

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. Berend Isermann
Bereich Pathobiochemie
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann

**Über den Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die
Entstehung von Lipidakkumulaten unter der Bedingung von
Hyperglykämie und Hyperinsulinämie und den protektiven
Wirkungen eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma
pentaphyllum* in primären Hepatozytenkulturen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: Christian Müller
aus: Brandenburg/Havel
Magdeburg: 2015

- Für meine Familie –

**„Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“**

- Marie Curie -

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Müller, Christian:

Über den Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Entstehung von Lipidakkumulaten unter der Bedingung von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie und den protektiven Wirkungen eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma pentaphyllum* in primären Hepatozytenkulturen. – 2015. – 112 Bl.: 15 Abb., 4 Tab., 136 Literaturquellen.

Kurzreferat:

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist mit einer Prävalenz von bis zu 44% eine der weitverbreitetsten metabolischen Störungen der hochentwickelten, westlichen Industriestaaten. Sie ist charakterisiert durch eine zunehmende Anhäufung von Lipiden in den Leberzellen charakterisiert und kann in späteren Stadien zu entzündlichen Veränderungen der Leber bis hin zum hepatozellulärem Karzinom führen. Die exzessive Aufnahme von fettreicher und kohlenhydratreicher Nahrung, sowie Übergewicht und Diabetes mellitus können die Entwicklung der NAFLD begünstigen. Des Weiteren zeigen Patienten mit einer NAFLD sowohl in der Leber, als auch im Blut Marker für oxidativen Stress.

Um die Einflüssen von Fettsäuren auf Lipidanreicherung und oxidativen Stress zu untersuchen, wurden Hepatozyten aus Wistar-Ratten isoliert und über insgesamt 48 Stunden entweder mit Palmitin- oder Linolsäure unter hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen kultiviert. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer Reduktion der Zellviabilität in Linolsäure – behandelten Hepatozyten. Dies war mit einer Steigerung der Lipidakkumulation, insbesondere einer verstärkten Triglyceridanreicherung der Zellen verbunden. Zusätzlich konnte anhand zweier Lipidperoxidationsprodukte (F₂-Isoprostane, oxidiertes Cardiolipin) demonstriert werden, dass die Inkubation mit Linolsäure zu einer stärkeren Induktion von oxidativen Stress führte, als die Behandlung mit Palmitinsäure. Im zweiten Teil der experimentellen Arbeiten wurde der Einfluss eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma pentaphyllum*, einer asiatischen Heilpflanze, auf die Viabilität, die Anreicherung von Lipiden und auf den oxidativen Stress untersucht. Unter der Gabe dieses Extraktes konnte eine Verbesserung der Zellviabilität verbunden mit einer Reduktion der Lipidakkumulation und des oxidativen Stresses gezeigt werden.

Schlüsselwörter:

Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) – primäre Hepatozytenkultur – Linolsäure – Palmitinsäure – Stickstoffmonoxid (NO) – Lipidakkumulation – oxidativer Stress – Lipotoxizität – Cardiolipin – F₂-Isoprostane – *Gynostemma pentaphyllum*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	10
1.1 Allgemeines zur nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD).....	10
1.2 Bedeutung von oxidativem Stress in der NAFLD.....	11
1.3 Über die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO).....	13
1.4 Cardiolipin.....	15
1.5 Isoprostane als Marker für zellulären oxidativen Stress.....	18
1.6 <i>Gynostemma pentaphyllum</i>	20
1.7 Zielstellung der Arbeit.....	22
2 Materialien und Methoden	24
2.1 Präparation der Hepatozyten und Zellkultivierung.....	24
2.2 Proteinbestimmung nach LOWRY.....	27
2.3 MTT-Bestimmung.....	27
2.4 Trypanblaufärbung.....	28
2.5 Nitrit-/Nitratbestimmung nach GRIESS.....	28
2.6 Extraktion des Gesamtlipids nach BLIGH und DYER.....	29
2.7 Bestimmung des Triglyceridanteils.....	30
2.8 Bestimmung des Cholesterolanteils.....	30
2.9 Bestimmung des Isoprostangehaltes.....	30
2.10 Bestimmung des Cardiolipins.....	31
2.11 Statistische Analyse.....	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf Faktoren der Viabilität in Hepatozytenkulturen – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	34
3.1.1 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf den zellulären Proteingehalt – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	34
3.1.2 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Reduktion von MTT – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	36

3.1.3	Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Trypanblaufärbung – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	39
3.2	Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Bildung von Nitrit/Nitrat in Hepatozytenkulturen – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	41
3.3	Auswirkung von Palmitin- und Linolsäure auf den Lipidgehalt von Hepatozyten.....	43
3.3.1	Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf die Gesamtlipide – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	43
3.3.2	Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt an Triglyceriden – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	46
3.3.3	Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt an Cholesterol – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	48
3.4	Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Bildung von Isoprostanen – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	50
3.5	Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt und die Spezieszusammensetzung von Cardiolipin – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	53
3.5.1	Veränderungen des Cardiolipingehaltes nach Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	53
3.5.2	Veränderung des Gehaltes an oxidiertem Cardiolipin nach Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	55
3.5.3	Veränderungen der Speziesverteilung des Cardiolipin unter der Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i>	57
4	Diskussion	65
4.1	Allgemeine Betrachtungen zum gewählten <i>in vitro</i> – System und dessen Limitationen.....	65
4.2	Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren führt zu einer Verminderung der Viabilität	67
4.2.1	Linolsäure bewirkt eine verstärkte Reduktion der Viabilität in primären Hepatozytenkulturen.....	67
4.2.2	Die Behandlung mit <i>G. pentaphyllum</i> verbessert die Viabilität von primären Hepatozytenkulturen	70
4.3	Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren führt zu einer unterschiedlich ausgeprägten Lipidakkumulation.....	72

4.3.1	Die Behandlung mit Linolsäure führt zu einer drastischen Akkumulation von Lipiden.....	72
4.3.2	Die Inkubation mit Palmitinsäure induziert die zelluläre Bildung von NO.....	73
4.3.3	Die Gabe von <i>G. pentaphyllum</i> bewirkt eine Reduktion der Lipidakkumulation in primären Hepatozytenkulturen.....	75
4.4	Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren induziert oxidativen Stress	76
4.4.1	Die Behandlung mit Linolsäure bewirkt eine verstärkte Akkumulation von Lipidperoxidationsprodukten.....	76
4.4.2	<i>G. pentaphyllum</i> beeinflusst die Bildung von mitochondrialen und zytosolischen Lipidperoxidationsprodukten.....	82
4.5	Klinische Bedeutung der aus dem <i>in vitro</i> – Modell erhobenen Befunde.....	84
4.5.1	Patienten mit NAFLD zeigen verstärkten oxidativen Stress.....	84
4.5.2	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> hat positive Einflüsse auf metabolische Erkrankungen des Menschen.....	86
5	Zusammenfassung.....	88
6	Literaturverzeichnis.....	90
	Anhang.....	102
	Anhang: Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	102
	Anhang: Geräte.....	106
	Anhang: Verbrauchsmaterialien.....	107
	Abbildungsverzeichnis.....	108
	Tabellenverzeichnis.....	109
	Eidesstattliche Erklärung.....	110
	Danksagung.....	111
	Darstellung des Bildungsweges.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
$C_2H_3Cl_3O_2$	Chloralhydrat
$C_2H_4O_2$	Hydroxyacetaldehyd
CH_3OH	Methanol
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CCl_4	Tetrachlorkohlenstoff
CL	Cardiolipin
COX	Cyclooxygenase
CPT	Carnitin-Palmityltransferase
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Kupfersulfatpentahydrat
<i>Cytc</i>	Cytochrom-c
DEANOate	1,1-diethyl-2-hydroxy-2-nitrozohydrazine
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Erk1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FAS	Fettsäure-Synthase (<i>fatty acid synthase</i>)
Fe^{2+}	Eisen (zweiwertig)
γ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
<i>GP</i>	<i>Gynostemma pentaphyllum (G. pentaphyllum)</i>
GPx	Glutathionperoxidase

GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HbA _{1c}	glykiertes Hämoglobin A1c
HCl	Chlorwasserstoff
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HNE	Hydroxynonenal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IRS-2	Insulinrezeptorsubstrat-2
KHK	koronare Herzkrankheit
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
Komplex I	NADH-CoenzymQ-Oxidoreduktase
Komplex III	CoenzymQ-Cytochrom c-Oxidoreduktase
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
L-NNA	Nitro-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Linolsäure
MDA	Malondialdehyd
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ x7H ₂ O	Magnesiumsulfatheptahydrat
MMP	Matrixmetalloproteinase
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	messenger-RNA (messenger Ribonucleinsäure)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid

Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
mtNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidanion-Radikal
PAPANONOate	1-(3-aminopropyl)-2-hydroxy-3-oxo-1-propyltriazane
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPARs	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPAR _α	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor α
PPAR _γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ
PS	Palmitinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	Standardfehler (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-Penicillamin
SOD	Superoxiddismutase
SREBP-1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TLCL	Tetralinoleylcardiolipin
TNF _α	Tumornekrosefaktor α
TXA ₂	Thromboxan A ₂

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die NAFLD ist mit einer Prävalenz von bis zu 44 % in den westlichen Industrieländern neben dem Diabetes mellitus Typ II und den Formen der Hyperlipidämie eine der häufigsten metabolischen Erkrankungen. Neben Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition wird insbesondere eine einseitige und fettreiche Ernährung als ursächlicher Faktor der Pathogenese angesehen (Blachier et al. 2013). Die NAFLD ist assoziiert mit erhöhten Transaminasenaktivitäten, ASAT und ALAT, und der γ GT im Serum, sowie mit erhöhten Blutglukose- und Insulinkonzentrationen als Zeichen einer gestörten Glukosehomöostase (Bedogni et al. 2005). Zudem zeigt sich bei vielen Erkrankten eine Insulinresistenz, eine gestörte hepatische Aufnahme der Glukose aus dem Blut und eine verstärkte Gluconeogenese. Die NAFLD wird demnach als komplexes Krankheitsbild bestehend aus Übergewicht, mangelnder Insulinwirkung und der daraus möglichen Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II angesehen. Spätfolgen, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, diabetische Neuropathie und Nephropathie, können im Rahmen einer fortschreitenden Erkrankung zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen (Farrell, Larter 2006). Die NAFLD kann neben organspezifischen Veränderungen, wie einer Verfettung des Parenchyms und in der Folge einer verstärkten Fibrosebildung, auch systemische Auswirkungen haben (Targher et al. 2007). Da die NAFLD mit einem erhöhten Risiko für Leberfibrose und Leberzirrhose sowie einer erhöhten Prävalenz von Infektionen und Malignomen assoziiert ist, steht sie zunehmend im Fokus der Forschung (Adams et al. 2005).

In einer Studie von Marchesini et al. konnte die Verbindung zwischen Bildung einer Steatose und der Ausbildung einer Insulinresistenz demonstriert werden (Marchesini et al. 1999). Die Patienteneiner Kohorte mit NAFLD wiesen deutlich erhöhte Konzentrationen an Blutglukose, Insulin und einen sehr hohen und lang anhaltenden postprandialen Insulinpeak auf. Dies deuteten die Autoren so, dass die Insulinwirkung an den abhängigen Organen wie Leber und Skelettmuskulatur gestört sein muss. Ferner schlossen die Autoren daraus, dass die Insulinresistenz als „first hit“ angesehen werden kann. Dadurch kommt es in der Folge zu einem gestörten Lipidmetabolismus der Hepatozyten mit Ausbildung von Triglyzeriddepots. Diese Anreicherung führt zum „second hit“, der irreversiblen Schädigung des Leberparenchyms mit Ausbildung einer reaktiven Fibrose. Für die These, dass es bei der NAFLD zu einer gestörten Insulinwirkung in der Leber kommt, fanden Fantani et al. in einer *in vivo* – Untersuchung an Wistar-Ratten eindeutige Befunde. Sie zeigten, dass durch die Induktion mit einer high-fat Diät, welche zu einer ausgeprägten Fettleber führte, die Proteine, welche direkt an den Insulinrezeptor gekoppelt sind, in ihrer Expression vermindert sind. Insbesondere gilt dies für das Insulinrezeptorsubstrat 2

(IRS-2) und die Phosphoinositol-3-Kinase, die für die Weiterleitung des Rezeptorsignals erforderlich sind (Fatani et al. 2011).

Die bei der NAFLD entstehende Akkumulation von Lipiddroplets in den Hepatozyten basiert zum größten Teil auf Triglyceriden. Die gesteigerte Bildung dieser im Lichtmikroskop sichtbaren Tröpfchen ist eine Kombination aus vermehrter *de novo*-Synthese von Fettsäuren und Aufnahme von peripheren Fettsäuren in Verbindung mit einer gesteigerten Triglyceridsynthese. Der vermehrten Bildung geht eine erhöhte Insulin- und Glukosekonzentration voraus. Durch die Insulintransduktion werden intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen, die u.a. zu einer Verstärkung der Expression eines Proteins führt, das als Sterol regulatory element-binding protein, SREBP, bekannt ist. Dieses Eiweiß führt im Zellkern zur vermehrten Transkription von Enzymen, wie der Fettsäuresynthase (FAS) und der HMG-CoA-Reduktase, und führt zur Bildung von neuen Fettsäuren und Cholesterol in den Hepatozyten (Diraison et al. 2003, Ribaux, Iynedjian 2003, Kohjima et al. 2007).

Neben der gesteigerten *de novo*-Synthese führen auch die aus dem Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren zu einer Überladung der Hepatozyten. In der Leber werden nicht benötigte freie Fettsäuren in Form von Triglyzeriddepots gespeichert. Dabei scheint der Sättigungsgrad der freien Fettsäuren eine bedeutende Rolle zu spielen. In einer *in vitro* – Studie konnte Li et al. zeigen, dass vor allem die einfach ungesättigte Ölsäure zu einer Anreicherung von Lipidtröpfchen führt. Im Gegensatz dazu kommt es durch Applikation der gesättigten Palmitinsäure zu keiner nennenswerten Akkumulation von Triglyceriden, jedoch zur Induktion der Apoptose und damit zu einer stärkeren Toxizität. Auf der Basis dieser Ergebnisse schlossen die Autoren, dass die Bildung von Lipidakkumulaten gegenüber der Apoptose protektiv wirkt (Li et al. 2009). Dies steht jedoch im Kontrast zu den Ergebnissen von Müller et al., die keine Schutzfunktion der Lipidakkumulate hinsichtlich oxidativer Schädigung nachweisen konnten (Müller et al. 2010). Durch die Inkubation mit der mehrfach ungesättigten Linolsäure kam es zur Triglyceridakkumulation und Verminderung des Stickstoffmonoxidgehaltes (NO), sowie zu einer Abnahme der Zellviabilität. Unter diesen Bedingungen wurde eine deutliche Erhöhung der Oxidationsprodukte des mitochondrialen Phospholipids Cardiolipin und der Arachidonsäure durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen.

1.2 Bedeutung von oxidativem Stress in der NAFLD

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Aufkommen von reaktiven Molekülen, vor allem reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), reaktiven Stickstoffspezies (RNS) und den antioxidativ wirksamen Radikalfängern. Bei der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien, bei dem durch Aufbau eines Protonengradienten zwischen Mitochondrienmatrix und intermembranösen Raum die Energie für die Synthese von energiereichem ATP erzeugt wird,

entstehen ROS. Diese führen jedoch nicht unbedingt zu einer oxidativen Schädigung der Umgebung, da sie durch zelleigene Entgiftungsmechanismen, wie der Superoxiddismutase, der Katalase und dem Glutathionsystem, abgebaut werden können. Übersteigt jedoch die Bildung von ROS und RNS die antioxidative Kapazität, so treten oxidativ bzw. peroxidativ bedingte Schädigungen auf, die Apoptose auslösen können. Dabei besteht die Möglichkeit, dass das intramitochondrial gebildete Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auch cytosolische Oxidationen oder Peroxidationen bewirken kann.

Bei der NAFLD kommt es bedingt durch eine Erhöhung von freien Fettsäuren im Serum, einer gesteigerten Triglyceridablagerung in Hepatozyten und einer gestörten Glukosehomöostase zu oxidativem Stress, der zur Schädigung der Leber führt. Dabei steigen auch im Serum Produkte der oxidativen Schädigung, wie TBARS an (Saricam et al. 2005, Madan et al. 2006, Bhardwaj et al. 2008). Dieser Parameter ist zum einen Ausdruck für eine oxidative Veränderung nicht nur in der Leber, sondern im gesamten Organismus und zum anderen für ein überlastetes Scavengersystem. In Hepatozyten von Patienten mit NAFLD wurden verringerte Konzentrationen von Glutathion, SOD und Katalase nachgewiesen (Videla et al. 2004). In der Studie von Das et al. wurden erhöhte Expressionslevel der SOD gefunden. Dieser Befund wurde von den Autoren als Schutzmechanismus interpretiert, der zu einer vermehrten Entgiftung des reaktiven $O_2^{\cdot -}$ zum weniger reaktiven H_2O_2 führt (Das et al. 2008). Allerdings erreicht H_2O_2 durch eine größere Diffusionsstrecke zytosolische Komponenten und kann dort zu oxidativen Schädigungen führen. Durch die Gabe von Katalase in einer *in vitro* – Studie von Ito et al. konnte tatsächlich eine Schädigung der Zellen vermindert werden (Ito et al. 1992). Dies spiegelt die Bedeutung von H_2O_2 hinsichtlich der gesamtzellulären Schädigung wieder.

In der *in vivo* – Studie von Petrosillo et al. sind einige Schädigungsmechanismen der NAFLD dargestellt (Petrosillo et al. 2007). Die Autoren induzierten in Wistar-Ratten mittels Cholindefizienter Diät eine Steatose der Leber und untersuchten die Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels. Nach Ausbildung der Fettleber zeigte sich eine verminderte Aktivität von Komplex I der Atmungskette, die dazu führte, dass der Energieumsatz über die oxidative Phosphorylierung deutlich abnahm und zu einer verstärkten Bildung von ROS, insbesondere von H_2O_2 , führte. Durch die erhöhte Bildung von ROS kam es zu einer Abnahme der Menge von Cardiolipin und zu einer Zunahme des oxidierten Cardiolipins als Zeichen eines peroxidativen Prozesses in den Mitochondrien. Dadurch wird die funktionelle Integrität der Atmungskette beeinflusst. Die beobachteten Schädigungen wurden als eine Folge der Ablagerung von Lipiddepots in den Hepatozyten interpretiert. Bisher wurde die spezifische Wirkung einzelner Fettsäuren auf die Schädigung von Hepatozyten nicht untersucht. Freie Fettsäuren können die Bildung von ROS in isolierten Mitochondrien beeinflussen. In der Arbeit von Schönfeld et al. wurden die gesättigte Palmitinsäure, sowie Linolsäure und Arachidonsäure als Vertreter der ungesättigten Fettsäuren auf

die Bildung von ROS untersucht. Sie zeigten, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein hohes Maß an schädlichen H_2O_2 bilden können. Palmitinsäure hingegen zeigte kaum einen Effekt (Schönfeld, Wojtczak 2007).

1.3 Über die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid, NO, ist ein kleines unpolares Molekül, das über drei freie Elektronenpaare, zwei auf Seiten des Sauerstoffs und eins auf Seiten des Stickstoffs verfügt. Auf Grund der geringen Größe ist es in der Lage, durch Membranen zu diffundieren und somit nicht nur am Entstehungsort, sondern auch in seiner Umgebung zu wirken. Die Bildung des Moleküls wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthetasen, NOS, ermöglicht. Es existieren vier Isoformen des Enzyms. Von diesen werden drei Isoformen konstitutiv exprimiert. Sie werden auf Grund des primären Vorkommens in Neuronen und Endothelzellen als neuronale NOS (nNOS) und endotheliale NOS (eNOS) bezeichnet. Die dritte konstitutive Isoform ist die mitochondriale NOS (mtNOS). Neben diesen Vertretern gibt es eine Variante, die erst nach Induktion vermehrt exprimiert wird. Die induzierbare NOS (iNOS) kann im Falle eines Entzündungsprozesses durch Cytokine oder direkt durch Bestandteile von Bakterien induziert werden.

NO steht im Verdacht neben den bereits beschriebenen ROS zur oxidativen Schädigung von Zellen beizutragen. Hier ist vor allem die Bildung von reaktiven Stickstoffspezies, RNS, zu nennen, die ähnlich wie ROS zu Peroxidationsvorgängen führen können. In tierexperimentell induzierter Steatose kann es in den Mitochondrien durch erhöhte Bildung und bereits eingeschränkter Entgiftung von ROS zur Reaktion mit NO kommen. Dabei entsteht u.a. das reaktive Peroxynitrit, welches in der Lage ist, Proteine in seiner Umgebung chemisch zu modifizieren. Diese Nitrosylierung und die direkte Wirkung von NO auf die Atmungskette, insbesondere Komplex I der Atmungskette, können zu einer Abnahme der Aktivität des Komplexes und somit zur weiteren Bildung v.a. von Superoxidanionradikalen und damit auch von H_2O_2 führen (Grattagliano et al. 2008). NO ist darüber hinaus in der Lage, Komplex IV der Atmungskette zu inhibieren und somit eine Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu behindern. Das Resultat daraus ist eine erhöhte Bildung von $O_2^{\cdot-}$. Diese können in direkter Umgebung zur Peroxidation von Lipiden, wie z. B. Cardiolipin, und zur Bildung von Peroxynitrit führen. Dies hat u.a. den Effekt, dass es zu einer Dissoziation von Cardiolipin und Cytochrom c, kommt und nachfolgend zur Induktion von Apoptose (Ushmorov et al. 1999). Rauen et al. konnten zeigen, dass durch die Gabe von einem NO-Donor, SperminNONOate, eine Inhibition der Entgiftung von H_2O_2 in Endothelzellen entsteht und es zu einer allmählichen Verringerung des Gehaltes an Glutathion kommt. In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) nachgewiesen (Rauen et al. 2007).

Es gibt Berichte über einen gegenteiligen, nämlich protektiven Effekt des NO in Bezug auf oxidative Schädigung und programmierten Zelltod. NO kann durch Nitrosylierungen an Caspasen, die für die Einleitung der Apoptose eine bedeutende Rolle spielen, zu einem Funktionsverlust dieser führen. Es konnte *in vitro* nach Induktion von Apoptose durch Tumornekrosefaktor α , TNF α , gezeigt werden, dass v.a. Caspase-3 und Caspase-8 inaktiviert bzw. in ihrer Expressionsstärke verringert werden können. Zudem scheint NO auch das mitochondriale Membranpotential zu stabilisieren (Kim et al. 1997, Li et al. 1999, Kim et al. 2000). Im Rahmen apoptotischer Vorgänge kommt es zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, was zu einer Schwellung und zu einem Ioneneinstrom in den Matrixraum der Mitochondrien führen kann. Dadurch wird das Öffnen von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-poren begünstigt.

Madar et al. zeigten in einer *in vitro* – Studie in einem Streptozotocin-induzierten diabetischen Rattenmodell, dass isolierte Hepatozyten eine deutlich höhere Aktivität der iNOS aufwiesen, als die Kontrollgruppe. Dies war mit einer stärkeren Expression des Enzyms verbunden. Neben diesem Befund zeigte sich auch eine erhöhte Expression der SOD, jedoch ohne Veränderung der enzymatischen Gesamtaktivität. Sowohl die iNOS-Aktivität, als auch die Expression sank dabei *in vitro* nach Insulinstimulation. Man vermutet hierbei eine direkte Verknüpfung zwischen der Rezeptorwirkung durch Insulin und der iNOS-Expression via PI3K (Madar et al. 2005). Musso et al. zeigten, dass bei NAFLD-Patienten mit Insulinresistenz als Folge des vermehrt ausgesetzten Stresses deutlich höhere Konzentrationen an Nitrotyrosinen, also Verbindungen die durch den Angriff von NO oder NO-Derivaten, wie den RNS, modifiziert worden sind, zu finden sind. Bei Patienten ohne NAFLD aber mit bestehender Insulinresistenz waren die Level der Nitrotyrosine deutlich niedriger. Dies scheint die pathologische Bedeutung der Lipidablagerung in der Leber bei der NAFLD nochmals zu verdeutlichen (Musso et al. 2007).

Aus diesen beiden Darstellungen ergibt sich die Frage, ob die Veränderung der Expression der iNOS als Effekt oder als Adaptationsmechanismus der metabolischen Störung aufzufassen ist. Hemmt man die Bildung von NO durch Inhibitoren der NOS in der Ratte, so zeigt sich eine erhöhte Konzentration von Triglyceriden und Cholesterol im Serum. Dies kann durch eine eingeschränkte Veresterung von Fettsäuren im Fettgewebe, aber auch durch den NO-Mangel blockierte β -Oxidation von freien Fettsäuren bedingt sein. Durch die Inhibition der NO-Bildung konnte eine verminderte Aktivität der Carnitinpalmitoyltransferase, CPT, ein Enzym, das als Shuttle zwischen Cytosol und Mitochondrien wirkt und Fettsäuren für die β -Oxidation in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert, nachgewiesen werden (Goto et al. 1999). Schild et al. zeigten *in vivo* den Einfluss der eNOS bei der Entwicklung einer Steatose, indem sie durch knockout die Bildung von NO über diese Variante des Enzyms inhibierten. Sie zeigten, dass in den eNOS-KO-Mäusen eine höhere Aktivität der Citratsynthase in Relation zur Aktivität von Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette vorlag. Die Anhäufung von Citrat kann eine Stimulation der Acetyl-

CoA – Bildung durch die ATP-abhängige Citratlyase, einem Schlüsselenzym der de novo Lipogenese, bewirken. Demnach kann die Fettsäuresynthese durch eine gesteigerte Bildung von Citrat in den Mitochondrien stimuliert werden. Zudem zeigten die Mitochondrien der KO-Mäuse eine verminderte Aktivität von Komplex I und Komplex III (Schild et al. 2008).

1.4 Cardiolipin

Im Jahr 1941 entdeckte die britische Wissenschaftlerin Mary C. Pangborn ein neuartiges Phospholipid, welches sie aus Herzen von Rindern gewann. Sie nannte es auf Grund der Herkunft und der chemischen Struktur Cardiolipin, ein „Herzfett“, das in den Jahrzehnten nach seiner Entdeckung zu einem zentralen Objekt für die Untersuchung für diverse Vorgänge in Zellen z.B. Apoptose über Zellatmung, bis hin zur Stabilisierung von Transkriptionsvorgängen im Zellkern, werden sollte. Man findet es in allen eukaryotischen Zelltypen und in mit Mitochondrien ausgestatteten Prokaryonten als Bestandteil der inneren Membran der Mitochondrien.

Strukturell ist das Cardiolipin eine Besonderheit. Es gehört zur Gruppe der Phospholipide und hat eine dimere Struktur. Als Rückgrat findet man eine Glycerolgruppe. Über zwei Phosphatidylgruppen sind jeweils zwei Fettsäurereste gebunden (Schlame et al. 2000; Abbildung 1.1). Untersuchungen an unterschiedlichen Zelltypen, sowohl eukaryotischer, als auch prokaryotischer Herkunft, zeigten Unterschiede in den an die Phosphatidylgruppen gebundenen Fettsäuren. So findet man in den Mitochondrien von Rinderherzen, aber auch in den Herzen von Ratten einen sehr hohen Anteil an Linolsäure mit einem großen Anteil des Tetralinoleylcardiolipins (TLCL) von etwa 48 %. Einen weit höheren Anteil dieser doppelt ungesättigten Fettsäure findet man im Cardiolipin der Rattenleber. Dort macht das TLCL einen Anteil von etwa 57 % am Gesamtcardiolipin aus. Es scheint also sowohl eine artspezifische, als auch eine organspezifische Struktur des natürlich vorkommenden Phospholipids zu geben (Schlame et al. 1991, Schlame et al. 2000).

Cardiolipin als Bestandteil der inneren mitochondrialen Membran ist wesentlich in die Funktion der Atmungskette eingebunden. Durch die Interaktion mit den Proteinen der Atmungskette kann Cardiolipin durch seine räumliche Struktur diese stabilisieren. Es vermag die komplexen und gut aufeinander abgestimmten Vorgänge von Komplex I, NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, bis hin zur F_0/F_1 -ATPase räumlich zu koordinieren und somit zur Bildung von energiereichen Phosphaten, dem Adenosintriphosphat, beizutragen. Eine Reduktion des Cardiolipinanteils in der Mitochondrienmembran führt zur Abnahme der Energiebildung durch fehlenden Aufbau eines ausreichenden Protonengradienten (Fry, Green 1981, Pfeiffer et al. 2003). Aber Cardiolipin ist auch in der Stabilisierung von Ionenkanälen in der mitochondrialen Membran eingebunden. So zeigt sich ein verminderter Transport von Adenosinnucleotiden über den ADP/ATP-Carrier bei Fehlen von Cardiolipin. Dies führt dazu, dass der über die Komplexe I bis IV aufgebaute Protonengradient

nicht bzw. nicht ausreichend zur ATP-Bildung genutzt werden kann, da die Substrate der F_0/F_1 -ATP-Synthase fehlen (Claypool et al. 2008).

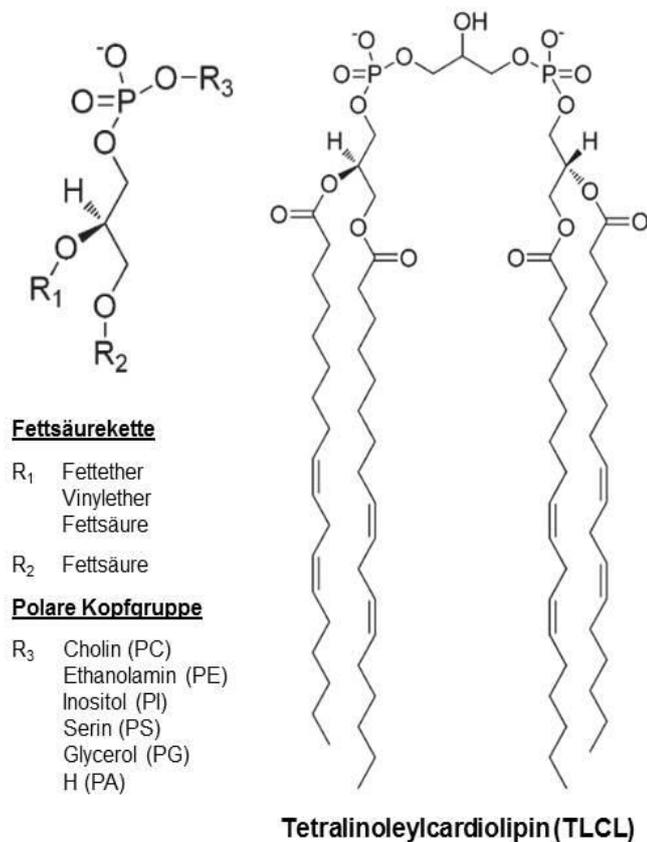


Abbildung 1.1: Darstellung der Struktur von Phospholipiden und Cardiolipin am Beispiel des Tetralinoleoyl-Cardiolipin (nach Yin et al. 2012). Phospholipide enthalten ein Glycerolrückgrat, eine polare Kopfgruppe eine hydrophobe Acylkette. Im Falle des Cardiolipins handelt es sich um ein Diphosphatidylglycerol, bei dem zwei Phosphatidylmotive an das Glycerolrückgrat gebunden sind. Über die Phosphatidylmotive können insgesamt vier Fettsäuremoleküle gebunden werden.

Zu den wichtigen membran-assoziierten ROS-Bildnern zählen die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette. Daher sind vor allem Lipide in Membranen, in Mitochondrien vornehmlich Cardiolipin, bevorzugte Zielstrukturen von oxidativen bzw. peroxidativen Veränderungen. Das Cardiolipin ist bedingt durch seinen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren für peroxidative Modifikationen sehr empfindlich. Hier spielen vor allem die einfach und besonders die mehrfach ungesättigten Vertreter eine besondere Rolle. Durch den Angriff von H_2O_2 , und O_2^- kommt es schrittweise zur Veränderung der Cardiolipinstruktur. Über eine Abspaltung eines Protons aus der Fettsäure entsteht ein Alkyradikal, welches durch Addition von Sauerstoff zu einem Peroxylradikal umgewandelt wird. Dieser instabile Komplex wird durch eine weitere Abspaltung eines Protons zu einem Hydroperoxid, welches benachbarte Fettsäuren im Rahmen einer Kettenreaktion zu weiteren Lipidperoxidationsvorgängen führen kann (Petrosillo et al. 2003, Paradies et al. 2009,

Wiswedel et al. 2010). Diese peroxidativen Vorgänge führen in der Folge zur Verminderung des Cardiolipingehaltes in den Mitochondrien und somit zu einer eingeschränkten Leistung des Atmungskomplexes, insbesondere zu einer verminderten Aktivität von Komplex I (Paradies et al. 2002). Interessanterweise kann der Verlust von Cardiolipin durch die Supplementation von antioxidativ wirksamen Enzymen, wie der Superoxiddismutase und der Catalase, verhindert und somit die Integrität des Atmungskomplexes stabilisiert werden (Paradies et al. 2000).

Eine besondere Stellung nimmt die Interaktion zwischen Cardiolipin und *Cytochrom c* (*Cytc*) ein. *Cytc* dient als Elektronenshuttle zwischen Komplex III und IV und ist unter bestimmten Bedingungen in der Lage Sauerstoff zum O_2^- zu oxidieren. Neben der Eigenschaft der Elektronenübertragung spielt *Cytc* in der Induktion der intrinsischen Apoptose eine bedeutende Rolle. Das Wechselspiel mit Cardiolipin scheint sowohl für die Funktionsweise der Atmungskette, als auch für die Induktion des programmierten Zelltodes wichtig zu sein. Die chemische Interaktion der beiden Partner hängt dabei vom Oxidationszustand des *Cytc* ab. Oxidiertes *Cytc* scheint als sogenannte „loose bond fraction“ die Bindung zum Cardiolipin zu verlieren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in der Oxidase-, bzw. Peroxidaseform das zu vermehrter Bildung von O_2^- und zu stärkerer Induktion der Apoptose führen kann. Liegt es jedoch in reduzierter Form vor, so scheint die Wechselbeziehung zum Cardiolipin deutlich gestärkt zu sein und die Bildung von O_2^- und die Induktion von Apoptose nehmen ab. Cardiolipin scheint also in diesem Zusammenhang als Wechselspieler von zwischen oxidiertem und reduziertem, bzw. von Oxidase-/Peroxidasefunktion und Reduktasefunktion von *Cytc*, zu wirken (Basova et al. 2007).

Bei metabolischen Störungen, wie Diabetes mellitus und NAFLD, werden strukturelle Veränderungen, d.h. veränderten Fettsäurekonstellationen, im Cardiolipin beschrieben. Ferreira et al. zeigten in einem *in vivo* – Modell, dass durch die Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotocin eine höhere Gesamtmasse an Cardiolipin in der Leber zu finden ist. Dieser Effekt könnte als Adaptationsvorgang bedingt durch mitochondriale Funktionsstörungen gesehen werden und somit als Schutzmechanismus gegen erhöhte radikalische Veränderungen in den Mitochondrien aufgefasst werden (Ferreira et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigt sich im Myokard von diabetischen Mäusen ein erniedrigter Cardiolipinanteil ohne Veränderung der Fettsäurekomposition. Es wird angenommen, dass dies eine Folge der mitochondrialen Dysfunktion oder eines gestörten Ab- und Umbauprozesses des Cardiolipins ist (Han et al. 2005). Aber auch Störungen des Lipidhaushaltes führen zu Alterationen. Petrosillo et al. konnten dies in einer *in vivo* – Studie zeigen. Sie induzierten in Wistar-Ratten mittels Cholin-defizienter Diät eine Steatose und untersuchten die Wirkung der Fettleber auf mitochondriale Funktion und Veränderungen des Cardiolipins. Es konnte gezeigt werden, dass die Leistung von Komplex I durch die Steatose deutlich abgenommen und zu einer Anpassung des mitochondrialen oxidativen Stoffwechsels geführt hat. Dies führte dazu, dass vermehrt H_2O_2 entstanden ist und durch

radikalischen Angriff auf das vulnerable Cardiolipin zu einer gesteigerten Peroxidation geführt hat. Durch diese Veränderung des Cardiolipins entstand eine weitere Reduktion der Leistung der Atmungskette. Durch Zugabe von unverändertem Cardiolipin war dieser Zustand partiell reversibel (Petrosillo et al. 2007). Aus diesen Ergebnissen scheint die Bedeutung des Cardiolipins, sowohl bei struktureller Veränderung, als auch bei veränderter Funktion von besonderem Interesse zu sein.

1.5 Isoprostane als Marker für zellulären oxidativen Stress

Isoprostane sind Arachidonsäurederivate, die bei oxidativem Stress entstehen können. Ihre chemische Struktur ähnelt denen der Prostaglandine. Sie weisen drei Hydroxylgruppen, zwei Doppelbindungen und jeweils eine *cis*-Prostanringhydroxylgruppe auf. Isoprostane liegen vorwiegend in Esterbindungen mit Phospholipiden in Membranen *in vivo* vor. Die Freisetzung der Isoprostane erfolgt enzymkatalysiert über die Phospholipase A₂ (PLA₂) (Morrow et al. 1992). Durch Blockade der Cyclooxygenasen, ein Enzymsystem, welches zum Beispiel bei Entzündungsprozessen die Bildung von Prostaglandinen als Botenstoffe aus Arachidonsäuren übernimmt, konnte gezeigt werden, dass der Bildungsprozess dieser Arachidonsäurederivate enzymunabhängig und nur durch Reaktion mit Radikalen an Membranen stattfindet (Morrow et al. 1990). Die Bildung der Isoprostane geht einer radikalischen Peroxidation von Arachidonsäure voraus. Beim Angriff durch ein Radikal entstehen insgesamt drei Arachidonsäureradikale, welche in Folge von Ladungsverschiebungen eine Endozyklisierung erfahren und vier sogenannte Prostaglandin H₂- ähnliche Regioisomere bilden. Durch Reduktion der Isomere entstehen in der Folge F-Ring-Isomere, die auf Grund der Ähnlichkeit zum Prostaglandin F_{2α} auch als F₂-Isoprostane bezeichnet werden (Roberts, Morrow 2000; Abbildung 1.2).

Isoprostane sind nicht nur Produkte von radikalischen Angriffen in Zellen. Sie besitzen auch biologische Aktivität als Signalmoleküle. So konnte gezeigt werden, dass es nach Inkubation von hepatischen Sternzellen mit F_{2a}-Isoprostanen über Aktivierung der Zellteilung von Sternzellen und Steigerung der Kollagenproduktion zur Fibrose kommen kann (Comporti et al. 2005). Zudem können Isoprostane durch Bindung an den Rezeptor für Thromboxan A₂ (TXA₂) zur Aktivierung von Endothelzellen und somit zur Konstriktion von Gefäßen führen (Audoly et al. 2000). Diese beiden Effekte werden aktuell bei der Entstehung des Zirrhose-induzierten hepato – renalen Syndroms diskutiert.

Die vermehrte Bildung dieser autoxidativ veränderten Lipide korreliert auch mit dem Alter. So scheint es *per se* entweder eine eingeschränkte Kapazität der Entgiftung von Radikalen, oder aber einen verminderten Abbau von zytosolisch wirkenden ROS zu geben. Dieser Zusammenhang konnte bis dato nicht endgültig geklärt werden (Ward et al. 2005). Die mit dem Alter zunehmenden Erkrankungen des Menschen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK), sind mit einer erhöhten

oxidativen Schädigung verschiedener Organsysteme verbunden. So konnte die Gruppe um Schwedhelm et al. an einer Kohorte mit KHK eine deutlich erhöhte Konzentration von Isoprostanen im Serum feststellen. Es wurde geschlussfolgert, dass die Konzentration der Isoprostane im Serum ein relevanter Biomarker als Maß für systemischen oxidativen Stresses bei KHK ist (Schwedhelm et al. 2004).

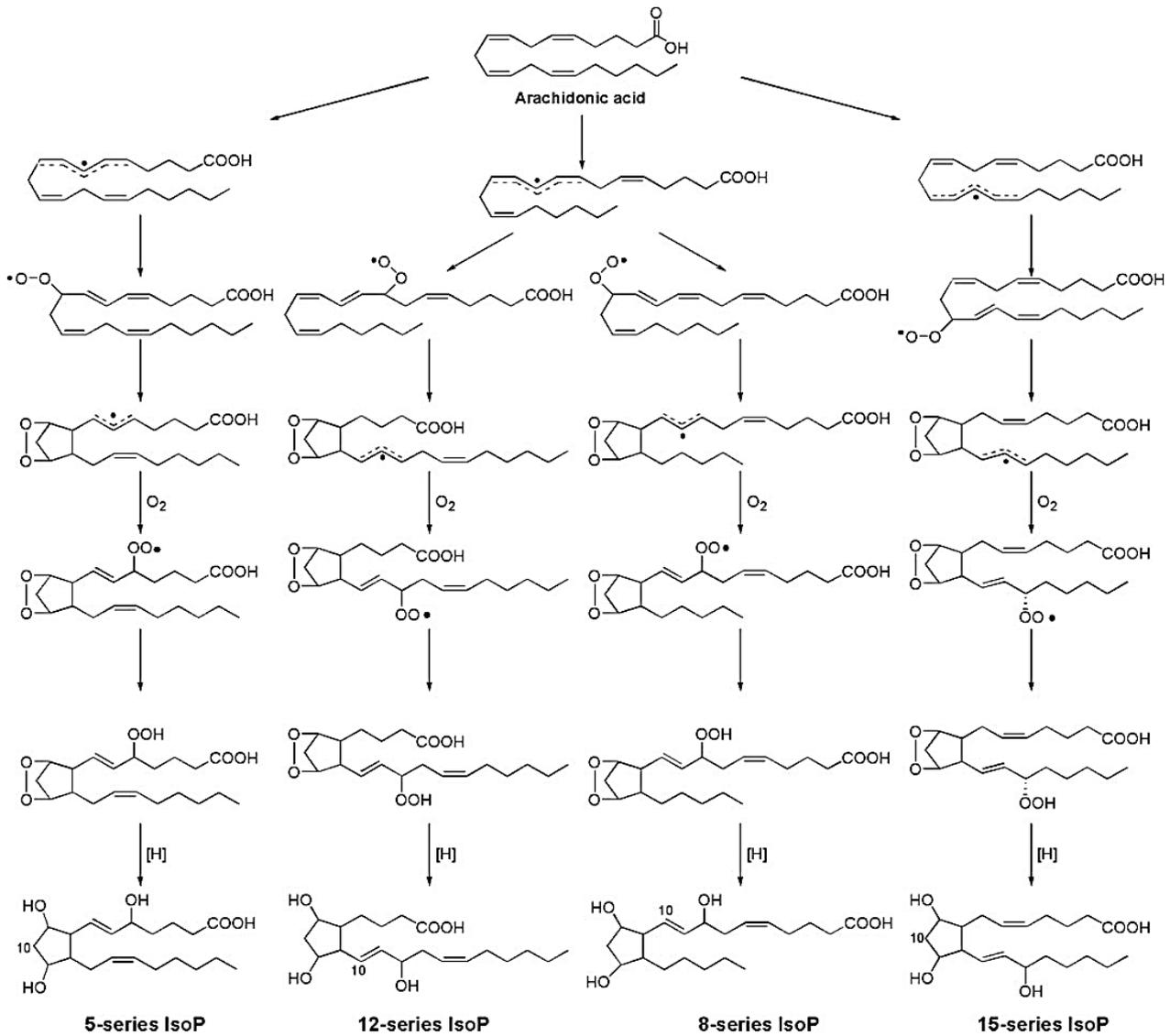


Abbildung 1.2: Bildung von F₂-Isoprostanen durch Radikal-vermittelte Peroxidation von Arachidonsäure (nach Roberts, Morrow 2000). Durch Angriff von ROS an Arachidonsäure entstehen zunächst drei Arachidonylradikale, die durch Endozyklisierung vier Prostaglandin H-ähnliche Intermediate bilden. Diese werden zu F-Ringregioisomeren reduziert, die eine isomere Struktur zum Prostaglandin F_{2α} aufweisen. Die Regioisomere werden als Serien in Abhängigkeit des Kohlenstoffatoms, an dem die Hydroxylgruppe gebunden ist, bezeichnet. Die Bezeichnung erfolgt nach der Nomenklatur für Isoprostane des *Eicosanoid Nomenclature Committee*.

Auch bei metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ II, wurden eindeutige Hinweise für die Wichtigkeit von zellulären oxidativen Schädigungsprozessen gefunden. In einer Patientenstudie, in der sowohl gesunde Probanden, als auch Diabetiker auf die Konzentration von

Isoprostanen im Serum untersucht worden sind, zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration der Arachidonsäurederivate im Blut der Diabetiker im Vergleich zu gesunden Probanden als Ausdruck eines vermehrten Schädigungsprozesses (Gopaul et al. 1995). In dieser Studie wurde der Stellenwert der nicht-enzymatischen Bildung von Isoprostanen herausgestellt, da unter der Medikation mit COX-Inhibitoren kein sichtbarer Effekt nachzuweisen war. In einer nachfolgenden Studie von Davi et al. zeigte sich eine Korrelation zwischen den Konzentrationen der Blutglukose und Isoprostanen. Man postulierte hieraus eine mögliche Verbindung zwischen einer eingeschränkten Insulinsignaltransduktion, der Insulinresistenz, und einer vermehrten oxidativen Schädigung auf zellulärem Niveau (Davi et al. 1999). In Verbindung mit dem Diabetes mellitus, einer gestörten Glukosehomöostase und einer Hyperlipidämie wird auch die NAFLD gebracht. Zahlreiche Studien zeigen, dass die NAFLD mit einem vermehrten oxidativen Stress und langsam nachlassenden antioxidativen Kapazitäten einhergehen kann. So zeigen sich an Leberbiopsaten von Patienten mit NAFLD deutlich erhöhte Lipidperoxidationsprodukte, wie 4-Hydroxynonenal (HNE) (Seki et al. 2002) oder Malondialdehyd (MDA) (Yesilova et al. 2005). Diese Produkte zeigen, dass es bei der Überladung der Hepatozyten mit Lipiden, insbesondere mit Triglyceriden, zu verstärkten oxidativen Schädigungen kommt. Dies wird durch die Untersuchung von Konishi et al. und Zhu et al. bestärkt (Konishi et al. 2006, Zhu et al. 2008). Sie zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Maß der Serumisoprostane und dem BMI beim Menschen.

1.6 *Gynostemma pentaphyllum*

G. pentaphyllum (GP) ist eine Pflanze, die bevorzugt in Regionen von Südchina, Taiwan, Korea und Vietnam zu finden ist. Sie gehört zur Familie der Kürbisgewächse (Curcubitaceae) und wird in der traditionellen fernöstlichen Medizin schon Jahrhunderte lang als Heilpflanze eingesetzt. Die Blätter dieser Pflanze werden entweder frisch als Salat oder getrocknet als Tee verwendet. Zu den biologisch wirksamen Hauptkomponenten gehören *Saponine*, oder auch angelehnt an den Namen *Gypenoside*. Ihre chemische Struktur ähnelt der von Steroidhormonen. In massenspektrometrischen Analysen konnten bisher mehr als 90 einzelne *Gypenoside* nachgewiesen werden (Cui et al. 1999, Kao et al. 2008). Neben diesen steroidähnlichen Substanzen werden auch Mineralverbindungen, wie Arsen-, Kupfer- oder Selensalze (Wang et al. 2012) und diverse Polysaccharide (Chi et al. 2012) für die Entstehung von Effekten durch *G. pentaphyllum* angesehen.

Eine der meist untersuchten Wirkungen ist ein antiproliferativer und damit tumorwachstumshemmender Effekt *in vitro*. So konnten Lu et al. nachweisen, dass unter dem Einfluss eines Extraktes aus *G. pentaphyllum* die Migration und Invasion von SAS-Zellen durch die Inhibition von NF κ B, Cyclooxygenase-2 (COX2) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs), sowie durch Beeinflussung von Erk1/2-Signaltransduktionswegen die Progression dieses Tumors unterbinden konnten und somit einen protektiven Effekt haben (Lu et al. 2011). Auch nicht-solide

Tumoren, wie Leukämien, scheinen auf *Gypenoside* zu reagieren. Hsu et al. zeigten in ihrer Arbeit in WEHI-3-Zellen, dass durch bestimmte Gypenosoidfraktionen apoptoseresistente Leukämiezelllinien durch Steigerung der Expression von pro-apoptotischen Proteinen, wie Bax, und verminderter Expression von anti-apoptotischen Boten, wie Bcl-2, zu einer vermehrten Freisetzung von *Cytc* führt. Diese Dysbalance kann zu einer verstärkten intrinsischen Apoptose führen. Neben dieser Komponente zeigten die Autoren ebenfalls eine regulatorische Rolle von *Gypenosiden* auf den Zellzyklus. Die Behandlung der Leukämiezellen mit *Gypenosiden* führte zu einem Arrest des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase (Hsu et al. 2011).

Neben den proliferationshemmenden und tumorsuppressiven Eigenschaften stehen auch Wirkungen auf antioxidative Systeme und den Metabolismus von Zuckern und Lipiden im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. *Gypenoside* zeigen die Möglichkeit, *in vitro* erzeugte Radikale abzufangen und somit zur Entgiftung dieser toxischen Moleküle beizutragen (Xie et al. 2010). Ebenso vermögen sie es, die bestehenden antioxidativen Scavengersysteme von Zellen positiv zu beeinflussen. Schild et al. konnten positive Effekte von *Gynostemma pentaphyllum* in einem Hypoxie/Hypoglykämie-Modell an Hippocampus-Schnitten nachweisen. Unter dem Einfluss von *Gypenosiden* in Hippocampusschnitten, die durch eine Deprivation von Sauerstoff und Glukose Stress ausgesetzt worden waren, bewirkte ein Extrakt aus *GP* eine Steigerung der Expression der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) und Glutathionperoxidase. Somit konnte die Konzentration von Sauerstoffradikalen, wie dem H₂O₂, auf einem niedrigen Level gehalten werden (Schild et al. 2012). Ähnliche Effekte konnten durch Shang et al. und Wang et al. gezeigt werden, indem sie in neuronalen Systemen eine Verminderung der Glutathiondepletion, Verstärkung der Glutathionbildung und eine Expressionssteigerung der Mn-SOD belegen konnten (Shang et al. 2006, Wang et al. 2010).

Die Arbeitsgruppe um Norberg war die erste, welche die möglichen Effekte von *Gypenosiden* auf den Metabolismus, insbesondere die Wirkung auf die Insulinsekretion und -wirkung *in vitro* untersuchten. Sie konnten zeigen, dass β -Zellen des Pankreas von Wistar-Ratten in Gegenwart von *GP* mehr Insulin ausgeschüttet haben. Dies führte *in vivo* zu einer effektiven Senkung des Blutzuckers in Phasen der Hyperglykämie (Norberg et al. 2004, Hoa et al. 2007). In der Folge dieser beiden Arbeiten hat sich das Spektrum der potentiellen Einflüsse von *G. pentaphyllum* stark erweitert. So zeigten sich deutliche Zeichen, dass *Gypenoside* auch eine *in vivo*-induzierte Hyperlipidämie günstig beeinflussen können. In zwei Studien von Megalli et al. an ZDF-Ratten und Sprague-Dawley-Ratten wurde *G. pentaphyllum* dem Futter zugesetzt. Insbesondere Serumtriglyceride und Serumcholesterol, tendenziell auch LDL-Cholesterol konnten durch den Zusatz vermindert werden (Megalli et al. 2005, Megalli et al. 2006).

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die NAFLD ist vor allem in industrialisierten, westlichen Nationen ein zunehmendes medizinisches und volkswirtschaftliches Problem, da es mit der Entstehung von entzündlichen Leberveränderungen und der Bildung einer Leberzirrhose verbunden ist. Sie ist neben hepatischen Veränderungen auch mit einer Erhöhung von Triglyceriden und des Cholesterols im Serum verbunden. In der Folge der NAFLD kann es zu einer Insulinresistenz und der Entwicklung von Diabetes mellitus kommen, die weitreichende Veränderungen unter anderem des Herz-Kreislauf-Systems bedingen können. Trotz intensiver Forschung zur Pathogenese dieser Erkrankung sind viele Fragen offen. Insbesondere die Rolle von speziellen Fettsäuren bei der Bildung von Lipidakkumulaten in Hepatozyten und deren schädigende Eigenschaften durch oxidativen Stress wird kontrovers diskutiert. Die Effekte von freien Fettsäuren auf die Leber bei Patienten mit Diabetes mellitus, bzw. einer bestehenden Insulinresistenz und deren pathogenetische Bedeutung für die Entwicklung einer NAFLD sind nicht eindeutig geklärt. Vor allem die Kombination aus Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und einer Erhöhung der freien Fettsäuren stellen für die Entwicklung von hepatischen Schäden im Rahmen einer Insulinresistenz und NAFLD ein bisher noch unvollständiges Bild dar. Auch therapeutisch bleiben neben diätetischen Ansätzen nur wenige pharmakologische Optionen, wie die Gabe von Statinen oder Fibraten, um die für das Gefäßsystem toxisch wirkenden Triglyceride und das LDL-Cholesterol zu senken. Es gibt Berichte einer phytomedizinisch-basierten Therapie mit *G. pentaphyllum*, die sowohl beim Menschen, als auch im Tiermodell hinsichtlich einer Schädigung im Rahmen von Stoffwechselveränderungen protektive Resultate zeigen.

Um die Effekte von Fettsäuren mit unterschiedlichem Charakter unter der Bedingung von unphysiologisch hohen Glukose- und Insulinkonzentrationen als Charakteristikum der Insulinresistenz auf die Ausbildung von Lipidakkumulaten und den damit verbundenen zellulären Prozessen zu untersuchen, wurden primäre Hepatozytenkulturen der Wistar – Ratte genutzt. Für die experimentellen Untersuchungen erfolgte die Behandlung der Hepatozyten mit einem Vertreter der gesättigten Fettsäuren, Palmitinsäure, und einem Vertreter der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Linolsäure. Linolsäure ist eine essentielle Fettsäure und kann vom menschlichen Körper nicht selbst synthetisiert werden. Die Auswahl der Fettsäuren wurde bewusst gewählt und musste auf Grund der ausführlichen experimentellen Untersuchungen beschränkt bleiben.

Ziel der Arbeit ist es, das Potential der Fettsäuren Palmitin- und Linolsäure bezüglich der Lipidakkumulation und der oxidativen Schädigung unter der Bedingung einer unphysiologisch hohen Glukose- und Insulinkonzentration an primären Hepatozytenkulturen zu untersuchen: Dabei werden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Welchen Einfluss haben freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren auf die Viabilität von primären Hepatozytenkulturen in Gegenwart von hohen Glukose- und Insulinkonzentrationen?
- 2) Lösen freie Fettsäuren am Beispiel von Palmitin- und Linolsäure unter diesen Bedingungen oxidativen Stress in primären Hepatozytenkulturen aus?
- 3) Wird das Phospholipid Cardiolipin in Menge, Oxidationsgrad und Speziesverteilung durch freie Fettsäuren verändert?
- 4) Übt *G. pentaphyllum* in Gegenwart von hohen Glukose- und Insulinkonzentrationen und den gewählten freien Fettsäuren einen protektiven Effekt auf die Viabilität und oxidativen Stress aus?

2 Materialien und Methoden

2.1 Präparation der Hepatozyten und Zellkultivierung

Für die Hepatozytenpräparation wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 180 – 250 g genutzt. Es wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten, wobei die Tag-Phase von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr dauerte. Die Temperatur betrug im Tierstall $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, bei einer Luftfeuchtigkeit von $60\% \pm 5\%$. Die Versuchstiere erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien des nationalen Gesetzes über die Verwendung von Versuchstieren unter dem Aktenzeichen AZ: 42502-2-912 UniMD durchgeführt.

Vor der Präparation wurde jeweils ein Versuchstier 2 Stunden vor dem Versuch von der Gruppe separiert. Es wurde erneut gewogen und die Narkose dem Gewicht angepasst. Zur Narkose wurde Chloralhydrat verwendet, das in einer Konzentration von 1 ml/100 g intraperitoneal gespritzt wurde. Das Versuchstier wurde auf einer Kunststoffplatte fixiert und durch Setzen eines adäquaten Schmerzreizes an der Hinterpfote des Tieres die Tiefe der Narkose überprüft. Bei ausreichend tiefer Narkotisierung wurde mit der Präparation begonnen. Die Methodik von Segelen diente als Grundlage für die Gewinnung der Hepatozyten (Seglen, 1973). Es erfolgte eine mediane Laparotomie mit Ausweitung des Schnittes nach inguinal, so dass der intraperitoneale Bauchsitus für die weiteren Präparationsschritte einzusehen war. Das Colon und die Dünndarmschlingen wurden sanft zur Seite gesetzt und mittels angefeuchteten Stieltupfer dort belassen, so dass sich die Sicht auf Leber, V. cava inferior und V. portae ergab. Eine schematische Darstellung der Präparationsanordnung zur Kollagenaseperfusion ist in Abbildung 2.1 gegeben. Zunächst wurde die V. portae mittels einer gebogenen, anatomischen Pinzette aufgeladen und mit weißem Sterngarn markiert. Es erfolgte die Markierung der V. cava inferior auf gleiche Art und Weise. Nachdem beide Venen für die weiteren Präparationsschritte markiert wurden, erfolgte die Kanülierung und Fixierung der V. portae mit einer Dauerverweilkanüle der Stärke 16 G (Braun, Melsungen Deutschland). Es wurde umgehend mit der Präperfusion der Leber begonnen. Die Lösungen für Präperfusion und Perfusion, sowie das Zellkulturmedium wurden zuvor mit Carbogen begast und steril filtriert. Im folgenden Schritt wurde die V. cave inferior unterhalb des Zuflusses der V. renalis längs eröffnet, so dass die infundierte Präperfusionslösung retrograd abfließen konnte. Es zeigte sich anfangs eine leichte Schwellung der Leber, die nach einigen Sekunden jedoch wieder abnahm. Nach Normalisierung der äußeren Form der Leber wurde die V. cava inferior mit einer Dauerverweilkanüle der Stärke 18 G (Braun, Melsungen Deutschland) kanüliert und die Verweilkanüle eingebunden. Nach 10-12 min wurde die Perfusion der Leber mit der Präperfusionslösung beendet und es schloss sich die Perfusion mit der Kollagenase-haltigen Perfusionslösung an. Dazu wurde die noch vorhandene Präperfusionslösung aus dem Vorratsgefäß abgesaugt und durch die Perfusionslösung ersetzt. Es erfolgte durch das Auffangen

der Perfusionslösung über die V. cava inferior eine Autotransfusion der Perfusionslösung, in dem an der 18G-Dauerverweilkanüle ein abgetrennter Infusionsschlauch (Braun, Melsungen Deutschland) angebracht wurde. Es zeigte sich eine Veränderung von äußerer Form und Konsistenz der Leber.

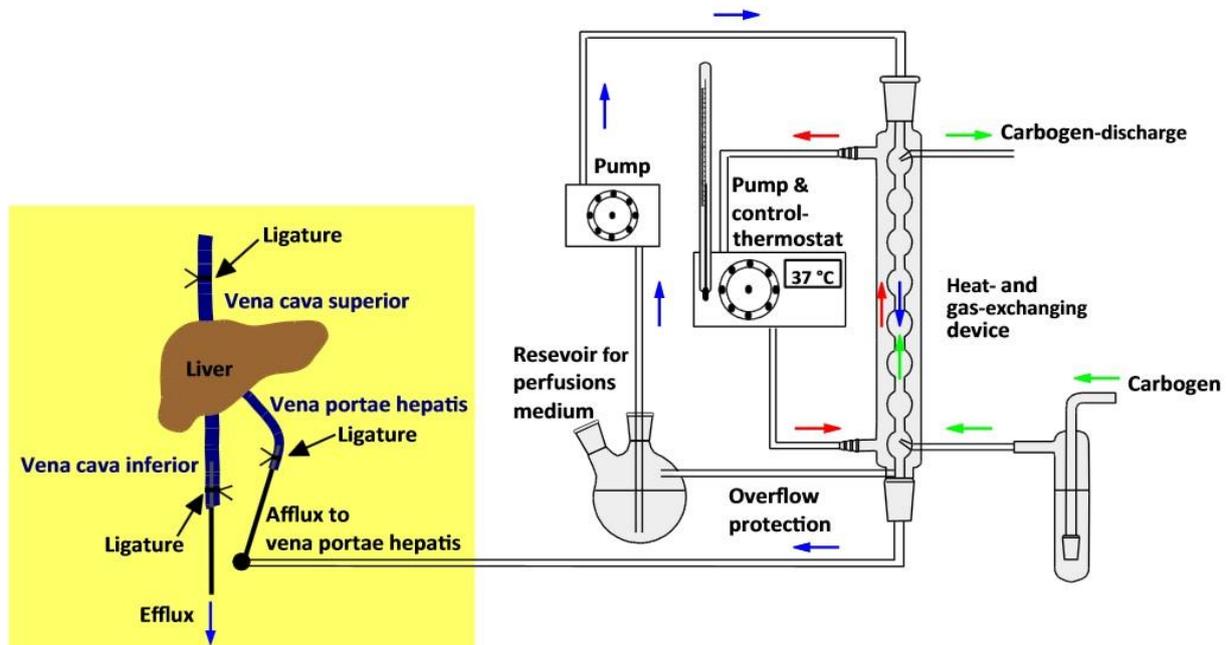


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Apparatur für die Kollagenaseperfusion (nach Martens et al. 2015). Über eine Rotorpumpe wurde sowohl das Präperfusions-, als auch das Perfusionsmedium über ein Schlauchsystem in einen Oxygenator gepumpt. Der Oxygenator bestand aus einem doppelwandigen Glasgefäß. In den Zwischenraum der Glaswände wurde zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur der Medien 37 °C warmes Wasser geleitet. Durch ein Gegenstromprinzip wurden die Medien durch Carbogenbegasung suffizient mit Sauerstoff angereichert. (Für die weiteren Präparationsschritte siehe 2.1)

Nach 5-7 min wurde der Verdau der Leber mit einer gebogenen anatomischen Pinzette überprüft. Durch leichten Druck der Pinzettenblätter auf die Leberkapsel zeigte sich bei ausreichendem Verdau der Leber eine bleibende Einsenkung der Pinzettenblätter. Die Perfusion wurde dann beendet. Vorsichtig wurde die Leber aus dem Bauchsitus genommen und in auf 37 °C erwärmtes Zellkulturmedium ohne Zusätze gegeben. Durch Eröffnung der Leberkapsel mit einem Skalpell (Aesculap, Tuttlingen Deutschland) konnten die von der Kollagenmatrix gelösten Hepatozyten durch vorsichtiges Ausschütteln der Leber entnommen werden. Es erfolgte eine Filtrierung des trüben Zellkulturmediums durch einen Filter mit der Maschenweite von 50 µm. Das filtrierte Medium wurde auf zwei runde Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4 °C für 4 Minuten bei 400 U/min (Universal 320R, Rotor 1494, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Zellkulturmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 500 U/min (Universal 320R, Rotor 1494, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) über 4 min. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in nur noch ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Die

Zellsuspension wurde erneut bei 4 °C und 500 U/min (Universal 320R, Rotor 1494, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) über 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml Zellkulturmedium und 49,5 ml der Percoll-Gradienten-Lösung aufgenommen. Hierbei wurde die Methodik nach Dalet entsprechend angepasst (Dalet *et al*, 1982). Es schloss sich eine Zentrifugation bei 4 °C und 2200 U/min (Universal 320R, Rotor 1494, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) über 5 min an. Durch diese Zentrifugation wurde eine Aufreinigung der Hepatozyten durch Separation von anderen zellulären Bestandteilen der Leber und eine Entfernung von abgestorbenen Hepatozyten erreicht. Im Anschluss wurde erneut der Überstand verworfen und das übrig gebliebene Zellpellet nochmals in Zellkulturmedium aufgenommen.

Mittels NEUBAUER-Zählkammer wurde die Zelldichte ermittelt und das Gesamtvolumen für eine Dichte von 1×10^6 Hepatozyten/ml Zellkulturmedium eingestellt. Die Hepatozyten wurden unter der sterilen Werkbank auf mit Kollagen beschichtete Zellkulturschalen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät und mit 2 ml Zellkulturmedien überschichtet. Das erste Zellkulturmedium enthielt BSA (0,2 %), Hepes (15 mM), NaHCO_3 (17,9 mM), Penicillin/Streptomycin (1 %), Glukose (10 mM) und Insulin (10^{-7} M) und wird in der Folge als Kontrolle bezeichnet. Für die Untersuchung der Wirkungen von Palmitin- und Linolsäure wurden diesem Medium 100 µM der Fettsäuren zugesetzt. Sie wurden zuvor in einer Stammkonzentration von 1 mM in Ethanol gelöst. Für die Effektuntersuchungen des ethanolischen Extraktes aus *G. pentaphyllum* wurde dem ursprünglichen Zellkulturmedium der ethanolische Extrakt in aufsteigender Konzentration (100 µg/ml = GP20, 200 µg/ml = GP 40, 300 µg/ml = GP60) zugesetzt. Die Zellkulturen wurden nun für die ersten 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und einer Gasatmosphäre von 78 % N_2 , 17 % O_2 und 5 % CO_2 kultiviert.

Nach 4 h der Inkubation erfolgten die ersten Messreihen und der erste Wechsel des Zellkulturmediums. Da die Adhärenz der Zellen an der Kollagenmatrix nach 4 Stunden nicht ausreichend stark ist, wurde in diesem Schritt vom Spülen der Platten abgesehen. Das Medium wurde durch leichtes Schräghalten der Zellkulturschalen abgesaugt und durch auf 37 °C temperiertes Zellkulturmedium (3 ml) ersetzt. Die behandelten Zellen sind erneut unter oben beschriebenen Bedingungen für 20 h in den Inkubator gegeben worden. Nach dieser Zeit erfolgte die Entnahme von einem Teil der Hepatozyten für die zweite Messreihe. Es erfolgte ein erneuter Mediumwechsel nach oben genanntem Schema. Die Adhärenz der Hepatozyten war nun ausreichend. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1 ml des auf 37 °C erwärmten Waschpuffers. Im Anschluss wurden erneut 2 ml Zellkulturmedium über die Hepatozyten geschichtet und für weitere 24 h inkubiert. Am letzten Tag nach 48 h Gesamtzeit, erfolgten die letzten Messreihen.

2.2 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry (LOWRY *et al*, 1951) basiert auf einer zweigeteilten Reaktion. Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion, in der ein Komplex zwischen Peptidbindung und Kupfer-II-Ionen in einem alkalischen Milieu gebildet wird, welcher eine blau-violette Färbung aufweist. In der zweiten Reaktion wird dieser Komplex durch das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz, das aus Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren besteht, reduziert. Die aus dieser Reaktion entstehende Blaufärbung dient zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration in der biologischen Probe. Diese Methode wurde gewählt, da sie auch für geringe Proteinkonzentrationen sensibel genug ist.

Für die Vorbereitung der Proben wurde das Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abgesaugt und die Zellen zweimalig mit 2,5 ml kaltem PBS gespült, so dass nur adhärente Zellen für die Messung genutzt werden konnten. Den Hepatozyten wurden 500 µl SDS (0,1 M NaOH/1 % SDS) hinzugefügt und die Zellen von der Kollagenmatrix mit einem Zellschaber abgeschabt. Das gesamte Volumen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 10 000 U/min für 30 sec (Centrifuge 5403, Rotor 16A4-44, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Aus den zentrifugierten Proben wurden 20 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Proteinlösung C für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl des Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzugefügt und erneut für 30 min inkubiert. Es schloss sich die Messung der Absorption bei 700 nm an. Als Referenz wurde eine Kalibrierkurve mit aufsteigenden Konzentrationen von BSA (1 mg/ml, 2 mg/ml und 5 mg/ml) erstellt und auf dieser Basis der Proteingehalt der biologischen Proben errechnet. Für die Erstellung der Eichkurven wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Hepatozytenproben wurden als Triplett bestimmt. Es kamen Hepatozytenproben nach 4, 24 und 48 h zum Einsatz.

2.3 MTT-Bestimmung

Der MTT-Proliferationstest wurde 1983 erstmalig von Mosmann charakterisiert und bedient sich dabei der Aktivität von mitochondrialen und cytosolischen Dehydrogenasen lebender Zellen. Das gelbliche Tetrazoliumbromid MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) dringt dabei in vitale Zellen ein und wird durch zelluläre und mitochondriale Dehydrogenasen zum blauvioletten Formazan reduziert. Es gibt zwei Wege, auf denen das Tetrazoliumbromid reduziert werden kann. Die cytosolische Umsetzung erfolgt auf der Basis von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und ist vom Pyridinnukleotidpool abhängig, der durch die Glykolyse gespeist wird. Die mitochondriale Reduktion des Tetrazoliumbromids erfolgt durch die enzymatische Katalyse der Succinatdehydrogenase. Der MTT-Proliferationstest wurde in abgewandelter Form zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt (Musser & Oseroff, 1994). Die

inkubierten Hepatozytenkulturen wurden mit jeweils 25 µl MMT-Stammlösung (6 mg MTT/ml PBS) und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml DMSO-Gemisch (DMSO + 1 % 0,1 M NaOH) versetzt. Das DMSO bewirkt einen Aufbruch der Zellmembranen und somit die Freisetzung des blauvioletten Formazankomplexes. Durch die Zugabe von 1 % 0,1 M NaOH wird eine pH-abhängige Veränderung der Absorption verhindert. Die optische Dichte wurde im Anschluss bei 570 nm gemessen. Als Leerwert diente das DMSO-Gemisch (DMSO + 1 % 0,1 M NaOH). Die biologischen Proben wurden als Triplett bestimmt. Es kamen Hepatozytenproben nach 4, 24 und 48 h zum Einsatz.

2.4 Trypanblaufärbung

Trypanblau wurde von Paul Ehrlich 1904 zum ersten Mal synthetisiert und ist ein organischer, anionischer Diazofarbstoff, der für Vitalfärbungen von Zellen eingesetzt wird. Mit dieser Methode ist es möglich, in einer Zellkultur vitale von avitalen Zellen lichtmikroskopisch abzugrenzen und aus dem Verhältnis zwischen der Gesamtzahl der Zellen und den angefärbten Zellen die Viabilität zu bestimmen. Der Umstand, dass Trypanblau vitale Zellen nicht anfärbt, ist auf die chemische Struktur und die Semipermeabilität der Zellmembran zurückzuführen. Trypanblau ist durch seine negative Ladung nicht in der Lage, in lebende Zellen zu permeieren. Dies ist durch das aufrecht erhaltende innere Membranpotential bedingt. Für den angewandten Trypanblau-Test wurde aus der Zellkulturschale das Medium abgesaugt und zweimalig mit 1ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurde den Schalen 500 µl Trypsin zugesetzt, um die adhärenen Hepatozyten von der Kollagenmatrix zu lösen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 3 min. Nach der Inkubation wurden 500 ml PBS zugegeben. Aus dem Gesamtvolumen wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in eine NEUBAUER-Zählkammer gegeben und sofort alle Zellen ausgezählt. Nach 10 min wurden nur die blau angefärbten Zellen gezählt. Aus dem Quotienten aus den zuerst gezählten Zellen und den nach 10 min angefärbten Zellen wurde die Viabilität bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in einem Triplett. Die Analyse erfolgte aus Hepatozyten 4 h und 48 h nach der Präparation.

2.5 Nitrit-/Nitratbestimmung nach GRIESS

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein instabiles Molekül, das in biologischen Systemen schnell chemische Reaktionen eingeht und maßgeblich zur Bildung von Nitrat und Nitrit führt. Für die Analyse von gebildetem Nitrat und Nitrit in Flüssigkeiten stellt die Methode nach GRIESS eine gute Möglichkeit dar, ein äquimolares Verhältnis zum in das Zellmedium diffundierten NO zu bestimmen. Die ablaufende Reaktion ist zweigeteilt. Im ersten Schritt erfolgt die Umwandlung von Nitrat in Nitrit. Der folgende zweite Schritt umfasst die Bildung eines roten bis pinken Farbstoffes. Dabei wird durch die Reaktion des Nitrites unter sauren Bedingungen eine Kupplungsreaktion mit N-(1-

naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid in Gang gesetzt, welche zur Derivatisierung des Azofarbstoffes führt.

Für die Bestimmung des Nitritgehaltes im Zellkulturmedium wurde eine Modifikation der GRIESS-Methode nach Ding verwendet (Ding *et al*, 1988). Das Zellkulturmedium wurde vorsichtig ohne Mitnahme von zellulärer Matrix aufgenommen und sofort mit 1 ml der Griess-Reagenz versetzt. Sie enthielt zu gleichen Anteilen 1 % N-(1-naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid und 1 % Sulfanilamid in 5 %-iger Phosphorsäure. Es wurde anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 540 nm gemessen. Zur Bestimmung des Nitratgehaltes wurde eine Eichkurve mit Natriumnitrit-Standards mit aufsteigender Konzentration (0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,6 mg/ml, 4 mg/ml und 8 mg/ml) ermittelt. Die Bestimmungen für die Eichkurve erfolgten als Doppelbestimmung. Die eingesetzten Proben wurden als Triplet bestimmt. Es kamen Hepatozytenproben nach 4 und 48 h zum Einsatz.

2.6 Extraktion des Gesamtlipids nach BLIGH und DYER

Die Extraktion der Gesamtlipidfraktion aus den Hepatozyten erfolgte durch eine Phasentrennung mit Methanol und Chloroform nach der Methode von BLIGH und DYER (BLIGH & DYER, 1959). In der Kombination aus Extraktion und gravimetrischer Bestimmung wurde der gesamte Lipidpool der inkubierten Zellen bestimmt. Die Reagenzgläser wurden vor jeder Extraktion mittels Waage auf 10^{-4} mg genau ausgewogen. Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ konservierten Hepatozyten mit Inkubationszeiten von 4 und 48 h nach Präparation wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und zum Schutz vor Oxidation mit BHT ($50\text{ }\mu\text{M}$) behandelt. $500\text{ }\mu\text{l}$ des Probengemisches wurden in eins der 12 ausgewählten Reagenzgläser überführt und mit 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform aufgefüllt. Die Reagenzgläser wurden über 20 Sekunden gevortext und 100-mal manuell geschüttelt, damit die Phasen sich gut vermengen konnten. Im Anschluss wurden die Reagenzgefäße in ein Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde das Chloroform-Methanol-Zellgemisch mit $0,4\text{ ml HCl}$ ($0,01\text{ M}$) behandelt und 100-mal per Hand durch kräftiges Schütteln vermischt. Es wurden im Anschluss 1 ml Chloroform und 1 ml Aqua destillatum hinzugefügt und erneut durch starkes Schütteln mit dem bereits vorhandenen Volumen vermischt. Zur Trennung der Phasen erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 U/min (Centrifuge 5403, Rotor 16A4-44, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min. Durch das Zentrifugieren entstand eine Phasentrennung mit einer oberen wässrigen Phase und einer unteren lipophilen Phase, in der die für die gravimetrische Messung notwendigen Lipide gelöst waren. Zwischen beiden Phasen zeigt sich eine Schicht denaturierter Proteine. Mittels einer dünnen Kanüle wurde vorsichtig die obere Phase und die Proteingrenze durchbrochen und die untere Phase abgenommen. Diese wurde in die ausgewogenen Reagenzgefäße überführt. Wichtig war dabei, keine Verunreinigungen durch die Proteingrenzschicht mitzunehmen, da es sonst zu falsch hohen Werten der Gesamtlipide gekommen wäre. Als die untere Phase komplett überführt war, erfolgte mit der oberen Phase eine

erneute Extraktion nach oben beschriebenen Prinzip und die Überführung der unteren Phase zu der ersten Unterphase in die Reagenzgefäße. Die gewonnenen Lipide wurden unter Stickstoffbegasung bei 45 °C getrocknet. Nachdem kein sichtbares Lösungsmittel mehr zu erkennen war, wurden die biologischen Proben mit Argon überschichtet. Nach dem Extraktionsverfahren wurden die Reagenzgläser erneut auf 10^{-4} mg genau gewogen und aus der Differenz der Gesamtlipidanteil der Hepatozyten bestimmt. Für alle eingesetzten Hepatozytenproben wurden jeweils Dreifachbestimmungen zu den Zeitpunkten 4 und 48 h nach der Präparation genutzt.

2.7 Bestimmung des Triglyceridanteils

Die Bestimmung des Triglyceridanteils aus den biologischen Proben erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Klinische Chemie. Jeweils 20 µl Probenmaterial wurden mittels Hitachi 912 Analysator (Bosch, Deutschland) auf den Gehalt von Triglycerid untersucht. Die Untersuchungen erfolgten ebenfalls als Triplet zu den Zeitpunkten 4 h und 48 h nach der Präparation.

2.8 Bestimmung des Cholesterolanteils

Für die Bestimmung des Cholesterolanteils der Hepatozyten wurde die Methode von GALLO (Gallo *et al.*, 1978) in modifizierter Form verwendet. Das Zellkulturmedium wurde aus den Zellkulturschalen abgesaugt und die Zellen zweimalig mit 1 ml PBS bei 37 °C gewaschen. Die Hepatozyten wurden mittels eines Zellschabers von der Kollagenmatrix abgetrennt und in 1 ml Isopropanol aufgenommen. Aus der erhaltenen Zellsuspension wurden 80 µl für die Messungen eingesetzt. Zu diesem Volumen wurden 3 ml des Cholesterolareagenz zugesetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus dem bestehenden Volumen wurde 1 ml der Lösung zur Messung des Cholesterolanteils eingesetzt. Die Absorption wurde bei 500 nm gemessen. Die Bestimmung der Cholesterolkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve aus Cholesterolstandards, die in aufsteigender Konzentration (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml) in Isopropanol gelöst wurden. Für die Ermittlung der Eichkurve erfolgten für die jeweiligen Konzentrationen Doppelbestimmungen. Die eingesetzten Proben aus den Hepatozytenkulturen wurden als Triplet bestimmt. Für die Bestimmung des zellulären Cholesterols wurden Hepatozyten 4 und 48 h nach der Präparation verwendet.

2.9 Bestimmung des Isoprostangehaltes

Die Bestimmung des Isoprostangehaltes bezieht sich auf die Summe der veresterten und nichtveresterten Isoprostane der F₂-Reihe (Wiswedel *et al.* 2002 ; Wiswedel *et al.* 2004).

Aus den Hepatozyten wurden 4 und 48 h nach der Präparation jeweils in einer Dreifachbestimmung der Gehalt an F₂-Isoprostanen ermittelt. Die bei -80 °C konservierten Proben wurden bei

Zimmertemperatur unter antioxidativem Schutz mit 1,5 µl BHT (10 mM) aufgetaut. Im nächsten Schritt schloss sich die alkalische Spaltung an. Hierzu wurden 150 µl des Hepatozytenzelllysats mit 125 µl KOH (1 M) versetzt und stark mit dem Vortexer vermenget. Die Proben wurden mit Argon überschichtet und für 30 min bei 45 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 0,01 M HCl auf pH 2 eingestellt. Die Proben wurden auf C18-Festphasensäulen gegeben (Vac 3cc 500mg, Waters Corporation, Milford USA). Die Säulen wurden dazu in einem Waschschrift mit 5 ml Ethanol und 5 ml Wasser vorbehandelt. Nach Probenaufgabe wurde dann erneut mit 10 ml Wasser und 10 ml Acetonitril/ Wasser (15/85, v/v) gespült. Die Isoprostane wurden aus den Säulen mit 5 ml n-Hexan/Ethylacetat/2-Propanol (30/65/5, v/v/v) eluiert. Die durch diesen Schritt gelösten Isoprostane wurden mit Stickstoff eingeengt. Das noch vorhandene Lösungsmittel wurde unter Argonbegasung bei 45 °C verdampft. Nachdem kein sichtbares Lösungsmittel mehr vorhanden war, wurden die biologischen Proben in 40 µl Pentafluorobenzylbromid (in 10 % Acetonitril) und 20 µl N,N-diisopropylethylamin (in 10 % Acetonitril) aufgenommen und erneut bei 45 °C für 30 min inkubiert und unter Stickstoffbegasung getrocknet. Nach der Einengung wurden die Proben in 50 µl bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid und 5 µl N,N-diisopropylethylamin aufgenommen und erneut bei 45 °C für 60 min silyliert und unter Stickstoffbegasung eingeengt. Die Proben wurden in 60 µl Isooktan mit 0,1 % bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid aufgenommen, in Probenvials überführt und mit Argon überschichtet. Die Proben wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie mittels chemischer Ionisation im negativen Modus bestimmt (DSQ/Trace GC Ultra, Thermo Fischer Scientific, Dreieich Deutschland). Zum Einsatz kam eine DB 5-MS Säule (50 m x 0,25 mm innerer Durchmesser; 0,25 µm Filmdicke; J&W Scientific, Folsom USA). Für die Probenaufgabe wurde eine initiale Temperatur von 80 °C für 2 min gewählt, die schrittweise um 30 °C/min auf eine Endtemperatur von 280 °C gesteigert wurde. Die Proben wurden für 19 min bei 280 °C belassen. Die Gesamtlaufzeit der Messung betrug 27,7 min. Die quantitative Analyse erfolgte unter der Reaktion mit Ammoniak als Reaktionsgas im Selected Ion Monitoring (SIM). Es wurde 9 α ,11 α -PGF_{2 α} als interner Standard verwendet. Für die Ermittlung der Eichkurve wurden aufsteigende Konzentrationen von 8-iso-PGF_{2 α} (50 pg/µl, 100 pg/µl und 200 pg/µl) genutzt. Sie wurden auf gleiche Art und Weise wie die biologischen Proben aufgearbeitet. Für die Angabe der Isoprostankonzentration in den biologischen Proben wurde der zuvor ermittelte Proteingehalt genutzt und die errechnete Isoprostankonzentration in Relation dazu gesetzt.

2.10 Bestimmung des Cardiolipins

Cardiolipin ist ein Phospholipid, das vornehmlich in den Mitochondrien vorkommt. Es zeichnet sich durch eine Vielfältigkeit an Fettsäureresten aus, die an den Phosphatidylresten gebunden sind. Aus den möglichen Konstellationen leitet sich ein großes Spektrum an molekularen Spezies ab. Für die Bestimmung der molekularen Cardiolipinspezies wurde die Methode von Müller et al. genutzt (Müller et al. 2010).

Die Extraktion des Cardiolipins aus den Hepatozyten beruht auf zwei Methoden. Zum einen die Lipidextraktion nach Folch (FOLCH *et al*, 1957) und die Anreicherung des Cardiolipins nach einer modifizierten Methode nach Schlame (Schlame *et al*, 1999). Für die Analyse des Cardiolipins wurden Proben 4 und 48 h nach der Präparation genutzt. Die Analysen der Proben erfolgten als Triplett. Die biologischen Proben wurden zunächst bei -80 °C konserviert und für die Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut. Durch die Zugabe von BHT wurde die Autooxidation der Lipide vermindert. Der erste Schritt für die Extraktion der Lipide beruht auf der Methode nach Folch. Es wurden 200 µl der vorhandenen Proben in ein Reagenzgefäß pipettiert und mit 200 µl Isolationsmedium aufgefüllt. Nach kurzem manuellem Schütteln wurden 4,2 ml Chloroform/Methanol (2:1) hinzugefügt und für 15 sec gevortext. Für die Phasentrennung wurden 880 µl HCl (0,01 M) hinzugefügt, gevortext und kräftig manuell geschüttelt. Die nun gut vermengten wässrigen und lipophilen Phasen wurden mittels Zentrifugation (4000 U/min über 5 min; Centrifuge 5403, Rotor 16A4-44, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) voneinander separiert. Die untere Phase wurde vorsichtig, ohne die Zwischenschicht aus Proteinen mitzunehmen, abpipettiert und in ein neues Reagenzglas überführt. Nach Einengung bei 45 °C unter Stickstoffbegasung wurden die Proben mit Argon überschichtet. In diesem ersten Schritt sind neben den Cardiolipinspezies auch andere Lipide enthalten, die nun durch die Azidifizierung vom Cardiolipin getrennt wurden. Für diesen Trennungsschritt diente die Methode nach Schlame (Schlame *et al*, 1999). Alle Lösungsmittel wurden im Eisbad gelagert. Zu den eingeeengten Proben wurden zunächst 2 ml Methanol gegeben und gevortext. In der Folge wurden 1 ml Chloroform und 1 ml HCl (0,1 M) hinzugefügt und nach jeder Volumenzugabe erneut gevortext. Die Proben mit den Lösungsmitteln wurden für 5 min im Eisbad belassen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 ml Chloroform und 1 ml HCl (0,1 M), sowie eine Ruhephase von 1 min im Eisbad. Durch diese Ruhephase zeigte sich erneut eine Phasentrennung, diesmal jedoch ohne Proteintrennschicht. Die untere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reagenzgefäß überführt, bei 45 °C unter Stickstoffbegasung getrocknet und mit Argon überschichtet. Die getrockneten Proben wurden im letzten Schritt mit 1 ml Chloroform/Methanol/Wasser (50/45/5 v/v/v) aufgenommen und gevortext. Das Cardiolipin-Lösungsmittel-Gemisch wurde durch eine PTFE-Membran (13 mm Filter, 0,2 µm PTFE – Membran) filtriert und für die Messungen in Probenvials überführt.

Für die Bestimmung des Cardiolipins und seiner Spezies wurde die HPLC-MS/MS- Technik mittels TSQ Quantum Discovery Max (Thermo Fischer Scientific, Dreieich Deutschland) im negativen Ionenelektrosprayionisationsmodus (ESI) genutzt. Die HPLC bestand aus einer Surveyor MS – Pumpe und Surveyor-Autosampler. Es wurden 10 µl des Lipidextraktes aus den Probenvials injiziert und das enthaltene Cardiolipin wurde über eine LiChroCart-Säule (125x2 mm, LiChrospher Si60; 5 µm Durchmesser, Merck, Darmstadt Deutschland) separiert. Für die Separation dienten Chloroform und ein Methanol/Wasser-Gemisch (9:1 v/v). Die hier eingesetzten Lösungsmittel enthielten 100 µl Ammoniak (25 %). Mit beiden Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen

wurde ein Gradient aufgestellt. Die ersten 0,2 min enthielt der Gradient 92 % Chloroform und 8 % Methanol/Wasser (9:1 v/v). In der Folgezeit von 0,2 bis 4,5 min wurde der Chloroformanteil schrittweise von 92 % auf 30 % reduziert und der Anteil des Methanol/Wasser-Gemisches von 8 % auf 70 % erhöht. Für die Zeit von 4,5 min bis 6 min wurde der Anteil von Chloroform von 30 % und von Methanol/Wasser von 70 % konstant gehalten. In der nächsten halben Minute wurde der Anteil des Chloroforms wieder kontinuierlich auf 92 % gesteigert und der des Methanol/Wasser auf 8 % gesenkt. Für die restliche Zeit von 6,5 min bis 11 min wurden die Konzentrationen der Lösungsmittel erneut konstant gehalten. Die Flussrate der Lösungsmittel betrug 300 µl/min. Das Eluat in der Zeit zwischen 0,3 min und 6 min wurde in das Massenspektrometer eingespritzt. Als Verneblergas diente hierbei Stickstoff, als Kollisionsgas Argon unter einem Druck von 1,5 mTorr. Die angelegte Spannung betrug 3,5 kV, die Kapillarentemperatur wurde auf 375 °C fixiert. Die Tochterfragmente des Cardiolipins wurden mit einer Kollisionsenergie von 36 eV generiert. Die Cardiolipinspezies wurden durch ihr doppelt geladenes Ion und ihre respektive Fettsäuren Linolsäure (m/z 279.2) und Myristinsäure (m/z 227.2) im selected reaction monitoring mode (SRM) analysiert. Ebenso erfolgte eine separate Bestimmung des internen Standards (m/z 619.6) mittels SRM – Methode. Das gleiche Vorgehen erfolgte auch mit den Eltern- und Tochterfragmenten der anderen Cardiolipinspezies. Die Messung des Gehaltes an oxidierten Cardiolipin ((C18:2)₃-monohydroxylinoleoy-CL) im SRM – Modus als Übergang von m/z 731.6 zu m/z 279.2. Hierzu erfolgte eine Anpassung der Methode von Pope (Pope et al., 2008). Die quantitative Analyse der Spezies wurde in Relation zu C(18:2)₄-Cardiolipin gesetzt.

2.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Signifikanz erfolgte mittels gemischten linearen Modellen. Vorab des Analyseverfahrens wurden die ermittelten Daten hinsichtlich ihrer Verteilung sowohl graphisch mittels Boxplot – Analyse, als auch mathematisch mittels D`Agostino-Pearson – Test und Shapiro-Wilk – Test auf Normalverteilung überprüft. Es zeigten sich sowohl graphisch, als auch in den angewendeten Tests keine Abweichungen von der Normalverteilung, so dass die statistische Methodik mittels gemischter linearer Modelle mit paarweisem Vergleich der einzelnen Gruppen durchgeführt werden konnte. Zur Beurteilung des Signifikanzniveaus wurden die Differenzwerte (Wert aus der Messung nach 48 h – Wert aus der Messung nach 4 h) betrachtet. Es erfolgte im Anschluss des Tests zur Behebung der Alphafehler-Kumulierung die Anpassung nach Bonferroni. Das statistische Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni – Anpassung für p -Werte $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels SPSS 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.2, Armonk, NY, USA). Alle dargestellten Werte sind als Mittelwert \pm SEM aus jeweils sechs unabhängigen Experimenten angegeben. Die graphische Darstellung der Signifikanzen bezieht sich ausschließlich auf die Differenzwertanalysen und nicht auf die nach 4 h bzw. 48 h gemessenen Werte.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf Faktoren der Viabilität in Hepatozytenkulturen – Wirkung von *G. pentaphyllum*

3.1.1 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf den zellulären Proteingehalt – Wirkung von *G. pentaphyllum*

In den ersten Untersuchungen erfolgte die Kontrolle des Proteingehalts nach 4, 24 und 48 h (Abbildung 3.1 A). Hierbei erfolgte die Bestimmung sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den Gruppen mit Zusatz von Palmitinsäure und Linolsäure. Zur besseren Veranschaulichung der erhobenen Befunde erfolgte wiederholend die Darstellung der Kontrollgruppe, sowie der mit Palmitat und Linolsäure behandelten Hepatozyten. In den mit Palmitin- und Linolsäure behandelten Zellen zeigte sich nach 4 h Inkubation in Bezug auf die Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Effekt durch den Zusatz der Fettsäuren. Es kam in der Kontrollgruppe nach 24 h zu einer Abnahme um etwa 60 % von $1,24 \pm 0,12$ mg/ml auf $0,47 \pm 0,09$ mg/ml. Der Proteingehalt nach 48 h war deutlich niedriger als nach 4h Inkubationszeit. Zwischen den letzten beiden Messungen nach 24 h und 48 h zeigte sich kein statistisch erhebbarer Unterschied in der Menge an vorhandenem Protein. Ein ähnliches Bild zeigten auch die mit Palmitinsäure behandelten Zellen. Es kam nach 24 h zu einem Verlust an Protein von etwa 68 % von $1,32 \pm 0,17$ mg/ml auf $0,42 \pm 0,07$ mg/ml. Im Vergleich zu der Kultur nach 48 h zeigte sich das Protein jedoch erneut stabil. Auch in den mit der mehrfach ungesättigten Fettsäure Linolsäure behandelten Hepatozyten zeigte sich dieser Effekt mit Verlust an Protein nach 24 h von $1,38 \pm 0,15$ mg/ml auf $0,4 \pm 0,06$ mg/ml, jedoch Stabilisierung nach insgesamt 48 h. Bezüglich der Differenz zwischen dem nach 48 h und 4 h erhobenen Werten war der Proteingehalt in den mit Linolsäure behandelten Zellen signifikant geringer, als in der Kontrollgruppe, wohingegen sich kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten zeigte.

In einer zweiten Serie an Experimenten erfolgte die Zugabe eines ethanolischen Extraktes aus *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen, sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den mit Palmitin- und Linolsäure behandelten Zellen. Die Bestimmung erfolgte erneut nach 4, 24 und 48 h. Unter Kontrollbedingungen konnte eine dosisunabhängige Steigerung des Proteingehaltes durch *GP* gezeigt werden. Unter der Zugabe von *G. pentaphyllum* stieg der Eiweißanteil nach 4 h Behandlungszeit um mehr als 110 % auf $2,65 \pm 0,14$ mg/ml. Es konnte der bereits beschriebene Verlust an Protein nach 24 und 48 h nicht gänzlich durch *GP* unterdrückt werden. Auch nach 48 h konnte ein höherer Proteingehalt in den mit *GP40* ($1,08 \pm 0,19$ mg/ml) und *GP60* ($0,98 \pm 0,16$ mg/ml) behandelten Zellen gemessen werden (Abbildung 3.1 B). Im Vergleich der Differenzen des Proteingehaltes nach 48 und 4 h zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in jeder eingesetzten *GP* – Dosis ein signifikant niedrigerer Wert.

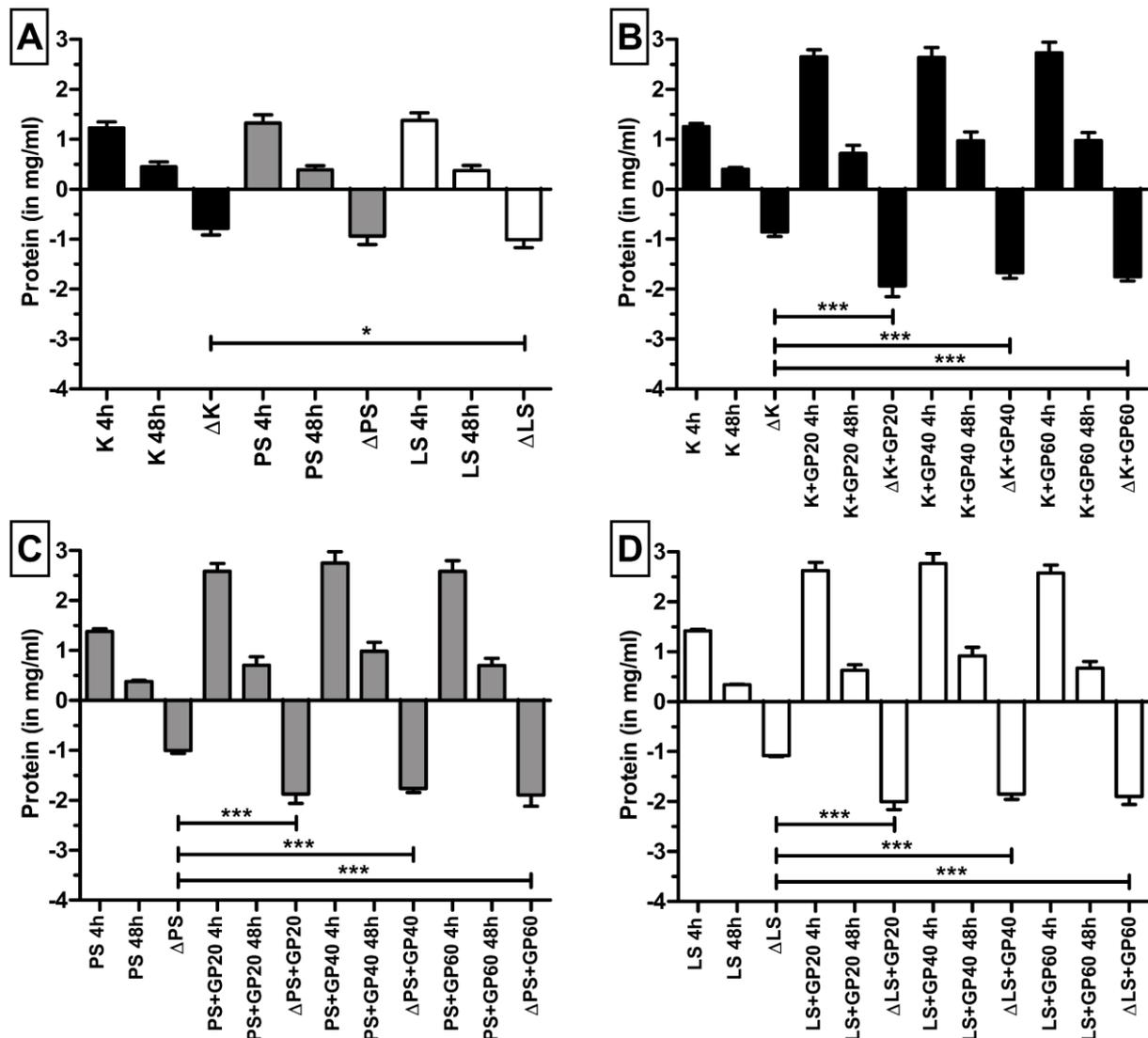


Abbildung 3.1: Darstellung des zellulären Proteingehaltes. A: Verlauf des zellulären Proteingehaltes in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure nach 4 und 48 h. B: Verlauf des zellulären Proteingehaltes der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. C: Verlauf des zellulären Proteingehaltes der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. D: Verlauf des zellulären Proteingehaltes der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; *p<0.05, *** p<0.005.

Ein divergentes Verhalten des Proteinanteils zur Kontrollgruppe zeigte sich in den mit Palmitinsäure und *Gynostemma* behandelten Hepatozyten. So kam es dosisunabhängig zu einer Steigerung auf mehr als das Zweifache des Ausgangswertes nach der ersten Messung (PS+GP20 2,58±0,16 mg/ml, PS+GP40 2,75±0,22 mg/ml, PS+GP60 2,59±0,21 mg/ml). Hierbei war die eingesetzte Konzentration des ethanolischen Extraktes unbedeutend. Nach 24 und 48 h zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe lediglich in der mittleren eingesetzten Dosierung von GP ein Unterschied. Tendenziell war der Gehalt an Protein in der niedrigsten und höchsten eingesetzten GP-Konzentration höher als unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.1 C). Wie bereits in der

Kontrollgruppe wiesen die Differenzen zwischen dem nach 48 h und nach 4 h ermittelten Wert zu den nicht mit *GP* behandelten Hepatozyten signifikant niedrigere Werte auf. Ein Unterschied zwischen der eingesetzten *GP* – Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Die für Palmitinsäure beschriebenen Effekte trafen auch bei den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten zu. Nach 4 h Inkubation zeigte sich ein Proteinzuwachs von mehr als 100 % unabhängig von der eingesetzten *GP*-Konzentration (LS+*GP*20 2,63±0,16 mg/ml, LS+*GP*40 2,77±0,2 mg/ml, LS+*GP*60 2,58±0,16 mg/ml). Auch nach 24 und 48 h wiesen, wie auch schon bei den mit Palmitinsäure und *Gynostemma* behandelten Zellen, die Hepatozyten mit *GP*-Zusatz in der Tendenz höhere Proteingehalte auf (Abbildung 3.1 D). In Betrachtung der Differenzwerte zwischen zeigten die mit *GP* und Linolsäure inkubierten Zellen einen signifikant niedrigeren Proteingehalt. Es konnten zwischen den eingesetzten *GP* – Dosierungen in der Differenzanalyse keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Die großen Differenzunterschiede in den mit *GP* behandelten Hepatozyten sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den mit Palmitin- und Linolsäure inkubierten Zellen sind durch relativ hohe Proteinkonzentrationen nach 4 h und konstante Werte nach 48 h in allen Gruppen zu erklären.

3.1.2 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Reduktion von MTT – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Zur Untersuchung der Viabilität wurde neben der Bestimmung des Proteins ein metabolischer Nachweis der Stoffwechselaktivität durch die Messung der Reduktion von MTT durchgeführt. Das gemessene reduzierte MTT wurde in Relation zu den vorher bestimmten Proteinkonzentrationen gesetzt, um die zelluläre Redoxkraft darzustellen.

Nach 4 h Behandlungszeit zeigte sich in der Kontrollgruppe ein durchschnittlicher Wert des reduzierten MTT von 0,34±0,05 mg/mg Protein. Im Vergleich zu den mit Palmitin- und Linolsäure behandelten Zellen gab es nach 4 h keinen signifikanten Unterschied. Unter Kontrollbedingungen kam es sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zu einer Verringerung der Reduktion des MTT um etwa 17 %. Es zeigten sich nach 24 und 48 h keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der Gruppe der mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten war nach 24 und 48 h eine leichte Steigerung der MTT-Reduktion im Mittel um etwa 6 % im Vergleich zu den nach 4 h gemessenen Werten erkennbar. Auch hier konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Ebenso wie in den mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten konnte in den mit der zweifach ungesättigten Linolsäure behandelten Zellen nach insgesamt 24 und 48 h Inkubationszeit eine leichte Steigerung des reduzierten MTT-Gehaltes ermittelt werden. Diese waren wie in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit Palmitinsäure jedoch nicht statistisch unterschiedlich von den nach 4 h gemessenen Werten (Abbildung 3.2 A). Auch in der Betrachtung der Differenzen

zwischen dem nach 48 und 4 h erhobenen Wert der MTT-Reduktion konnte in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Im zweiten Teil der Untersuchungen erfolgte die Kontrolle der Reduktion des MTT unter der Gabe von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. In der Kontrollgruppe kam es bereits im Mittel nach 4 h zu einer Erhöhung des reduzierten MTT um etwa 24 %. Den deutlichsten Effekt zeigte die mittlere Dosis des ethanolischen Extraktes mit einer Steigerung von über 120 % im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 h. Auch die höchste eingesetzte Konzentration zeigte deutlich höhere Werte als die Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach 24 h Inkubationszeit konnten im Vergleich zu der in der Kontrollgruppe bestimmten reduzierten MTT-Konzentrationen in allen eingesetzten *GP*-Dosierungen deutlich höhere Werte ermittelt werden. Es kam in jeder eingebrachten Dosis zu mindestens einer Verdopplung des reduzierten MTT. Der deutlichste Effekt war in der niedrigsten *Gynostemma*-Konzentration messbar. Nach insgesamt 48 h zeigte sich im Vergleich zu den ohne *Gynostemma* behandelten Hepatozyten in allen eingesetzten *GP*-Konzentrationen im Mittel erhöhte MTT-Werte. Hierbei bewirkte erneut die niedrigste Dosis den stärksten Effekt. Jedoch konnte aus den ermittelten Werten keine statistische Signifikanz ermittelt werden (Abbildung 3.2 B). Auch in der Differenzwertanalyse zwischen dem nach 48 und 4 h gemessenen Wert der MTT-Reduktion konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der eingesetzten *GP*-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Ein divergentes Bild ergab sich in den mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten. Nach 4 h Inkubationszeit zeigte sich im Mittel in allen eingesetzten Konzentrationen des Extraktes eine Erhöhung des reduzierten MTT. Diese waren jedoch im Vergleich zu den nur mit Palmitinsäure behandelten Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Vergleichbar mit den ermittelten MTT-Konzentrationen nach 24 h aus der Kontrollgruppe und den mit *GP* behandelten Hepatozyten unter Kontrollbedingungen zeigte sich ein ähnliches Bild in den mit Palmitinsäure behandelten Zellen nach 24 h. Es kam in allen eingesetzten Dosierungen des Extraktes zu einer vermehrten Reduktion des MTT. In der niedrigsten und höchsten eingesetzten Dosis konnte die stärkste MTT-Reduktion gesehen werden. Nach insgesamt 48 h erhöhte sich die Reduktion des MTT in der niedrigsten und höchsten *GP*-Konzentration tendenziell (Abbildung 3.2 C). Wie bereits in der Kontrollgruppe blieben auch in den mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* behandelten Hepatozyten die Differenzwerte ohne statistische Signifikanz.

In den mit Linolsäure und *G. pentaphyllum* behandelten Hepatozyten zeigten sich ebenso wie in den bereits dargestellten Ergebnissen zu den mit Palmitinsäure und *GP* inkubierten Zellen bezüglich der Reduktion von MTT heterogene Effekte. Nach 4 h konnten in allen eingesetzten Konzentrationen durchschnittlich höhere MTT-Werte gemessen werden. Es ergab sich jedoch im Vergleich zu den nur mit Linolsäure behandelten Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied. Nach 24 h Inkubationszeit zeigte sich eine deutliche Steigerung des MTT in allen eingesetzten *GP*-

Konzentrationen. Der deutlichste Effekt konnte erneut in der niedrigsten und höchsten eingesetzten Dosis festgestellt werden. Nach 48 h erhöhte sich in der niedrigsten und höchsten eingesetzten Konzentration des ethanolischen Extraktes die Reduktion des MTT, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die mittlere GP-Dosis zeigte hier eine im Mittel leicht geringere Konzentration an reduziertem MTT (Abbildung 3.2 D). In Bezug auf die statistische Auswertung der Differenzwerte in den nach 48 h und 4 h ermittelten MTT-Reduktionswerten konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

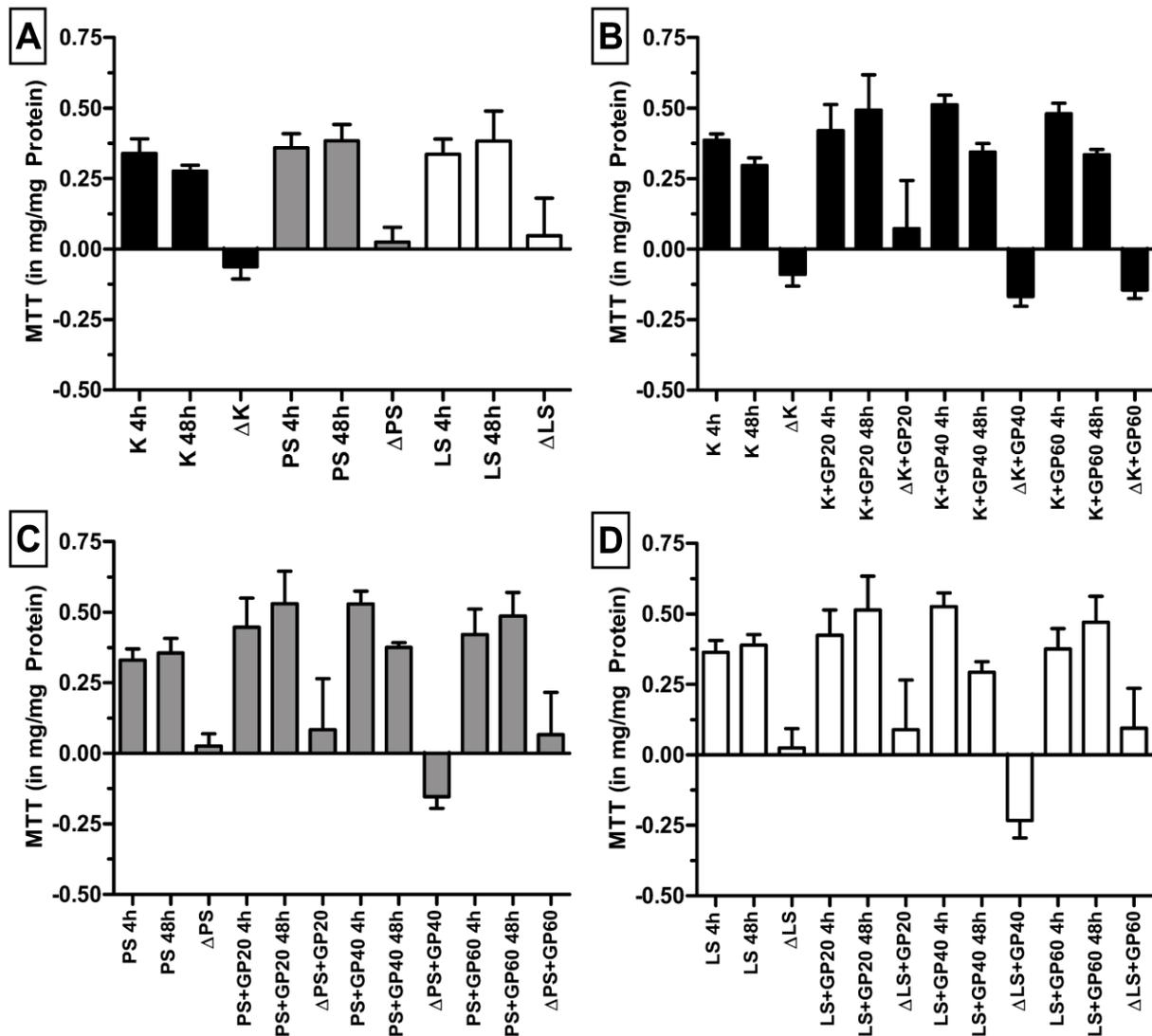


Abbildung 3.2: Darstellung des reduzierten MTT-Gehaltes. A: Verlauf des reduzierten MTT-Gehaltes in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure nach 4 und 48 h. B: Verlauf des reduzierten MTT-Gehaltes der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. C: Verlauf des reduzierten MTT-Gehaltes der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. D: Verlauf des reduzierten MTT-Gehaltes der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. Alle Werte sind als MW \pm SEM dargestellt, n=6.

3.1.3 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Trypanblaufärbung – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Ergänzend zur Bestimmung der MTT-Reduktion erfolgte die Analyse der Viabilität der Hepatozyten durch Anfärbung der Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau. Diese Methode erlaubt es, dass vitale von avitalen Zellen *in vitro* getrennt betrachtet werden können und somit der Prozentsatz von vitalen Zellen berechnet werden kann. Trypanblau kann, bedingt durch seine chemische Struktur, nur in Zellen aufgenommen werden, deren Membranpotential deutlich verringert ist. Ein vermindertes Membranpotential deutet auf eine Zellschädigung hin.

Im Fokus der ersten Untersuchungen stand die Frage, ob es durch den Einsatz von unterschiedlich langen und unterschiedlich gesättigten Fettsäuren zu einer Veränderung der Viabilität kommt und ob dieser Effekt von Kurzzeit- oder Langzeitexposition abhängig ist. Zunächst wurde nach vier Stunden die Viabilität der Hepatozyten untersucht. Hier zeigte sich kein Einfluss von Palmitinsäure oder Linolsäure in Bezug auf die Kontrollgruppe hinsichtlich einer Veränderung der Anfärbung der Zellen. Ein geringer Verlust war nach vier Stunden unter der Behandlung mit Linolsäure nicht signifikant. Die mittlere Viabilität lag um 90 %. Nach insgesamt 48 h Inkubation gab es jedoch in jeder der drei Gruppen deutliche Unterschiede. In der Kontrollgruppe kam es zu einer Abnahme der Viabilität um etwa 10 % auf $80,4 \pm 1,1$ %. Auch in der Gruppe der mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten konnte eine Verringerung der Viabilität bestimmt werden. Hier kam es zu einer Reduktion von nahezu 11 % auf $80,3 \pm 0,9$ %. Der deutlichste Effekt ergab sich nach 48 h Inkubation mit der ungesättigten Linolsäure. Hier kam es zu einem Absinken der Viabilität um mehr als 20 % auf $67,6 \pm 1,0$ %. Diese Verringerung der Zellviabilität in der Gruppe der mit Linolsäure behandelten Zellen unterschied sich auch in der Differenzwertanalyse zwischen 48- und 4 h – Wert signifikant zur Kontrollgruppe und zu den mit Palmitinsäure behandelten Zellen (Abbildung 3.3 A).

Im zweiten experimentellen Ansatz wurde der Einfluss von *Gynostemma pentaphyllum* auf die Zellviabilität untersucht. Nach vier Stunden Inkubation gab es in der Kontrollgruppe nach Zusatz von *GP* in aufsteigenden Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied der Viabilität der Hepatozyten. Im Mittel zeigte sich ein Wert um 90 %. Nach Kultivierung der Zellen über insgesamt 48 h konnte ein tendenzieller Unterschied zwischen den eingesetzten Konzentrationen und den ohne *GP* behandelten Hepatozyten festgestellt werden. Im Mittel war in allen eingesetzten Konzentrationen von *GP* die Viabilität niedriger, als in den über vier Stunden inkubierten Zellen. In der Differenzwertanalyse konnte jedoch *GP* über 48 h Inkubationszeit zu keiner signifikanten Verbesserung der Viabilität führen (Abbildung 3.3 B).

Gemessen an den Ergebnissen aus der Kombination der Kontrollgruppe und *GP* erfolgte die Untersuchung an mit Palmitinsäure inkubierten Zellen. Hier gab es nach vier Stunden Behandlung

keinen Unterschied zwischen den eingesetzten Konzentrationen des ethanolischen *GP* – Extraktes. Durchschnittlich waren alle prozentualen Viabilitätswerte unterhalb der nach vier Stunden gemessenen Werte. Doch zeigte sich in der mittleren und höchsten eingesetzten *GP*-Konzentration ein Unterschied im Gegensatz zu den ohne *GP* behandelten Zellen. Unter der Gabe von *GP* kam es zu einer Verbesserung der Viabilität. Zudem unterschieden sich die zwei höchsten eingesetzten *Gynostemma*-Dosen von der niedrigsten (PS+GP20 79,9±1,1 %, PS+GP40 84,5±0,4 %, PS+GP60 84,1±0,6 %; Abbildung 3.3 C). In der Betrachtung der Differenzwerte zwischen der Bestimmung nach 48 h und 4 h konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

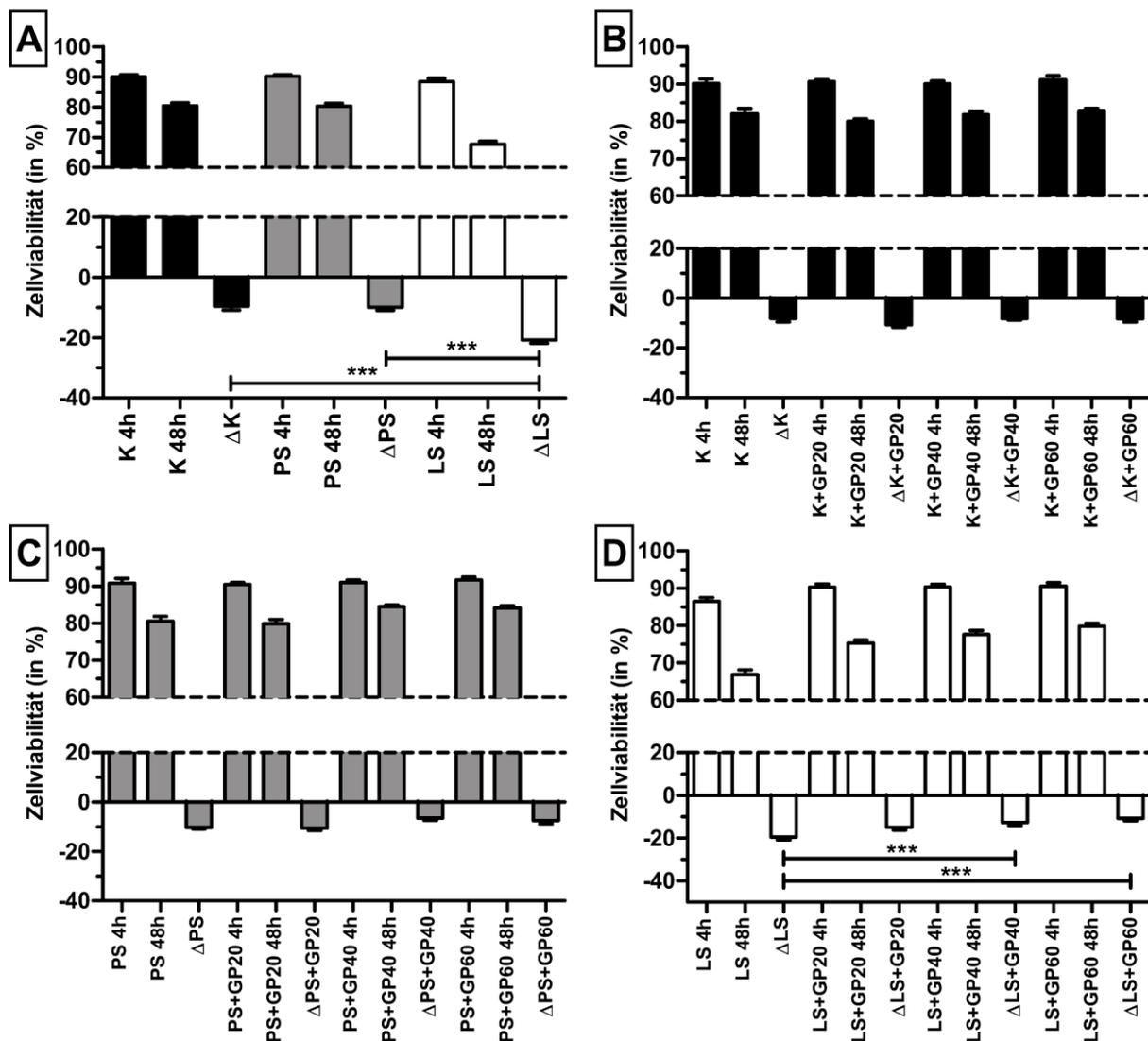


Abbildung 3.3: Darstellung der Zellviabilität nach der Trypanblau - Methode. A: Verlauf der Zellviabilität in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitinsäure und Linolsäure nach 4 und 48 h. B: Verlauf der Zellviabilität der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. C: Verlauf der Zellviabilität der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. D: Verlauf der Zellviabilität der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; ***p<0.005.

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob *G. pentaphyllum* die dramatisch abgesunkene Viabilität in den Hepatozyten mit Langzeitexposition durch Linolsäure positiv beeinflussen kann. Nach vier Stunden Inkubation mit aufsteigender Konzentration von *GP* zeigte sich tendenziell eine Verbesserung der Überlebensfähigkeit. Diese blieb ohne statistische Signifikanz. Die Abnahme der Viabilität nach 48h Inkubation mit dem ungesättigten Vertreter der eingesetzten Fettsäuren konnte jedoch positiv in einer dosisabhängigen Beziehung durch *G. pentaphyllum* beeinflusst werden. Im Mittel waren die Hepatozyten nach 48 h jedoch weniger viabel, als in den Vergleichsgruppen nach vier Stunden Inkubation. Bereits in der niedrigsten Dosierung gab es eine Verbesserung der Viabilität um etwa 11 % auf $75,3 \pm 0,9$ %. In der mittleren Dosierung konnte ein Anstieg der Viabilität um ca. 15 % auf $77,6 \pm 1,1$ % ermittelt werden. Den stärksten Effekt zeigte die höchste eingesetzte Konzentration mit einem Ansteigen der Viabilität um etwa 18 % auf $79,8 \pm 0,8$ % (Abbildung 3.3 D). In Betrachtung der Differenz zwischen der ersten und zweiten Viabilitätsbestimmung zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Viabilität in der mittleren und höchsten *GP*-Dosis verglichen mit den nur mit Linolsäure behandelten Hepatozyten. Zwischen den eingesetzten *GP*-Konzentrationen konnte keine statistisch signifikante Verbesserung der Viabilität nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Bildung von Nitrit/Nitrat in Hepatozytenkulturen – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Zur Bestimmung der Bildung von Stickoxid wurde das Zellmedium nach 4 und 48 h untersucht. Hierbei wurden die Konzentrationen von Nitrit/Nitrat auf das eingesetzte Volumen bezogen.

In der Kontrollgruppe konnte nach 4 h im Medium eine Konzentration an Nitrit/Nitrat von $0,82 \pm 0,02$ ng/ml gemessen werden. Die Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure führte bereits nach 4h zu einer Steigerung des Nitrit/Nitrat-Gehaltes im Kulturmedium um etwa 30 % auf $1,07 \pm 0,05$ ng/ml. Die Konzentration von Nitrit/Nitrat in den mit der gesättigten Fettsäure behandelten Hepatozyten war höher, als in den mit der zweifach ungesättigten Linolsäure inkubierten Zellen. Die mehrfach ungesättigte Linolsäure verursachte eine leichte Reduktion der NO-Bildung nach 4 h um 19 % auf $0,67 \pm 0,003$ ng/ml. Zur Beurteilung der Langzeitwirkung erfolgte die Messung des Nitrit/Nitrat-Gehaltes nach insgesamt 48 h Inkubationszeit. Unter Kontrollbedingungen gab es keine statistisch signifikanten Änderungen. Die mit Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten zeigten nach 48 h Langzeitexposition einen deutlichen jedoch statistisch nicht signifikanten Anstieg des Nitrit/Nitrat-Gehaltes im Zellkulturmedium um 33 % auf $1,43 \pm 0,1$ ng/ml. Zudem waren die Konzentrationen an Nitrit/Nitrat im Zellkulturmedium der mit Palmitinsäure behandelten Zellen nach 48 h höher als in der Kontrollgruppe und den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten. Auch in der Gruppe der mit Linolsäure langzeitexponierten Hepatozytenkulturen konnte nach insgesamt 48 h eine leichte Steigerung des NO – Releases in das Zellkulturmedium um 13 % beobachtet werden. Dieser war im Vergleich zur Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten jedoch deutlich geringer (Abbildung 3.4 A). In der Differenzwertanalyse zwischen dem nach 48 h und nach

vier Stunden ermittelten Werten konnte in keiner der drei Gruppen eine statistisch signifikante Änderung nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass *G. pentaphyllum* einen NO – Release in humanen Endothelzellen induziert (Tanner *et al*, 1999). Im zweiten Teil der Experimente wurde deshalb die Wirkung von aufsteigenden Konzentrationen des ethanolischen Extraktes von *GP* auf die Freisetzung von Stickoxid in Kurzzeit- und Langzeitexposition untersucht. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich nach 4 h Inkubationszeit bei keiner der eingesetzten Dosierungen eine NO-steigernde Wirkung durch *GP*. Es kam auch zu keiner dosisabhängigen Reduktion der Stickoxidfreisetzung in das Kulturmedium. Ein Effekt auf den Nitrit/Nitrat-Gehalt im Kulturmedium zeigte sich bei der mittleren und höchsten eingesetzten Dosis von *G. pentaphyllum*. Unter Langzeitexposition konnte in der höchsten eingesetzten *GP*-Konzentration die größte Steigerung des Gehaltes Nitrit/Nitrat um 28 % im Zellkulturmedium gemessen werden. In der niedrigsten und mittleren Dosierung des Extraktes war eine leichte Verringerung des Stickoxids im Kulturmedium nachzuweisen (Abbildung 3.4 B). In der Betrachtung des Differenzwertes nach erster (4 h) und zweiter Messung (48 h) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ein ähnliches Bild wie in der Kontrollgruppe zeigten auch die Hepatozytenkulturen unter der Inkubation mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* in der Kurzzeitexposition. Nach 4 h war in der niedrigsten und mittleren eingesetzten Dosierung ein leichter Rückgang der Stickoxidfreisetzung im Gegensatz zu den nur mit Palmitinsäure behandelten Kulturen messbar. Nach 48 h Exposition stieg bei jeder der eingesetzten *GP* – Dosierungen die Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium in Bezug auf die Kurzzeitexposition nach 4 h deutlich an. Der stärkste NO-steigernde Effekt war in der höchsten eingebrachten *GP*-Konzentration zu sehen. Hier stieg der Nitrit/Nitrat-Gehalt um etwa 40 % auf $2,03 \pm 0,09$ ng/ml an (Abbildung 3.4 C). Bezogen auf den Differenzwert zwischen 48 h und vier Stunden war der Gehalt an Nitrit/Nitrat im Zellkulturmedium in der Gruppe, die mit Palmitinsäure und *GP60* behandelt wurden zu allen anderen Gruppen signifikant unterschiedlich.

In den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten zeigte sich nach Kurzzeitexposition in der niedrigsten und mittleren eingesetzten Dosis von *G. pentaphyllum* ein tendenziell niedrigerer Nitrit/Nitrat-Gehalt im Zellkulturmedium, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dieser Trend zeichnete sich auch in der Langzeitbehandlung nach 48 h ab. In allen eingesetzten *GP*-Dosierungen konnte im Vergleich zu den erhobenen Werten nach 4 h im Kulturmedium im Mittel eine höhere NO-Konzentration gemessen werden. Im Vergleich zu allen mit Linolsäure und *GP* langzeitexponierten Hepatozyten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den ohne *GP* behandelten Hepatozyten und den mit der höchsten eingesetzten *GP*-Konzentration behandelten Zellkulturen nachgewiesen werden. Ebenso war in keiner der Gruppen ein signifikanten Unterschiede in der Differenzwertanalyse ermittelbar (Abbildung 3.4 D).

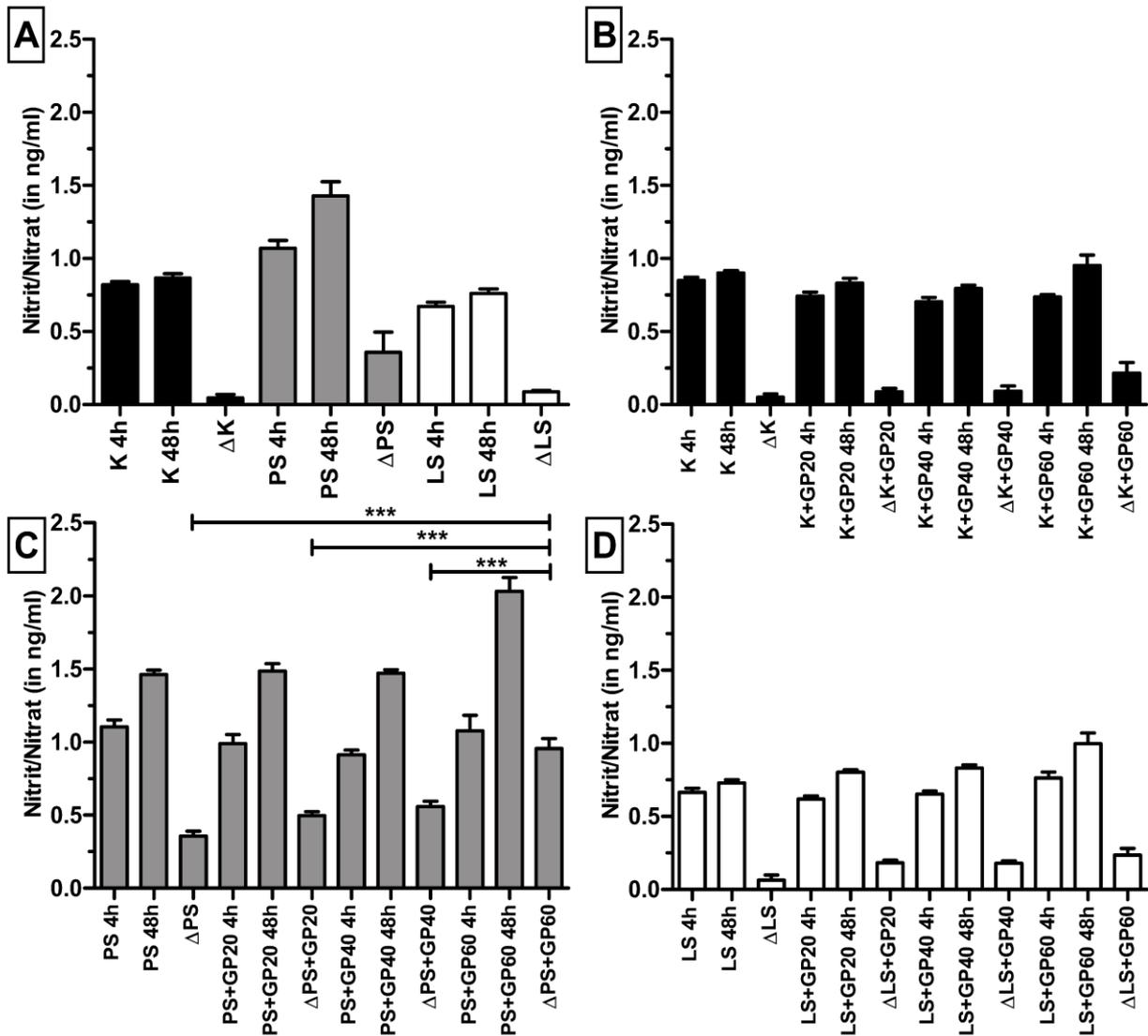


Abbildung 3.4: Darstellung der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium. A: Verlauf der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure. B: Verlauf der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. C: Verlauf der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. D: Verlauf der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; ***p<0.005.

3.3 Auswirkung von Palmitin- und Linolsäure auf den Lipidgehalt von Hepatozyten

3.3.1 Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf die Gesamtlipide – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Um den Effekt von Fettsäuren auf die Lipidakkumulation in primären Hepatozytenkulturen zu untersuchen, erfolgte zunächst die Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in den Zellen.

Nach 4 h zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung des Gesamtlipidgehaltes in der Gruppe der mit Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (K $1,47 \pm 0,08$ mg/mg Protein, PS $1,1 \pm 0,01$ mg/mg Protein). Im Gegensatz dazu stand eine Erhöhung der Gesamtlipide unter dem Einfluss von Linolsäure nach 4 h Inkubation von etwa 22 % auf $1,79 \pm 0,04$ mg/mg Protein. Deutlichere Effekte hinsichtlich der Lipidakkumulation waren nach 48 h Expositionszeit erkennbar. In der Kontrollgruppe kam es zu einer tendenziellen Verringerung, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Im Mittel war der Gesamtlipidgehalt nach 48 h in den mit Palmitinsäure und Linolsäure inkubierten Hepatozyten höher als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe der mit Palmitinsäure behandelten Zellen erhöhte sich der Gesamtlipidgehalt um etwa 67 % auf $1,84 \pm 0,03$ mg/mg Protein. Der deutlichste Unterschied zeigte sich in den mit Linolsäure über 48 h behandelten Hepatozyten. Es kam im Vergleich zur Inkubation von 4 h zu einer dramatischen Steigerung des Lipidgehaltes um mehr als 130 % auf $4,18 \pm 0,07$ mg/mg Protein (Abbildung 3.5 A). Bezogen auf die Differenz des Gesamtlipidgehaltes zum ersten Messzeitpunkt nach vier Stunden und dem zweiten Messpunkt nach 48 h zeigte sich in den mit Linolsäure behandelten Zellen ein signifikant höherer Wert, als in der Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten.

Für *G. pentaphyllum* wurde *in vivo* gezeigt, dass es lipidsenkende Wirkungen hat. Im zweiten Teil dieser Experimente wurde untersucht, ob der ethanolische Extrakt von *GP* den Anstieg des Lipidgehaltes in Gegenwart von freien Fettsäuren vermindern kann. In der Kontrollgruppe zeigte sich nach vier Stunden Inkubationszeit in der niedrigsten eingesetzten Konzentration des Extraktes von *GP* ein signifikant niedrigerer Gesamtlipidgehalt im Vergleich zur Kontrolle ohne *Gynostemma*-Zusatz (K+*GP*20 $1,26 \pm 0,03$ mg/mg Protein). Die mittlere und höchste Dosis ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Nach 48 h konnte in der Gegenüberstellung zur Kontrollgruppe lediglich die höchste eingesetzte Konzentration von *GP* zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Gesamtlipids um etwa 40 % auf $0,81 \pm 0,03$ mg/mg Protein führen. Im Vergleich zur niedrigsten und mittleren Konzentration von *GP* hob sich der senkende Effekt in der höchsten *GP*-Dosierung deutlich ab (Abbildung 3.5 B). In Bezug auf die Differenzwerte zwischen zweiten und ersten Messpunkt (48 h vs. 4 h) führte die höchste eingesetzte *Gynostemma* – Dosis zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtlipidgehaltes sowohl im Vergleich zu den nicht mit *GP* – inkubierten Hepatozyten, als auch zu den niedrigeren *GP* – Konzentrationen.

Auch in den mit Palmitinsäure und *GP* behandelten Hepatozyten zeigte sich eine Reduktion des Gesamtlipidgehaltes nach 48 h Behandlungszeit. In der geringsten eingesetzten Konzentration konnte eine Absenkung um etwa 17 % auf $1,52 \pm 0,02$ mg/mg Protein gemessen werden. Dieser Effekt wurde in der mittleren Konzentration noch einmal verstärkt. Hier zeigte sich eine Reduktion um fast 30 % auf $1,29 \pm 0,06$ mg/mg Protein. Der stärkste Effekt war in der höchsten eingesetzten Dosis messbar. Hier kam es zu einer Verringerung des Gesamtlipidgehaltes um mehr als 40 % auf

Unter der Gabe von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Dosierungen konnte die durch Linolsäure bedingte Erhöhung auf mittlere Werte unterhalb denen der Kontrollgruppe nach vier Stunden vermindert werden. Nach 4 h Inkubationszeit führte bereits die niedrigste *GP*-Dosis zu einer Reduktion des Lipidgehaltes um nahezu 8 % auf $3,88 \pm 0,07$ mg/mg Protein. Den stärksten Effekt konnte die höchste eingesetzte Konzentration des Extraktes aufweisen. Hier reduzierte sich der Gesamtlipidgehalt um mehr als 30 % auf $2,72 \pm 0,08$ mg/mg Protein (Abbildung 3.5 D). Vergleichbar mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe mit *GP* – Behandlung zeigten in der Differenzwertanalyse die höchste eingesetzte *GP* – Dosis zu allen anderen Gruppen eine signifikante Reduktion des Gesamtlipidgehaltes.

3.3.2 Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt an Triglyceriden – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Zunächst wurde der Einfluss der einzelnen Fettsäuren Palmitinsäure und Linolsäure untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 4 h zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein wesentlicher Unterschied der Triglyceride in der Kultur. Betrachtet man jedoch die Entwicklung nach insgesamt 48 h, kann man einen deutlichen Effekt abhängig von der angebotenen Fettsäure erkennen. In der Kontrollgruppe kam es nach 48 h zu keiner signifikanten Anreicherung von Triglyceride. Durch den Zusatz von Palmitinsäure kam es nach 48 h zu einer tendenziellen Erhöhung um etwa 58 % auf $0,33 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. Den deutlichsten Unterschied konnte man nach 48 h bei den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten erkennen. Hier kam es zu einem Anstieg der Triglyceride um mehr als das 5fache der nach 4 h ermittelten Konzentration auf $1,06 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. In Bezug zur Differenz des nach 48 Stunden und vier Stunden ermittelten Wertes zeigte sich eine signifikante Steigerung der Triglyceride in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten bezogen auf die Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure inkubierten Zellen (Abbildung 3.6 A).

Basierend auf der Darstellung in 3.3.1 und den in 1.6 bereits genannten Effekten von *G. pentaphyllum* auf Serumtriglyceride erfolgte die Inkubation mit dem ethanolischen Extrakt von *GP* in aufsteigenden Dosierungen. In der Kontrollgruppe nach vier Stunden zeigte sich, dass sich die Behandlung mit *GP* weder positiv noch negativ auf die Anreicherung von Triglyceriden auswirkt. Nach 48 h zeigte sich eine tendenzielle Senkung der Triglyceride (Abbildung 3.6 B).

Ein ähnliches Bild konnte auch bei den mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* behandelten Hepatozyten beobachtet werden. Nach 4 h war kein wesentlicher Unterschied im Gehalt an Triglyceriden in den Zellen erkennbar, jedoch ergab sich nach 48 h ein deutlich senkender Effekt der Triglyceridakkumulation durch das *GP*-Extrakt. Den deutlichsten Unterschied machte die höchste eingesetzte Konzentration. Hier konnte im Vergleich zu den Hepatozyten ohne Zusatz des Extraktes eine Senkung von etwa 40 % auf $0,24 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein erzielt werden (Abbildung

3.6 C). In Betrachtung der Differenzwerte zwischen der Messung nach 48 h und nach 4 h konnte kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

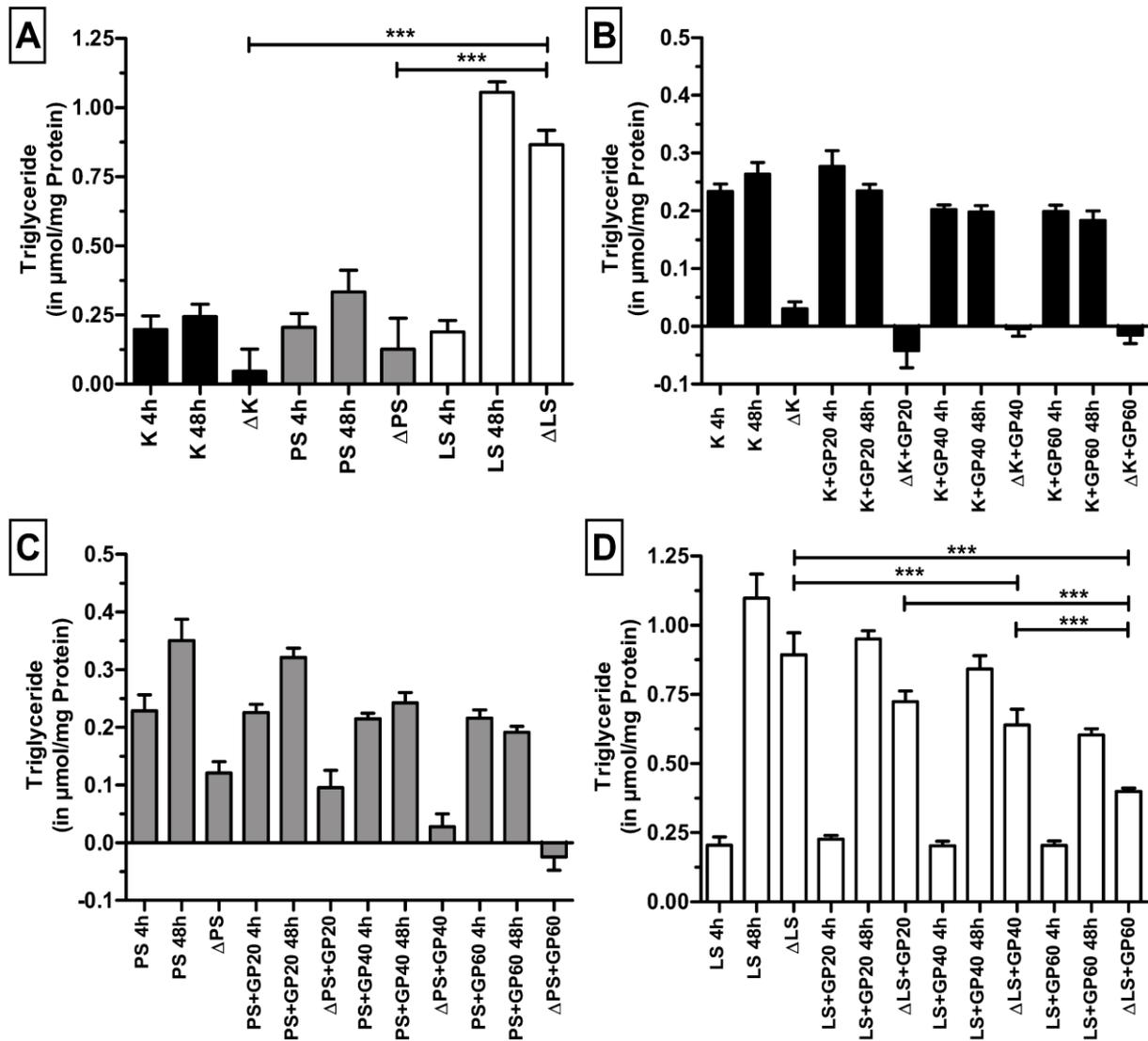


Abbildung 3.6: Einfluss von Palmitinsäure, Linolsäure und *G. pentaphyllum* auf den Triglyceridgehalt. A: Triglyceridakkumulation in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure nach 4 und 48 h. B: Triglyceridakkumulation der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. C: Triglyceridakkumulation der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. D: Triglyceridakkumulation der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; ***p<0.005.

In der Gruppe der mit Linolsäure und *G. pentaphyllum* behandelten Hepatozyten zeigten diese, wie auch schon in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der mit Palmitinsäure inkubierten Zellen, nach 4 h keinen wesentlichen Unterschied bezüglich der eingesetzten Konzentrationen des Extraktes. Die in den ersten beiden Darstellungen gezeigten Effekte stellten sich unter Einfluss von

Linolsäure auch hier erst nach 48 h ein. Die geringste *GP*-Konzentration führte zu einer tendenziellen Senkung der Triglyceride. Die mittlere Dosis zeigte einen deutlicheren Unterschied zu der Gruppe ohne Zusatz des Extraktes mit einer Reduktion der Triglyceridkonzentration um 20 % auf $0,84 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. Dieser Effekt wurde durch die höchste eingesetzte Konzentration mit einer Verminderung des Triglyceridgehaltes von mehr als 40 % auf $0,6 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein noch einmal deutlich verstärkt. Bezüglich der Differenz zwischen der zweiten und der ersten Messung war der Triglyceridgehalt in den mit *GP60* behandelten Zellen signifikant niedriger als in den anderen drei Gruppen (Abbildung 3.6 D). Dies traf auch für die mit *GP40* behandelten Zellen in Bezug auf die nur mit Linolsäure inkubierten Hepatozyten zu.

3.3.3 Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt an Cholesterol – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Im ersten Teil wurde das Potential von Fettsäuren auf die Anhäufung von Cholesterol in primären Hepatozytenkulturen untersucht. Es zeigten sich nach 4 h Inkubationszeit in keiner Gruppe signifikanten Veränderungen des Cholesterolgehaltes der Zellkulturen. Nach 48 h stieg in der Kontrollgruppe der Cholesterolgehalt signifikant um ca. 30 % auf $0,1462 \pm 0,0058$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein an. Ebenso war ein leichter Anstieg des Cholesterolgehaltes nach Behandlung der Hepatozyten mit Palmitinsäure nachweisbar. Es kam zu einer Akkumulation um 39 % auf $0,1622 \pm 0,0059$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. Den stärksten Effekt bei der Steigerung der Cholesterolkonzentration gab es in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten. Hier kam es zur mehr als einer Verdopplung des Cholesterolgehaltes. In der statistischen Analyse der Differenzwerte zwischen dem Cholesterolgehalt am zweiten Messpunkt (48 h) und dem ersten Messpunkt (4 h) zeigte sich in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure inkubierten Zellkulturen (Abbildung 3.7 A).

In den Darstellungen zum Gesamtlipidgehalt und Triglyceridgehalt konnte ein potentiell protektiver Effekt durch *G. pentaphyllum* nachgewiesen werden. Zur Beantwortung der Frage, ob der ethanolische Extrakt auch auf der Ebene der Cholesterolsynthese bzw. der Anhäufung von Cholesterolen in inkubierten Hepatozyten Auswirkungen zeigt, erfolgte die Inkubation mit *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen.

In der Kontrollgruppe konnte in der ersten Messung nach vier Stunden Inkubationszeit kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der angebotenen Konzentration von *Gynostemma* nachgewiesen werden. Erst nach 48 h zeigten sich Cholesterol-senkende Effekte in Abhängigkeit der eingesetzten *Gynostemma*-Konzentration. In der niedrigsten und mittleren Konzentration kam es zu keiner wesentlichen Veränderung des Cholesterolgehaltes. Lediglich in der Gruppe mit dem Zusatz *GP60* konnte eine deutlichere Reduktion des Cholesterolgehaltes von $0,1462 \pm 0,0058$

$\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein in der Kontrollgruppe auf $0,1184 \pm 0,0022 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein in den mit *GP60* behandelten Zellkulturen nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 B). In der Betrachtung der Differenzwerte zwischen dem nach 48 h und 4 h ermittelten Cholesterolkonzentration konnte keine signifikante Änderung ermittelt werden.

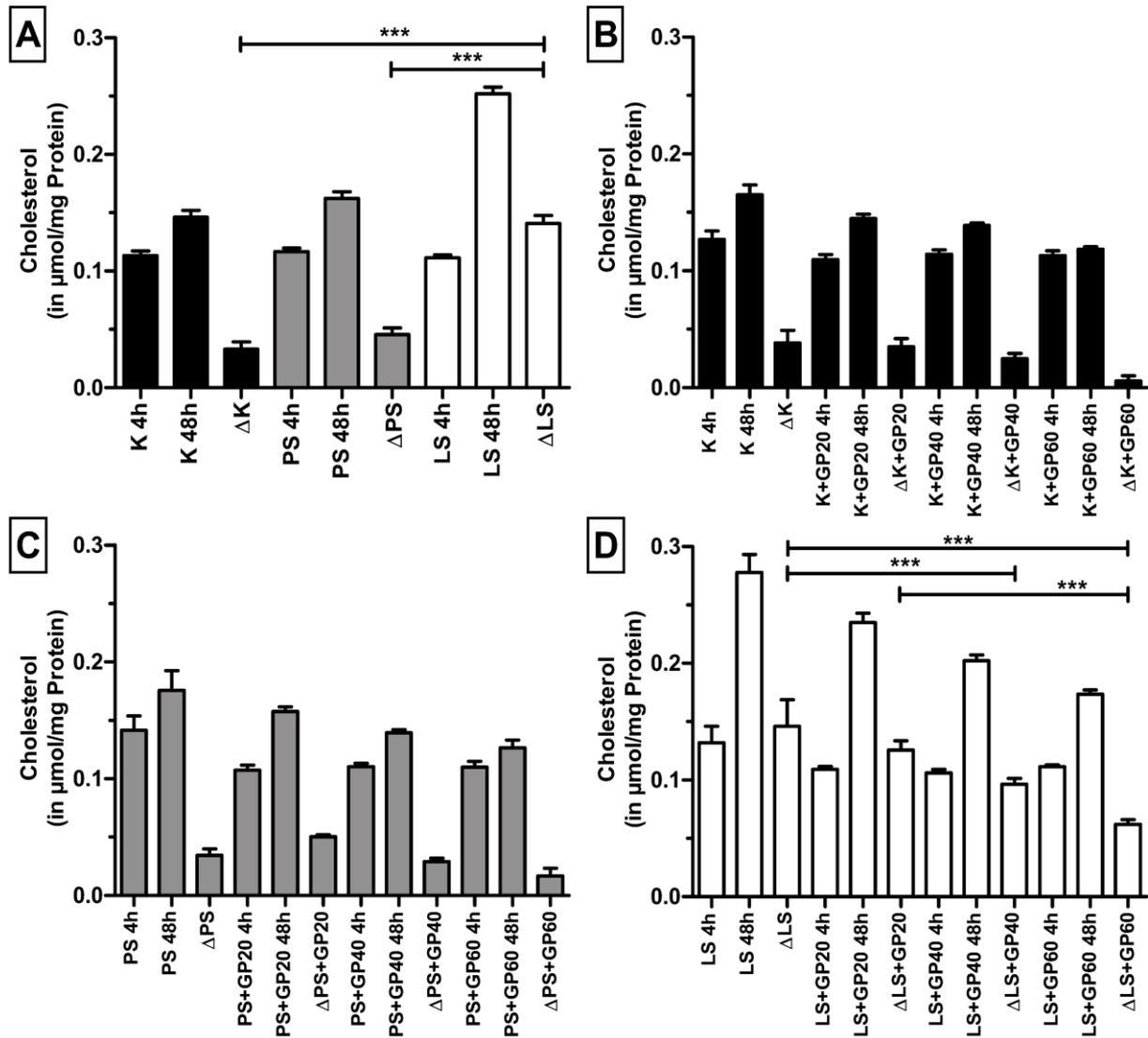


Abbildung 3.7: Einfluss von Palmitinsäure, Linolsäure und *G. pentaphyllum* auf den Cholesterolgehalt. A: Cholesterolkonzentrationen in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure nach 4 und 48 h. B: Cholesterolkonzentrationen der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. C: Cholesterolkonzentrationen der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. D: Cholesterolkonzentrationen der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen nach 4 und 48 h. Alle Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt, $n=6$; $***p < 0.005$.

In den mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* inkubierten Hepatozyten zeigte sich ein ähnliches Bild. Im Mittel war der Cholesterolgehalt nach 48 h Behandlung jedoch höher als in der Kontrollgruppe. Nach 4 h konnte in der kombinierten Gabe von Palmitinsäure und *Gynostemma-*

Extrakt in aufsteigenden Dosierungen kein wesentlicher Unterschied bezüglich des Gehaltes an Cholesterol nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch den Effekt nach 48 h Inkubationszeit, so zeigen sich deutliche Effekte hinsichtlich einer Cholesterol-senkenden Eigenschaft durch den GP-Extrakt. In der mittleren Konzentration sank der Cholesterolgehalt um ca. 15 % auf $0,1393 \pm 0,0027$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. Einen deutlicheren Effekt gab es in der höchsten angebotenen Konzentration. Hier konnte eine Senkung des Cholesterols um 22 % auf $0,1265 \pm 0,0066$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein gemessen werden (Abbildung 3.7 C). In der Differenzwertanalyse zwischen dem nach 48 h und 4 h ermittelten Cholesterolgehalt zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

In den mit Linolsäure und *G. pentaphyllum* inkubierten Zellen zeigte sich nach 4 h Inkubation kein statistisch messbarer Unterschied im Cholesterolgehalt. Dies spiegelt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den mit Palmitinsäure und *Gynostemma*-Extrakt behandelten Zellen wieder. Nach 48 h waren die Konzentrationen an Cholesterol in allen Gruppen im Mittel höher als zur ersten Messung nach vier Stunden. Es gab jedoch einen in Abhängigkeit der GP-Konzentration stehenden Cholesterol-senkenden Effekt. In der geringsten eingesetzten Dosis konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Differenz zwischen dem nach 48 h und nach 4 h ermittelten Cholesterolgehalt ermittelt werden. Erst in der mittleren Konzentration verringerte sich der Cholesterolgehalt signifikant um etwa 20 % auf $0,2024 \pm 0,0048$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein. Der stärkste Effekt konnte erneut in den mit GP60 behandelten Hepatozyten gemessen werden. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des Cholesterols um mehr als 30 % auf $0,1734 \pm 0,0038$ $\mu\text{mol/mg}$ Protein (Abbildung 3.7 D).

3.4 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Bildung von Isoprostanen – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Durch die Behandlung mit Palmitinsäure kam es zu keiner Erhöhung der Isoprostankonzentration, sondern zu einer geringfügigen Senkung. Diese war jedoch nicht statistisch verschieden von der Kontrollgruppe. Unter der Gabe von Linolsäure kam es im Gegensatz zum gesättigten Vertreter zu einer Steigerung der Isoprostane, die jedoch unter den angewandten Methoden keinen statistisch signifikanten Unterschied ausmachte. Nach 48 h zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Verdopplung der Konzentration der Isoprostane auf $1,313 \pm 0,1460$ ng/mg Protein. Im Vergleich zu den eingesetzten Fettsäuren war die Erhöhung jedoch weitaus geringer. Unter der Exposition mit Palmitinsäure kam es zu einer Steigerung auf mehr als das 2,5-fache auf $1,53 \pm 0,3450$ ng/mg Protein der nach vier Stunden gemessenen Werte. Der größte Unterschied zeigte sich in der Gruppe der mit Linolsäure behandelten Hepatozyten. Dort stieg die Konzentration der veresterten und freien Isoprostane auf mehr als das 8-fache an ($LS\ 8,084 \pm 4,5780$ ng/mg Protein; Abbildung 3.8 A). Auf Grund des großen SEM-Wertes in der Gruppe der Linolsäure konnte jedoch keine Signifikanz zur Kontrollgruppe oder zur Palmitinsäuregruppe errechnet werden.

Im zweiten Teil der Untersuchungen erfolgte die Zugabe von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. In der Kontrollgruppe zeigte sich nach 4 h in der niedrigsten Konzentration des Extraktes ein deutlich senkender Effekt bezüglich der Isoprostankonzentration. Hierbei kam es zu einer Abnahme des Isoprostangehaltes um etwa 70 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso ergaben die mittlere Konzentration (GP40) und die höchste eingesetzte Konzentration (GP60) erniedrigte Werte der Arachidonsäurederivate. Diese waren zwar nicht so stark ausgeprägt, wie bei der niedrigsten GP-Konzentration. Nach 48 h erhöhten sich im Vergleich zu den erhobenen Daten nach vier Stunden die Isoprostane in allen eingesetzten GP-Konzentrationen. Es konnte lediglich in der geringsten angebotenen Konzentration des GP ein senkender Einfluss von *G. pentaphyllum* nachgewiesen werden (Abbildung 3.8 B). In der Analyse der Differenz aus dem nach 48 h und vier Stunden ermittelten Wert konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Nach 4 h waren die Konzentrationen der Isoprostane in Gegenwart von Palmitinsäure niedriger als bei den Zellen ohne *Gynostemma*-Einfluss. In der Tendenz war die niedrigste eingesetzte Konzentration von GP mit einer Reduktion von 67 % auf $0,193 \pm 0,048$ ng/mg Protein am effektivsten, blieb jedoch ohne statistische Signifikanz. Die höchste eingesetzte Dosis (GP60) zeigte ebenfalls diesen Effekt, blieb jedoch ebenfalls ohne Signifikanz. Deutliche Effekte waren nach 48 h messbar. Insgesamt lag der Gehalt an Isoprostanen nach einer Inkubationszeit von 48 h mit Palmitinsäure im Mittel höher als die vergleichbaren Gruppen nach 4 h. Im Durchschnitt waren durch den Einsatz des Extraktes niedrigere Konzentrationen des Arachidonsäurederivates nachweisbar. Jedoch zeigte sich eine starke Diversität zwischen den einzelnen Dosierungen von GP. Den stärksten Effekt gab es bei den niedrigsten gewählten Konzentrationen. Es kam zu einer Reduktion der Isoprostane um fast 70 % auf $0,461 \pm 0,045$ ng/mg Protein. Auch die höchste GP-Dosis zeigte eine Verringerung um etwa 70 % auf $0,4582 \pm 0,071$ ng/mg Protein. In Betrachtung der Differenzwerte zwischen 48 h und 4 h konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 3.8 C).

Durch die kombinierte Inkubation mit Linolsäure und *G. pentaphyllum* ergab sich ein unterschiedliches Resultat. Es konnte nach 4 h Inkubationszeit eine Senkung des Gehaltes der Isoprostane durch GP nachgewiesen werden. Den größten Effekt zeigte die niedrigste eingesetzte Konzentration GP20. Hier konnte eine Abnahme von mehr als 70 % auf $0,256 \pm 0,105$ ng/mg Protein nachgewiesen werden. Bei den zwei nächsthöheren Dosierungen konnte ebenfalls eine Reduktion von ca. 60 % auf $0,36 \pm 0,052$ ng/mg Protein in der Gruppe der mittleren Dosierung und von ca. 65 % auf $0,333 \pm 0,150$ ng/mg Protein in der höchsten angebotenen Konzentration nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden Inkubationszeit ergab sich in allen vier Gruppen eine Erhöhung der Isoprostane im Vergleich zu ihrem Gegenpart nach vier Stunden. Im Mittel war der Gehalt an Isoprostanen in den mit *G. pentaphyllum* behandelten Zellen im Gegensatz zu den ohne *Gynostemma* inkubierten Hepatozyten niedriger. Ein deutlicher Effekt war bereits in der niedrigsten

angeboten Dosierung zu sehen. Hier reduzierte sich der Gehalt um 86 % auf $1,112 \pm 0,259$ ng/mg Protein. Die massiv erhöhte Konzentration an Isoprostan in der Gruppe mit Linolsäure allein konnte durch die höchste eingesetzte Dosis des ethanolischen Extraktes auf den Ausgangswert nach vier Stunden gesenkt werden. In der Differenzwertanalyse zwischen dem Wert nach 48 h und nach 4 h zeigten die Hepatozyten, die mit Linolsäure und *GP60* behandelt wurden im Vergleich zur Gruppe ohne *Gynostemma* – Zusatz und zu den mit *GP40* behandelten Zellen ein signifikant niedrigeren Isoprostangehalt. Dies war auch für den Vergleich zwischen den mit *GP20* und *GP40* behandelten Zellen nachweisbar (Abbildung 3.8 D).

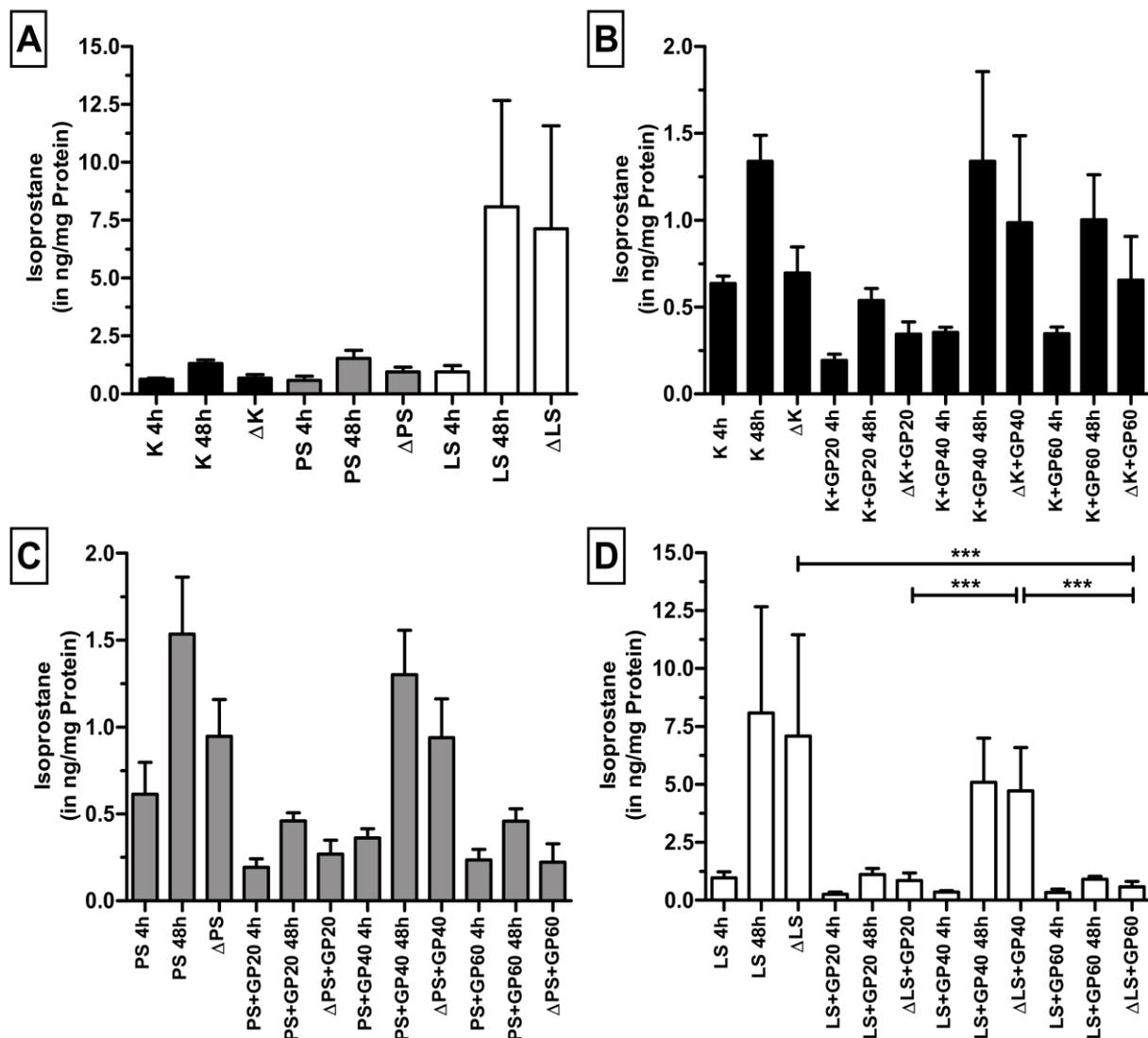


Abbildung 3.8: Darstellung des zellulären Isoprostangehaltes. A: Verlauf der zellulären Isoprostankonzentration in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure. B: Verlauf der zellulären Isoprostankonzentration der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. C: Verlauf der zellulären Isoprostankonzentration der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. D: Verlauf der zellulären Isoprostankonzentration der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ dargestellt, $n=6$; $***p<0.005$.

3.5 Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf den Gehalt und die Spezieszusammensetzung von Cardiolipin – Wirkung von *G. pentaphyllum*

3.5.1 Veränderungen des Cardiolipingehaltes nach Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Im ersten Schritt der Experimente wurde der Einfluss von Hyperinsulinämie und Hyperglykämie in Kombination mit Palmitinsäure und Linolsäure auf den Gesamtgehalt von Cardiolipin untersucht. Hierbei wurde der Gesamtcardiolipingehalt in Relation zum zellulären Protein dargestellt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtcardiolipingehaltes nach 4 h Inkubationszeit bezüglich der mit Palmitin- oder Linolsäure behandelten Zellkulturen. Jedoch konnte im Vergleich zu den mit Palmitinsäure behandelten Zellen ein niedriger Gesamtcardiolipingehalt in den mit Linolsäure inkubierten Hepatozyten gemessen werden. Nach 48 h ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtgehalt des Phospholipids in allen drei Gruppen (Abbildung 3.9 A).

Zur Beantwortung der Frage, ob der ethanolische Extrakt aus *G. pentaphyllum* einen Effekt auf die Bildung von Cardiolipin *in vitro* hat, wurden die Hepatozytenkulturen mit aufsteigenden Konzentrationen von *GP* inkubiert. In der Kontrollgruppe zeigte sich bereits nach 4 h Behandlung eine Abnahme des Cardiolipingehaltes in allen eingesetzten Dosierungen. Es kam zu einer Reduktion in der mit *GP20* behandelten Gruppe von etwa 60 % auf $0,63 \pm 0,01$ µg/mg Protein, sowie etwa 18 % auf $1,3 \pm 0,04$ µg/mg Protein in der mit *GP40* behandelten Gruppe und um etwa 40 % auf $0,96 \pm 0,04$ µg/mg Protein in der mit *GP60* behandelten Gruppe. Diese Reduktion des Gesamtcardiolipingehaltes in den Zellkulturen mit *G. pentaphyllum* konnte jedoch nach Langzeitexposition dosisabhängig zugunsten einer verstärkten Cardiolipinsynthese positiv beeinflusst werden. In allen eingesetzten *GP* – Dosierungen kam es zu einem Anstieg des Cardiolipingehaltes verglichen mit den ermittelten Werten nach 4 h. In der Analyse der Differenzen zwischen dem zweiten Messzeitpunkt (48 h) und dem ersten Messzeitpunkt zeigte sich in den mit *Gynostemma* behandelten Hepatozyten ein signifikant höherer Gesamtcardiolipingehalt, als in den Zellkulturen ohne *GP* – Behandlung. Ebenso konnte zwischen der höchsten *GP* – Dosis und den beiden niedrigeren *Gynostemma* – Konzentrationen ein signifikant höherer Gesamtcardiolipingehalt ermittelt werden (Abbildung 3.9 B).

Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch in den mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* behandelten Hepatozytenkulturen ab. Hier kam es ebenfalls nach 4 h Inkubationszeit zu einem Verlust an Cardiolipin in den mit *GP* inkubierten Zellen von etwa 53 % in der *GP20*-Gruppe, 30 % in der *GP40*-Gruppe und 50 % in der *GP60*-Gruppe. Dieser durch *GP* bedingte senkende Effekt auf den Gesamtcardiolipingehalt konnte durch Langzeitexposition mit dem ethanolischen Extrakt nach 48 h wie schon in der Kontrollgruppe behoben werden. In allen eingesetzten Dosierungen kam es

bezüglich der Differenzwertes zwischen dem Gehalt gemessen nach 48 h und dem Gehalt nach 4 h zu einem signifikanten Anstieg des Gesamtgehaltes an Cardiolipin verglichen mit den nur mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten. Zudem war in den Zellkulturen, die mit der mittleren und höchsten GP-Konzentration behandelt wurden, ein signifikanter Unterschied des Gesamtcardiolipingehalt ermittelt werden (Abbildung 3.9 C).

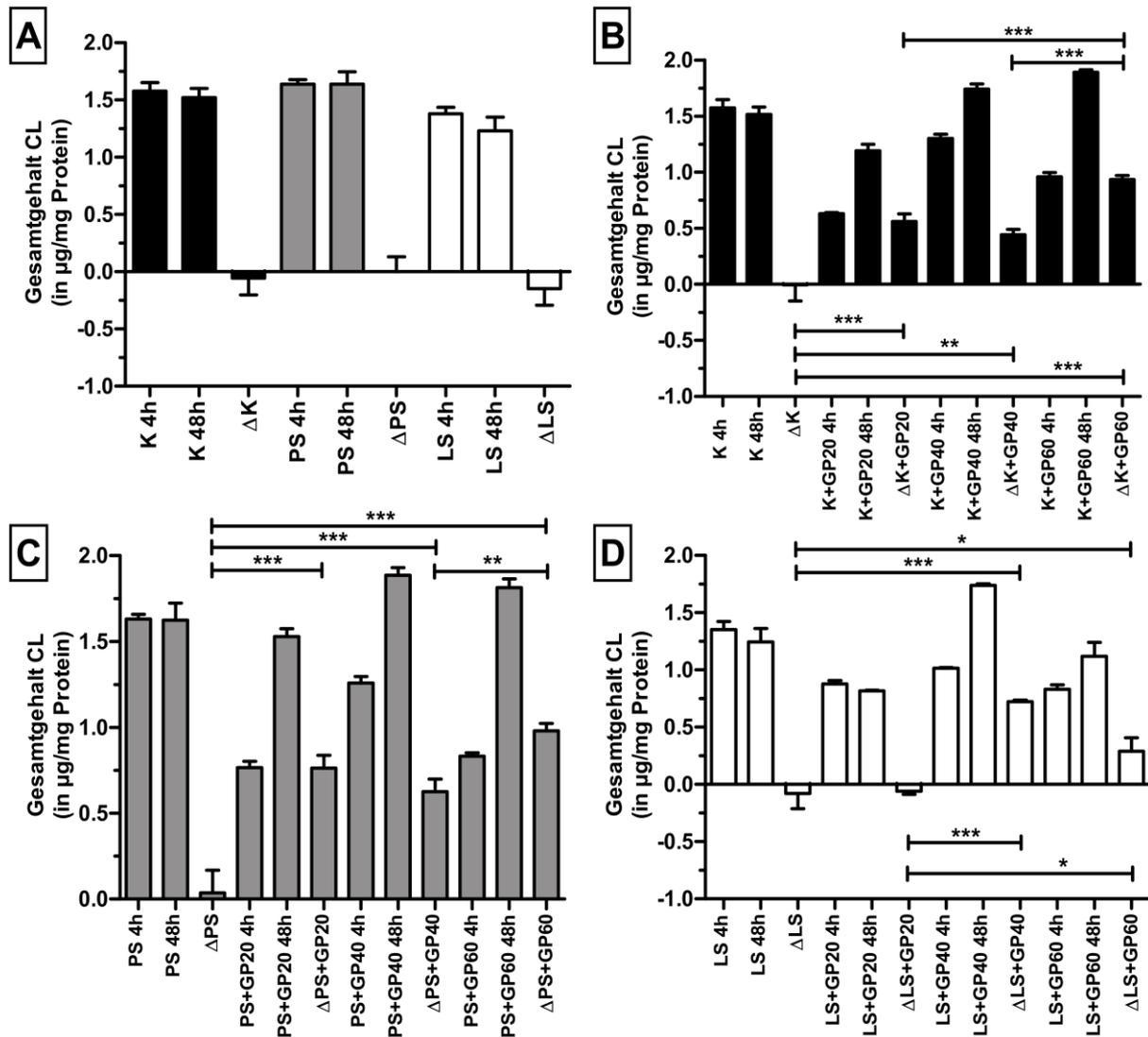


Abbildung 3.9: Darstellung des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes. A: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes in der Kontrollgruppe, sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure. B: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. C: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. D: Verlauf der zellulären Gesamtcardiolipingehaltes der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005.

Die Linolsäure, die in der Cardiolipinkomposition den größten Anteil ausmacht, hatte initial keinen Einfluss auf den Gesamtcardiolipingehalt nach Langzeitexposition. Es zeigte sich in der Koinkubation mit *G. pentaphyllum* jedoch erneut ein differentes Bild. Bereits nach 4 h Behandlungszeit konnte in allen eingesetzten GP-Dosierungen eine Verringerung des Gesamtcardiolipingehaltes ermittelt werden (LS+GP20 rund 35 % auf $0,88\pm 0,03$ µg/mg Protein, LS+GP40 rund 26 % auf $1,02\pm 0,01$ µg/mg Protein, LS+GP60 rund 40 % auf $0,83\pm 0,04$ µg/mg Protein). Verglichen mit den Effekten von GP in der Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure behandelten Zellen nach 48 h führte *G. pentaphyllum* in der mittleren und höchsten Konzentration in der Betrachtung der Differenzwerte zwischen 48 h und 4h zu einer signifikanten Steigerung des Gesamtgehaltes um 70 % auf $1,74\pm 0,02$ µg/mg Protein (Abbildung 3.9 D).

3.5.2 Veränderungen des Gehaltes an oxidiertem Cardiolipin nach Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Als Ausdruck für oxidative Prozesse in den Mitochondrien, getriggert durch die mitochondriale Bildung von ROS, wurden die kultivierten Hepatozyten nach 4h und 48h Inkubationszeit auf den prozentualen Gehalt an oxidierten Cardiolipin untersucht. Dazu wurde als Referenzspezies für oxidative Veränderungen des Cardiolipins (C18:2)₃-monohydroxylinoleyl-Cardiolipin verwendet.

In der Kontrollgruppe zeigte sich nach Langzeitexposition von 48 h mit Insulin und Glukose im Vergleich zur Kurzzeitexposition von 4 h ein leichter Rückgang des oxidierten Cardiolipins. Dieser war statistisch nicht signifikant. Unter der Behandlung mit Palmitinsäure konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 4 h Behandlungszeit keine Veränderung des Anteils an oxidiertem Cardiolipin beobachtet werden. Nach Langzeitexposition mit Palmitinsäure zeigte sich ein tendenzieller Anstieg des oxidativ veränderten Phospholipids um etwa 10 % auf $0,56\pm 0,05$ µg/mg Protein, der jedoch wie in der Kontrollgruppe auch, keine Signifikanz zeigte. Der nach 48 h ermittelte Wert in den mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten unterschied sich zur Kontrollgruppe ebenfalls nicht. Unter dem Einfluss der Linolsäure kam es nach 48 h zu einer massiven Steigerung des prozentualen Anteils an oxidiertem Cardiolipin um mehr als 260 % auf $1,67\pm 0,06$ µg/mg Protein. In der Analyse der Differenz zwischen dem nach 48 h und nach 4 h ermittelten Wert war der Gehalt an oxidierten Cardiolipin in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten signifikant höher, als in der Kontrollgruppe und den mit Palmitinsäure inkubierten Zellkulturen (Abbildung 3.10 A).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des ethanolischen Extraktes aus *G. pentaphyllum* auf die Bildung von oxidativ verändertem Cardiolipin untersucht. In der Kontrollgruppe konnte ein Anstieg des oxidativ veränderten Phospholipids bereits nach 4 h Inkubation gemessen werden. Hier zeigte sich eine Erhöhung des oxidierten Cardiolipins in allen eingesetzten Konzentrationen des Extraktes (GP20 $1,03\pm 0,02$ µg/mg Protein, GP40 $0,87\pm 0,03$ µg/mg Protein, GP60 $0,99\pm 0,02$ µg/mg Protein). Es zeigte sich zudem, dass im Vergleich zur niedrigsten und höchsten

eingesetzten Konzentration von *GP* die mittlere Dosis den geringsten Anstieg an oxidiertem Cardiolipin aufwies. Auch nach Langzeitexposition in der Zellkultur konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48 h in allen eingesetzten *GP*-Dosierungen ein erhöhter Anteil an oxidiertem Cardiolipin ermittelt werden. Hierbei zeigte sich insbesondere auch in der mittleren und höchsten Konzentration von *GP* eine deutliche Erhöhung des oxidierten Cardiolipins nach Langzeitexposition. Bezogen auf die Differenzwertanalyse zwischen zweitem und ersten Messzeitpunkt konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 3.10 B).

Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch in den mit Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten ab. In allen mit *GP* behandelten Kulturen war bereits nach 4 h Inkubationszeit ein höherer Anteil an oxidiertem Cardiolipin, verglichen mit den nur mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten, messbar. So kam es zu einer Steigerungen in den mit *GP20* behandelten Kulturen um 60 % auf $0,82 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein, in den mit *GP40* behandelten Hepatozyten zu einem Anstieg um 94 % auf $0,99 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein und zu einem Zuwachs in den mit *GP60* behandelten Zellen um 80 % auf $0,92 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein. Durch Inkubation mit *G. pentaphyllum* und Palmitinsäure war der Anteil an oxidiertem Cardiolipin nach 48 h in allen mit *GP* behandelten Hepatozyten höher, als in den nur mit Palmitinsäure behandelten Zellkulturen. Der höchste prozentuale Anteil an oxidativ verändertem Cardiolipin von 80 % konnte in der Gruppe mit *GP40* behandelten Hepatozyten ermittelt werden (PS+*GP40* $1,77$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in der Differenz des oxidieren Cardiolipins nach 48 h und 4 h ermittelt werden (Abbildung 3.10 C).

Die Linolsäure führte in der Langzeitexposition zu einem dramatischen Anstieg von oxidiertem Cardiolipin. Dieser Effekt war ebenso in den mit *G. pentaphyllum* behandelten Zellkulturen nachweisbar. Bereits nach 4 h Inkubation mit dem Extrakt kam es zu einer Steigerung in allen eingesetzten Konzentrationen, verglichen zu den nur mit Linolsäure behandelten Zellen. In der niedrigsten *GP*-Dosierung kam es nach Langzeitexposition zu einem Anstieg von etwa 70 % auf $1,57 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein. Bei den mit *GP40* behandelten Hepatozyten konnte die höchste Steigerung des oxidativ veränderten Cardiolipins von nahezu 240 % auf $3,33 \pm 0,39$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein gemessen werden. Betrachtet man jedoch die Differenzwerte zwischen dem nach 48 h ermittelten Wert an oxidierten Cardiolipin mit dem nach 4 h konnte sowohl in der niedrigsten, als auch in der höchsten *GP* – Konzentration ein signifikant niedrigerer Zuwachs ermittelt werden, als in der Gruppe, die ohne *Gynostemma* behandelt wurde. Im Vergleich hierzu war der Zuwachs an oxidierten Cardiolipin in den mit Linolsäure und *GP40* behandelten Hepatozyten im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant höher (Abbildung 3.10 C).

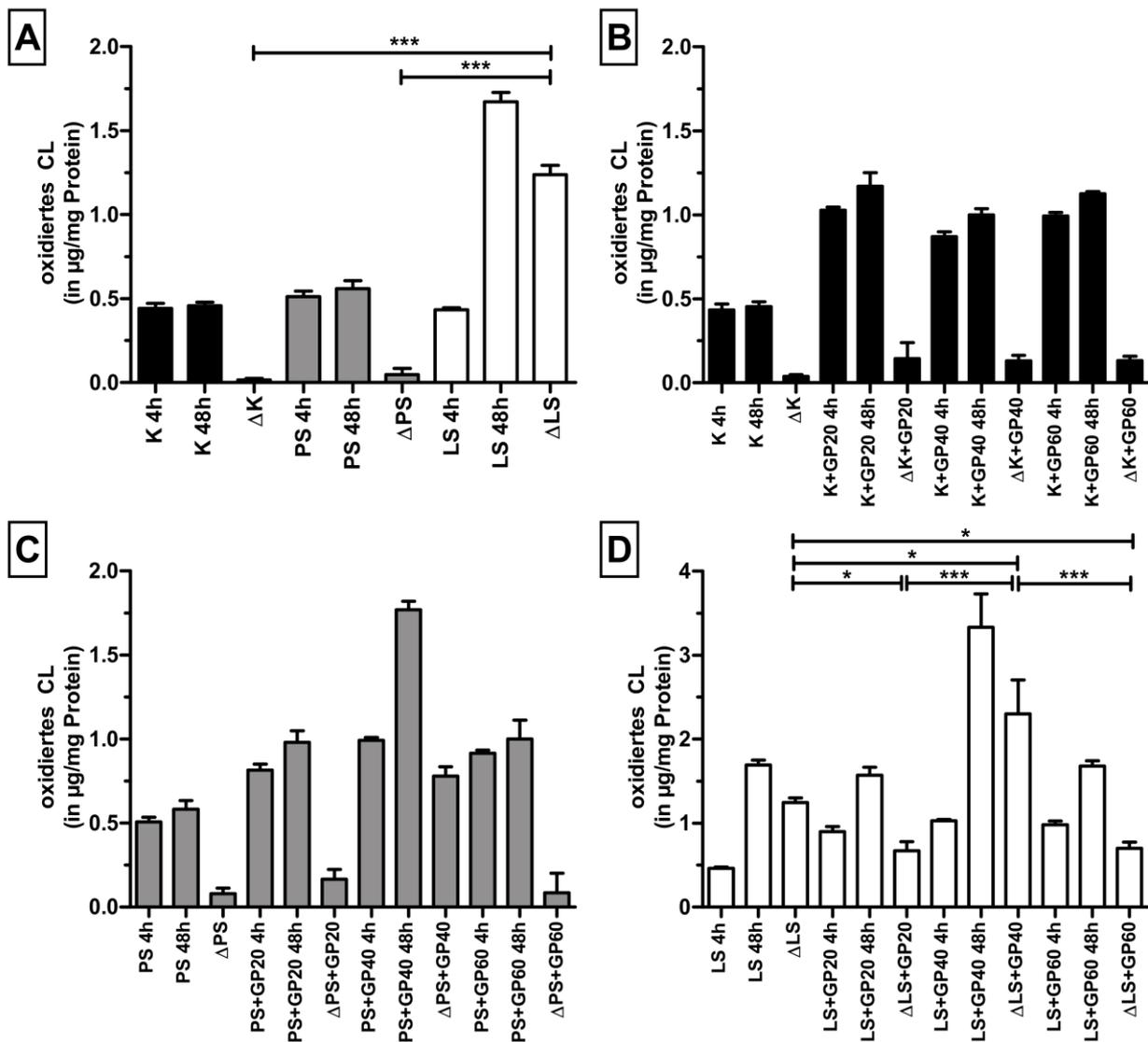


Abbildung 3.10: Darstellung des oxidierten Cardiolipins (als (C18:2)₃-monohydroxylinolsäure-CL). A: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes in der Kontrollgruppe sowie nach Zugabe von Palmitin- und Linolsäure. B: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes der Kontrollgruppe mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. C: Verlauf des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes der Palmitinsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. D: Verlauf der zellulären Isoprostankonzentration der Linolsäure-inkubierten Hepatozyten mit Zusatz von *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; *p<0.05, ***p<0.005.

3.5.3 Veränderungen der Speziesverteilung des Cardiolipins unter der Behandlung mit Palmitin- und Linolsäure – Wirkung von *G. pentaphyllum*

Cardiolipin ist ein Phospholipid, das über zwei Phosphatgruppen insgesamt vier unterschiedliche Fettsäuren binden kann. Die Komposition der Fettsäuren ist nicht nur für die Möglichkeit der Oxidation der Fettsäuren entscheidend, sondern kann durch Veränderung des Sättigungsgrades zu sterischen Konfigurationsänderungen führen. Dies kann eine differente Bindung von Proteinen in der mitochondrialen Membran bedingen.

Im ersten Teil der Experimente erfolgte die Untersuchung der Cardiolipinzusammensetzung unter der Bedingung hoher Insulin- und Glukosekonzentrationen mit und ohne Zusatz von Palmitinsäure und Linolsäure. Es wurden insgesamt sieben Cardiolipinspezies untersucht [(C18:2)₄-CL, (C18:2)₃/C18:1-CL, (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL, (C18:2)₃/C16:1-CL, (C18:2)₃/C20:3-CL, (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL, (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL]. Bei den beiden Spezies (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL und (C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL konnte mit den angewandten Methoden auf Grund der gleichen Masse beider Verbindungen keine eindeutige Zuordnung getroffen werden und werden folgend in der Darstellung (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL betrachtet. Prozentual bezogen auf die Summe aller analysierten CL – Spezies, zeigte sich in allen Zellkulturen eine ähnliche Struktur der Verteilung der bestimmten Cardiolipinspezies. Hierbei war das (C18:2)₄-CL am stärksten vertreten. Die weiteren analysierten Vertreter waren nach absteigender Reihenfolge wie folgt vertreten: (C18:2)₃/C18:1-CL > (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL > (C18:2)₃/C16:1-CL > (C18:2)₃/C20:3-CL > (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL > (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden konnte eine signifikante Erhöhung von (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL in den mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt werden. Es traten keine weiteren Veränderungen der Cardiolipinzusammensetzung nach Kurzzeitexposition auf. Nach einer Langzeitexposition von 48 h konnten jedoch weitere Unterschiede in den Anteilen der Fettsäuren gemessen werden. So zeigte sich in der Kontrollgruppe nach 48 h ein Anstieg von (C18:2)₄-CL um etwa 5 %, sowie eine Reduktion von (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL um fast 22 %. In der Langzeitbehandlung mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure konnten keine Veränderungen in der Zusammensetzung der gemessenen Cardiolipinspezies gezeigt werden. Auch in der Langzeitexposition mit Linolsäure über 48 h zeigte sich verglichen mit der Kurzzeitbehandlung nach vier Stunden kein wesentlicher Unterschied in der Komposition der CL-Spezies. Lediglich in der Spezies (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL konnte eine Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 19 % berechnet werden (Tabelle 1).

Im zweiten Teil der experimentellen Arbeiten wurde der Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die prozentuale Verteilung der gemessenen Fettsäurereste im Cardiolipin nach Kurzzeit- und Langzeitexposition mit und ohne Inkubation von Palmitinsäure und Linolsäure untersucht. Bereits nach vier Stunden zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Reduktion des Hauptvertreters (C18:2)₄-CL. So zeigte sich in allen *GP*-Konzentrationen eine Reduktion um etwa 12 %. In den mit *GP*20 behandelten Zellen konnte zudem eine Erhöhung folgender Cardiolipinspezies ermittelt werden: (C18:2)₃/C18:1-CL um 5 %, (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 35 %, (C18:2)₃/C16:1-CL um 36 % und (C18:2)₃/C20:3-CL um 33 %. Ebenso konnte in der mittleren *GP*-Konzentration (*GP*40) eine Erhöhung von (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 22 %, (C18:2)₃/C16:1-CL um 38 % und (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL um 54 % ermittelt werden. In der Kontrollgruppe mit Zusatz von *GP*60 war eine Erhöhung von (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 21 % und von (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL um 11 %

zu sehen. In der Langzeitexposition zeigte sich ein ähnliches Bild unter der Behandlung mit *G. pentaphyllum*. In der niedrigsten *GP*-Konzentration kam es nach 48 h Exposition zu einem Anstieg aller gemessenen Cardiolipinspezies. Dieser Unterschied der Cardiolipinkompositionen war sowohl in der mittleren, als auch der höchsten *GP*-Dosierung vorhanden (Tabelle 2).

Auch in den mit Palmitinsäure und *GP* behandelten Zellen konnte ein ähnlich differentes Bild der Zusammensetzung der Cardiolipinspezies nachgewiesen werden. Nach Kurzzeitexposition kam es erneut zu einem Verlust der Hauptspezies (C18:2)₄-CL in allen eingesetzten *GP*-Konzentrationen. Dieser Verlust führte zur kompensatorischen Steigerung des Anteils der anderen gemessenen Spezies. In der niedrigsten *GP*-Dosis kam es zu einem Anstieg von (C18:2)₃/C18:1-CL um 6 %, (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 20 %, (C18:2)₃/C16:1-CL um 35 %, (C18:2)₃/C20:3-CL um 22 % und (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL um 37 %. In der mittleren *GP*-Konzentration kam es zu einer Steigerung des Anteils von (C18:2)₃/C18:1-CL um 5 %, (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 19 %, (C18:2)₃/C16:1-CL um 51 %, (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL um 10 % und (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL um 27 % verglichen mit den nur mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten. Dieser Trend war auch in den Zellkulturen mit der höchsten *GP*-Dosis erkennbar. Nach Langzeitexposition mit Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* zeigte sich jedoch ein weitaus heterogeneres Bild. In der niedrigsten *GP*-Dosis war lediglich eine Erhöhung von (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL, (C18:2)₃/C16:1-CL und (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL messbar. In der mittleren *GP*-Dosierung fand sich verglichen mit den nur mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten eine Erhöhung von (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL, (C18:2)₃/C16:1-CL, (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL und (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL, jedoch auch eine erkennbare Reduktion von (C18:2)₃/C18:1-CL und (C18:2)₃/C20:3-CL. In der höchsten eingesetzten *GP*-Konzentration konnte ein Anstieg von (C18:1)₂-CL, (C18:2)₃/C16:1-CL, sowie C18:1/C16:0-CL ermittelt werden (Tabelle 3).

Die bereits in der Kontrollgruppe und in der mit Palmitinsäure behandelten Gruppe mit *GP*-Inkubation beschriebenen Effekte waren auch in den mit Linolsäure und *GP* inkubierten Zellkulturen messbar. Es kam bereits nach vier Stunden zu einer signifikanten Reduktion von (C18:2)₄-CL in den hier eingesetzten *GP*-Konzentrationen. Betrachtet man die anderen analysierten Cardiolipinspezies kann eine teilweise Kompensation des Verlustes an (C18:2)₄-CL gesehen werden. So zeigte die niedrigste *GP*-Dosis nach 4 h eine deutliche Steigerung des Anteils an (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL um 30 %, (C18:2)₃/C16:1-CL um 40 %, (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL um 12 % und (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL/(C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL um 23 %. Dieser Trend war auch in der mittleren *GP*-Konzentration nachweisbar. *GP*60 wies lediglich einen Anstieg des Anteils in (C18:2)₂/(C18:1)₂-CL (32 %), (C18:2)₃/C20:3-CL (20 %) und (C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL (69 %) auf. Der reduzierende Effekt von *GP* auf die Reduktion des Hauptvertreter (C18:2)₄-CL war auch nach Langzeitexposition mit Linolsäure und den eingesetzten Konzentrationen von *G. pentaphyllum* nachweisbar. So war der Anteil von (C18:2)₄-CL in allen mit *GP* inkubierten Hepatozyten niedriger,

als in den Zellkulturen, die nur mit Linolsäure behandelt wurden. Der kompensatorische Effekt, der bereits in der Kontrollgruppe und der Palmitinsäuregruppe zu erkennen war, zeigte sich in den mit Linolsäure und *GP* behandelten Hepatozyten nur teilweise. So konnte in der niedrigsten *GP*-Dosis lediglich ein Anstieg von $(C18:2)_2/C18:1/C16:0-CL // (C18:1)_2/C18:2/C16:1-CL$ um 28 % nachgewiesen werden. Betrachtet man die Verteilung in der nächst höheren *GP*-Dosierung, war eine Erhöhung des Anteils von $(C18:2)_2/(C18:1)_2-CL$ um 37 % und $(C18:2)_2/C18:1/C16:0-CL // (C18:1)_2/C18:2/C16:1-CL$ um 12 % ermittelbar. Es kam sogar zu einer Reduktion von $(C18:2)_3/C20:3-CL$ um 13 %. Jedoch zeigte sich in der höchsten eingesetzten *GP* - Konzentration im Vergleich zu den nur mit Linolsäure behandelten Hepatozyten nach 48 h Inkubationszeit ein Anstieg des Anteils von $(C18:2)_2/(C18:1)_2-CL$ um 26 %, $(C18:2)_3/C16:1-CL$ um 20 %, $(C18:2)_3/C20:3-CL$ um 13 %, $(C18:2)_2/C18:1/C16:1-CL$ um 42 % und $(C18:2)_2/C18:1/C16:0-CL // (C18:1)_2/C18:2/C16:1-CL$ um 26 % (Tabelle 4).

Molekulare CL - Spezies	Gehalt molekularer CL – Spezies in % der Summe aus den gemessenen Spezies					
	K 4 h	K 48 h	PS 4 h	PS 48 h	LS 4 h	LS 48 h
(C18:2) ₄ -CL	49,52 ± 0,09	50,92 ± 0,39	49,11 ± 0,20	50,33 ± 0,18 *	49,52 ± 0,22	50,94 ± 0,25 ***
(C18:2) ₃ /C18:1-CL	28,66 ± 0,15	28,37 ± 0,17	28,75 ± 0,14	29,28 ± 0,22 ***	29,16 ± 0,36	28,53 ± 0,27 *, a
(C18:2) ₂ /(C18:1) ₂ -CL	7,77 ± 0,10	7,52 ± 0,12	8,59 ± 0,15	7,85 ± 0,17	7,76 ± 0,18	7,83 ± 0,12 a
(C18:2) ₃ /C16:1-CL	5,48 ± 0,13	5,01 ± 0,20	5,39 ± 0,15	5,01 ± 0,11 ***	5,33 ± 0,13	5,17 ± 0,26 ***, a
(C18:2) ₃ /C20:3-CL	3,80 ± 0,08	3,35 ± 0,12	3,83 ± 0,07	4,00 ± 0,12 ***	3,81 ± 0,04	3,78 ± 0,11 a
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:1-CL	3,20 ± 0,07	3,00 ± 0,09	3,27 ± 0,06	3,01 ± 0,07 ***	3,06 ± 0,07	3,01 ± 0,19 ***, b
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:0-CL// (C18:1) ₂ /C18:2/C16:1-CL	1,38 ± 0,04	1,08 ± 0,04	1,39 ± 0,03	1,08 ± 0,04 *	1,30 ± 0,04	1,28 ± 0,04 *

Tabelle 1: Effekte von Palmitin- und Linolsäure auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen. 1x10⁶ Zellen/ml der primären Hepatozytenkultur wurde mit 10 mM Glukose und 10⁻⁷ M Insulin (Kontrolle: K), sowie mit 100 µM Palmitinsäure (Palmitinsäure: PS) oder 100 µM Linolsäure (Linolsäure: LS) inkubiert. Die Verteilung der Cardiolipinspezies wurde nach 4 und 48 h Inkubationszeit bestimmt. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; die statistische Analyse und Darstellung basiert auf der Analyse des Differenzwertes zwischen dem ermittelten Wert nach 48 h und 4 h Inkubationszeit; * p<0,05 bezogen auf die Kontrollgruppe, *** p<0,005 bezogen auf die Kontrollgruppe; ^a p<0,005 bezogen auf die Palmitinsäuregruppe, ^b p<0,05 bezogen auf die Palmitinsäuregruppe.

Molekulare CL - Spezies	Gehalt molekularer CL – Spezies in % der Summe aus den gemessenen Spezies							
	K 4 h	K 48 h	K + GP20 4 h	K + GP20 48 h	K + GP40 4 h	K + GP40 48 h	K + GP60 4 h	K + GP60 48 h
(C18:2) ₄ -CL	49,52 ± 0,09	50,92 ± 0,39	43,71 ± 0,08	50,94 ± 0,21	43,44 ± 0,20	43,24 ± 0,34 ***	43,23 ± 0,23	43,61 ± 0,21 ***
(C18:2) ₃ /C18:1-CL	28,66 ± 0,15	28,37 ± 0,17	29,55 ± 0,06	29,20 ± 0,19	28,61 ± 0,06	28,42 ± 0,20	28,15 ± 0,21	28,42 ± 0,12
(C18:2) ₂ /(C18:1) ₂ -CL	7,77 ± 0,10	7,52 ± 0,12	10,50 ± 0,10	10,53 ± 0,10	9,51 ± 0,17	9,45 ± 0,03	9,45 ± 0,07	9,47 ± 0,11
(C18:2) ₃ /C16:1-CL	5,48 ± 0,13	5,01 ± 0,20	7,50 ± 0,19	5,80 ± 0,06	7,59 ± 0,12	8,30 ± 0,22 ***	5,61 ± 0,06	7,63 ± 0,05 ***, a
(C18:2) ₃ /C20:3-CL	3,80 ± 0,08	3,35 ± 0,12	5,06 ± 0,07	4,56 ± 0,11	3,67 ± 0,09	3,35 ± 0,08	3,53 ± 0,11	3,59 ± 0,06 ***
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:1-CL	3,20 ± 0,07	3,00 ± 0,09	3,21 ± 0,05	3,72 ± 0,09	4,94 ± 0,04	4,89 ± 0,03	3,57 ± 0,04	3,65 ± 0,07
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:0-CL// (C18:1) ₂ /C18:2/C16:1-CL	1,38 ± 0,04	1,08 ± 0,04	1,58 ± 0,09	1,50 ± 0,08	1,35 ± 0,02	1,66 ± 0,04 *	1,30 ± 0,03	1,61 ± 0,03 *

Tabelle 2: Effekte von *G. pentaphyllum* auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen. 1×10^6 Zellen/ml der primären Hepatozytenkultur wurde mit 10 mM Glukose und 10^{-7} M Insulin (Kontrolle: K) inkubiert. Die Hepatozytenkulturen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen eines ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum* über insgesamt 48 h behandelt (GP20=100 µg/ml, GP40=200 µg/ml, GP60=300 µg/ml). Die Verteilung der Cardiolipinspezies wurde nach 4 und 48 h Inkubationszeit bestimmt. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; die statistische Analyse und Darstellung basiert auf der Analyse des Differenzwertes zwischen dem ermittelten Wert nach 48 h und 4 h Inkubationszeit; * p<0,05 bezogen auf K+GP20, *** p<0,005 bezogen auf K+GP20; ^a p<0,005 bezogen auf K+GP40.

Molekulare CL - Spezies	Gehalt molekularer CL – Spezies in % der Summe aus den gemessenen Spezies							
	PS 4 h	PS 48 h	PS + GP20 4 h	PS + GP20 48 h	PS + GP40 4 h	PS + GP40 48 h	PS + GP60 4 h	PS + GP60 48 h
(C18:2)₄-CL	49,11 ± 0,20	50,33 ± 0,18	43,81 ± 0,34	47,05 ± 0,32	43,11 ± 0,19	43,79 ± 0,25 *	47,16 ± 0,48	47,38 ± 0,29 ***
(C18:2)₃/C18:1-CL	28,75 ± 0,14	29,28 ± 0,22	30,45 ± 0,15	29,65 ± 0,16	30,19 ± 0,26	28,64 ± 0,13	30,29 ± 0,10	28,66 ± 0,17
(C18:2)₂/(C18:1)₂-CL	8,59 ± 0,15	7,85 ± 0,17	10,43 ± 0,12	9,57 ± 0,02	10,22 ± 0,13	10,32 ± 0,12 *	10,18 ± 0,15	10,06 ± 0,04
(C18:2)₃/C16:1-CL	5,39 ± 0,15	5,01 ± 0,11	7,27 ± 0,14	6,31 ± 0,11	8,17 ± 0,15	5,45 ± 0,04 ***	8,67 ± 0,15	5,63 ± 0,11 ***
(C18:2)₃/C20:3-CL	3,83 ± 0,07	4,00 ± 0,12	4,69 ± 0,08	4,12 ± 0,11	3,97 ± 0,04	3,44 ± 0,05	5,09 ± 0,06	3,80 ± 0,06 ***, a
(C18:2)₂/C18:1/C16:1-CL	3,27 ± 0,06	3,01 ± 0,07	4,49 ± 0,11	4,21 ± 0,18	3,63 ± 0,07	3,47 ± 0,05	4,54 ± 0,15	3,22 ± 0,07 ***, a
(C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL// (C18:1)₂/C18:2/C16:1-CL	1,39 ± 0,03	1,08 ± 0,04	1,31 ± 0,06	1,22 ± 0,05	1,77 ± 0,02	1,79 ± 0,05	1,52 ± 0,04	1,67 ± 0,06

Tabelle 3: Effekte von Palmitinsäure und *G. pentaphyllum* auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.

1x10⁶ Zellen/ml der primären Hepatozytenkultur wurde mit 10 mM Glukose und 10⁻⁷ M Insulin und 100 µM Palmitinsäure (Palmitinsäure: PS) inkubiert. Die Hepatozytenkulturen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen eines ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum* über insgesamt 48 h behandelt (GP20=100 µg/ml, GP40=200 µg/ml, GP60=300 µg/ml). Die Verteilung der Cardiolipinspezies wurde nach 4 und 48 h Inkubationszeit bestimmt. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; die statistische Analyse und Darstellung basiert auf der Analyse des Differenzwertes zwischen dem ermittelten Wert nach 48 h und 4 h Inkubationszeit; * p<0,05 bezogen auf PS+GP20, *** p<0,005 bezogen auf PS+GP20; ^a p<0,005 bezogen auf PS+GP40.

Molekulare CL - Spezies	Gehalt molekularer CL – Spezies in % der Summe aus den gemessenen Spezies							
	LS 4 h	LS 48 h	LS + GP20 4 h	LS + GP20 48 h	LS + GP40 4 h	LS + GP40 48 h	LS + GP60 4 h	LS + GP60 48 h
(C18:2) ₄ -CL	49,52 ± 0,22	50,94 ± 0,25	44,52 ± 0,60	45,33 ± 0,27	42,73 ± 0,13	42,69 ± 0,32	43,29 ± 0,12	44,36 ± 0,25
(C18:2) ₃ /C18:1-CL	29,16 ± 0,36	28,53 ± 0,27	28,62 ± 0,15	30,53 ± 0,08	30,21 ± 0,24	29,3 ± 0,17 ***	28,56 ± 0,10	28,81 ± 0,25 ***, b
(C18:2) ₂ /(C18:1) ₂ -CL	7,76 ± 0,18	7,83 ± 0,12	10,08 ± 0,02	9,74 ± 0,16	9,26 ± 0,10	10,60 ± 0,09 ***	10,25 ± 0,13	9,86 ± 0,07^a
(C18:2) ₃ /C16:1-CL	5,33 ± 0,13	5,17 ± 0,26	7,41 ± 0,16	4,84 ± 0,25	7,73 ± 0,07	5,85 ± 0,10	5,40 ± 0,11	6,23 ± 0,11 ***, a
(C18:2) ₃ /C20:3-CL	3,81 ± 0,04	3,78 ± 0,11	3,82 ± 0,04	4,50 ± 0,05	4,30 ± 0,07	3,29 ± 0,04 ***	4,59 ± 0,11	4,28 ± 0,05 ***, a
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:1-CL	3,06 ± 0,07	3,01 ± 0,19	3,43 ± 0,04	2,82 ± 0,06	4,67 ± 0,06	3,40 ± 0,09	5,17 ± 0,03	4,26 ± 0,17
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:0-CL// (C18:1) ₂ /C18:2/C16:1-CL	1,30 ± 0,04	1,28 ± 0,04	1,60 ± 0,04	1,67 ± 0,05	1,84 ± 0,05	1,46 ± 0,03 ***	1,24 ± 0,03	1,61 ± 0,06^a

Tabelle 4: Effekte von Linolsäure und *G. pentaphyllum* auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.

1x10⁶ Zellen/ml der primären Hepatozytenkultur wurde mit 10 mM Glukose und 10⁻⁷ M Insulin und 100 µM Linolsäure (Linolsäure: LS) inkubiert. Die Hepatozytenkulturen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen eines ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum* über insgesamt 48 h behandelt (GP20=100 µg/ml, GP40=200 µg/ml, GP60=300 µg/ml). Der Gehalt an Cardiolipin wurde nach 4 und 48 h Inkubationszeit bestimmt. Alle Werte sind als MW±SEM dargestellt, n=6; die statistische Analyse und Darstellung basiert auf der Analyse des Differenzwertes zwischen dem ermittelten Wert nach 48 h und 4 h Inkubationszeit; * p<0,05 bezogen auf LS+GP20, *** p<0,005 bezogen auf LS+GP20; ^a p<0,005 bezogen auf LS+GP40, ^b p<0,05 bezogen auf LS+GP40.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Betrachtungen zum gewählten *in vitro* – System und dessen Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil der Experimente ein *in vitro* – Modell aus primären Hepatozyten der Wistar-Ratte genutzt, um den Einfluss von Palmitin- und Linolsäure bei hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen auf die Viabilität, Akkumulation von Lipiden und oxidativen Stress zu untersuchen. Das gewählte Modell ermöglicht eine selektive Betrachtung der vorgegebenen Bedingungen ohne Beeinflussung durch andere Parameter, wie systemische Einflüsse (z.B. zirkadiane Rhythmik, hormonelle Veränderungen, pharmakodynamische und pharmakokinetische Aspekte) und unzureichende Erfassung von Wechselwirkungen durch andere hepatische Zelltypen (z.B. Kupffer-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, phagozytierenden Zellen).

In dieser Arbeit wurden primäre Hepatozytenkulturen unter hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen über insgesamt 48 h kultiviert. Unter ähnlichen Bedingungen konnten Klein et al. zeigen, dass der für die Glykolyse notwendige stimulierende Effekt von Insulin nahezu komplett aufgehoben ist und die Glycogensyntheserate um ca. 33 % reduziert war (Klein et al. 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass diese beschriebenen Effekte nicht mit einer verminderten intrazellulären Signaltransduktion (gemessen an der Phosphorylierung von IRS-1, IRS-2 und Akt durch den Insulinrezeptor) verbunden waren. Zudem bestand keine Einschränkung der Glukoseaufnahme in primären Hepatozytenkulturen durch hohe Insulinkonzentrationen. Derartige Veränderungen des zellulären Glukosemetabolismus mit verminderter intrazellulärer Vermittlung der Insulinsignaltransduktion findet man auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II (Boden 2008). Demnach scheint das hier gewählte *in vitro* – Modell geeignet zu sein, um den Einfluss von Fettsäuren bei bestehender oder sich entwickelnder Insulinresistenz, die bei Patienten mit NAFLD oftmals auftritt (Gudson et al. 2014), zu untersuchen.

Des Weiteren wurde der Effekt von Fettsäuren auf die Bildung von NO verbunden mit hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen untersucht. Hepatozyten, die durch Kollagenase-perfusion aus Rattenlebern isoliert wurden, sezernieren unterschiedlich hohe Mengen von Nitrit in das Kulturmedium nach der Isolation. Wie Tirmenstein et al. zeigen konnten, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Isolation und der Freisetzung von Nitrit (Tirmenstein et al. 2000). Dies beruht sowohl auf einer verstärkten mRNA-Expression, als auch einer verstärkten Bildung von nachweisbaren Mengen an Protein von iNOS. Die Autoren konnten zeigen, dass vier Stunden nach der Isolation der Hepatozyten aus Sprague-Dawley-Ratten das Maximum an nachweisbarer mRNA der iNOS erreicht war. Dies war verbunden mit einer gesteigerten Proteinexpression der iNOS, die acht Stunden nach der Isolation nochmals deutlich zunahm. Bezieht man diese Daten auf die in Abbildung 3.4 dargestellte Nitrit/Nitrat-Konzentration im Kulturmedium der primären

Hepatozytenkulturen vier Stunden nach Isolation, müsste der gemessene Nitrit/Nitrat-Gehalt in allen untersuchten Gruppen im gleichen Maße gestiegen sein. Dies war jedoch nicht der Fall. So zeigten die mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten einen signifikant höheren Nitrit/Nitrat-Gehalt, als die Kontrollgruppe und die Gruppe, die mit Linolsäure behandelt wurde. Wie Müller et al. zeigen konnten, war die Proteinexpression der iNOS zwischen der Kontrollgruppe und der mit Linolsäure inkubierten Hepatozytenkulturen vier Stunden nach der Isolation der Zellen vergleichbar, wohingegen, die mit Palmitinsäure behandelten Zellen ein deutlich höheres Proteinlevel der iNOS nach vier Stunden aufwiesen (Müller et al. 2010). Demnach scheint in der vorliegenden Arbeit die Isolation der Hepatozyten mittels Kollagenaseperfusion auf die Proteinexpression der iNOS keine signifikante Rolle zu spielen.

Im zweiten Teil der hier dargestellten Experimente wurde der Einfluss eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma pentaphyllum* auf die Viabilität, die Akkumulation von Lipiden und den Einfluss auf Marker des oxidativen Stress untersucht. Bislang wurde eine potentielle toxische Wirkung von *Gynostemma pentaphyllum* auf primäre Hepatozytenkulturen nicht untersucht und es gibt auch keine Hinweise darauf, dass *GP* in nicht-malignen Zellkulturen bzw. in *in vivo* – Studien toxische Nebenwirkungen aufweist. So zeigten Attawish et al. in Wistar-Ratten und Chiranthan et al. in Sprague-Dawley-Ratten, die hohe Konzentrationen an *GP* per os erhielten, keine signifikanten Änderungen der Blutbildung, der Transaminasen, der Retentionsparameter Creatinin und Harnsäure, sowie der Serumelektrolyte (Attawish et al. 2004, Chiranthan et al. 2013). Daher war es zu Beginn der Untersuchungen an primären Hepatozytenkulturen anzunehmen, dass es zu keinen toxischen Wirkungen durch *G. pentaphyllum* kommt. Insbesondere die in Abbildung 3.1 und 3.3 dargestellte dosisabhängige Verbesserung des zellulären Proteingehaltes und der gesteigerten Zellviabilität in der Trypanblaufärbung durch *GP* stützt die Annahme, dass durch die Inkubation mit dem ethanolischen Extrakt keine toxischen Nebenwirkungen im gewählten *in vitro* – Modell entstanden sind.

Die experimentellen Bedingungen, die in dieser Arbeit gewählt wurden, können jedoch nicht die gesamte Stoffwechsellage von Patienten mit einer Insulinresistenz und/oder einer NAFLD widerspiegeln. Insbesondere andere hormonelle Einflüsse (wie Glucokortikoide) und inflammatorische Komponenten, die bei Patienten mit dieser Stoffwechselerkrankung eine Komponente der Pathogenese darstellen, wurden nicht betrachtet. Dennoch eignet sich das vorliegende *in vitro* – Modell zur Untersuchung isolierter Einflüsse von Fettsäuren auf den wesentlichen Aspekt der NAFLD – der Lipidakkumulation.

4.2 Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren führt zu einer Verminderung der Viabilität

4.2.1 Linolsäure bewirkt eine verstärkte Reduktion der Viabilität in primären Hepatozytenkulturen

Im ersten Teil der experimentellen Untersuchungen wurde die Veränderung der Viabilität von primären Hepatozytenkulturen unter unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen in Kombination mit Palmitin- und Linolsäure untersucht. Zur Beurteilung der Viabilität dienten die Messung des zellulären Proteingehaltes, die Trypanblaufärbung und die Messung des reduzierten MTT. Alle drei Methoden haben unterschiedliche Wertigkeit in der Beurteilung der Viabilität der Zellkulturen. Eine Verringerung des zellulären Proteingehaltes entspricht einem Verlust an Zellen, die durch die Kulturbedingungen in Apoptose gegangen oder nekrotisch geworden sind. In der Trypanblaufärbung kann man keine Unterscheidung zwischen apoptotischen oder nekrotischen Zellen machen. Der Farbstoff wird bedingt durch seine chemische Struktur und durch die bestehende Semipermeabilität der Zellmembran von Zellen aufgenommen, bei denen entweder die Integrität der Zellmembran geschädigt ist oder die nicht mehr in der Lage sind, ihr Membranpotential aufrecht zu erhalten. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran und stabilen Membranpotential werden durch Trypanblau nicht angefärbt. Zum dritten erfolgte die Messung von reduziertem MTT als Maß für die metabolische Aktivität der Hepatozytenkulturen. MTT wird in Abhängigkeit von der Konzentration von intrazellulären Reduktionsäquivalenten reduziert und kann indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität von sowohl mitochondrialen als auch zytosolischen Dehydrogenasen zulassen.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt wurde, kommt es unabhängig vom Zusatz der Fettsäure zu einer Reduktion des zellulären Proteingehaltes vom ersten Messpunkt nach vier Stunden zum zweiten Messpunkt nach 24 Stunden. Dieser Verlust an Protein war jedoch zum dritten Zeitpunkt konstant. Ebenso konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine deutlichen Unterschiede in der Konzentration des reduzierten MTT nachgewiesen werden. Auffallend war jedoch eine Reduktion der Zellviabilität in der Trypanblaufärbung. Hier konnte in allen drei Gruppen eine Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden, wobei die mit Palmitinsäure behandelten Hepatozytenkulturen nach 48 Stunden eine vergleichbare Verringerung ihrer Viabilität aufwiesen wie die Kontrollgruppe. Signifikant unterschiedlich war zu diesen beiden Gruppen jedoch diejenige, die mit Linolsäure über 48 Stunden inkubiert wurden. Hier kam es zu einer drastischen Reduktion der Zellviabilität um mehr als 20 %.

In der Literatur wird der Effekt von Fettsäuren unterschiedlichen Charakters hinsichtlich ihres Schädigungspotentials kontrovers diskutiert. Li et al. konnten in einer *in vitro* – Studie an isolierten Hepatozyten aus C57BL/6 – Mäusen, die sowohl mit Palmitin-, als auch mit Ölsäure über 24

Stunden inkubiert wurden, eine deutlich erhöhte Apoptose in den mit Palmitinsäure inkubierten Hepatozyten nachweisen (Li et al. 2009). Die niedrigere Apoptoserate in den mit Oleat behandelten Zellen war verbunden mit einer Akkumulation von Triglyceriden. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Hepatozyten *in vitro* durch eine Akkumulation von Triglyceriden vor einer vermehrten Apoptoseinduktion geschützt seien. Auch in einer *in vivo* – Studie von Wang et al. scheinen die ungesättigten Fettsäuren im Gegensatz zu den gesättigten Vertretern eine geringere Neigung zur Zellschädigung zu haben (Wang et al. 2006). In dieser Studie wurde eine Gruppe Wistar-Ratten mit einer Diät mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren (HSAT) ernährt, wohingegen das Futter der zweiten Gruppe einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren (HPUFA) enthielt. In beiden Gruppen kam es nach insgesamt 24 Wochen der Behandlung zu einer Erhöhung der Triglyceride in der Leber. Jedoch nahm der Anteil an gesättigten Fettsäuren in den Triglyceriden in der HSAT – Gruppe deutlich stärker zu als in der HPUFA – Gruppe. Diese Veränderungen des Triglyceridgehaltes und deren Zusammensetzung war verbunden mit einer Steigerung der Caspase-3 – Aktivität und mit Markern des endoplasmatischen Stresses in der HSAT – Gruppe.

Bezieht man diese Daten auf die hier erhobenen Befunde, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Durch die Inkubation mit Linolsäure kam es zu einer Akkumulation von Lipiden, insbesondere von Triglyceriden. Jedoch konnte in diesem experimentellen Ansatz in primären Hepatozytenkulturen kein begünstigender Einfluss der Lipidanreicherung auf die Zellviabilität gesehen werden. Die in der Arbeit von Li et al. gehaltenen primären Hepatozytenkulturen wurden ohne Insulin kultiviert. Pagliassotti et al. konnten jedoch einen protektiven Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität *in vitro* demonstrieren (Pagliassotti et al. 2007). So zeigten die Autoren in H4I13-Zellen, als auch in primären Hepatozyten der Wistar-Ratte, dass Palmitinsäure mit einer Konzentration von 0,25 mM ohne Insulin zu einer starken Zellschädigung durch Aktivierung von Caspase-3 und JNK führt. Dieser Effekt war durch Insulin schon ab einer Konzentration von 1 nM deutlich reduziert. In höheren Insulinkonzentrationen war dieser Effekt sogar noch ausgeprägter. Aus diesen Daten lässt sich rückwirkend auf den hier angewandten *in vitro* – Modell eine durchaus protektive Wirkung von Insulin auf primäre Hepatozytenkulturen unter hoher Insulinkonzentration ableiten.

Neben der Akkumulation von Triglyceriden scheint die Induktion der intrinsischen Apoptose ein wesentlicher Bestandteil bezüglich der Lipotoxizität zu sein. Hierbei spielt die Freisetzung von *Cytc* aus den Mitochondrien in das Zytosol eine bedeutende Rolle. Die Freisetzung von *Cytc* wird unter anderem durch mitochondrialen oxidativen Stress in einer mehrstufigen Reaktion initiiert. Durch Permeabilitätsänderungen der Mitochondrienmembran und Reduktion des mitochondrialen Potentials wird die Freisetzung von *Cytc* und anderen pro-apoptischen Proteinen begünstigt (Adams 2003, Plati et al. 2011). *Cytc* befindet sich als Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette in enger Bindung mit Cardiolipin und ist in seiner Funktionsweise von der Integrität

und chemischen Struktur dieses Phospholipids abhängig (Petrosillo et al. 2001, Petrosillo et al. 2003).

Durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren im Cardiolipin besteht vor allem durch ROS ein hohes Potential für peroxidative Veränderungen. Diese können zu dramatischen Folgen in der Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges führen, welche durch eine Freisetzung von *Cytc* aus den Mitochondrien in das Cytosol getriggert wird. *Cytc* ist in der inneren Mitochondrienmembran mit Cardiolipin assoziiert. Kommt es intramitochondrial zu einer vermehrten Bildung von ROS so steigt die Bildung von peroxidativ veränderten Cardiolipin an und führt somit zu einer Dissoziation von *Cytc* aus dem *Cytc*-Cardiolipin-Komplex sowohl in submitochondrialen Partikeln, als auch in isolierten Lebermitochondrien (Petrosillo et al. 2001, Petrosillo et al. 2003). Kagan et al. untersuchten die Vorgänge der Apoptoseeinleitung durch Veränderungen des Cardiolipin-*Cytc*-Systems in der humanen myeloischen Leukämiezelllinie HL-60, isolierten Lebermitochondrien aus C57BL/J6-Mäusen, sowie in Embryozellen von *Cytc*^{+/+} und *Cytc*^{-/-} (Kagan et al. 2005). Die Autoren konnten eine zeitliche Abfolge von Ereignissen darstellen, die zur Induktion der Apoptose führten. So kam es zuerst zu einer Oxidation von Cardiolipin, die durch Staurosporin und ActinomycinD induziert wurde. Nach dieser radikalischen Veränderung des Phospholipides kam es zwei Stunden später zu einem Freisetzen des *Cytc* und in rascher Folge zu einer Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-7. Die initialen Veränderungen von Cardiolipin wurden durch *Cytc* selbst induziert, so dass die Autoren zu dem Schluss kamen, dass *Cytc* als Cardiolipin-Peroxidase unter dem Einfluss von H₂O₂ wirken und somit die Initiation der intrinsischen Apoptose regulieren kann. Die Peroxidation von Cardiolipin führt auch zu einer geringeren Bindungsaffinität zwischen den beiden Partnern durch eine Verringerung der Hydrophobizität und zu einer Veränderung der Konformation (Shidoji et al. 1999).

Für die Peroxidationsvorgänge und die Integrität des *Cytc*-Cardiolipin-Systems spielt Stickstoffmonoxid eine bedeutende Rolle, wie bereits Osipov et al. demonstrieren konnten (Osipov et al. 2006). Ähnliche Befunde bezüglich der Peroxidaseaktivität von *Cytc* erhoben auch Vlasova et al. in *Cytc*-Cardiolipin-Komplexen, die mit H₂O₂ oxidiert und mit den NO-Donatoren PAPANONOate und DEANOate inkubiert wurden (Misra et al. 2006). Wie die Autoren zeigen konnten, reduziert NO die Peroxidation von Tetralinoleylcardiolipin nach H₂O₂-Begasung. Dass NO bei der Peroxidation von Fettsäuren eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wurde auch durch Hiramoto et al. nachgewiesen (Hiramoto et al. 2003). Die Autoren induzierten in Lebermikrosomen der Maus mittels Fe²⁺ oxidativen Stress und inkubierten diese mit aufsteigenden Konzentrationen von NO. Durch die Behandlung der Mikrosomen mit Fe²⁺ kam es als Zeichen der Lipidperoxidation zu einem starken Anstieg der TBARS nach einer Stunde, welche durch NO in aufsteigenden Konzentrationen erheblich reduziert werden konnte. Neben dem direkten Einfluss auf die Expression von regulatorischen Elementen der Apoptose werden jedoch auch Einflüsse von NO

auf die Regulation der Induktion der intrinsischen Apoptose diskutiert. So zeigten Li et al. in primären Hepatozytenkulturen, in denen durch $\text{TNF}\alpha$ und ActinomycinD Apoptose induziert wurde, dass es sowohl durch die Gabe des NO-Donor SNAP, als auch durch Expressionssteigerung der iNOS durch Transfektion mit adenovirale Vektoren, zu einer Verringerung der Apoptose kam (Li et al. 1999). Unter dem Einfluss von NO konnte die zuvor durch $\text{TNF}\alpha$ und ActinomycinD bedingte Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials verbessert und die Freisetzung von *Cytc* deutlich vermindert werden. Die Rolle von NO hinsichtlich anti-apoptotischer Einflüsse ist jedoch weitaus komplexer. So ist bekannt, dass NO regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung von Caspasen hat. Alle Caspasen weisen Cysteinreste in ihrer katalytischen Domäne auf, die sehr empfindlich für Redoxmodifikationen, wie S-Nitrosylierungen, sind. NO ist durch S-Nitrosylierung von Caspase-1 und Caspase-3 in der Lage, die proteolytische Aktivität dieser apoptotischen Proteine zu reduzieren (Li et al. 1997, Kim et al. 2000). NO kann ebenso die Proteinexpression von Proteinen der Bcl-2 – Familie regulieren. Genaro et al. konnten in B-Lymphozyten der Milz zeigen, dass unter der Gabe des NO-Donors SIN-1 und Isosorbiddinitrat sowohl die mRNA –, als auch die Proteinexpression von Bcl-2 erhöht werden konnte (Genaro et al. 1995). Des Weiteren schützt NO vor der Freisetzung von *Cytc* aus den Mitochondrien in das Zytosol durch Aufrechterhaltung des Bcl-2 – Proteinlevels, durch Hemmung der Bildung des Apoptosoms und durch Hemmung der Aktivität von Caspase-9 in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (Kim et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter der Behandlung mit Palmitinsäure bereits nach vier Stunden Inkubationszeit gegenüber der Kontrollgruppe und den Linolsäure-behandelten Zellkulturen zu einem signifikanten Anstieg der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium gekommen ist. Dieser Effekt war nach 48 Stunden sogar noch stärker ausgeprägt. Es ist vorstellbar, dass auch primäre Hepatozytenkulturen der Wistar-Ratte ähnliche anti-apoptotische Effekte aufweisen, wie in den oben beschriebenen Versuchsansätzen. Es bleibt an dieser Stelle jedoch offen, welchen Einfluss NO unter der Gabe von Fettsäuren mit unterschiedlichem Charakter auf die Stabilisierung von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Proteinen hat.

4.2.2 Die Behandlung mit *G. pentaphyllum* verbessert die Viabilität von primären Hepatozytenkulturen

Gynostemma pentaphyllum führte nach einer Exposition von 48 Stunden in primären Hepatozytenkulturen konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung des zellulären Proteingehaltes sowie zu einer Verbesserung der Zellviabilität. Es konnte durch die Gabe des ethanolischen Extraktes die Reduktion der Viabilität in den Zellkulturen, die mit Linolsäure inkubiert wurden, deutlich entgegengewirkt werden. Diese Veränderungen der Viabilitätsparameter deuten auf einen protektiven Effekt von *GP* hinsichtlich der Induktion von Apoptose in primären Hepatozytenkulturen hin.

Dass *G. pentaphyllum* einen Einfluss auf regulatorische Proteine der Apoptose hat, konnten Shang et al. *in vitro* in kortikalen Neuronen, in denen durch Glutamat oxidativer Stress induziert wurde, nachweisen (Shang et al. 2006). In dem von Shang et al. genutzten Modell wurde durch Glutamat eine verstärkte oxidative Schädigung und Apoptose induziert, die mit einer Zunahme von MDA, einem Verlust an GSH und einer Steigerung der Apoptose einherging. Glutamat führte zudem zu einer Reduktion der Bcl-2- und zu einer Steigerung der Bax-Expression. Die Behandlung der kortikalen Neuronen mit Gypenosiden bewirkte eine Veränderung des Expressionsmusters dieser Apoptose-regulierenden Proteine mit Steigerung der Expression von Bcl-2 und Reduktion der Expression von Bax. Ähnliche Beobachtungen machten auch Zhao et al. in einem Ischämie-/Reperusionsmodell der Leber an C56BL/6-Mäusen (Zhao et al. 2014). Zunächst wurde in dieser Studie eine Ischämie durch das Abklemmen der V. portae und der A. hepatica über eine Stunde initiiert, der sich eine Reperusionsdauer von sechs Stunden anschloss. Um Effekte von *G. pentaphyllum* nachzuweisen, wurde den Mäusen 30 min vor Beginn der Ischämiephase *GP* oral angeboten. In den Mäusen, die zuvor kein *GP* erhalten hatten, zeigten sich nach der Reperusionsphase ein deutlicher Anstieg des MDA, sowie eine Reduktion des GSH/GSSG-Quotienten, was auf einen Verbrauch von GSH zurückzuführen ist. Diese Effekte konnten durch *G. pentaphyllum* deutlich reduziert werden. Die oxidative Schädigung der Leber durch die Ischämie/Reperfusion war verbunden mit einer deutlich reduzierten Expression von Bcl-2, einer vermehrten Expression von Bax und einem verstärkten *Cytc*-Release in das Cytosol. Zeitgleich konnte eine erhöhte Aktivität von Caspase-3 und Caspase-8 gemessen werden. Unter *GP* konnte sowohl die Aktivität beider Caspasen, aber auch der cytosolische Release von *Cytc* und die Expression von Bax deutlich gesenkt und die Expression von Bcl-2 gesteigert werden. Dass es aber auch zu pro-apoptotischen Effekten von *Gypenosiden* spezifisch in Tumorzelllinien kommt, ist bekannt. Schild et al. wiesen in C6 – Gliomazellen einen Apoptose-induzierenden Effekt von *G. pentaphyllum* nach (Schild et al., 2010). Die *in vitro* – Inkubation mit aufsteigenden *GP*-Konzentrationen führte zu einer verstärkten Induktion von ROS, gemessen an der Fluoreszenzintensität von DCFH-DA, und zu einer gesteigerten Aktivität der SOD. Gleichzeitig war die Behandlung der Gliomazelllinie mit *GP* verbunden mit einer Steigerung der Aktivität von Caspase-3. Interessanterweise war die Behandlung von primären Astrozytenkulturen mit *G. pentaphyllum* nicht mit einer Induktion der Apoptose verbunden. Ähnliche Effekte wiesen Wang et al. in der humanen Hepatomazelllinie Huh-7 nach (Wang et al. 2007). *Gypenoside* führten in dem gewählten experimentellen Ansatz zu einer vermehrten Bildung von ROS und einem erhöhten Einstrom von Calcium in die Mitochondrien. Hieraus kam es zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials. Der Zusammenbruch des Membranpotentials war zudem verbunden mit einem zunehmenden *Cytc*-Release und mit einer Umverteilung von Bax und Bcl-2. Die eingesetzten *Gypenoside* führten zu einer verstärkten Einlagerung von Bax in der mitochondrialen Membran und zu einem vermehrten Auslagern von Bcl-2 in das Cytosol. Ähnliche

Befunde zeigten auch Hsu et al. in der Zelllinie WEHI-3, sowie Lin et al. in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und in einem Xenograftmodell (Hsu et al. 2011, Lin et al. 2011).

4.3 Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren führt zu einer unterschiedlich ausgeprägten Lipidakkumulation

4.3.1 Die Behandlung mit Linolsäure führt zu einer drastischen Akkumulation von Lipiden

Die NAFLD ist durch eine zunehmende Steatose der Hepatozyten, insbesondere aber durch eine Akkumulation von Triglyceriden charakterisiert (Puri et al. 2007). Zudem findet man im Serum von Patienten mit einer NAFLD häufig erhöhte Glukose- und Insulinkonzentrationen, die eine gestörte hepatische Utilisierung der Blutglukose und somit eine Insulinresistenz der Leber darstellt. Ein wichtiges Charakteristikum der NAFLD ist die Erhöhung der nicht-veresterten Fettsäuren im Serum der Patienten (Diraison et al. 2003). Es besteht aktuell jedoch keine eindeutige Studie, die zeigen konnte, welchen Einfluss sowohl die Länge, als auch der Sättigungscharakter einer Fettsäure auf die Bildung dieser Lipidakkumulate hat.

Basierend auf den Daten von Diraison et al. und Puri et al. wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Hepatozytenkulturen unter dem Einfluss einer unphysiologisch hohen Konzentration von Insulin und Glukose über einen Zeitraum von 48h kultiviert und deren Potential auf die Bildung von Lipidakkumulaten untersucht (Diraison et al. 2003, Puri et al. 2007). In 3.3 wurde demonstriert, dass es ohne Einfluss von Fettsäuren zu keiner wesentlichen Anhäufung der Gesamtlipide und der Triglyceride kam, wohingegen in den Versuchsansätzen mit Palmitin- und Linolsäure ein erhöhter Anteil nachweisbar war. Im Gegensatz zur gesättigten Palmitinsäure führte Linolsäure nach 48 Stunden Inkubationszeit zu einer deutlicheren Akkumulation der Gesamtlipide, der Triglyceride und des Cholesterols. Der Charakter der Fettsäure scheint demnach großen Einfluss auf das Potential der Steatose von Hepatozyten zu haben.

Ähnliche Befunde konnten Ricchi et al. in der humanen Hepatomazelllinie HepG2, sowie in WRL68- und HuH7-Zellen nachweisen (Ricchi et al. 2009). Unter der Inkubation mit Palmitinsäure kam es in allen untersuchten Zelllinien zu einer geringeren konzentrationsabhängigen Akkumulation von Lipiden und insbesondere Triglyceriden, als durch die einfach ungesättigte Oleinsäure. Diese Anhäufung von Lipiden in den Hepatozyten war verbunden mit einer erhöhten Expression von PPAR γ und SREBP-1 und einer verminderten Expression von PPAR α in den mit Oleinsäure behandelten Zellen. PPAR γ und SREBP-1 spielen in der Regulation der de novo Lipogenese eine bedeutende Rolle und zeigen auch bei Patienten mit NAFLD eine gesteigerte Expression (Kohjima et al. 2007). PPAR α hingegen ist ein wichtiger Regulator für Enzyme der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren und somit deren Abbau (Rao, Reddy 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Hepatozytenkulturen mit unphysiologisch hohen Konzentrationen von Insulin und Glukose gehalten. Hyperinsulinämie und Hyperglykämie, wie sie im Rahmen einer Insulinresistenz auch bei der NAFLD anzutreffen ist, können ebenso zu einer Veränderung der Expression von Enzymen führen, die den hepatischen Fettsäuremetabolismus regulieren. Hier scheint vor allem SREBP-1c eine bedeutende Rolle zu spielen. Wie Halaas et al. in *ob/ob* Mäusen, die auf Grund einer Mutation des Leptingens übergewichtig und insulinresistent sind, zeigen konnten, führt die Inaktivierung des SREBP-1 – Gens in der Leber der Tiere zu einer starken Reduktion der Triglyceridakkumulation (Halaas et al. 1995). Des Weiteren reguliert SREBP-1c die Expression der Acetyl-CoA – Carboxylase. Dieses Enzym bewirkt eine Überladung der Zellen mit Malonyl-CoA und somit eine Hemmung der β -Oxidation von Fettsäuren durch Blockade der Carnitin-Palmitoyl-Transferase1 (CPT-1) (McGarry et al. 1977, Abu-Elheiga et al. 2000, Horton et al. 2003).

Wie Puri et al. gezeigt haben, besteht der größte Anteil von Fettsäureresten der hepatischen Triglyceride von Patienten mit NAFLD aus einfach- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Puri et al. 2007). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Linolsäure durch unterschiedliche Mechanismen zu einer Anhäufung von Triglyceriden geführt hat. Palmitinsäure scheint dabei präferentiell über die β -Oxidation metabolisiert zu werden, wohingegen die β -Oxidation von Linolsäure energetisch ungünstiger zu sein scheint. Der mögliche Einfluss von Linolsäure auf die Steigerung der Expression von SREBP-1c und PPAR γ und somit einer verstärkten *de novo* Lipogenese könnte ebenso zur verstärkten Triglyceridakkumulation geführt haben. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um das Potential der Fettsäuren auf die Expression von Enzymen des Fettsäuremetabolismus in primären Hepatozytenkulturen unter den hier gewählten Grundbedingungen hinreichend zu klären.

4.3.2 Die Inkubation mit Palmitinsäure induziert die zelluläre Bildung von NO

Im ersten Teil der experimentellen Untersuchungen wurde der Einfluss der beiden Fettsäuren Palmitin- und Linolsäure auf die Bildung und Freisetzung von NO in das Kulturmedium unter unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen untersucht. Bereits nach vier Stunden Inkubationszeit zeigte sich in den mit Palmitinsäure behandelten Zellkulturen eine signifikante Steigerung der Nitrit/Nitrat-Konzentration verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Hepatozyten, die mit Linolsäure behandelt wurden, zeigten eine signifikante Verringerung der Nitrit/Nitrat-Konzentration sowohl in Bezug zur Kontrollgruppe, als auch zu den mit Palmitinsäure inkubierten Zellen. Dieser Effekt war nach insgesamt 48 Stunden Inkubationszeit noch ausgeprägter.

Wie Müller et al. zeigen konnten, ist dieser Anstieg mit einer Veränderung der Proteinexpression der iNOS verbunden (Müller et al. 2010). Hierbei führte die Behandlung mit Palmitinsäure zu einer signifikanten Erhöhung des Proteins, tendenziell bereits nach 4h, signifikant jedoch nach 48 h. Im

Gegensatz dazu kam es durch die Behandlung mit Linolsäure lediglich zu einem leichten Anstieg der iNOS-Expression. Diese *in vitro* – Daten bestätigen die von Wan et al. gezeigten *in vivo* – Effekte einer Palmitinsäure-basierten Diät (Wan et al. 2000). Die Autoren zeigten in ihrem experimentellen Setting neben einer verstärkten Enzymaktivität von iNOS auch eine deutlich erhöhte Expression des Proteins in Palmitinsäure-behandelten Wistar-Ratten. Die Palmitinsäure-basierte Diät führte zudem zu einer Akkumulation von Triglyceriden und Cholesterol in der Leber, wohingegen es zu keiner wesentlichen Anhäufung der Lipide in der Gruppe der Linolsäure-basierten Fütterung kam. Die Tiere, die mit einer Linolsäure-angereicherten Diät behandelt wurden, zeigten zwar auch eine gesteigerte Aktivität und Proteinexpression der iNOS, diese war aber tendenziell niedriger, als in den Tieren, die Palmitinsäure-basiertes Futter erhielten. Wan et al. diskutierten die Expressions- und Aktivitätssteigerung der iNOS als Folge der Lipidakkumulation in den Palmitinsäure-gefütterten Tieren.

Dass eine pharmakologische Blockade der NO-Bildung zu einer Erhöhung der freien Fettsäuren, Triglyceriden und des Cholesterols im Blut führen kann, wurde durch Khedara et al. in einem *in vivo* – Modell an Wistar-Ratten, die den NOS-Inhibitor L-NNA erhielten, gezeigt (Khedara et al 1996). Die serologischen Veränderungen wurden in Zusammenhang mit einer verringerten Aktivität der CPT in den mit L-NNA behandelten Tieren gebracht. Die CPT stellt ein Schlüsselenzym der β -Oxidation von Fettsäuren durch die Mitochondrien dar. Demnach wird durch die Autoren postuliert, dass es durch die pharmakologische Blockade der NOS zu einer eingeschränkten Kapazität der Leber zum Abbau von Fettsäuren über die β -Oxidation kommt und somit das vermehrte Auftreten von sowohl freien Fettsäuren, als auch Triglyceriden im Serum der Tiere zu erklären ist. Diese Ergebnisse konnte durch die Gruppe von Goto et al. in Wistar-Ratten, die ebenfalls L-NNA erhielten, bestätigt werden (Goto et al. 1999). Hinzu kam jedoch auch ein tendenzieller Anstieg von Triglyceriden in der Leber von L-NNA-behandelten Tieren.

Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung der NOS bezüglich regulatorischer Mechanismen, die zur Bildung von Lipiddepots führen, wurden von Schild et al. durchgeführt (Schild et al. 2008). In homozygoten knock-out Modellen der eNOS und nNOS in C57BL/6-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es durch den knock-out von eNOS zu einer Anhäufung von Fett, aber auch Glycogen in den Hepatozyten kommt. Die fehlende endogene Produktion von NO durch die eNOS führte auch zu einer Steigerung der Aktivität der Citratsynthase in Relation zur Aktivität von Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette, sowie der Aktivität von Komplex I+III der mitochondrialen Atmungskette in den gewonnenen Leberhomogenaten. Es wird von Schild et al. die Möglichkeit diskutiert, dass es sowohl durch die gesteigerte Enzymaktivität der Citratsynthase, als auch von Komplex I+III der mitochondrialen Atmungskette zu einer Erhöhung der cytosolischen Konzentration von Citrat kommt. Ein Aufstau von Citrat kann zu einer Stimulation der Bildung von Acetyl-CoA durch die ATP-abhängige Citratlyase führen. Dieses Enzym wird als Schlüsselenzym

der *de novo* Lipogenese betrachtet. Demnach ist es nach Interpretation der Autoren möglich, dass durch, was folglich zu einer Stimulation der Acetyl-CoA-Bildung durch die ATP-abhängige Citratlyase führt. Die ATP-anhängige Citratlyase stellt das Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese dar und kann somit die *de novo* Lipogenese begünstigen.

Dass im Umkehrschluss eine Steigerung der NO-Bildung durch den NO-Donor GSNO zu einer Senkung der Cholesterol- und Fettsäuresynthese führt, zeigten Roediger et al. *in vitro* an isolierten Hepatozytenkulturen aus Wistar-Ratten, die mit Butyrat behandelt wurden (Roediger et al. 2004). Ilan et al. konnten ebenso einen inversen Zusammenhang zwischen Triglyceridakkumulation und NO-Bildung *in vitro* an isolierten Hepatozyten nachweisen (Ilan et al. 2005). Durch die Inkubation mit einer Lipidemulsion kam es zu einer sukzessiven Steigerung der intrazellulären Triglyceride nach insgesamt 48 h. Dies war verbunden mit einer Verringerung des NO-Release in das Zellkulturmedium um 67 % und mit einer Erhöhung der ROS-Bildung um 250 % in Abhängigkeit von der Konzentration der Lipidemulsion. Zudem konnten Ilan et al. zeigen, dass es durch die Gabe der Lipidemulsion zu einer Reduktion der mRNA von iNOS und eNOS, sowie des iNOS-Proteins kam. Inwiefern Länge und Sättigungsgrad bei den eben beschriebenen Effekten eine Rolle spielen, konnte jedoch nicht abgeleitet werden. In der eingesetzten Lipidemulsion war der Anteil von Palmitinsäure mit 4 % gegenüber dem Anteil von Linolsäure mit 19,5 % weitaus niedriger, als in den hier eingesetzten dosisäquivalenten Konzentrationen der Fettsäuren.

4.3.3 Die Gabe von *G. pentaphyllum* bewirkt eine Reduktion der Lipidakkumulation in primären Hepatozytenkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma pentaphyllum* in Kombination mit Palmitin- und Linolsäure unter unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen auf die Anreicherung von Lipiden in primären Hepatozytenkulturen der Wistar-Ratte untersucht. Die im ersten Teil der experimentellen Arbeiten vor allem durch Linolsäure bedingte Lipidakkumulation konnte dosisabhängig durch *GP* reduziert werden. Hierbei nahm vor allem der Anteil der Triglyceride unter *GP* – Einfluss konzentrationsabhängig ab.

Dass ähnliche Effekte auch in Tiermodellen nachweisbar sind, konnten Megalli et al. in ihrer Arbeit demonstrieren. Sprague-Dawley-Ratten, in denen mittels Polaxamer 407 eine Hypertriglyceridämie induziert wurde, wurden p.o. mit *GP* oder Atorvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, behandelt (Megalli et al. 2005). *GP* führte zu einer signifikanten Senkung der Triglyceride und des Gesamtcholesterols im Blut nach 4 und 12 Tagen der Behandlung. Dies war auch verbunden mit einer Steigerung der Plasmanitritkonzentration in den mit *GP* behandelten Tieren. Ähnliche Beobachtungen machten auch Qin et al. in einem Tiermodell der Sprague-Dawley-Ratte, die mit einer Diät mit hohem Fett- und Cholesterolanteil gefüttert wurden (Qin et al. 2012). Die Tiere, die zusätzlich über das Trinkwasser *G. pentaphyllum* in aufsteigenden Konzentrationen erhalten

haben, zeigten nach 10 Wochen der Behandlung eine deutliche Reduktion des Triglycerid-, Cholesterol- und Anteils an freien Fettsäuren sowohl in der Leber, als auch im Blut. Es kam zudem zu einer Reduktion der Apoptoserate der Hepatozyten in den mit *GP*-behandelten Tieren.

Ein möglicher Mechanismus, der zur Verringerung der Triglycerid- und Cholesterolakkumulation beiträgt, ist die Induktion der Bildung von Stickoxid. Dass *GP* zu einer dosisabhängigen Steigerung der NO-Bildung in Endothelzellen führen kann, wurde bereits von Tanner et al. in Endothelzellen beschrieben (Tanner et al. 1999). Wie unter 4.3.2 beschrieben, spielt NO in der Regulation des Lipidstoffwechsels eine bedeutende Rolle.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt werden konnte, führt die Behandlung mit *GP* in den mit Linolsäure behandelten Zellkulturen, verglichen mit den ohne *GP*-inkubierten Hepatozyten erst in der höchsten eingesetzten *GP*-Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Nitrit/Nitrat – Konzentration im Kulturmedium. Hingegen konnte schon in der mittleren *GP*-Dosierung eine signifikante Reduktion des Gesamtlipids, der Triglyceride und des Cholesterols bezogen auf die nur mit Linolsäure inkubierten Zellkulturen nachgewiesen werden. Somit scheint die Steigerung der Stickoxidproduktion nicht ausreichend erklärend für die Reduktion der Lipidakkumulate zu sein. Dennoch sind regulatorische Funktionen der gesteigerten NO-Bildung bezüglich der de novo Lipogenese wie in 4.3.2 beschrieben, nicht auszuschließen.

Hier kann eine mögliche Interaktion der mehrfach ungesättigten Linolsäure und *GP* auf die Expression von PPAR α eine entscheidende Rolle spielen. Dass *GP* insbesondere zu einer Induktion von PPAR α in Sprague-Dawley-Ratten, die mit einer Diät aus hohem Fett- und Cholesterolanteil gefüttert wurden und *GP* p.o. erhielten, konnten Qin et al. demonstrieren (Qin et al. 2012). Die Tiere, die *Gypenoside* zusätzlich zur fett- und cholesterolfreien Nahrung bekamen, zeigten eine deutlich höhere Expression der mRNA von PPAR α . Dieser Einfluss von *GP* auf die Expression von PPAR α wurde ebenfalls in HEK293-Zellen und murinen Makrophagen nachgewiesen (Huang et al. 2006). Es bleibt jedoch offen, inwiefern *GP* unter den gewählten Bedingungen *in vitro* einen Einfluss auf die Regulation von Enzymen des Lipidstoffwechsels hat.

4.4 Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Fettsäuren induziert oxidativen Stress

4.4.1 Die Behandlung mit Linolsäure bewirkt eine verstärkte Akkumulation von Lipidperoxidationsprodukten

Lipidperoxidationsreaktionen finden in Abhängigkeit der Bildung von ROS vornehmlich in Zellkompartimenten mit hohen Anteilen mehrfach ungesättigter Fettsäuren statt und stellen ein Korrelat für das Vorhandensein von oxidativem Stress dar. Wichtige Membran-assoziierte ROS – Bildner sind vor allem die mitochondriale Atmungskette und die zellmembrangebundene NADPH-

Oxidase (NOX). Zur Differenzierung von zytosolischen und mitochondrialen oxidativen Veränderungen wurden zwei unterschiedliche massenspektrometrische Analyseverfahren genutzt. Zum einen wurde die Peroxidation von Arachidonsäure, welche zum größten Teil an Phospholipide in zellulären Membranen gebunden ist, untersucht. Zum anderen wurden die Hepatozytenkulturen auf den Gehalt an dem mitochondrial vorkommenden Cardiolipin, den Anteil an oxidierten Cardiolipin und der Speziesverteilung der Fettsäuren analysiert.

In der Literatur wird das Potential von Fettsäuren hinsichtlich der Generierung von oxidativem Stress kontrovers diskutiert. So wird in einigen Studien den gesättigten Fettsäuren ein hohes Maß an schädigenden Eigenschaften zugeschrieben. Srivastava et al. zeigten in einer *in vitro* – Studie in HepG2/C3A-Zellen, dass das Potential zur Bildung von ROS und somit zur Schädigung von Zellen stark vom Charakter der angebotenen Fettsäure abhängt (Srivastava, Chan 2007). Die gewählte Zelllinie wurde über drei Tage hinweg mit Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure behandelt. Zur Beurteilung der Bildung von ROS wurde das Fluorochrom AM-H2-DCFDA eingesetzt. Unter der Gabe von Palmitinsäure über drei Tage kam es zu einem konstanten Anstieg der ROS-Bildung gemessen an der Stärke des Fluoreszenzsignals, wohingegen Oleat und Linolsäure zu keiner wesentlichen Erhöhung der ROS-Produktion führten. Auch zeigten die mit den ungesättigten Fettsäuren behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle keinen wesentlich höheren LDH-Release. Die Basis der Zellschädigung durch ROS wurde mechanistisch weiterführend untersucht und so konnte demonstriert werden, dass es unter der Behandlung mit Palmitinsäure zu einer Verringerung des mitochondrialen Potentials kommt. Ähnliche Zusammenhänge zwischen der Zellschädigung durch Fettsäuren erkannten auch Ricchi et al. in HepG2-, WRL-68- und Huh-7 – Zellen, die mit Palmitinsäure, Oleat und einer Kombination von Palmitinsäure und Oleat über 24h behandelt wurden (Ricchi et al 2009). Palmitinsäure führte im Vergleich zu Oleat zu einer geringfügigeren Triglyceridanreicherung in allen drei Zelllinien, jedoch war die Inkubation mit Palmitinsäure mit einer deutlich höheren Apoptoserate verbunden. Der vermehrte Zelltod in den mit Palmitinsäure versetzten Zellen war mit einer Steigerung der Aktivität von Caspase-3 und Caspase-7 verbunden. Des Weiteren konnten die Autoren demonstrieren, dass der chemische Charakter der Fettsäure einen Einfluss auf die Genexpression von regulatorischen Elementen des Fettstoffwechsels hat. So führte die Behandlung mit Palmitinsäure in HepG2 zu einer verstärkten Expression von PPAR α und einer verminderten Expression von SREBP-1, wohingegen Oleat eine Induktion von PPAR γ und SREBP-1 bewirkte. Die in diesen beiden Arbeiten eingesetzten Zellkulturen leiten sich von primären humanen Hepatomazellen (HepG2) oder vom hepatozellulären Karzinom mit bestehender p53-Mutation (Huh-7) ab. Beide Krebszelllinien zeigen jedoch im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten einige Differenzen auf. Wie De Gottardi et al. in einer Oil-red-O – Färbung zeigen konnten, hatten sowohl HepG2-, als auch Huh-7-Zellen ohne Behandlung mit Fettsäuren ein deutlich höheren Anteil an intrazellulären Lipiden als immortalisierte humane Hepatozytenkulturen (De Gottardi et al. 2007). Zudem konnte

insbesondere in der durch die Autoren durchgeführte Dünnschichtchromatographie gezeigt werden, dass sowohl HepG2-, als auch Huh-7-Zellen ohne Behandlung mit Fettsäuren einen höheren Anteil an Triglyceriden aufwiesen. Demnach scheinen nach Meinung der Autoren diese beiden Zelllinien auf Grund ihrer spontanen Lipidüberladung nicht für Analysen des Lipidstoffwechsels geeignet zu sein. Zudem zeigen Huh-7 – Zellen im Vergleich zu primären Hepatozytenkulturen aus Wistar-Ratten erhebliche Unterschiede in ihrem Verhalten der Glukose- und Laktatbildung. Takagi et al. untersuchten in ihren Arbeiten Unterschiede im Ammoniumstoffwechsel in primären Hepatozyten der Wistar-Ratte und Huh-7-Zellen (Takagi et al. 2000). Hierzu nutzten sie unterschiedliche Medien mit aufsteigender Ammoniumchlorid- und Glukosekonzentration. Unter hoher Glukosekonzentration konnten sie verglichen mit den Primärkulturen einen höheren Laktatanteil im Zellkulturmedium der Huh-7-Zellen nachweisen. Zudem verringerte sich die Glukosekonzentration nur im Zellkulturmedium der Huh-7-Zellen, was auf eine erhöhte Utilisierung der Glukose durch eine verstärkte Glykolyse zurückzuführen ist. Demnach scheinen sich Zelllinien, die sich von primären Tumoren der Leber ableiten, für Analysen sowohl des Glukose-, als auch des Lipidmetabolismus nicht zu eignen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde weisen Differenzen zu den von Srivastava et al. und Ricchi et al. dargestellten Ergebnissen auf (Srivastava, Chan 2007, Ricchi et al. 2009). Beide Autoren zeigten *in vitro*, dass es im Gegensatz zu Öl- und Linolsäure durch Palmitinsäure zu einer verstärkten Apoptose, bedingt durch Veränderungen des mitochondrialen Potentials und durch Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-7, kommt. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den hier dargestellten Folgen der Langzeitexposition mit Palmitinsäure und Linolsäure. In beiden beschriebenen Studien wurden primäre Kulturen verwendet, die sich aus Karzinomzelllinien ableiten. Demnach ist fraglich, ob der Metabolismus der angebotenen Fettsäuren mit primären Hepatozytenkulturen der Wistar-Ratte vergleichbar ist. In beiden *in vitro* – Studien wurden hohe Konzentrationen an Palmitinsäure eingesetzt (Srivastava et al. 0,7 mM; Ricchi et al. 0,33 mM/0,66 mM). In den primären Hepatozytenkulturen wurde für Palmitin- und Linolsäure eine Konzentration von 0,1 mM verwendet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass höhere Konzentrationen von Palmitinsäure in dem hier gewählten primären Zellmodell nicht auch zu einer stärkeren Schädigung der Hepatozyten geführt hätten.

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass ungesättigte Vertreter ein ausgeprägtes Lipotoxizitätspotential haben. So zeigten Zhu et al. in einem *in vivo* – Modell der NAFLD in Sprague-Dawley-Ratten, die zuvor 16 Wochen eine Diät mit hohem Fettanteil erhielten, dass es durch die Fütterung mit fettreicher Nahrung zu einer deutlichen Akkumulation von Triglyceriden in der Leber der Ratten gekommen ist (Zhu et al. 2008). Zur Analyse der peroxidativen Veränderungen in der Leber wurde mittels Massenspektrometrie der Gehalt an F₂-Isoprostanen gemessen. Die Triglyceridanreicherung in der Leber führte hierbei nach 16 Wochen zu einer

Steigerung des Gehaltes der Isoprostane. Dies war auch verbunden mit einer Reduktion der Gesamtaktivität der SOD-Isoformen in der Leber der Tiere, die mit der fettreichen Diät behandelt wurden. Dass auch Patienten mit einer NAFLD erhöhte Level an Isoprostanen aufweisen, zeigte eine Studie von Konishi et al. (Konishi et al. 2006). In einer Kohorte von 14 Patienten mit einer NAFLD zeigten sich deutlich höhere Isoprostankonzentrationen im Plasma als bei gesunden Probanden. Diese Veränderung korrelierte positiv mit dem BMI der Patienten.

Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde mit den Ergebnissen von Zhu et al. findet man einige Parallelen bezüglich der Akkumulation von Isoprostanen in der Leber. Linolsäure führte im Gegensatz zu Palmitinsäure nach 48 Stunden Inkubationszeit zu einer Akkumulation von Lipiden, insbesondere von Triglyceriden. Dies war verbunden mit einer deutlich erhöhten Isoprostankonzentration in den mit Linolsäure behandelten Hepatozytenkulturen. Vergleicht man diese Effekte von Linolsäure mit den von Zhu et al. erhobenen Befunden, zeigt sich eine Korrelation zwischen der Anhäufung von Lipiddepots und der peroxidativen Wirkung dieser auf die Bildung von Isoprostanen (Zhu et al. 2008). Jedoch kann aus der Arbeit von Zhu et al. kein direkter Zusammenhang zwischen der Linolsäure und dem erhöhten Isoprostangehalt geschlossen werden, da in der angebotenen Diät der Gehalt an Linolsäure im Verhältnis zu gesättigten Fettsäuren gering war. Jedoch findet man Hinweise für das Potential der Linolsäure zur Bildung von Isoprostanen bei Turpeinen et al. (Turpeinen et al. 1998). In einer Studie an gesunden Probanden zeigten die Autoren, dass diejenigen, die über vier Wochen eine Linolsäure-reiche Diät erhielten, eine höhere Konzentration an Isoprostanen im Urin aufwiesen, als Probanden, die eine Oleat-haltige Diät bekamen. Zusätzlich konnte bei den Probanden mit Linolsäurediät ein erniedrigter Wert an NO-Metaboliten im Urin gemessen werden. Ob dieser Zusammenhang zwischen einer verstärkten Lipidperoxidation, gemessen am erhöhten Isoprostan-level, und einer verringerten Konzentration von NO-Metaboliten im Urin dieser Probanden direkt miteinander assoziiert ist, konnten die Autoren jedoch nicht beantworten. Diese Daten unterstützen jedoch die in dieser Arbeit erhobenen Befunde, bei denen Linolsäure zu einer verstärkten Bildung von Isoprostanen in den Hepatozyten führte und dies von einer nur schwachen Erhöhung der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium verbunden war. Es bleibt an dieser Stelle jedoch offen, inwiefern Fettsäuren mit unterschiedlichem Charakter bei Patienten mit NAFLD zu Veränderungen von Isoprostanen im Serum oder Urin führen und welche systemischen Einflüsse diese auf die Progression der NAFLD hin zur NASH und auf die Entstehung von Steatose-assoziierten kardiovaskulären Veränderungen haben.

Neben der Bildung von Isoprostanen als Maß für Lipidperoxidationsvorgänge in allen Zellkompartimenten wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Veränderung des Gehaltes an oxidiertem Cardiolipin untersucht. Der Einfluss von Fettsäuren im Rahmen einer Steatosis hepatis auf die Synthese von Phospholipiden wird auch im Zusammenhang mit peroxidativen Schädigungen von

mitochondrialen Vertretern wie Cardiolipin diskutiert. Wie Petrosillo et al. in ihrer Arbeit an Wistar-Ratten, die eine Cholin-defiziente Diät erhielten, zeigen konnten, entwickelten diese Tiere nach 30 Tagen Beobachtungszeitraum eine ausgeprägte Leberparenchymverfettung (Petrosillo et al. 2007). Diese Steatose war mit einer Verminderung des Gesamtgehaltes an Cardiolipin, einer Erhöhung des relativen Anteils an oxidiertem Cardiolipin und einer erhöhten Bildung von H₂O₂ in isolierten Lebermitochondrien verbunden. Zusätzlich untersuchten die Autoren die Rolle der Veränderung des Cardiolipins auf die Funktion der mitochondrialen Atmungskette. Die Tiere, die eine Cholin-defiziente Diät erhielten, zeigten eine verringerte Aktivität von Komplex I sowie eine verminderte ADP-abhängige Respiration. Es bestand zudem ein Zusammenhang zwischen der Reduktion des Cardiolipins und der Aktivität von Komplex I, da durch die Zugabe von Cardiolipin zu isolierten Lebermitochondrien der Cholin-defizienten Tiere eine Verbesserung der Komplex I – Aktivität erreicht wurde. Dass eine Veränderung des Cardiolipins, bzw. der Cardiolipinzusammensetzung auch vom Angebot der Fettsäuren abhängen kann, wurde eindrucksvoll von Aoun et al. in einer *in vivo* – Studie gezeigt (Aoun et al. 2012). In ihren Experimenten erhielten Wistar-Ratten entweder eine Diät, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren war, oder eine Diät mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren. Der Fettanteil der Diäten variierte zwischen 5 und 30 %. In Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der Fettdiät stieg in beiden Gruppen, die einen 30 %-igen Anteil an Fett erhielten, der Cholesterol- und Triglyceridanteil in der Leber, ohne dass es einen Unterschied zwischen dem dominanten Sättigungsgrad gab. Der Anteil der Phospholipide unterschied sich in keiner der untersuchten Gruppen. Den quantitativen Untersuchungen zum Phospholipidgehalt schlossen sich qualitative Analysen an. In der qualitativen Aufarbeitung konnten die Autoren einen Einfluss sowohl des Fettanteils der Diät (5 % vs. 30 %), als auch des prädominanten Fettes in der Diät nachweisen. So zeigten die Tiere, welche 30% einer Fischöl-reichen Diät bekamen verglichen zu den Tieren, die 30 % einer eher gesättigten Diät erhielten, deutlich niedrigere Konzentrationen von Cardiolipin in den Lebermitochondrien. Diese Ergebnisse waren Grundstein für eine weiterführende Analyse der Fettsäureverteilung im Cardiolipin dieser Tiere. Der Gesamtgehalt an gesättigten Fettsäuren im Cardiolipin änderte sich in keiner der Gruppen. Jedoch kam es zu einer deutlichen Reduktion des Anteils an einfach ungesättigten Fettsäuren im Cardiolipin in den Gruppen, die einen 30 %-igen Anteil an Fett in ihrer Diät erhielten, während sich der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in dieser Gruppe deutlich erhöhte.

In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Veränderungen nachgewiesen werden. Durch die Inkubation mit Linolsäure über 48 h kam es zu einer Verringerung des Gesamtgehaltes an Cardiolipin im Vergleich zu den Zellkulturen, die mit Palmitinsäure behandelt wurden. Auch führte die Behandlung mit Linolsäure zu einer deutlich stärkeren Akkumulation von oxidiertem Cardiolipin verglichen mit der Kontrollgruppe und der mit Palmitinsäure gehaltenen Hepatozyten. Verbunden war dies mit einer deutlich stärkeren Akkumulation von Lipiden, insbesondere Triglyceriden. Daher ist es anzunehmen, dass es durch die Behandlung mit Linolsäure verbunden mit einer

Anreicherung von intrazellulären Lipiden es zu einer verstärkten oxidativen Schädigung der Hepatozyten (gemessen an der erhöhten Konzentration des oxidierten Cardiolipins) gekommen ist. Die Mechanismen, die dazu führten, waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit und bedürfen weiteren Untersuchungen.

Die nachgewiesenen Peroxidationen von Arachidonsäure und Cardiolipin dokumentieren jedoch deutlich, dass es in der Kombination aus unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen und Linolsäurebehandlung zu deutlich erhöhten oxidativen Stress in den primären Hepatozytenkulturen kommt. Dies stellt einen wesentlichen Bestandteil in der Pathogenese der Lipotoxizität in der NAFLD dar.

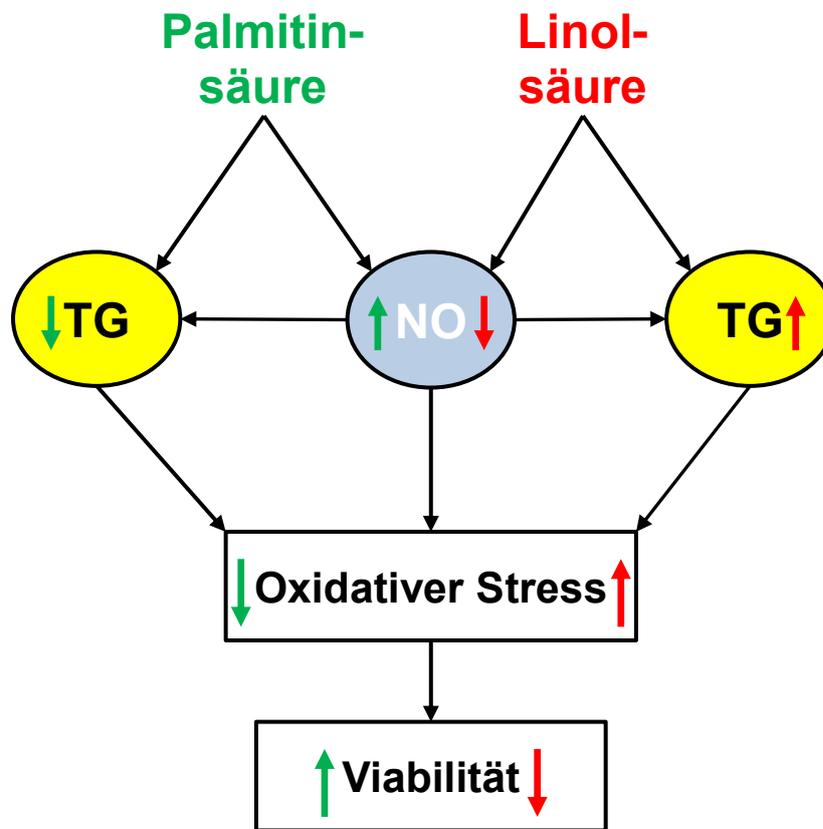


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Effekte von Palmitin- und Linolsäure in primären Hepatozytenkulturen. Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit Palmitin-säure (grüne Pfeile) führte nach 48h zu einer geringeren Akkumulation von Triglyceriden verglichen mit Linolsäure-behandelten Kulturen (rote Pfeile). Die Inkubation mit Palmitinsäure führte nach 48h zu einer stärkeren Bildung von NO (gemessen an der Konzentration von Nitrit/Nitrat im Zellkulturmedium), als in den Zellkulturen, die mit Linolsäure behandelt wurden. Die Anreicherung mit Triglyceriden und die geringere Steigerung der NO-Bildung waren sowohl mit einer erhöhten Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (gemessen am Gehalt von F₂-Isoprostanes und oxidierten Cardiolipin) als Marker für oxidativen Stress, als auch einer verminderten Zellviabilität (gemessen an der Trypanblaufärbung) verbunden.

4.4.2 *G. pentaphyllum* beeinflusst die Bildung von mitochondrialen und zytosolischen Lipidperoxidationsprodukten

Um den Einfluss eines ethanolischen Extraktes von *Gynostemma pentaphyllum* *in vitro* auf die Bildung von zellulären Lipidperoxidationsprodukten zu untersuchen, wurden im zweiten Teil der experimentellen Arbeiten primäre Hepatozytenkulturen unter unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen in Kombination mit Palmitin- oder Linolsäure über 48 Stunden behandelt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen des Gehalts an Isoprostanen, sowie des Gesamtcardiolipingehalts, den Anteil an oxidiertem Cardiolipin und der Speziesverteilung der Fettsäuren erfolgte analog zum ersten Teil der experimentellen Versuche.

Für *Gynostemma pentaphyllum* wurde in mehreren *in vitro* – Studien gezeigt, dass es durch die enthaltenen Saponine und Flavonoide durch Einflussnahme auf die Bildung und Detoxifikation von ROS protektiv im Rahmen von oxidativem Stress wirken kann. Xie et al. konnten zeigen, dass sowohl Aceton- basierte, als auch Ethanol-basierte Extrakte von *G. pentaphyllum* Hydroxylradikale entgiften können (Xie et al. 2010). Dies beruht nach Auffassung der Autoren auf dem hohen Gehalt an Phenolen bzw. Flavonoiden in den Extrakten. Ähnliche radikalsenkende Effekte zeigten Li et al. in humanen neutrophilen Granulozyten (Li et al. 1993). Durch die Behandlung mit *GP* kam es konzentrationsabhängig zu einer Reduktion sowohl von Superoxidradikalen, als auch von Wasserstoffperoxid. Zusätzlich zeigten die Autoren einen ebenso protektiven Effekt hinsichtlich der Bildung von Malondialdehyd (MDA) in Lebermikrosomen von Wistar-Ratten, welche zur Induktion von oxidativem Stress sowohl mit Fe^{2+} , als auch mit Ascorbat inkubiert wurden. Unter der Gabe von *GP* in aufsteigenden Konzentrationen konnte der Gehalt an MDA in beiden Gruppen deutlich gesenkt werden.

Doch nicht nur direkte Radikal-entgiftende Wirkungen wurden für *Gynostemma pentaphyllum* beschrieben. Neben den durch Phenole, Flavonoide und Saponine direkt beschriebenen Effekten wird auch die Aktivität sowie die Expression von Enzymen durch *GP* reguliert, die den Abbau sowohl von O_2^- , als auch von H_2O_2 katalysieren. Schild et al. demonstrierten in primären Astrogliazellkulturen von Wistar-Ratten, die mit *GP* über 48 h behandelt wurden, eine Steigerung der Enzymaktivität der SOD, als auch eine verstärkte Proteinexpression dieses Enzyms und der Glutathionperoxidase (GPx) (Schild et al. 2012). Im Gegensatz zur SOD konnte keine erhöhte Enzymaktivität für die GPx unter *GP*-Stimulation nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Wang et al. in einem *in vivo* – Modell für Morbus Parkinson (Wang et al. 2010). Hier konnte durch die intraperitoneale Gabe von *Gypenosiden* eine Steigerung der SOD-Aktivität und des GSH-Levels erreicht werden, was mit einer Reduktion von Oxidationsprodukten in der Substantia nigra verbunden war.

Neben den beschriebenen Wirkungen von *G. pentaphyllum* als direktes Antioxidans und den Einfluss auf die Expression von ROS-abbauenden Enzymen, scheint bei der Bildung von Lipidperoxidationsprodukten NO eine bedeutende regulatorische Rolle zu spielen. Wie bereits durch Tanner et al. in Endothelzellen beschrieben wurde, führt die Behandlung mit *G. pentaphyllum* zu einem verstärkten NO-Release in bovinen Endothelzellen (Tanner et al. 1999). NO wiederum wirkt als Radikalfänger unter Bildung von Peroxynitrit, welches in hohen Konzentrationen ebenfalls zu verstärkten Peroxidationsvorgängen führen kann.

Ein eindeutiger Mechanismus, der zur Reduktion von Isoprostanen durch die Behandlung mit *Gynostemma pentaphyllum* führte, kann jedoch aus den vorliegenden Untersuchungen nicht abgeleitet werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass es in den Langzeitexpositionsversuchen zu einer Hochregulierung entweder der Aktivität und/oder der Expression von Scavengingenzymen, wie der SOD, in Abhängigkeit der GP-Konzentration kommt. Dieser Effekt könnte in Kombination mit dem chemischen Potential der *Gypenoside*, ROS zu binden, und der Steigerung der NO-Bildung durch GP speziell bei hohen Konzentrationen zu einer potentiell protektiven Wirkung von *G. pentaphyllum* hinsichtlich der Peroxidation von Arachidonsäure führen.

Durch die Inkubation mit *Gynostemma pentaphyllum* kam es zu Veränderungen des Cardiolipingesamtgehaltes, dem Gehalt an oxidiertem Cardiolipin und der Verteilung der Cardiolipinspezies. Änderungen der Komposition von Fettsäuren im Cardiolipin sind sehr eng mit Störungen der mitochondrialen Funktion verbunden. Insbesondere die Funktion der Enzyme der Atmungskette, als auch das Zusammenspiel zwischen *Cytc* und Cardiolipin scheinen von der Fettsäurekomposition und der Oxidation von Cardiolipin abzuhängen (Paradies et al. 2000, Paradies et al. 2002). Zusätzlich besteht durch den hohen Anteil an Linolsäure im Cardiolipin ein hohes Potential zur Peroxidation durch ROS in den Mitochondrien (Wiswedel et al. 2010). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, beeinflusst *G. pentaphyllum* die Zusammensetzung der Cardiolipinspezies. Diese Veränderungen sind charakterisiert durch einen prozentualen Anstieg der gesättigten Fettsäuren im Cardiolipin, was auf einen Einfluss auf die Biosynthese und das Remodelling dieses Phospholipids schließen lässt. Ein höherer Anteil an gesättigten Fettsäuren im Cardiolipin könnte hierbei zu einem Schutz der Hepatozyten vor Einschränkungen der mitochondrialen Funktion und Induktion der Apoptose führen.

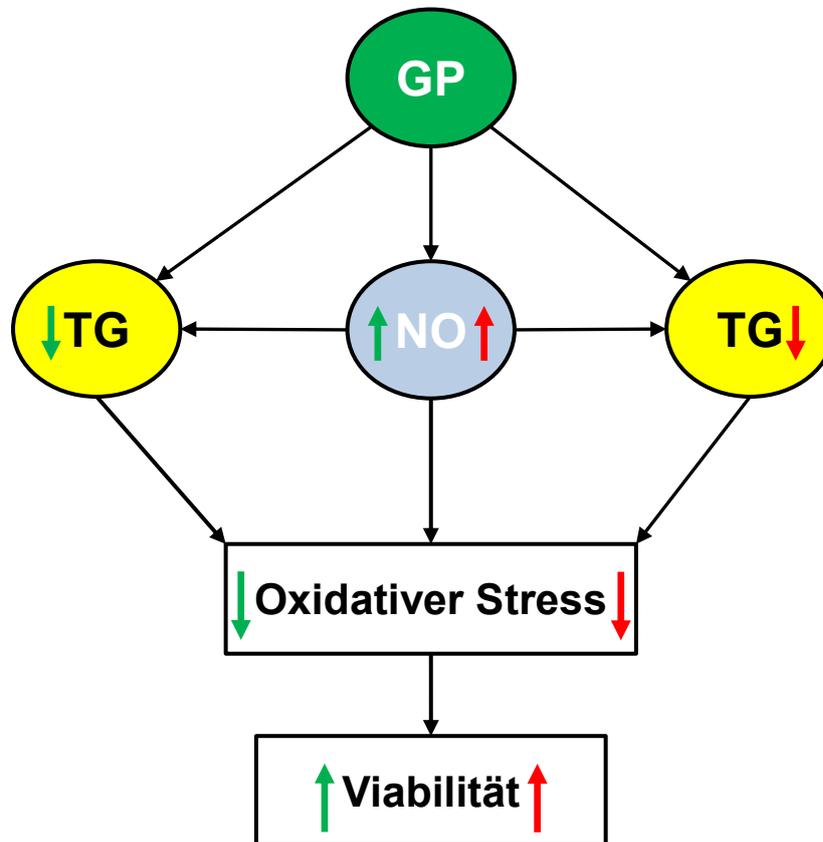


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Effekte von *Gynostemma pentaphyllum* in primären Hepatozytenkulturen. Die Behandlung von primären Hepatozytenkulturen mit einem ethanolischen Extrakt aus *G. pentaphyllum* führte nach 48h Inkubationszeit zu einer dosisabhängigen Reduktion der Triglyceridakkumulation in mit Palmitin- (grüne Pfeile) und Linolsäure-behandelten (rote Pfeile) Kulturen. Dies war mit einer konzentrationsabhängigen Steigerung der NO-Bildung (gemessen an der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium) verbunden. In Abhängigkeit der eingesetzten GP-Konzentration konnte in den Hepatozytenkulturen nach 48h eine Verringerung der Lipidperoxidationsprodukte (gemessen am Gehalt der F₂-Isoprostane und des oxidierten Cardiolipins) nachgewiesen werden. Die Behandlung mit GP führte zudem zu einer dosisabhängigen Verbesserung der Zellviabilität der Zellkulturen (gemessen an der Trypanblaufärbung) nach 48h.

4.5 Klinische Bedeutung der aus dem *in vitro* – Modell erhobenen Befunde

4.5.1 Patienten mit NAFLD zeigen verstärkten oxidativen Stress

Patienten mit einer bestehenden NAFLD weisen im Zuge einer verstärkten Schädigung der Leber sowohl im Organ, als auch im Plasma erhöhte Konzentrationen von Lipidperoxidationsprodukten auf (Seki et al. 2002, Madan et al. 2006). Als Ursache der Akkumulation dieser Produkte werden vielfältige Mechanismen diskutiert. Basierend auf einer eingeschränkten intrazellulären Signaltransduktion durch den Insulinrezeptor im Rahmen einer Insulinresistenz und durch eine verstärkte Aufnahme von Fettsäuren aus dem Blut, kommt es zu einer Akkumulation von Triglyceriden in den Hepatozyten (Neuschwander-Tetri 2010). Zudem findet man im Serum der Patienten eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren, die durch eine verstärkte Lipolyse im Fettgewebe hervorgerufen wird (Kotronen et al. 2009). Im Rahmen dieses metabolischen Ungleichgewichts und durch eine erhöhte Insulinkonzentration im Blut der Patienten kann sowohl die Anreicherung der Hepatozyten mit Triglyceriden, als auch die Induktion von oxidativem Stress

erheblich gesteigert werden. Neben der Akkumulation der Hepatozyten mit Lipiden und deren schädigenden Potentials spielen Mechanismen zur ROS-Scavenging ebenso eine bedeutende Rolle. Es gibt Hinweise für Veränderungen dieses Entgiftungssystems bei Patienten mit NAFLD, was zu einer Dysbalance zwischen ROS-Bildung und ROS-Abbau führt und somit sekundäre Veränderungen, wie Lipidperoxidationen, hervorrufen kann (Videla et al. 2004). Es besteht jedoch in der Literatur keine einheitliche Meinung zum Schädigungspotential hinsichtlich der Länge und des Sättigungsgrades von Fettsäuren bei Patienten mit NAFLD.

Der hauptsächliche Anteil der durch die Nahrung aufgenommenen Fette besteht aus gesättigten, tierischen Fettsäuren. Der Anteil von ungesättigten Fettsäuren, wie Linolsäure ist weitaus geringer. Nach Resorption im Dünndarm erfolgt die Bindung der Fettsäuren an Albumin und nachfolgend die Aufnahme durch Adipozyten. Hier werden die Fettsäuren zunächst gespeichert und im gesunden Probanden bei Bedarf wieder freigesetzt. Bei Patienten mit NAFLD und einer gestörten Insulinsekretion, die auch im Rahmen einer Insulinresistenz entstehen kann, ist dieser Kreislauf jedoch gestört, so dass es zu einer deutlich höheren Konzentration von Fettsäuren im Blut der Patienten kommt. Dies hat zur Folge, dass die hepatische Aufnahme dieser gesteigert ist. Jedoch findet man prozentual einen deutlich höheren Teil an gesättigten Fettsäuren im Blut der NAFLD-Patienten. Dies erklärt jedoch nicht die Vorgänge der Lipotoxizität in der Leber. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss gesättigte und ungesättigte Fettsäuren in Hepatozyten auf die Bildung von Lipidakkumulaten und oxidativen Stress haben. Wie in 3.3 gezeigt werden konnte, kam es zu einer starken Anreicherung von Lipiden, vor allem von Triglyceriden durch die Behandlung mit Linolsäure, wohingegen Palmitinsäure nur zu einem geringeren Maße eine Akkumulation aufwies. Dies war verbunden mit einer deutlichen Steigerung der Bildung der Lipidperoxidationsprodukte und einer verminderten Viabilität der Zellen. Aus den hier erhobenen *in vitro* – Daten lassen sich Rückschlüsse auf das Schädigungspotential ziehen. Linolsäure als mehrfach ungesättigte Fettsäure verursacht am ehesten durch die nachgewiesene Triglyceridanhäufung oxidativen Stress, der zu einer zunehmenden Zellschädigung führt. Nun ist der Bezug dieser Daten auf systemische Ansätze schwierig. Aus den in dieser Arbeit gewonnen Befunde lassen sich jedoch folgende Rückschlüsse ableiten:

- 1) Linolsäure als Vertreter der ungesättigten Fettsäuren führte zu einer Verminderung der Viabilität von primären Hepatozyten
- 2) die verminderte Viabilität war verbunden mit einer Anreicherung von Lipiden, insbesondere von Triglyceriden
- 3) die Behandlung von primären Hepatozyten mit Palmitinsäure führte zu einer erhöhten NO-Bildung gemessen an der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium; Linolsäure zeigte lediglich eine verringerte Zunahme der Nitrit/Nitrat-Konzentration

- 4) Linolsäure führte am ehesten durch die Anreicherung von Triglyceriden und einer geringeren NO-Bildung zu verstärktem oxidativem Stress gemessen an der Konzentration von Isoprostanen und oxidiertem Cardiolipin, was zur Einschränkung der Viabilität geführt hat

Unterstützt werden diese Kernaussagen hinsichtlich der Bedeutung von oxidativem Stress und dem Vorkommen von Lipidperoxidationsprodukten, wie den Isoprostanen, durch zwei Arbeiten. Elizondo et al. demonstrierten in einer Studie mit NAFLD-Patienten, dass diese einen deutlich höheren Gehalt an Isoprostanen im Serum aufwiesen, als gesunde Probanden (Elizondo et al. 2007). In einer Analyse der Fettsäurekomposition der hepatischen Phospholipide konnten die Autoren einen erhöhten Anteil von gesättigten Fettsäuren nachweisen. Im Vergleich war der Anteil der ungesättigten Fettsäuren deutlich reduziert. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied im Anteil von Palmitinsäure in den hepatischen Phospholipiden gezeigt werden. In einer zweiten Studie an gesunden Probanden zeigten Turpeinen et al., dass diejenigen, die über vier Wochen eine linolsäurereiche Diät erhielten, eine höhere Konzentration an Isoprostanen im Urin aufwiesen, als Probanden, die eine Oleat-haltige Diät bekamen (Turpeinen et al. 1998). Die fehlende Anreicherung von Palmitinsäure in den hepatischen Phospholipiden stützt die Hypothese, dass Palmitinsäure primär nicht in den Hepatozyten gespeichert wird, sondern vielmehr durch die β -Oxidation abgebaut wird, wohingegen die mehrfach ungesättigte Linolsäure eher der Speicherung in Triglyceriden zugeführt wird. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit keine Analyse der Fettsäurekomposition der Triglyceride durchgeführt, so dass diese Annahme nicht belegt werden kann.

4.5.2 *Gynostemma pentaphyllum* hat positive Einflüsse auf metabolische Erkrankungen des Menschen

In der traditionellen chinesischen Medizin ist der Einsatz von Heilpflanzen als Tee auch zur Behandlung von metabolischen Erkrankungen, wie Hyperlipidämie und NAFLD, sehr weit verbreitet (La Cour et al. 1995, Liu et al. 2013). In mehreren klinischen Studien an Patienten mit Diabetes mellitus Typ II konnte ein positiver Effekt von *Gynostemma pentaphyllum* nachgewiesen werden. So zeigten Huyen et al., dass durch die Gabe von GP als Tee der Nüchternblutzuckerspiegel bei neu-diagnostizierten, Therapie-naiven Typ II – Diabetikern positiv gesenkt werden konnte (Huyen et al. 2010). Zudem konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die diabetische Stoffwechsellage von neudiagnostizierten Diabetikern, die zusätzlich eine Kombination aus GP – Tee und dem Sulfonylharnstoff Gliclazid erhalten hatten, bereits nach vier Wochen Behandlungszeit eine deutliche Verbesserung des Nüchternblutzuckerspiegels und des im Plasma gemessenen Insulins aufwiesen (Huyen et al. 2012). Als weiterer Effekt der kombinierten Therapie konnte ebenso eine Reduktion der Serumtriglyceride, des Serumcholesterols und des LDL-Cholesterols nachgewiesen werden. In einer weiteren

Patientenstudie untersuchten Park et al. den Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Reduktion des abdominalen und viszeralen Fettes von übergewichtigen Patienten (Park et al. 2014). Durch die Gabe von *GP* konnten die Autoren nach einer Behandlungsdauer von 12 Wochen eine Reduktion sowohl des abdominalen, viszeralen und subkutanen Fettgewebes mittels CT nachweisen. Zudem zeigte sich tendenziell auch eine Reduktion des Cholesterols und der Triglyceride im Serum der Patienten mit *GP* – Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte eines ethanolischen Extraktes auf die Viabilität, die Bildung von Lipidakkumulaten und den oxidativen Stress in primären Hepatozytenkulturen unter der Gabe von Palmitin- und Linolsäure untersucht. Wie gezeigt werden konnte, führt die Behandlung mit *GP* zu einer Verbesserung der Viabilität, was mit einer Verringerung der Lipidakkumulation und einer vermehrten NO – Bildung assoziiert war. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch den Extrakt die Linolsäure-bedingte Bildung von Lipidperoxidationsprodukten in unterschiedlichem Maß reduziert werden konnte. Aus den hier dargestellten Daten und den vorliegenden Ergebnissen der Patientenstudien von Huyen et al. und Park et al. lässt sich für metabolische Störungen, wie der NAFLD, ein positiver Einfluss von *GP* ableiten.

Die beschriebenen protektiven Einflüsse von *Gynostemma pentaphyllum* bei Patienten mit metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus oder NAFLD, können nach jetzigem Stand auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen führt die Behandlung mit *GP* sowohl bei Diabetikern, als auch im Tiermodell zu einer Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage. Zhang et al. konnten in CD-1 – Mäusen, die durch eine Diät mit hohem Fettanteil eine Insulinresistenz entwickelten, zeigen, dass unter der oralen Gabe von *GP* es zu einer Absenkung der Blutglukose und der Insulinkonzentration im Serum der Tiere mit Insulinresistenz gekommen ist (Zhang et al., 2009). Ebenso wiesen die Mäuse mit *GP*-Behandlung einen wesentlich günstigeren Verlauf der Plasmaglukosekonzentration nach oraler Glukoseexposition auf, als die Tiere, die keine Behandlung mit *G. pentaphyllum* erhielten. Die Behandlung mit Gypenosiden führte ebenso zu einer verstärkten Expression der hepatischen Glukokinase und des hepatischen Glycogengehaltes in insulinresistenten CD-1 – Mäusen. Zum anderen führt die Anwendung von Gypenosiden, wie unter anderem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, zu einer Verringerung von sekundären Schädigungen durch oxidativen Stress bei metabolischen Störungen. Demnach scheint ein synergistischer Mechanismus bestehend aus der Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage und einer Reduktion sekundärer Schäden induziert durch Insulinresistenz/Diabetes mellitus auch beim Menschen möglich zu sein.

5 Zusammenfassung

Zunächst wurde im ersten Teil der Arbeit der Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Viabilität von primären Hepatozytenkulturen der Wistar-Ratte untersucht. Um den Charakter der NAFLD zu simulieren, wurden die Hepatozyten unter unphysiologisch hohen Insulin- und Glukosekonzentrationen für einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 48h inkubiert. Wie gezeigt werden konnte, wiesen die Hepatozyten, die mit Linolsäure behandelt wurden, nach Langzeitexposition eine deutlich reduzierte Zellviabilität auf. Um die zugrunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, die zum Verlust der Viabilität führten, erfolgte die Bestimmung von Nitrit/Nitrat im Zellkulturmedium nach 4 h und 48 h. Während Palmitinsäure bereits nach 4h zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid geführt hat, konnte in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten nur ein schwacher Anstieg nach 48 h gemessen werden. Ein charakteristisches Merkmal der NAFLD ist die Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten, die zu einer progredienten Schädigung der Leber durch oxidativen Stress führen können. Um den Effekt von Palmitin- und Linolsäure auf diese Anhäufung zu untersuchen, erfolgte sowohl eine quantitative Messung des Gesamtlipids, als auch eine qualitative Aufarbeitung der Triglyceride und des Gesamtcholesterols. Unter der Palmitinsäurebehandlung entwickelten die primären Hepatozyten eine leichte quantitative Erhöhung des Gesamtlipids, die jedoch weitaus niedriger war, als unter der Inkubation mit Linolsäure. Auch in der qualitativen Analyse zeigten sich hier große Unterschiede zwischen den eingesetzten Fettsäuren. So konnte in den Zellkulturen, die mit Linolsäure behandelt wurden, nach 48 h ein massiver Anstieg von Triglyceriden nachgewiesen werden, wohingegen unter Palmitinsäure keine Veränderung des Triglyceridgehaltes messbar war. Ein weiteres Merkmal der NAFLD sind oxidative Schäden der Hepatozyten, die am ehesten durch die Anreicherung von Lipiden in den Zellen bedingt werden. Diese oxidativen Schädigungen können zu einer erhöhten Apoptoserate führen. Um das Ausmaß von oxidativem Stress in primären Hepatozytenkulturen zu untersuchen, erfolgte die massenspektrometrische Bestimmung des Isoprostangehaltes und des Anteils an oxidiertem Cardiolipin. Unter der Behandlung mit Linolsäure kam es nach 48 h verglichen zur Kontroll- und Palmitinsäuregruppe zu einer exzessiven Anhäufung von Isoprostanen. Auch der Anteil des oxidierten Cardiolipins unterschied sich in den mit Linolsäure behandelten Hepatozyten zu den anderen beiden Gruppen. Während es zu keiner Veränderung des Gehaltes am peroxidativ veränderten Cardiolipin in der Kontrollgruppe und in den mit Palmitinsäure inkubierten Zellen kam, konnte in der Linolsäuregruppe ein deutlich höherer Anteil an oxidiertem Cardiolipin nach 48h Behandlungsdauer gemessen werden. Interessanterweise gab es hinsichtlich des Gesamtgehaltes an Cardiolipin keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Effekt eines ethanolischen Extraktes aus *G. pentaphyllum* auf die Zellviabilität untersucht. Hierbei wurden die primären Hepatozytenkulturen über 48 h mit drei unterschiedlichen Konzentrationen des Extraktes behandelt. Wie gezeigt werden

konnte, führte die Behandlung mit *GP* zu einer konzentrationsabhängigen Verbesserung des Proteingehaltes und der Zellviabilität in den mit Palmitin- und Linolsäure behandelten Hepatozyten. Die Zunahme der Viabilität und der Einfluss von *G. pentaphyllum* waren eng mit einer Abnahme des quantitativ gemessenen Gesamtlipids und einer Reduktion der Triglyceride und des Cholesterols verbunden. Zudem konnte durch *GP* die Freisetzung von Nitrit/Nitrat im Zellkulturmedium verbessert werden. Um den Effekt von *GP* auf Veränderungen der Lipidperoxidationsprodukte zu untersuchen, erfolgte erneut die Bestimmung der Isoprostankonzentration und des Anteils an oxidiertem Cardiolipin. Bereits nach 4 h Inkubationszeit kam es in allen eingesetzten *GP*-Konzentrationen zu einer Erhöhung des oxidierten Cardiolipins in allen Gruppen, wohingegen der Isoprostananteil deutlich unter den ohne *GP* behandelten Hepatozyten lag. Dieser Effekt wurde jedoch nach 48h teilweise aufgehoben. So führte lediglich die geringste und höchste *GP*-Dosierung zu einer Reduktion des Isoprostangehaltes in den Hepatozyten. Bezüglich des oxidierten Cardiolipins konnte keine Reduktion durch *G. pentaphyllum* nachgewiesen werden. Um den Effekt von *G. pentaphyllum* auf den Gesamtgehalt von Cardiolipin und deren Speziesverteilung zu untersuchen, schlossen sich weitere massenspektrometrische Analysen an. *GP* führte nach 4 h zu einer Reduktion des Cardiolipingehaltes in allen drei Gruppen. Diese Reduktion konnte jedoch nach Behandlung mit *GP40* und *GP60* nach 48h rückgängig gemacht werden. Interessanterweise führte *GP* auch zu einer Veränderung der Speziesverteilung des Cardiolipins. So kam es durch *GP* zu einer prozentualen Reduktion des Hauptvertreterers (C18:2)₄-CL und zu einer deutlichen prozentualen Steigerung von (C18:2)₂/C18:1/C16:0-CL. Dies zeigt, dass *GP* nicht nur Einfluss auf die Cardiolipinsynthese, sondern auch auf das Remodelling dieses besonderen mitochondrialen Phospholipids zu haben scheint.

Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass bei Vorliegen einer Insulinresistenz die essentielle Linolsäure in der gewählten Dosierung hinsichtlich der Entwicklung einer Akkumulation von Lipiden schädlich auf die Viabilität der Hepatozyten auswirkt. Dies war mit einer starken Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten verbunden. Demnach scheint die Konzentration von Linolsäure im Blut, aber auch in den Lipidakkumulaten der Patienten für die toxischen Wirkungen ausschlaggebend zu sein. Inwiefern die Kombination aus einzelnen Fettsäuren einen additiven Effekt bezüglich der Lipidanreicherung und der oxidativen Schädigung hat, bleibt an dieser Stelle jedoch offen. Weitere Untersuchungen könnten sich der Konzentrationsabhängigkeit einzelner Fettsäuren und dem Verhältnis zwischen diesen widmen.

6 Literaturverzeichnis

Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J.: The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 4:1444-1449.2000.

Adams, J.M.: Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & development*. 20:2481-2495.2003.

Adams, L.A., Lymp, J.F., St Sauver, J., Sanderson, S.O., Lindor, K.D., Feldstein, A., and Angulo, P.: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 1:113-121.2005.

Aoun, M., Fouret, G., Michel, F., Bonafos, B., Ramos, J., Cristol, J.-P., Carbonneau, M.-A., Coudray, C., and Feillet-Coudray, C.: Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 4:439-452.2012.

Attawish, A., Chivapat, S., Phadungpat, S., Bansiddhi, J., Techadamrongsin, Y., Mitrijit, O., Chaorai, B., and Chavalittumrong, P.: Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. *Fitoterapia*. 6:539-551.2004.

Audoly, L.P., Rocca, B., Fabre, J.E., Koller, B.H., Thomas, D., Loeb, A.L., Coffman, T.M., and FitzGerald, G.A.: Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2 α)-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo. *Circulation*. 24:2833-2840.2000.

Basova, L.V., Kurnikov, I.V., Wang, L., Ritov, V.B., Belikova, N.A., Vlasova, I.I., Pacheco, A.A., Winnica, D.E., Peterson, J., and Bayir, H., et al.: Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry*. 11:3423-3434.2007.

Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G., and Bellentani, S.: Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 1:44-52.2005.

Bhardwaj, P., Madan, K., Thareja, S., Joshi, Y.K., and Saraya, A.: Comparative redox status in alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology international*. 2:202-208.2008.

Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.C., Roudot-Thoraval, F.: The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. 58(3):593-608. 2013.

Bligh, E.G., Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 8:911-917.1959.

Boden, G.: Obesity and free fatty acids. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 3:635-46, viii-ix.2008.

- Chi, A., Tang, L., Zhang, J., and Zhang, K.: Chemical composition of three polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* and their antioxidant activity in skeletal muscle of exercised mice. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 6:479-485.2012.
- Chiranthanut, N., Teekachunhatean, S., Panthong, A., Khonsung, P., Kanjanapothi, D., and Lertprasertsuk, N.: Toxicity evaluation of standardized extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Journal of ethnopharmacology*. 1:228-234.2013.
- Claypool, S.M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J.A., and Koehler, C.M.: Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*. 5:937-950.2008.
- Comporti, M., Arezzini, B., Signorini, C., Sgherri, C., Monaco, B., and Gardi, C.: F2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 11:1381-1391.2005.
- Cui, J., Eneroth, P., and Bruhn, J.G.: *Gynostemma pentaphyllum*: identification of major saponin and differentiation from *Panax* species. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 3:187-191.1999.
- Dalet, C., Fehlmann, M., and Debey, P.: Use of Percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability. *Analytical biochemistry*. 1:119-123.1982.
- Das, K.S., Balakrishnan, V., Mukherjee, S., and Vasudevan, D.M.: Evaluation of blood oxidative stress-related parameters in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 4:323-334.2008.
- Davì, G., Ciabattoni, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., and Costantini, F., et al.: In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 2:224-229.1999.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., and Stuehr, D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of immunology*. 7:2407-2412.1988.
- Diraison, F., Moulin, P., and Beylot, M.: Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & metabolism*. 5:478-485.2003.
- Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Díaz, J.C., Signorini, C., Sgherri, C., and Comporti, M., et al.: Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity*. 1:24-31.2007.
- Farrell, G.C., and Larter, C.Z.: Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2 *Suppl 1*:S99-S112.2006.

Fatani, S., Itua, I., Clark, P., Wong, C., and Naderali, E.K.: The effects of diet-induced obesity on hepatocyte insulin signaling pathways and induction of non-alcoholic liver damage. *International journal of general medicine*:211-219.2011.

Ferreira, F.M., Seica, R., Oliveira, P.J., Coxito, P.M., Moreno, A.J., Palmeira, C.M., and Santos, M.S.: Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzyme Q and cardiolipin contents. *Biochimica et biophysica acta*. 2:113-120.2003.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1:497-509.1957.

Fry, M., and Green, D.E.: Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *The Journal of biological chemistry*. 4:1874-1880.1981.

Gallo, L.L., Atasoy, R., Vahouny, G.V., and Treadwell, C.R.: Enzymatic assay for cholesterol ester hydrolase activity. *Journal of lipid research*. 7:913-916.1978.

Genaro, A.M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martínez, C., and Boscá, L.: Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *The Journal of clinical investigation*. 4:1884-1890.1995.

Gopaul, N.K., Anggård, E.E., Mallet, A.I., Betteridge, D.J., Wolff, S.P., and Nourooz-Zadeh, J.: Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS letters*. 2:225-229.1995.

Goto, T., Ohnami, S., Khedara, A., Kato, N., Ogawa, H., and Yanagita, T.: Feeding the nitric oxide synthase inhibitor L-N(omega)nitroarginine elevates serum very low density lipoprotein and hepatic triglyceride synthesis in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 5:274-278.1999.

Gottardi, A. de, Vinciguerra, M., Sgroi, A., Moukil, M., Ravier-Dall'Antonia, F., Pazienza, V., Pugnale, P., Foti, M., and Hadengue, A.: Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 8:792-806.2007.

Grattagliano, I., Caraceni, P., Calamita, G., Ferri, D., Gargano, I., Palasciano, G., and Portincasa, P.: Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *European journal of clinical investigation*. 7:523-530.2008.

Gusdon, A.M., Song, K.-X., and Qu, S.: Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxidative medicine and cellular longevity*:637027.2014.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M.: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 5223:543-546.1995.

Han, X., Yang, J., Cheng, H., Yang, K., Abendschein, D.R., and Gross, R.W.: Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 50:16684-16694.2005.

Hiramoto, K., Ohkawa, T., Oikawa, N., and Kikugawa, K.: Is nitric oxide (NO) an antioxidant or a prooxidant for lipid peroxidation? *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 9:1046-1050.2003.

Hoa, N.K., Norberg, A., Sillard, R., van Phan, D., Thuan, N.D., Dzung, Dang Thi Ngoc, Jörnvall, H., and Ostenson, C.-G.: The possible mechanisms by which phanoside stimulates insulin secretion from rat islets. *The Journal of endocrinology*. 2:389-394.2007.

Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.: Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21:12027-12032.2003.

Hsu, H.-Y., Yang, J.-S., Lu, K.-W., Yu, C.-S., Chou, S.-T., Lin, J.-J., Chen, Y.-Y., Lin, M.-L., Chueh, F.-S., and Chen, S.-S., et al.: An experimental study on the antileukemia effects of gypenosides in vitro and in vivo. *Integrative cancer therapies*. 1:101-112.2011.

Huang, T.H.-W., Li, Y., Razmovski-Naumovski, V., van Tran, H., Li, G.Q., Duke, C.C., and Roufogalis, B.D.: Gypenoside XLIX isolated from *Gynostemma pentaphyllum* inhibits nuclear factor-kappaB activation via a PPAR-alpha-dependent pathway. *Journal of biomedical science*. 4:535-548.2006.

Huyen, V T T, Phan, D.V., Thang, P., Hoa, N.K., and Ostenson, C.G.: Antidiabetic effect of *Gynostemma pentaphyllum* tea in randomly assigned type 2 diabetic patients. *Hormone and metabolic research*. 5:353-357.2010.

Huyen, V T T, Phan, D.V., Thang, P., Ky, P.T., Hoa, N.K., and Ostenson, C.G.: Antidiabetic Effects of Add-On *Gynostemma pentaphyllum* Extract Therapy with Sulfonylureas in Type 2 Diabetic Patients. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*:452313.2012.

Ilan, E., Tirosh, O., and Madar, Z.: Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *The Journal of nutrition*. 9:2090-2095.2005.

Ito, Y., Hiraishi, H., Razandi, M., Terano, A., Harada, T., and Ivey, K.J.: Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite-induced cell damage in cultured rat hepatocytes. *Hepatology*. 1:247-254.1992.

Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., and Kini, V., et al.: Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*. 4:223-232.2005.

Kao, T.H., Huang, S.C., Inbaraj, B.S., and Chen, B.H.: Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2:200-211.2008.

Khedara, A., Kawai, Y., Kayashita, J., and Kato, N.: Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N(omega)nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. *The Journal of nutrition*. 10:2563-2567.1996.

Kim, Y.M., Talanian, R.V., and Billiar, T.R.: Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 49:31138-31148.1997.

Kim, Y.M., Kim, T.H., Seol, D.W., Talanian, R.V., and Billiar, T.R.: Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry*. 47:31437-31441.1998.

Kim, Y.M., Kim, T.H., Chung, H.T., Talanian, R.V., Yin, X.M., and Billiar, T.R.: Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology*. 4 Pt 1:770-778.2000.

Klein, H.H., Ullmann, S., Drenckhan, M., Grimmsmann, T., Unthan-Fechner, K., and Probst, I.: Differential modulation of insulin actions by dexamethasone: studies in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Journal of hepatology*. 4:432-440.2002.

Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., and Harada, N., et al.: Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*. 3:351-358.2007.

Konishi, M., Iwasa, M., Araki, J., Kobayashi, Y., Katsuki, A., Sumida, Y., Nakagawa, N., Kojima, Y., Watanabe, S., and Adachi, Y., et al.: Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8-isoprostane. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 12:1821-1825.2006.

Kotronen, A., Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Bergholm, R., Frayn, K.N., Fielding, B.A., and Yki-Järvinen, H.: Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 9:1439-1446.2009.

La Cour, B., Mølgaard, P., and Yi, Z.: Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *Journal of ethnopharmacology*. 2:125-129.1995.

Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V., and Kim, Y.M.: Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2:419-424.1997.

Li, J., Bombeck, C.A., Yang, S., Kim, Y.M., and Billiar, T.R.: Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 24:17325-17333.1999.

Li, L., Jiao, L., and Lau, B.H.: Protective effect of gypenosides against oxidative stress in phagocytes, vascular endothelial cells and liver microsomes. *Cancer biotherapy*. 3:263-272.1993.

Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E.: Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *The Journal of biological chemistry*. 9:5637-5644.2009.

Lin, J.-J., Hsu, H.-Y., Yang, J.-S., Lu, K.-W., Wu, R.S.-C., Wu, K.-C., Lai, T.-Y., Chen, P.-Y., Ma, C.-Y., and Wood, W.G., et al.: Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo using a HL-60 cells murine xenograft model. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 12:1075-1085.2011.

Liu, Z.L., Xie, L.Z., Zhu, J., Li, G.Q., Grant, S.J., and Liu, J.P.: Herbal medicines for fatty liver diseases. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD009059.2013.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1:265-275.1951.

Lu, K.-W., Chen, J.-C., Lai, T.-Y., Yang, J.-S., Weng, S.-W., Ma, Y.-S., Lu, P.-J., Weng, J.-R., Chueh, F.-S., and Wood, W.G., et al.: Gypenosides inhibits migration and invasion of human oral cancer SAS cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 -9 and urokinase-plasminogen by ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways. *Human & experimental toxicology*. 5:406-415.2011.

Madan, K., Bhardwaj, P., Thareja, S., Gupta, S.D., and Saraya, A.: Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of clinical gastroenterology*. 10:930-935.2006.

Madar, Z., Kalet-Litman, S., and Stark, A.H.: Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology*. 2:106-112.2005.

Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., and Melchionda, N.: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American journal of medicine*. 5:450-455.1999.

Martens, J.-C., Keilhoff, G., Halangk, W., Wartmann, T., Gardemann, A., Päge, I., Schild, L.: Lipidomic analysis of molecular cardiolipin species in livers exposed to ischemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*. 1-2:253-263.2015.

McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., and Foster, D.W.: A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1:265-270.1977.

Megalli, S., Aktan, F., Davies, N.M., and Roufogalis, B.D.: Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of gynostemma pentaphyllum in rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*. 3:507-515.2005.

Megalli, S., Davies, N.M., and Roufogalis, B.D.: Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of Gynostemma pentaphyllum in the Zucker fatty rat. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*. 3:281-291.2006.

Misra, U.K., Deedwania, R., and Pizzo, S.V.: Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *The Journal of biological chemistry*. 19:13694-13707.2006.

Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., and Roberts, L.J.: A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 23:9383-9387.1990.

Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., and Roberts, L.J.: Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 22:10721-10725.1992.

Müller, C., Gardemann, A., Keilhoff, G., Peter, D., Wiswedel, I., Kropf, S., and Schild, L.: Palmitate protects hepatocytes from oxidative stress and triacylglyceride accumulation by stimulation of nitric oxide synthesis in the presence of high glucose and insulin concentration. *Free radical research*. 12:1425-1434.2010.

Musser, D.A., and Oseroff, A.R.: The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with Photofrin II. *Photochemistry and photobiology*. 6:621-626.1994.

Musso, G., Gambino, R., Michieli, F. de, Biroli, G., Premoli, A., Pagano, G., Bo, S., Durazzo, M., and Cassader, M.: Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. *The American journal of clinical nutrition*. 3:661-671.2007.

Neuschwander-Tetri, B.A.: Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2:774-788.2010.

Norberg, A., Hoa, N.K., Liepinsh, E., van Phan, D., Thuan, N.D., Jörnvall, H., Sillard, R., and Ostenson, C.-G.: A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *The Journal of biological chemistry*. 40:41361-41367.2004.

Osipov, A.N., Stepanov, G.O., Vladimirov, Y.A., Kozlov, A.V., and Kagan, V.E.: Regulation of cytochrome C peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation. *Biochemistry*. 10:1128-1132.2006.

Pagliassotti, M.J., Wei, Y., and Wang, D.: Insulin protects liver cells from saturated fatty acid-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH₂ terminal kinase activity. *Endocrinology*. 7:3338-3345.2007.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F.M.: The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS letters*. 2-3:323-326.2000.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F.M.: Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*. 1:135-141.2002.

Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., and Ruggiero, F.M.: Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell calcium*. 6:643-650.2009.

Park, S.-H., Huh, T.-L., Kim, S.-Y., Oh, M.-R., Tirupathi Pichiah, P B, Chae, S.-W., and Cha, Y.-S.: Antiobesity effect of *Gynostemma pentaphyllum* extract (actiponin): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Obesity*. 1:63-71.2014.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., and Paradies, G.: Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS letters*. 3:435-438.2001.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., and Paradies, G.: Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15:2202-2208.2003.

Petrosillo, G., Portincasa, P., Grattagliano, I., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F.M., Ferri, D., and Paradies, G.: Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochimica et biophysica acta*. 10:1260-1267.2007.

Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., and Schägger, H.: Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*. 52:52873-52880.2003.

Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R.: Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*. 4:279-296.2011.

Pope, S., Land, J.M., Heales, J.R.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochimica et biophysica acta*. 1777:794-799. 2008.

Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., and Sanyal, A.J.: A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 4:1081-1090.2007.

Qin, R., Zhang, J., Li, C., Zhang, X., Xiong, A., Huang, F., Yin, Z., Li, K., Qin, W., and Chen, M., et al.: Protective effects of gypenosides against fatty liver disease induced by high fat and cholesterol diet and alcohol in rats. *Archives of pharmacal research*. 7:1241-1250.2012.

Rao, M.S., and Reddy, J.K.: Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Seminars in liver disease*. 1:43-55.2001.

Rauen, U., Li, T., Ioannidis, I., and Groot, H. de: Nitric oxide increases toxicity of hydrogen peroxide against rat liver endothelial cells and hepatocytes by inhibition of hydrogen peroxide degradation. *American journal of physiology. Cell physiology*. 4:C1440-9.2007.

Ribaux, P.G., and Iynedjian, P.B.: Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *The Biochemical journal. Pt 3*:697-705.2003.

Ricchi, M., Odoardi, M.R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L.I., Marra, F., Bertolotti, M., and Banni, S., et al.: Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology. 5*:830-840.2009.

Roberts, L.J., and Morrow, J.D.: Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free radical biology & medicine. 4*:505-513.2000.

Roediger, W.E., Hems, R., Wiggins, D., and Gibbons, G.F.: Inhibition of hepatocyte lipogenesis by nitric oxide donor: could nitric oxide regulate lipid synthesis? *IUBMB life. 1*:35-40.2004.

Sarıçam, T., Kircali, B., and Köken, T.: Assessment of lipid peroxidation and antioxidant capacity in non-alcoholic fatty liver disease. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology. 2*:65-70.2005.

Schild, L., Dombrowski, F., Lendeckel, U., Schulz, C., Gardemann, A., and Keilhoff, G.: Impairment of endothelial nitric oxide synthase causes abnormal fat and glycogen deposition in liver. *Biochimica et biophysica acta. 3*:180-187.2008.

Schild, L., Chen, B.H., Makarov, P., Kattengell, K., Heinitz, K., Keilhoff, G.: Selective induction of apoptosis in glioma tumour cells by a *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 8-9*:589-597. 2010.

Schild, L., Cotte, T., Keilhoff, G., and Brödemann, R.: Preconditioning of brain slices against hypoxia induced injury by a *Gynostemma pentaphyllum* extract--stimulation of anti-oxidative enzyme expression. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 8-9*:812-818.2012.

Schlame, M., Beyer, K., Hayer-Hartl, M., and Klingenberg, M.: Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids. Is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP/ATP carrier? *European journal of biochemistry / FEBS. 2*:459-466.1991.

Schlame, M., Shanske, S., Doty, S., König, T., Sculco, T., DiMauro, S., and Blanck, T.J.: Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *Journal of lipid research. 9*:1585-1592.1999.

Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M.L.: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in lipid research. 3*:257-288.2000.

Schönfeld, P., and Wojtczak, L.: Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et biophysica acta. 8*:1032-1040.2007.

Schwedhelm, E., Bartling, A., Lenzen, H., Tsikas, D., Maas, R., Brümmer, J., Gutzki, F.-M., Berger, J., Frölich, J.C., and Böger, R.H.: Urinary 8-iso-prostaglandin F₂alpha as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation*. 7:843-848.2004.

Seglen, P.O.: Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Experimental cell research*. 2:391-398.1973.

Seki, S., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Nakatani, K., and Wakasa, K.: In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Journal of hepatology*. 1:56-62.2002.

Shang, L., Liu, J., Zhu, Q., Zhao, L., Feng, Y., Wang, X., Cao, W., and Xin, H.: Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity. *Brain research*. 1:163-174.2006.

Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N., and Yagi, K.: Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2:343-347.1999.

Srivastava, S., and Chan, C.: Hydrogen peroxide and hydroxyl radicals mediate palmitate-induced cytotoxicity to hepatoma cells: relation to mitochondrial permeability transition. *Free radical research*. 1:38-49.2007.

Takagi, M., Kojima, N., and Yoshida, T.: Analysis of the ammonia metabolism of rat primary hepatocytes and a human hepatocyte cell line Huh 7. *Cytotechnology*. 1:9-15.2000.

Tanner, M.A., Bu, X., Steimle, J.A., and Myers, P.R.: The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 5:359-365.1999.

Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R., Rodella, S., Tessari, R., Zenari, L., Day, C., and Arcaro, G.: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 5:1212-1218.2007.

Tirmenstein, M.A., Nicholls-Grzemeski, F.A., Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., and Fariss, M.W.: Characterization of nitric oxide production following isolation of rat hepatocytes. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 1:56-62.2000.

Turpeinen, A.M., Basu, S., and Mutanen, M.: A high linoleic acid diet increases oxidative stress in vivo and affects nitric oxide metabolism in humans. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 3:229-233.1998.

Ushmorov, A., Ratter, F., Lehmann, V., Dröge, W., Schirmmacher, V., and Umansky, V.: Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood*. 7:2342-2352.1999.

Videla, L.A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quiñones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., and Csendes, A., et al.: Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical science*. 3:261-268.2004.

- Wan, G., Ohnami, S., and Kato, N.: Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 3:555-561.2000.
- Wang, D., Wei, Y., and Pagliassotti, M.J.: Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2:943-951.2006.
- Wang, J., Xiao, Y.-p., Liang, X.-q., Shao, X.-h., and Zhang, K.: Determination of arsenic, mercury and selenium in *Gynostemma pentaphyllum* and rhizospheric soil samples collected from different regions by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Guang pu*. 3:813-816.2012.
- Wang, P., Niu, L., Gao, L., Li, W.-X., Jia, D., Wang, X.-L., and Gao, G.-D.: Neuroprotective effect of gypenosides against oxidative injury in the substantia nigra of a mouse model of Parkinson's disease. *The Journal of international medical research*. 3:1084-1092.2010.
- Wang, Q.-F., Chiang, C.-W., Wu, C.-C., Cheng, C.-C., Hsieh, S.-J., Chen, J.-C., Hsieh, Y.-C., and Hsu, S.-L.: Gypenosides induce apoptosis in human hepatoma Huh-7 cells through a calcium/reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. *Planta medica*. 6:535-544.2007.
- Ward, W.F., Qi, W., van Remmen, H., Zackert, W.E., Roberts, L.J., and Richardson, A.: Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 7:847-851.2005.
- Wiswedel, I., Hirsch, D., Nourooz-Zadeh, J., Flechsig, A., Lück-Lambrecht, A., and Augustin, W.: Analysis of monohydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes as markers of lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Free radical research*. 1:1-11.2002.
- Wiswedel, I., Hirsch, D., Kropf, S., Gruening, M., Pfister, E., Schewe, T., and Sies, H.: Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free radical biology & medicine*. 3:411-421.2004.
- Wiswedel, I., Gardemann, A., Storch, A., Peter, D., and Schild, L.: Degradation of phospholipids by oxidative stress--exceptional significance of cardiolipin. *Free radical research*. 2:135-145.2010.
- Xie, Z., Liu, W., Huang, H., Slavin, M., Zhao, Y., Whent, M., Blackford, J., Lutterodt, H., Zhou, H., and Chen, P., et al.: Chemical composition of five commercial *Gynostemma pentaphyllum* samples and their radical scavenging, antiproliferative, and anti-inflammatory properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 21:11243-11249.2010.
- Yesilova, Z., Yaman, H., Oktenli, C., Ozcan, A., Uygun, A., Cakir, E., Sanisoglu, S.Y., Erdil, A., Ates, Y., and Aslan, M., et al.: Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *The American journal of gastroenterology*. 4:850-855.2005.
- Yin, H., Zhu, M.: Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free radical research*. 8:959-974.2012.

Zhang, H.J., Ji, B.P., Chen, G., Zhou, F., Luo, Y.C., Yu, H.q., Gao, F.Y., Zhang, Z.P., Li, H.Y.: A combination of grape seed-derived procyanidins and gypenosides alleviates insulin resistance in mice and HepG2 cells. *Journal of food science*. 74(1):H1-7.2009.

Zhao, J., Ming, Y., Wan, Q., Ye, S., Xie, S., Zhu, Y., Wang, Y., Zhong, Z., Li, L., and Ye, Q.: Gypenoside attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice via anti-oxidative and anti-apoptotic bioactivities. *Experimental and therapeutic medicine*. 5:1388-1392.2014.

Zhu, M.-J., Sun, L.-J., Liu, Y.-Q., Feng, Y.-L., Tong, H.-T., Hu, Y.-H., and Zhao, Z.: Blood F2-isoprostanes are significantly associated with abnormalities of lipid status in rats with steatosis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 29:4677-4683.2008.

Anhang: Chemikalien und Lösungen

Verwendete Chemikalien

Chemikalien

Acetonitril
3,5-Di-tert-4-butylhydroxytoluen (BHT)
Bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (BSTFA)
Bovines Serumalbumin (BSA)
Calciumchlorid
Chloralhydrat
Chloroform
Cholesterol
Dimethylsulfoxid (DMSO)
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)
Essigsäure, konzentriert
Ethanol
Ethylacetat
Folin – Ciocalteus – Phenolreagenz
Gynostemma pentaphyllum – Extrakt (25% Aqua dest./75% Ethanol)
Glukose
Hepes (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Insulin (aus Rinderpankreas)
Isopropanol (2-Propanol)
Kaliumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat
Kaliumhydroxid
Kollagenase
Kupfersulfatpentahydrat
Linolsäure
Magnesiumchlorid
Magnesiumsulfatheptahydrat
Methanol
MTT
N-1-(1-naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid
n-Hexan
Natriumcarbonat
Natriumchlorid
Natriumcitrat
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Natriumhydrogencarbonat

Hersteller

Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Riedel–de Haen AG, Seelze, Deutschland
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland
Sigma, St. Louis, USA
Merck, Darmstadt, Deutschland
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
Herbasin Co., Shenyang, China

Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roanal, Budapest, Ungarn
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Biochrom AG, Berlin, Deutschland
VEB Laborchemie, Apolda, Deutschland
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fluka Chemie, Deutschland
VEB Jenapharm, Apolda, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sigma, St. Louis, USA

Natriumhydroxid	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumnitrit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palmitinsäure	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS (Phosphate-buffered Saline)	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	GIBCO, Auckland, Neuseeland
2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
9 α ,11 α -PGF _{2α} -d4	Axxora GmbH, Lörrach, Deutschland
Percoll – Lösung	Sigma, St. Louis, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sulfanilamid	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetra-Myristoyl-Cardiolipin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
Trypanblau	Sigma – Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin	PAA – Laboratories, Pasching, Österreich

Verwendete Lösungen

Präperfusionslösung:	NaCl	120,00 mM
	KCl	4,80 mM
	MgSO ₄ x7H ₂ O	1,20 mM
	KH ₂ PO ₄	1,20 mM
	NaHCO ₃	24,00 mM
	EGTA	0,25 mM
	pH	7.4

Perfusionslösung:	NaCl	120,00 mM
	KCl	4,80 mM
	MgSO ₄ x7H ₂ O	1,20 mM
	KH ₂ PO ₄	1,20 mM
	NaHCO ₃	24,00 mM
	Hepes	15,00 mM
	CaCl ₂	4,00 mM
	Kollagenase	0,40 mg/ml
	pH	7.4

Percoll-Gradient:	Percoll-Lösung		43,00 ml
	Stammpuffer:		6,50 ml
		NaCl	1,40 mM
		KCl	50,00 mM
		MgCl ₂	8,00 mM
		Na ₂ HPO ₄	16,00 mM
		KH ₂ PO ₄	4,00 mM

Zellkulturmedium:	BSA	0,20 %
	Hepes	15,00 mM
	NaHCO ₃	17,90 mM
	Penicillin/Streptomycin	1,00 %
	Glukose	10,00 mM
	Insulin	10 ⁻⁷ mM
	+/- Palmitinsäure	100,00 µM
	+/- Linolsäure	100,00 µM
	+/- GP20	100,00 µg/ml
	+/- GP40	200,00 µg/ml
	+/- GP60	300,00 µg/ml
	pH	7.4

Waschpuffer:	NaCl	120,00 mM
	KCl	4,80 mM
	MgSO ₄ x7H ₂ O	1,20 mM
	KH ₂ PO ₄	1,20 mM
	Hepes	20,00 mM
	BSA	0,20 %
	pH	7.4

Proteinanalytik nach LOWRY:	Proteinlösung A:		
		NaOH	0,10 mM
		Na ₂ CO ₃	2,00 %
		SDS	0,10 %
	Proteinlösung B:		
		CuSO ₄ x5H ₂ O	0,50 %
		Natriumcitrat	1,00 %
	Proteinlösung C:		Proteinlösung A:Proteinlösung B (50:1)

Cholesterolareagenz:	K ₃ PO ₄ -Puffer	0,01 M
	Natriumtaurocholat	5,20 mM
	Natriumazid	2,00 mM
	Phenol	14,00 mM
	4-Amino-Antipyrin	0,82 mM
	Triton-X 100	0,50 ml
	Cholesteroxidase	90,00 U
	Peroxidase	33 000 U

Anhang: Geräte

Geräte

Analysator Hitachi 912

Brutschrank Hera Cell

Feinwaage

Flüssigchromatographie: TSQ Quantum Discovery Max

Gaschromatographie: MS DSQ/Trace GC Ultra

Heizblock Block Heater SBH 130

HPLC: Surveyor MS Pump plus, Surveyor-Autosampler plus

Inversionsmikroskop

pH-Messgerät/pH-Meter

Spektrophotometer Cary 100 UV-Vis-Spektrometer

Sterilbank Lamini HB2448

Vortexer Vortex Genie 2

Waage

Wasserbad

Zentrifuge Centrifuge 5403 (Rotor 16A4-44)

Zentrifuge Universal 320R (Rotor 1494)

Zentrifuge Sorvall RC-5B

Hersteller

Bosch, Deutschland

Heraeus, Hanau, Deutschland

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Thermo Fischer Scientific, Dreieich,
Deutschland

Thermo Fischer Scientific, Dreieich,
Deutschland

Bibby Scientific Limited, Staffordshire,
USA

Thermo Fischer Scientific, Dreieich,
Deutschland

Olympus, Hamburg, Deutschland

WTW, Weilheim, Deutschland

Varian, Darmstadt, Deutschland

Heraeus, Hanau, Deutschland

Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern,
Deutschland

Laktotherm, Dinkelberg, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen,
Deutschland

GMI-Inc., Ramsey, USA

Anhang: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

C18-Festphasensäule (Vac 3cc, 500mg)

DB 5-MS Säule (50mx0.25mm, 0,25µm)

Dauerverweilkanüle (16G, 18G)

Infusionssystem

Küvetten, Polysterol

Küvetten, Quarz

Petrischalen Cellstar (35x10mm)

Pipetten (0,5-2µl; 2-20µl; 10-100µl; 100-1000µl)

Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)

PTFE – Membran (13mm, 0,2µm)

Safe-lock Tubes (1,5ml)

Skalpell

Sterilfilter Steritop Express plus (0,22µm, 150ml)

Zellschaber

Hersteller

Waters Corporation, Milford, USA

J&W Scientific, Folsom, USA

Braun, Melsungen, Deutschland

Braun, Melsungen, Deutschland

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Hellma, Mühlheim, Deutschland

Greiner Bio One, Frickenhausen,
Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Greiner Bio One, Frickenhausen,
Deutschland

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Darstellung der Struktur von Phospholipiden und Cardiolipin am Beispiel des Tetralinoleoyl-Cardiolipin.....	16
Abbildung 1.2	Bildung von F ₂ -Isoprostanen durch Radikal-vermittelte Peroxidation von Arachidonsäure.....	19
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung des Aufbaus der Apparatur für die Kollagenaseperfusion.....	25
Abbildung 3.1	Darstellung des zellulären Proteingehaltes.....	35
Abbildung 3.2	Darstellung des reduzierten MTT-Gehaltes.....	38
Abbildung 3.3	Darstellung der Zellviabilität nach der Trypanblau – Methode.....	40
Abbildung 3.4	Darstellung der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Zellkulturmedium.....	43
Abbildung 3.5	Einfluss von Palmitinsäure, Linolsäure und <i>G. pentaphyllum</i> auf den Gesamtlipidgehalt.....	45
Abbildung 3.6	Einfluss von Palmitinsäure, Linolsäure und <i>G. pentaphyllum</i> auf den Triglyceridgehalt.....	47
Abbildung 3.7	Einfluss von Palmitinsäure, Linolsäure und <i>G. pentaphyllum</i> auf den Cholesterolgehalt.....	49
Abbildung 3.8	Darstellung des zellulären Isoprostangehaltes.....	52
Abbildung 3.9	Darstellung des zellulären Gesamtcardiolipingehaltes.....	54
Abbildung 3.10	Darstellung des oxidierten Cardiolipins.....	57
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung der Effekte von Palmitin- und Linolsäure in primären Hepatozytenkulturen.....	81
Abbildung 4.2	Schematische Darstellung der Effekte von <i>Gynostemma pentaphyllum</i> in primären Hepatozytenkulturen.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Effekte von Palmitinsäure und Linolsäure auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.....	61
Tabelle 2	Effekte von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.....	62
Tabelle 3	Effekte von Palmitinsäure und <i>G. pentaphyllum</i> auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.....	63
Tabelle 4	Effekte von Linolsäure und <i>G. pentaphyllum</i> auf die Verteilung der Cardiolipinspezies in primären Hepatozytenkulturen.....	64

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Über den Einfluss von Palmitin- und Linolsäure auf die Entstehung von Lipidakkumulaten unter der Bedingung von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie und den protektiven Wirkungen eines ethanolischen Extraktes aus *Gynostemma pentaphyllum* in primären Hepatozytenkulturen“

an dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. rer. nat. Lorenz Schild

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 31.08.2015

Christian Müller

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann für die Überlassung des interessanten und sogleich sehr herausfordernden Themas, sowie für die Bereitstellung der Laborräume des Bereiches Pathologische Biochemie und für die intensiven Diskussion.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild, der mit seiner hilfreichen Anleitung und Unterstützung bei der experimentellen Bearbeitung des Themas stets zur Seite stand und für seine hilfsbereite Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ich möchte mich zudem für die tiefgründigen Diskussionen, die auch weitab von dieser Arbeit lagen, bedanken.

Ein Dank gilt auch Frau Prof. I. Probst, die uns helfender Hand in ihren Laborräumen des Instituts für Biochemie, Universität Göttingen, die Präparation der Hepatozyten näher brachte.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeiterinnen des Labors des Bereiches für Pathologische Biochemie, die jederzeit bei den experimentellen Arbeiten mit ihrem Rat und ihrer Unterstützung zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeglicher Hinsicht ermuntert und ermutigt haben, die Herausforderungen dieser Arbeit anzunehmen und zu bewältigen. Nicht zuletzt die endlosen Korrekturen und Diskussionen um mögliche Kommata wären ohne euch nicht möglich gewesen.

Darstellung des Bildungsweges

Name: Müller
Vorname: Christian
Geburtsdatum: 13. Dezember 1983
Geburtsort: Brandenburg/Havel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1990 – 1996 Grundsschule 2 Kirchmöser, Brandenburg/Havel
1996 – 2003 von-Saldern – Gymnasium, Brandenburg/Havel
Abschluss mit Abitur

Hochschulstudium

10/2004 – 10/2011 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2012 Assistenzarzt in der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinikums Magdeburg

Publikationen

Müller, C., Gardemann, A., Keilhoff, G., Peter, D., Wiswedel, I., Kropf, S., Schild, L.: Palmitate protects hepatocytes from oxidative stress and triacyglyceride accumulation by stimulation of nitric oxide synthesis in the presence of high glucose and insulin concentration. Free radical research. 12:1425-1434. 2010.

Müller, C., Gardemann, A., Keilhoff, G., Peter, D., Wiswedel, I., Schild, L.: Prevention of free fatty acid-induced lipid accumulation, oxidative stress, and cell death in primary hepatocyte cultures by a Gynostemma pentaphyllum extract. Phytomedicine. 19(5):395-401. 2012.

Magdeburg, den 31.08.2015

Christian Müller