabelle 3-15 Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	45
Tabelle 3-16 Zusammensetzung des Starvationmediums	45
Tabelle 3-17 Im Versuch eingesetzte Hormonkonzentrationen.....	45
Tabelle 3-18 Zusammensetzung des Coating-Puffers.....	47
Tabelle 3-19 Coating-Reagenz.....	47
Tabelle 3-20 Zusammensetzung des Waschpuffers (40x)	48
Tabelle 3-21 Zusammensetzung des Working Detectors.....	48
Tabelle 3-22 Substratreagenz	48
Tabelle 3-23 Zusammensetzung der Stopplösung	48
Tabelle 4-1 Klinisch-chemische und anthropometrische Parameter von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen.....	52
Tabelle 4-2 Tägliche Aufnahme von Energie, Alkohol, Fett, Protein und Kohlenhydraten....	55
Tabelle 4-3 Gegenüberstellung der Zufuhrempfehlungen: Dietary Reference Intakes (DRI) vs. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr (<i>DACH</i>)	56
Tabelle 4-4 Tägliche relative Aufnahme von Mikronährstoffen (% DRI) bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen.....	57
Tabelle 4-5 Tägliche Aufnahme von Mikronährstoffen (pro kg KG/Tag) bei Patienten mit ALD und bei gesunden Kontrollpersonen.....	58

Tabelle 4-6 Einteilung der Patienten mit ALD und der gesunden Kontrollen in Quintile von der niedrigsten (A) bis hin zur höchsten (E) Zink-Aufnahme	59
Tabelle 4-7 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A mit dem Quintil E bei männlichen Patienten mit ALD (Zink)	59
Tabelle 4-8 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A mit dem Quintil E bei weiblichen Patienten mit ALD (Zink)	59
Tabelle 4-9 Einteilung der Patienten mit ALD und der gesunden Kontrollen in Quintile von der niedrigsten (A) bis hin zur höchsten (E) Eisen-Aufnahme	60
Tabelle 4-10 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A mit dem Quintil E bei männlichen Patienten mit ALD (Eisen).....	60
Tabelle 4-11 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A mit dem Quintil E bei weiblichen Patienten mit ALD (Eisen)	60

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALD	alcoholic liver disease (alkoholinduzierte Lebererkrankungen)
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALT	Alaninaminotransferase
ANOVA	analysis of variances (Varianzanalyse)
ApoB	Apolipoprotein B
AST	Aspartataminotransferase
BMI	body mass index
BSA	bovine serum albumin (bovines Serumalbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRI	dietary reference intake (empfohlene Nährstoffzufuhr)
DTT	Dithiothreitol
E ₂	β-Estradiol (Östrogen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	estrogen receptor (Östrogenrezeptor)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
HSC	hepatic stellate cell (hepatische Sternzelle)
HGF	hepatic growth factor
HS	horse serum (Pferdeserum)
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LH	luteinisierendes Hormon
MK	männliche Kontrollmaus
METOH	männliche alkoholbehandelte Maus
MTP	mikrosomales triglyceridtransferierendes Protein
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NK	Negativkontrolle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OCT	optimal cutting temperature compound
Oligo dT	Oligo-Desoxythymidin
P	Progesteron
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PK	Positivkontrolle
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Saline)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SERM	selective estrogen receptor modulator
SOCS	suppressor of cytokine signaling
T	Testosteron
TG	Triglycerid
TGF- β	transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
uPA	Urokinasetyp Plasminogen Aktivator
VLDL	very low density lipoprotein
WK	weibliche Kontrollmaus
WETOH	weibliche alkoholbehandelte Maus

1. Einleitung

1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Alkoholkonsum, der Ernährung und in der Entstehung von alkoholinduzierten Lebererkrankungen (ALD)

Die Ergebnisse zahlreicher Studien geben einen Hinweis darauf, dass Frauen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber alkoholbedingten Lebererkrankungen (alcoholic liver disease, ALD) aufweisen als Männer. So reicht bei Frauen bereits die halbe Menge an Alkohol aus, um dennoch vergleichbare Organschäden hervorzurufen (Becker *et al.*, 1996). Ebenso ist die Inzidenz alkoholinduzierter fortgeschrittener Lebererkrankungen bei Frauen höher (Morgan und Sherlock, 1977) und schwerwiegende Leberschäden treten wesentlich früher auf als bei Männern (Tuyns und Pequignot, 1984). Trotz des niedrigeren Körperwassergehalts bei Frauen, der nach Aufnahme gleicher Alkoholmengen zu einer relativ höheren Ethanolkonzentration als bei Männern führt, ist bislang noch weitgehend ungeklärt, ob die höhere Empfindlichkeit gegenüber ALD auf biologische, geschlechtsspezifische Unterschiede („sex“) oder auf geschlechtsassoziierte Verhaltensunterschiede („gender“) zurückzuführen ist. Geschlechtsspezifische Unterschiede treten nicht nur in der Empfindlichkeit für die Entwicklung von ALD auf, sondern auch im geschlechtsspezifischen Ernährungsverhalten. Das typische weibliche Ernährungsverhalten, das von Frauen auch als „gesund“ erachtet wird, ist gekennzeichnet durch einen höheren Konsum von Obst und Gemüse und einen geringeren Verzehr von Fleisch und Fett (Hoogerbrugge *et al.*, 2001). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Präferenzen für bestimmte Lebensmittel korrelieren auch mit einem unterschiedlichen Muster der täglichen Mikro- und Makronährstoffaufnahme. Dass die Zufuhr verschiedener Mikronährstoffe bei der Entstehung von Leberschäden eine wesentliche Rolle spielt, konnte in zahlreichen Tierstudien nachgewiesen werden. So fördert beispielsweise eine erhöhte Zufuhr von Vitamin A oder Eisen Leberzellschädigungen (Russell *et al.*, 1974; Stal und Hultcrantz, 1993), wohingegen Tocopherol, Vitamin C und Zink eher einen protektiven Effekt bei der Entstehung der ALD haben (Lee *et al.*, 1995; Cadenas *et al.*, 1998; Kang und Zhou, 2005). Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen bei US-amerikanischen Alkoholikern weisen darauf hin, dass sie unter einer ausgeprägten Mangelversorgung mit bestimmten Mikronährstoffen leiden (zur Übersicht Lieber, 2003), wohingegen Bergheim *et al.* (2003) zeigen konnten, dass sich die Aufnahme der Nährstoffe von deutschen Alkoholikern, die sich in der sozialen Mittelschicht befinden, nicht von gesunden Kontrollpersonen unterscheidet. Dennoch können ein Mangel oder eine übermäßige Aufnahme bestimmter Nährstoffe zur Entwicklung alkoholbedingter Leberschäden in

1. EINLEITUNG

Einzelfällen beitragen (Russell *et al.*, 1974; Stal und Hultcrantz, 1993; Lee *et al.*, 1995; Cadenas *et al.*, 1998; Kang und Zhou, 2005).

1.2 Bedeutung des Alkoholkonsums in Deutschland

Doch wie gefährdet sind Männer und Frauen in Deutschland, einen alkoholbedingten Leberschaden zu entwickeln und über welche Mechanismen lassen sich (geschlechtsspezifische) alkoholinduzierte Leberschäden erklären?

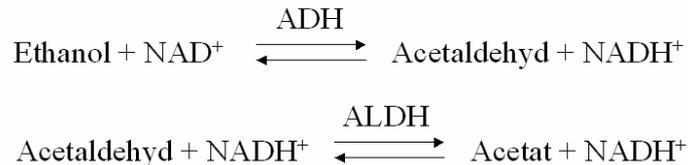
Zahlen der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) weisen darauf hin, dass dem Alkohol bezüglich der konsumierten Mengen nicht nur eine große Rolle als Genussmittel, sondern auch als Suchtmittel zugeschrieben werden muss. Laut DHS betrug im Jahr 2006 der Pro-Kopf-Verbrauch reinen Alkohols in Deutschland 10.1 l. Davon entfielen 55.2 % auf Bier, 21.9 % auf Wein und 18.7 % auf Spirituosen (DHS, 2006). Von risikoarmem Alkoholkonsum geht man bei einer Menge von bis zu 15-20 g Reinalkohol pro Tag bei der Frau und 30-40 g/Tag beim Mann aus, was laut Definition der Anzahl von ca. 1.5-2 bzw. 3-4 Drinks (1 Drink = ca. 10-12 g Alkohol) pro Tag entspricht. Ab 30-60 g Alkohol/Tag bei erwachsenen Männern bzw. 20-40 g Alkohol/Tag bei erwachsenen Frauen gilt dagegen die Einstufung als „Risikotrinker“ und man spricht dann bereits vom Alkoholmissbrauch. Zu diesen sogenannten „Risikotrinkern“ werden in Deutschland schätzungsweise 11.4 % der deutschen Bevölkerung gezählt. Ca. 2 Mio. Deutsche (3.8 %) gehen missbräuchlich mit dem Alkohol um und ca. 1.3 Mio. (2.4 %) Männer und Frauen können als alkoholabhängig eingestuft werden (DHS, 2006). Welche Gefahren das Genussmittel Alkohol birgt, zeigt die Anzahl der Todesfälle (ca. 42000/Jahr) in Deutschland, die direkt auf den Alkoholmissbrauch und die dadurch entstehenden Erkrankungen (z.B. Leberzirrhose) bzw. auf indirekt durch Alkohol verursachte Unfälle zurückzuführen sind (DHS, 2006).

1.3 Ethanolstoffwechsel

Da Ethanol sowohl wasser- als auch lipidlöslich ist, wird er relativ schnell durch einfache Diffusion durch die Zellmembran absorbiert. Der überwiegende Anteil wird in der Leber metabolisiert, da die Hepatozyten die wichtigsten für den Ethanolmetabolismus benötigten Enzyme, wie die Alkoholdehydrogenase (ADH) und Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1), in größeren Mengen als andere Gewebe exprimieren (Lieber, 1970; Lieber, 1991; Lieber und De Carli, 1991). Der Ethanolabbau erfolgt durch die im Zytosol lokalisierte ADH, die Ethanol zu Acetaldehyd oxidiert. Dieses sehr toxische Zwischenprodukt wird in den Mitochondrien

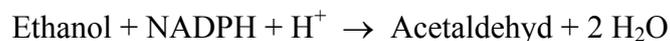
1. EINLEITUNG

durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) weiter zu Acetat oxidiert. Beide Enzyme (ADH und ALDH) benötigen für diese Stoffwechselwege Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) als Coenzym:



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Elimination des Ethanols ist dabei die Reoxidation von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ($\text{NADH} + \text{H}^+$) zu NAD^+ . Normalerweise wird Acetat anschließend zu Acetyl-Coenzym A aktiviert und im Citratzyklus oxidiert. Aufgrund des hohen NADH/NAD^+ -Verhältnisses kann das in der Leber infolge der Alkoholoxidation gebildete Acetat jedoch nicht über den Citratzyklus oxidiert werden, sondern es wird extrahepatisch zu CO_2 und H_2O oxidiert.

Ein weiterer Weg der Ethanoloxidation erfolgt durch das MEOS (microsomal ethanol oxidizing system), das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Hierbei handelt es sich um das Cytochrom-P450-Enzym CYP2E1, das neben $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) molekularen Sauerstoff benötigt:



Da das Isoenzym CYP2E1 im Menschen durch chronischen Alkoholkonsum induziert wird und somit die Beteiligung dieses Enzyms am Alkoholstoffwechsel gesteigert ist, kann dies als möglicher Mechanismus der metabolischen Alkoholtoleranz bei Alkoholikern gesehen werden.

Als drittes Enzymsystem steht noch die Katalase in den Peroxisomen der Leber zur Verfügung. Dabei findet eine Peroxidation des Ethanols statt:



1.4 Pathogenese alkoholinduzierter Leberschäden

Schäden, die durch Alkohol an der Leber hervorgerufen werden, reichen von der Fettleber über die alkoholinduzierte Hepatitis bis hin zur alkoholbedingten Leberzirrhose, bei der es schließlich zu einem irreversiblen bindegewebigen Umbau der Leber kommt. Frühere Studien

1. EINLEITUNG

haben dabei klar belegt, dass es eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Alkoholkonsum und dem Risiko, einen Leberschaden zu entwickeln, gibt (Lelbach, 1975; Day, 1997).

Nach der Lebersteatose ist die nächste entscheidende Entwicklungsstufe alkoholbedingter Lebererkrankungen die alkoholinduzierte Hepatitis, deren Krankheitsbild unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Das Spektrum reicht hierbei von asymptomatischen Patienten mit pathologischen Laborwerten (erhöhte Aktivitäten leberspezifischer Enzyme (AST, ALT, γ -GT) sowie erhöhte Bilirubinkonzentrationen; Erniedrigung von Albumin und Gerinnungsfaktoren) und einer Lebervergrößerung, bis hin zu Patienten mit zunehmendem Leberversagen. Die letzte Stufe in der Entwicklung von alkoholinduzierten Leberschäden ist schließlich die Akkumulation von extrazellulärer Matrix, die zur Fibrose bis hin zur Zirrhose führt. Ohne Lebertransplantation führen die Spätschäden dieser Lebererkrankung oft zum Tod der Patienten (Kim *et al.*, 2002).

Wie bereits erwähnt, ist eine der ersten Veränderungen, die durch chronischen Alkoholkonsum in der Leber hervorgerufen werden, die Lebersteatose (Zhou *et al.*, 2003). Während früher davon ausgegangen wurde, dass die Verfettung der Leber lediglich eine harmlose histologische Veränderung der Leber ist, so weisen neuere Arbeiten darauf hin, dass die Lebersteatose nicht nur in der Initiierung, sondern auch im Fortschreiten der alkoholinduzierten Lebererkrankungen eine bedeutende Rolle spielt (Yang *et al.*, 1997; Day *et al.*, 1998). So sind Lebern mit Steatose empfindlicher gegenüber hepatotoxischen Substanzen wie z.B. bakteriellen Endotoxinen (Yang *et al.*, 1997). Zudem lassen sich ausgehend vom Grad der Verfettung Prognosen über den Schweregrad späterer Entwicklungsstufen der ALD machen (Sorensen *et al.*, 1984; Teli *et al.*, 1995). Lange Zeit wurde die Steatose dem Abbau von Alkohol und dem sich daraus ergebenden veränderten intrazellulären Verhältnis von NADH:NAD⁺ („hypermetabolischer“ Zustand) zugeordnet (Ryle *et al.*, 1986; Deaciuc *et al.*, 1992; Lieber, 2005). Durch diesen ‚Redox-Shift‘ sind die Fettsäuresynthese und Veresterung gesteigert, gleichzeitig ist die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren vermindert, was letztendlich zur Lipidakkumulation in den Hepatozyten führt. Studien an Menschen und an Tieren sprechen jedoch dafür, dass auch bakterielle Endotoxine intestinalen Ursprungs (Bode *et al.*, 1987; Nanji *et al.*, 1995) und die daraus resultierende Aktivierung hepatischer Kupffer-Zellen und Freisetzung des Tumornekrosefaktors (TNF) α eine entscheidende Rolle in der Entstehung von alkoholbedingten Lebererkrankungen spielen (zur Übersicht siehe auch Arteel, 2003). Übermäßiger Alkoholkonsum bewirkt im oberen Intestinaltrakt sowohl morphologische als auch funktionelle Störungen der Dünndarmmukosa

1. EINLEITUNG

(Bode, 1980). Als eine Ursache für diese Schleimhautschädigung wird dabei u.a. die gestörte Synthese zytoprotektiver Prostaglandine diskutiert (Bode *et al.*, 1989; Bode, 1996), sowie eine Störung der Mikrozirkulation (Beck *et al.*, 1986). Zudem führt Alkoholkonsum zu einer erhöhten Permeabilität der Darmmukosa für Makromoleküle (Bode *et al.*, 1991; Parlesak *et al.*, 2000) und somit auch für Endotoxine. Endotoxine (Lipopolysaccharid, LPS) sind charakteristische Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien (Rietschel *et al.*, 1985) und werden für die Pathogenese verschiedener Krankheiten verantwortlich gemacht. Rivera *et al.* (1998) konnten in Untersuchungen mit weiblichen Ratten, denen 5 g Ethanol/kg KG verabreicht wurden, nach 90 min eine signifikante Erhöhung der Endotoxinkonzentration im Plasma messen. Infolge des chronischen Alkoholkonsums kommt es außerdem zu einer bakteriellen Fehlbesiedlung im Jejunum (Bode *et al.*, 1984) und im Duodenum, die ihrerseits zu einer erhöhten Konzentration freier Endotoxine im Darm führt. Zusammen mit der erhöhten Darmpermeabilität resultiert dies in einer Endotoxinämie (Bode *et al.*, 1987), die wiederum für die Aktivierung der Kupffer-Zellen in der Leber verantwortlich gemacht wird. Dies führt zur Freisetzung von Zytokinen (z.B. TNF- α) und damit zur Stimulation der Hepatozyten (Enomoto *et al.*, 1998). (siehe Abb. 1-1)

Die Bildung und Freisetzung zahlreicher Zytokine (TNF- α , Interleukine), die für die Entwicklung einer Vielzahl bei Alkoholikern auftretender metabolischer Störungen und daraus resultierender Organschädigungen verantwortlich gemacht werden können, wird durch Ethanol beeinflusst. Bereits akuter, einmaliger Alkoholkonsum erniedrigt die durch Pathogene induzierte Produktion von Entzündungszytokinen durch Monozyten *in vitro*. So wird zum Beispiel die TNF- α -Produktion von aus Blut isolierten Monozyten *in vitro* durch akute Ethanoleinwirkung verringert (Arbabi *et al.*, 1999). Ein sechs Tage andauernder Alkoholeinfluss (25-75 mM) bewirkt dagegen im gleichen Zelltyp eine gesteigerte Ausschüttung von TNF- α , für die die ebenfalls durch chronische Einwirkung von Ethanol hervorgerufene vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Ursache identifiziert wurde (Parlesak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001). In Untersuchungen von Bergheim *et al.* (2006) konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α über Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-) 1-abhängige Signalwege sowohl nach akutem als auch nach chronischem Alkoholkonsum zu einer verminderten Sekretion von Triglyceriden aus der Leber führt. Hierbei kommt es zu einer Verminderung der Aktivität des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins (MTP), das für den Einbau von Triglyceriden in Apolipoprotein B (ApoB) verantwortlich ist (Bergheim *et al.*, 2006) (siehe Abb. 1-1).

1. EINLEITUNG

Inwieweit diese Pathomechanismen geschlechtsspezifisch reguliert werden, ist bislang nicht geklärt.

Ergebnisse tierexperimenteller Studien weisen weiterhin darauf hin, dass die höhere Suszeptibilität weiblicher Tiere für ALD nach chronischem Alkoholkonsum sich zumindest teilweise aus einer höheren intestinalen Translokation von LPS bei weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Ratten ergibt (Yin *et al.*, 2000). In diesen Untersuchungen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass dieser Effekt von Alkohol bei weiblichen Ratten nach Ovariectomie teilweise aufgehoben ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit Östrogen zu einer erhöhten Expression des Rezeptors für LPS (CD14) auf Kupffer-Zellen und einer erhöhten TNF α -Ausschüttung nach LPS-Stimulation führt (Ikejima *et al.*, 1998). Järveläinen *et al.* (2001) konnten weiterhin zeigen, dass der Östrogen-Antagonist Toremifen bei weiblichen Ratten einen protektiven Effekt gegen ALD hat (Järveläinen *et al.*, 2001). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von TNF-a nach akuter oder chronischer Alkoholexposition die Expression von PAI-1 in der Leber induziert. Über einen Hepatic growth factor (HGF)-abhängigen Signalweg kann dies zu einer verminderten Aktivität des MTP und somit zu einem reduzierten Einbau von Triglyceriden in ApoB und schließlich zur Lipidakkumulation in der Leber führen (Bergheim *et al.*, 2006). Wie sich die Aktivität und die Verfettung der Lebern von männlichen und weiblichen Tieren im weiteren Verlauf nach akuter Alkoholexposition verhalten, ist bisher nicht geklärt. Auch die Mechanismen der unterschiedlichen Regulation des MTP sind bisher ungeklärt. Die Untersuchungen von Lemieux weisen jedoch darauf hin, dass die Behandlung von Ratten mit dem Östrogen-Antagonisten Acolbifene eine signifikante Reduktion der mRNA für MTP in der Leber zur Folge hatte (Lemieux *et al.*, 2005) und somit der östrogenbedingten hepatischen VLDL-Sekretion entgegenwirkt. Inwieweit die östrogenbedingte Regulation der VLDL-Sekretion auch nach akutem Alkoholkonsum von Bedeutung ist und welche Rolle dabei das MTP spielt und ob dies zu der höheren Suszeptibilität von weiblichen Tieren für ALD beiträgt, ist bisher nicht geklärt.

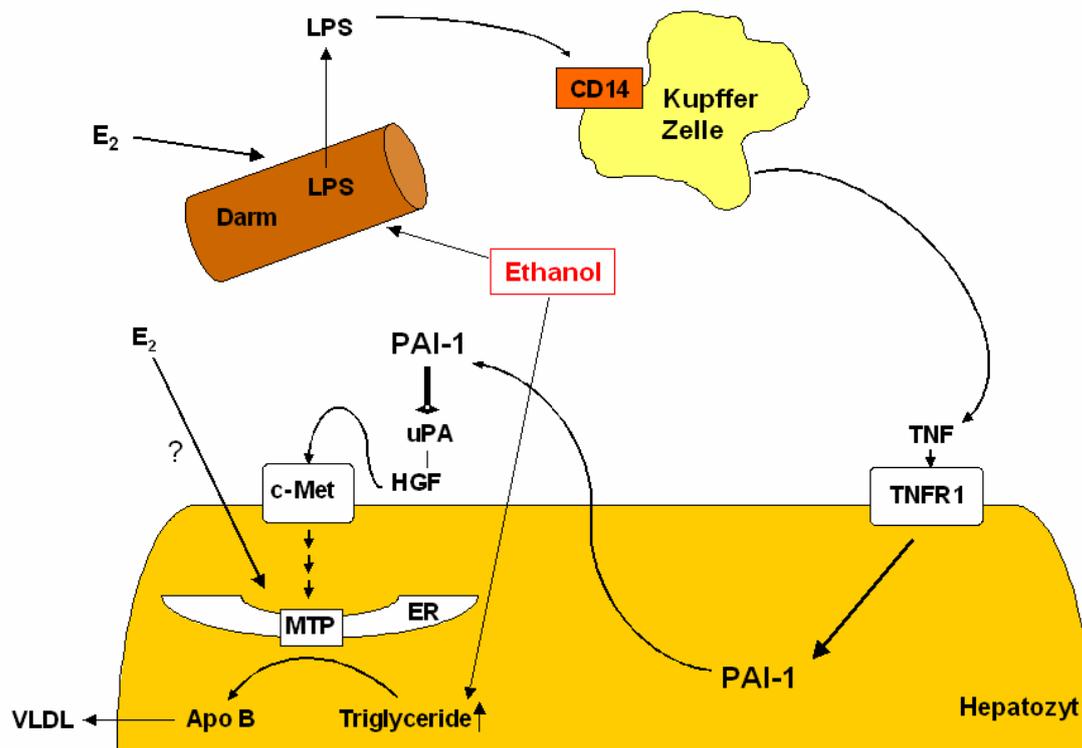


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung möglicher Mechanismen in der Entstehung von ALD (nach Arteel, 2008). Östrogen (E_2) und Ethanol bewirken eine erhöhte Permeabilität für bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharid = LPS) im Darm. LPS stimuliert die Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha ($TNF-\alpha$) aus Kupfer-Zellen, welcher über den TNF-Rezeptor (TNFR1) in den Hepatozyten zu einer Erhöhung des Plasminogen Aktivator Inhibitors (PAI-) 1 führt. Die Hemmung des Urokinasetyp Plasminogen Aktivators (uPA) hat eine über Hepatic Growth Factor (HGF)- und cMet-abhängige Signalwege vermittelte Verminderung des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins (MTP) und von Apolipoprotein B (ApoB) zur Folge. Dadurch wird die Bildung und Sekretion triglyceridreicher Lipoproteine (very low density lipoprotein = VLDL) reduziert und es kommt zur Lipidakkumulation in Hepatozyten.

1.5 Die Leber als Immunorgan

Die Leber ist nicht nur ein wichtiges Stoffwechselorgan, sondern auch eine der reichsten Quellen für Zellen des angeborenen Immunsystems (Doherty und O'Farrelly, 2000; Wick *et al.*, 2002). Hepatozyten machen nur ungefähr 2/3 der gesamten Zellpopulation in der Leber aus. Die restlichen Zellen sind Leber-Sinusoidal-Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Stellatumzellen und intrahepatische Lymphozyten (zur Übersicht siehe Racanelli und Rehermann, 2006). Diese lassen sich wiederum in T- und B-Zellen (erworbenes Immunsystem) und in NK- (natürliche Killerzellen) und NKT- Zellen (angeborenes Immunsystem) unterteilen (Abb. 1-2).

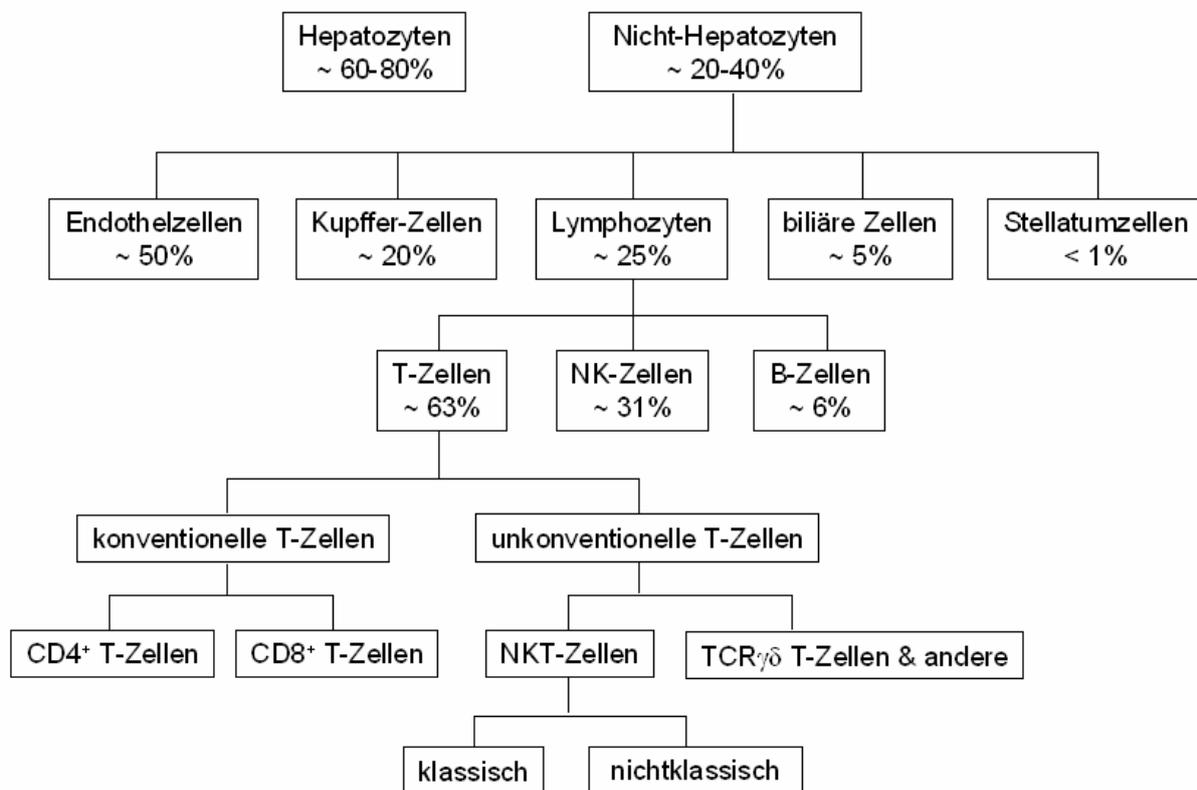


Abbildung 1-2 Zusammensetzung der Zellen in einer gesunden Leber (nach Racanelli und Rehermann, 2006)

Eine besondere Rolle im Immunsystem spielen hierbei die NKT-Zellen. NKT-Zellen exprimieren sowohl T-Zell- (CD3) als auch NK-Zell-Oberflächenmarker (NK1.1). Diese Zellen werden im Thymus gebildet, aber akkumulieren überwiegend in der Leber, wo sie die lokale pro-inflammatorische (Th-1) und anti-inflammatorische (Th-2) Zytokinproduktion anderer mononukleärer Zellen regulieren (Benlgha *et al.*, 2002). Ein Mangel an hepatischen

NKT-Zellen hat in der Maus eine gesteigerte lokale Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge, welche wiederum zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Leber gegenüber LPS-Toxizität führen (Li *et al.*, 2004). Zusätzlich zu T-Zellen befinden sich in der Leber in hoher Zahl auch NK-Zellen, die eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort spielen. In der Maus sind ca. 10%, in der Ratte und im Menschen ca. 30-50% der Lymphozyten in der Leber NK-Zellen (Racanelli und Rehermann, 2006; Gao *et al.*, 2008). Hepatische NK-Zellen sind in ihrer Struktur und Funktion den peripheren NK-Zellen ähnlich, beide sind CD3⁻ und CD56⁺ (Hines und Wheeler, 2004). Jedoch weisen hepatische NK-Zellen eine höhere Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen auf als NK-Zellen in der Milz oder im peripheren Blut (Ishiyama *et al.*, 2006). NK-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der frühen Immunantwort gegen virusinfizierte Zellen, so auch gegen Hepatitis C-infizierte Hepatozyten (Biron *et al.*, 1999). Zudem wirken die hepatischen NK-Zellen der Leberfibrose entgegen, indem sie antifibrotische Zytokine (Interferon (IFN)- α und IFN- γ) ausschütten (Rockey *et al.*, 1994; Inagaki *et al.*, 2003) und außerdem aktivierte Stellatumzellen abtöten (Radaeva *et al.*, 2006). Jeong *et al.* (2008) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass Ethanol die Fähigkeit von NK-Zellen beeinträchtigt, Stellatumzellen zu töten, indem einerseits die Aktivierung und andererseits die Freisetzung von Zytokinen in NK-Zellen inhibiert werden.

1.6 Einfluss von Alkohol auf das Immunsystem

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Alkohol eine bedeutende Rolle als Modulator der Immunabwehr spielt. Vor allem bei Patienten mit chronischem Alkoholmissbrauch wird eine Beeinträchtigung des Immunsystems beschrieben (Kanagasundram und Leevy, 1981; Palmer, 1989; Baker und Jerrels, 1993; Mac Gregor und Louria, 1997). So ist beispielsweise Alkoholkonsum mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität in Verbindung mit bösartigen Tumoren assoziiert (Roselle *et al.*, 1993; Smith-Warner *et al.*, 1998). Eine große Bedeutung kommt hierbei der Aktivität der NK-Zellen zu, die an der Zerstörung virusinfizierter Zellen und der Verhinderung der Tumorentstehung und Metastasierung beteiligt sind. In Humanstudien konnte gezeigt werden, dass chronischer Alkoholkonsum zu einer Verminderung aktivierter NK-Zellen im peripheren Blut führt (Cook *et al.*, 1997). Aber auch akuter Alkoholkonsum beeinträchtigt das Immunsystem, indem die Serumkonzentrationen von IFN- α , IFN- γ und Interleukin (IL)-2 vermindert werden (Vicente-Gutierrez *et al.*, 1991). Zusammen mit dem von Makrophagen ausgeschütteten IL-12 ist IFN- γ äußerst wichtig für die Induktion der zellulären pro-inflammatorischen (Th-1)

Immunantwort (D'Andrea *et al.*, 1992; Trincieri und Gerosa, 1996). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass chronische Alkoholfütterung sowohl zu einer Verminderung von IFN- γ als auch der Th-1-Immunantwort führt (Peterson *et al.*, 1998). Wie bereits erwähnt, spielt diese Immunmodulation (verminderte NK-Zell-Aktivität und IFN- γ -Ausschüttung) auch in der Entstehung der alkoholinduzierten Leberfibrose eine wichtige Rolle (Rockey *et al.*, 1994; Inagaki *et al.*, 2003; Radaeva *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2008).

1.7 Geschlechtshormone und Immunsystem

Die höhere Prävalenz von Autoimmunkrankheiten bei Frauen lässt schon seit längerem eine Immunmodulation durch Geschlechtshormone vermuten (Jacobson *et al.*, 1997). Dabei wird den Östrogenen eine Immunsystem-aktivierende Eigenschaft zugesprochen, wohingegen die Rolle der Androgene kontrovers diskutiert wird. Jedoch überwiegen hier die Aussagen, dass Androgene eher immunsuppressiv wirken (Cutulo *et al.*, 2004; Klein, 2004; Tanriverdi *et al.*, 2003). Viele Funktionen von 17 β -Estradiol werden über die Östrogenrezeptoren (ER), welche hormonabhängige Transkriptionsfaktoren sind, vermittelt (Chu *et al.*, 2004; Hennessy *et al.*, 2005). Die beiden Subtypen ER α und ER β (Kuiper *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1986) werden auf vielen immunregulatorischen Zellen wie z.B. B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und auch auf NK-Zellen exprimiert (Erlandsson *et al.*, 2003; Curran *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003), die z.T. an der Entstehung von alkoholbedingten Leberschäden beteiligt sind. Somit sind geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber ALD möglicherweise nicht nur durch eine östrogenbedingte Erhöhung der Darmpermeabilität (Yin *et al.*, 2000) und der Sensitivität von hepatischen Kupffer-Zellen gegenüber LPS (Ikejima *et al.*, 1998), sondern auch durch eine direkte Modulation von immunregulatorischen Zellen in der Leber zu erklären.

1.8 Zielsetzungen der Arbeit

1. Männer und Frauen weisen sowohl Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber alkoholbedingten Leberschädigungen als auch im Ernährungsverhalten auf. Deshalb sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit anhand einer computergestützten Ernährungsanamnese untersucht werden, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Aufnahme von Mikro- und Makronährstoffen bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen gibt und falls ja, ob diese einen Einfluss auf den Schweregrad der ALD bei Männern und Frauen haben.
2. In zahlreichen tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass weibliche Tiere bei chronischer Alkoholexposition empfindlicher gegenüber ALD sind als männliche Tiere. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob weibliche Mäuse auch bei akuter Alkoholexposition schwerwiegendere Leberschäden - speziell eine erhöhte Lebersteatose - aufweisen als männliche Tiere. Dazu sollte im zeitlichen Verlauf untersucht werden, ob sich die hepatische Lipidakkumulation nach akuter Alkoholexposition in weiblichen und männlichen Mäusen unterscheidet und falls ja, welche Rolle das mikrosomale triglyceridtransferierende Protein (MTP) in diesem Zusammenhang im Lipidexport aus der Leber spielt.
Des Weiteren sollte geprüft werden, ob sich hierbei mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede im hepatischen Lipidexport nach akuter Alkoholexposition auf das weibliche Geschlechtshormon Östrogen zurückführen lassen. Dazu sollte weiblichen Mäusen vor der akuten Alkoholexposition der Östrogenrezeptor-Antagonist Toremifen verabreicht werden, um mögliche Östrogen-Effekte auf den hepatischen Lipidexport zu blockieren.
3. Bei akuter *in-vitro*-Gabe von Ethanol kann eine verminderte Aktivität der natürlichen Killer (NK)-Zellen gemessen werden. Da NK-Zellen u.a. auch Östrogenrezeptoren exprimieren und da Geschlechtshormone wie z.B. Östrogen immunmodulierend wirken, sollte im dritten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob weibliche (β -Estradiol, Progesteron, FSH, LH) und männliche Geschlechtshormone (Testosteron) bei gleichzeitiger Alkoholexposition die Ausschüttung von IFN- γ in NK-92-Zellen beeinflussen.

2. Material

2.1 Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD

2.1.1 Ernährungserhebung

Krankenakten (klinisch-chemische Diagnostik, Ernährungsanamnese) von 1804 Kontrollpersonen und 227 Patienten mit ALD

EBIS-Software (Ernährungsanamnese, Beratungs- und Informations-System)

Dr. J. Erhardt, Stuttgart-Hohenheim

2.1.2 Statistische Auswertung

Statistica Version 6.0

StatSoft, Inc., Tulsa, USA

2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose im Mausmodell

2.2.1 Alkohol-/Toremifen-Gavage

C57Bl6/J6-Mäuse
Futter ssniff® M-Z Reich
Maltodextrin
Ethanol >96%, DAB, reinst
Toremifen base
Methylcellulose
Natriumchlorid (NaCl), ≥99.8%

Janvier S.A.S., Le-Genest-St-Isle, Frankreich
ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
LKT Laboratories, Inc., USA
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

Makrolonkäfing mit 360 cm²
Waage
Gavagiernadel
Spritzen Omnifix 1ml

Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg

B/Braun Melsungen, Melsungen

2.2.2 Gewebeentnahme

Ketamin
Xylazin

BelaPharm GmbH, Feichta
Bayer AG, Leverkusen

Spritzen Omnifix 1ml
Nadeln Sterican
Schere
Pinzette
Stickstoff, flüssig

B/Braun Melsungen, Melsungen
B/Braun Melsungen, Melsungen

2.2.3 Bestimmung des hepatischen Gesamtlipidgehalts mittels Oil Red O-Färbung

Oil Red O
Isopropanol ≥99.5%
Hämatoxylin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
medite Medizintechnik, Burgdorf

2. MATERIAL

Wässriges Eindeckmedium MEDITE
Schälchen Cryomold Standard
OCT

medite Medizintechnik, Burgdorf
Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
medite Medizintechnik, Burgdorf

Objektträger Super Frost
Kryotom Leica CM3050J
Färbeküvetten
Mikroskop Leica DM1000
Mikroskop AxioVert 200M
Software AxioVision Release 4.5

Menzel GmbH & Co, Braunschweig
Leica Camera AG, Solms

Leica Camera AG, Solms
Zeiss, Jena

2.2.4 Triglyceridextraktion nach Folch

Chloroform
Methanol
BSA
NaCl
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Randox TRIGS Triglycerid-Kit (Nr.: 121047)
Kontrollseren Level 2 und 3

CarlRoth & Co, Karlsruhe
Randox Laboratories LTD., Crumlin, UK
Randox Laboratories, Krefeld

96-Well-Platte, U-Form
Glashomogenisator
Ultraschallgerät, SonoPuls
Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4
Zentrifuge 5417 R
Vakuumentrifuge Concentrator 5301

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CarlRoth & Co, Karlsruhe
Bandelin, Berlin
Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg

2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

NaCl
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Dye Reagent Konzentrat
BSA

CarlRoth & Co, Karlsruhe
CarlRoth & Co, Karlsruhe
CarlRoth & Co, Karlsruhe
Bio-Rad-Laboratories, München
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

96-Well-Platten, U-Form

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4

Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.2.6 Untersuchungen der Genexpression auf mRNA-Ebene

RNA-Isolation

peqGOLD TriFast™
Chloroform $\geq 99\%$
Isopropanol $\geq 99.5\%$
Ethanol absolut
RNase-freies Wasser

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Merk, Darmstadt
Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

Elektrischer Homogenisator TissueRuptor
Zentrifuge 5417 R
Wärmeschrank Medax

Quiagen GmbH, Hilden
Eppendorf, Hamburg
Medax GmbH & Co.KG, Rendsburg

cDNA-Synthese

5x MuLV Buffer
DNase (1U/ μl)
EDTA
Oligo dT
dNTP

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Pharmacia Biotech AG, Dübendorf
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2. MATERIAL

MuLV Reverse Transcriptase (20 U/μl)
RNase-freies Wasser

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

UV-96-Well-Platten
Photometer Bio-Tek Synergy HAT, Software KC4
Peltier Thermal Cycler PTC-200

BD Bioscience, Heidelberg
Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

Realtime RT-PCR

SYBR[®] Green

Primer: MTP
ApoB
β-Actin

RNase-freies Wasser

Applied Biosystems, Darmstadt

MWG-Biotech, Ebersberg

MWG-Biotech, Ebersberg

MWG-Biotech, Ebersberg

Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

Strips, 200 μl Thin Wall
Filtertips Tip One (0.1-10 μl; 1-20 μl; 1-200 μl;
101-1000 μl)

Bio-Rad Laboratories, München
Starlab GmbH, Ahrensburg

RT-PCR-Gerät iCycler iQTM5, Software iQ Version 2.0
Primer3

Bio-Rad Laboratories, München
Whitehead Institute for Biomedical Research,
Cambridge, MA

2.2.7 Bestimmung der MTP-Aktivität

Tris base
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)
-Tetraessigsäure
MgCl₂
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini
Research Kit for MTP (R100)
Isopropanol > 99.5%

CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Chylos Inc., USA
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

96-Well-Platte Fluotrac, schwarz

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Elektrischer Homogenisator TissueRuptor
Photometer Bio-Tek Synergy HAT, Software KC4

Quiagen GmbH, Hilden
Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.2.8 Isolierung der Proteine aus Lebergesamthomogenat

HEPES Pufferan[®] >99.5%
MgCl₂
KCl >99.5% p.a.
DTT (Dithiothreitol)
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini
NP-40-Lösung
Glycerol
NaCl
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) >99%, p.a.

CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

Galshomogenisator
Ultraschallgerät SonoPuls

CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Bandelin, Berlin

2.2.9 Westernblot

DTT (Dithiothreitol)
Ladungspuffer
30% Acrylamid/Bis-Lösung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bio-Rad Laboratories, München

2. MATERIAL

Tris base	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
10% SDS (Natriumdodecylsulfat)	Gibco Invitrogen Corporation
TEMED (Tetramethylethyldiamin) ~99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
APS	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin >99% p.a	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol ROTISOLV® HPLC Ultra Gradient Grade	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Primäre Antikörper	
- MTP Mouse IgG2a (97 kDa)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
- β-Actin Rabbit mAb (45 kDa)	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Sekundäre Antikörper	
- Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., USA
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Full Range Rainbow Molekular Weight Markers (12000-225000Da)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tween® 20	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
NaCl	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
PVDF-Membran Hybond-P	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Gel Blot Paper Whatman-Papier	Whatman International Ltd, UK
Mini Vertical Gel System	Neolab, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia, Schweden
Electroblotting System, Semi-Dry Hep-1 Panther	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Wackeltisch ST5 CAT	Neo Lab, Heidelberg

2.3 Einfluss von Ethanol und Geschlechtshormonen auf die Interferon- γ Ausschüttung in NK-92-Zellen

2.3.1 Inkubationsversuche

NK-92-Zellen, human natural killer lymphoma (ACC 488)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
Alpha Modification of eagle's medium, without ribosides & deoxyribosides, with L-Glutamine, endotoxin tested, sterile filtered	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FCS (Fetal Calf Serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HS (Horse Serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin-Strptomycin (10000 IU/ml-10000 μ /ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Recombinant Human Interleukin-2, (IL-2), >95%	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA
Ethanol, ROTIPURAN®, >99.8%, p.a.	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
FSH (F4021), 7.000 IU/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LH (L5259), 11.000 IU/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Estradiol, cell-culture tested, (E2758), 99.8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Progesteron, cell-culture tested, (P8783), 99.4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Testosteron, (T1500), >99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO), cell-culture tested	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Human Interleukin-12 (IL-12), >97%	R&D Systems Europe GmbH, Wiesbaden
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V, ~99%, proteasefrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2. MATERIAL

Trypanblau-Lösung, 0.4%, steril filtriert,
cell-culture tested

Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm²)
Zellkulturflaschen (175 cm²)
TC-Platten, 24-Well, steril, mit Deckel
Plastikboxen mit Deckel
BioFolie
Neubauer Zählkammer
Glspipetten (10ml, 20 ml)
Combitips plus (1 ml, 5 ml)
Falcon Tubes, Cellstar[®] PP tubes with screw cap
(15 ml, 50 ml)

MCO-20AIC Automatic CO₂ Inkubator
Laminar Flow Biosafe
Fireboy plus, Bunsenbrenner
Pipettus[®]
GS-6R Zentrifuge
Zentrifuge 5417 R
Mikroskop
SANOclav, Autoklav
Hitzesterilisationsofen

2.3.2 Messung der Zellviabilität

SYTOX Green
Triton X-100
RPMI ohne Phenolrot
Salmon Sperm DNA-Lösung

TC-Platten, 96-Well, steril, U-Form
Fluostar (Software BMG-FluoStar 1.0)

2.3.3 Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA

NaHCO₃
Na₂CO₃
NaCl
Na₂HPO₄ · 2 H₂O
KH₂PO₄
KCl
Tween[®] 20
FCS
OptEIA[™] ELISA Set –Human IFN- γ
OptEIA[™] Substrate Geagent Set
-Substrate Reagent A (Hydrogenperoxid)
-Substrate Reagent B (Tetramethylbenzidin)
H₂SO₄
Nunc-Immuno[™] Microplatten (Maxi Sorp[™] Surface)

Mehrkanalpipette 300 ml
Mikrotiterplatten-Washer Columbus
Platteninkubator ThermoStar
Mikrotiterplatten-Reader (459)

SlideWrite Plus Version 6.0

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Emsa Werke Wulf GmbH & Co., Emsdetten
Vivascience, Göttingen
Assistent, Kirchheim u. Teck
Multimed Wicker GmbH, Hirschheim u. Teck
Eppendorf AG, Hamburg
Greiner, Frickenhausen

Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Bad Nenndorf
Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen
INTEGRA Biosciences AG, Chur, Schweiz
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co., Eberstadt
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Eppendorf AG, Hamburg
Olympus, Hamburg
Wolf GmbH, Bad Überkingen-Hausen
Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Molecular Probes, Göttingen
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gibco Life Technologies, Eggenstein

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
BMG, Freiburg

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Merck KGaA, Darmstadt
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
BD Bioscience, Heidelberg
BD Bioscience, Heidelberg

CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Nunc, Wiesbaden

Eppendorf, Hamburg
Tecan SLT-Labinstruments, Crailsheim
BMG, Offenburg
Tecan SLT-Labinstruments, Crailsheim

Advanced Graphics Software Inc., Carlsbad, USA

2. MATERIAL

2.4 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Kolbenhubpipette
Spitzen für Kolbenhubpipette
Reaktionsgefäße (0.65 ml, 1.5 ml, 2 ml)
Falcons mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)
Feinwaage Kern ARS 120-4
Vortex-Mixer 7-2020

Eppendorf, Hamburg
Sarsted AG & Co, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg
Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
Kern, Balingen
neoLab®, Heidelberg

2.5 Software

MS Office 2000
GraphPad Prism Version 4.00
Statistica Version 6.0
Slide Write Version 6

Microsoft Corporation
GraphPad Software, San Diego California USA
StatSoft, Inc., Tulsa, USA
Advanced Graphics Software Inc., Carlsbad, USA

3. Methoden

3.1 Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD

3.1.1 Ein-/Ausschlusskriterien für Patienten mit ALD und für gesunde Kontrollen

In die Untersuchung wurden ursprünglich die Messdaten von 2031 Patienten (weiblich: 878, männlich: 1153) aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart einbezogen. Die Daten stammten aus Studien zur Pathogenese alkoholinduzierter Organerkrankungen, die im Zeitraum von 1992 bis 2002 von dem Arbeitskreis Profs. J.Ch. Bode und Ch. Bode durchgeführt wurden. Aufgrund der strengen Ausschlusskriterien (Tab. 3-1) wurde die Anzahl der in die Auswertung eingehenden Probanden letztendlich auf 546 (weiblich: 180, männlich: 366) reduziert. Die Durchführung der Studien wurde jeweils durch die Ethik-Kommission des Robert-Bosch-Krankenhauses genehmigt und entsprach der Deklaration von Helsinki von 1975, überarbeitet im Jahr 1983. Die Patienten wurden vor der Untersuchung über Zweck und Ablauf der jeweiligen Studien informiert und erklärten schriftlich ihre Einwilligung.

Persönliche Daten (Gewicht, Größe etc.) und Angaben zu den Trinkgewohnheiten (letzter Alkoholkonsum, Dauer des Alkoholkonsums etc.) wurden zusammen mit der Erhebung der retrospektiven Ernährungsanamnese („diet history“) erfasst, die mit dem im Arbeitskreis entwickelten (Erhardt, 1991) Computerprogramm EBIS (Ernährungsanamnese, Beratungs- und Informations-System) durchgeführt wurde. Die Messung der klinisch-chemischen Parameter (AST, ALT, γ -GT, Bilirubin, relative Prothrombinzeit, Albumin) erfolgte im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart nach den gängigen Standard-Methoden. Die Einteilung der Probanden in die Untersuchungsgruppen erfolgte nach den unten aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien. Folgende Untersuchungsgruppen wurden dem Ziel der Studie entsprechend gebildet:

Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe (C) bestand aus 336 freiwilligen gesunden Probanden (128 Frauen, 208 Männer), die bezüglich des Alters und der Geschlechterverteilung vergleichbar mit dem untersuchten Patientenkollektiv mit alkoholbedingten Lebererkrankungen waren und weniger als 20 g Alkohol pro Tag konsumierten. Als Kontrollen wurden einerseits gesunde freiwillige Personen (Krankenhauspersonal, Mitarbeiter im Labor) gewonnen, andererseits dienten Patienten als Kontrollen, die im Krankenhaus einer Routineuntersuchung wegen intestinaler

3. METHODEN

Beschwerden unterzogen wurden, die aber keine der unten aufgeführten Ausschlusskriterien aufwiesen.

Patienten mit alkoholbedingten Leberveränderungen

Es wurden folgende Patienten in die Studie eingeschlossen:

Alkoholabusus mit > 60 g pro Tag seit über drei Jahren

Alkoholkonsum bis mindestens drei Tage vor Aufnahme ins Krankenhaus

- A. 98 Patienten (männlich: 82; weiblich: 16) mit alkoholbedingter Leberveränderung, die nicht über das Stadium einer Fettleber hinausgeht (alkoholbedingte Fettleber, **ALD1**)

Die folgenden klinisch-chemischen Parameter lagen im Normbereich:

Bilirubin

Quick-Wert

Es konnten erhöht sein:

Aspartat-Aminotransferase (AST) bis 40 U/l und

Alanin-Aminotransferase (ALT) bis 35 U/l

- B. 59 Patienten (männlich: 45; weiblich: 14) mit alkoholbedingter Leberveränderung mit Leberzellschädigung (alkoholbedingte Hepatitis, **ALD2**)

Folgende Laborparameter waren erhöht:

AST > 40 U/l oder

AST > 35 U/l und Bilirubin > 1,5 mg/dl

und zusätzlich

Quotient AST / ALT > 1 und

γ -Glutamyltransferase (γ -GT) > 55 U/l

- C. 53 Patienten (männlich: 31; weiblich: 22) mit alkoholbedingter zirrhotischer Leberveränderung (alkoholinduzierte Zirrhose, **ALD3**)

Nachweis der Leberzirrhose durch histologische Untersuchung oder

klinischer Nachweis (Ultraschall) durch Vorliegen von Ösophagusvarizen, Aszites oder Splenomegalie

3. METHODEN

und/oder

Nachweis durch klinisch-chemische Messgrößen:

Es mussten von

AST > 40 U/l

γ -GT > 100 U/l **mindestens 1 Kriterium**

und von

Quick < 60 %

Bilirubin > 3.5 mg/dl

Serumalbumin < 2.5 g/dl **mindestens 2 Kriterien** erfüllt sein.

Bei Zustimmung der Patienten zu einer Leberbiopsie wurde die histologische Untersuchung zusätzlich zur Einteilung der Patienten in die jeweiligen ALD-Gruppen herangezogen. Patienten mit der Diagnose ‚Fettleber‘ wurden der Gruppe ALD1 zugeordnet, Patienten mit dem Befund ‚alkoholinduzierte Hepatitis‘ der Gruppe ALD2 und Patienten mit ‚Zirrhose‘ der Gruppe ALD3. Da bei einigen Patienten eine Biopsie der Leber aufgrund einer verminderten Blutgerinnung (v.a. bei Patienten der Gruppe ALD3) kontraindiziert war und einige Patienten eine Biopsie verweigerten, konnte nur bei insgesamt 53 Patienten mit ALD (ALD1: 13, ALD2: 24, ALD3: 16) eine Leberbiopsie durchgeführt werden. Jedoch wurden in allen Fällen die Einteilungen der Patienten in die jeweiligen Gruppen (ALD1 = Fettleber, ALD2 = Hepatitis, ALD3 = Zirrhose) durch die histologischen Untersuchungen bestätigt. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Zuordnung zu den Gruppen ALD1-3, die nur auf Ultraschalluntersuchungen oder klinisch-chemischen Messwerten basierte, war kleiner als 0.1% ($p < 0.001$; Chi-Square-Test).

Tabelle 3-1 Allgemeine Ausschlusskriterien für Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen

Allgemeine Ausschlusskriterien (für alle Studienteilnehmer)
Alter < 18 und > 61 Jahre
Vorliegen einer Schwangerschaft
akute und chronische Pankreatitis
Divertikulitis
Darmpolypen > 20 mm
anhaltende Diarrhö
kardiale Dekompensation
schwere bakterielle Infektion oder Sepsis
Malignome, Tumorleiden
rheumatische Erkrankungen
eine kurz zuvor durchgeführte Operation
Bluttransfusion in den letzten drei Monaten
Hepatitis B- oder C-Infektion
Diabetes mellitus
chronisch entzündliche Darmerkrankungen
krankhafte Adipositas
Einnahme hepatotoxischer Medikamente
nicht-alkoholbedingte Lebererkrankungen

3.1.2 Ernährungsanamnese bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen

Sowohl die Patienten mit ALD (innerhalb von 3 Tagen nach Einlieferung ins Krankenhaus) als auch die Kontrollpersonen wurden von geschulten Ernährungsspezialisten über ihre Ernährungsgewohnheiten befragt. Hierzu wurde eine computergestützte retrospektive Diet History (EBIS) durchgeführt (Landig *et al.*, 1998). Um jahreszeitliche Schwankungen im Ernährungsverhalten auszuschließen, wurden die Studienteilnehmer über ihr Langzeit-Ernährungsmuster der vergangenen 3-6 Monate befragt. Das Programm EBIS basiert auf dem Bundeslebensmittelschlüssel BLS. Diese Datenbank umfasst mehr als 11000 Lebensmittel und Rezepte. Um die Angaben zum täglichen Alkoholkonsum nicht zu beeinflussen, wurden die Studienteilnehmer zu ihrer durchschnittlichen täglichen Nahrungsaufnahme befragt, ohne sich dabei speziell auf den Konsum alkoholhaltiger Getränke zu fokussieren. Dennoch wurden sowohl Patienten mit ALD als auch die gesunden Kontrollpersonen möglichst unauffällig über die Häufigkeit und die Menge an konsumierten alkoholhaltiger Getränke im Rahmen der Diet History befragt. Als eine „Portion“ Alkohol galten hierbei entweder ein Glas Wein, eine kleine Flasche Bier (0.33 l) oder ein Schnapsglas Spirituosen. Für die Berechnung

3. METHODEN

der durchschnittlichen täglichen Alkoholmenge wurde von folgenden Volumenprozent (Vol.%) -Angaben ausgegangen: Wein 11 Vol.%, Bier 4 Vol.% und Schnaps 40 Vol.%.

3.1.3 Statistische Analyse

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurde eine Analyse der Varianzen (two-way-ANOVA: Geschlecht und Schweregrad der ALD) mit einem anschließenden post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt (Statistica Version 6.0 Software, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde auf Varianzhomogenität (Test nach Bartlett) geprüft, um die Bedingungen für die Anwendung der ANOVA zu erfüllen. Der Student's *t*-Test wurde für den Vergleich der Quintile für unterschiedliche Nährstoffaufnahmen durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0.05$ war.

3.2 Untersuchung geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzess-bedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des MTP

3.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Alle Tierversuche wurden beim Regierungspräsidium Stuttgart, Ref. 35 Veterinärwesen, Lebensmittelüberwachung, im Versuchsantrag Nr. V250/07 EM beantragt und genehmigt. Sechs bis 8 Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse wurden von Janvier bezogen. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere unter kontrollierten Beleuchtungs- und Luftverhältnissen (Dunkelphase von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr; Lichtphase von 19.00 Uhr bis 7.00 Uhr; 50-60 % Luftfeuchtigkeit) in einem Tierstall mit SPF-Bereich (spezifisch pathogenfrei) bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ gehalten. Während des gesamten Versuchszeitraums hatten die Tiere *ad libitum*-Zugang zum Standardfutter (ssniff®) und Trinkwasser.

3.2.2 Akute Alkoholexposition

Am Versuchstag erhielten die Tiere morgens einmalig entweder einen Bolus Alkohol (6g Ethanol/ kg Körpergewicht) oder isokalorische/isovolumetrisch Maltodextrin-Lösung. Zur Herstellung der Alkohollösung wurde 95%-iger unvergällter Alkohol verwendet, der zu einer 20%-igen isotonischen Lösung (0.9 % NaCl) verdünnt wurde. Insgesamt wurden entweder 0.0378 ml Alkohol- oder isokalorische Maltodextrin-Lösung pro g Körpergewicht über eine Schlundsonde verabreicht. Bei dieser Alkoholdosis wurden die Tiere träge, jedoch erlangten sie nach ca. 6 Stunden wieder normales Verhalten. Die eingesetzte Menge an Ethanol verursachte keine Mortalität. Zwölf, 24 bzw. 48 h nach akuter Alkoholexposition wurden die Tiere zur Gewebeentnahme terminal narkotisiert (siehe 3.2.4).

3.2.3 Behandlung mit Toremifen

Basierend auf den Konzentrationen von Toremifen, die bereits erfolgreich in den Untersuchungen zur Rolle des Östrogens in der Entstehung der chronischen ALD in der Ratte von Järveläinen *et al.* (2001) verwendet wurden, erhielten weibliche 6 Wochen alte Mäuse über 5 Tage hinweg morgens mittels oraler Gavage entweder 5 mg/kg KG des Östrogen-Antagonisten Toremifen in 0.5%-iger isotoner Methylcellulose-Suspension oder nur Methylcellulose-Suspension. Am 5. Tag erhielten die Tiere 1 h nach der Toremifen-/

3. METHODEN

Methylcellulose-Gavage über eine Schlundsonde entweder einen akuten Bolus Alkohol (6 g/kg KG) oder isokalorisch/isovolumetrisch Maltodextrin-Lösung. Zwölf h nach akuter Alkoholexposition wurden die Tiere zur Gewebeentnahme terminal narkotisiert (siehe 3.2.4).

3.2.4 Gewebeentnahme

Mittels einer intraperitonealen Injektion eines Gemisches aus 80 mg Ketamin und 6 mg Xylazin pro kg Körpergewicht wurden die Tiere am Versuchsende narkotisiert. Nach Öffnen des Abdomens wurde die Leber entnommen, Gewebestücke wurden zum einen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt, zum anderen wurde für histologische Untersuchungen Gewebe des *Lobus sinister hepatis lateralis* in OCT gefrierfixiert.

3.2.5 Bestimmung der Lipidakkumulation in der Leber mittels Oil Red O-Färbung

Zur histologischen Darstellung der Lipidakkumulation im Lebergewebe wurden Gefrierschnitte des Lebergewebes mit Oil Red O gefärbt. Hierbei werden Fetttröpfchen in der Leber durch den roten Farbstoff angefärbt.

10 µm dicke Kryoschnitte (Lebergewebe gefrierfixiert in OCT) wurden 12 min mit Oil Red O gefärbt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 300 mg Oil Red O in 100 ml Isopropanol gelöst und zweimal filtriert. 48 ml dieser Stocklösung wurden mit 32 ml destilliertem Wasser gemischt und nach 10 min sofort zur Färbung verwendet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal mit destilliertem Wasser, dann 5 min lang unter kaltem fließendem Leitungswasser und anschließend wiederum einmal mit destilliertem Wasser gespült. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte 45 sec in Hämatoxylin inkubiert und ca. 3 min lang unter kaltem fließendem Leitungswasser „gebläut“. Nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt. Bei 400-facher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop von den gefärbten Gewebeschnitten Aufnahmen gemacht und diese densitometrisch mit der Software AxioVision ausgewertet. Das Ausmaß der mit Oil Red O angefärbten hepatischen Lipideinlagerung wurde prozentual (% of microscope field) angegeben. Pro Gewebeschnitt wurden 5 Aufnahmen gemacht und der jeweilige Mittelwert der prozentualen Lipideinlagerung errechnet.

3.2.6 Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts

Um die hepatischen Triglyceride basierend auf der Methode nach Folch *et al.* (1957) isolieren zu können, wurden 50 mg Lebergewebe in 1 ml 2x PBS (pH 7,4) in einem Glashomogenisator und durch Behandlung mit Ultraschall (30 sec, 6 cycles) homogenisiert. Zu 500 µl des Lebergesamthomogenats wurden 750 µl Chloroform/Methanolgemisch (2:1) hinzugefügt. Die Proben wurden 10 min gevortext und weitere 30 min auf dem Schwenktisch geschüttelt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 4°C, 14000 rpm). Von der unteren organischen Phase wurden 200 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Vakuumzentrifugation wurde das Chloroform verdampft. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl BSA (5%) resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (20 sec, 6 cycles). Nach Einfrieren bei -80°C und Wiederauftauen wurden die Proben erneut mit Ultraschall behandelt (20 sec, 6 cycles), gevortext und 30 min bei 37°C inkubiert. Mit einem kommerziell erhältlichen Kit (RANDOX), welches auf einem colorimetrischen Nachweisverfahren basiert, wurde die Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei werden die Triglyceride nach enzymatischer Hydrolyse mit Lipasen bestimmt. Als Indikator dient hierbei Quinonimin, das aus Wasserstoffperoxid, 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter katalytischem Einfluss von Peroxidase gebildet wird.

Die Proben wurden bei 500 nm photometrisch gemessen und der Triglyceridgehalt wie folgt berechnet:

$$\text{Triglyceride [mg/100 ml]} = \text{Konzentration}_{(\text{Standard})} * (\text{Absorption}_{(\text{Probe})} / \text{Absorption}_{(\text{Standard})})$$

Der Gehalt an Triglyceriden wurde auf die Proteinkonzentration des Lebergesamthomogenats bezogen, die durch den Bradford-Assay bestimmt wurde (siehe 3.2.7).

3.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration im Lebergesamthomogenat nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde basierend auf der Methode nach Bradford (1976) aus den Lebergesamthomogenaten durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Messung einer Verschiebung des Absorptionsmaximums durch die spezifische Bindung des Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an hydrophobe Seitenketten der Proteine. Die aus der Komplexbildung resultierende Farbänderung von rot nach blau kann

3. METHODEN

anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.

Zunächst wurde das Lebergesamthomogenat 1:30 oder 1:50 mit 2x PBS (PH 7,4) verdünnt. 5 µl der verdünnten Probe wurden mit je 200 µl verdünnter Färbelösung (5 ml Dye-Reagent + 20 ml dest. Wasser) 5 min in einer 96well-Platte inkubiert und bei 595 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente eine BSA-Stammlösung (100 mg/ml), die in den Konzentrationen 1 mg/ml; 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml; 0.125 mg/ml; 0.0625 mg/ml; 0 mg/ml eingesetzt wurde (jeweils 5 µl Standard + 200 µl Dye-Reagent). Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde mittels der Standard-Geradengleichung die Proteinkonzentration der Leberproben berechnet.

3.2.8 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Zur Isolation der RNA aus Lebergewebe wurde das kommerziell erhältliche peqGOLD TriFast™ verwendet. Diese Isolationsmethode basiert auf dem Verfahren von Chomczynski *et al.* (1987), in dem das aus Guanidinisothiocyanat und Phenol bestehende peqGOLD TriFast™ in einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation eingesetzt wird.

50-100 mg Lebergewebe wurden mit einem elektrischen Homogenisator (TissueRuptor) in 1 ml TriFast™-Reagenz homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden dem Überstand je 200 µl Chloroform zugesetzt, die Proben 15 sec geschüttelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 × g, 5 min) wurde die obere farblose Phase zur Fällung der RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 × g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und erneut zentrifugiert (12000 × g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-behandelt) bei 55°C gelöst und bei -80°C eingefroren.

3.2.9 cDNA-Synthese

Die RNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt and jeweils 1 µg der Gesamt-RNA wurde mittels MulV Reverser Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurde folgender Ansatz pipettiert (Tab. 3-2):

3. METHODEN

Tabelle 3-2 Protokoll der cDNA-Synthese

Pipettierschema der cDNA-Synthese	
1 µg RNA/20µl H ₂ O	
DNase-Verdau:	
5xMuLV-Buffer	5 µl
DNase	1 µl
<i>Inkubation: 15 min, 37 °C</i>	
Abstopfung der Reaktion:	
25 mmol EDTA	2.5 µl
<i>Inkubation: 10 min, 70 °C</i>	
CDNA-Synthese:	
5xMuLV-Buffer	5 µl
Oligo dT Primer	2.5 µl
dNTP	4 µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-freies Wasser	9 µl
<i>Inkubation: 60 min, 37 °C</i>	
RNase-freies Wasser	50 µl

3.2.10 Realtime RT-PCR

Mit Hilfe des Online-Programms ‚Primer 3‘ (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) wurden spezifische Primer so „designed“, dass nur cDNA und keine genomische DNA amplifiziert wurde (Tab. 3-3). Die Expression von MTP, ApoB und β-Actin wurde in den Proben mittels 3-stufiger realtime-RT-PCR bestimmt (Tab. 3-4). Pro Probe wurden 10 µl SYBR® Green, 3 µl RNase-freies Wasser, 1 µl Primer forward (3 pmol/µl), 1µl Primer reverse (3 pmol/µ) und 5 µl cDNA angesetzt. Die Konzentration des Zielgens wurde mit der vergleichenden C_T-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) berechnet und auf das Referenzgen (β-Actin) normalisiert.

Tabelle 3-3 Primersequenzen

	Primer-Sequenz forward	Primer-Sequenz reverse
MTP	5'- CCT GCT GTC CAT TGG GGA AC -3'	5'- CAC GGG GGC TAC GTT CTA CG -3'
ApoB	5'- TCA CCA TTT GCC CTC AAC CT -3'	5'- CAG GTC AAC ATC GGC AAT CA -3'
β-Actin	5'- GGC TCC TAG CAC CAT GAA -3'	5'- AGC CAC CGA TCC ACA CAG A -3'

3. METHODEN

Tabelle 3-4 Realtime-RT-PCR-Protokoll

Protokoll zur Messung der mRNA-Expression mittels realtime-RT-PCR		
Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1x	95°C	3 min
50x	95°C	15 sec
	60°C	30 sec
	72°C	30 sec
71x	60°C	10 sec

3.2.11 Bestimmung der MTP-Aktivität

Die Aktivität des MTP wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Chylos Inc.) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierbei werden gequentschte Fluoreszenzlipide von Donorvesikeln durch MTP auf Akzeptorvesikel übertragen.

Ca. 100 mg Lebergewebe wurden mit einem elektrischen Homogenisator (TissueRuptor) in 500 µl Puffer (Tab. 3-5) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 30 min, 4°C). Im Überstand wurde die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (siehe 3.2.7) bestimmt und für die Messung der MTP-Aktivität auf eine Konzentration von 50 µg/50 µl mit Puffer eingestellt.

Tabelle 3-5 Pufferzusammensetzung (MTP-Aktivitätsmessung)

Puffer zur Bestimmung der MTP-Aktivität	
Tris	1 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Protease-Inhibitor-Cocktail	50 µl/ml Puffer
pH-Wert: 7.6	

Zur Bestimmung der MTP-Aktivität wurden die Ansätze nach folgendem Schema in eine schwarze 96well-Platte pipettiert (Tab. 3-6):

Tabelle 3-6 Pipettierschema (MTP-Aktivitätsmessung)

Pipettierschema zur Bestimmung der MTP-Aktivität	Vesikel	Wasser	Probe	Puffer	Isopropanol	MTP
Blank	5 µl	45 µl	-	50 µl	-	-
Total	5 µl	-	-	-	95 µl	-
Positivkontrolle	5 µl	40 µl	-	50 µl	-	5 µl
Test	5 µl	45 µl	50 µl	-	-	-

3. METHODEN

Nach einer 3-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz bei 485 nm (Anregungswellenlänge) und bei 528 nm (Emissionswellenlänge) gemessen. Die prozentuale Transferrate wurde wie folgt berechnet:

$$\%Transfer = ((Fluoreszenz_{(Probe)} - Fluoreszenz_{(Blank)}) / (Fluoreszenz_{(Total)} - Fluoreszenz_{(Blank)})) * 100$$

3.2.12 Bestimmung der Proteinexpression von MTP mittels Westernblot

3.2.12.1 Cytosolischer und nukleärer Extrakt

Tabelle 3-7 Zusammensetzung des Dignum A-Puffers

Dignum A-Puffer (Cytosolischer Extrakt)	
1 M HEPES ph 7.6	100 µl
1 M MgCl ₂	15 µl
2 M KCl	50 µl
1 M DTT	5 µl
1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail	
H ₂ O bidest.	ad 10 ml

Tabelle 3-8 Zusammensetzung des Dignum C-Puffers

Dignum C-Puffer (Nukleärer Extrakt)	
1 M HEPES ph 7.6	100 µl
50% Glycerol	5 ml
5 M NaCl	840 µl
0.5 M EDTA	15 µl
1 M DTT	5 µl
1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail	
H ₂ O bidest.	ad 10 ml

Zur Herstellung des cytosolischen Extrakts des Leberproteins, wurden die Leberproben (50-100 mg) zunächst in 300 µl Dignum A-Puffer (Tab. 3-7) in einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden 30 µl 10%-ige NP-40-Lösung zugesetzt und die Proben 10 sec gevortext. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 30 sec, 4°C) wurde der Überstand (= cytosolisches Protein) mit Ultraschall behandelt (5 sec, 8 cycles). Das Pellet wurde in 120 µl Dignum C-Puffer (Tab. 3-8) 15 min auf Eis resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand (= nukleäres Protein) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3. METHODEN

3.2.12.2 Gelelektrophorese

Nach der Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.2.7) wurden die cytosolischen Extrakte mit Dignum A und Ladungspuffer verdünnt, sodass je 20 µg Protein/Tasche zur Bestimmung von MTP auf das Gel aufgetragen wurden. Nach Zusatz von je 2 µl DTT wurden die Proben anschließend 5 min bei 95°C inkubiert.

Für den Nachweis von MTP wurde ein 8%-iges SDS-Polyacrilamidgel verwendet. Für 2 Trenngel (Tab. 3-9) wurde folgender Ansatz pipettiert:

Tabelle 3-9 Zusammensetzung des 8%-igen Trenngels

8%-iges Trenngel (Ansatz für 2 Gele)	
H ₂ O bidest	4.5 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung	2.7 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.6 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	6 µl
10% APS	100 µl

Nach ca. 20-minütigem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit einem 4%-igen Sammelgel (Tab. 3-10) überschichtet.

Tabelle 3-10 Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels

4%-iges Sammelgel (Ansatz für 2 Gele)	
H ₂ O bidest	1.492 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung	333 µl
0.5 M Tris (pH 6.8)	625 µl
10% SDS	25 µl
TEMED	3 µl
10% APS	25 µl

Für die Elektrophorese wurde der 10x Elektrophoresepuffer (Tab. 3-11) 1:10 verdünnt. Bei 90 V lief das Gel ca. 2 h.

3. METHODEN

Tabelle 3-11 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers (10x)

10x Elektrophoresepuffer	
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O _{bidest}	1000 ml

3.2.12.3 Semy-Dry-Blotting

Nach der Elektrophorese wurde das Gel, die Whatmanpapiere und die zuvor mit Methanol aktivierte Hybond-P Polyvinylidendifluorid-Membran ca. 5 min in Transferpuffer (Tab. 3-12) inkubiert. Mittels eines Semidry-Elektroblotters wurden anschließend die Proteine auf die Membran übertragen (bei 2 Gelen: 80 mA, 55 min). Zur Überprüfung einer gleichen Beladung mit Protein wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Nach 45-minütigem Blocken mit BSA (2.5% in TBST (Tab. 3-13)) wurde die Membran jeweils mit dem primären Antikörper für MTP (1:500 verdünnt in 2.5% BSA in TBST) oder β -Actin (1:750 verdünnt in 2.5% BSA in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit den jeweiligen sekundären HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:5000 verdünnt) 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und mit Substratlösung 5 min lang im Dunkeln inkubiert, 5 min lang belichtet und eine Aufnahme zur densitometrischen Auswertung mit der zur Kamera gehörenden Software gemacht. Die Intensität der Banden für MTP wurde auf das Referenzprotein β -Actin normalisiert.

Tabelle 3-12 Zusammensetzung des Transferpuffers

Transferpuffer	
Tris-Base	5.8 g
Glycin	2.9 g
SDS	0.37 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

3. METHODEN

Tabelle 3-13 Zusammensetzung des TBST-Puffers

TBST	
Tris	8.77 g
NaCl	6.06 g
H ₂ O bidest	1000 ml
PH 7.6	
Tween® 20	1 ml

3.2.13 Statistische Auswertung

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurde eine Analyse der Varianzen (two-way-ANOVA: Geschlecht und Alkoholbehandlung) mit einem anschließenden post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt (Statistica Version 6.0 Software, StatSoft, Inc., Tulsa, USA; Graph Pad Prism Version 4.00, GraphPad Software, San Diego California USA). Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde auf Varianzhomogenität (Test nach Bartlett) geprüft, um die Bedingungen für die Anwendung der ANOVA zu erfüllen. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0.05$ war.

3.3 Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen

3.3.1 Inkubationsversuche

Tabelle 3-14 Eigenschaften der Zelllinie NK-92

NK-92-Zelllinie	
Zellart	human natural killer lymphoma
DSMZ-Nummer	ACC 488
Herkunft	im Jahr 1992 aus peripherem Blut eines 50 Jahre alten Mannes mit Non-Hodgkin-Lymphom gewonnen; azurophile Granula; starke zytotoxische Aktivität
Morphologie	Zellen wachsen in Zellkugeln in Suspension
Verdopplungszeit	ca. 40-50 h

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium (Tab. 3-15) gewechselt und die Zellsuspension 1:5 oder 1:10 verdünnt. Um eine ausreichende Menge an Zellen für die Inkubationsversuche zu erhalten, wurden die Zellen vor den jeweiligen Experimenten in größeren Zellkulturflaschen (175 cm²) in einem größeren Volumen an Medium kultiviert. Zur Einstellung der für die Inkubationsversuche benötigten Zellzahl wurden die Zellen zunächst 10 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Starvationmedium (Tab. 3-16) resuspendiert. Zum Auszählen in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen 1:50 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt. Nach Verdünnung mit dem entsprechenden Volumen an Starvationmedium (mit 1% Penicillin-Streptomycin) und Zusatz der jeweiligen Hormonlösungen wurden je 4 ml der Zellsuspensionen (2.4×10^6 Zellen/ml) 19 h lang mit den jeweiligen Hormonlösungen prä-inkubiert. Die Kombination und Konzentration der jeweiligen Hormone (Tab. 3-17) wurde entsprechend des Hormonverlaufs während des weiblichen Zyklus ausgewählt (Abb. 3-1). Die Inkubation in Starvationmedium wurde durchgeführt, um Einflüsse von IL-2, FCS (fötales Kälberserum) und HS (Pferdeserum) auf die IFN- γ -Produktion der NK-92 Zellen zu vermeiden.

3. METHODEN

Tabelle 3-15 Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Zellkulturmedium	
α -Modification of Eagle's Medium	75%
FCS (hitze-inaktiviert)	12.5%
HS (hitze-inaktiviert)	12.5%
IL-2	10 ng/ml

Tabelle 3-16 Zusammensetzung des Starvationmediums

Starvationmedium	
α -Modification of Eagle's Medium	97.5%
FCS (hitze-inaktiviert)	2.5%

Tabelle 3-17 Im Versuch eingesetzte Hormonkonzentrationen

Hormonkonzentrationen im Endvolumen (Hormone gelöst in Starvationmedium mit 0.02% DMSO)	
β -Estradiol (E_2)	500 pg/ml
Progesteron (P)	25 ng/ml
Testosteron (T)	8 ng/ml
LH	0.1 IU/ml
FSH	0.05 IU/ml

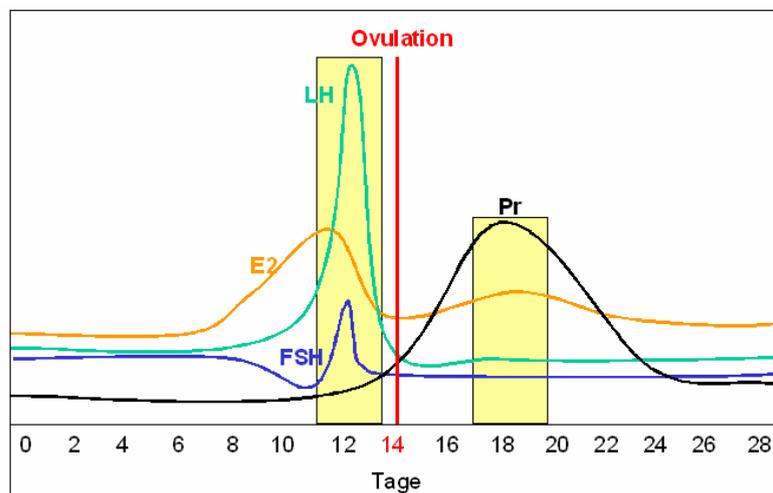


Abbildung 3-1 Hormonverlauf während des weiblichen Zyklus. E_2 = Östrogen, FSH = follikelstimulierendes Hormon, LH = luteinisierendes Hormon, Pr = Progesteron.

Nach 19 h wurden die Zellen mit Starvationmedium (mit 1% Penicillin-Streptomycin) gewaschen und in 24well-Platten umgesetzt. Nach Zusatz von Ethanol (1‰, 2‰ und 3‰ im Endvolumen) und der jeweiligen Hormonlösungen wurden die Zellen mit IL-12 (75 ng/ml Zellsuspension) stimuliert und 18 h lang in Alkohol-Vapor-Chambers, in denen die

3. METHODEN

entsprechende Ethanolatmosphäre herrschte, inkubiert. Die Positivkontrolle wurde nur mit IL-12 stimuliert, der Negativkontrolle wurde dagegen kein IL-12 zugefügt (Abb. 3-2). Zum Abbruch des Versuchs wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert (10 min, 1500 rpm) und der Überstand bis zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA bei -80°C eingefroren. Jeder Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt; insgesamt wurde das Experiment viermal wiederholt.

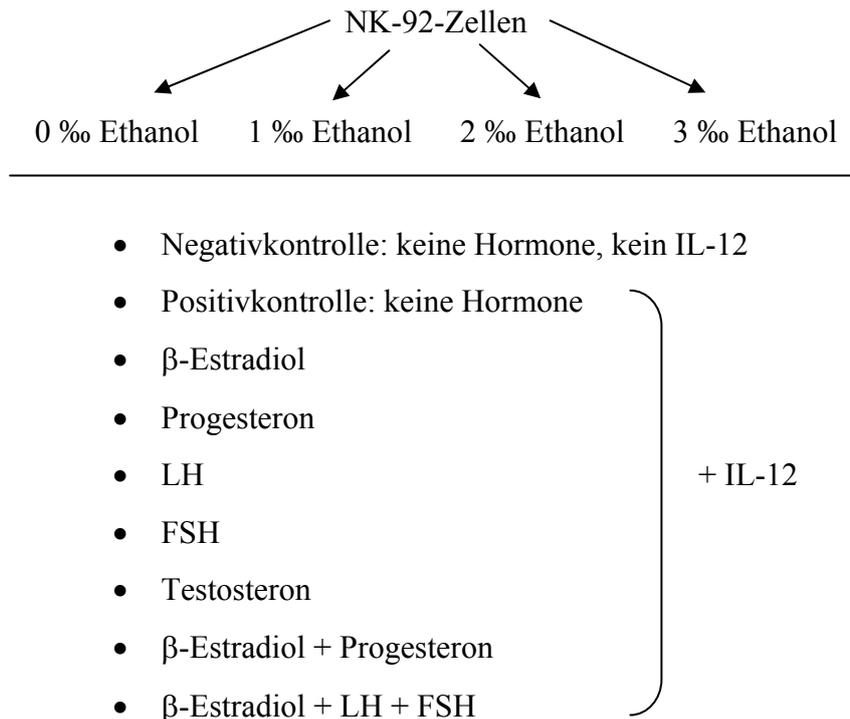


Abbildung 3-2 Versuchsbedingungen der Inkubationsversuche zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol und Geschlechtshormonen auf die Ausschüttung von IFN- γ in NK-92-Zellen. FSH = föllikelstimulierendes Hormon, LH = luteinisierendes Hormon, IL-12 = Interleukin 12.

3.3.2 Messung der Zellviabilität

Nach der 19-stündigen Prä-Inkubation mit Hormonen wurde die Viabilität der Zellen mittels SYTOX Green gemessen. Dazu wurden je 200 μl Zellsuspension abzentrifugiert (800 rpm, 10 min), das Pellet in 280 μl RPMI ohne Phenolrot resuspendiert (1.3×10^5 Zellen/ml) und 40 μl dieser Zellsuspension mit 10 μl SYTOX Green (10 μM) 5 min im Dunkeln inkubiert. Zudem wurde eine 1:3-Verdünnungsreihe der Standard-DNA (Salmon Sperm DNA) angesetzt (höchste Konzentration: 75 $\mu\text{g/ml}$). Bei 485 nm wurde anschließend die Fluoreszenz gemessen. Nach einer weiteren Inkubation (45 min) mit 50 $\mu\text{l/well}$ Triton X-100 wurde ein weiteres Mal die Fluoreszenz gemessen. Die Anteil lebender Zellen wurde aus der Differenz

3. METHODEN

totaler DNA (SYTOX Green-positive Zellen nach Triton X-100-Behandlung) und der DNA der anfänglich toten Zellen (SYTOX Green-positive Zellen vor Triton X-100-Behandlung) berechnet. Die Menge an DNA der toten Zellen wurde mittels Standardkurve mit dem Programm ‚Slide Write‘ nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Fluoreszenzintensität} = a_0 + a_1 / (1 + \exp(-(c[\log(\text{DNA pro well})] - a_2) / a_3))$$

3.3.3 Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA

Die Menge an Interferon- γ , die infolge der Stimulation mit IL-12 und/oder Ethanol und verschiedener Hormone von den NK-92-Zellen sezerniert wurde, wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Human IFN- γ BD OptEIA™ ELISA Set) nach den Angaben des Herstellers gemessen. Die Proben wurden entweder unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

Die 96well-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit 100 ml/well Coating-Reagenz (Tab. 3-19) inkubiert.

Tabelle 3-18 Zusammensetzung des Coating-Puffers

Coating-Puffer	
NaHCO ₃	4.20 g
Na ₂ CO ₃	1.78
H ₂ O bidest.	ad 500 ml
pH-Wert: 9.5	

Tabelle 3-19 Coating-Reagenz

Coating-Raegenz	
Coating-Puffer	10.5 ml
Capture Antibody	42 μ l
Ansatz für eine 96well-Platte	

Anschließend wurden die Platten dreimal mit 300 μ l/well 1x-Waschpuffer (0.05% Tween 20; Tab. 3-20) gewaschen und mit 200 μ l/well 16.5% FCS (in 1x Waschpuffer) 1 h lang bei Raumtemperatur auf einem Rütteltisch inkubiert.

3. METHODEN

Tabelle 3-20 Zusammensetzung des Waschpuffers (40x)

Waschpuffer (40x)	
NaCl	200 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	29 g
KH ₂ PO ₄	5 g
KCl	5 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
pH-Wert: 7.0	

Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden je 100 µl/well der Proben in der entsprechenden Verdünnung und der IFN-γ-Standard in einer 1:2-Verdünnungsreihe (höchste Konzentration: 1200 pg/ml) in Doppelbestimmung auf die Platten aufgetragen und 2 h lang bei Raumtemperatur auf dem Rütteltisch inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal gewaschen und mit 100 ml/well Working Detector (Tab. 3-21) 1 h lang inkubiert.

Tabelle 3-21 Zusammensetzung des Working Detectors

Working Detector	
1x- Waschpuffer (16.5% FCS)	10.5 ml
Detection Antibody	42 µl
Enzymreagenz	42 µl
Ansatz für eine 96well-Platte	

Tabelle 3-22 Substratreagenz

Substratreagenz	
Substratreagenz A	5.5 ml
Substratreagenz B	5.5 ml
Ansatz für eine 96well-Platte	

Tabelle 3-23 Zusammensetzung der Stopplösung

Stopplösung	
H ₂ SO ₄ (25%)	25 ml
H ₂ O bidest.	50 ml

Nach einem letzten Waschschrift (7mal) wurden je 100 µl/well Substratreagenz (Tab. 3-22) hinzugefügt und ca. 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl/well Stopplösung (Tab. 3-23) abgestoppt und die Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe der

3. METHODEN

Standardkurve wurde mit dem Programm ‚SlideWrite‘ die IFN- γ -Konzentration der Proben nach folgender Gleichung berechnet:

$$y = a_0 + (a_1 * x) / (a_2 + x)$$

3.3.4 Statistische Auswertung

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurde eine Analyse der Varianzen (one-way-ANOVA) mit einem anschließenden post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt (Statistica Version 6.0 Software, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde auf Varianzhomogenität (Test nach Bartlett) geprüft, um die Bedingungen für die Anwendung der ANOVA zu erfüllen. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0.05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Untersuchung der geschlechtsspezifischen Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD

Klinisch-chemische und anthropometrische Daten der Patienten mit ALD und der gesunden Kontrollpersonen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. In allen Gruppen (C, ALD1-3) war das durchschnittliche Körpergewicht bei den Frauen niedriger. Wie erwartet waren die Messwerte der Parameter, die eine Aussage über den Schweregrad der alkoholbedingten Leberschädigung liefern (Bilirubin, Albumin, relative Prothrombinzeit, AST, ALT, γ -GT und der AST/ALT-Quotient) bei allen Patientengruppen (ALD1-3) mit der Schwere des Leberschadens assoziiert und außerhalb des Referenzbereichs (Tab. 4-1). Bei weiblichen Patienten mit weiter fortgeschrittenen Stufen der ALD konnten im Vergleich zu den männlichen Patienten signifikant höhere Werte für den AST/ALT-Quotienten (ALD2 und ALD3) und für die Aktivität der γ -GT (ALD2) gemessen werden (Tab. 4-1, Abb. 4-1). Dies weist darauf hin, dass Frauen bei gleichem oder geringerem Alkoholkonsum schwerwiegendere Leberschädigungen entwickelten als die männlichen Patienten mit ALD.

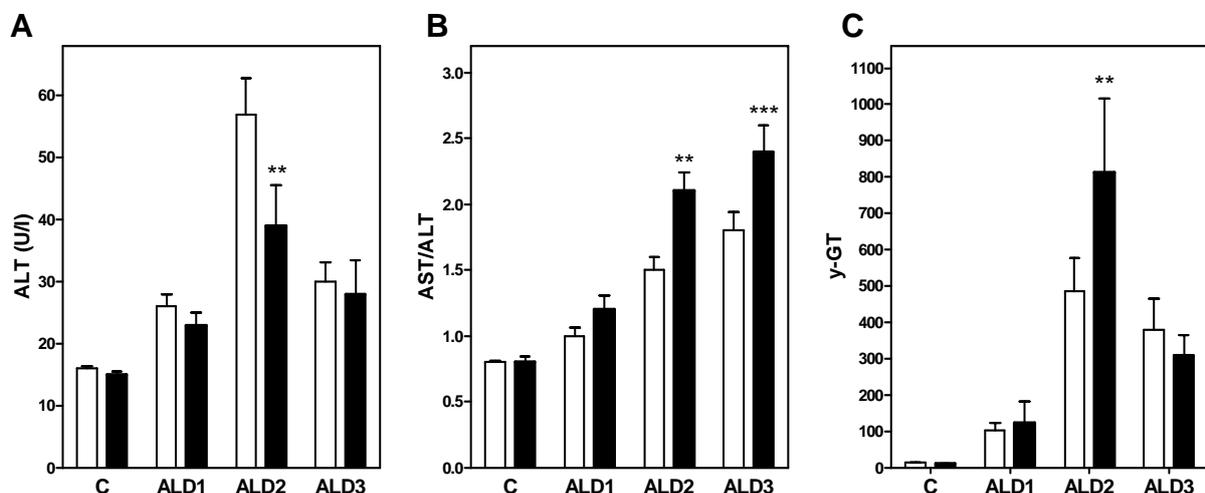


Abbildung 4-1 Klinisch-chemische Parameter von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen. **A)** ALT-Aktivität, **B)** AST/ALT-Quotient, **C)** γ -GT-Aktivität. C = gesunde Kontrollen, ALD1 = Patienten mit alkoholinduzierter Fettleber, ALD2 = Patienten mit alkoholinduzierter Hepatitis, ALD3 = Patienten mit alkoholinduzierter Zirrhose, ALD = alkoholinduzierte Lebererkrankung, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase γ -GT = Gamma-Glutamyltransferase. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM. ** p < 0.01 männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe, *** p < 0.001 männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey). Weiße Balken = männlich, schwarze Balken = weiblich.

4. ERGEBNISSE

Sowohl für den absoluten täglichen Alkoholkonsum als auch für den relativen täglichen Alkoholkonsum (g Alkohol pro kg Körpergewicht) konnten für weibliche Patienten aus allen ALD-Gruppen (ALD1-3) tendenziell niedrigere Werte errechnet werden, wobei allerdings nur in der Gruppe ALD 1 der Unterschied zu den männlichen Probanden signifikant war (Tab. 4-2, Abb. 4-2).

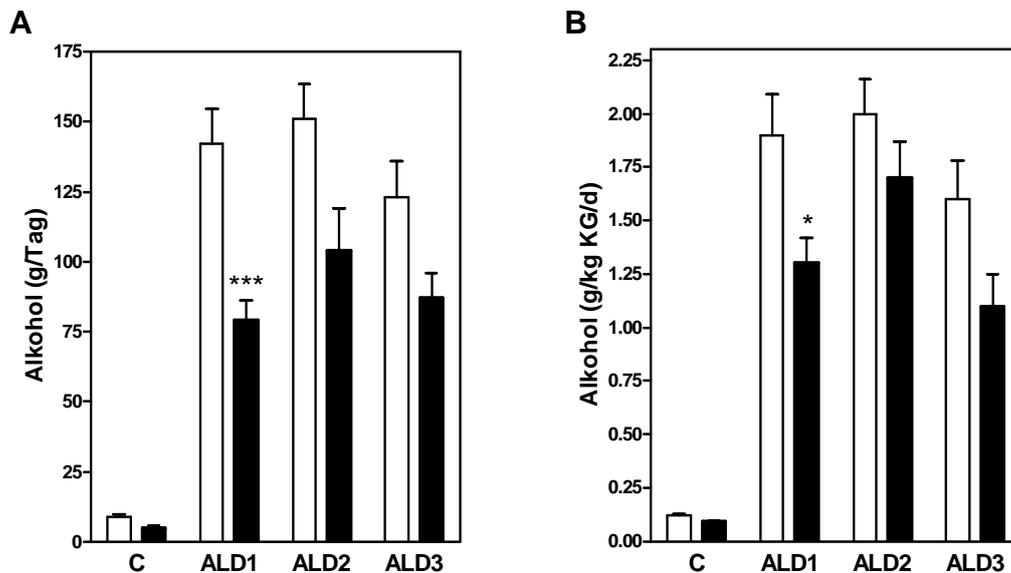


Abbildung 4-2 Alkoholkonsum von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollen (C). **A)** absoluter Alkoholkonsum (g/Tag), **B)** relativer Alkoholkonsum bezogen auf das Körpergewicht (g/kg KG/Tag). ALD1 = Patienten mit alkoholinduzierte Fettleber, ALD2 = Patienten mit alkoholinduzierter Hepatitis, ALD3 = Patienten mit alkoholinduzierter Zirrrose. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM. * $p < 0.05$ männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe, *** $p < 0.001$ männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey). Weiße Balken = männlich, schwarze Balken = weiblich.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-1 Klinisch-chemische und anthropometrische Parameter von Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen (C). Patienten mit alkoholinduzierter Fettleber (ALD1), alkoholbedingte Hepatitis (ALD2) und alkoholinduzierte Zirrhose (ALD3)

Variablen	Gesunde Kontrollen		Nicht-zirrhatische ALD				Zirrhatische ALD	
	C		ALD1		ALD2		ALD3	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
n	208	128	82	16	45	14	31	22
Alter	44 ± 0.7	51 ± 0.7 ^{***}	45 ± 1.0	50 ± 1.5	45 ± 1.5	42 ± 2.8 [†]	51 ± 1.4 ^{††}	48 ± 1.8
Körpergewicht (kg)	79 ± 0.8	67 ± 1.1 ^{***}	78 ± 1.8	62 ± 1.7 ^{***}	76 ± 2.3	55 ± 2.7 ^{***†}	78 ± 2.5	65 ± 2.9 [*]
BMI (kg/m ²) 18-25 ^a	25 ± 0.2	25 ± 0.4	25 ± 0.5	23 ± 0.7	24 ± 0.7	20 ± 0.8 ^{†††}	26 ± 1.0	24 ± 1.1
AST (U/l) 2-19 ^a	12 ± 0.2	11 ± 0.6	24 ± 1.4	26 ± 3.4	72 ± 5.3	78 ± 15.7	57 ± 9.1	66 ± 11.4
ALT (U/l) 5-24 ^a	16 ± 0.3	15 ± 0.5	26 ± 2.0	23 ± 2.1	57 ± 5.8	39 ± 6.6 ^{**}	30 ± 3.2	28 ± 5.5
AST/ALT	0.8 ± 0.01	0.8 ± 0.04	1.0 ± 0.06	1.2 ± 0.11	1.5 ± 0.10	2.1 ± 0.14 ^{**}	1.8 ± 0.14	2.4 ± 0.20 ^{***}
γ-GT (U/l) 6-28 ^a	13 ± 0.6	11 ± 0.9	103 ± 19.7	124 ± 57.5	487 ± 90.7	812 ± 202.8 ^{**}	381 ± 85.3	310 ± 55.9
Bilirubin (mg/dl) 0.2-1.4 ^a	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.09	1.0 ± 0.06	1.0 ± 0.19	1.5 ± 0.13	2.4 ± 0.60	5.7 ± 1.51	6.6 ± 1.60
Relative Prothrombinzeit (%) 70-100 ^a	93 ± 0.5	95 ± 1.4	92 ± 1.6	93 ± 2.7	91 ± 2.6	95 ± 5.3	59 ± 4.0	59 ± 2.7
Albumin (g/dl) 3.5-5.0 ^a	4.1 ± 0.03	4.4 ± 0.15	4.2 ± 0.11	4.5 ± 0.19	4.3 ± 0.15	4.3 ± 0.14	3.4 ± 0.17	3.6 ± 0.20

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ weiblich vs. männlich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey)

† $P < 0.05$; †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ Frauen mit ALD vs. weibliche Kontrollpersonen und Männer mit ALD vs. männlichen Kontrollpersonen (two-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey). Für Parameter, die für die Klassifikation der ALD herangezogen wurden, wurden signifikante Unterschiede zwischen männlichen/weiblichen Patienten mit ALD and männlichen/weiblichen Kontrollpersonen nicht angegeben.

Alle Werte sind angegeben als MW ± SEM; ^a Referenzbereich

ALD (alkoholinduzierte Lebererkrankung); AST (Aspartat-Aminotransferase); ALT (Alanin-Aminotransferase); γ-GT (Gamma-Glutamyltransferase)

4. ERGEBNISSE

Sowohl bei den weiblichen Kontrollpersonen als auch bei den weiblichen Patienten mit ALD war die tägliche Gesamtenergiezufuhr niedriger als in den entsprechenden Gruppen der Männer. Weibliche Patienten mit ALD und gesunde Frauen der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht in der Gesamtenergieaufnahme, wohingegen bei den männlichen Probanden aller ALD-Gruppen (ALD1-3) im Vergleich zu den männlichen Kontrollpersonen eine signifikant höhere Gesamtenergieaufnahme berechnet werden konnte (Tab. 4-2). Abzüglich der Energie, die aus dem Alkoholkonsum resultierte, unterschieden sich weder die weiblichen noch die männliche Patienten mit ALD von den jeweiligen Kontrollgruppen in der Energieaufnahme. Dies lässt darauf schließen, dass bei Patienten mit ALD die aus dem Alkoholkonsum resultierende Energie additiv zur Energie, die aus der Nahrung stammt, zugeführt wurde. Weibliche und männliche Patienten mit ALD unterschieden sich nicht in der tägliche Aufnahme von Protein, Fett und Kohlenhydraten.

Um die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte der Mikronährstoffzufuhr international vergleichen zu können, wurde die prozentuale Bedarfsdeckung bezogen auf die DRI-Werte (Dietary Reference Intake; Panel on Micronutrients, 2002; Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water, 2005) berechnet. Zum Vergleich sind in Tabelle 4-3 die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr in Deutschland, Österreich und der Schweiz (DACH, 2000) angegeben. Im Weiteren sind jedoch die Werte der täglichen Nährstoffzufuhr bezogen auf die internationalen DRI-Werte angegeben.

Die berechnete tägliche Aufnahme einiger Mikronährstoffe entsprach nicht der Zufuhrempfehlung (DRI). So lagen die aufgenommenen Mengen von Vitamin E, Folat und Kalium in allen Gruppen (C, ALD1-3) unterhalb der empfohlenen Zufuhr (DRI). Die empfohlenen Zufuhrmengen von Thiamin wurden dagegen lediglich von weiblichen Patienten der Gruppe ALD2 und von Männern und Frauen der Gruppe ALD3 nicht erreicht. Die mit der Nahrung aufgenommenen Mengen an Calcium waren bei weiblichen Patienten der Gruppe ALD1, bei männlichen Probanden der Gruppe ALD2 und in beiden ALD3-Gruppen unterhalb der Zufuhrempfehlung (DRI). Für die Aufnahme der restlichen Mikronährstoffe konnte dagegen in allen Untergruppen eine ausreichende Zufuhr berechnet werden (Tabelle 4-4).

Verglichen mit den männlichen Kontrollpersonen war die durchschnittliche tägliche Aufnahme (pro kg Körpergewicht) bei männlichen Patienten der Gruppe ALD1 für Riboflavin, Vitamin B₆, Folat, Kalium, Magnesium und Phosphor signifikant höher (Tabelle 4-5). Dagegen nahmen Patientinnen der Gruppe ALD1 signifikant mehr Phosphor, Eisen und Zink auf als die gesunden weiblichen Kontrollpersonen. Männliche Patienten mit einer alkoholbedingten Hepatitis (ALD2) konsumierten mehr Vitamin B₆ und Folat, aber weniger

4. ERGEBNISSE

Calcium als die gesunden männlichen Kontrollen. Patientinnen der Gruppe ALD2 unterschieden sich von den weiblichen Kontrollen in einer signifikant niedrigeren Aufnahme von Vitamin A und einem höheren Eisenkonsum. In der Gruppe ALD3 war die Folataufnahme sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Patienten signifikant höher als bei den jeweiligen Kontrollgruppen. (Tabelle 4-5)

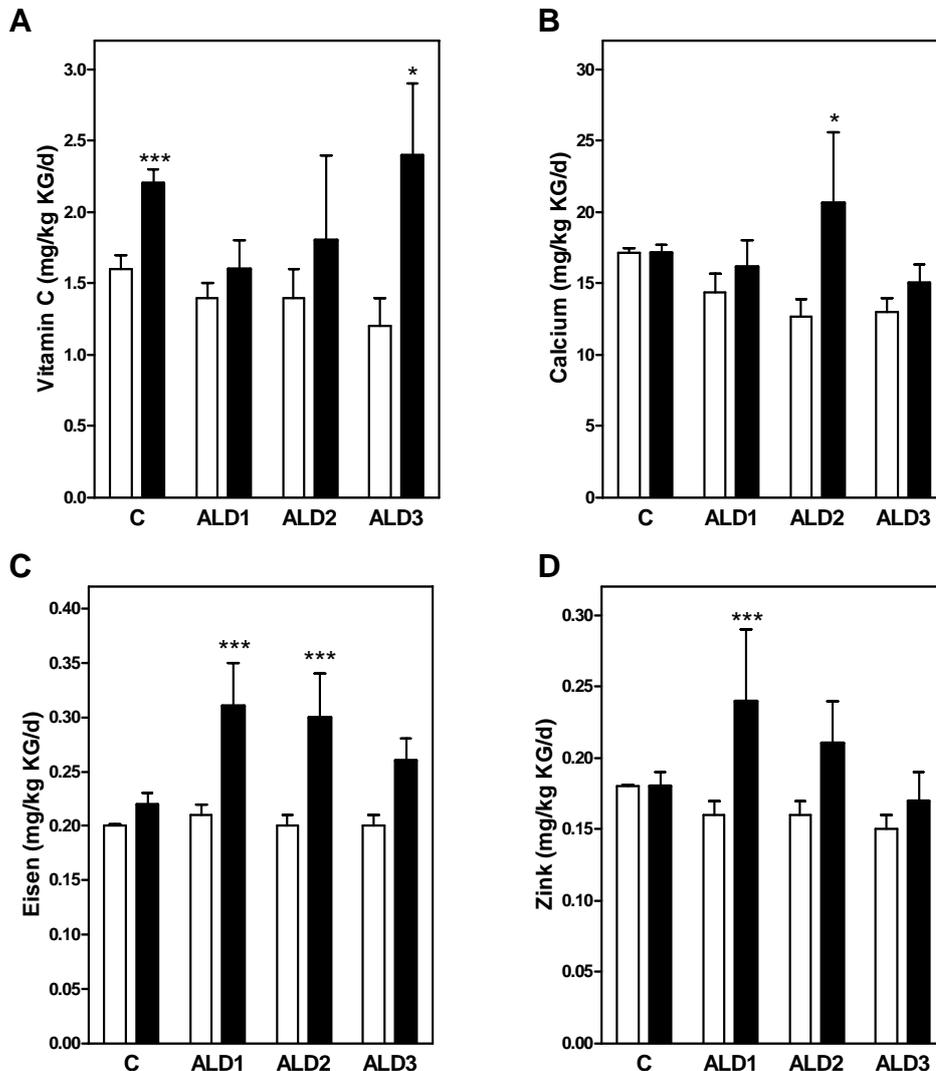


Abbildung 4-3 Relative tägliche Aufnahme von A) Vitamin C, B) Calcium, C) Eisen und D) Zink (mg/kg KG/Tag). C = gesunde Kontrollen, ALD1 = Patienten mit alkoholinduzierte Fettleber, ALD2 = Patienten mit alkoholinduzierter Hepatitis, ALD3 = Patienten mit alkoholinduzierter Zirrhose. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM. * $p < 0.05$ männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe, *** $p < 0.001$ männlich vs. weiblich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey). Weiße Balken = männlich, schwarze Balken = weiblich.

Vergleicht man männliche und weibliche Patienten innerhalb der jeweiligen ALD-Untergruppen miteinander, so konnte bei den Frauen eine signifikant höhere Aufnahme von Eisen (ALD1 und ALD2), Zink (ALD1), Calcium (ALD2) und Vitamin C (ALD3) ermittelt werden (Abb. 4-3).

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-2 Tägliche Aufnahme von Energie, Alkohol, Fett, Protein und Kohlenhydraten bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen (C).

Variablen	Gesunde Kontrollen		Nicht-zirrhatische ALD				Zirrhatische ALD	
	C		ALD1		ALD2		ALD3	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Alkohol (g/Tag)	9 ± 0.5	5 ± 0.5	142 ± 12.6	79 ± 7.3 ^{***}	151 ± 12.6	104 ± 15.0	123 ± 13.0	87 ± 8.9
Alkohol (g/kg KG/Tag)	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	1.9 ± 0.19	1.3 ± 0.12 [*]	2.0 ± 0.16	1.7 ± 0.17	1.6 ± 0.18	1.1 ± 0.15
Gesamtenergie (kcal/Tag)	2636 ± 34	2232 ± 58 ^{**}	3812 ± 189 ^{†††}	2789 ± 116 ^{**}	3413 ± 188 ^{†††}	2500 ± 255 [*]	3215 ± 173 [†]	2274 ± 189 [*]
Energie ohne Alkohol (kcal/Tag)	2571 ± 34	2193 ± 58 ^{***}	2807 ± 153	2230 ± 112	2337 ± 145	1760 ± 216	2340 ± 118	1654 ± 169
Protein (g/Tag)	98 ± 1.6	81 ± 2.0 ^{***}	101 ± 5.7	85 ± 7.1	83 ± 5.4	62 ± 9.6	85 ± 5.4	58 ± 6.5
Protein (g/kg KG/Tag)	1.24 ± 0.02	1.25 ± 0.03	1.36 ± 0.10	1.42 ± 0.16	1.08 ± 0.07	1.15 ± 0.22	1.13 ± 0.08	0.93 ± 0.12
Fett (g/Tag)	113 ± 2.0	91 ± 2.9 ^{***}	111 ± 6.7	95 ± 7.7	85 ± 7.7 ^{†††}	70 ± 10.5	86 ± 4.5 [†]	69 ± 8.7
Fett (g/kg KG/Tag)	1.44 ± 0.02	1.40 ± 0.05	1.50 ± 0.11 [†]	1.57 ± 0.16	1.13 ± 0.11	1.25 ± 0.23	1.12 ± 0.06	1.10 ± 0.16
Kohlenhydrate (g/Tag)	282 ± 4.6	250 ± 8.5	335 ± 19.6 ^{††}	238 ± 21.6 [*]	285 ± 18.7	187 ± 27.9	288 ± 17.5	214 ± 24.4
Kohlenhydrate (g/kg KG/Tag)	3.61 ± 0.06	3.82 ± 0.14	4.56 ± 0.33	3.81 ± 0.36	3.69 ± 0.24	3.41 ± 0.62	3.84 ± 0.24	3.38 ± 0.38

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ weiblich vs. männlich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey)

[†] $P < 0.05$; ^{††} $P < 0.01$; ^{†††} $P < 0.001$ Frauen mit ALD vs. weibliche Kontrollpersonen und Männer mit ALD vs. männlichen Kontrollpersonen (two-way-ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey). Für Parameter, die für die Klassifikation der ALD herangezogen wurden, wurden signifikante Unterschiede zwischen männlichen/weiblichen Patienten mit ALD and männlichen/weiblichen Kontrollpersonen nicht angegeben.

Alle Werte sind angegeben als MW ± SEM. ALD (alkoholinduzierte Lebererkrankung); alkoholinduzierte Fettleber (ALD1), alkoholbedingte Hepatitis (ALD2) und alkoholinduzierter Zirrhose (ALD3); KG (Körpergewicht).

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-3 Gegenüberstellung der Zufuhrempfehlungen: Dietary Reference Intakes (**DRI**), Recommended Intakes for Individuals (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, The National Academy of Sciences, 2004) vs. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, **DACH** (Deutschland, Österreich, Schweiz; 2000)

Mikronährstoffe	männlich				weiblich			
	< 50 Jahre		> 50 Jahre		< 50 Jahre		> 50 Jahre	
	DRI	<i>DACH</i>	DRI	<i>DACH</i>	DRI	<i>DACH</i>	DRI	<i>DACH</i>
Vitamin A [$\mu\text{g}/\text{Tag}$]	900	<i>1000</i>	900	<i>1000</i>	700	<i>800</i>	700	<i>800</i>
Vitamin E [mg/Tag]	15	<i>14</i>	15	<i>13</i>	15	<i>12</i>	15	<i>12</i>
Thiamin [mg/Tag]	1.2	<i>1.2</i>	1.2	<i>1.1</i>	1.1	<i>1.0</i>	1.1	<i>1.0</i>
Riboflavin [mg/Tag]	1.3	<i>1.4</i>	1.3	<i>1.3</i>	1.1	<i>1.2</i>	1.1	<i>1.2</i>
Vitamin B ₆ [mg/Tag]	1.3	<i>1.5</i>	1.7	<i>1.5</i>	1.3	<i>1.2</i>	1.5	<i>1.2</i>
Folat [$\mu\text{g}/\text{Tag}$]	400	<i>400</i>	400	<i>400</i>	400	<i>400</i>	400	<i>400</i>
Vitamin C [mg/Tag]	90	<i>100</i>	90	<i>100</i>	75	<i>100</i>	75	<i>100</i>
Natrium [mg/Tag]	1500	<i>550</i>	1300	<i>550</i>	1500	<i>550</i>	1300	<i>550</i>
Kalium [mg/Tag]	4700	<i>2000</i>	4700	<i>2000</i>	4700	<i>2000</i>	4700	<i>2000</i>
Calcium [mg/Tag]	1000	<i>1000</i>	1200	<i>1000</i>	1000	<i>1000</i>	1200	<i>1000</i>
Magnesium [mg/Tag]	420	<i>350</i>	420	<i>350</i>	320	<i>300</i>	320	<i>300</i>
Phosphor [mg/Tag]	700	<i>700</i>	700	<i>700</i>	700	<i>700</i>	700	<i>700</i>
Eisen [mg/Tag]	8	<i>10</i>	8	<i>10</i>	18	<i>15</i>	8	<i>10</i>
Zink [mg/Tag]	11	<i>10</i>	11	<i>10</i>	8	<i>7</i>	8	<i>7</i>

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-4 Tägliche relative Aufnahme von Mikronährstoffen (% DRI) bei Patienten mit ALD und gesunden Kontrollpersonen (C).

Mikronährstoffe	Gesunde Kontrollen		Nicht-zirrhatische ALD				Zirrhatische ALD	
	C		ALD1		ALD2		ALD3	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Vitamin A	104 ± 4.5	202 ± 12.0 ^{***}	130 ± 12.5	187 ± 28.2	127 ± 14.7	102 ± 31.8 [†]	104 ± 12.4	129 ± 29.1
Vitamin E	90 ± 2.7	88 ± 3.4	78 ± 5.8	63 ± 6.7	68 ± 6.6 [†]	59 ± 7.6	72 ± 8.0	74 ± 11.1
Thiamin	126 ± 2.3	119 ± 3.3	128 ± 7.8	112 ± 8.9	104 ± 7.1 [†]	89 ± 10.6	99 ± 6.4 [†]	91 ± 9.0
Riboflavin	137 ± 2.6	145 ± 4.3	187 ± 10.5 ^{†††}	173 ± 14.2	167 ± 10.1 [†]	152 ± 30.3	148 ± 11.2	116 ± 10.3
Vitamin B ₆	135 ± 2.4	121 ± 3.1	191 ± 9.8 ^{†††}	136 ± 9.2 ^{**}	165 ± 11 [†]	115 ± 14.9 [*]	148 ± 14.2	105 ± 9.1
Folat	37 ± 1.3	33 ± 1	75 ± 4.8 ^{†††}	51 ± 5.5 [*]	70 ± 3.9 ^{†††}	43 ± 6.7 ^{**}	71 ± 5.9 ^{†††}	51 ± 6.3 [†]
Vitamin C	141 ± 4.9	191 ± 8.5 ^{***}	115 ± 8.3	126 ± 18.2	114 ± 13.2	132 ± 36.5	107 ± 12.1	198 ± 41.8 [*]
Natrium	370 ± 7.6	231 ± 27.3 [*]	319 ± 22.9	268 ± 40.8	292 ± 30.1 [†]	215 ± 25.4	328 ± 25.3	213 ± 24.5
Kalium	73 ± 1.1	70 ± 1.7	90 ± 4.1 ^{†††}	73 ± 3.4	78 ± 3.9	73 ± 8.8	78 ± 4.4	67 ± 5.8
Calcium	128 ± 3.3	100 ± 3.5 ^{***}	104 ± 8.5 [†]	90 ± 9.1	88 ± 8.5 ^{†††}	109 ± 26.8	89 ± 7.7 [†]	88 ± 9.0
Magnesium	117 ± 1.9	134 ± 3.3 ^{**}	145 ± 7.2 ^{†††}	149 ± 11.6	128 ± 6.7	123 ± 13.6	131 ± 9.8	119 ± 8.1
Phosphor	246 ± 4.1	174 ± 12.9	307 ± 17.2 ^{†††}	283 ± 19.9	277 ± 16.7	236 ± 29.7	274 ± 23.2	182 ± 19.3 [*]
Eisen	196 ± 2.6	141 ± 5.5 ^{***}	194 ± 7.4	182 ± 32.3	188 ± 11.7	109 ± 11.7 ^{***}	189 ± 10.6	131 ± 13.2 [*]
Zink	131 ± 2.1	150 ± 3.8 ^{**}	113 ± 4.4 [†]	180 ± 34.4 ^{***}	109 ± 7.4	146 ± 17	104 ± 5.4	132 ± 12.2

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ weiblich vs. männlich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey)

[†] $P < 0.05$; ^{††} $P < 0.01$; ^{†††} $P < 0.001$ Frauen mit ALD vs. weibliche Kontrollpersonen und Männer mit ALD vs. männlichen Kontrollpersonen (two-way-ANOVA und post-hoc - Test nach Tukey). Alle Werte sind angegeben als MW ± SEM.

ALD (alkoholinduzierte Lebererkrankung); DRI (Dietary Reference Intakes: Zufuhrempfehlung, herausgegeben von "Food and Nutrition Board", Institute of Medicine (2002, 2005)).

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-5 Tägliche Aufnahme von Mikronährstoffen (pro kg KG/Tag) bei Patienten mit ALD und bei gesunden Kontrollpersonen (C).

Mikronährstoffe	Gesunde Kontrollen		Nicht-zirrhatische ALD				Zirrhatische ALD	
	C		ALD1		ALD2		ALD3	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Vitamin A [$\mu\text{g/kg/d}$]	11.9 \pm 0.5	21.7 \pm 1.3 ^{***}	16.5 \pm 1.9	20.4 \pm 3.4	14.6 \pm 1.7	10.9 \pm 3.8 [†]	12.6 \pm 1.6	14.4 \pm 3.4
Vitamin E [mg/kg/d]	0.17 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01 [*]	0.16 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02
Thiamin [$\mu\text{g/kg/d}$]	19.4 \pm 0.4	20.2 \pm 0.6	20.7 \pm 1.4	20.5 \pm 1.8	16.4 \pm 1.1	18.1 \pm 2.8	15.8 \pm 1.2	15.8 \pm 1.7
Riboflavin [$\mu\text{g/kg/d}$]	22.8 \pm 0.4	24.4 \pm 0.8	32.7 \pm 2.3 ^{†††}	31.5 \pm 3.3	28.4 \pm 1.8	30.6 \pm 7.4	25.3 \pm 2.0	21.0 \pm 2.0
Vitamin B ₆ [mg/kg/d]	24.1 \pm 0.4	26.6 \pm 0.8	35.2 \pm 2.1 ^{†††}	30.6 \pm 2.2	30.1 \pm 1.7 [†]	27.4 \pm 4.3	30.0 \pm 2.8	23.0 \pm 2.2
Folat [$\mu\text{g/kg/d}$]	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	4.1 \pm 0.3 ^{†††}	3.2 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2 ^{†††}	3.2 \pm 0.6	3.8 \pm 0.3 ^{†††}	3.4 \pm 0.4 ^{††}
Vitamin C [mg/kg/d]	1.6 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 ^{***}	1.4 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.8 \pm 0.6	1.2 \pm 0.2	2.4 \pm 0.5 [*]
Natrium [mg/kg/d]	68.8 \pm 1.5	55.5 \pm 5.8	62.1 \pm 5.3	60.6 \pm 9.4	54.4 \pm 6.0	57.7 \pm 8.0	61.3 \pm 5.9	48.7 \pm 5.9
Kalium [mg/kg/d]	43.9 \pm 0.7	50.8 \pm 1.4 ^{**}	57.1 \pm 3.4 ^{†††}	56.0 \pm 3.0	49.0 \pm 2.6	62.0 \pm 9.1	49.0 \pm 3.2	50.4 \pm 4.6
Calcium [mg/kg/d]	17.1 \pm 0.4	17.1 \pm 0.6	14.4 \pm 1.3	16.2 \pm 1.8	12.7 \pm 1.2 [†]	20.6 \pm 5.0 [*]	13.0 \pm 1.0	15.0 \pm 1.3
Magnesium [mg/kg/d]	6.3 \pm 0.1	6.6 \pm 0.2	8.2 \pm 0.5 ^{†††}	7.1 \pm 0.8	7.1 \pm 0.4	7.0 \pm 0.9	7.3 \pm 0.6	6.0 \pm 0.4
Phosphor [mg/kg/d]	22.0 \pm 0.4	20.4 \pm 1.7	29.3 \pm 2.1 ^{†††}	34.3 \pm 3.5 [†]	25.6 \pm 1.6	30.6 \pm 4.3	25.3 \pm 2.1	21.0 \pm 2.6
Eisen [mg/kg/d]	0.20 \pm 0.00	0.22 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.31 \pm 0.04 ^{***†††}	0.20 \pm 0.01	0.30 \pm 0.04 ^{***††}	0.20 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02
Zink [mg/kg/d]	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.24 \pm 0.05 ^{***†}	0.16 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ weiblich vs. männlich innerhalb einer Gruppe (two-way-ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey)

† $P < 0.05$; †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ Frauen mit ALD vs. weibliche Kontrollpersonen und Männer mit ALD vs. männlichen Kontrollpersonen (two-way-ANOVA und post-hoc - Test nach Tukey). Alle Werte sind angegeben als MW \pm SEM.

ALD (alkoholinduzierte Lebererkrankung); d (Tag); KG (Körpergewicht)

4. ERGEBNISSE

Um einen möglichen Einfluss bestimmter Mikronährstoffe auf die Entwicklung eines alkoholbedingten Leberschadens untersuchen zu können, wurden sowohl männliche und weibliche Kontrollen als auch PatientInnen mit ALD in Quintile von der niedrigsten bis zur höchsten Zink- (Tab. 4-6) bzw. Eisenzufuhr (Tab. 4-9) eingeteilt. Doch weder bei männlichen (Tab. 4-7) noch bei weiblichen PatientInnen (Tab. 4-8) aus den Quintilen mit der niedrigsten oder der höchsten Zinkaufnahme konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Klassifizierungskriterien für ALD (AST, ALT, γ -GT, AST/ALT, Bilirubin und Quickwert) berechnet werden. Auch bezüglich der täglichen Eisenzufuhr unterschieden sich die Indikatoren für ALD nicht zwischen Patienten aus dem Quintil mit der niedrigsten Eisenaufnahme und dem Quintil mit der höchsten Zufuhr an Eisen (Tab. 4-10 und 4-11).

Tabelle 4-6 Einteilung der Patienten mit ALD und der gesunden Kontrollen in Quintile von der niedrigsten bis hin zur höchsten Zink-Aufnahme (mg/kg KG/Tag)

Quintile Zink-Aufnahme (mg/kg KG/d)	Patienten mit ALD	gesunde Kontrollen
Minimum	0.023	0.050
A	bis 0.118	0.141
B	bis 0.141	0.168
C	bis 0.171	0.189
D	bis 0.218	0.222
E	> 0.218	> 0.222
Maximum	0.861	0.363

Tabelle 4-7 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A (niedrigste Zink-Zufuhr) mit dem Quintil E (höchste Zink-Zufuhr) bei männlichen Patienten mit ALD (Student's *t*-Test)

	Quintil A MW \pm SD	n	Quintil E MW \pm SD	n	p
AST	29.42 \pm 24.49	45	24.13 \pm 24.40	48	0.299
ALT	23.81 \pm 12.94	58	21.25 \pm 14.23	53	0.322
AST/ALT	1.08 \pm 0.52	44	1.09 \pm 0.66	48	0.950
γ -GT	135.0 \pm 290.09	59	106.96 \pm 297.69	53	0.615
Albumin	4.19 \pm 0.69	43	4.26 \pm 0.61	45	0.657
Bilirubin	1.56 \pm 2.31	43	1.02 \pm 0.56	47	0.124
Quick	94.0 \pm 11.71	30	91.56 \pm 8.59	39	0.322

Tabelle 4-8 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A (niedrigste Zink-Zufuhr) mit dem Quintil E (höchste Zink-Zufuhr) bei weiblichen Patienten mit ALD (Student's *t*-Test)

	Quintil A MW \pm SD	n	Quintil E MW \pm SD	n	p
AST	34.45 \pm 26.44	11	77.06 \pm 71.32	17	0.070
ALT	17.73 \pm 5.91	22	28.62 \pm 27.38	29	0.073
AST/ALT	1.68 \pm 0.89	11	1.99 \pm 0.77	16	0.336
γ -GT	126.14 \pm 242.88	22	307.03 \pm 589.29	31	0.181
Albumin	4.29 \pm 0.57	11	4.22 \pm 0.65	15	0.798
Bilirubin	2.81 \pm 3.29	10	4.41 \pm 5.76	14	0.440
Quick	82.0 \pm 21.9	6	81.38 \pm 17.93	8	0.954

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4-9 Einteilung der Patienten mit ALD und der gesunden Kontrollen in Quintile von der niedrigsten bis hin zur höchsten Eisen-Aufnahme (mg/kg KG/Tag)

Quintile Eisen-Aufnahme (mg/kg KG/d)	Patienten mit ALD	gesunde Kontrollen
Minimum	0.053	0.082
A	0.145	0.164
B	0.189	0.189
C	0.231	0.214
D	0.280	0.247
E	> 0.280	> 0.247
Maximum	0.750	0.493

Tabelle 4-10 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A (niedrigste Eisen-Zufuhr) mit dem Quintil E (höchste Eisen-Zufuhr) bei männlichen Patienten mit ALD (Student's *t*-Test)

	Quintil A		Quintil E		p
	MW ± SD	n	MW ± SD	n	
AST	27.16 ± 23.14	55	28.0 ± 33.39	45	0.883
ALT	23.81 ± 13.48	70	22.73 ± 18.16	51	0.706
AST/ALT	1.03 ± 0.49	55	1.16 ± 0.73	45	0.306
γ-GT	92.59 ± 188.18	70	80.0 ± 169.49	51	0.706
Albumin	4.02 ± 0.77	51	4.15 ± 0.50	41	0.354
Bilirubin	1.75 ± 3.20	53	1.18 ± 0.93	42	0.270
Quick	91.44 ± 15.72	45	91.64 ± 12.05	33	0.953

Tabelle 4-11 Vergleich der klinisch-chemischen Parameter des Quintils A (niedrigste Eisen-Zufuhr) mit dem Quintil E (höchste Eisen-Zufuhr) bei weiblichen Patienten mit ALD (Student's *t*-Test)

	Quintil A		Quintil E		p
	MW ± SD	n	MW ± SD	n	
AST	26.25 ± 16.64	4	49.58 ± 53.47	19	0.405
ALT	16.0 ± 4.59	18	23.57 ± 20.97	30	0.140
AST/ALT	1.65 ± 0.90	4	1.71 ± 0.81	18	0.907
γ-GT	31.06 ± 47.80	18	225.78 ± 504.53	32	0.110
Albumin	4.27 ± 0.84	4	4.32 ± 0.65	17	0.893
Bilirubin	3.95 ± 4.22	4	3.34 ± 5.62	16	0.844
Quick	60.0 ± 22.2	4	81.25 ± 18.92	8	0.113

Wie den Tabellen im Anhang (Anhang 1 und 2) zu entnehmen ist, lagen die durchschnittlichen täglichen Zufuhrmengen an Zink sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen ALD-PatientInnen des Quintils „A“ (geringste Zinkzufuhr) unterhalb der empfohlenen Zufuhr (DRI). Bezüglich der Eisenzufuhr konnten im Mittel nur bei weiblichen ALD-PatientInnen des Quintils „A“ (geringste Zufuhr) eine Zufuhr unterhalb der Empfehlung (DRI) ermittelt werden.

*4.2 Ergebnisse der Untersuchungen der geschlechtsspezifischen
Unterschiede in der akuten alkoholexzess-bedingten Lebersteatose*

4.2.1 Ergebnisse der Messung der Lipideinlagerung und der Triglyceridkonzentration in der Leber

Um die Lipideinlagerung in den Hepatozyten nach akuter Alkoholexposition in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen, wurden einerseits die Triglyceride aus dem Lebergewebe extrahiert (Abb. 4-4), andererseits wurden Gefrierschnitte der Lebern mit Oil Red O angefärbt (Abb. 4-5 und 4-6). Zwölf Stunden nach akuter Alkoholexposition war bei männlichen Mäusen der Triglyceridgehalt in der Leber um das 3.5-fache höher als bei den Kontrolltieren, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Bei den weiblichen Mäusen war dieser Unterschied wesentlich ausgeprägter: Verglichen mit den weiblichen Kontrolltieren war der Triglyceridgehalt in den Lebern der weiblichen Tieren 12 h nach Alkoholexposition signifikant ($p < 0.001$) um das ca. 11-fache erhöht (Abb. 4-4A). Auch im Vergleich zu den männlichen Alkohol- ($p < 0.001$) und Kontrolltieren ($p < 0.01$) war der Triglyceridgehalt in den Lebern der weiblichen alkoholbehandelten Mäusen signifikant erhöht. Nach 24 h unterschieden sich sowohl männliche als auch weibliche alkoholbehandelte Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren nicht im Triglyceridgehalt in den Lebern, jedoch war die Triglyceridkonzentration in den Lebern der alkoholbehandelten Tiere noch tendenziell erhöht (Abb. 4-4B). 48 h nach Alkoholexposition konnte bei männlichen und weiblichen alkoholbehandelten Tieren ein Rückgang des Triglyceridgehalts in der Leber auf das Niveau der jeweiligen Kontrolltiere gemessen werden (Abb. 4-4C). Die weiblichen Kontrolltiere unterschieden sich nach 48 h signifikant von den männlichen Tieren ($p < 0.05$ vs. MK und $p < 0.01$ vs. METOH) im hepatischen Triglyceridgehalt. Bei den weiblichen mit Alkohol behandelten Tieren war auch noch nach 48 h die Triglyceridkonzentration im Vergleich zu den männlichen alkoholbehandelten Tieren ($p < 0.05$) erhöht (Abb. 4-4C).

Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch die densitometrische Auswertung der mit Oil Red O angefärbten Gewebeschnitte (Abb. 4-5). Sowohl bei männlichen ($p < 0.01$) als auch bei weiblichen ($p < 0.001$) mit Alkohol behandelten Mäusen war 12 h nach akuter Alkoholexposition eine signifikante Fettakkumulation in der Leber im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nachweisbar (Abb. 4-6A). Der Gesamtlipidgehalt in den Lebern der weiblichen alkoholbehandelten Mäuse war nach 12 h im Vergleich zu den männlichen alkoholbehandelten Tiere signifikant ($p < 0.001$) um das ca. 3-fache erhöht.

4. ERGEBNISSE

Nach 24 h unterschieden sich nur noch die weiblichen mit Alkohol behandelten Tiere signifikant ($p < 0.001$) von den Kontrolltieren im hepatischen Gesamtlipidgehalt (Abb. 4-6B).

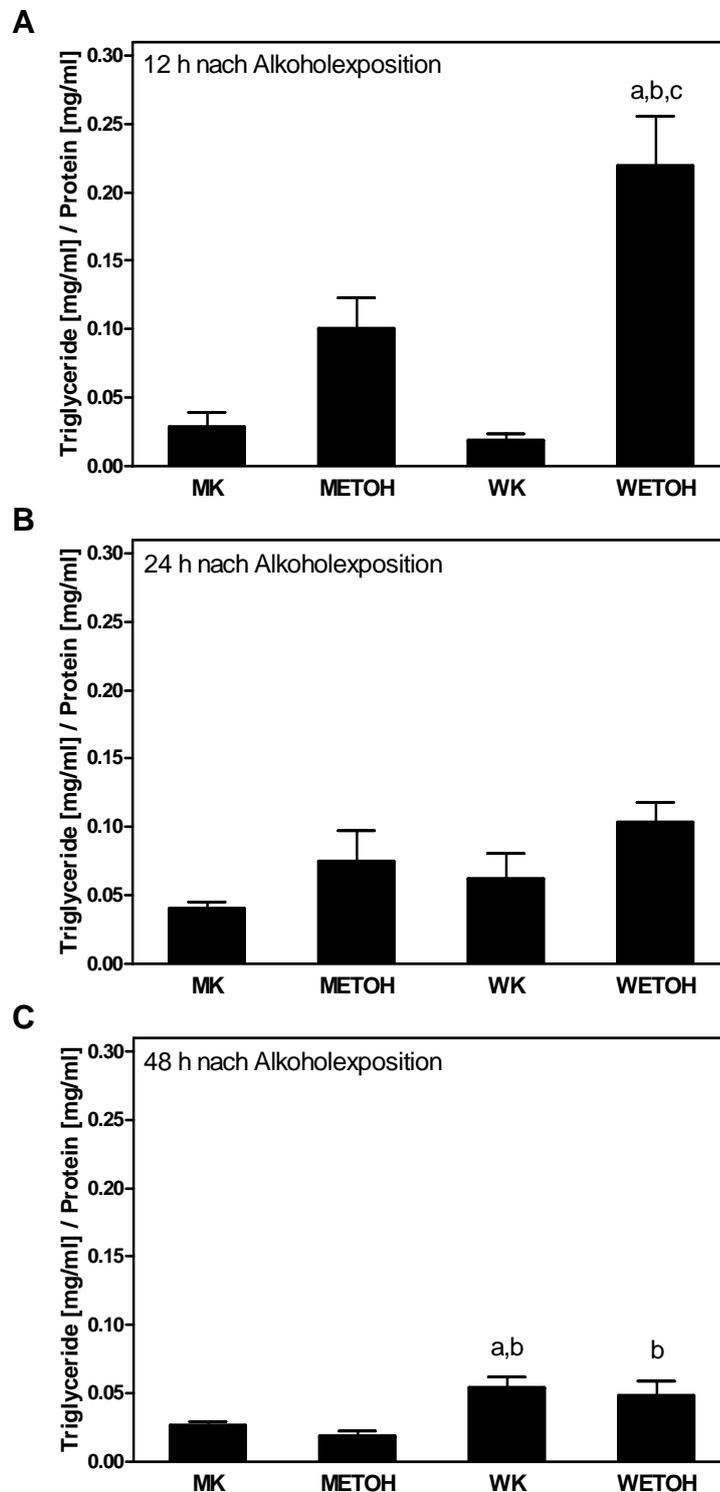


Abbildung 4-4 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts im Lebergesamthomogenat (Triglyceride (mg/ml)/Proteingehalt (mg/ml)) von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten ($n = 7-8$). **A**) 12 h ($p_{\text{alle Effekte}} < 0.001$), **B**) 24 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.086$), **C**) 48 h nach akuter Alkoholexposition ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.003$). ^a $p < 0.05$ vs. MK, ^b $p < 0.05$ vs. METOH, ^c $p < 0.05$ vs. WK. Ergebnisse sind angegeben als $MW \pm SEM$ (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey).

4. ERGEBNISSE

Im Vergleich zu den männlichen alkoholbehandelten Mäusen war auch noch nach 24 h der Gesamtlipidgehalt in den Lebern der weiblichen mit Alkohol behandelten Tiere signifikant ($p < 0.05$) erhöht (Abb. 4-6B). 48 h nach Alkoholexposition war bei den männlichen Tieren nahezu keine Lipidakkumulation mehr messbar, wohingegen bei weiblichen Mäusen der Fettgehalt in der Leber immer noch leicht erhöht war. Die Erhöhung der Fetteinlagerung war jedoch nur bei den mit Alkohol behandelten weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen Tieren ($p < 0.001$ vs. MK und $p < 0.001$ vs. METOH) und zu den weiblichen Kontrollen ($p < 0.01$) signifikant (Abb. 4-6C).

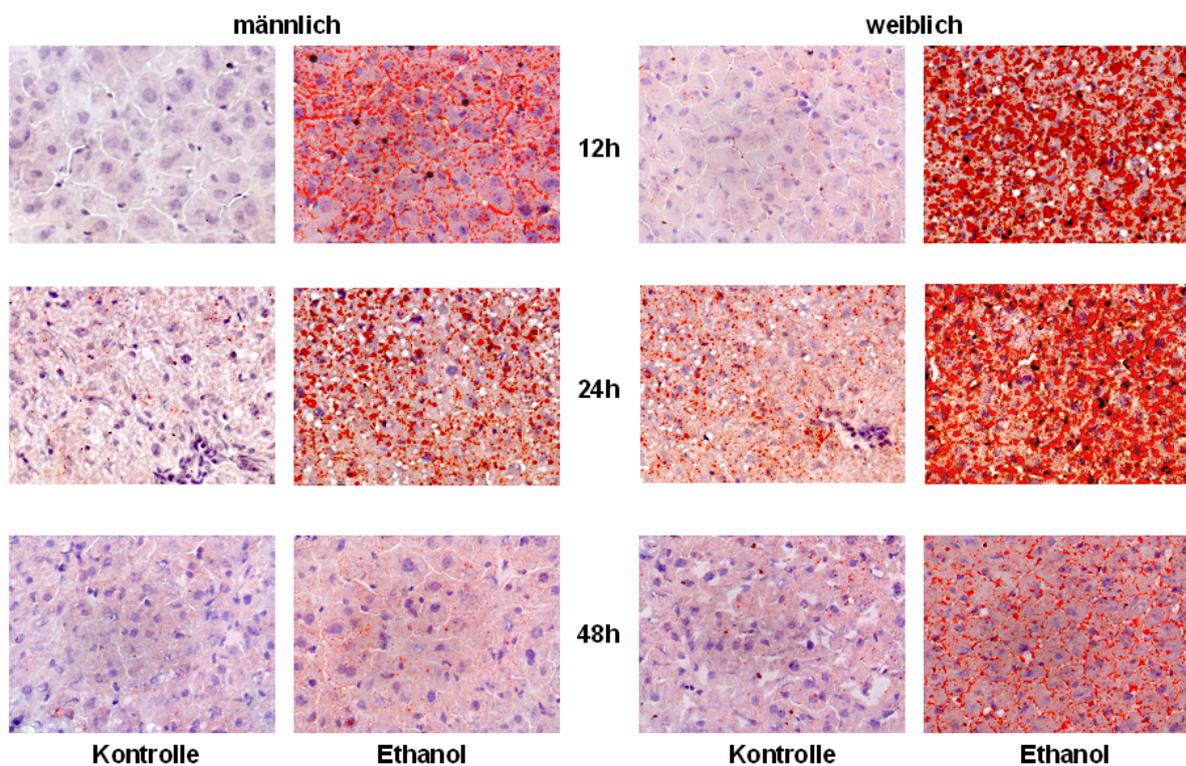
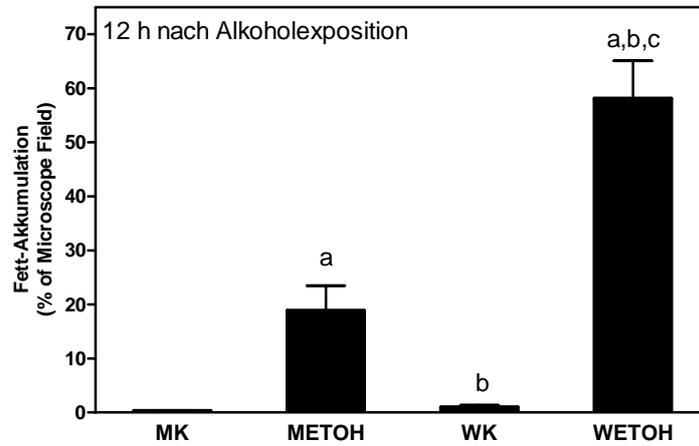


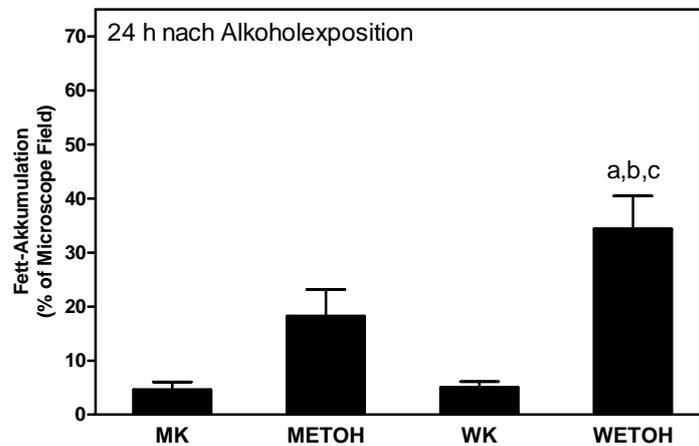
Abbildung 4-5 Repräsentative Bilder der Oil Red O Färbung der Lebern von männlichen und weiblichen Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG) oder isokalorische Maltodextrinlösung (Kontrolle) erhielten ($n = 6-8$), 12, 24 und 48 h nach akuter Alkoholexposition. Repräsentative Bilder in 400-facher Vergrößerung.

4. ERGEBNISSE

A



B



C

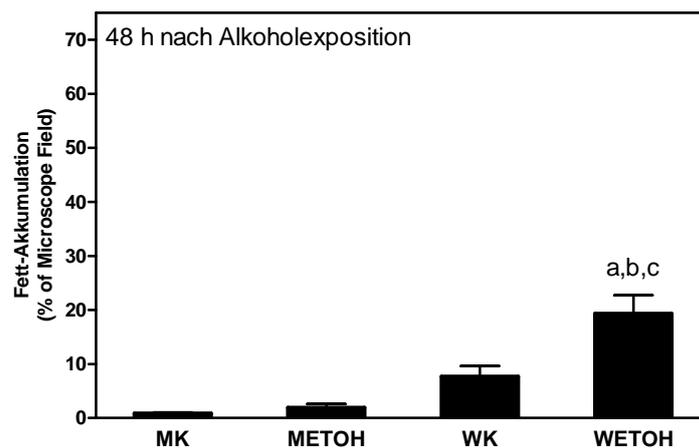


Abbildung 4-6 Vergleich der hepatische Lipidakkumulation männlicher (M) und weiblicher (W) Mäuse, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 6-8). Densitometrische Auswertung der mittels Oil Red O gefärbten Gewebeschnitte (% of microscope field). A) 12 h (p_{alle Effekte} < 0.001), B) 24 h (p_{alle Effekte} < 0.001), C) 48 h nach akuter Alkoholexposition (p_{alle Effekte} < 0.001). ^a p < 0.05 vs. MK, ^b p < 0.05 vs. METOH, ^c p < 0.05 vs. WK. Ergebnisse sind angegeben als MW ± SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey).

4. ERGEBNISSE

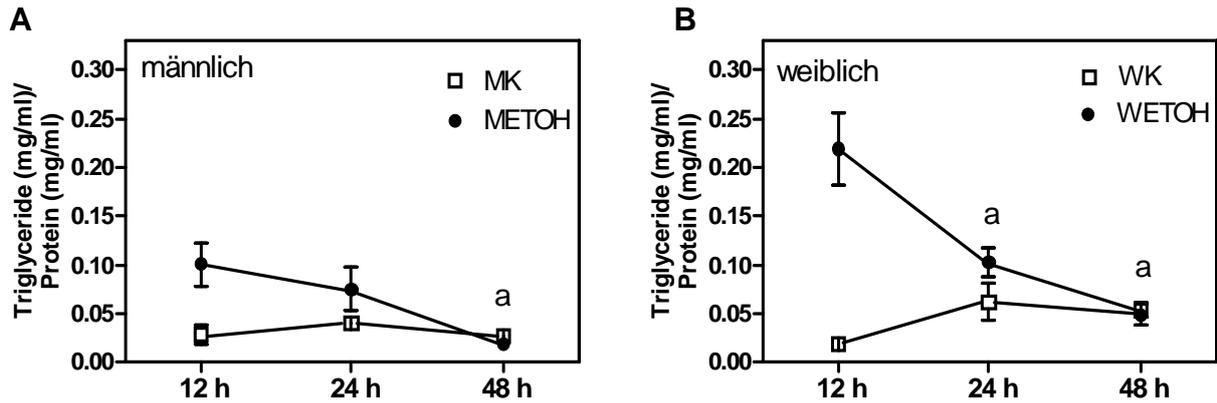


Abbildung 4-7 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts im zeitlichen Verlauf A) männlicher (M) und B) weiblicher (W) Mäuse, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 7-8). ^a p < 0.05 im Vergleich zu 12 h. Ergebnisse sind angegeben als MW ± SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey; p_{alle Effekte} = 0.01184).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Messwerte für den Triglyceridgehalt in der Leber analytisch (Abb. 4-7) und histochemisch (Oil Red O Färbung; Abb. 4-8), so sieht man, dass 12 h nach akuter Alkoholgabe sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen (●) der Triglyceridgehalt bzw. die gesamte Fettakkumulation am höchsten war. Bereits nach 24 h war bei den weiblichen alkoholbehandelten Tieren (●) eine signifikante Reduktion (p < 0.001) des Triglyceridgehalts in der Leber im Vergleich zu den nach 12 h gemessenen Werten nachweisbar. Nach 48 h war der Triglyceridgehalt in der Leber bei männlichen (p < 0.05) und auch bei weiblichen (p < 0.001) mit Alkohol behandelten Tieren wieder nahezu auf das Niveau der unbehandelten Kontrolltiere signifikant zurückgegangen.

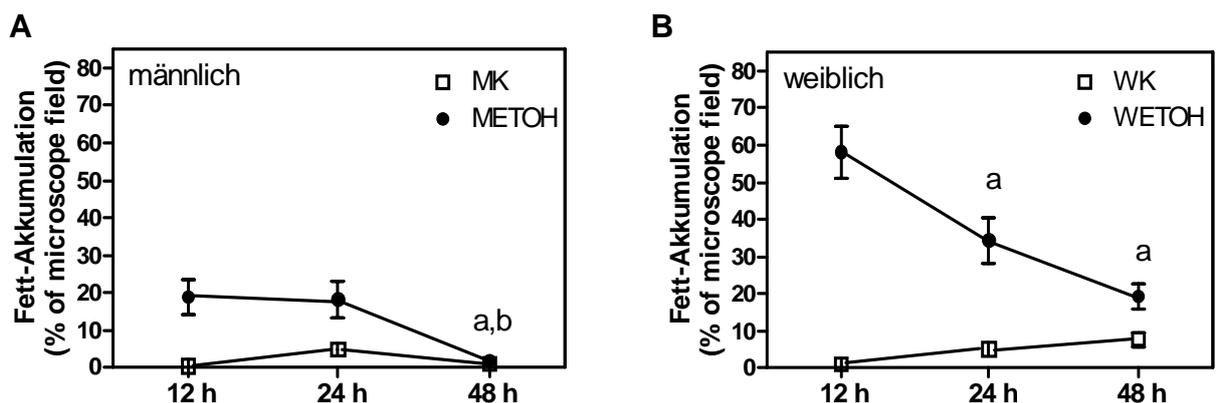


Abbildung 4-8 Vergleich der hepatischen Lipidakkumulation im zeitlichen Verlauf A) männlicher (M) und B) weiblicher (W) Mäuse, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 6-8). Densitometrische Auswertung der mittels Oil Red O gefärbten Gewebeschnitte (% of microscope field). ^a p < 0.05 im Vergleich zu 12 h, ^b p < 0.05 im Vergleich zu 24 h. Ergebnisse sind angegeben als MW ± SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey; p_{alle Effekte} = 0.00793).

4.2.2 Ergebnisse der Bestimmung des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins in der Leber

Die Ergebnisse der relativen mRNA-Expression von MTP (% über Kontrolle) nach akuter Alkoholexposition in Abhängigkeit von der Zeit sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Im Gegensatz zu den männlichen Tieren war bei den weiblichen mit Alkohol behandelten Mäusen 12 h nach akuter Alkoholexposition eine tendenzielle Verminderung der mRNA-Expression von MTP auf $7.7 \% \pm 3.8 \%$ (MW \pm SD) im Vergleich zu den Kontrolltieren messbar (Abb. 4-9A), jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0.2$). Bezogen auf die männlichen Mäuse, die mit Alkohol behandelt wurden, war die mRNA-Expression von MTP in den Lebern der weiblichen Tiere 12 h nach Alkoholapplikation jedoch signifikant ($p < 0.05$) vermindert. Sowohl nach 24 als auch nach 48 h nach Alkoholgabe fanden sich für die Expression der mRNA von MTP keine Unterschiede mehr zwischen den mit Alkohol behandelten Tieren und den jeweiligen Kontrollen bzw. zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Abb. 4-9B und C). Im zeitlichen Verlauf unterschieden sich die relativen mRNA-Expressionen von MTP bei den mit Alkohol behandelten Tieren (männlich und weiblich) nicht.

In Abbildung 4-10 sind die prozentualen Transferraten der MTP-Aktivität dargestellt. 12 h nach Alkoholgabe lagen die Messergebnisse für alle Gruppen im Mittel bei 34-38 % Transfer. Im Gegensatz zu den weiblichen Tieren konnte bei den männlichen Tieren 12 h nach akuter Alkoholexposition eine signifikante Steigerung ($p < 0.05$) der MTP-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden (Abb. 4-10A). 24 h nach Alkoholgabe konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts und der Alkoholbehandlung ermittelt werden (Abb. 4-10B). Gleiches gilt für die Messung der prozentualen Transferrate der MTP-Aktivität in den Lebern nach 48 h nach Alkoholapplikation (Abb. 4-10C). Zwar konnte im zeitlichen Verlauf 24 h nach Alkoholexposition bei den männlichen und weiblichen Alkohol- und Kontrollmäusen eine tendenzielle Verminderung der MTP-Aktivität im Vergleich zu den Messwerten nach 12 bzw. 24 h gemessen werden, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

4. ERGEBNISSE

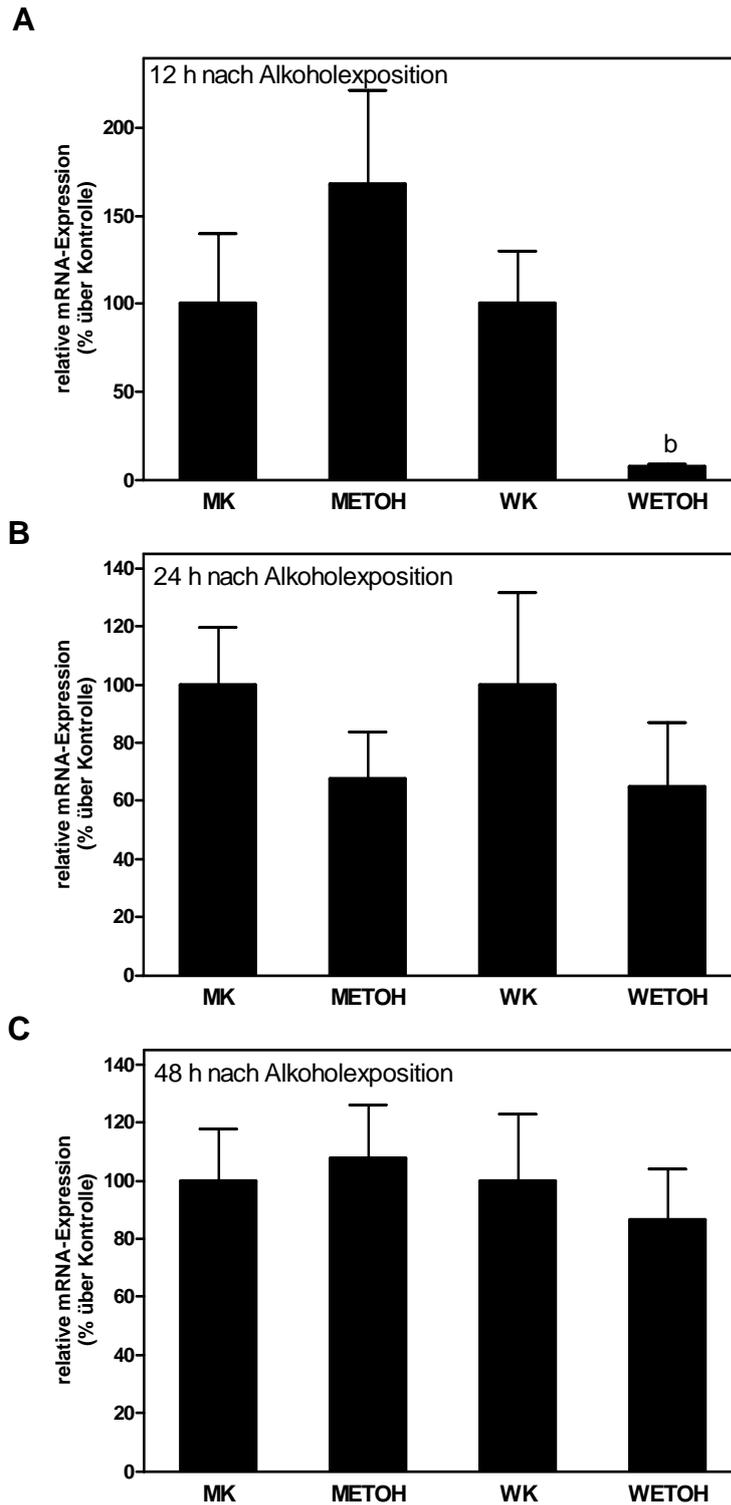


Abbildung 4-9 Vergleich der relativen mRNA-Expression von MTP (% über Kontrolle) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 4-8). **A**) 12 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.024$), **B**) 24 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.518$), **C**) 48 h nach akuter Alkoholexposition ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.889$). ^b $p < 0.05$ vs. METOH. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey).

4. ERGEBNISSE

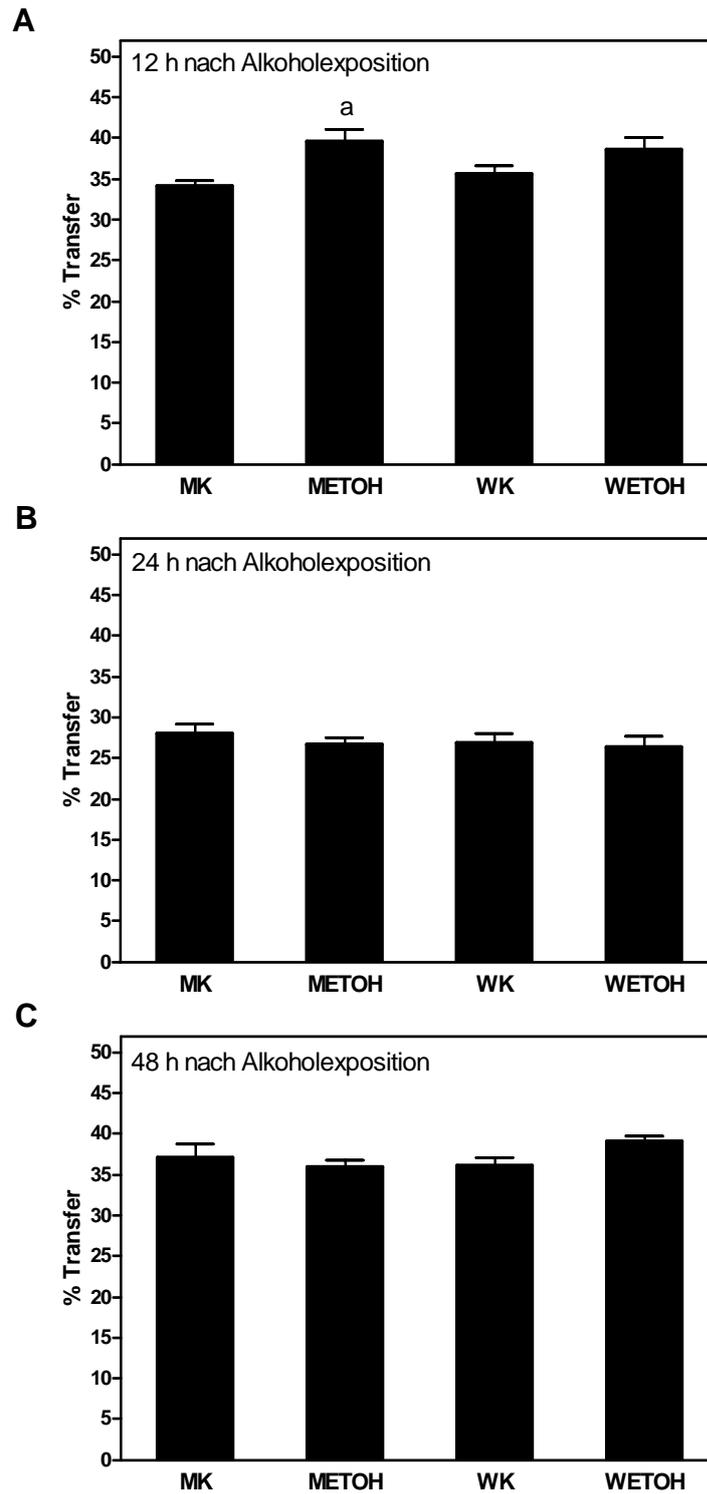


Abbildung 4-10 Vergleich der MTP-Aktivität (% Transfer) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 4-8). **A**) 12 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.009$), **B**) 24 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.755$), **C**) 48 h nach akuter Alkoholexposition ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.197$). ^a $p < 0.05$ vs. MK. Ergebnisse sind angegeben als $MW \pm SEM$ (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey).

4. ERGEBNISSE

Das Ergebnis der Bestimmung von MTP auf mRNA-Expressions-Ebene konnte durch die Messung des Proteingehalts (normalisiert auf β -Actin) durch Westernblot nicht bestätigt werden. Weder nach 12 noch nach 24 h nach akuter Alkoholexposition konnte eine signifikante Beeinflussung der Proteinmenge von MTP durch die Alkoholbehandlung bei beiden Geschlechtern nachgewiesen werden (Abb. 4-11).

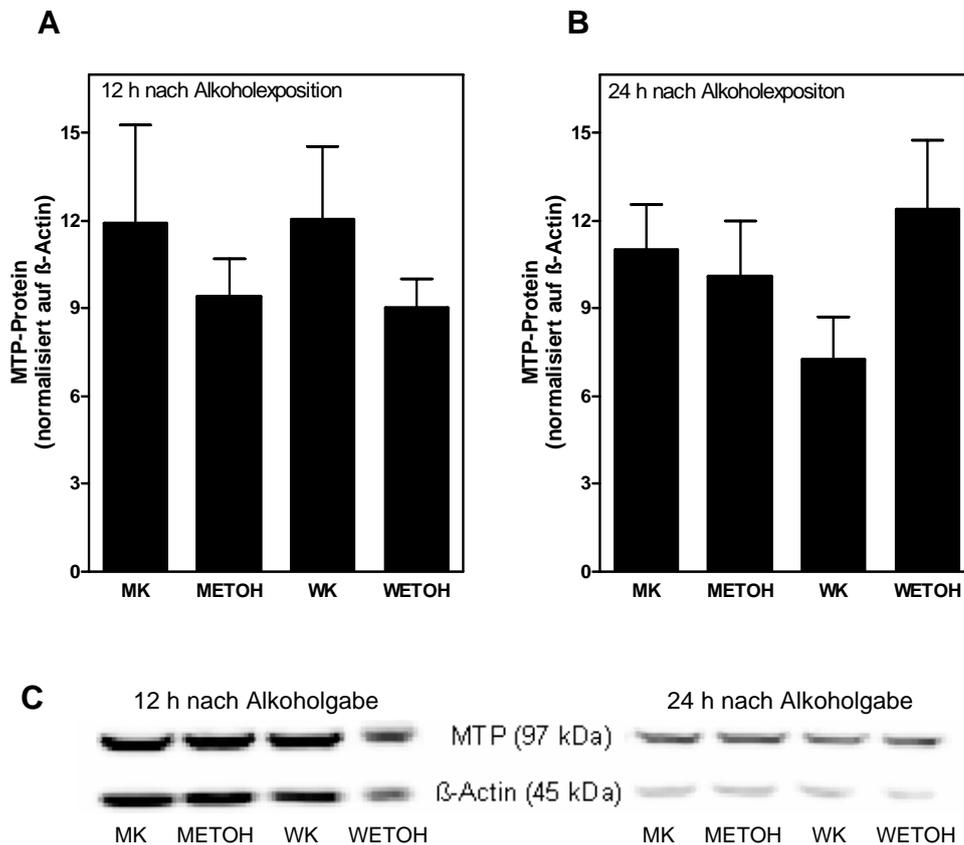


Abbildung 4-11 Relativer Proteingehalt von MTP (normalisiert auf β -Actin) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 5-8). A) 12 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.0502$), B) 24 h nach akuter Alkoholexposition ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.7077$). Ergebnisse sind angegeben als $MW \pm SEM$. C) Repräsentative Westernblots.

4.2.3 Ergebnisse der Bestimmung der mRNA-Expression von Apolipoprotein B

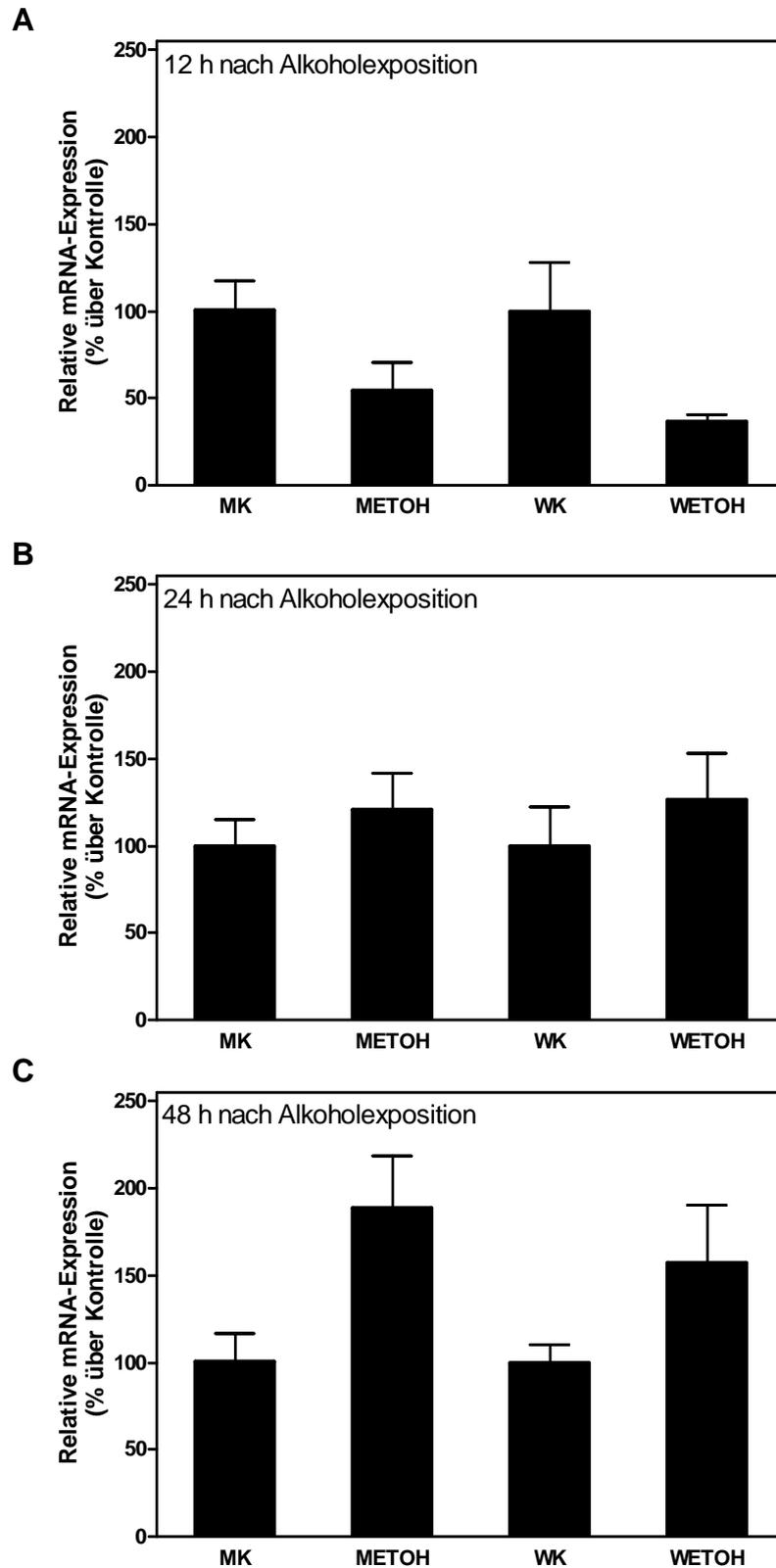


Abbildung 4-12 Vergleich der relativen mRNA-Expression von ApoB (% über Kontrolle) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 5-7). A) 12 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.035$), B) 24 h ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.755$), C) 48 h nach akuter Alkoholexposition ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.055$). Ergebnisse sind angegeben als $MW \pm SEM$ (keine signifikanten Unterschiede nach post-hoc-Test nach Tukey).

4. ERGEBNISSE

Die relativen mRNA-Expressionen von ApoB (% über Kontrolle) sind in Abbildung 4-12 dargestellt. Zwar waren 12 h nach Alkoholgabe die relativen mRNA-Expressionen von ApoB bei alkoholbehandelten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren deutlich vermindert (METOH: 54.5 % über Kontrolle; WETOH: 36.2 % über Kontrolle), jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (WETOH vs. WK $p = 0.086$). Auch unterschieden sich die mRNA-Expressionen von ApoB zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht (Abb. 4-12A). 24 h nach Alkoholgavage konnte ebenfalls bei beiden Geschlechtern kein Einfluss der Alkoholbehandlung auf die relative mRNA-Expression von ApoB nachgewiesen werden (Abb. 4-12B). Zwar war bei beiden Geschlechtern 48 h nach Ethanolexposition eine Induktion der mRNA-Expression von Apo B im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen messbar, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (Abb. 4-12C).

Im zeitlichen Verlauf war im Vergleich zu den nach 12 h gemessenen Werten sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen alkoholbehandelten Tieren nach 48 h eine signifikante Erhöhung ($p < 0.01$) der relativen mRNA-Expression von Apo B im Lebergesamthomogenat nachweisbar (Abb. 4-13).

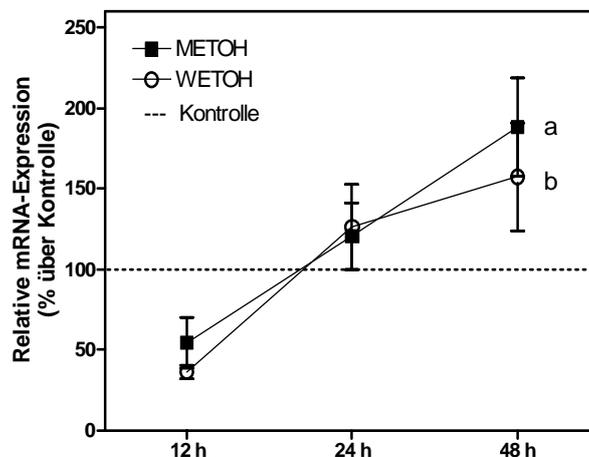


Abbildung 4-13 Vergleich der relativen mRNA-Expression von ApoB (% über Kontrolle) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten (n = 5-7) im zeitlichen Verlauf. ^a $p < 0.01$ METHO 48 h vs. METOH 12 h, ^b $p < 0.01$ WETOH 48 h vs. WETOH 12 h. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey; $p_{\text{alle Effekte}} = 0.008$).

4.2.4 Einfluss der Behandlung mit Toremifen auf die akute alkoholexzessbedingte Lebersteatose

Bei weiblichen mit Alkohol behandelten Mäusen, die über 5 Tage hinweg morgens mit Toremifen gavagiert worden waren, war der Triglyceridgehalt in der Leber im Vergleich zu den Kontrolltieren (Maltodextrin +/-Toremifen (T)) 12 h nach akuter Alkoholexposition

4. ERGEBNISSE

signifikant ($p < 0.001$) erhöht (Abb. 4-14). Zudem konnten im Vergleich zu den alkoholbehandelten weiblichen Tieren, die nicht mit Toremifen, sondern nur mit der Trägersubstanz Methylcellulose 5 Tage lang gavagiert worden waren, eine signifikante Erhöhung ($p < 0.05$) der hepatischen Triglyceridkonzentration gemessen werden. Repräsentative Bilder der Oil Red O Färbung sind in Abbildung 4-15 dargestellt.

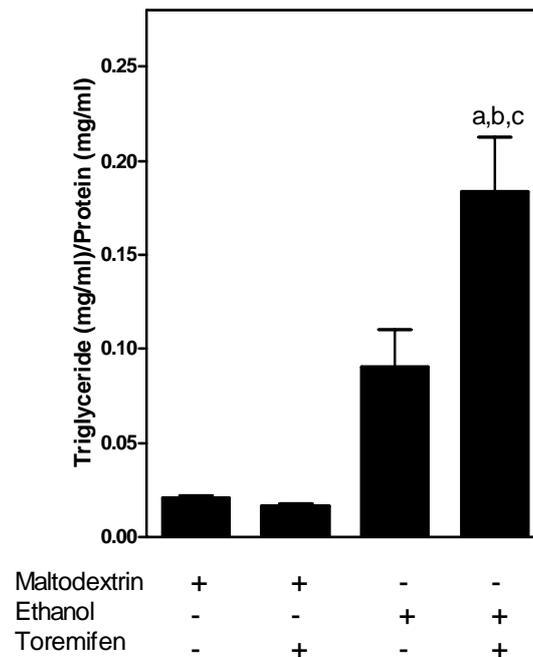


Abbildung 4-14 Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts (Triglyceride (mg/ml)/Proteingehalt (mg/ml)) im Lebergesamthomogenat von weiblichen Mäusen, die über 5 Tage hinweg je 5 mg/kg KG Toremifen in 0.5% Methylcellulose (+T) oder nur die Trägersubstanz erhielten (-T) und am 5. Tag einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG) oder isokalorische Maltodextrinlösung erhielten. (n = 4). ^a $p < 0.001$ vs. Maltodextrin -T, ^b $p < 0.001$ vs. Maltodextrin +T, ^c $p < 0.05$ vs. Ethanol -T. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey; $p_{\text{alle Effekte}} < 0.0001$).

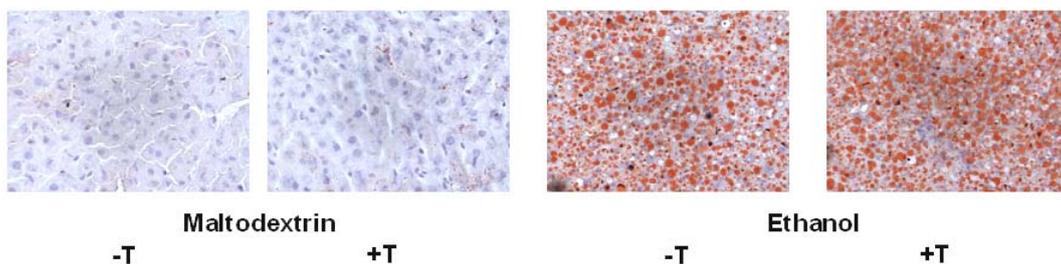


Abbildung 4-15 Repräsentative Bilder der Oil Red O Färbung der Lebern von weiblichen Mäusen, die über 5 Tage hinweg je 5 mg/kg KG Toremifen in 0.5% Methylcellulose (+T) oder nur die Trägersubstanz erhielten (-T) und am 5. Tag einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG) oder isokalorische Maltodextrinlösung erhielten (n = 4). Repräsentative Bilder in 400-facher Vergrößerung.

4.3 Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen

Um mögliche Auswirkungen der Behandlung mit den jeweiligen Hormonlösungen auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde der Anteil lebender Zellen nach der 19-stündigen Starvationphase mit gleichzeitiger Prä-Inkubation der Zellen mit Hormonen bestimmt. Im Mittel konnten bei den unterschiedlich mit Hormonen behandelten Zellen Werte zwischen 57 % und 67 % lebender Zellen gemessen werden, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Im Vergleich zu Zellen, die keiner Behandlung unterzogen worden waren konnten keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. (Abb. 4-16)

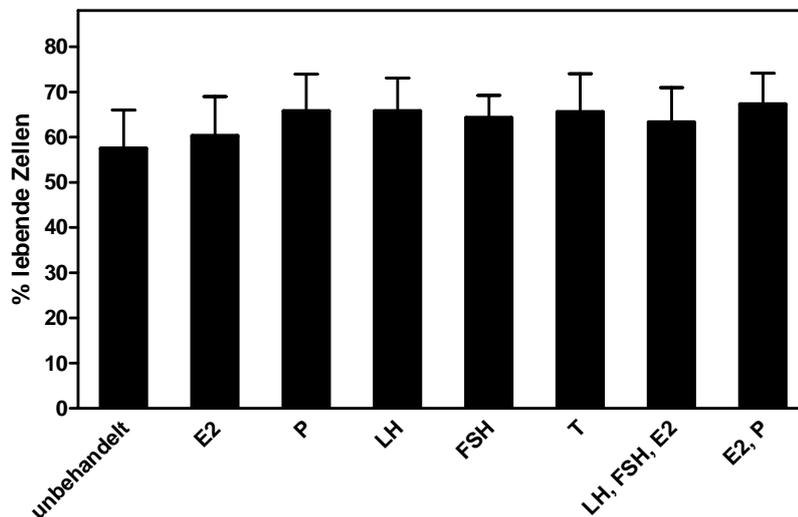


Abbildung 4-16 Prozentualer Anteil der lebenden Zellen nach 19-stündiger Prä-Inkubation mit verschiedenen Hormonen. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM (one-way-ANOVA). E2 = β -Estradiol, P = Progesteron, LH = luteinisierendes Hormon, FSH = follikelstimulierendes Hormon, T = Testosteron. Keine signifikanten Unterschiede nach ANOVA ($p_{\text{alle Effekte}} = 0.9865$).

Die Ergebnisse der Messungen der IFN- γ -Konzentrationen im Medium nach 19-stündiger Starvationphase mit gleichzeitiger Prä-Inkubation mit verschiedenen Hormonen und anschließender Behandlung mit Ethanol und Stimulation mit IL-12 sind in Abbildung 4-17 dargestellt. In allen Ansätzen, die mit IL-12 stimuliert wurden (PK, alle Hormonkombinationen), konnten nach Stimulation mit IL-12 ohne gleichzeitige Inkubation mit Ethanol (0 %) im Mittel IFN- γ -Konzentration von ca. 6000 pg/ml gemessen werden, die im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle signifikant ($p < 0.001$) erhöht waren. Sobald jedoch die Zellen mit Ethanol (1-3 %) behandelt wurden, waren die IFN- γ -Konzentrationen im Medium aller Zellen, die mit Hormonen behandelt wurden, und auch in

4. ERGEBNISSE

der Positivkontrolle (nur mit IL-12 stimuliert) signifikant ($p < 0.001$) im Vergleich zu den entsprechenden 0 %-Messwerten erniedrigt. Bezüglich der verschiedenen Alkoholinkubation (0-3 %) konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Hormonbehandlung und der Positivkontrolle gemessen werden. Auch konnten keine Einflüsse der verschiedenen Hormone auf die IFN- γ -Ausschüttung gezeigt werden: die IFN- γ -Konzentrationen im Medium der mit verschiedene Hormonen inkubierten Zellen unterschieden sich nicht voneinander (Abb. 4-17).

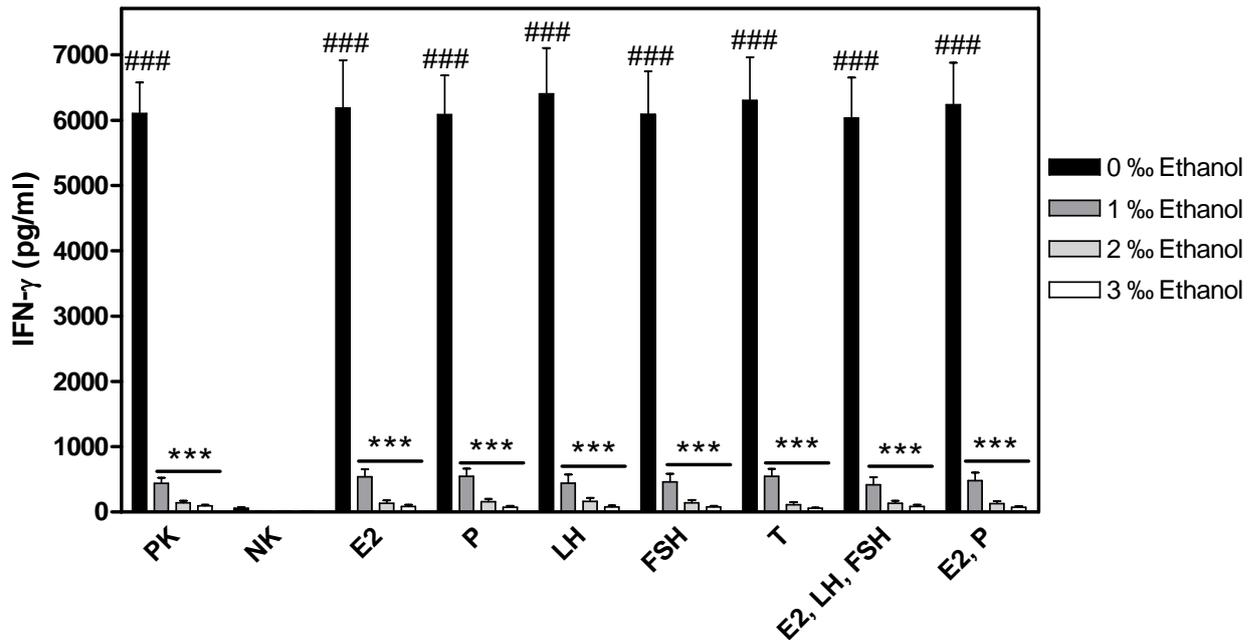


Abbildung 4-17 IFN- γ -Ausschüttung von NK-92-Zellen nach 19-stündiger Starvationphase und gleichzeitiger Prä-Inkubation mit Hormonen und anschließender Stimulation mit IL-12 und Ko-Inkubation mit Alkohol (0-3 %) und Hormonen. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SEM (ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey ($p_{\text{alle Effekte}} < 0.001$)). PK = Positivkontrolle (nur mit IL-12 stimuliert, keine Hormonbehandlung), NK = Negativkontrolle (keine IL-12-Stimulation, keine Hormonbehandlung), E2 = β -Estradiol, P = Progesteron, LH = luteinisierendes Hormon, FSH = follikelstimulierendes Hormon, T = Testosteron. *** $p < 0.001$ 1-3 % Ethanol vs. 0 % Ethanol innerhalb der gleichen Hormongruppe; ### $p < 0.001$ vs. NK 0% Ethanol.

5 Diskussion

5.1 Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit alkoholbedingten Lebererkrankungen (ALD)

Die Gesamtheit der Menschen mit alkoholbedingten Lebererkrankungen (ALD) wird in Deutschland auf ca. 5% der allgemeinen Bevölkerung geschätzt (Bundesministerium für Gesundheit, 2000). Die Ergebnisse zahlreicher epidemiologischer Studien legen nahe, dass die Entwicklung von alkoholbedingten Leberschäden bei Frauen bei gleichem Alkoholkonsum schneller voranschreitet als bei Männern (Ashley *et al.*, 1977; Loft *et al.*, 1987; Schenker *et al.*, 1997) und dass eine geringere Menge an Alkohol bei Frauen ausreicht, um vergleichbare Organschäden wie beim Mann hervorzurufen (Becker *et al.*, 1996). Jedoch beruhen diese in epidemiologischen Studien ermittelten Daten des Alkoholkonsums lediglich auf den Ergebnissen von Befragungen zum Alkoholkonsum. Bislang wurde die tatsächliche aufgenommene Menge an Alkohol nicht direkt gemessen. Das Hauptproblem bei der Ermittlung des durchschnittlichen täglichen Alkoholkonsums stellt dabei das Phänomen des „Underreportings“ dar (Permanen, 1974). Langjährige Erfahrungen der Arbeitsgruppe von Prof. Ch. Bode weisen zudem darauf hin, dass die Gefahr des „Underreportings“ des Alkoholkonsums bei Frauen größer ist als bei Männern. So wurde bislang angenommen, dass Frauen stärker ausgeprägte Leberschädigungen bei geringerem Alkoholkonsum haben als Männer, ohne dass es einen konkreten Beweis der tatsächlichen Alkoholaufnahme gab.

Zwar weisen auch die Ergebnisse von Tierstudien darauf hin, dass weibliche Ratten stärkere Leberschädigungen nach vierwöchiger Alkoholfütterung (10-17 g/ kg Körpergewicht) mittels Magensonde (Tsukamoto-French-Modell) aufweisen (Kono *et al.*, 2000) als männliche Tiere, jedoch ist dieses Modell äußerst unphysiologisch.

Die Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der erhöhten Empfindlichkeit in der Entstehung von ALD ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt.

Geringere konsumierte Alkoholmengen führen bei Frauen zu schwerwiegenderen Leberzellschäden als bei Männern

Als Marker für alkoholassoziierte Leberzellschädigungen werden u.a. Serumaktivitäten bestimmter Enzyme, die in der Leber vorkommen, herangezogen wie z.B. die Aktivität des membrangebundenen Enzyms γ -Glutamyltransferase (γ -GT), das in mehreren Organen, wie z.B. Herz, Niere, Pankreas, Gallengänge, aber auch in der Leber vorkommt. Da die γ -GT-

5. DISKUSSION

Bestimmung nur bedingt als spezifischer Marker für chronischen Alkoholabusus geeignet ist (Bode JC, 1995), wird sie meist nur in Kombination mit der Aktivitätserhöhung anderer „Leberenzyme“ wie z.B. Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) als Ausdruck einer alkoholbedingten Leberzellschädigung angesehen. Bei weiter fortgeschrittenen Lebererkrankungen verliert die Messung der γ -GT-Aktivität im Serum ihre Spezifität (Bell et al., 1993), da die Aktivität auch bei hepatischen Entzündungsprozessen und weiter fortgeschrittener Leberschädigung ungeachtet der Ursache erhöht sein kann. Um alkoholassoziierte Leberzellschäden von nichtalkoholinduzierten Schädigungen differenzieren zu können, wird das AST/ALT-Verhältnis (DeRitis-Quotient) als Marker herangezogen. Ein DeRitis-Quotient $>1-2$ gibt hierbei einen Hinweis auf eine alkoholspezifische Leberzellschädigung (zur Übersicht siehe Schmidt, 1999). Zwar geben all diese Marker einen Hinweis auf den Schweregrad der alkoholbedingten Leberschädigung, sie liefern aber keinen endgültigen Beweis und korrelieren nicht zwangsläufig mit der Schwere der Erkrankung.

In der vorliegenden Studie wurde bei den weiblichen Patienten aus den Gruppen ALD 2 und 3 ein signifikant höheres AST/ALT-Verhältnis errechnet als bei den männlichen Patienten, obwohl die Frauen tendenziell weniger Alkohol konsumiert hatten als die Männer. Auch die Aktivität der γ -GT war bei Patientinnen der Gruppe ALD 3 signifikant höher als bei den männlichen Patienten. Das höhere AST/ALT-Verhältnis und auch die höhere γ -GT-Aktivität bei weiblichen Patienten mit ALD legen nahe, dass bei gleichem oder niedrigerem Alkoholkonsum die alkoholinduzierte Leberzellschädigung stärker ausgeprägt war als bei männlichen Patienten und bestätigt die Ergebnisse mehrerer Studien, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ALD bei Frauen belegen (Ashley *et al.*, 1977; Loft *et al.*, 1987; Schenker *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1996).

Die Aufnahme von Makronährstoffen und von Na, K, Ca, Mg und P unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Patienten mit ALD

Um die Ergebnisse der vorliegenden Studie auch international vergleichen zu können, wurde alle Werte der relativen (%DRI) täglichen Nährstoffzufuhr auf die DRI-Werte (Dietary Reference Intakes, Recommended Intakes for Individuals, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, The National Academy of Sciences, 2004) bezogen. Der Vergleich mit den DACH-Referenzwerten (Deutschland, Österreich, Schweiz, 2000) in Tabelle 4-3 zeigt die Unterschiede in den Empfehlungen auf. Dies wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht in der Auswertung der relativen Nährstoffzufuhr berücksichtigt.

5. DISKUSSION

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich Männer und Frauen in der Wahl der verzehrten Nahrungsmittel unterscheiden (zur Übersicht Westenhoefer, 2005). Dies lässt wiederum ein unterschiedliches Muster der Nährstoffaufnahme vermuten. Jedoch konnten in der vorliegenden Studie keine nennenswerten Unterschiede in der Aufnahme von Makronährstoffen (Protein, Fett, Kohlenhydrate) zwischen Männern und Frauen mit unterschiedlichen Schweregraden der ALD berechnet werden. Daraus kann man schließen, dass keine der Makronährstoffe einen Einfluss auf die stärker ausgeprägten Leberzellschädigungen nach chronischem Alkoholkonsum bei weiblichen Patienten mit ALD haben.

Weder ein Defizit noch eine die Zufuhrempfehlung überschreitende Aufnahme der Mineralstoffe Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphor wurde bislang mit der Entwicklung alkoholinduzierter Leberzellschädigung in Verbindung gebracht, noch konnten in der vorliegenden Studie Unterschiede in der täglichen relativen Aufnahme dieser Mineralstoffe zwischen weiblichen und männlichen Patienten mit ALD berechnet werden. Auch bei diesen Nährstoffen kann davon ausgegangen werden, dass sie keinen Einfluss auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung von alkoholinduzierten Leberzellschädigungen haben.

Der Konsum von protektiv auf die Leber wirkenden Mikronährstoffen ist bei Frauen mit ALD gleich oder höher als bei männlichen Patienten mit ALD

Im Gegensatz dazu konnte durch zahlreiche Studien belegt werden, dass bestimmte Mikronährstoffe, wie z.B. Vitamin E (Lee *et al.*, 1995), Zink (Kang und Zhou, 2005), Folat (Halsted *et al.*, 2002), Vitamin C (Cadenas *et al.*, 1998), Vitamin B₆ (Taysi, 2005) und Riboflavin (Manthey *et al.*, 2006), für die Leberfunktion essentiell sind oder dass eine defizitäre Aufnahme zu Störungen der Leberfunktion führen kann, die u.a. in der Histologie diagnostizierbar wäre. In der vorliegenden Studie konnten allerdings keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten mit ALD in der täglichen relativen Aufnahme (pro kg Körpergewicht) von Vitamin E, Folat, Riboflavin und Vitamin B₆ berechnet werden. Der in der Literatur beschriebene protektive Effekt dieser Mikronährstoffe auf die Leber beeinflusste somit in der vorliegenden Studie nicht die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber ALD. Da bei den Frauen mit alkoholbedingter Fettleber (ALD1) bzw. alkoholinduzierter Zirrhose (ALD3) eine höhere relative Aufnahme von Zink bzw. Vitamin C ermittelt werden konnte, ist eine Malsupplementation dieser beiden

5. DISKUSSION

essentiellen Mikronährstoffe ebenfalls keine Erklärung für die höhere Empfindlichkeit gegenüber ALD bei Frauen. Zusätzlich konnte weder bei männlichen noch bei weiblichen Patienten aus den Quintilen mit der höchsten oder der niedrigsten täglichen relativen Zinkaufnahme signifikante Unterschiede für klinisch-chemische Parameter, die Auskunft über einen Leberschaden geben (AST, ALT, AST/ALT, γ -GT, Albumin, Bilirubin, Quick-Wert), berechnet werden. Zwar waren die berechneten Zufuhrmengen für Zink sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen ALD-Patienten des Quintils mit der niedrigsten relativen Zinkaufnahme niedriger als die empfohlene Zufuhrmenge (Anhang 1), dennoch waren keine Unterschiede in den Laborwerten, die auf einen Leberschaden hinweisen, messbar. Daraus kann man schließen, dass die höhere Zinkzufuhr bei weiblichen Patienten mit ALD keinen Einfluss auf die höhere Empfindlichkeit gegenüber ALD hat.

Die tägliche relative Aufnahme von Vitamin A und Eisen bei Frauen mit ALD hat keinen Einfluss auf den Schweregrad von ALD

Bei anderen Mikronährstoffen wie z.B. Vitamin A (Leo *et al.*, 1982; Worner *et al.*, 1988) und Eisen (Stal und Hultcrantz, 1993) wurde insbesondere unter anhaltendem Alkoholkonsum ein die Leberzelle schädigender Effekt nachgewiesen. In der vorliegenden Studie unterschied sich allerdings die tägliche relative Aufnahme von Vitamin A nicht zwischen männlichen und weiblichen Patienten aller Gruppen mit ALD. Jedoch hatten Frauen mit alkoholinduzierter Fettleber (ALD1) und Hepatitis (ALD2) eine höhere täglich Eisenzufuhr (pro kg Körpergewicht) als die jeweiligen männlichen Patienten. Der mögliche hepatotoxische Effekt einer hohen Eisenaufnahme bei weiblichen ALD-Patienten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Einteilung in Quintile von der niedrigsten bis hin zur höchsten täglichen relativen Eisenzufuhr ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Marker für ALD. Somit konnte trotz einer höheren Zufuhr des hepatotoxischen Mikronährstoffs Eisen bei Frauen mit ALD kein Einfluss auf die geschlechtsspezifische Entstehung von ALD nachgewiesen werden.

Auch wenn durch die Daten der vorliegenden Studie keine ausgeprägten Unterschiede in der täglichen Nährstoffzufuhr berechnet werden konnten, so bedeutet dies nicht, dass die untersuchten (Mikro-) Nährstoffe keine wichtige Rolle in der geschlechtsspezifischen Entwicklung alkoholinduzierter Leberschäden spielen. Generell ist bei der vorliegenden Studie zu berücksichtigen, dass lediglich die Nährstoffaufnahme, nicht jedoch die Bioverfügbarkeit oder die Konzentration der jeweiligen Mikronährstoffe im Plasma der Probanden ermittelt

5. DISKUSSION

wurde. Im Rahmen dieser Studie wurden keine Untersuchungen durchgeführt, die Hinweise geben könnten, ob sich die Aufnahme von Mikronährstoffen im Darm zwischen männlichen und weiblichen Patienten mit ALD unterscheidet. Sowohl die intestinale Absorption (Pfeiffer *et al.*, 1993), als auch der Metabolismus der einzelnen Nährstoffe wird durch Alkoholmissbrauch beeinträchtigt (Lieber, 2000; Wagnerberger *et al.*, 2006). Bislang gibt es jedoch noch keine Studien darüber, inwieweit geschlechtsspezifische Unterschiede in der intestinalen Absorption bestehen. Da es keinen Effekt einer unterschiedlichen Nährstoffaufnahme zwischen Männern und Frauen auf die heterogene Entwicklung der ALD bei Patienten beider Geschlechter in der vorliegenden Studie gibt (Himmelstein, 1983; Nanji and French, 1987; Becker *et al.*, 1996), liegt vermutlich ein hormonelle Hintergrund für diese Unterschiede vor: So weisen beispielsweise weibliche Ratten eine ausgeprägtere Empfindlichkeit gegenüber ALD auf (Iimuro *et al.*, 1997). Dieser Unterschied hängt zum einen vom weiblichen Geschlechtshormon Östrogen ab (Yin *et al.*, 2000), zum anderen von einem unterschiedlichen Zytokinmuster immunkompetenter Zellen (Yamada *et al.*, 1999) und einer unterschiedlichen Empfindlichkeit von Kupffer Zellen und Hepatozyten gegenüber der Stimulierbarkeit durch bakterielle Toxine (Thurman, 2000; Gallucci *et al.*, 2004).

Zusammenfassend belegen die Daten der vorliegenden Studie, dass trotz gleicher oder geringerer konsumierter Alkoholmengen weibliche Patienten der Gruppe ALD 2 höhere gemessene Werte der Marker für Leberzellschäden (DeRitis-Quotient, γ -GT) aufweisen als männliche Patienten. Dies kann als eine erhöhte Empfindlichkeit für die Entstehung von ALD bei Frauen gewertet werden. Jedoch kann man anhand der vorliegenden Daten zur täglichen Aufnahme bestimmter Makro- und Mikronährstoffe bei Männern und Frauen mit verschiedenen Stadien alkoholinduzierter Leberschäden nicht auf einen Einfluss in der Entstehung von ALD durch eine geschlechtsspezifische Ernährung schlussfolgern. Obwohl für die Zufuhr einiger Mikronährstoffe Unterschiede zwischen den Geschlechtern berechnet werden konnten, so können dennoch diese Mikronährstoffe nicht allein für die höhere Empfindlichkeit gegenüber ALD bei Frauen verantwortlich gemacht werden.

5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des MTP

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Suszeptibilität gegenüber ALD nicht auf die z.T. unterschiedliche Aufnahme von Mikronährstoffen zurückzuführen sind, wurde im zweiten Teil der Arbeit in einem Mausmodell der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose untersucht, ob Veränderungen im hepatischen Lipidexport eine Rolle in den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Entstehung der alkoholinduzierten Fettleber spielen.

Die akute alkoholinduzierte Lebersteatose ist in weiblichen Mäusen stärker ausgeprägt und länger anhaltend

Trotz einer Vielzahl von Studien zu direkten und indirekten Stoffwechselveränderungen durch Alkohol ist die Pathogenese von alkoholinduzierten Leberschädigungen (ALD) bisher nicht vollständig geklärt. Obwohl viele Hypothesen aufgestellt wurden, die versuchten die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Entstehung von alkoholbedingten Lebererkrankungen beispielsweise mit Hilfe einer unterschiedlichen Absorption, Disposition oder Metabolismus zu erklären (Hobbs *et al.*, 1985; Rachamin *et al.*, 1980; Zeiner und Kegg, 1981), ist bisher weitgehend ungeklärt, woraus sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber ALD wirklich ergeben. In chronischen Alkoholfütterungsversuchen bei Ratten konnte von Iimuro *et al.* (1997) nachgewiesen werden, dass sich bei weiblichen Ratten nach 4-wöchiger Alkoholexposition die daraus resultierenden Leberschäden, wie Steatose, Entzündungen bis hin zu Nekrosen, schneller und in einem schwerwiegenderen Ausmaß entwickeln als bei den männlichen Tieren. Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob diese geschlechtsspezifischen Unterschiede auch nach akuter Alkoholexposition nachweisbar sind. In der vorliegenden Studie wurde somit ein Mausmodell mit akutem Alkoholexzess (ein Bolus Alkohol, 6 g/kg KG, intragastral) angewandt, um zu untersuchen, ob weibliche Mäuse eine höhere Empfindlichkeit gegenüber akuter alkoholinduzierter Lebersteatose aufweisen als männliche Tiere. In Versuchen mit Ratten konnte bislang nachgewiesen werden, dass eine einmalige Dosis Alkohol zu einer deutlichen Erhöhung der hepatischen Triglyceride führt, wobei das Maximum nach ca. 24 h erreicht ist und nach 48 h wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht (Brodi *et al.*, 1961; Jauhonen *et al.*, 1975). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus diesen Studien und aus

5. DISKUSSION

Studien von Bergheim *et al.* (2006), in denen nicht explizit der geschlechtsspezifische Unterschied untersucht worden war, war in der vorliegenden Studie 12 h nach akuter Alkoholexposition eine Akkumulation von Lipiden und Triglyceriden sowohl in den Lebern von männlichen als auch in denen von weiblichen Mäusen messbar. Dabei war jedoch die Gesamtlipidakkumulation in den weiblichen Tieren stärker ausgeprägt als in den Männchen. Darüber hinaus war die akute alkoholexzessbedingte Lebersteatose in den weiblichen Mäusen über einen längeren Zeitraum nachweisbar (48 h vs. 12 h). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die akute alkoholinduzierte Lebersteatose in weiblichen Mäusen nicht nur ausgeprägter, sondern auch länger anhaltend war als bei männlichen Tieren.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholinduzierten Lebersteatose sind mit Veränderungen im hepatischen Lipidexport assoziiert

Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen darauf hin, dass bei akuten und chronischen alkoholbedingten Leberschäden eine erhöhte intestinale Translokation bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharid, LPS) (Bode *et al.*, 1987) und die Aktivierung hepatischer Kupffer-Zellen, die wiederum in der Freisetzung von TNF α und der Stimulation von Hepatozyten (Enomoto *et al.*, 1998) resultiert, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der ALD spielen (zur Übersicht siehe Arteel, 2003; Bode und Bode, 2005). Außerdem konnte in Modellen der akuten und chronischen Alkoholexposition nachgewiesen werden, dass die erhöhte Freisetzung von TNF α mit einer Induktion von PAI-1 assoziiert ist. Dies führt wiederum über HGF/c-Met-abhängige Signalwege zu einer Beeinträchtigung des MTP-vermittelten Triglyceridexports aus der Leber (Bergheim *et al.*, 2006; Sugimoto *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 2004). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass chronischer Ethanolkonsum die Synthese und Exkretion von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) hemmt, was wiederum zur Akkumulation von Lipiden in der Leber führt (Venkatesan *et al.*, 1988). In der Pathogenese der ALD soll das weibliche Geschlechtshormon Östrogen nicht nur die Darmpermeabilität (Yin *et al.*, 2000) erhöhen, sondern auch die Sensitivität von hepatischen Kupffer-Zellen gegenüber LPS erhöhen (Ikejima *et al.*, 1998). Bei weiblichen Ratten und bei weiblichen ovariectomierten Ratten, denen aber zusätzlich Östrogen verabreicht wurde, waren die Plasma-Endotoxinkonzentrationen im Vergleich zu weiblichen ovariectomierten Ratten ohne Östrogenbehandlung nach 4-wöchiger Ethanolexposition signifikant erhöht. Da intestinale Epithelzellen Östrogenrezeptoren exprimieren (Thomas *et al.*, 1993), schließen die Autoren daraus auf eine durch Östrogen verursachte erhöhte Darmpermeabilität (Yin *et al.*,

5. DISKUSSION

2000). Ikejima *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass die Behandlung von weiblichen Ratten mit dem Geschlechtshormon Östrogen im Vergleich zu unbehandelten Ratten zu einer gesteigerten Sensitivität hepatischer Kupffer-Zellen gegenüber bakteriellem Endotoxin (LPS) führt. Dabei wurde weiblichen Ratten zunächst Östrogen und anschließend LPS injiziert. Nach dieser Behandlung konnte bei den östrogenbehandelten Tieren eine zweifache Erhöhung der TNF- α -Konzentration im Serum nachgewiesen werden. Auch der Endotoxinrezeptor CD14 wird bei östrogenbehandelten Ratten vermehrt auf hepatischen Kupffer-Zellen exprimiert (Ikejima *et al.*, 1998). All diese Befunde lassen darauf schließen, dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen die Lebern weiblicher alkoholbehandelter Tiere empfindlicher gegenüber endotoxinvermittelter Leberschädigungen macht. Bislang wurde jedoch nicht speziell untersucht, ob auch Veränderungen des Triglyceridexports aus der Leber ebenso an der erhöhten Empfindlichkeit weiblicher Mäuse gegenüber akuter alkoholexzessbedingter Lebersteatose beteiligt sind.

Veränderungen der MTP-Aktivität bei Lebersteatose werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Untersuchungen von Lettéron *et al.* (2003) hatten eine signifikante Verminderung der MTP-Aktivität 4 h nach Behandlung von Mäusen mit lebersteatosefördernden Drogen (Amineptin, Amiodaron, Tetracyclin, Tianeptin und Pirprofen) als Resultat (Lettéron *et al.*, 2003). Die Autoren vermuten hier einen direkten hemmenden Effekt dieser Substanzen auf die Aktivität des hepatischen MTP. Bergheim *et al.* (2006) konnten dagegen 12 h nach akuter Alkoholexposition in Wildtypmäusen keine Veränderung der Aktivität des MTP im Vergleich zu den Kontrolltieren messen. In der vorliegenden Studie resultierte die akute Alkoholexposition nach 12 h in den Lebern der männlichen alkoholbehandelten Mäuse in einem signifikanten Anstieg der Aktivität des MTP im Vergleich zu den Kontrollen. Ein ähnlicher Effekt war dagegen zu keinem Zeitpunkt in den Lebern der weiblichen Tiere nachweisbar. Im Gegensatz dazu führte die akute Alkoholaufnahme nach 12 h in den Lebern der weiblichen Tiere zu einer beinahe vollständigen Repression der mRNA-Expression von MTP. Lin *et al.* (1997) konnten nachweisen, dass bei männlichen Ratten, die 1 oder 3 g Ethanol/kg KG erhielten, bereits nach 3 h die Expression der mRNA von hepatischem MTP signifikant erniedrigt ist. In syrischen Hamstern führt LPS nach 8 h zu einer signifikanten Verminderung der mRNA-Expression von MTP in der Leber. Dieser Effekt hält bis zu 16 h lang an und ist nach 24 h wieder aufgehoben (Navasa *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse mehrere Studien belegen für MTP eine Halbwertszeit von 4 bis 5 Tagen (Lin *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997; Navasa *et al.*, 1998). Unter den Bedingungen der vorliegenden Studie scheint die Abnahme der mRNA-Expression von MTP deshalb nicht zu den

5. DISKUSSION

Veränderungen im MTP-vermittelten Triglyceridexport aus der Leber geführt zu haben. Eine direkte Regulation der Proteinexpression und der Aktivität des MTP basierend auf Veränderung in der mRNA-Expression war unter den zeitlichen Bedingungen des Experiments nicht nachzuweisen. Vielmehr scheint allein die erhöhte MTP-Aktivität zusammen mit der unveränderten mRNA-Expression von Apo B 12 h nach akuter Alkoholexposition die männlichen Mäuse vor der ausgeprägteren und länger anhaltenden Lebersteatose -wie sie in weiblichen alkoholbehandelten Tieren nachgewiesen werden konnte- geschützt zu haben. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, ob diese geschlechtsspezifischen Unterschiede durch eine erhöhte intestinale Translokation von LPS und einer erhöhten Induktion von PAI-1 bedingt sind oder ob sie auf direkten modulierenden Effekten von Östrogen beruhen. Dies bietet Anlass für weitere Untersuchungen.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass akuter Alkoholexzess zu einer temporären Lipidakkumulation sowohl in den Lebern von männlichen als auch von weiblichen Tieren führt, wobei die jedoch in den Lebern der weiblichen Tiere wesentlich stärker ausgeprägt und vor allem länger andauernd ist als in männlichen Mäusen. Zudem legen die Daten die Vermutung nahe, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der erhöhten Empfindlichkeit weiblicher Mäuse gegenüber akuter alkoholinduzierter Lebersteatose zumindest teilweise auf eine fehlende Hochregulation des MTP-vermittelten Triglyceridexports aus der Leber, die in männlichen Tieren nachgewiesen werden konnte, beruht.

Die Verabreichung von Toremifen beeinflusst nicht die Entwicklung der akuten alkoholinduzierten Lebersteatose in weiblichen Mäusen

Zahlreiche Studien haben belegt, dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen eine bedeutende Rolle in der Entstehung von alkoholbedingten Leberschädigungen nach chronischer Alkoholfütterung in der Ratte hat (Ikejima et al., 1998; Enomoto *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, inwieweit die bei weiblichen Mäusen stärker ausgeprägte Lebersteatose auch nach akuter Alkoholexposition auf das weibliche Geschlechtshormon Östrogen zurückzuführen ist, wurde in der vorliegenden Studie weiblichen Mäusen vor der akuten Alkoholgabe 5 Tage lang der Östrogen-Rezeptor-Antagonist Toremifen verabreicht.

Toremifen gehört wie auch beispielsweise Tamoxifen zur Gruppe der SERMs (selective estrogen receptor modulator). Beide Substanzen haben sowohl östrogene als auch

5. DISKUSSION

antiöstrogene Wirkung in verschiedenen Geweben und wirken über die Bindung an die Hormonbindestelle des Rezeptors (MacGregor und Jordan, 1998). Toremifen hat dabei in Nagetieren eine stärkere antiöstrogene Wirkung als Tamoxifen (Kangas, 1990) und es wird als nicht genotoxisch und nicht karzinogen beschrieben (Williams *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 1996).

Die Untersuchungen von Lemieux *et al.* (2005) weisen darauf hin, dass eine 4-wöchige Behandlung von weiblichen Ratten mit Acolbifene, einem weiteren SERM, eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von MTP in der Leber zur Folge hat und somit der östrogenbedingten hepatischen VLDL-Sekretion entgegenwirkt. In einer anderen Studie wurde weiblichen Ratten 6 Wochen lang sowohl Ethanol als auch der Östrogenrezeptor-Antagonist Toremifen verabreicht (Järveläinen *et al.*, 2001). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Toremifen zu einer signifikanten Reduktion der alkoholbedingten Entzündungen und Nekrosen in der Leber führt. Ein Einfluss auf die chronische alkoholbedingte Lebersteatose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Järveläinen *et al.*, 2001). Ergebnisse aus Humanstudien weisen allerdings darauf hin, dass Antiöstrogene die Lipidakkumulation in der Leber beeinflussen können: So verursachte die orale Einnahme von Tamoxifen (3-5 Jahre) in 30 % der Brustkrebspatientinnen Fetteinlagerungen in der Leber (Ogawa *et al.*, 1998). Dahingegen war die Entwicklung einer Fettleber bei Brustkrebspatientinnen, die über 3-5 Jahre hinweg mit Toremifen behandelt worden waren, signifikant niedriger im Vergleich zur Tamoxifenbehandlung (Hamada *et al.*, 2000). In der Studie von Järveläinen *et al.* (2001) führte die Toremifen-Behandlung bei Kontrollratten, die nicht chronisch mit Alkohol, sondern mit einer kohlenhydratniedrigen und fettreichen Diät gefüttert wurden, zu einer Reduktion der Triglyceride in der Leber. Die Autoren vermuten wegen der Reduzierung der Lebersteatose einen protektiven Effekt von Toremifen. Dieser Effekt konnte allerdings in Ratten, die chronisch mit Alkohol gefüttert wurden, nicht nachgewiesen werden (Järveläinen *et al.*, 2001). Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse so, dass die Behandlung mit Toremifen zwar zu einer Reduktion der ethanolinduzierten Lebersteatose führt, allerdings zu einem früheren Zeitpunkt während der 6-wöchigen Alkoholfütterung (Järveläinen *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Studie sollte dieser postulierte protektive Effekt des Antiöstrogens Toremifen in einem akuten Alkoholfütterungsmodell in der Maus untersucht werden. Allerdings konnte die Hypothese, dass Toremifen die akute alkoholexzessbedingte Lebersteatose in der weiblichen Maus reduziert, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: Der Triglyceridgehalt in den Lebern der mit Toremifen behandelten Tiere war 12 h nach akuter Alkoholexposition im Vergleich zu den mit Alkohol behandelten Mäusen, die lediglich die

5. DISKUSSION

Trägersubstanz Methylcellulose verabreicht bekommen hatten, signifikant erhöht.

Vergleicht man die Triglyceridkonzentrationen in den Lebern der weiblichen Mäuse, die mit der Trägersubstanz Methylcellulose vorbehandelt und denen anschließend Ethanol verabreicht wurde, mit den Triglyceridkonzentrationen in den Lebern weiblicher Mäuse, die nur mit Ethanol behandelt wurden, so fällt auf, dass die hepatischen Triglyceridmengen in den mit Methylcellulose behandelten Tieren wesentlich geringer sind. Dies lässt darauf schließen, dass die Trägersubstanz Methylcellulose unter Umständen selbst einen protektiven Effekt auf die akute alkoholinduzierte Lebersteatose hat. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Dies bietet aber Anlass für weitere Untersuchungen. Denkbar wäre, dass die unverdauliche Trägersubstanz Methylcellulose im Darm bakterielle Endotoxine bindet, sodass folglich eine Endotoxämie, die damit verbundene Aktivierung hepatischer Kupffer-Zellen und im Weiteren die Lipidakkumulation in den Hepatocyten vermindert werden. Als ein weiterer möglicher Mechanismus kommt u.U. auch ein protektiver Effekt der Methylcellulose auf die Darmbarriere und eine dadurch bedingte reduzierte Durchlässigkeit für bakterielles Endotoxin in Betracht. Aber auch eine Veränderung der bakteriellen Flora im Darm, begleitet durch eine Modulation der freigesetzten bakteriellen Produkte könnte ein protektiver Mechanismus der Methylcellulose in der Entstehung der alkoholbedingten Lebersteatose sein. In weiterführenden Experimenten, in denen die Endotoxinkonzentrationen im Blut, die Expression von Tight-Junction-Proteinen und die Zusammensetzung der intestinalen Flora untersucht werden sollen, soll der mögliche Mechanismus des protektiven Effekts der Methylcellulose geklärt werden.

5.3 Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen

Die Leber spielt nicht nur eine wichtige Rolle im Alkoholstoffwechsel, sondern auch im Immunsystem. In der Leber sind Zellen des angeborenen Immunsystems angesiedelt. Makrophagen/ Kupffer-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen sind in der Leber nachweisbar und spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr gegen Pathogene und Tumoren (Lodoen und Lanier, 2006; Shimizu *et al.*, 2007; Baratin *et al.*, 2005). Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen darauf hin, dass diese Zelltypen auch an der Pathogenese der Hepatitis beteiligt sind: So führen beispielsweise bakterielle Endotoxine zur Aktivierung der Kupfferzellen in der Leber, was wiederum in der Freisetzung von Zytokinen (z.B. TNF- α) und damit zur Stimulation der Hepatozyten (Enomoto *et al.*, 1998) führt. Daneben sind NKT-Zellen zentrale Mediatoren in der Entstehung von Concanavalin A- oder α -Galactosylceramid-induzierten Leberschädigungen, indem sie Zytokine (TNF- α , IL-4) produzieren und direkt zytotoxisch gegenüber Hepatozyten sind (Biburger und Tiegs, 2005; Kaneko *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2000). Aber auch NK-Zellen sind in verschiedenen Modellen an der Pathogenese von Leberschädigungen beteiligt: So spielen sie eine wichtige Rolle in PolyI:C-, *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A- und Hepatitis B und C-Virus-induzierten Leberschäden (Dong *et al.*, 2004; Muhlen *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2007; Ahmad und Alvarez, 2004).

Obwohl NK-Zellen einen großen Anteil der intrahepatischen Lymphozyten darstellen und an der Entstehung vieler Leberschädigungen beteiligt sind, ist der zugrundeliegende Mechanismus bislang nur teilweise geklärt. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das proinflammatorische Zytokin IFN- γ , welches von NK-Zellen ausgeschüttet wird. Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien belegen, dass IFN- γ einen antifibrotischen Effekt hat, bzw. dass IFN- γ -defiziente Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber CCl₄-induzierter Leberfibrose aufweisen (Shi *et al.*, 1997). Die antifibrotische Wirkung von IFN- γ beruht dabei auf der Arretierung des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose in hepatischen Sternzellen (hepatic stellate cell, HSC) (Rockey *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2006), einer direkten Aktivierung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber aktivierten HSC (Radeva *et al.*, 2006) und der Inhibierung der Kollagensynthese (Inagaki *et al.*, 2003).

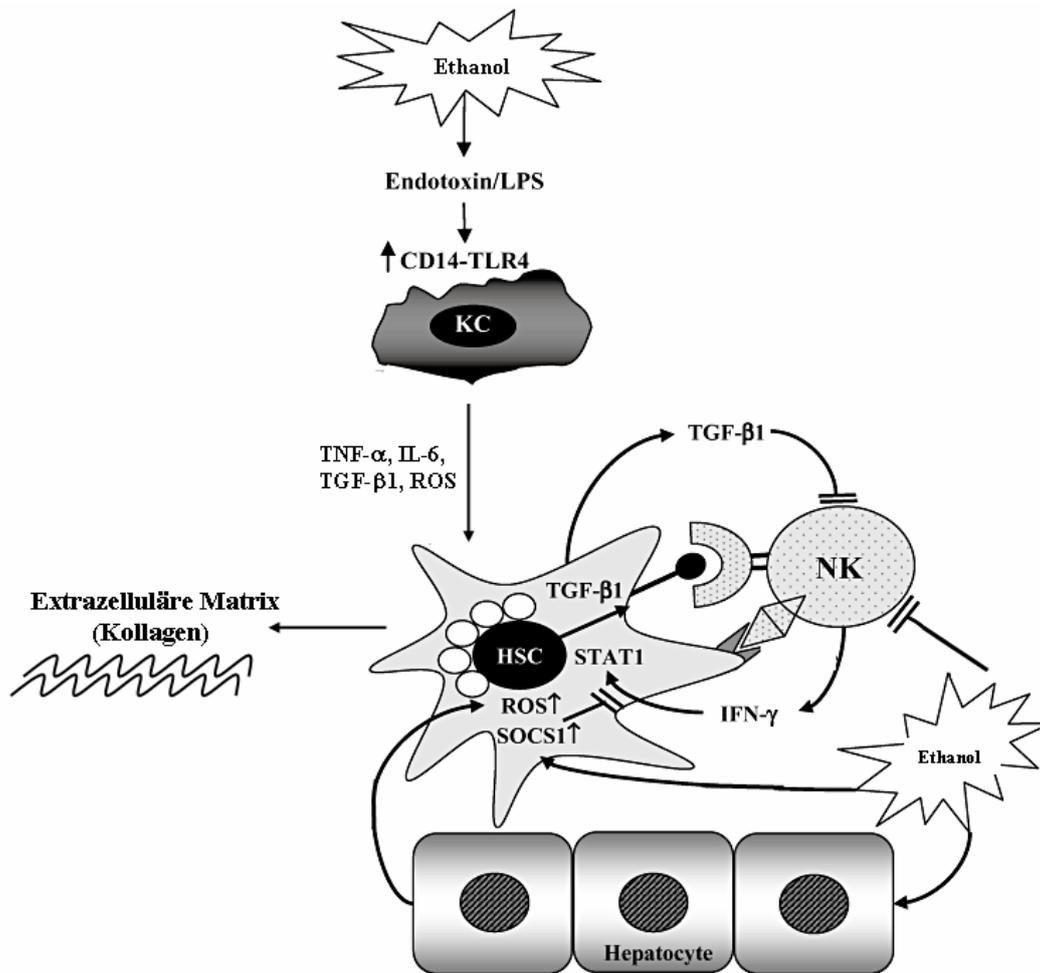


Abbildung 5-1 Inhibition des antifibrotischen Effekts von NK-Zellen durch Ethanol (nach Jeong und Gao, 2008)

Ethanol erhöht die Darmpermeabilität und führt zur Endotoxinämie, die wiederum über Rezeptoren für Endotoxin (CD14 und Toll-like Rezeptor (TLR) 4) in einer Aktivierung der Kupfer-Zellen resultiert. Proinflammatorische Zytokine und inflammatorische Mediatoren wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6, Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktivieren hepatische Sternzellen (HSC). Daraus resultiert die Produktion von extrazellulärer Matrix (Kollagen).

Ethanol hemmt die antifibrogenen Effekte von NK-Zellen, indem die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber aktivierten HSC vermindert wird. Ethanol stimuliert HSC zu Produktion von TGF- β 1, der wiederum die NK-Zell-vermittelte Abtötung von aktivierten HSC hemmt. Ethanol induziert die Expression von SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1), wodurch die IFN- γ -vermittelte Signalübertragung in HSC inhibiert wird. Zudem stimuliert Ethanol die Produktion von ROS, die auch wiederum die IFN- γ -vermittelte Signalübertragung in HSC inhibieren. (nach Jeong und Gao, 2008)

Es ist bekannt, dass Alkohol das angeborene und erworbene Immunsystem beeinträchtigt (zur Übersicht siehe Szabo und Mandrekar, 2009). Sowohl akuter als auch chronischer Alkoholkonsum hemmen T-Zell-Funktionen und die IL-12-Produktion, was wiederum in Veränderungen der Th 1- (IFN- γ) und Th 2-Zytokinproduktion resultiert. Diese alkoholbedingten Veränderungen des Zytokinmusters tragen schließlich zu einer beeinträchtigten Eliminierung der Pathogene und einer verminderten Immunantwort nach

5. DISKUSSION

Alkoholexposition bei (Szabo und Mandrekar, 2009). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Ethanol eine immunsuppressive Wirkung hat, indem beispielsweise die Aktivität von NK-Zellen vermindert wird (Collier *et al.*, 2000; Boyadjieva *et al.*, 2001; Boyadjieva *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2006). Durch diesen suppressiven Effekt des Ethanols geht zudem die antifibrotische Wirkung des NK/IFN- γ -Systems verloren (Abb. 5-1) (zur Übersicht siehe Jeong und Gao, 2008). Somit sind nicht nur die in der Leber angesiedelten Makrophagen (Kupffer-Zellen), sondern auch die NK-Zellen an der komplexen Entstehung verschiedener ethanolbedingter Leberschädigungen beteiligt.

In Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits der Einfluss des Menstruationszyklusses auf die LPS-induzierte Zytokin-Ausschüttung in Monozyten untersucht (Schwarz *et al.*, 2000). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass bei prämenopausalen Frauen während der Lutealphase TNF- α im Vergleich zur Follikelphase vermindert war. Ebenso waren TNF- α und IL-6 während der Lutealphase im Vergleich zu männlichen Probanden vermindert (Schwarz *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob weibliche oder männliche Geschlechtshormone die Zytokinausschüttung in NK-Zellen beeinflussen und somit eine mögliche Erklärung für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber alkoholbedingten Leberschädigungen liefern, wurde in der vorliegenden Studie ein bereits etabliertes Alkohol-Zellkulturmodell (Sauter, 2008) angewandt. Zellen der Linie NK-92 wurden zunächst mit verschiedenen Hormonen 19 h lang präinkubiert und anschließend für 18 h mit Hormonen und Ethanol co-inkubiert, um im Anschluss daran die INF- γ -Ausschüttung im Zellmedium zu messen.

Die Inkubation von NK-92-Zellen mit Geschlechtshormonen und Ethanol hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Um mögliche toxische Effekte der Hormonbehandlung im vorliegenden Zellkultur-Modell ausschließen zu können, wurde zunächst die Zellviabilität der NK-92-Zellen nach 19-stündiger Inkubation mit verschiedenen Hormonen bestimmt. Im Schnitt waren Werte zwischen 57 % und 67 % lebender Zellen messbar. Da keine Unterschiede in der Zellviabilität zwischen unbehandelten Zellen und Zellen, denen im Medium Hormone zugesetzt waren, nachweisbar waren, kann man davon ausgehen, dass die in den Versuchen eingesetzten Hormone keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten. Zudem wurde bereits in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Sauter, 2008) geprüft, ob die verwendeten

5. DISKUSSION

Ethanolkonzentrationen (1-3 ‰) einen toxischen Effekt auf NK-92-Zellen haben. Dabei konnte keine Beeinflussung der Zellviabilität durch die Inkubation mit Ethanol nachgewiesen werden. In den Kontrollansätzen (ohne Ethanolzusatz) war die Viabilität der NK-92-Zellen 59 %, im Vergleich dazu konnte bei einer Behandlung der Zellen mit 1 ‰ Ethanol eine Viabilität von 65 %, bei 2 ‰ Ethanol von 60 % und bei 3 ‰ Ethanol von 62 % gemessen werden (Sauter, 2008). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass 1-3 ‰ Ethanol keinen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen die Viabilität isolierter PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) nach 72-stündiger Inkubation mit Ethanol (0-100 mM) nicht beeinträchtigt war (Wagner *et al.*, 1992). Auch die Behandlung von Milzzellen mit 0.1-1.0 ‰ Ethanol führte zu keinen Veränderungen der Zellviabilität. Da das Modell zur Ethanolinkubation von NK-92-Zellen im eigenen Arbeitskreis (Sauter, 2008) etabliert ist, wurde in der vorliegenden Studie darauf verzichtet, explizit die Zellviabilität nach Ethanolinkubation zu bestimmen.

Die Inkubation von NK-92-Zellen mit Geschlechtshormonen hat keinen Einfluss auf die ethanolabhängige Verminderung der Interferon- γ -Ausschüttung

Ziel der Inkubationsversuche war es, zu untersuchen, ob eine gleichzeitige Behandlung von NK-92-Zellen mit verschiedenen Geschlechtshormonen und verschiedenen Ethanolkonzentrationen zu einer Beeinflussung der INF- γ -Ausschüttung führt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen (siehe 3.3.1) konnte jedoch lediglich bestätigt werden, dass Ethanol per se zu einer Verminderung der IFN- γ -Ausschüttung führt (Wagner *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Laso *et al.*, 1997; Waltenbaugh *et al.*, 1998; Starckenburg *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2001; Dokur *et al.*, 2003). Wie bereits von Sauter (2008) in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, resultiert die Behandlung von NK-92-Zellen mit Ethanol in einer Hemmung der IFN- γ -Ausschüttung. Jedoch ist diese Hemmung nicht mit einer Verminderung der mRNA-Expression von IFN- γ , einer intrazellulären Akkumulation von IFN- γ , oder einer Veränderung der STAT-4-Phosphorylierung, einem wichtigen Schritt in der Signaltransduktion hin zur INF- γ -Genexpression, assoziiert (Sauter, 2008). Vielmehr werden hier posttranslatorisch wirksame Mechanismen postuliert (Sauter, 2008).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte jedoch in der vorliegenden Studie kein Effekt der ausgewählten Geschlechtshormone auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen nachgewiesen werden. Die weiblichen Geschlechtshormone Östrogen, Progesteron, FSH, LH,

5. DISKUSSION

fürten weder alleine, noch in in Kombinationen, die den hormonellen Status während verschiedener Phasen des weiblichen Zyklus widerspiegeln sollen (Follikelphase: Östrogen, LH, FSH; Lutealphase: Östrogen, Progesteron), zu Veränderungen der INF- γ -Ausschüttung nach Co-Inkubation mit Ethanol. Auch konnte keine Beeinflussung durch das männliche Geschlechtshormon Testosteron nachgewiesen werden. Aufgrund der vorliegenden Befunde kann ausgeschlossen werden, dass bei Alkoholexposition weibliche oder männliche Geschlechtshormone zu einer Modulation der ausgeschütteten Mengen an IFN- γ führen. Immunsuppressive Effekte – im vorliegenden Fall anhand einer Verminderung der IFN- γ -Ausschüttung aufgezeigt – scheinen somit einzig auf die Inkubation der NK-92-Zellen mit Ethanol zurückzuführen zu sein. Zwar konnte in vielen Studien belegt werden, dass das immunsuppressive Hormon Östrogen zahlreiche Zellen des Immunsystems (B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, Eosinophile) direkt oder indirekt beeinflusst (zur Übersicht siehe Jansson und Holmdahl, 1998), und dass eine Behandlung mit Östrogen zu einer Verminderung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen führt (Pfeifer und Patterson, 1985; Seaman und Gindhart, 1979), die Befunde der vorliegenden Studie weisen aber darauf hin, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber immunsuppressiven Effekten nicht auf einen direkten Einfluss von Geschlechtshormonen auf Zellen der Linie NK-92 zurückzuführen sind.

6 Zusammenfassung

Geschlechtsspezifische Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen bei Patienten mit ALD

Frauen wird im Vergleich zu Männern eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber alkoholbedingten Lebererkrankungen (ALD) unterstellt. Die Ergebnisse von Untersuchungen an verschiedenen Probandenkollektiven belegen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Auswahl von Lebensmitteln. In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Mikronährstoffe die Entstehung der ALD beeinflussen können. So war die Hypothese der vorliegenden retrospektiven Querschnittsstudie, dass die geschlechtsspezifische Aufnahme von Mikro- und Makronährstoffen in Patienten mit ALD eine Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit für eine alkoholbedingte Leberschädigung bei Frauen ist. Bei 210 Patienten (158 Männer, 52 Frauen) mit verschiedenen Stufen der ALD (ALD1: alkoholinduzierte Fettleber; ALD2: alkoholinduzierte Hepatitis; ALD3: alkoholinduzierte Zirrhose) und bei 336 gesunden Kontrollpersonen (208 Männer, 128 Frauen) wurde in Bezug auf den Schweregrad der ALD und dem Geschlecht der Patienten mittels einer computergestützten Ernährungserhebung (Diet History) die durchschnittliche tägliche Nährstoffaufnahme ermittelt. Es konnten keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen mit ALD bezüglich der täglichen relativen Aufnahme (pro kg Körpergewicht/ Tag) von Proteinen, Kohlenhydraten und Fett und der meisten Mikronährstoffe berechnet werden. Bei Patientinnen mit ALD wurde eine höhere Zufuhr von Vitamin C (ALD3), Calcium (ALD2), Eisen (ALD1 und ALD2) und Zink (ALD1) errechnet als bei männliche Patienten. Ein Einfluss dieser Mikronährstoffe auf die Entstehung von alkoholinduzierten Leberveränderungen konnte jedoch nicht evaluiert werden. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Enzymaktivität „leberspezifischer“ Enzyme im Blut und der DeRitis-Quotient bei Frauen mit ALD trotz gleichen oder niedrigeren Alkoholkonsums höher waren als bei männlichen Patienten mit ALD. Dies kann als eine erhöhte Empfindlichkeit für die Entstehung von ALD gewertet werden. Es können aber aus den Ergebnissen der berechneten Mikro- bzw. Makronährstoffaufnahme keine Rückschlüsse auf einen Einfluss der geschlechtsspezifischen Ernährung in der Entstehung von ALD gezogen werden.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholexzessbedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des MTP

Human- und Tierstudien belegen, dass Frauen bzw. weibliche Nagetiere bei chronischem Alkoholkonsum eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ALD aufweisen. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Tierstudie, zu untersuchen, ob weibliche Mäuse

auch empfindlicher gegenüber der **akuten** alkoholbedingten Lebersteatose sind als männliche Tiere und ob dies auf geschlechtsspezifische Veränderungen im hepatischen Lipidexport zurückzuführen ist. Männliche und weibliche C57/Bl6-Mäuse erhielten einmalig intragastral einen Bolus Ethanol (6 g/ kg Körpergewicht) oder isokalorische Maltodextrinlösung. Die Konzentration der Triglyceride in der Leber, die hepatische Lipidakkumulation, die mRNA-Expression des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins (MTP) und des Apolipoproteins (Apo) B, als auch die MTP-Aktivität wurden 12, 24 und 48 h nach akuter Alkoholgabe gemessen. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen resultierte die akute Alkoholexposition in einem deutlichen Anstieg der Triglyceride und Lipide in der Leber, wobei die Gesamtlipidakkumulation in den Lebern der weiblichen Mäuse ca. 2-fach höher und auch länger anhaltend war als bei den männlichen Tieren. 48 h nach der Alkoholgabe waren die Konzentrationen der Triglyceride in den Lebern der männlichen und weiblichen mit Alkohol behandelten Tiere wieder vergleichbar mit denen der Kontrolltiere. Die MTP-Aktivität war nur in den Lebern der männlichen Tiere 12 h nach Alkoholexposition signifikant erhöht; wohingegen zu diesem Zeitpunkt die mRNA-Expression von MTP nur in den Lebern der weiblichen Mäuse signifikant vermindert war. Ebenso war die mRNA-Expression von ApoB nur in den Lebern der weiblichen Tiere 12 h nach Alkoholgabe tendenziell im Vergleich zu den Kontrollen vermindert; die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die akute alkoholbedingte Lebersteatose in weiblichen Mäusen nicht nur stärker ausgeprägt, sondern auch länger anhaltend ist als bei männlichen Tieren. Dies lässt sich zumindest teilweise durch eine geschlechtsspezifische Regulation des hepatischen Lipidexports erklären. Ein protektiver Effekt des selektiven Östrogenrezeptor-Modulators (SERM) Toremifen auf die alkoholinduzierte hepatische Lipidakkumulation konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Einfluss von Alkohol und Geschlechtshormonen auf die IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen

Nicht nur im Ethanolstoffwechsel, sondern auch in der Immunabwehr spielt die Leber eine wichtige Rolle. Mit 30-50 % der hepatischen Lymphozyten stellen lymphatische NK-Zellen eine bedeutende Zellpopulation in der Leber dar. Durch Ausschüttung des proinflammatorischen und antifibrotisch wirkenden Zytokins IFN- γ sind NK-Zellen auch am Verlauf der Leberschädigungen beteiligt. In Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnte bislang nachgewiesen werden, dass bereits eine 6-stündige Inkubation von NK-92-Zellen mit Ethanol zu einer Verminderung der IL-12-induzierten IFN- γ -Ausschüttung führt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob männliche (Testosteron) und weibliche

6. ZUSAMMENFASSUNG

(Östrogen, Progesteron, FSH, LH) Geschlechtshormone die alkohol-induzierte Immunsuppression in NK-92-Zellen beeinflussen. Dazu wurden Zellen der Linie NK-92 zunächst mit den Geschlechtshormonen 19 h lang prä-inkubiert und anschließend mit Ethanol (1-3 ‰) und Hormonen 18 h lang co-inkubiert. Im Zellkulturmedium wurde die nach IL-12-Stimulation ausgeschüttete IFN- γ -Menge mittels ELISA bestimmt. Wie bereits in anderen Studien nachgewiesen werden konnte, hatte Ethanol eine immunsuppressive Wirkung und führte zu einer signifikanten Verminderung der IFN- γ -Ausschüttung in NK-92-Zellen im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Ethanol inkubiert worden waren. Jedoch konnte keinerlei Beeinflussung der IFN- γ -Ausschüttung durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Geschlechtshormonen nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man schließen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen lediglich Ethanol, nicht jedoch Geschlechtshormone einen immunmodulierenden Effekt auf NK-92-Zellen haben.

7 Summary

Gender-specific intake of micro- and macronutrients in patients with ALD

Women are assumed to have a higher susceptibility to alcohol-induced liver disease (ALD) than men. Gender-related differences in food preference were described in previous studies for several populations. As certain micronutrients are reported to take influence on the development of ALD in animal experiments, the hypothesis of the present retrospective cross-sectional study was that gender-dependent (micro-) nutrient intake in patients with ALD may cause the higher susceptibility of women to this disease. In 210 patients (male: 158, female: 52) with different stages of ALD (ALD1: mild stage of liver damage; ALD2: moderately severe changes of the liver with signs of hepatic inflammation; ALD3: severely impaired liver function) and in 336 controls (male: 208, female: 128), nutrient intake was determined by a computer-guided diet history and related to the severity of ALD in dependence on the sex of the patients. No significant differences between males and females with ALD were calculated for the intake (per kg body/day) of protein, carbohydrates, fat, and the intake (per kg body/day) of most micronutrients. In females with ALD, higher intake was found for vitamin C (ALD3), calcium (ALD2), iron (ALD1 and ALD2), and zinc (ALD1), but the consumption of none of these micronutrients seems to contribute to a higher susceptibility to ALD in females. In the present study, a higher activity of “liver-specific” enzymes and a higher DeRitis quotient was measured in female patients with ALD despite equal or lower amounts of consumed alcohol. This may indicate a higher susceptibility to the development of ALD in women. However, the data of calculated daily macro- and micronutrient intake do not suggest any explicit influence of gender-specific nutrition in the development of ALD.

Gender-specific differences in the acute alcohol-induced liver steatosis in a mouse model: role of the hepatic microsomal triglyceride transfer protein

In a chronic setting of alcohol intake, women and female rodents are more susceptible to alcohol-induced liver disease than men and male mice. Starting from this background, the purpose of the present study was to determine if female mice are also more susceptible to **acute** alcohol-induced steatosis than male mice and to investigate whether this is due to alterations in hepatic lipid export. Male and female C57/Bl6-mice received one single dose of ethanol (6 g/kg) or isocaloric maltose-dextrin solution (control) intragastrically. Hepatic triglycerides, lipid accumulation, mRNA expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and apolipoprotein (Apo) B, as well as MTP activity were measured 12, 24, and 48 h after alcohol intake. In both genders, acute alcohol ingestion markedly increased

7. SUMMARY

hepatic lipid and triglyceride levels; however, total lipid accumulation was ~2-fold higher and more persistent in livers of female than in male mice. Fourty-eight h after ethanol treatment hepatic triglyceride concentrations in male and female ethanol-treated mice were similar to those of controls. MTP activity was significantly increased only in male mice 12 h after ethanol ingestion; whereas expression of MTP mRNA was significantly reduced in female alcohol-treated animals compared to controls at this timepoint. Expression of ApoB was also reduced only in livers of female mice after 12 h; however, differences did not reach level of significance. The results of the present study suggest that the markedly more pronounced and more prolonged susceptibility to acute alcohol-induced liver steatosis of female mice results at least partly from a gender-specific regulation of hepatic lipid export. In our experiments, the selective estrogen receptor modulator (SERM) toremifen did not protect against alcohol-induced hepatic lipid accumulation.

Influence of treatment with ethanol and sex hormones on IFN- γ production in NK-92 cells

The liver plays an important role not only in the metabolism of ethanol but also in the immune system. Lymphatic NK cells are present at an unusually high frequency among liver-resident lymphocytes (30-50 %). By producing the pro-inflammatory and anti-fibrotic cytokine IFN- γ NK cells are involved in the development of liver diseases. Results of studies of our own working group indicate a decrease of IL-12-induced IFN- γ production in NK-92 cells after treatment with ethanol for 6 h. The aim of the present study was to investigate whether male (testosterone) or female (estrogen, progesterone, FSH, LH) sex hormones influence the ethanol-induced immunosuppression in NK-92 cells. Therefore, NK-92 cells were incubated with different sex hormones for 19 h and were subsequently treated with ethanol (1-3 %) and sex hormones for 18 h. Concentrations of IFN- γ were determined by ELISA. According to previous studies ethanol treatment resulted in a significant decrease of released IFN- γ in comparison to NK-92 cells that were not incubated with ethanol. However, treatment with male and female sex hormones did not affect IFN- γ release in NK-92 cells. The results of the present study suggest that solely ethanol treatment but not incubation with sex hormones has an immun modulating effect on NK-92 cells.

Literaturverzeichnis

A

- Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108: 218-224
- Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leuc Biol* 2004; 76: 743-759
- Arbabi S, Garcia I, Bauer GJ, Maier RV. Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of the p38 pathway. *J Immunol* 1999; 162: 7441-7445
- Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 778-790
- Arteel GE. New role of plasminogen activator inhibitor-1 in alcohol-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 (Suppl 1): S54-S59
- Ashley MJ, Olin JS, Le Riche WH, Kornaczewski A, Schmidt W, Rankin JG. Morbidity in alcoholics: evidence for accelerated development of physical disease in women. *Archives of Internal Medicine* 1977; 137: 883-887

B

- Baker RC, Jerrels TR. Recent developments in alcoholism: immunological aspects. *Recent Developments in Alcoholism* 1993; 11: 249-271
- Baratin M, Roetynck S, Lepolard C, Falk C, Sawadogo S, et al. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14747-14752
- Beck IT, Morris GP, Buell MG. Ethanol-induced vascular permeability changes in the jejunal mucosa of the dog. *Gastroenterology* 1986; 90: 1137-45
- Becker U, Deis A, Sorensen TI, Gronbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996; 23: 1025-1029
- Bell H, Tallaksen C, Sjaheim T, Weberg R, Raknerud N, Orjasaeter H, Try K, Haug E. Serum carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol consumption in patients with chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 246-252.
- Benlagha K, Kylin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NKT cell lineage. *Science* 2002; 296:443-555

- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JI, Dubeau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE. Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology* 2006; 130: 2099-2112
- Bergheim I, Parlesak A, Dierks C, Bode JC, Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol-consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57: 431-438
- Biburger M, Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 2005; 175: 1540-1550
- Bode C, Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 166S-171S
- Bode C, Ganzhorn A, Brauner B, Bode JC. Effect of acute ethanol ingestion on human gastrioluminal prostaglandin F2 alpha and keto-6-prostaglandin F1 alpha. *Alcohol Alcohol* 1989; 24: 35-42
- Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 1987; 4: 8-14
- Bode C, Maute G, Bode JC. Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha biosynthesis in human gastric mucosa: effect of chronic alcohol misuse. *Gut* 1996; 39: 348-352
- Bode C, Vollmer E, Hug J, Bode JC. Increased permeability of the gut to polyethylen glycol and dextran in rats fed alcohol. *Ann NY Ac Sc* 1991; 625: 837-840
- Bode JC. Alcohol and the gastrointestinal tract. *Inn Med Kinderheilkd* 1980, 45: 1-75
- Bode JC. Alkoholismusdiagnostik aus internistischer Sicht. In: Soyka M (Hrsg.) Biologische Alkoholismusmarker, Chapman and Hall, Weinheim, S. 21-20, 1995
- Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterol* 1984; 31: 30-34
- Boyadjieva NI, Chaturvedi K, Poplawski MM et al. Opioid antagonist naltrexone disrupts feedback interaction between mu and delta opioid receptors in splenocytes to prevent alcohol inhibition of NK cell function. *J Immunol* 2004; 173: 42-49
- Boyadjieva N, Dokur M, Advis JP et al. Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. *J Immunol* 2001; 167: 5645-5652
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

Brodie BB, Butler WM, Horning MG, Maickel RP, Maling HM. Alcohol-induced triglyceride deposition in liver through derangement of fat transport. *Am J Clin Nutr* 1961; 9: 432-435

Bundesministerium für Gesundheit. Alkoholkonsum und Krankheiten. Nomos Verlag, 2000

C

- Cadenas S, Rojas C, Barja G. Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C. *Pharmacology and Toxicology* 1998; 82: 11-18.
- Chen GJ, Huang DS, Watzl B, Watson RR. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci* 1993; 52: 1319-26
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
- Chu S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Fuller PJ. Transrepression of estrogen receptor beta signaling by nuclear factor-kappaB in ovarian granulosa cells. *Mol Endocrinol* 2004; 8: 1919-1928
- Collier SD, Wu WJ, Pruett SB. Ethanol suppresses NK cell activation by polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) in female B6C3F1 mice: role of endogenous corticosterone. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 291-299
- Cook RT, Feng L, Vandersteen D, Balls ZK, Cook BL, LaBreque DR. Ethanol and NK cells I. Activity and immunophenotype in alcoholic humans. *Alc Clin Exp Res* 1997; 21: 974-980
- Cooke LJ, Wardle J. Age and gender differences in children's food preferences. *British Journal of Nutrition* 2005; 93: 741-746
- Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB, Estes DM. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* 2001; 214: 12-20
- Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004; 13: 635-638

D

DACH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage. Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE). Frankfurt am Main, 2000

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste SH, Chan M, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G. Production of natural killer cell stimulatory factor (IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 1525-1529

Day CP. Alcoholic liver disease: dose and threshold-new thoughts on an old topic. *Gut* 1997; 41:857-858

Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998; 27: 1463-1466

Deaciuc IV, D'Souza NB, Lang CH, Spitzer JJ. Effects of acute alcohol intoxication on gluconeogenesis and its hormonal responsiveness in isolated, perfused rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1617-1624

Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) <http://www.dhs.de/web/datenfakten/alkohol.php>

Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 5-20

Dokur M, Boyadjieva NI, Sarkar DK. Reduction of perforin, granzyme B, and cytokine Interferon γ by ethanol in male Fischer 344 rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003; 27: 670-676

Dong Z, Wei H, Sun R, Hu Z, Gao B, Tian Z. Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 966-973

Dunn C, Brunnetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007; 204: 667-680

E

Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* 1998; 115: 443-451

Enomoto N, Yamashina S, Schemmer P, Rivera CA, Bradford BU, Enomoto A, Brenner DA, Thurman RG. Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin. *Am J Physiol* 1999; 277: G671-G677

Erhardt J. Entwicklung eines Computerprogramms zur Erhebung von Ernährungsanamnesen. Diplomarbeit Universität Hohenheim. 1991

Erlandsson MC, Jonsson CA, Islander U, Ohlsson C, and Carlsten H. Oestrogen receptor specificity in estradiol-mediated effects on B lymphoiesis and immunoglobulin production in male mice. *Immunology* 2003; 108: 346-351

F

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509

G

Gallucci RM, Sloan DK, O'Dell SJ, Reinke LA. Differential expression of liver interleukin-6 receptor-alpha in female versus male ethanol-consuming rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 2004; 28: 365-373

Gao B, Jeong W, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008; 47: 729-736

Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 1986; 24: 77-83

H

Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM. Folate deficiency, methionine metabolism, and alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27: 169-172

Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemelä O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ. Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2002; 99: 10072-10077

Hamada N, Ogawa Y, Saibara T, Murata Y, Kariya S, Nishioka A, Tereshima M, Inomata T, Yoshida S. Toremifene-induced fatty liver and NASH in breast cancer patients with breast-conservation treatment. *Int J Oncol* 2000; 17: 1119-1123

Hennessy BA, Harvey BJ, Healy V. 17Beta-estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 39-47

Himmelstein DU. Sex differences in alcohol-related disease at a county hospital. *The International Journal of the Addictions* 1983; 18: 125-131

- Hines IN, Wheeler MD. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G310-G314
- Hobbs J, Boutagy J, Shenfield GM. Interactions between ethanol and oral contraceptive steroids. *Clin Pharmacol Ther* 1985; 38: 371-380
- Hoogerbrugge N, van Domburg R, van der Zwet E, van Kemenade M, Bootsma A, Simoons ML. High fat intake in hyperlipidaemic patients is related to male gender, smoking, alcohol intake and obesity. *The Netherlands journal of medicine* 2001; 59: 16-22

I

- Iimuro Y, Frankenberg MV, Arteel GE, Bradford BU, Wall CA, Thurman RG. Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males. *Am J Physiol* 1997; 272: G1186-G1194
- Ikejima K, Enomoto N, Iimuro Y, Ikejima A, Fang D, Xu J, Forman DT, Brenner DA, Thurman RG. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 37: G669-G676
- Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. Interferon alfa downregulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 890-899
- Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, Mitsuta H, Arihiro K, Asahara T. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 2006; 43: 362-372

J

- Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 223-243
- Jansson L, Holmdahl R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune disease. *Inflammation Research* 1998; 47: 290-301
- Jauhonen VP, Savolainen MJ, Hassinen IE. Cyclic AMP-linked mechanisms in ethanol-induced derangements of metabolism in rat liver and adipose tissue. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 1879-1883
- Järveläinen HA, Lukkari TA, Heinaro S, Sippel H, Lindros KO. The antiestrogen toremifene protects against alcoholic liver injury in female rats. *J Hepatol* 2001; 35: 46-52

- Jeong Wi, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 (Suppl 1); S112-S118
- Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon- γ contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 248-258
- Jeong WI, Park O, Radeava S et al. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006; 44: 1441-1451
- John U, Hanke M. Alcohol-attributable mortality in a high per capita consumption country – Germany. *Alcohol and Alcoholism* 2002; 37: 581-585

K

- Kanagasundram N, Leevy C. Ethanol, immune reactions and the digestive system. *Clin Gastroenterol* 1981; 10: 295-306
- Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, et al. Augmentation of Valpha14NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 2000; 191: 105-114
- Kang YJ, Zhou Z. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2005; 26: 391-404
- Kangas L. Introduction to toremifene. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: S3-S7
- Karlsson S, Hirsimäki Y, Mantylä E, Nieminen L, Kangas L, Hirsimäki P, Perry CJ, Mulhern M, Millar P, Handa J, Williams GM. A two-year dietary carcinogenicity study of the antiestrogen toremifene in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol* 1996; 245-266
- Kim WR, Brown, RS Jr, Terrault NA, El Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002; 36: 227-242
- Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 2004; 26: 247-264
- Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF κ B, and TNF- α . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G652-G661.
- Kuiper GG, Enmark E, Penlto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5925-5930.

L

- Landig J, Erhardt JG, Bode JC, Bode C. Validation and comparison of two computerized

- methods of obtaining a diet history. *Clinical Nutrition* 1998; 17: 113-117
- Laso FJ, Lapena P, Madruga JI, San Miguel JF, Orfao A, Iglesias MC, Alvarez-Mon M. Alterations in tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-6 production by natural killer cell-enriched Peripheral Blood Mononuclear Cells in chronic alcoholism: relationship with liver disease and ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1226-31
- Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *The Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 2461-2468
- Lelbach WK. Cirrhosis in the alcoholic and its relation to the volume of alcohol abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 252:85-105
- Lemieux C, G elinas Y, Lalonde J, Labrie F, Cianflone K, Deshaies Y. Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors. *J Lipid Res* 2005; 46:1285-1294
- Leo MA, Arai M, Sato M, Lieber CS. Hepatotoxicity of vitamin A and ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1982; 82: 194-205.
- Lett eron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: Another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 133-140
- Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, Thomas SY, Diehl AM. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40:434-441
- Lieber CS. New pathway of ethanol metabolism in the liver. *Gastroenterology* 1970; 59: 930-937
- Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 573-592
- Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 1994; 106: 1085-1105
- Lieber CS. Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annual Review of Nutrition* 2000; 20: 395-430
- Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Research and Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 2003, 27: 220-231
- Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis.* 2005; 9: 1-35
- Lieber CS, De Carli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepatol* 1991; 12: 394-401

- Lin MCM, Gordon D, Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res* 1995; 36: 1073-1081
- Lin MCM, Li JJ, Wang EJ, Princler GL, Kauffman FC, Kung HF. Ethanol down-regulates the transcription of microsomal triglyceride transfer protein gene. *FASEB J* 1997; 11: 1145-1152
- Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 391-398
- Loft S, Olesen K, Dossing M. Increased susceptibility to liver disease in relation to alcohol consumption in women. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1987; 22: 1251-1256

M

- MacGregor RR, Louria DB. Alcohol and infection. *Current Topics in Infectious Disease* 1997; 17: 291-315
- Manthey KC, Rodriguez-Melendez R, Hoi JT, Zempleni J. Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2 cells, triggering arrest in G1 phase of cell cycle. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; 17: 250-256
- MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 151-196
- Morgan MY, Sherlock S. Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *British Medical Journal* 1977; 1: 939-941
- Muhlen KA, Schumann J, Wittke F, Stenger S, Van Rooijen N, Van Kaer L, et al. NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunol* 2004; 172: 3034-3041

N

- Nanji AA, French SW. Female to male mortality ratios for alcohol-related disorders: possible indicator of susceptibility in different sexes. *Advances in Alcohol & Substance Abuse* 1987; 6: 89-95
- Nanji AA, Greenberg SS, Tahan SR, Fogt F, Loscalzo J, Sadrzadeh SM, Xie J, Stamler JS. Nitric oxide production on experimental alcoholic liver disease in the rat: role in protection from injury. *Gastroenterology* 1995; 109: 899-907

Navasa M, Gordon DA, Hariharan N, Jamil H, Shigenaga JK, Moser A, Fiers W, Pollock A, Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein mRNA expression by endotoxin and cytokines. *J Lipid Res* 1998; 39: 1220-1230

O

Ogawa Y, Murata Y, Nishioka A, Inomata T, Yoshida S. Tamoxifen-induced fatty liver in patients with breast cancer. *The Lancet* 1998; 351:725

P

Palmer DL. Host defense impairment in the alcoholic. *Immunocompromised Host* 1989; 6: 2-15

Pan HN, Sun R, Jaruga et al. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1615-1623

Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients, of Interpretation, Use of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. (2002) *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. 1st Ed. The National Academy Press, Washington, DC.

Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine of the National Academies. (2005) *Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate*. The National Academy Press, Washington, DC.

Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000, 32: 742-747

Parlesak A, Schäfer C, Paulus SB, Hammes S, Diedrich JP, Bode C. Phagocytosis and production of reactive oxygen species by peripheral blood phagocytes in patients with different stages of alcohol-induced liver disease: effect of acute exposure to low ethanol concentrations. *Alcohol Clinical and Experimental Research* 2003; 27: 503-508

Permanen K. Validity of survey data on alcohol use. In: Gibbins et al. (eds.). *Research Advances in Alcohol and Drug Problems*. New York: John Wiley & Sons 1974. S. 335-374.

- Peterson J, Vasquez K, Waltenbaugh C. IL-12 therapy restores cell-mediated immunity in ethanol consuming mice. *Alc Clin Exp Res* 1998; 22: 245-251
- Pfeifer RW, Patterson RM. Modulation of non-specific cell-mediated growth inhibition by estrogen metabolites. *Immunopharmacology* 1985; 10: 127-185
- Pfeiffer A, Schmidt T, Vidon N, Kaess H. Effect of ethanol on absorption of a nutrient solution in the upper human intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1993; 28: 515-521

R

- Rachamin G, Macdonald JA, Wahid S, Clapp JJ, Khanna JM, Israel Y. Modulation of alcohol dehydrogenase and metabolism by sex hormones in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem J* 1980; 186: 483-490
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43: S54-S62
- Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners *Gastroenterology* 2006; 130: 435-452
- Rietschel ET, Brade H, Kaca W, Kawahara K, Lindner B, Lüderitz T, Tomita T, Schade U, Seydel U, Zähringer U. Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. *Prog Clin Biol Res* 1985, 189: 31-51
- Rivera CA, Bradford BU, Seabra V, Thurman RG. Role of endotoxin in the hypermetabolic state after acute ethanol exposure. *Am J Physiol* 1998; 275: G1252-G1258
- Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med* 1994; 42: 660-670
- Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR et al. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology* 1992; 16: 776-784
- Roselle G, Mendenhall CL, Grossmann CJ. Effects of alcohol on immunity and cancer. In: *Alcohol, Immunity, and Cancer*. Yirmiya R und Taylor AN, eds, S. 3-21. CRC Press, Boca Raton, FL; 2003
- Russell RM, Boyer JL, Bagheri SA, Hruban Z. Hepatic injury from chronic hypervitaminosis A resulting in portal hypertension and ascites. *The New England journal of medicine* 1974, 291: 435-440
- Ryle PR, Chakraborty J, Thomson AD. The role of the hepatocellular redox state in the

hepatic triglyceride accumulation following acute ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3159-316

S

- Sauter S. Effect of low ethanol concentrations on the production and stability of Interferon gamma. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart, 2008
- Schenker S. Medical consequences of alcohol abuse: is gender a factor? *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 1997; 21: 179-181
- Schmidt LG. Biologische Marker des Alkoholismus und alkoholassoziierter Organschäden. In: *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten*. Hrsg. Singer MV, Teysen S. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1999; S.122-129
- Schwarz E, Schäfer C, Bode JC, Bode C. Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes. *Cytokine* 2000; 12: 413-416
- Seaman WE, Gindhart TD. Effect of estrogen on natural killer cells. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 1234-1240
- Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 663-668
- Shimizu K, Goto A, Fukui M, Taniguchi M, Fujii S. Tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide induce innate NKT and NK cell-dependent resistance to tumor implantation in mice. *J Immunol* 2007; 178: 2853-2861
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun D. Alcohol and breast cancer in women. *Journal of the American Medical Association* 1998; 278: 535-540
- Sorensen TI, Orholm M, Bentsen KD, Hoybye G, Eghoje K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet* 1984; 2: 241-244
- Stal P, Hultcrantz R. Iron increases ethanol toxicity in rat liver. *Journal of Hepatology* 1993; 17: 108-115
- Starkenburger S, Munroe ME, Waltenbaugh C: Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1221-1230
- Sugimoto T, Yamashita S, Ishigami M, Sakai N, Hirano K, Tahara M, Matsumoto K, Nakamura T, Matsuzawa Y. Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats. *J Hepatol* 2002; 36: 157-162

Szabo G und Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 220-232

Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A, Catalano D, Kodys K. Reduced alloreactive T cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN γ levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1766-1772

T

Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murin model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5498-5503

Tanriverdi F, Silveira LF, MacGoll GS, Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* 2003; 176: 293-304

Taysi S. Oxidant/antioxidant status in liver tissue of vitamin B6 deficient rats. *Clinical Nutrition* 2005; 24: 385-389

Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995; 346: 987-990

Thomas ML, Xu X, Norfleet AM, Watson CS. The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells. *Endocrinol* 1993; 132: 426-430

Thurman RG. Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Canadian Journal of Gastroenterology* 2000; 14 Suppl D: 129D-135D

Tomita K, Azuma T, Kitamura N, Nishida J, Tamiya G, Oka A, Inokuchi S, Nishimura T, Suematsu M, Ishii H. Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through up-regulation of c-Met. *Gastroenterology* 2004; 126: 873-885

Trincieri BK, Gerosa F. Immunoregulation by IL-12. *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 59: 505-511

Tuyns AJ, Pequignot G. Greater risk of ascitic cirrhosis in females in relation to alcohol consumption. *International Journal of Epidemiology* 1984; 13: 53-57

V

Venkatesan S, Ward RJ, Peters TJ. Effect of chronic ethanol feeding on the hepatic secretion of very-low-density lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1998; 960: 61-66

Vicente-Gutierrez MM, Ruiz AD, Extremera BG, Garcia JMB, Gea FG. Low serum levels of alpha-interferon, gamma-interferon, and interleukin-2 in alcoholic cirrhosis. *Digestive Diseases and Science* 1991; 36: 1209-1212

W

Wagner F, Fink R, Hart R, Lersch C, Dancygier H, Classen M. Ethanol inhibits interferon-gamma secretion by human peripheral lymphocytes. *J Stud Alcohol* 1992; 53: 277-80.

Wagnerberger S, Schäfer C, Bode C, Parlesak A. Saturation of retinol-binding protein correlates closely to the severity of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 2006; 38: 37-43

Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22 (Suppl): 220S-223S

Wardle J, Haase AM, Steptoe A, Nillapun M, Jonwutiwes K, Bellisle F. Gender differences in food choice: the contribution of health beliefs and dieting. *Annals of Behavioral Medicine: publication of the Society of Behavioral Medicine* 2004; 27: 107-116

Westenhoefer J. Age and gender dependent profile of food choice. *Forum Nutr* 2005; 57: 44-51

Wick MJ, Leithauser F, Reimann J. The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 47- 103

Williams GM, Ross, PM, Jeffrey AM, Karlsson S. Genotoxicity studies with the antiestrogen toremifene. *Drug Chem Toxicol* 1998; 21: 449-476

Worner TM, Gordon G, Leo MA, Lieber CS. Vitamin A treatment of sexual dysfunction in male alcoholics. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1988; 48: 1431-1435

Y

Yamada S, Matsuoka H, Harada Y, Momosaka Y, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi Y, Eto S. Effect of long-term ethanol consumption on ability to produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in the rat liver and its gender differences. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 1999; 23: 61S-66S

Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diel AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2557-2562

Yin M, Ikejima K, Wheeler MD, Bradford BU, Seabra V, Forman DT, Sato N, Thurman RG. Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model. *Hepatology* 2000; 31:117-123

You HJ, Choi CY, Jeon YJ, Chung YC, Kang SK, Hahm KS, Jeong HG. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by 4-nonylphenol in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 294: 753-759

Z

Zhang Z, Bagby GJ, Stoltz D, Oliver P, Schwarzenberger PO, Kolls JK. Prolonged ethanol treatment enhances lipopolysaccharide/phorbol myristate acetate-induced tumor necrosis factor-alpha production in human monocytic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, 25: 444-449

Zeiner AR und Kegg PS. Effects of sex steroids on ethanol pharmacokinetics and autonomic activity. *Prog Biochem Pharmacol* 1981; 18: 130-142

Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. *Am J Pathol* 2003; 163: 1137-1146

Anhang

Anhang 1: Prozentuale Deckung der Zufuhrempfehlung (%DRI, dietary reference intake) für die tägliche Zinkzufuhr bei gesunden Kontrollen und Patienten mit ALD (alkoholbedingte Lebererkrankungen). Quintil A = Gruppe mit der niedrigsten Zinkaufnahme; Quintil E = Gruppe mit der höchsten Zinkaufnahme. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zinkaufnahme: Prozentuale Bedarfsdeckung (%DRI)				
	männlich		weiblich	
	Kontrolle	ALD	Kontrolle	ALD
Quintil A	100 \pm 20.8	63 \pm 23.7	105 \pm 19.3	74 \pm 18.5
Quintil E	173 \pm 30.3	168 \pm 32.7	196 \pm 34.9	214 \pm 112.6

Anhang 2: Prozentuale Deckung der Zufuhrempfehlung (%DRI, dietary reference intake) für die tägliche Eisenzufuhr bei gesunden Kontrollen und Patienten mit ALD (alkoholbedingte Lebererkrankungen). Quintil A = Gruppe mit der niedrigsten Eisenaufnahme; Quintil E = Gruppe mit der höchsten Eisenaufnahme. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Eisenaufnahme: Prozentuale Bedarfsdeckung (%DRI)				
	männlich		weiblich	
	Kontrolle	ALD	Kontrolle	ALD
Quintil A	157 \pm 29.7	120 \pm 36.9	110 \pm 40.9	61 \pm 40.6
Quintil E	248 \pm 24.5	293 \pm 46.9	166 \pm 74.8	182 \pm 107.7

Anhang 3: Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts im Lebergesamthomogenat (Triglyceride (mg/ml)/Proteingehalt (mg/ml)) von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. A) 12 h , B) 24 h, C) 48 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA und pos-hoc-Test nach Tukey.

A) Triglyceridgehalt (mg/ml) / Proteingehalt (mg/ml) 12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	0.0283	0.0299	8	< 0.001	MK vs METOH	0.1220
METOH	0.1005	0.0620	8		MK vs WK	0.9902
WK	0.0188	0.0133	8		MK vs WETOH	< 0.001
WETOH	0.2190	0.1042	8		METOH vs WK	0.0658
					METOH vs WETOH	0.0041
					WK vs WETOH	< 0.001

B) Triglyceridgehalt (mg/ml) / Proteingehalt (mg/ml) 24 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	0.0405	0.0131	8	0.086
METOH	0.0749	0.0632	8	
WK	0.0621	0.0484	7	
WETOH	0.1027	0.0407	7	

C) Triglyceridgehalt (mg/ml) / Proteingehalt (mg/ml) 48 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	0.0261	0.0096	8	0.003	MK vs METOH	0.8523
METOH	0.0184	0.0099	8		MK vs WK	0.0458
WK	0.0539	0.0201	7		MK vs WETOH	0.1216
WETOH	0.0484	0.0299	8		METOH vs WK	0.0074
					METOH vs WETOH	0.0215
					WK vs WETOH	0.9461

Anhang 4: Vergleich der hepatischen Lipidakkumulation männlicher (M) und weiblicher (W) Mäuse, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. Densitometrische Auswertung der mittels Oil Red O gefärbten Gewebeschnitte (% of microscope field). A) 12 h, B) 24 h, C) 48 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

A) Lipidakkumulation in der Leber (% of microscope field) 12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	0.293	0.212	8	< 0.001	MK vs METOH	0.0076
METOH	18.84	13.15	8		MK vs WK	0.9993
WK	0.968	1.080	7		MK vs WETOH	0.0002
WETOH	58.11	17.15	6		METOH vs WK	0.0136
					METOH vs WETOH	0.0002
					WK vs WETOH	0.0002

B) Lipidakkumulation in der Leber (% of microscope field) 24 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	4.532	4.359	8	< 0.001	MK vs METOH	0.0578
METOH	18.15	14.22	8		MK vs WK	0.9998
WK	4.997	2.761	6		MK vs WETOH	0.0003
WETOH	34.32	13.74	5		METOH vs WK	0.1026
					METOH vs WETOH	0.0458
					WK vs WETOH	0.0006

C) Lipidakkumulation in der Leber (% of microscope field) 48 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	0.843	0.618	8	< 0.001	MK vs METOH	0.9799
METOH	1.926	1.938	8		MK vs WK	0.1086
WK	7.683	5.119	7		MK vs WETOH	0.0002
WETOH	19.31	9.689	8		METOH vs WK	0.2165
					METOH vs WETOH	0.0002
					WK vs WETOH	0.0023

Anhang 5: Vergleich der relativen mRNA-Expression von MTP (% über Kontrolle) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. A) 12 h, B) 24, C) 48 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

A) MTP: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle) 12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	100.0	98.79	6	0.024	MK vs METOH	0.5193
METOH	168.1	120.3	5		MK vs WK	1.0000
WK	100.0	59.67	4		MK vs WETOH	0.2056
WETOH	7.659	3.758	7		METOH vs WK	0.6006
					METOH vs WETOH	0.0157
					WK vs WETOH	0.2949

B) MTP: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle) 24 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	100.0	55.60	8	0.518
METOH	67.39	43.08	7	
WK	100.0	77.23	6	
WETOH	64.97	57.62	7	

C) MTP: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle) 48 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	100.0	46.61	7	0.889
METOH	107.8	48.74	7	
WK	100.0	55.92	6	
WETOH	86.50	43.10	6	

Anhang 6: Vergleich der MTP-Aktivität (% Transfer) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. A) 12 h, B) 24 h, C) 48 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

A) MTP-Aktivität (% Transfer) 12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
MK	34.10	2.175	8	0.009	MK vs METOH	0.0107
METOH	39.53	3.832	6		MK vs WK	0.7906
WK	35.60	2.309	5		MK vs WETOH	0.0754
WETOH	38.63	2.888	4		METOH vs WK	0.1358
					METOH vs WETOH	0.9591
					WK vs WETOH	0.4077

B) MTP-Aktivität (% Transfer) 24 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	27.98	3.501	8	0.755
METOH	26.66	2.363	7	
WK	26.80	3.028	6	
WETOH	26.35	3.186	6	

C) MTP-Aktivität (% Transfer) 48 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	37.14	4.634	8	0.197
METOH	35.96	2.296	8	
WK	36.14	2.630	7	
WETOH	39.17	1.500	7	

Anhnag 7: Relativer Proteingehalt von MTP (normalisiert auf β -Actin) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. A) 12 h, B) 24 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA

A) MTP-Protein (normalisiert auf β-Actin)				
12 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	11.89	8.323	6	0.713
METOH	9.393	3.202	6	
WK	12.06	6.121	6	
WETOH	9.024	2.194	5	

B) MTP-Protein (normalisiert auf β-Actin)				
24 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)
MK	11.02	4.363	8	0.333
METOH	10.08	5.485	8	
WK	7.263	3.585	6	
WETOH	12.40	5.805	6	

Anhang 8: Vergleich der relativen mRNA-Expression von ApoB (% über Kontrolle) im Lebergesamthomogenat von männlichen (M) und weiblichen (W) Mäusen, die einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG; ETOH) oder isokalorische Maltodextrinlösung (K) erhielten. A) 12 h, B) 24 h, C) 48 h nach akuter Alkoholexposition. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

A) ApoB: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle)						
12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P _(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P _(Tukey)
MK	100.0	45.62	7	0.035	MK vs METOH	0.2709
METOH	54.54	42.39	7		MK vs WK	1.000
WK	100.0	69.29	6		MK vs WETOH	0.0693
WETOH	36.23	11.35	7		METOH vs WK	0.3043
					METOH vs WETOH	0.8770
					WK vs WETOH	0.0856

B) ApoB: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle)				
24 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P _(alle Effekte)
MK	100.0	34.25	5	0.755
METOH	120.8	50.42	6	
WK	100.0	54.28	6	
WETOH	126.6	64.46	6	

C) ApoB: relative mRNA-Expression (% über Kontrolle)				
48 h nach Alkoholexposition				
Gruppe	MW	SD	n	P _(alle Effekte)
MK	100.0	37.70	5	0.055
METOH	188.4	74.60	6	
WK	100.0	25.95	6	
WETOH	157.5	81.40	6	

Anhang 9: Vergleich des hepatischen Triglyceridgehalts (Triglyceride (mg/ml)/Proteingehalt (mg/ml)) im Lebergesamthomogenat von weiblichen Mäusen, die über 5 Tage hinweg je 5 mg/kg KG Toremifen in 0.5% Methylcellulose (+T) oder nur die Trägersubstanz erhielten (-T) und am 5. Tag einmalig einen Bolus Ethanol (6 g/kg KG) oder isokalorische Maltodextrinlösung erhielten. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

Triglyceridgehalt (mg/ml) / Proteingehalt (mg/ml)						
12 h nach Alkoholexposition						
Gruppe	MW	SD	n	P(alle Effekte)	Gruppenvergleich	P(Tukey)
Maltodextrin -T	0.0205	0.0024	4	< 0.0001	MD -T vs MD +T	> 0.05
Maltodextrin +T	0.0163	0.0033	4		MD -T vs Ethanol -T	> 0.05
Ethanol -T	0.0903	0.0399	4		MD -T vs Ethanol +T	< 0.001
Ethanol +T	0.1835	0.0586	4		MD +T vs Ethanol -T	> 0.05
					MD +T vs Ethanol +T	< 0.001
					Ethanol -T vs Ethanol +T	< 0.05

Anhang 10: Prozentualer Anteil der lebenden Zellen nach 19-stündiger Prä-Inkubation mit verschiedenen Hormonen. PK/NK = keine Inkubation mit Hormonen. E2 = β -Estradiol, P = Progesteron, LH = luteinisierendes Hormon, FSH = follikelstimulierendes Hormon, T = Testosteron. ANOVA.

Prozentualer Anteil lebender Zellen				
Hormon	MW	SD	n	P(alle Effekte)
PK, NK	57.50	17.02	4	0.987
E ₂	60.25	17.40	4	
P	65.75	16.28	4	
LH	65.75	14.59	4	
FSH	64.25	10.01	4	
T	65.50	17.00	4	
LH, FSH, E ₂	63.25	15.41	4	
E ₂ , P	67.25	13.70	4	

Anhang 11: INF- γ -Ausschüttung von NK-92-Zellen nach 19-stündiger Starvationphase und gleichzeitiger Prä-Inkubation mit Hormonen und anschließender Stimulation mit IL-12 und Ko-Inkubation mit Alkohol (0-3%) und Hormonen. PK = Positivkontrolle (nur mit IL-12 stimuliert, keine Hormonbehandlung), NK = Negativkontrolle (keine IL-12-Stimulation, keine Hormonbehandlung), E2 = β -Estradiol, P = Progesteron, LH = luteinisierendes Hormon, FSH = follikelstimulierendes Hormon, T = Testosteron. *** p < 0.001 1-3% Ethanol vs. 0% Ethanol innerhalb der gleichen Hormongruppe; ### p < 0.001 vs. NK 0% Ethanol. ANOVA und post-hoc-Test nach Tukey.

IFN- γ -Konzentration (pg/ml)								
Hormon	0 % Ethanol		1 % Ethanol		2 % Ethanol		3 % Ethanol	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
PK	6102.4 ^{###}	474.4	436.4 ^{***}	90.9	141.6 ^{***}	32.2	91.8 ^{***}	20.6
NK	59.3	17.3	11.4	1.6	12.3	0.6	9.6	1.4
E ₂	6187.8 ^{###}	729.4	536.4 ^{***}	121.8	133.8 ^{***}	41.3	83.8 ^{***}	26.4
P	6086.5 ^{###}	599.2	548.5 ^{***}	115.0	157.3 ^{***}	45.5	73.8 ^{***}	20.7
LH	6403.9 ^{###}	700.5	442.9 ^{***}	129.2	163.0 ^{***}	51.3	77.8 ^{***}	22.1
FSH	6090.0 ^{###}	658.4	458.1 ^{***}	130.5	143.4 ^{***}	43.3	76.3 ^{***}	17.6
T	6303.4 ^{###}	662.5	545.3 ^{***}	113.5	111.5 ^{***}	38.2	57.8 ^{***}	11.9
E ₂ , LH, FSH	6034.3 ^{###}	618.8	414.9 ^{***}	117.4	133.0 ^{***}	38.4	84.5 ^{***}	25.6
E ₂ , P	6240.1 ^{###}	640.3	480.0 ^{***}	125.1	130.5 ^{***}	38.2	72.3 ^{***}	15.4

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben:

Name: Sabine Wagnerberger
Geburtsdatum: 31.01.1979
Geburtsort: Prien am Chiemsee
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

09 / 1985 – 07 / 1989 Grund- und Hauptschule Chieming

09 / 1989 – 07 / 1998 Gymnasium LSH Schloss Ising am Chiemsee
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife / Abitur

Studium:

10 / 1999 – 02 / 2005 Universität Hohenheim
Studium der Ernährungswissenschaft mit dem Schwerpunkt:
spezielle Biochemie
Diplomarbeit zum Thema:
„Konzentration von Leptin und Retinol-bindendem Protein
(RBP) bei chronischem Alkoholmissbrauch und Bildung von
Leptin in Enterozyten“
Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Promotion/ beruflicher Werdegang:

04 / 2005 – 03 / 2008 Universität Hohenheim, Institut für Ernährungsmedizin,
Fg. Ernährungsphysiologie (180b); Prof. Dr. Ch. Bode

04 / 2008 – 12 / 2008 Universität Hohenheim, Institut für Ernährungsmedizin,
Fg. Ernährungsmedizin/Prävention (180a); Prof. Dr. med. S.C.
Bischoff

seit 01 / 2009 Universität Hohenheim, Institut für Ernährungsmedizin,
Fg. Ernährungsmedizin/Prävention (180a); BMBF-
Nachwuchsforschergruppe, Dr. I. Bergheim

Gutachterin:

02/2009 Journal of Human Nutrition and Dietetics

Reisestipendien:

Personal full bursary: 44th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Kopenhagen, Dänemark, 2009.

Travel Award: 12th Congress of the European Society for Biomeical Research on Alcoholism (ESBRA), Helsinki, Finnland, 2009.

Publikationen

Wagnerberger Sabine, Schäfer Christian, Bode Christiane, Parlesak Alexandr. Saturation of retinol-binding protein correlates closely to the severity of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 38, 37-43, 2006.

Wagnerberger Sabine, Schäfer Christian, Schwarz Eveline, Bode Christiane, Parlesak Alexandr. Is nutrient intake a gender-specific cause for enhanced susceptibility to alcohol-induced liver disease in women? *Alcohol and Alcoholism* 43, 9-14, 2008.

In Press:

Spruss Astrid, Kanuri Giridhar, **Wagnerberger Sabine**, Haub Synia, Bischoff Stephan C., Bergheim Ina. Toll-like Receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. In Press: *Hepatology*.

Submitted:

Kanuri Giridhar, Spruss Astrid, **Wagnerberger Sabine**, Haub Synia, Bischoff Stephan C., Bergheim Ina. Role of tumor necrosis factor (TNF α) in the onset of fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Submitted in *Hepatology*.

In Vorbereitung zur Publikation:

Wagnerberger Sabine, Kanuri Giridhar, Haub Synia, Bode Christiane, Bischoff Stephan C., Bergheim Ina. Female mice are more susceptible to acute alcohol-induced liver steatosis: role of the hepatic microsomal triglyceride transfer protein. In Vorbereitung zur Publikation in *Journal of Nutrition*.

Wagnerberger Sabine, Brune Thomas, Haub Synia, Spruss Astrid, Bischoff Stephan C., Bergheim Ina. Toll-like receptors 1-9 are involved in the development of fructose-induced non-alcoholic liver disease. Manuskript in Vorbereitung zur Publikation.

Kongressbeiträge/ Posterpräsentationen

Wagnerberger S, Bode Ch, Parlesak A. „Die Sättigung des Retinol-bindenden Protein korreliert eng mit dem Schweregrad alkoholbedingter Lebererkrankungen“.

43. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Stuttgart, 2006.

Wagnerberger S, Bode Ch, Parlesak A. „Chronischer Alkoholmissbrauch nivelliert den geschlechtsspezifischen Unterschied der Plasmakonzentration von Leptin“.

43. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Stuttgart, 2006.

Wagnerberger S, Bode Ch, Parlesak A. „Abnahme des Sättigungsgrades des Retinol-bindenden Proteins bei alkoholbedingten Lebererkrankungen“.

5. Gemeinsame Dreiländertagung der DGEM, AKE und GESKES, Berlin, 2006.

Wagnerberger S, Bode Ch, Parlesak A. „, Micelles of conjugated primary bile acids adsorb bacterial endotoxin“.

Falk Symposium 155, XIX International Bile Acid Meeting, Biles Acids: Biological Actions and Clinical Relevance, Freiburg, 2006.

Wagnerberger S, Weber S, Volynets V, Kanuri G, Bode Ch, Bischoff SC, Bergheim I. „Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkoholbedingten Lebersteatose im Mausmodell: Rolle des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins (MTP)“.

7. Gemeinsame Dreiländertagung der DGEM, AKE und GESKES, Hamburg, 2008.

Wagnerberger S, Brune T, Weber S, Spruss A, Bischoff SC, Bergheim I. “Toll-like receptors 1-9 are involved in the development of fructose-induced non-alcoholic liver disease”. 44th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Kopenhagen, Dänemark, 2009.

Wagnerberger S, Kanuri G, Haub S, Bode Ch, Bischoff SC, Bergheim I. “Female mice are more susceptible to acute alcohol-induced liver steatosis: role of the hepatic microsomal triglyceride transfer protein”. 12th Congress of the European Society for Biomeical Research on Alcoholism (ESBRA), Helsinki, Finnland, 2009.

Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Prof. Dr. Christiane Bode, Leiterin des Fachgebiets „Ernährungsphysiologie“, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, ihre stete Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und ihre anregende Kritik danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Stephan C. Bischoff, Geschäftsführender Direktor des Instituts für Ernährungsmedizin (F.G. Ernährungsmedizin/ Prävention und Genderforschung), für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, sein stetes Interesse und dafür, dass er es mir ermöglicht hat, meine Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Ina Bergheim, Leiterin der BMBF-Nachwuchsforschergruppe im F.G. Ernährungsmedizin/ Prävention und Genderforschung für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die erfahrene Betreuung des tierexperimentellen Teils dieser Arbeit. Mit ihrer großen Kompetenz auf dem Gebiet „alkoholbedingte und nicht-alkoholbedingte Leberschäden im Tiermodell“ stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alexandr Parlesak für seine kompetente Betreuung bei der Planung der Humanstudie, der Auswertung der Patientendaten und bei der Planung der Zellkulturversuche.

Herrn Prof. Dr. J. Christian Bode möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung zahlreicher Patientendaten und für seine kompetente Beratung in vielen Fragen bezüglich der Humanstudie danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Jensen bedanke ich mich sehr für seine ausführliche Beratung bei Fragen zur statistischen Auswertung der Daten.

Mein weiterer Dank gilt dem *Institut Danone Ernährung für Gesundheit e.V.* für die finanzielle Unterstützung des Projekts „Geschlechtsspezifische Unterschiede in der akuten alkohol-exzessbedingten Lebersteatose: Rolle des mikrosomalen triglyceridtransferierenden Proteins (MTP)“.

Für das Rekrutieren zahlreicher Probanden und das Überlassen der gesammelten Patientendaten danke ich sehr herzlich Dr. Tatjana Schütz, Dr. Jens Diedrich, Dr. Carsten Dierks, Dr. Andrea Barutzky, Dr. Jens Diedrich, Dr. Jürgen Erhardt und Dr. Joachim Eckoldt.

Bei Lydia Moser, Dr. Senja Sauter, Claudia Ullrich, Dr. Annette Bäuerlein, Katja Mitzscherling, Monika Ostertag und allen weiteren Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Christiane Bode möchte ich mich ganz herzlich für das freundliche, angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima bedanken.

Auch allen MitarbeiterInnen des Fachgebietes „Ernährungsmedizin/ Prävention und Genderforschung“ danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Vor allem möchte ich mich bei den MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ina Bergheim bedanken: Astrid Spruss, Synia Haub, Valentina Volynets, Giridhar Kanuri und bei allen, die ich hier nun nicht namentlich erwähne, denen ich aber deswegen nicht weniger danken möchte.

Schließlich möchte ich mich noch sehr, sehr herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und ganz besonders bei Larissa Hoffmann dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben und immer für mich da waren.

Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

*„Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entstehung von alkoholbedingten
Lebererkrankungen“*

von mir selbst, lediglich unter Verwendung der aufgeführten Literatur angefertigt wurde.
Wörtliche oder inhaltliche Zitate wurden als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, im Juli 2009

Sabine Wagnerberger