

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor Prof. Dr. med. Lammert

**Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH):
Konzepte zur Pathogenese und einer rationalen Behandlung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2016

vorgelegt von Junko Clara Huebers
geb. am 22.10.1975 in Quierschied/Saar

Meinem Bruder gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|--------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungen | V |
| | |
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| Abstract in Englisch | 2 |
| | |
| 2. Einleitung | 4 |
| 2.1 Das NASH-Syndrom | 5 |
| 2.2 Theorien zur Entstehung der NASH | 6 |
| 2.3 Diagnosestellung | 7 |
| 2.4 Insulinresistenz und NASH | 7 |
| 2.5 Prävalenz | 8 |
| 2.6 Gegenwärtige Behandlungsansätze | 9 |
| 2.7 Abgrenzung zur hereditären Hämochromatose | 9 |
| 2.8 Vulnerabilität der Hepatozyten | 10 |
| 2.9 Leitenzyme und Biomarker | 10 |
| 2.10 Ursachen und Abwehr von Zellschädigungen | 11 |
| 2.11 Zelluläre Eisenakkumulation | 12 |
| 2.12 Unterschiede zwischen NASH und Hämochromatose | 13 |
| 2.13 Einfluss der Lipidperoxidation | 13 |
| 2.14 Zielsetzungen und Fragestellungen dieser Arbeit | 13 |
| | |
| 3. Material und Methodik | |
| 3.1 Patientengut | 16 |
| 3.2 Fallbeobachtung eines exemplarischen NASH-Patienten | 16 |
| 3.3 Untersuchungsmethoden | 16 |
| 3.4 Fallbeobachtung bei Anwendung von UDC | 17 |
| 3.5 Fallbeobachtung bei Aderlasstherapie | 17 |
| 3.6 Laboranalysen | 17 |
| 3.6.1 Beteiligte Laboratorien | 17 |
| 3.6.2 Akutlabor | 18 |
| 3.6.2.1 Hämatokritbestimmung | 18 |
| 3.6.2.2 Transaminasenbestimmungen | 18 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.6.2.3 | Blutzuckermessungen | 18 |
| 3.6.2.4. | Glukosetoleranztestung | 18 |
| 3.6.2.5 | Blutsenkungsgeschwindigkeit | 19 |
| 3.6.2.6 | Urinanalysen | 19 |
| 3.6.2.7 | Nachweis von okkultem Blut | 19 |
| 3.6.2.8 | Normalbereich der Laborparameter | 20 |
| 3.6.2.9 | Phlebotomie | 21 |
| 3.6.3 | Zytologische Untersuchungen | 21 |
| 3.6.4 | Allgemeine Patientendaten | 22 |
| 3.6.5 | Sonographische Methoden | 22 |
| 3.6.6 | Statistische Verfahren | 22 |
| 4. | Ergebnisse | 23 |
| 4.1 | Analyse des Patientenguts mit Fettleber und Fettleberhepatitis | 24 |
| 4.2 | Geschlechtsbezogene Auswertung | 24 |
| 4.3 | Alters- und geschlechtsbezogene Auswertung | 26 |
| 4.4 | Präliminäre Daten bei Patienten mit nicht gesicherten Fettstoffwechselerkrankungen | 31 |
| 4.5 | Vergleich der Behandlung eines NASH-Patienten mit UDC und Aderlassen | 31 |
| 4.5.1 | Vorperiode | 31 |
| 4.5.2 | Anwendung von UDC | 33 |
| 4.5.3 | Aderlasstherapie | 35 |
| 4.6 | OGT-Teste und Insulinbestimmungen | 36 |
| 4.7 | Verlaufskontrollen | 38 |
| 4.7.1 | Leberbiopsien | 38 |
| 4.7.2 | Sonographische Befunde | 39 |
| 4.8 | Effekte von UDC und Aderlassen bei Patienten ohne NASH | 40 |
| 4.8.1 | UDC-Wirkung in einer Langzeitstudie | 40 |
| 4.8.2 | Konsequente Therapie mit Aderlassen | 41 |
| 4.8.3 | Korrelation zwischen Leberenzymen und Parametern des Eisenstoffwechsels | 42 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5. | Diskussion | 47 |
| 5.1 | Zur Datenbasis des Universitätsklinikums des Saarlandes | 48 |
| 5.1.1 | Variationsbreite der Parameter von Hämoglobin und Hämatokrit | 48 |
| 5.1.2 | Aussagekraft des Serumferritins | 49 |
| 5.2 | Einfluss von Adipositas und pathologischer Glukosetoleranz | 50 |
| 5.3 | Signifikanz des Eisenstatus bei NASH | 50 |
| 5.4 | Zur Hypothese eines „second hit“ | 50 |
| 5.5 | Angenommene Wirkmechanismen | 51 |
| 5.6 | Kinetik der Behandlung mit UDC | 52 |
| 5.7 | UDC als möglicher Eisenchelatbildner | 53 |
| 5.8 | Andere Wirkmechanismen von UDC | 54 |
| 5.9 | Laborparameter während einer konsequenten Aderlasstherapie | 55 |
| 5.10 | Eisen beim NASH-Syndrom: Verursacher oder Zuschauer ? | 57 |
| 5.10.1 | Zelltoxische Wirkung chemischer Radikale | 57 |
| 5.10.2 | Hämoglobin als Katalysator von Zellschädigungen | 58 |
| 5.11 | Aderlasstherapie bei alkoholgeschädigter Leber | 58 |
| 5.12 | Lipide als mögliche Noxen für Hepatozyten | 59 |
| 5.13 | Validierung der Behandlungsergebnisse | 59 |
| 5.14 | Ist NASH heilbar ? | 60 |
| 5.15 | Diskussion zur Problematik der Diagnosestellung von NASH | 60 |
| 5.15.1 | Bildgebende Verfahren | 60 |
| 5.15.2 | Morphologische Untersuchungen | 60 |
| 5.15.3 | Atomabsorptionsspektrometrie | 61 |
| 5.16 | Eisenstatus und NASH | 61 |
| 5.16.1 | NASH aus endokrinologischer Sicht | 61 |
| 5.16.2 | NASH als Eisenspeicherkrankheit | 61 |
| 5.17 | Erweiterung der „second hit“ Hypothese | 62 |
| 5.18 | Vergleich von NASH und Hämochromatose | 63 |
| 5.18.1 | Aderlasstherapie bei Hämochromatose | 63 |
| 5.18.2 | Aderlässe und Parameter des Eisenstoffwechsels | 63 |
| 5.18.3 | Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen NASH und Hämochromatose | 64 |
| 5.18.4 | Bestimmungsmethoden für das Gesamteisen im Körper | 65 |
| 5.19 | Ferritin und seine Beziehung zu Hämosiderin | 65 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.20 | Eisen in metabolischem Transit | 66 |
| 5.21 | Probleme bei der Interpretation des Serumferritins | 70 |
| 5.22 | Empfehlungen zur Diagnosesicherung und der Behandlung von NASH aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit | 72 |
| 5.23 | Ausblick auf weitere Entwicklungen | 72 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 74 |
| 7. | Publikation von Teilergebnissen dieser Arbeit | 86 |
| 8. | Danksagung | 87 |
| 9. | Anhang | 88 |

Abkürzungen:

| | |
|---------|--|
| AA | Atomabsorptionsspektrometrie |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| ASH | Alkoholische Steatohepatitis |
| Bili | Bilirubin |
| BMI | Body Mass Index |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| Bz | Blutzucker |
| C 282 Y | Mutation der HFE-Synthese |
| CK-18 | Cytokeratin-Marker |
| CYP | Cytochrom P System |
| DFO | Desferrioxamin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzym-linked Immunassay |
| F | Ferritin |
| FO | Ferrioxamin |
| GGT | Gamma Glutamyl Transpeptidase |
| GOT | Glutamat Oxalat Transaminase |
| GPT | Glutamat Pyruvat Transaminase |
| Hb | Hämoglobin |
| HbA 1 c | Glucosyliertes Hämoglobin |
| HCC | Hepatocelluläres Carcinom |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HH | Hereditäre Hämochromatose |
| Hkt | Hämatokrit |
| hMS | Metabolisches Syndrom der Leber |
| HOMA IR | Index der Insulinresistenz |
| IR | Insulinresistenz |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LDL | Low density lipoprotein |
| MCL | Medioclavicularlinie |
| MS | Metabolisches Syndrom |
| NAFLD | Nicht alkoholische Fettlebererkrankung |
| NASH | Nicht alkoholische Steatohepatitis |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| NID | Near iron deficiency |
| OGTT | Oraler Glukosetoleranztest |
| P | Signifikanz |
| RE | Retikuloendotheliales System |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| SDM | Standardabweichung vom Mittelwert |
| SeF | Serumferritin |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| sTfR | Serumtransferrin-Rezeptor |
| TFR1 | Transferrin-Rezeptor 1 |
| TFR2 | Transferrin-Rezeptor 2 |
| Tf | Transferrin |
| Tfsat | Transferrinsättigung mit Eisen |
| Tg | Triglyzeride |
| t-Test | Student Test |
| UDC/UDCA | Ursodesoxycholsäure |
| ZNS | Zentralnervensystem |

Zusammenfassung:

(1) In dieser Dissertation sollten aktuelle Hypothesen zur Genese, Pathophysiologie, Diagnose und Behandlung von NASH auf Validität und Begründbarkeit hin überprüft werden. Dazu wurden umfangreiche Patientendaten der Medizinischen Universitätsklinik in Homburg sowie experimentelle Langzeit-Untersuchungen an Einzelpersonen durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war die Formulierung rationaler Empfehlungen zur Diagnose und Therapie des NASH-Syndroms.

(2) Aus dem großen Patientengut des Universitätsklinikums wurden relevante Labordaten des Eisen-, Fett - und Kohlenhydrat-Stoffwechsels von NASH-Patienten und von Patienten mit ähnlicher Symptomatik einer breit gefächerten statistischen Auswertung unterzogen.

(3) Zusätzlich wurden Behandlungsdaten eines jungen Patienten mit gesichertem NASH-Syndrom über einen Zeitraum von über fünf Jahren analysiert. Die Daten erlaubten an diesem Patienten einen unmittelbaren Vergleich der Effektivität einer Therapie mit Ursodesoxycholsäure (UDC) und der Therapie mit Aderlässen. Zur Dokumentation des Behandlungserfolgs wurden bei beiden Therapieansätzen die wichtigsten Parameter des Eisen- und Zuckermetabolismus sowie wichtige Leitenzyme der Leber im Blut bestimmt. Histologische Untersuchungen an Leberbiopsien sowie bildgebenden Techniken wie Sonographie wurden als weitere Verfahren herangezogen.

(4) Die Analyse der Daten des umfangreichen Patientengutes bestätigte Vermutungen, dass das NASH-Syndrom meist - wenn nicht immer- mit Adipositas und erhöhten Werten des Serumferritins vergesellschaftet ist. Nicht bestätigt werden konnte dagegen frühere Berichte über einen engen Zusammenhang des NASH-Syndroms mit Hypertriglyzeridämie und Hypercholesterinämie.

(5) Eine orale Langzeittherapie mit Ursodeoxycholsäure (UDC) führte bei dem NASH-Patienten zur Reduktion pathologisch erhöhter Leberenzymaktivitäten, insbesondere der GPT. Darüber hinaus wurde während der UDC-Behandlung ein deutlicher Rückgang pathologisch erhöhter Serumferritinwerte beobachtet. Nach Absetzen der UDC-Behandlung stiegen die Werte für die relevanten Leberenzyme sowie für das Serumferritin wieder stetig an. Für das Serumeisen und den Hämatokritwert wurden dann sogar deutlich höhere Werte als

vor Beginn der Behandlung mit UDC beobachtet (=„Rebound-Phänomen“).

(6) Unter einer konsequenten Aderlasstherapie fielen die Werte der relevanten Laborparameter steil ab. Obwohl bei Aussetzung oder Verminderung der Häufigkeit der Aderlässe wieder ein deutlicher Anstieg von GPT und Hämatokrit beobachtet wurde, blieben die Werte für das Serumferritin in einem sehr niedrigen Bereich.

(7) Die Labordaten, die histologische Beurteilung von Biopsien der Leber und die Resultate zusätzlicher Methoden der Bildgebung belegen die Rückbildung von spezifischen Veränderungen des NASH-Syndroms.

(8) Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung zusätzlicher Beobachtungen an gesunden Probanden sowie an einem Patienten mit alkoholbedingter Lebererkrankung werden in dieser Dissertation begründbare Empfehlungen zur Diagnose und Behandlung des NASH-Syndroms und verwandter Syndrome mit Leberbeteiligung vorgeschlagen. Dabei wird insbesondere die Schädigung von Zellstrukturen durch katalytisch aktives Eisen mit Bildung freier chemischer Radikale und deren nachfolgender Angriff auf zelluläre Lipide und Fette diskutiert.

Shortened Summary in English (Abstract):

(1) The present study was conducted to test the validity of current hypotheses pertinent to the pathogenesis and treatment of the NASH syndrome. The aim of this investigational work was to develop better methods for the diagnosis and treatment of NASH.

(2) Data from outpatients with NASH and related disorders were grouped according to gender and age and to the grade of confidence in the diagnosis. The data were subjected to an extensive statistical evaluation. Furthermore, experimental studies were carried out in a patient with proven NASH. The effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) and of phlebotomy were tested during a period of several years. Relevant parameters of the iron and glucose metabolism and liver enzymes were measured at short intervals. In addition, histological techniques and liver ultrasound were performed.

(3) While statistical evaluation confirmed previous reports indicating that NASH

syndrome is associated with obesity and increased serum ferritin concentrations, no association could be demonstrated between NASH and hyperlipidemia.

(4) Long-term treatment with UDCA leads to marked reduction of abnormal serum aminotransferase activities, in particular ALT. Surprisingly, UDCA treatment causes a marked reduction in the concentration of serum ferritin.

(5) After termination of UDCA treatment, aminotransferases and ferritin levels steadily increased. Hematocrit and serum iron concentrations showed an excessive rebound to pathological values.

(6) Phlebotomy is followed by a steep decline in all parameters of iron metabolism and aminotransferases. In particular, serum ferritin values were affected, whereas only traces were detected during blood removal.

(7) The laboratory evaluation (including iron and glucose parameters and liver enzymes) together with histological results and ultrasound imaging suggest complete recovery from the symptoms of NASH in our patient. In addition, clinical signs underscored the efficiency of iron removal as a rational and efficient procedure for the treatment of the NASH syndrome.

(8) The results presented here provide additional insights into our understanding of the pathogenesis of the NASH syndrome. In addition, recommendations are given to detect and diagnose the NASH syndrome. Finally, suggestions are presented for the rational treatment of the NASH syndrome, which poses an ever increasing health problem in developed countries.

2. Einleitung

Veränderungen im makroskopischen Aussehen der Leber durch Fetteinlagerung sind den Ärzten schon seit der Antike bekannt (76, 77). Sie werden in unserer Zeit mit zunehmender Häufung besonders bei steigendem Alkoholkonsum in Kombination mit kohlehydratreicher Ernährung beobachtet (25, 27, 30, 31). Letztere ist bei Tieren die Vorbedingung für die Produktion der Fettleberpastete bei Gänsen („foie gras“). Das Volumen der fettreichen Lebern wird dabei durch Zwangsfütterung („Nudlung“) mitunter um das Fünffache der Norm gesteigert.

Eine Fettleber beim Menschen liegt definitionsgemäß dann vor, wenn mehr als 50% der Hepatozyten verfettet sind oder das Fett mehr als 5% des Gesamtlebergewichts ausmacht (20, 21, 28, 32, 33). Sind weniger Zellen betroffen, so spricht man von einer Leberzellverfettung (34, 35, 40, 41, 58, 60, 67, 69, 89, 90). Die intrazellulären Fetttropfen bestehen vorwiegend aus Triglyzeriden (Tg) und sind mit einer eigenen Membran vom übrigen Zellinhalt abgegrenzt. Man unterscheidet die blande Fettleber (Steatosis hepatis) ohne entzündliche Reaktion und eine Fettleberhepatitis (Steatohepatitis) mit entzündlicher Reaktion. Dazu zählen die alkoholische Steatohepatitis (ASH) und die nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH) (80).

Seit dem Ende des 20. Jahrhunderts traten Fettlebererkrankungen immer häufiger auf. In den USA hat man diese Erkrankung sogar als Epidemie des neuen Jahrtausends bezeichnet (81, 84, 86, 98, 110, 112). Auch in Deutschland ist dies mit 20% der Bevölkerung die häufigste Lebererkrankung. Assoziiert mit der Fettleber sind Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2. Aber auch regelmäßiger Alkoholkonsum (bis hin zum Alkoholabusus) wird bei Patienten mit Fettleber häufig festgestellt (91, 118, 125, 128). Da aber die Fettlebererkrankung auch bei nachgewiesener Alkoholabstinenz auftrat, hat Ludwig dieses Krankheitsbild als Nicht-Alkoholische-Fettleber-Erkrankung (NAFLD) bezeichnet (48, 50, cf Ludwig p. 94). Die Verschlechterung zu einer entzündlichen Form mit Zellschädigung wurde nomenklatorisch konsequent mit NASH (Nicht-Alkoholische-Steatohepatitis) bezeichnet.

2.1 Das NASH-Syndrom

Das NASH-Syndrom ist ein mit Adipositas, Fettleber, Zuckerstoffwechselstörungen sowie laborchemischen und histologischen Veränderungen von Leberzellen und bindegewebshaltigen Strukturelementen der Leber einhergehender Symptomkomplex (49, 119, 132). Eine enge Beziehung zum metabolischen Syndrom (MS) wird angenommen (67, 72, 79, 47, 87, 88, 117, 121). Unter MS wird bekanntlich ein Symptomenkomplex aus androgener Adipositas, gestörtem Kohlenhydratmetabolismus (Insulinresistenz, pathologischer oraler Glukose-Toleranztest oder Diabetes mellitus), Hypertriglyzeridämie und arterieller Hypertonie verstanden (16, 29, 67, 72, 79, 101, 132, 140, 142, 152). Neben diesen begleitenden Syndromen wird mit hoher Konstanz bei indirekten Laboranalysen auch eine höhere Eisenbelastung der Leber festgestellt.

Die Pathogenese der Erkrankungen des NASH-Formenkreises ist weitgehend unbekannt. Eine Diagnose ist daher nur nach Ausschluss anderer Lebererkrankungen (viral, metabolisch, autoimmunologisch), begleitet von einer histologischen Untersuchung an Leberbiopsien, möglich (Ausschlussdiagnose).

Klinisch imponieren bei NASH eine Adipositas mit chronischer Müdigkeit und einem verminderten körperlichen Leistungsvermögen. Zudem bestehen meist Völlegefühl und Druckgefühl mit diffusen rechtsseitigen Oberbauchschmerzen (49, 51, 72, 73, 77, 78, 80). Die Patienten leiden häufig unter schwerer Schlafapnoe. Die Krankheit tritt bei Männern und Frauen im fortgeschrittenen Lebensalter mit gleicher Häufigkeit auf. Frauen im menstruationsfähigen Alter scheinen aber weniger betroffen zu sein. Aber bereits im Kindesalter sind Fälle mit typischer NASH-Symptomatik beschrieben worden (1, 2, 5, 6, 7).

Höheres Alter, kaukasische oder hispanische Abstammung scheinen neben Übergewicht und anderen metabolischen Erkrankungen bei der Pathogenese von NASH eine wichtige Rolle zu spielen. Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) ist oft nicht eindeutig von dem NASH-Syndrom zu trennen. Allgemein wird NAFLD als die Vorstufe zu der NASH-Erkrankung angesehen. Erhöhte Eisenspeicher sind bei NAFLD im Gegensatz zu NASH jedoch nicht vorhanden (77, 78, 80, 90, 92, 93, 99, 102, 108, 115, 116).

2.2 Theorien zur Entstehung der NASH

Mehrere Theorien zur Entstehung von NASH wurden publiziert und extensiven Diskussionen unterworfen. Die Mehrzahl der Diabetologen vertritt die Ansicht, dass NASH zum Formenkreis eines metabolischen Syndroms („hepatic metabolic syndrome“, hMS) gezählt werden sollte. Andere Forschergruppen vermuten hingegen weitere auslösende Faktoren wie einer Beteiligung oder kausale Rolle des Lebereisens (49, 51, 83, 100, 126, 130, 137, 138, 139, 140, 142, 145, 147, 148, 150, 151). Eisen katalysiert in vivo und in vitro die Bildung aggressiver Sauerstoff- und Hydroxylradikale, die auf Zellmembranen und die Ribonucleinsäure (RNA) einwirken. Diese Mechanismen werden auch bei der hereditären Hämochromatose (HH) für die Zellschädigung verantwortlich gemacht (4, 12, 26, 36). Es erfolgt zunächst eine Fibrosierung, die sich schließlich in das irreversible Stadium einer Leberzirrhose weiterentwickeln kann. Hepatocelluläre Carcinome (HCC) werden bei der HH wie auch bei NASH gehäuft beobachtet (39, 44, 49, 51, 54). Bei der HH muss allerdings eine hohe bis sehr hohe Eisenbeladung der Leber vorhanden sein. Beim NASH-Syndrom liegt eine derart hohe Eisenanreicherung in der Leber nicht vor. Dennoch hat man wegen unverkennbarer Ähnlichkeiten das NASH-Syndrom als den „kleinen Bruder“ der HH bezeichnet (49).

Eine dritte Hypothese ist im Wesentlichen ein Hybrid der vorab beschriebenen zwei Theorien. Es wird angenommen, dass primär eine Einlagerung von Fett (=erste Noxe, „first hit“) in den Hepatozyten erfolgen muss. Dies führt dann letzten Endes nach längerer Zeit zu einer Fettleber (NAFLD). Danach bedarf es jedoch noch einer zweiten Noxe („second hit“), um morphologisch und biochemisch fassbare Leberschädigungen auszulösen (49, 51, 82). Als eine dieser Noxen steht überschüssiges, katalytisch aktives Eisen in der Diskussion. Aber auch andere Noxen wie Alkohol, einseitige Diäten, lebertoxische Medikamente und endokrine Ursachen kommen in Frage. Konsequenz dieser Einwirkungen eines „second hit“ sind metabolische Fehlleistungen der Leberzellen, die schließlich morphologische Veränderungen zur Folge haben.

Man muss daher annehmen, dass NASH keine monokausale Erkrankung ist und dass die Einwirkung verschiedenster zusätzlicher Noxen („additional hits“) den Verlauf und die Intensität der Störungen bei NASH sehr unterschiedlich beeinflussen können. Patienten (vor allem Frauen über 50 Jahre) mit chronisch leicht erhöhten Leberenzym-Werten, die nach intensiver klinischer, biochemischer und radiologischer Untersuchung weiterhin ohne spezifische Diagnose bleiben, leiden wahrscheinlich an einer nicht-alkoholischen

Steatohepatitis (NASH-Syndrom). Dieser Verdacht wird bei Vorliegen einer Adipositas, Insulinresistenz, einem hyperechogenen Leberparenchym, Fibrosierung und Neigung zu Störungen des Eisen- und Zuckerstoffwechsels erhärtet (103, 104, 106).

2.3 Diagnosestellung

Powell et al. (110) schlugen drei Kriterien für das Erkennen von NASH vor:

- (1) Das histologische Bild einer Steatohepatitis
- (2) Kein oder nur minimaler Alkoholkonsum
- (3) Ausschluss einer viralen Hepatitis.

Diese Kriterien sind aber nicht ausreichend, um die Ausschlussdiagnose „NASH-Syndrom“ mit erforderlicher Sicherheit stellen zu können. Als mögliche Störfaktoren oder Unschärfen werden folgende Argumente vorgetragen:

(1) Das biopsische Material könnte bei der Punktion aus einem nicht befallenen oder nicht repräsentativen Leberareal entnommen worden sein („sampling error“).

(2) Die Definition „nicht alkoholisch bedingt“ ist eigentlich ein Misnomer, denn die australische Gruppe um Powell et al. gestatten dem NASH-Patienten durchaus einen (nicht) geringen Alkoholkonsum von ca. 20g /Tag (110). Wie sollte man dann aber einen NASH-Patienten eingruppiieren, der am Wochenende oder bei Festen Alkohol in erheblicher Menge zu sich nimmt und dabei dennoch unter der nicht beanstandenden wöchentlichen Ration von 140 ml reinen Alkohols bleibt?

(3) Der Ausschluss des Vorliegens einer viralen Hepatitis oder eines Folgezustandes dieser Infektion oder anderer kryptogener Lebererkrankungen ist gelegentlich nicht mit der gebotenen Eindeutigkeit zu führen.

2.4 Insulinresistenz und NASH

Durch Einbeziehung von Werten aus dem Routinelabor hat man versucht, die Diagnose NASH verlässlicher zu stellen. Da NASH meist mit Übergewicht und Neigung zu Diabetes mellitus einhergeht, hat man in erster Linie die für diese Stoffwechselstörungen aussagekräftigen Laborparameter ausgewählt. Viele der Untersuchungen weisen eindeutig auf eine relative Insulinresistenz (IR) bei vielen NASH-Patienten hin (97, 117, 133, 135, 136,

139, 144). Diese kann man durch Bildung des HOMA IR-Index annähernd quantifizieren. Dabei wird das Insulin ($\mu\text{U/ml}$) mit dem Serumglukosewert (mmol/l) multipliziert und durch 22,5 geteilt. Werte über 2 geben einen Hinweis auf eine Insulinresistenz; über 2,5 deutet der Quotient auf eine wahrscheinliche Insulinresistenz hin, und bei Typ 2-Diabetikern sind Werte über 5 Durchschnittswerte.

Insgesamt kann man unter Einbeziehung von Parametern des Fettstoffwechsels (z.B. Triglyceride und Cholesterin mit Differenzierung in HDL und LDL) mit einiger Sicherheit davon ausgehen, dass das Syndrom NASH und ihre Vorstufe NAFLD einen engen Bezug zu IR und MS haben. Zum MS zählt dagegen nicht ein erhöhter Gehalt des Körpers an toxisch wirksamen Eisen. Dies ist aber bei NASH regelhaft der Fall.

2.5 Prävalenz

NASH ist eine sehr häufige Erkrankung. Etwa 1% der Allgemeinbevölkerung ist betroffen. In Autopsiestudien wird sogar eine Häufigkeit von 4% berichtet. Die Tendenz zu NASH ist in Wohlstandsländern stark ansteigend. Nicht zuletzt scheint in diesen Ländern der Konsum von schnell einnehmbarer kalorienreicher Kost („fast food“) eine wichtige Rolle zu spielen. Zeitmangel für die Verzehr einer Mahlzeit führt auch zu ungenügender Zerkleinerung der Speisen durch Kauen. In den USA wird der Verzehr von Pizza mit Streukäse, Hamburgern mit Pommes frites und mexikanischen Taco-Schalen mit Fettlebererkrankungen und NASH in engen Zusammenhang gebracht (51, 52, 61, 65, 66).

Bei vielen NASH-Patienten kann die Krankheit eine postnekrotische Leberzirrhose auslösen. Diese geht mit einer nicht zu unterschätzenden Morbidität einher. Auch das gehäufte Auftreten von HCCs ist bekannt (49, 51, 52, 110). Weitere Angaben zur systematischen Einordnung des NASH-Syndroms finden sich in Tab. 1.

Folgende Kriterien wurden von der American Gastroenterological Association vorgeschlagen:

Tabelle 1: Nomenklatur der durch Fett ausgelösten Erkrankungen der Leber

Histologische Nomenklatur

1. Fettleber (Grad 1-4)
2. Steatohepatitis
 - a. Grad: Ausmaß nekroinflammatorischer Aktivität
 - b. Stadium: Ausmaß der Fibrosierung

Klinisch bedeutsame Faktoren

1. Alkohol
 2. Insulinresistenz (Fettsucht, Diabetes, Hypertriglyzeridämie, Bluthochdruck, Lipoatrophie)
 3. Pharmaka (Amiodaron, Diltiazem, Tamoxifen, Steroide, antivirale Medikamente)
 4. Störungen des Lipidstoffwechsels (Abetalipoproteinämie, Hypobetalipoproteinämie, Cholesterinspeicherkrankheit, Weber-Christian-Syndrom, Hypobetalipoproteinämie)
 5. Toxische Einflüsse (Umwelt, Arbeitsplatz)
 6. Gewichtsabnahme (jejunoilealer Bypass, Magenbypass, längerandauerndes Hungern)
 7. Idiopathisch
-

2.6 Gegenwärtige Behandlungsansätze

Spezifische Behandlungsansätze für das NASH-Syndrom sind heute nicht bekannt. Symptomatisch kann eine Besserung durch Gewichtsreduktion und verstärkte Bewegung sowie durch pharmakologische Beeinflussung bestimmter biochemischer Abweichungen (Hyperglykämie und Hyperlipidämie) erreicht werden (21, 23, 68, 97, 103). Antidiabetika, Antioxidantien und andere Substanzen mit fraglichen oder zumindest ungeklärten Wirkmechanismen wie Ursodesoxycholsäure (UDC) wurden zur Behandlung eingesetzt. Die Resultate zahlreicher Studien mit verschiedenen medikamentösen Ansätzen sind jedoch widersprüchlich (8, 24, 71, 75, 89, 90, 105, 122, 127).

Bei erhöhten Serumferritinwerten, die üblicherweise als Indikator für den Eisenstatus des Körpers extrapoliert werden, kann durch Aderlasstherapie eine temporäre Verbesserung erhöhter Leberenzymwerte, der Hyperglykämie und möglicherweise auch ein Rückgang fibrotischer Veränderungen der Leber erreicht werden (57, 123, 138, 147, 150). Günstige Resultate durch Entfernung überschüssigen Eisens durch Phlebotomie wurden auch bei anderen Erkrankungen wie der chronischen Hepatitis C Virus-Infektion bei gleichzeitiger Interferontherapie beschrieben (54, 59, 68, 129).

2.7 Abgrenzung zur hereditären Hämochromatose

Durch genetischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die für die HH verantwortliche Genmutation p.C282Y im *HFE*-Gen für die Inzidenz des Auftretens der

NASH und NAFLD- Erkrankungen ohne Bedeutung („no linkage“) ist (26, 37, 38, 73). Dies konnte durch zahlreiche Untersuchungen weiter gefestigt werden.

2.8 Vulnerabilität der Hepatozyten

Es kann als erwiesen gelten, dass die Hepatozyten und nicht die Kupfferzellen des retikuloendothelialen Systems der Leber das Ziel des Angriffs („target“) bei entzündlichen Lebererkrankungen einschließlich des NASH-Syndroms sind. Aber auch hier gibt es in der Literatur gegenteilige Ansichten, wobei in erster Linie eine Dysfunktion des retikuloendothelialen Systems mit entsprechenden Konsequenzen diskutiert wird (59, 64).

Mit Hinblick auf die Anreicherung von Eisen in verschiedenen Leberzelltypen wurde auch darauf hingewiesen, dass ein spezifischer pathogener Mechanismus vorhanden sei, der eine starke Eisendeposition in den Sinusiden der Leber auslöse. Die Autoren charakterisieren diese spezifische Deposition als ein „metabolisches Eisenüberladungssyndrom“ (64, 67).

2.9 Leitenzyme und anderen Biomarker

Unabhängig von den Noxen (z.B. Alkohol, Diätfehler, Viren, Gallengangveränderungen, Einwirkung lebertoxischer Medikamente) zeigen sich stets Veränderungen in der Blutkonzentration der im Hepatozyten synthetisierten („leberspezifischen“) Transaminasen (51, 52, 110, 119). Die Leitenzyme GOT und GPT sowie die GGT werden bei Vorliegen einer Lebererkrankung meist routinemäßig bestimmt. Bei diskreter Erhöhung bestimmter Transaminasen kann eine weitere Differenzierung durch Bildung von Quotienten (z.B. GOT/GPT) hilfreich sein (51, 52). Dies gilt insbesondere als diagnostische Hilfe beim NASH-Syndrom, wobei die GPT-Werte meist höher pathologisch berichtet werden als die GOT. Eine solitär erhöhte GGT kann oft auf Alkoholabusus oder die Einnahme lebertoxischer Medikamente hinweisen (111).

In einer neueren Veröffentlichung wird als möglicher Biomarker für die Diagnose des NASH-Syndroms Plasmacytokeratin 18 (CK-18) empfohlen (149). Dieser Ansatz, d.h. die semiquantitative Messung des Zelluntergangs von Leberzellen durch Apoptose, hat nach Meinung der Autoren das Potenzial, das NASH-Syndrom von einer milden Fettleber (NAFLD) abgrenzen zu können (145).

2.10 Ursachen und Abwehr von Zellschädigungen

Viele Faktoren wirken auf das Ausmaß einer Schädigung der Hepatozyten durch Noxen modifizierend. Der Hepatozyt verfügt über eine Reihe sehr effektiver Detoxifikations-Mechanismen, die bis zu einem gewissen Grad die Abwehr von Noxen gestatten. Diese Möglichkeit zur Detoxifikation ist aber individuell sehr variabel und unterliegt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch einer genetischen Determinierung (113, 114, 124).

So kann beispielsweise der Genuss exzessiver Mengen an Alkohol bei einem Individuum eine starke Erhöhung der Transaminasen bei hepatozellulärer Schädigung auslösen. Bei einem anderen Individuum kann jedoch ein gleich hoher Alkoholkonsum auf die Transaminasen und die morphologische Struktur der Leber keinerlei Auswirkungen haben. Diese „Toleranz“ gegen Alkohol ohne Leberdysfunktion kann bei einzelnen Individuen ein Leben lang persistieren.

Genetik

Bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen wird diskutiert, ob der Mangel an bestimmten Leberenzymen oder Gewebs-Rezeptoren schädliche Eigenschaften des Alkohols mit anschließenden zellulären Entgleisungen verstärken kann (134). Asiaten und die Ureinwohner Nordamerikas werden oft als Beispiele für eine verstärkte Vulnerabilität der Leber und des Immunsystems durch Noxen wie Alkohol angeführt (134, 137). Neuere Veröffentlichungen, die auf genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) basieren, konnten bestimmte Risiko-Genloci identifizieren wie eine Variante der Triglyzeridhydrolase PNPLA3, die eine Progression metabolischer Lebererkrankungen in eine Leberzirrhose oder ein Fortschreiten der NAFLD-Erkrankung begünstigen können (17).

Modifizierende Einflüsse

Eine erwiesene Rolle bei Schädigungen der Leber durch Alkohol spielt die Ernährung. Bei ausgedehnten Beobachtungen im europäischen Weinbau hat man schon vor Jahrzehnten festgestellt, dass zwischen den Gutsbesitzern und den bei der Weinlese beschäftigten Arbeitern bei alkoholbedingten Erkrankungen der Leber Unterschiede bestehen. So entwickelt sich bei den Arbeitern und dem Hilfspersonal im Weinbau meist eine Fettleber mit nachfolgendem Übergang in eine Fibrose. Diese kann sich später zu einer Leberzirrhose weiter entwickeln. Dagegen kommt es bei den Weinbergbesitzern bei vergleichbarem Konsum von Alkohol meist nur zum Bild einer „benignen“ Fettleber mit der Möglichkeit zur

Reversibilität. Diese Unterschiede finden eine plausible Erklärung in der Qualität der Ernährung: Der Gutsherr hatte hochwertiges Protein (Fleisch, Fisch) und reichlich vitaminhaltiges Obst auf der Speisekarte, während die Arbeiter aus finanziellen Gründen meist auf eine kohlenhydratreiche proteinarme Kost angewiesen waren. Hochwertiges Eiweiß und reichlich Vitamine scheinen somit eine leberprotektive Funktion zu besitzen.

Bekannt ist auch, dass Vorerkrankungen der Leber wie die chronische Virushepatitis die Abwehrmöglichkeiten des Hepatozyten einschränken können. Nach derartigen Erkrankungen sind für den Patienten oftmals eine lebenslange Alkoholabstinenz und strenge diätätische Maßnahmen erforderlich. Aber auch bei Befolgung dieser Maßnahmen kann es zur Progression der Fibrose bis zum Endstadium einer Leberzirrhose kommen.

2.11 Zelluläre Eisenakkumulation

Für die Auslösung von Organschäden in der Leber durch exzessives Eisen spielt die Eisenverteilung auf die Zelltypen der Leber, insbesondere die Hepatozyten und die Makrophagen (Kupffer-Zellen), eine entscheidende Rolle (4, 102, 110, 121, 137, 138). Der Makrophage vermag viel größere Mengen an Eisen zu speichern, ohne dass es dadurch zu einer Funktionseinschränkung kommt. Diese außerordentlich hohe Speicherkapazität für Eisen ohne toxische Auswirkungen hat große Bedeutung für die Transfusionsmedizin. Sehr viele Blutkonserven (Erythrozyten/Hämoglobin) können gegeben werden, ohne dass dadurch eine Organdysfunktion der Leber auftritt. Dies ist Folge einer quasi untoxischen Deposition des aus den Erythrozyten entlassenen Eisens im retikuloendothelialen System des Körpers (62).

Bei der NASH könnte ein Defekt in den Kupffer-Zellen vorliegen, der zu einer verminderten „phagozytotischen“ Aufnahmekapazität dieser Zellen führt (102, 113). Dies könnte sekundär zu einer verstärkten Einlagerung von Eisen in die Hepatozyten der Leber führen. Die Konsequenzen dieser Einlagerung wären pathologische Veränderungen wie sie von den Frühstadien der HH bekannt sind (51, 64, 68, 110, 147). Diese neue und provokative Hypothese für die Genese von NASH erscheint attraktiv und ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die mögliche Toxizität des im Parenchym (Hepatozyten) deponierten Eisens ist völlig anders zu bewerten als bei Lagerung im retikuloendothelialen System. Schon eine geringe parenchymale Eisenüberladung löst Zeichen einer Leberschädigung aus. Bei der HH treten als Frühsymptome bereits im jugendlichen Alter Erhöhungen der leberspezifischen Enzyme auf.

Dies ist auch beim NASH-Syndrom der Fall.

2.12 Unterschiede zwischen NASH und Hämochromatose

Der weitere Verlauf der NASH und der HH ist sehr unterschiedlich. Während bei der HH ohne Behandlung (Phlebotomie) eine Deposition von Eisen in den parenchymalen Organen immer weiter fortschreitet und zum Tode führen kann, kommt es bei NAFLD und NASH zunächst nur zu einer progressiven Steigerung des Fettanteils (Fetttröpfchen in den Hepatozyten). Offenbar ist dieser hohe Fettanteil Vorbedingung für die toxischen Auswirkungen des sekundär vermehrt eingelagerten Eisens. Da der Verlauf von NASH und HH sehr starke Parallelen zeigt, muss man sich die Frage stellen, ob der ähnliche Verlauf mit Organdysfunktion der Leber und anderer parenchymalen Organe (z.B. Pankreas, Myokard) auf vergleichbare Triggermechanismen zurückzuführen ist.

2.13 Einfluss der Lipidperoxidation

Von besonderem Interesse ist die Lipidperoxidation im Hepatozyten (20, 23, 44, 47, 48). Bei diesem Vorgang werden die Lipide durch Reaktion mit Sauerstoffmolekülen oder Sauerstoffradikalen oxidiert und dadurch in ihren chemischen Eigenschaften verändert. Die Toxizität der Oxidationsprodukte bestimmter Lipidspezies wird im Wesentlichen durch Sauerstoffverbrückung und Dreiringbildung bestimmt.

Traditionell wird Fett in irdenen Gefäßen (z.B. Steingut) bei Kellertemperatur unter Luftabschluss gelagert. Dies rührt aus der Erfahrung, dass Fett, in eisernen Töpfen oder Pfannen aufbewahrt, sehr viel schneller ranzig wird. Für dieses Verhalten ist ebenfalls die katalytische Funktion des Eisens im Sinne einer Haber-Weiss-Reaktion oder des Fenton-Reagenz verantwortlich (vgl. Anhang).

2.14 Zielsetzungen und Fragestellungen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten Informationen über die Genese und die Auswirkungen der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) auf den menschlichen Organismus gesammelt werden. Wegen der Gemeinsamkeiten von NASH und NAFLD wurden NAFLD-Patienten ebenso wie Patienten mit NASH in die Untersuchungen aufgenommen. Für diese Studien standen umfangreiche Daten aus dem Patientengut des

Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung.

Ziel der statistischen Auswertung der Patientendaten und eigener experimenteller Beobachtungen war die Validierung der gegenwärtig etablierten Vorgehensweisen zur Diagnosestellung und der Behandlungsstrategien bei Verdacht auf ein NASH-Syndrom oder einem mit diesem Syndrom verwandten Krankheitskomplex.

Im Mittelpunkt dieser Dissertation stand die Frage, ob bei Patienten mit NASH oder NAFLD ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Eisenbeladung im Parenchym der Leber bzw. in den Zellen des retikuloendothelialen Systems und pathologischen Werten des Leber- und Zuckerstoffwechsels nachweisbar ist.

Folgende Ansätze wurden verfolgt:

1. Die sehr umfangreichen Daten der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes bei Patienten mit NASH und NAFLD oder Verdacht auf diese Erkrankungen sollten auf die relevanten Parameter des Eisen- und Zuckerstoffwechsels sowie auf eine Mitbeteiligung der Leber und des Pankreas hin untersucht werden.
2. Bei einem Patienten mit histologisch gesichertem NASH-Syndrom und eindeutig erhöhten Leberenzymen sollte der Effekt einer Langzeit-Behandlung mit oral verabreichter Ursodesoxycholsäure (UDC) untersucht werden. Der Effekt dieser Therapie auf relevante Funktionsparameter des Eisen- und Zuckerstoffwechsels sollte im Langzeitverlauf analysiert werden.
3. Am o.g. Patienten sollte nach Abschluss der UDC-Therapie ein erneuter Therapieansatz mit Aderlässen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Die Effektivität der Aderlasstherapie sollte den mit UDC gewonnenen Resultaten gegenübergestellt werden. Zusätzlich sollte der Einfluss der Phlebotomietherapie auf ausgesuchte Parameter des Zuckerstoffwechsels verfolgt werden.
4. Zu geeigneten Zeitpunkten der Therapie mit UDC oder mit Aderlässen sollten beim NASH-Patienten Leberbiopsien durchgeführt und histologischen Untersuchungen erfolgen.
5. Langzeit-Untersuchungen mit UDC sollten bei einem Kontroll-Patienten ohne NASH durchgeführt werden. Außer sonographisch gesicherten stummen Gallensteinen sollte der Patient gesund sein. Ziel der Untersuchungen war es, den Effekt von Ursodesoxycholsäure

(UDC) auf relevante Parameter des Eisen- und Fettstoffwechsels zu prüfen.

6. Bei einem Probanden mit selektiv erhöhter GGT-Leberenzymaktivität infolge ständigen Alkoholenusses sollten über längere Zeiträume Aderlässe durchgeführt werden. Relevante Labordaten des Eisenmetabolismus sowie ausgewählte Leberwerte sollten während der Phlebotomietherapie im Blut verfolgt werden.

7. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten mit den bisherigen Vorstellungen über Genese und Therapie des NASH-Syndroms kritisch verglichen werden. Die Ergebnisse dieser Dissertation sollten dazu dienen, begründbare Vorschläge zur Verbesserung der Diagnosestellung und Therapie des NASH-Syndroms und der mit diesem Syndrom verwandten Gesundheitsstörungen zu formulieren.

3 Material und Methodik

3.1 Patientengut

Die Resultate von über 200 weiblichen und männlichen Patienten aus dem Einzugsbereich des Universitätsklinikums in Homburg/Saar wurden in der Klinik für Innere Medizin II zusammengestellt und in dieser Studie einer zielgerichteten Auswertung zugeführt. Die Studie wurde 2001 begonnen und hatte eine Nachbeobachtungszeit von mehr als 5 Jahren.

Eine Aufteilung zur statistischen Auswertung erfolgte nach dem Geschlecht und dem Alter der Patienten (< 50 und ≥ 50 Jahre). Unterschieden wurde dabei zusätzlich zwischen gesicherten Diagnosen und Verdachtsdiagnosen der Erkrankungen NASH und der nicht durch Alkohol bedingten Fettleber (NAFLD).

3.2 Fallbeobachtung eines exemplarischen NASH-Patienten

Bei einem durch Leberbiopsie, Atomabsorptionsspektroskopie, extensives Labor und klinischen Verlauf gesicherten Fall einer NASH-Erkrankung wurden zusätzliche Untersuchungen über einen Zeitraum von mehreren Jahren durchgeführt. Der männliche Patient war bei Anfang der Studie 20 Jahre alt, 181 cm groß und hatte ein Gewicht von 92 kg. Daraus errechnet sich ein BMI von 29,0 kg/qm.

Bei diesem Patienten wurden bei früheren Routineuntersuchungen in der hausärztlichen Praxis erhöhte Werte aller Leberenzyme (vor allem GPT) und erhöhte Hämatokritwerte gefunden. Bei einigen Untersuchungen war im Nüchternurin auch eine Glukosurie aufgefallen.

3.3 Untersuchungsmethoden

Weitere spezielle Untersuchungsmethoden wurden in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes (vormaliger Direktor: Prof. Dr. Zeuzem) durchgeführt. Nach Bildung einer Patientengruppe mit der gesicherten Diagnose NASH wurde der o.g. Patient in eine Studie zur Beurteilung des Langzeiteffekts von Ursodesoxycholsäure (UDC) aufgenommen. Dieser Studie war zuvor von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt worden.

Der Patient gehörte nach Informationen am Ende der Studie der Verumgruppe an und erhielt 2,0 g UDC pro Tag als Einzeldosis. Während der über ein Jahr dauernden Einnahme

von UDC wurden die Laborparameter des Eisenstoffwechsels und der Leberfunktion gemessen. Orale Glukosetoleranztests (OGTT) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ausgeführt. Am Ende der UDC-Studie wurden neben extensiven Laboruntersuchungen wiederum eine Leberbiopsie und eine Sonographie der Oberbauchorgane durchgeführt.

Nach diesem Zeitpunkt wurden die Laborparameter nun ohne jede Medikation noch über neun Monate weiterverfolgt. Nach starkem Wiederanstieg der für das NASH-Syndrom typischen Laborwerte auf hohe Werte wurde als weitere therapeutische Option die Phlebotomie eingesetzt. Regelmäßige Aderlässe (190-200 ml Blut) wurden wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Jahren ausgeführt.

3.4 Fallbeobachtung bei Anwendung von UDC

Die Patientin hatte ein Körpergewicht von 59 kg, war 151 cm groß und 63 Jahre alt. Der BMI errechnet sich aus diesen Werten zu 25,9 kg/qm. Alle gemessenen Laborparameter lagen im Normbereich.. Insbesondere war der Wert für die GGT 27 U/ml und für das Gesamtbilirubin 0,84 mg/dl. Der OGTT war unauffällig. Die Patientin konsumierte keinen Alkohol. Die tägliche UDC-Dosis betrug 1,25 g/Tag.

3.5 Fallbeobachtung bei Aderlasstherapie

Der Patient war 54 Jahre alt, 175 cm groß und 83 kg schwer. Der BMI errechnet sich zu 27,0 kg/qm. Der OGTT war normal. Die Leberwerte waren GOT 24 U/l, GPT 31 U/l und GGT 162 U/ml. Das Bilirubin betrug bei Beginn der Aderlasstherapie 0,93 mg/ml. Der Patient gab einen regelmäßigen Konsum von Alkohol von mehr als 40 g pro Tag an. Der tägliche Alkoholgenuss wurde bei Ausführung der Aderlasstherapie (190 ml + 10 ml Blut) auf Wunsch des Patienten nicht eingeschränkt.

3.6 Laboranalysen

3.6.1 Beteiligte Laboratorien

Die Laboranalysen wurden in verschiedenen medizinischen Laboratorien ausgeführt:

(1) Zum ersten war in der Hausarztpraxis des Patienten und in der Klinik ein Akutlabor vorhanden. In diesem konnten die Proben für eine Reihe von Parametern ohne zeitlichen Verzug analysiert werden.

(2) Darüber hinaus erfolgten Einsendungen in ein Routinelabor für medizinische

Untersuchungen (Labor Saar, Dr. Lehmann, St. Ingbert) und an das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes.

(3) Zusätzlich wurde ein für spezielle Untersuchungen und Fragestellungen ausgerüstetes Referenzlabor (Prof. Dr. Seelig, Karlsruhe) mit Untersuchungen betraut.

Bei Einsendung des gleichen Untersuchungsmaterials unterschieden sich die Ergebnisse der o.g. zertifizierten Laboratorien in den wichtigsten Parametern des Eisen- und Zuckerstoffwechsel sowie der Leberwerte im Mittel um nicht mehr als 5%.

3.6.2 Akutlabor

3.6.2.1 Hämatokritbestimmung

Der Hämatokritwert wurde in der Hettich Haematokritzentrifuge Typ 2011 (Hettich, Tuttlingen) bei 13000 U/M nach sechsminütiger Zentrifugation abgelesen. Dazu wurden mit Na-Heparinat beschichtete Mikrohämatokritzentrifugenröhrchen (55x75 mm) (Servoprax GmbH, 46485 Wesel) verwendet. Die Ablesung erfolgte lupengestützt mit einer Präzision von weniger als plus/minus 0,5 Hämatokriteinheiten.

3.6.2.2 Transaminasenbestimmungen

Die Messung der Lebertransaminasen konnte nach Abnahme sofort durch „Trockenchemie“ erfolgen. Dazu stand das Gerät Reflotron 1 der Fa. Roche zur Verfügung. Die dazu passenden Analysestäbchen waren für die Leberenzyme Reflotron GOT, GPT, Gamma-GT sowie für Bilirubin das Reflotron-Stäbchen Bil. Die Messungen am Reflotron wurden bei einer Temperatur von 25 Celsius durchgeführt. Die gefundenen Messwerte stimmten mit den Ergebnissen der zertifizierten Laboratorien befriedigend überein.

3.6.2.3 Blutzuckermessungen

Blutzuckermessungen aus dem Vollblut wurden in dem Messgerät Ascensia Contour (Serie Nr. 36 28661) der Fa. Bayer Health Care GmbH, 51368 Leverkusen durchgeführt. Dabei wurden die Blutzuckermessstäbchen der Serie Bayer Contour Sensor verwendet.

3.6.2.4 Glukosetoleranztestung

Zur Ermittlung des Einflusses des Körpers auf Resorption und Abbau von Zucker wurde ein vollständiger OGTT über einen Zeitraum von drei Stunden ausgeführt. Das Testreagenz wurde von Roche AG (79639 Grenzach-Whylen) bezogen. Dabei enthält eine Flasche Dextro-O.G.T. in 300 ml Saft ein Gemisch von Mono- und Oligosacchariden

(Glukose Sirup Ph.Eur), das nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht. Weitere inaktive Inhaltsstoffe sind Johannisbeersaft, Kaliumsorbit, Konservierungsmittel und gereinigtes Wasser. Diese Lösung enthält zusätzlich 0,01-0,06 % Alkohol zur Haltbarmachung.

Nach der Messung des Nüchternzuckers aus der Fingerbeere wurde bei den Patienten 300 ml der OGTT-Lösung innerhalb von fünf Minuten getrunken und danach die Zeitnahme gestartet. In Intervallen von 30 Minuten wurde durch Entnahme einer Blutprobe aus der Fingerbeere der Blutzuckergehalt mit dem Ascensia Contour System bestimmt. Die Messwerte wurden in Abhängigkeit von der Zeit gegen die Blutglukosekonzentration aufgetragen. Insgesamt wurden 7 Proben bis zu 3 Stunden nach Testbeginn der OGT-Untersuchung getestet. Die OGT-Testung wurde vornehmlich bei jeder Änderung des Behandlungsmodus (z.B. UDC, Aderlasstherapie, keine Therapie) vorgenommen. In ausgesuchten Proben wurde während der OGT-Testung auch die Insulinausschüttung ins Blut quantifiziert.

3.6.2.5 Blutsenkungsgeschwindigkeit

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) wurde mit der Sarstedt Sedivette (Sarstedt, 51588 Nümbrecht) bestimmt. Zur Füllung waren 3,5 ml Blut notwendig. Im Blutentnahmesystem wurde zur Vermeidung von Eisenkontamination aus Kanülen ausschließlich Material der Firma Sarstedt verwendet. Dazu wurden Serum Gel Monovetten, EDTA Membran Monovetten und Citrat Monovetten benutzt. Die dazu gehörigen (grünen) Kanülen waren mit einem Multiadapter aus Plastikmaterial ausgestattet.

3.6.2.6 Urinalysen

Der Urin der Patienten wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit den Analysenstäbchen für Urin der Firma Roche (Roche Pharma AG, 79639 Grenzach Whylen) auf 9 Parameter (= Combur 9) untersucht. Diese waren Nitrit, Leukozyten, Protein, Glucose, Keton, Urobilinogen, Bilirubin, Blut und Hämoglobin. Mittels einer Farbskala konnte eine semiquantitative Abschätzung der Parameter mit den Intensitäts-Graden 1-3 vorgenommen werden.

3.6.2.7 Nachweis von okkultem Blut

Der Stuhl wurde auf Anwesenheit von okkultem Blut im Haemokultsystem (Fa. Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) getestet.

3.6.2.8 Normalbereiche der Laborparameter

Die verschiedenen Laboratorien weisen im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd gleiche Normalwerte für die relevanten Bestimmungen auf. Tabelle 2 fasst die Normbereiche der untersuchten Laborparameter von männlichen und weiblichen Personen zusammen.

Tabelle 2: Normalwertbereiche der gemessenen Laborparameter

| Dimension | männlich | weiblich | Einheit |
|--|-----------------|-----------------|-------------------|
| Hämoglobin (Hb) | 14-18 | 12-16 | g/dl |
| Hämatokrit (Hkt) | 41-53 | 36-46 | % |
| Serumeisen (SeFe) | 59-158 | 37-145 | µg/dl |
| Transferrin (Tf) | 200-360 | 200-360 | mg/dl |
| Transferrinsättigung mit Eisen | 30-35 | 30-35 | % |
| Serumferritin | 30-400 | 15-150 | ng/ml |
| Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) | 10-50 | 10-35 | U/l |
| Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) | 10-50 | 10-35 | U/l |
| Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) | 0-50 | 0-35 | U/l |
| Alkalische Phosphatase (AP) | 40-129 | 35-104 | U/l |
| Bilirubin (Bili) | 0,3-1,2 | 0,3-1,2 | mg/dl |
| Cholesterin (Chol) | <200 | <200 | mg/dl |
| HDL | >35 | >35 | mg/dl |
| LDL | <150 | <150 | mg/dl |
| Triglyceride (Tg) | <200 | <200 | mg/dl |
| Body-Mass-Index (BMI) | 20-25 | 20-25 | kg/m ² |
| Glycosyliertes Hämoglobin (HbA1c) | 4,1-6,2 | 4,1-6,2 | % |
| Blutglucosekonzentration (BZ) | 70-115 | 70-115 | mg/dl |
| Insulin im Serum (basaler Nüchternwert!) | 2,5-25 | 2,5-25 | µU/ml |
| Homa IR | <2 | <2 | µU/ml/mmol/l |

In dem Labor Saar wurden routinemäßig und gegebenenfalls vergleichend zu den Sofortanalysen in der Praxis folgende Parameter bestimmt:

- Großes Blutbild mit Differenzierung
- Bilirubin
- Cholinesterase
- Hämoglobin
- glykosyliertes Hämoglobin (HbA1c)

- Eisen im Serum
- GOT, GPT, GGT
- LDH
- Gesamt-Cholesterin einschließlich einer Differenzierung in LDL und HDL

Im Labor von Prof. Dr. Seelig und Kollegen (76038 Karlsruhe) wurden die Bestimmungen von Insulin und Serumferritin sowie die Untersuchungen der Hepatitis A, B und C-Viruserologie durchgeführt.

Im Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg (Direktor: Prof. Dr. Geisel) wurde die flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie zur Bestimmung von Eisen und Kupfer in biotisch gewonnenen Leberstanzen eingesetzt.

3.6.2.9 Phlebotomie

Aderlässe von jeweils ca. 200 ml (200 ml + 5 ml, SDM) wurden nach Venenpunktion mit einem Wingflo Infusionsset 20 G x 3/4 (0,9 x 20 mm) unter Verwendung von BD Plastikpak Luer 50/60 ml sterilen Einmalspritzen (Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg) ausgeführt. Die zum Stau benutzte Blutdruckmanschette wurde dabei konstant auf 40 mm Hg gehalten.

Teile des Blutes wurden sofort mit Citrat oder Heparin ungerinnbar gemacht und in einer Laborzentrifuge (Hettich EBA 3 S, Type 2006) während 10 Minuten bei 6000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei wurde ein Festwinkel-Rotor (3-8 cm) der Firma Hettich (78532 Tuttlingen) benutzt. Das Plasma wurde danach abgehebert und den verschiedenen Analysen zugeführt.

3.6.3 Zytologische Untersuchungen

Als Mikroskop wurde das Phasenkontrastmikroskop JP 20 der Fa. Carl Zeiss (73447 Oberkochen) eingesetzt. Dieses war mit zwei Okularen 10/0.22 und KF 10x in binokularer Bauweise ausgerüstet.

Zur mikroskopischen Zählung der Leukozyten wurden vorbereitend Blutmischpipetten für Leukozyten und die Lösung Leuco-plus pur der Fa. Servoprax (46485 Wesel) benutzt. Die Blutmischpipetten wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten in einem Vibrator (Firma Assistent, Karl Hecht KG, 94647 Sondheim) zur Homogenität durchmischt, und das resultierende Hämolsat wurde in eine Zählkammer nach Neubauer transferiert. Die

Zählkammer bestand aus optischen Spezialglas und geeichten Deckgläsern ohne Federklemmen (Fa. Brand, 61440 Oberursel). Die Tiefe war 0,100 mm und die Fläche 0,0025 mm. Mindestens 9 Quadratfelder wurden auf Anwesenheit von Leukozyten ausgezählt.

3.6.4 Allgemeine Patientendaten

Als Personenwaage wurde eine mechanische Säulenwaage mit Gewichten (Modell Seca 220, 22089 Hamburg der maximalen Tragkraft von 150 kg benutzt. Eine Ablesung erfolgte in einer Präzision bzw. Teilung von 100 g. Darüber hinaus war diese Waage zur Größenmessung mit einem Teleskop-Messstab ausgestattet. Eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Größenmessung konnte durch Verwendung einer Wasserwaage und einem von der Messlatte um 90 Grad auslenkenden Latte von 20 cm erreicht werden. Die ohne Schuhe und mit leichter Bekleidung gemessenen Werte der Patienten dienten zur Berechnung des Body-Mass-Index (BMI = Körpergewicht in kg /Quadrat der Körpergröße in Meter).

3.6.5 Sonographische Methoden

Sonographische Untersuchungen wurden in der Klinik für Innere Medizin II Universitätsklinikum des Saarlandes und in der hausärztlichen Praxis durchgeführt. Hierfür wurden als Geräte Hitachi EUB-8500 bzw. Siemens Sonoline LX mit 3,5 MHz-Schallköpfen verwendet. Bilder und Daten wurden mit einem Mitsubishi Video Copy Processor dokumentiert.

3.6.6 Statistische Verfahren

Von den Resultaten wurden Mittelwerte gebildet und diese nach statistischer Auswertung als Mittelwerte \pm SDM ausgedruckt. Die Gültigkeit einer Gauss'schen Normalverteilung wurde für die verschiedenen Messparameter überprüft und als gegeben befunden (42, 146).

Der nicht gepaarte Student t Test wurde für den Vergleich von Gruppendaten angewandt. Der gepaarte t-Test kam bei Erfüllung entsprechender Prämissen zum Einsatz. Zudem wurden nicht-parametrische Tests eingesetzt. Ausgewertet wurde nach Mann-Whitney U und mit Wilcoxon Signed-Ranks. Insgesamt wurden 37.449 Datenpunkte zulässiger Parameterkombinationen geprüft. Die Parameter waren Hämatokrit, Serumeisen, Transferrin,

Ferritin, GOT, GPT, GGT, AP, Bilirubin, Triglyceride, BMI, HbA1c und Glukose. Diese wurden zusätzlich nach Gruppenvariablen des Alters und Geschlechts weiter analysiert.

Der Grad der Signifikanz bei Vergleich von Datenpaaren wurde üblicherweise wie folgt definiert:

| | |
|----------------|-------------------------|
| $p > 0,05$ | nicht signifikant (ns.) |
| $p \leq 0,05$ | signifikant |
| $p \leq 0,01$ | sehr signifikant |
| $p \leq 0,001$ | hochsignifikant |

4. Ergebnisse

Aus dem großen Patientenaufkommen der Kliniken für Innere Medizin des Universitätsklinikums des Saarlandes wurden in einem Zeitraum von ca. 10 Jahren Patienten mit Stoffwechselstörungen verschiedenster Art in Studien aufgenommen. Diese Dissertation beschränkt sich auf Patienten, bei denen Störungen im Fettstoffwechsel und verschiedene Lebererkrankungen festgestellt wurden. Besonderes Gewicht wurde auf das Vorliegen eines NASH-Syndroms (syn. einfach: NASH) oder verwandter Störungen gelegt. Dabei wurde vor allem auf eine möglichst sichere Diagnosestellung Wert gelegt. Patienten mit malignen Erkrankungen (z. B. Lebermetastasen) oder komplizierenden Komorbiditäten wurden nicht aufgenommen. Gelegentlich kamen neben den Laboruntersuchungen des Blutes auch histologische Techniken und in speziellen Fällen auch die Bestimmung von Genmarkern zur Absicherung der Diagnosen zum Einsatz. Informationen über die ethnische Zugehörigkeit bzw. einen Migrationshintergrund wurden nicht erhoben. Auch nähere Auskünfte über Essgewohnheiten oder verlässliche Angaben über Alkoholkonsum wurden von den Patienten nicht erfragt. Nach Berücksichtigung aller vorgenannten Einschränkungen konnten dennoch ca. 200 Patienten rekrutiert und einer klinischen und laborchemischen Auswertung zugeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Auswertungen weisen auf neue Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit NASH an. Diese mussten in zusätzlichen, experimentellen Studien an ausgewählten Patienten auf ihre klinische Relevanz hin überprüft werden. Dabei war es ein glücklicher Umstand, dass umfangreiche Behandlungsdaten von Patienten ab dem Jahre 2004 retrospektiv analysiert und mit Behandlungsansätzen bis zum Jahre 2001 hin verglichen

werden konnten. Kontrolluntersuchungen an weiteren Patienten dienen zur Absicherung der Erkenntnisse für eine rationale Behandlung von Patienten mit NASH.

4.1 Analyse des Patientenguts mit Fettleber und Fettleberhepatitis

Die Ergebnisse für die untersuchten Parameter des Eisen- und Glukosemetabolismus in drei Patientengruppen ohne jedwede Präselektion sind in Tabelle 3a zusammengefasst. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Patienten mit gesicherter NASH. In der zweiten Gruppe sind Resultate von Patienten mit gesicherter Fettlebererkrankung (NAFLD) wiedergegeben. Beide Gruppen wurden zusätzlich auch zusammen (NASH + NAFLD) analysiert. Die dritte Gruppe umfasst die Resultate bei nicht gesicherten Verdachtsdiagnosen.

Bei der kumulativen Auswertung der Daten aller Patienten mit NASH zeigen sich unabhängig von Alter und Geschlecht bei den Werten von GPT und GGT sowie beim BMI bereits deutliche Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den in Tabelle 2 zusammengestellten Normalwerten. Die Parameter des Eisen- und Glukosestoffwechsels fallen dagegen durchaus in den Bereich gesunder Vergleichspersonen. Dies gilt insbesondere auch für die Serumferritinwerte. Bei NAFLD wird eine der NASH vergleichbare Tendenz beobachtet.

4.2 Geschlechtsbezogene Auswertung

Trennt man die Laborergebnisse nach Geschlecht der Patienten, so werden weitere Abweichungen von der Norm und Unterschiede zwischen NASH und NAFLD erkennbar (Abb. 1 und Tab. 4). So liegen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) jetzt auch bei einem weiteren Leberenzym (GOT), bei den Serumferritinwerten und dem Blutzucker vor.

Die größten Unterschiede ($p \leq 0,01$) zeigen sich insbesondere bei der GGT und den Ferritinwerten. Bei Frauen ist der mittlere Ferritinwert bei NASH mehr als doppelt so hoch wie bei der NAFLD. Bei Männern wird bezüglich des Ferritinwerts zwischen NASH und NAFLD kein Unterschied erkennbar. Der BMI unterscheidet sich bei Patienten mit NASH und NAFLD nicht. Dieser ist mit ca. 30 kg/qm deutlich höher als der Normalwert gesunder Vergleichspersonen.

Tabelle 3

Zusammenfassung von Daten ausgewählter Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes über einen Studienzeitraum von ca. 10 Jahren

- 3a) Daten von Patienten mit gesicherter NASH bzw. NAFLD in kumulativer Darstellung (NASH + NAFLD) bzw. nach Auftrennung in NASH oder NAFLD (Alter und Geschlecht blieben bei dieser Auswertung unberücksichtigt).
 3b) Auswertung analog 3a) jedoch mit einer Patientengruppe mit Verdachtsdiagnosen (V.a. NASH bzw. V.a. NAFLD). Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht gefunden werden. Die Fallzahl war mit n = 3 - 15 auch deutlich niedriger als bei dem Patientengut in Tab. 3a.

3a)

| ♂+♀ | Hb [g/dl] | Hkt [%] | Serumeisen [µg/dl] | Tf [mg/dl] | Ferritin [ng/ml] | GOT [U/l] | GPT [U/l] | γ-GT [U/l] | Tg [mg/dl] | Glucose [mg/dl] | HbA1c [%] | BMI [kg/m ²] |
|--------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| NASH + NAFLD | 14,8 ± 1,3 (n=129) | 43,4 ± 3,7 (n=129) | 106 ± 37 (n=121) | 262 ± 50 (n=110) | 315 ± 199 (n=105) | 49 ± 25 (n=134) | 72 ± 38 (n=131) | 150 ± 115 (n=109) | 176 ± 87 (n=108) | 109 ± 42 (n=107) | 5,7 ± 0,9 (n=72) | 29 ± 4,2 (n=73) |
| NASH | 14,7 ± 1,2 (n=47) | 43,2 ± 4,3 (n=47) | 103 ± 39 (n=42) | 252 ± 46 (n=39) | 360 ± 190 (n=38) | 57 ± 31 (n=47) | 88 ± 44 (n=46) | 209 ± 162 (n=35) | 186 ± 107 (n=40) | 116 ± 55 (n=44) | 6,0 ± 1,2 (n=29) | 31 ± 5 (n=23) |
| NAFLD | 14,9 ± 1,4 (n=82) | 43,4 ± 3,9 (n=82) | 106 ± 36 (n=79) | 267 ± 52 (n=71) | 289 ± 200 (n=67) | 45 ± 19 (n=87) | 63 ± 31 (n=85) | 122 ± 71 (n=74) | 171 ± 92 (n=68) | 105 ± 30 (n=63) | 5,6 ± 0,7 (n=43) | 28,2 ± 3,5 (n=50) |

3b)

| ♂+♀ | Hb [g/dl] | Hkt [%] | Serumeisen [µg/dl] | Tf [mg/dl] | Ferritin [ng/ml] | GOT [U/l] | GPT [U/l] | γ-GT [U/l] | Tg [mg/dl] | BMI [kg/m ²] |
|------------|-----------|----------|--------------------|------------|------------------|-----------|-----------|------------|------------|--------------------------|
| V.a. NASH | 14,8±1,5 | 44,8±4,4 | 97±27 | 269±37 | 332±232 | 43±17 | 63±40 | 142±95 | 172±89 | 29±4,9 |
| V.a. NAFLD | 14,6±2,7 | 43,9±2,8 | 100±37 | 262±44 | 224±112 | 41±14 | 70±44 | 142±118 | 145±78 | 29,4±4,3 |

4.3 Alters- und geschlechtsbezogene Auswertung

Noch deutlichere Unterschiede werden erkennbar, wenn neben der Trennung nach Geschlecht nun auch noch eine Trennung der Patienten in Altersgruppen vorgenommen wird (Abb. 2 und Tab. 5). Patienten, die jünger und älter als 50 Jahre sind, werden miteinander verglichen. Zusätzlich enthält diese Tabelle auch Daten von Patienten, bei denen eine eindeutige Zuordnung zu der Gruppe NASH oder NAFLD nicht möglich war. Diese Gruppen sind mit der Einschränkung „Verdacht auf ...“ kenntlich gemacht (Tab. 6).

Bei NASH steigen die Werte der GGT im Alter besonders stark an. Dies gilt für beide Geschlechter. Ein signifikanter Anstieg mit fortschreitendem Alter ergibt sich auch für die Blutglukosewerte und für die HbA1c-Werte. Die Triglyceridkonzentrationen sind bei der älteren Gruppe ebenfalls signifikant gegenüber jüngeren Patienten erhöht.

Während bei Männern mit NASH die erhöhten Ferritinwerte bei der Gruppe über 50 Jahre eher eine Tendenz in Richtung niedriger Werte haben, wird bei Frauen ein Anstieg des Ferritins um mehr als das Doppelte beobachtet. In dieser Frauen-Gruppe findet man bei den über 50-jährigen dazu noch eine signifikante Zunahme des BMI von 26,5 kg/qm auf 29,1 kg/qm. Bei den Männern ist eine derartige Zunahme nicht zu erkennen.

Die Gruppe der Patienten mit gesicherter NAFLD zeigt im Vergleich mit der NASH-Gruppe hochsignifikante Unterschiede. Hier wird weder ein altersabhängiger Anstieg der GGT-Werte noch ein Anstieg der Blutzucker- und der HbA1c-Werte beobachtet. Während bei Frauen im Alter über 50 Jahre der Ferritinwert ebenfalls stark zunimmt, ist dies bei Männern nur als eine Tendenz zu erkennen. Beim BMI ist bei Frauen mit NAFLD ein ähnlicher altersabhängiger Anstieg wie bei der NASH-Gruppe vorhanden. Die BMI-Werte sind bei NAFLD deutlich niedriger als in der männlichen NASH-Vergleichsgruppe (27,4 kg/qm vs. 31,9 kg/qm, $p < 0,01$).

Tabelle 4

Nach Geschlecht geordnete Ergebnisse der Patienten mit gesicherter NASH und NAFLD bzw. gesicherten Daten nach Auftrennung in NASH bzw. NAFLD. Die gemessenen Labor-Parameter und die Dimensionen entsprechen denen von Tabelle 2.

4a) männliche Patienten

| ♂ | Hb | Hkt | Serum-eisen | Tf | Ferritin | GOT | GPT | γ-GT | Tg | Gluc. | HbA1c | BMI |
|--------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| NASH + NAFLD | 15,3 ± 2,0 (n=79) | 44,3 ± 3,5 (n=79) | 109 ± 30 (n=72) | 261 ± 47 (n=67) | 375 ± 196 (n=65) | 48 ± 24 (n=81) | 77 ± 35 (n=80) | 147 ± 99 (n=68) | 188 ± 104 (n=64) | 111 ± 39 (n=74) | 5,8 ± 0,9 (n=54) | 30 ± 6 (n=51) |
| NASH | 14,5 ± 2,8 (n=28) | 44 ± 3,6 (n=28) | 107 ± 27 (n=24) | 252 ± 39 (n=23) | 395 ± 195 (n=23) | 55 ± 29 (n=29) | 89 ± 39 (n=28) | 185 ± 133 (n=22) | 216 ± 124 (n=23) | 117 ± 48 (n=26) | 6,1 ± 1,1 (n=19) | 34 ± 8,9 (n=16) |
| NAFLD | 15,5 ± 1,3 (n=51) | 44,5 ± 3,5 (n=51) | 110 ± 32 (n=48) | 265 ± 50 (n=44) | 364 ± 197 (n=42) | 45 ± 19 (n=52) | 71,4 ± 32 (n=52) | 128 ± 72 (n=46) | 172 ± 88 (n=41) | 108 ± 34 (n=48) | 5,6 ± 0,8 (n=35) | 28 ± 3,0 (n=35) |

4b) weibliche Patienten

| ♀ | Hb | Hkt | Serum-eisen | Tf | Ferritin | GOT | GPT | γ-GT | Tg | Glucose | HbA1c | BMI |
|--------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| NASH + NAFLD | 14,0 (n=50) | 42 (n=50) | 101 (n=49) | 264 (n=43) | 210 (n=40) | 50 (n=53) | 63,5 (n=51) | 154 (n=41) | 160 (n=44) | 110 (n=33) | 5,7 (n=18) | 28,8 (n=22) |
| NASH | 14,2 (n=19) | 42 (n=19) | 99 (n=18) | 253 (n=16) | 306 (n=15) | 61 (n=18) | 88 (n=18) | 252 (n=13) | 145 (n=17) | 121 (n=18) | 5,8 (n=10) | 28,2 (n=7) |
| NAFLD | 13,9 (n=31) | 41,7 (n=31) | 101 (n=31) | 271 (n=27) | 151 (n=25) | 45 (n=35) | 50 (n=33) | 108 (n=28) | 170 (n=27) | 96 (n=15) | 5,8 (n=8) | 29 (n=15) |

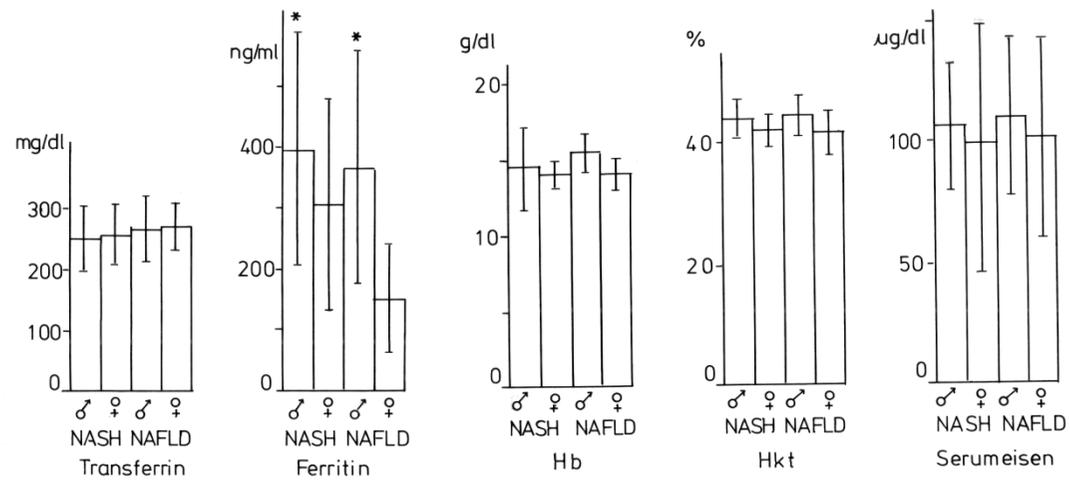


Abb. 1. Ausgewählte Laborparameter von Tabelle 4 in graphischer Darstellung (Mittelwerte \pm SDM).

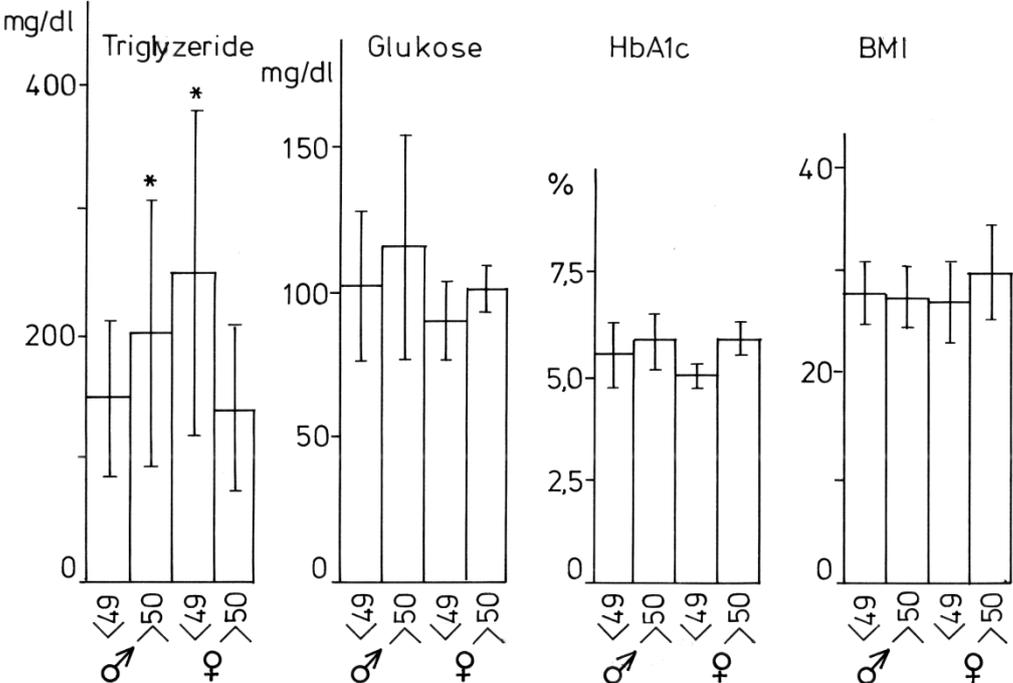
Tabelle 5

Daten von Patienten mit gesichertem NASH oder NAFLD, geordnet nach Geschlecht und Altersgruppen.. Die gemessenen Labor-Parameter und die Dimensionen entsprechen denen von Tabelle 2.

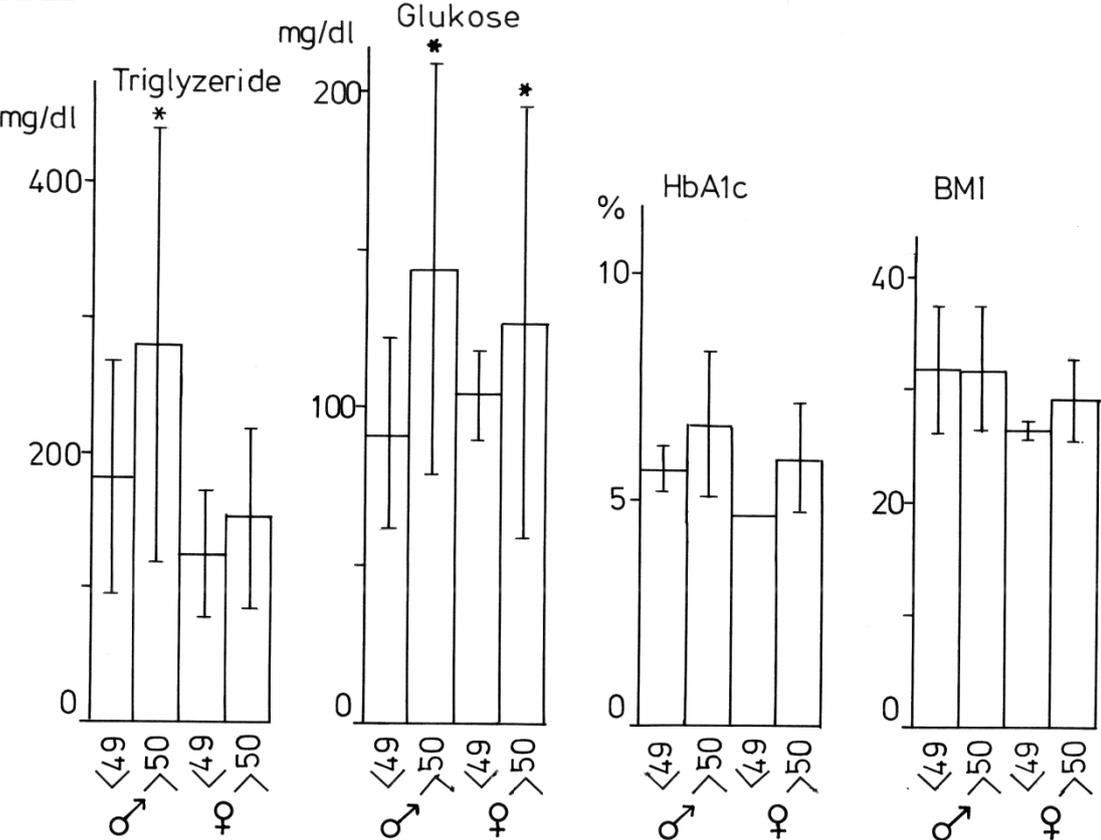
| | Hb m ± | Hkt m ± | Serumeisen m ± | Tf m ± | Ferritin m ± | GOT m ± | GPT m ± | γ-GT m ± | AP m ± | Bili m ± | Chol m ± | Tg m ± | BMI m ± | HbA1c m ± | Glucose m ± |
|--------------|------------------|-------------------|--------------------------|------------------|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| NASH | | | | | | | | | | | | | | | |
| ♂ < 50 | 15,3±0,7 | 44,7±2 | 101 ±26 | 250±32 | 438±225 | 56±35 | 101±44 | 134±89 | 95±53 | 0,8±0,5 | 218±54 | 182±88 | 31,8±5,5 | 5,7±0,5 | 91±32 |
| ♂ ≥ 50 | 14,7±1,8 | 43,0±5 | 113±29 | 256±50 | 329±119 | 52±16 | 70±18 | 258±158 | 86±30 | 0,8±0,3 | 213±35 | 279±161 | 31,9±5,7 | 6,7±1,6 | 144±66 |
| ♀ < 50 | 14,6±0,6 | 42,2±2 | 90±34 | 288±44 | 169±188 | 60±55 | 96±55 | 176±99 | 102±46 | 0,7±0,3 | 201±14 | 124±46 | 26,5±0,7 | 4,6 | 106±14 |
| ♀ ≥ 50 | 14,0±1,0- | 42,1±3 | 102±56 | 241±57 | 357±148 | 62±28 | 85±42 | 289±231 | 129±60 | 0,6±0,2 | 219±72 | 152±65 | 29,1±3,5 | 5,9±1,2 | 127±68 |
| NAFLD | | | | | | | | | | | | | | | |
| ♂ < 50 | 15,6±0,9 | 45,9±3 | 112±33 | 272±48 | 314±172 | 46±19 | 77±34 | 131±74 | 75±22 | 0,9±0,4 | 200±45 | 152±65 | 28±3,1 | 5,5±0,8 | 102±27 |
| ♂ ≥ 50 | 15,4±1,8 | 44,0±5 | 107±32 | 254±54 | 463±219 | 43±21 | 62±24 | 126±81 | 72±30 | 0,8±0,3 | 211±70 | 203±110 | 27,4±3,0 | 5,8±0,7 | 116±41 |
| ♀ < 50 | 13,2±1,5 | 39,0±5 | 108±67 | 278±74 | 59±28 | 35±16 | 34±14 | 107±75 | 91±37 | 0,4±0,2 | 203±40 | 251±134 | 27±4,0 | 5,0±0,3 | 90±14 |
| ♀ ≥ 50 | 14,4±0,8 | 43,0±2,4 | 98±21 | 267±42 | 195±77 | 49±20 | 57±28 | 109±56 | 104±36 | 0,9±0,4 | 225±55 | 141±66 | 30±4,6 | 5,8±0,4 | 100±8 |

Abb. 2. Ausgewählte Laborparameter von Tabelle 5 in graphischer Darstellung. Die mit (*) gekennzeichneten Säulen sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Altersgruppen sind angegeben.

2a) NASH



2b) NAFLD



4.4 Präliminäre Daten bei Patienten mit nicht gesicherten Fettstoffwechselerkrankungen

Tabelle 6 enthält Daten von Patienten, deren exakte Zuordnung zu NASH oder NAFLD nicht möglich war. Da die Zahl der Patienten in dieser Gruppe relativ gering ist, können keine eindeutigen Aussagen abgeleitet werden. Dennoch sind Tendenzen zu erkennen, die bei Erhöhung der Patientenzahlen möglicherweise Signifikanz erreichen werden. Auffallend ist im älteren Frauenkollektiv mit Verdacht auf NASH gegenüber der jüngeren Gruppe ein deutlicher Anstieg der Ferritinwerte. Bei Männern wird ein derartiger Anstieg nicht beobachtet. Die BMI-Werte bei den Verdachtsdiagnosen auf NASH oder NAFLD sind insgesamt deutlich niedriger als in der Gruppe mit der gesicherten Diagnose einer NASH, insbesondere bei Männern. Der durchschnittliche BMI liegt um 29 kg/qm (Tab. 2).

4.5 Vergleich der Behandlung eines NASH-Patienten mit UDC und Aderlässen

4.5.1 Vorperiode

Vor der Behandlung mit UDC wurden bei dem Patienten vom 21.06.2001 an wiederholt über einen Zeitraum von 2 Jahren ohne Medikation Laboranalysen durchgeführt. Diese beinhalteten die Messungen der GPT, des Hämatokritwertes, von Serumferritin und Serumeisen (Abb. 3a). Die Werte der GPT sind während dieses Zeitraums im Mittel fast sechsfach über der Norm erhöht. Es fällt eine gewisse Periodizität mit Anstieg und Abfall der GPT innerhalb von 3-4 Monaten auf. Dabei wird die GPT bis zum Sechsfachen der Norm überschritten. Auch bei den Werten für Serumferritin liegt eine den GPT-Werten paralleler Verlauf vor. Die Werte für das Serumeisen und den Hämatokritwert steigen dagegen überwiegend stetig an.

Tabelle 6

Daten von Patienten mit klinischem V.a. NASH oder NAFLD, stratifiziert nach Alter und Geschlecht (Mittelwerte \pm SDM). Die gemessenen Labor-Parameter und die Dimensionen entsprechen denen von Tabelle 2.

| | Hb m \pm | Hkt m \pm | Serumeisen m \pm | Tf m \pm | Ferritin m \pm | GOT m \pm | GPT m \pm | γ-GT m \pm | AP m \pm | Bili m \pm | Chol m \pm | Tg m \pm | BMI m \pm |
|-------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| V.a. NASH | | | | | | | | | | | | | |
| ♂ < 50 | 16,3 \pm 1,3 | 47,0 \pm 4 | 107 \pm 29 | 258 \pm 21 | 459 \pm 124 | 49 \pm 33 | 96 \pm 69 | 188 \pm 80 | 58 \pm 12 | 0,8 \pm 0,2 | 211 \pm 42 | 138 \pm 56 | 28 \pm 5,0 |
| ♂ \geq 50 | 15,2 \pm 1,2 | 47,0 \pm 4 | 92 \pm 33 | 277 \pm 41 | 384 \pm 159 | 41 \pm 8 | 55 \pm 22 | 192 \pm 78 | 74 \pm 37 | 0,9 \pm 0,5 | 234 \pm 58 | 240 \pm 99 | 30 \pm 6,6 |
| ♀ < 50 | 13,7 \pm 1,3 | 41,0 \pm 4 | 76 \pm 20 | 300 \pm 20 | 36 \pm 13 | 37 \pm 13 | 62 \pm 25 | 42 \pm 22 | 166 \pm 116 | 0,4 \pm 0,2 | 253 \pm 51 | 151 \pm 151 | 27 \pm 2,6 |
| ♀ \geq 50 | 13,9 \pm 1,0 | 42,0 \pm 2 | 110 \pm 13 | 245 \pm 33 | 349 \pm 337 | 42 \pm 12 | 41 \pm 18 | 95 \pm 102 | 77 \pm 24 | 0,9 \pm 0,3 | 181 \pm 36 | 120 \pm 25 | 30 \pm 3,4 |
| V.a. NAFLD | | | | | | | | | | | | | |
| ♂ < 50 | 15,8 \pm 0,6 | 46,0 \pm 2 | 86 \pm 28 | 263 \pm 33 | 287 \pm 99 | 45 \pm 17 | 73 \pm 30 | 99 \pm 43 | 76 \pm 22 | 0,3 \pm 0,3 | 234 \pm 49 | 107 \pm 47 | 28 \pm 2,6 |
| ♂ \geq 50 | 15,3 \pm 1,2 | 47,0 \pm 2 | 101 \pm 34 | 242 \pm 22 | 239 \pm 99 | 40 \pm 18 | 72 \pm 43 | 369 \pm 246 | 115 \pm 70 | 0,7 \pm 0,1 | 212 \pm 41 | 117 \pm 29 | 30 \pm 2,2 |
| ♀ < 50 | 14,2 \pm 1,0 | 41,2 \pm 2 | 118 \pm 49 | 311 \pm 73 | 156 \pm 115 | 39 \pm 9 | 111 \pm 88 | 124 \pm 50 | 86 \pm 30 | 0,6 \pm 0,2 | 204 \pm 20 | 231 \pm 123 | 31 \pm 6,7 |
| ♀ \geq 50 | 13,0 \pm 4,1 | 43,0 \pm 2 | 103 \pm 39 | 247 \pm 26 | 184 \pm 114 | 38 \pm 12 | 49 \pm 21 | 123 \pm 59 | 97 \pm 24 | 0,6 \pm 0,2 | 222 \pm 60 | 148 \pm 60 | 30 \pm 5,5 |

4.5.2 Anwendung von UDC

Bei Beginn der Behandlung mit UDC am 15.07.2003 haben die GPT, das Serumferritin, das Serumeisen und besonders auch der Hämatokritwert des Patienten nahezu patientenspezifische Maximalwerte erreicht. In den ersten Wochen nach Verabreichung von 2 g UDC/die kommt es bereits zu einem steilen Abfall der GPT, des Serumeisens und des Serumferritins. Der Hämatokritwert wird durch UDC wenig beeinflusst. Im weiteren Verlauf der Behandlung sinkt der Serumferritinwert stetig ab und erreicht vor Absetzen der UDC-Medikation Normalwerte. Auch die GPT fällt zunächst ab, wobei wiederum eine Periodizität auffällt. Die Werte von Serumeisen und Hämatokrit werden bei der Langzeittherapie mit UDC im weiteren Verlauf nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 3b).

Nach Ende der UDC-Behandlung am 07.03.2005 steigen die Werte für Ferritin, Hämatokrit und Serumeisen wieder sehr steil an und übertreffen deutlich die Werte vor Behandlungsbeginn. Ein Anstieg wird auch für die GPT beobachtet. Dabei zeigt sich wieder eine gewisse Periodizität.

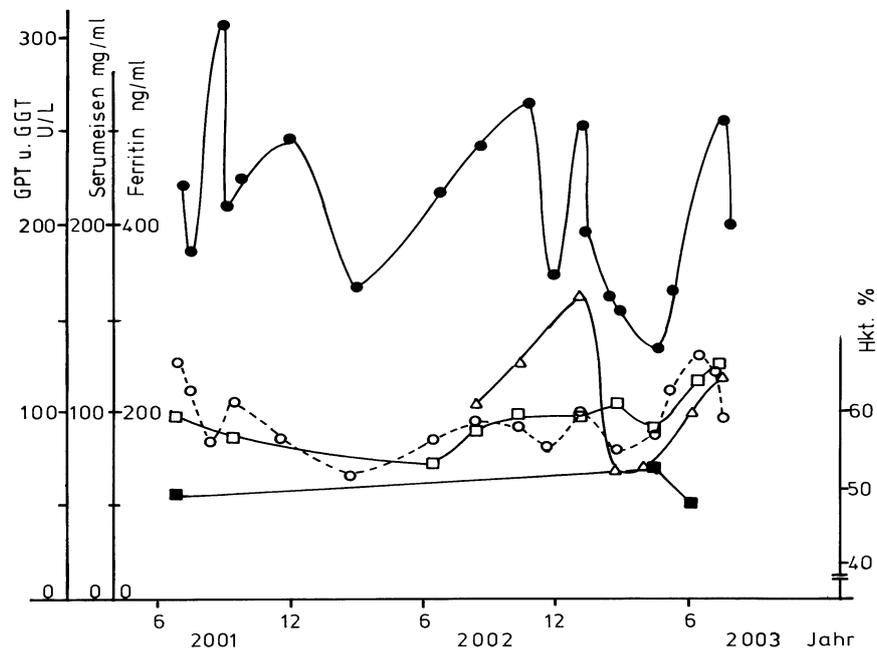


Abb. 3a. Zeitlicher Verlauf der Werte von GPT (●) und GGT (○), Serumeisen (□) sowie Serumferritin (Δ) und Hämatokrit (■) bei einem Patienten mit gesichertem NASH-Syndrom ohne Therapie (= Vorperiode).

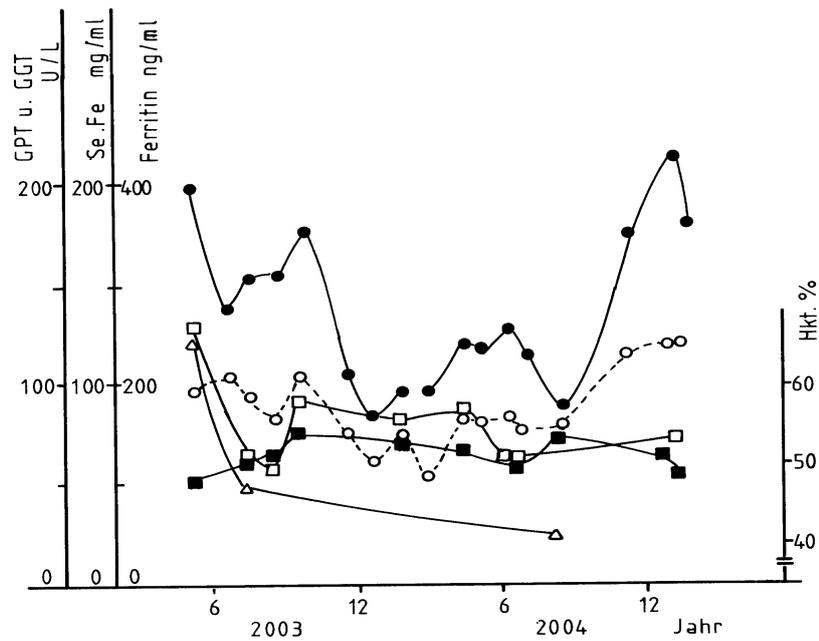


Abb. 3b. Zeitlicher Verlauf der Werte von GPT (●) und GGT (○), Serumeisen (□) und Serumferritin (△) und Hämatokrit (■) bei täglicher oraler Gabe von Ursodesoxycholsäure (UDC) in einer Dosierung von 2 g pro Tag bei einem Patienten mit gesichertem NASH-Syndrom.

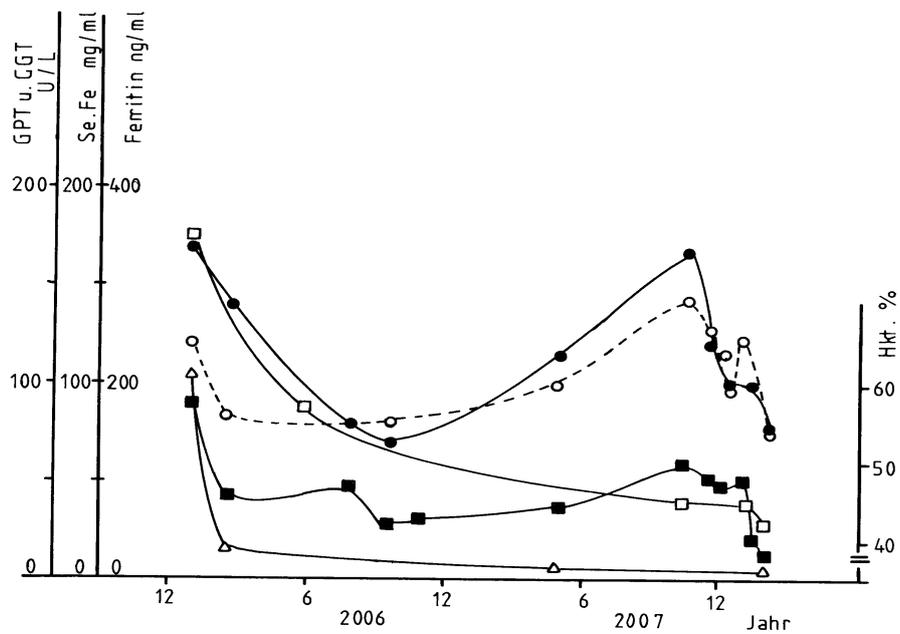


Abb. 3c. Effekte einer repetitiven Aderlasstherapie auf die Werte von GPT (●) und GGT (○), Serumeisen (□), Serumferritin (△) und Hämatokrit (■) bei einem Patienten mit gesichertem NASH-Syndrom.

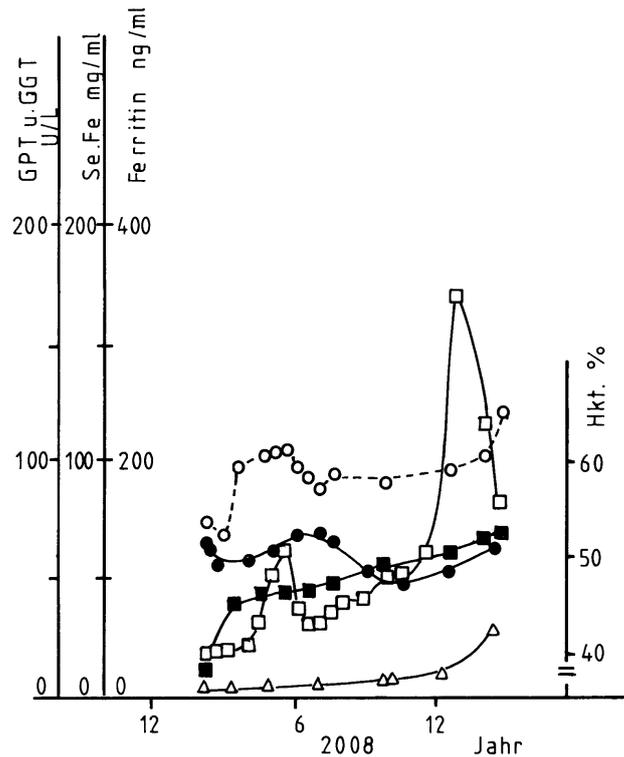


Abb. 3d. Zeitlicher Verlauf der Werte von GPT (●), GGT (○), Serumeisen (□), Serumferritin (Δ) und Hämatokrit (■) nach Terminierung der Aderlassperiode (= Nachbeobachtung).

4.5.3 Aderlasstherapie

Wegen der einige Wochen nach Absetzen des UDC beobachteten pathologisch erhöhten Werte für Hämatokrit, GPT, Serumferritin und Serumeisen wurde mit einer Aderlasstherapie begonnen. Diese wurde durch regelmäßige Entnahme von 190 - 200 ml Blut pro Woche ausgeführt.

Bereits nach dem zweiten Aderlass ist ein steiler Abfall aller Parameter (GPT, Hkt, Serumferritin und Serumeisen) zu beobachten. Für das Ferritin werden während des gesamten Zeitraums der Aderlasstherapie nunmehr Normalwerte gefunden. Für die GPT-Werte und die Hämatokritwerte ergeben sich periodische Schwankungen mit zeitweiser Erhöhung beider Werte. Durch Forcierung der Aderlasstherapie kurz vor Behandlungsende wurden am 01.02.2008 Tiefstwerte für alle beobachteten Parameter gemessen. Diese Erniedrigung ist in der Nachperiode ohne Therapie für die GPT-Werte und das Serumferritin für länger als ein Jahr anhaltend, während der Hämatokrit und zunächst auch das Serumeisen kontinuierlich ansteigen. Für das Serumeisen wird ein Maximum nach etwa 12 Monaten beobachtet. Danach erfolgt dann wieder ein Abfall. Die Werte für die GPT, Serumferritin und Serumeisen fallen Anfang 2008 wieder in einen nahezu normalen Bereich ab (Abb. 3c). Nach Terminierung der

Aderlässe (Februar 2008) steigen die Hämatokritwerte kontinuierlich an und erreichen im weiteren Verlauf wieder Werte von über 50%. Das Serumeisen steigt über einen Zeitraum von fast einem Jahr ebenfalls an, erreicht dann ein Maximum und fällt schließlich auf Werte im Normalbereich ab (Abb. 3d).

4.6 OGT-Teste und Insulinbestimmungen

Die Ergebnisse der Blutzuckerbestimmungen und der Messung von Insulinwerten während des OGT- Tests sind in Abbildung 4 dargestellt. Beim ersten Test in der Vorperiode ohne UDC-Medikation (Abb. 4a) war der HbA1c-Wert 4,9% und der BMI 29,3 kg/qm.

Die Glukosetoleranzkurve hat einen für Normalpersonen typischen Verlauf. Nach 60 Minuten wird ein Höchstwert der Blutglukose von 159 mg/100 ml gemessen. Danach erfolgt ein kontinuierlicher Abfall der Glukosekonzentration. Drei Stunden nach Beginn des Tests beträgt die Glukosekonzentration 94 mg/100 ml. Die Insulinwerte steigen während des Test von einem Basalwert von 17,6 μ U/ml auf 157 μ U/ml an und fallen danach kontinuierlich ab. Nach 180 und 240 Minuten betragen die Insulinkonzentrationen 85,7 bzw. 71,2 μ U/ml. In den Urinproben vor Testbeginn und unmittelbar nach Erreichen des Maximums der Blutzuckerkurve war der Test auf Glukose negativ.

Während der Aderlasstherapie waren die pathologischen Daten von GPT, Serumferritin, Serumeisen und Hämatokritwert zunächst stark rückläufig. Wurden die Intervalle zwischen den einzelnen Aderlässen aber ausgedehnt, so wurde bei Verbleiben der Serumferritinwerte im unteren Normbereich ein erneuter Anstieg der GPT und des Hämatokritwertes beobachtet.

Vor Forcierung der Aderlasstherapie wurde wieder ein OGTT ausgeführt (Abb. 4b). Der Wert des HbA1c betrug zu diesem Zeitpunkt 5,8 %. Der BMI war mit 29,5 kg/qm gegenüber dem ersten OGTT unverändert. Während der Nüchternzucker mit 93 mg/100 ml noch im Normbereich ist, steigt die Blutzuckerkurve nach 60 Minuten auf einen Maximalwert von 195 mg/ 100 ml an. Zu diesem Zeitpunkt tritt mit einem Wert von mehr als 1,0 g/100 ml eine deutliche Glukosurie auf. Im weiteren Verlauf fallen die Blutzuckerwerte stetig ab. Die Glukosewerte bleiben aber bis zum Ende der Beobachtungszeit (180 Minuten) mit 163, 142 und 129 mg/100 ml deutlich über dem für gesunde Normalpersonen gültigen Grenzwert von maximal 120 mg/100 ml. Bei nur gelegentlichen Aderlässen werden im weiteren Verlauf

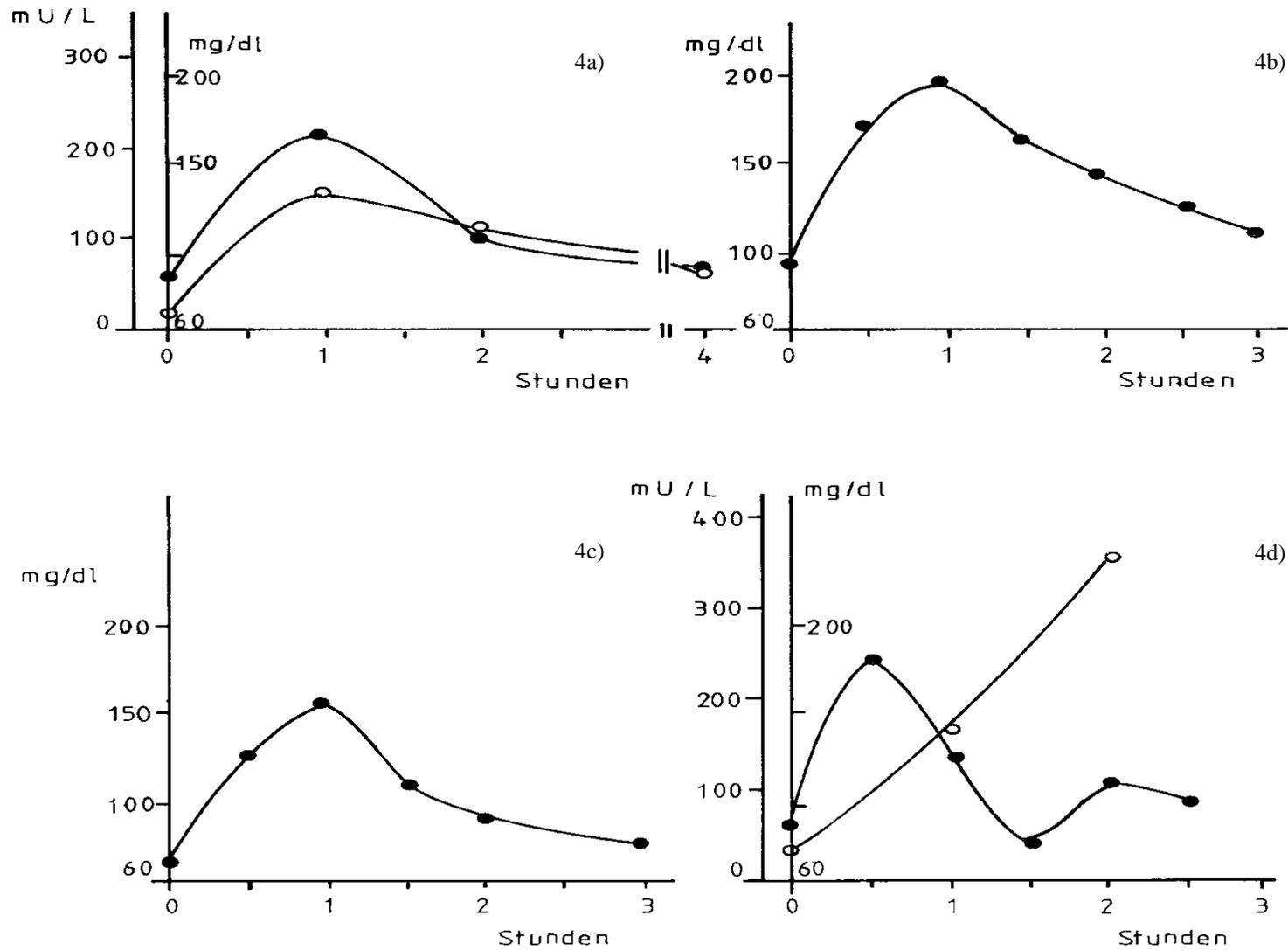


Abb. 4. Bestimmung von Blut-Glukose (●) und Insulin (○) bei oraler Glukosetoleranztestung (OGTT): OGTT vor (a), während (b) und (c) und nach der Aderlasstherapie (d). Bei dieser Therapie wurden die Hkt-Werte des NASH-Patienten von 58% auf 38% gesenkt.

zwei weitere OGTT ausgeführt (Abb. 4c und 4d). Die letzte Testung schließt wieder eine Mitbestimmung der Insulinwerte ein. Bei der dritten OGT-Testung beträgt der HbA1c-Wert 5,2 %. Der BMI errechnet sich zu 29,9 kg/qm. Der basale Insulinwert ist 22,1 μ U/ml. Der Nüchternwert und der zeitliche Verlauf der Blutzuckerkurve liegen im Normbereich gesunder Personen. Der Höchstwert der Glukosekonzentration ist nach 60 Minuten erreicht und beträgt 160 mg/100 ml. Innerhalb von 180 Minuten fällt der Zuckerwert auf 85 mg/100 ml ab. Beim vierten OGTT (Abb. 4d) ist der HbA1c 5,3 %, der BMI 31 kg/qm und der basale Insulinwert 34,2 μ U/ml. Nach einem normalen Nüchternzucker von 92 mg/100 ml steigt der Blutzucker innerhalb von 30 Minuten auf einen Höchstwert von 184 mg/100 ml an. In einer unmittelbar danach gewonnenen Urinprobe findet sich Zucker in einer Konzentration von 0,3 g/100 ml. Nach dem Höchstwert bei 30 Minuten fällt die Blutzuckerkurve zunächst bis 90 Minuten steil ab, um dann mit einem kurzen Nachschwingen und einem Nebenmaximum des Blutzuckers von 109 mg/100 ml bei 150 Minuten auszuklingen. Der Kurvenverlauf lässt die Tendenz zu einer reaktiven Hypoglykämie erkennen. Die Insulinkurve beginnt bei einem Basalwert von 34,2 μ U/ml und steigt innerhalb der nächsten zwei Stunden nahezu linear an. Der höchste gemessene Wert für Insulin beträgt 240 μ U/ml.

4.7 Verlaufskontrollen

4.7.1 Leberbiopsien

Vor Beginn der Behandlung mit Ursodesoxycholsäure wurden dem Patienten mit NASH unter sonographischer Kontrolle Leberbiopsiezyylinder entnommen und an zwei Instituten (Homburg und Ludwigsburg) der unabhängigen Begutachtung durch Pathologen unterworfen. Die initiale Beurteilung erfolgte durch Prof. Dr. Remberger aus Homburg:

„Die Eisenfärbung ist negativ. Es findet sich nur eine minimale Ablagerung von feinkörnigen bräunlichen intrazytoplasmatischem Pigment.

Leberstanzbiopsiezyylinder mit einer ausgeprägten, überwiegend großtropfigen Leberzellverfettung, entsprechend einer Fettleber mit geringgradiger entzündlicher Aktivität und diskreter portaler und perisinusoidaler Fibrose.

Kein Anhalt für Malignität oder Spezifität am vorliegenden Material.“

Das Vergleichs-Gutachten aus Ludwigsburg (Prof. Dr. Herrmann) stellt u.a. fest:

„Keine nennenswerte Siderose, keine Cholestase. Die weitere histochemische Aufarbeitung ergab keinen Nachweis einer Akkumulation von Kupfer oder Alpha-1-Antitrypsin. Damit kein Hinweis auf eine Hämochromatose, einen M. Wilson oder einen Alpha-1-Antitrypsin-Mangel.

Gering floride chronische Fettleberhepatitis mit ausgeprägter Leberparenchymverfettung und geringer portaler sowie mäßiger intralobulärer Fibrose. Der Befund entspricht einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH).

Mäßige Ballonierung der Hepatozyten. Ferner reichlich verfettete Hepatozyten (ca. 75%).“

Nach der Langzeitbehandlung des NASH-Patienten mit Ursodesoxycholsäure (2,0 g pro Tag über 18 Monate) wurde erneut biotisches Material aus der Leber gewonnen. Die histologische Auswertung in Ludwigsburg ergibt nun folgenden Befund:

„Mäßig floride chronische Fettleberhepatitis mit mäßiger Leberparenchymverfettung und insgesamt geringer portaler sowie geringer intralobulärer Fibrose und beginnender porto-portalen Septenbildung.

Insgesamt mäßiggradige Ballonierung der Hepatozyten. Ferner mäßig reichlich verfettete Hepatozyten (ca.60-70 %).

Der Befund entspricht einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH).“

4.7.2 Sonographische Befunde

Initiale Befunde bei dem NASH-Patienten in einer gastroenterologischen Schwerpunktspraxis während der therapiefreien Vorperiode

Bei zwei ambulant durchgeführten Oberbauchsonographien in einer gastroenterologischen Schwerpunktspraxis (Dr. Gerd Rosprich, Saarbrücken) wurden am 23.01.01 die Leberlänge des Patienten in der rechten Medioclavicularlinie mit 14,0 cm bestimmt. Der Normalbereich der Lebergröße wird mit 9,0- 12,0 cm angegeben. Bei einer erneuten Vorstellung am 15.05.03 wurde mit 13,0 cm ebenfalls ein erhöhter Wert gemessen.

Sonographische Untersuchungen im Universitätsklinikum des Saarlandes

Der Patient wurde zusätzlich vor und nach der Behandlung mit Ursodesoxycholsäure sowie nach Ende der Aderlasstherapie sonographischen Kontrollen der Oberbauchorgane

unterworfen. Diese Untersuchungen wurden in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes unter identischen technischen Gegebenheiten durchgeführt. Die Ergebnisse fasst der Untersucher wie folgt zusammen:

Abdomensonographie vom 10.03.03 (vor der Therapie mit UDC):

Leber: gut beurteilbar, vergrößert, Länge in der MCL rechts 170 mm, Oberfläche glatt, ausgeprägte intrahepatische Schallabschwächung.

Pfortader: gut beurteilbar, nicht dilatiert, max. Durchmesser 11 mm, Lebervenen rarefiziert.

Beurteilung: deutliche intrahepatische Schallabschwächung und Hyperechogenität des Leberparenchyms. Befund mit ausgeprägter Steatosis hepatis Grad III vereinbar.

Abdomensonographie vom 21.02.2005 (nach der Therapie mit UDC):

Leber: gut beurteilbar, Abbildungsqualität gut. Vergrößert, kaudaler Leberrand abgerundet,

Oberfläche: glatt, Echomuster verdichtet, mäßige Schallabschwächung, Gefäßstrukturen: noch normal abgrenzbar. Steatosis hepatis Grad II mit einem maximalen Durchmesser in MCL rechte von 181 cm.

Abdomensonographie vom 02.10.2008 (vor Beginn der Aderlasstherapie):

Leber: gut beurteilbar, Abbildungsqualität gut. Normal groß, kaudaler Leberrand abgerundet,

Oberfläche glatt, Echomuster verdichtet, mäßige Schallabschwächung, Gefäßstrukturen: noch normal abgrenzbar. Vena porta: normal weit, maximaler Durchmesser 12 mm, normale Blutströmung, V max =16 cm/sec. Lebersteatosis Grad II.

Abdomensonographie vom 16.12.2010 (nach Aussetzen der Aderlasstherapie):

Leber: normal groß, Oberfläche: glatt, Echomuster verdichtet, keine Schallabschwächung,

normal verformbar, Gefäßstrukturen: normal, Vena porta: V max 22,0 cm/sec.

Statis hepatis Grad I

4.8 Effekt von UDC und Aderlässen bei Patienten ohne NASH

4.8.1 UDC-Wirkung in einer Langzeitstudie

Die Probandin (53 Jahre, 54 kg) hatte stumme Cholesterin-Gallensteine ohne Erhöhung von Leberenzymen und des BMI. Der Serumferritinwert vor Beginn der UDC-Behandlung war in einem für Frauen hohem Normalbereich von 172 ng/ml. Täglich wurden 1,25 g UDC gegeben.

Die Studie wurde ein Jahr lang durchgeführt. Parameter des Eisenstoffwechsels und der Leberenzyme wurden in diesem Zeitraum verfolgt (Abb. 5).

In den ersten Wochen nach Beginn der UDC-Gabe wurde ein steiler Abfall der Serumferritinwerte von 172 ng/ml auf 112 ng/ml beobachtet (Abb. 5a). Danach erfolgte über die nächsten Wochen wiederum ein Anstieg mit einem Maximum in der Nähe des Ausgangswerts, dann erneut ein Abfall bis auf Ferritinwerte von 151 ng/ml. Im weiteren Verlauf wurden bis zum Ende der UDC-Gabe periodische Schwankungen der Konzentrationen des Serumferritins gesehen. Die Werte des Serumferritins am Ende der Studie bleiben jedoch ohne weitere UDC-Behandlung unter dem Ausgangswert. Mit Hinblick auf den Hämatokritwert und das Serumeisen wurden nur geringe Variationen beobachtet (Abb. 5b). Der geringe Abfall des Hämatokritwerts zu Beginn der Studie war jedoch signifikant ($p < 0,05$).

Der Verlauf des Gesamtcholesteringehalts im Blut sowie die Differenzierung in LDL- und HDL-Cholesterin sind in Abbildung 5c dargestellt. Ein signifikanter Effekt der UDC-Behandlung auf diese Parameter ist nach Vergleich mit den Ausgangswerten in der Vorperiode nicht feststellbar.

4.8.2 Konsequente Therapie mit Aderlässen

Die Aderlässe wurden in zeitlich wechselnden Abständen und unterschiedlichen Blutvolumina (Mittelwert: 180 ml \pm SDM) über einen Zeitraum von 16 Monaten ausgeführt. Die Resultate sind in Abbildung 6 dargestellt.

Bei der GGT ist bereits bei Beginn der Aderlasstherapie ein starker Abfall der initial pathologischen GGT-Werte von über 220 U/ml auf dann nur noch leicht erhöhte Werte der GGT von 70 - 80 U/ml ersichtlich. Der Hämatokrit fällt erwartungsgemäß von 50% auf 39% ab. Die zu Beginn normalen Werte für Serumferritin fallen während der Phlebotomiebehandlung in den unteren Normbereich ab.

Bei Aussetzen der Aderlasstherapie ist wieder ein Anstieg mit Richtung auf die Ausgangswerte der Laborparameter erkennbar. Trägt man die Konzentration des Serumferritins gegen die Aktivität der GGT auf (Abb. 7) so resultiert daraus eine lineare Beziehung, die statistisch gesichert werden konnte (Regressionsgerade). Eine statistisch abzusichernde lineare Beziehung ergibt sich ebenfalls bei der Auftragung der Hämatokritwerte gegen die GGT (Abb. 8). Bei Auftragen der Serumeisenwerte gegen die GGT ist auch eine Linearität erkennbar

(Abb. 9). Der Patient mit klassischer NASH-Symptomatik bei Beginn der Behandlung wird ärztlicherseits ständig weiter beobachtet. Bei Erreichen eines Hämatokritwerts von über 49% werden nur noch gelegentlich Aderlässe durchgeführt. Nur 1-2 Aderlässe von jeweils 200 ml pro Jahr sind zur Stabilisierung des vorab beschriebenen Behandlungserfolgs notwendig.

4.8.3 Korrelationen zwischen Leberenzymen und Parametern des Eisenstoffwechsels

Wegen der Bedeutung der Hämatokritwerte und des Leitenzyms GPT bei NASH können aufgrund der Resultate dieser Arbeit beim NASH-Syndrom verlässliche Schlussfolgerungen gezogen sowie neue Therapieansätze vorgeschlagen werden.

Es zeigt sich bei einer zusätzlichen Auftragung der entsprechenden Werte während der gesamten Aderlasstherapie eine hochsignifikante lineare Korrelation zwischen dem Hämatokritwert und dem für NASH wichtigsten Leberleitenzym GPT (Abb. 10). Durch die drastische Verminderung des Hämatokritwertes um 20 Punkte (von 57% auf 37%) wird ein weiter Beobachtungsbereich eröffnet.

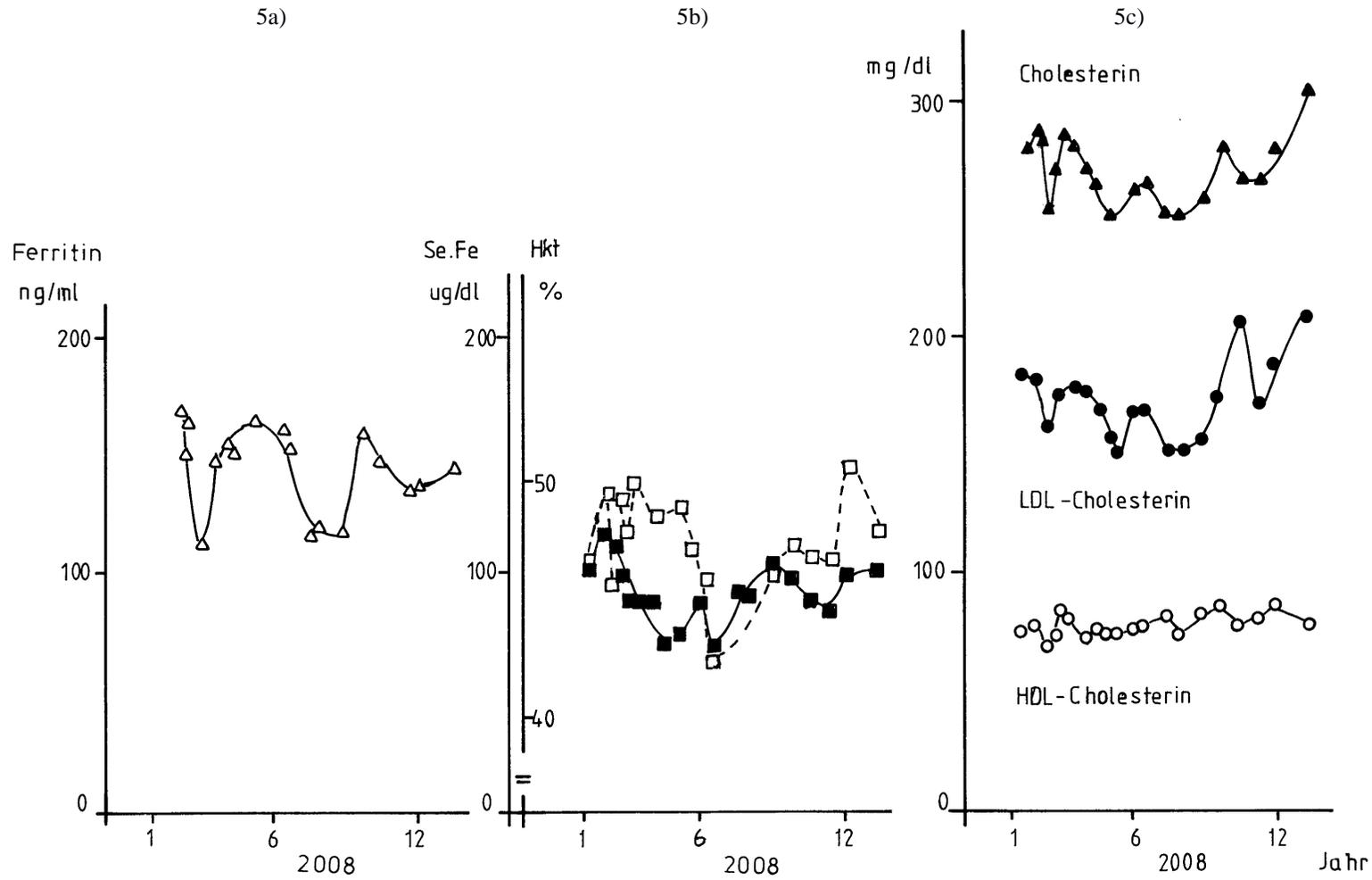


Abb. 5. UDC-Effekt bei Patient mit Hypercholesterinämie: 5a) Ferritin, 5b) Hkt (■) und SeFe (□), 5c) Cholesterin.

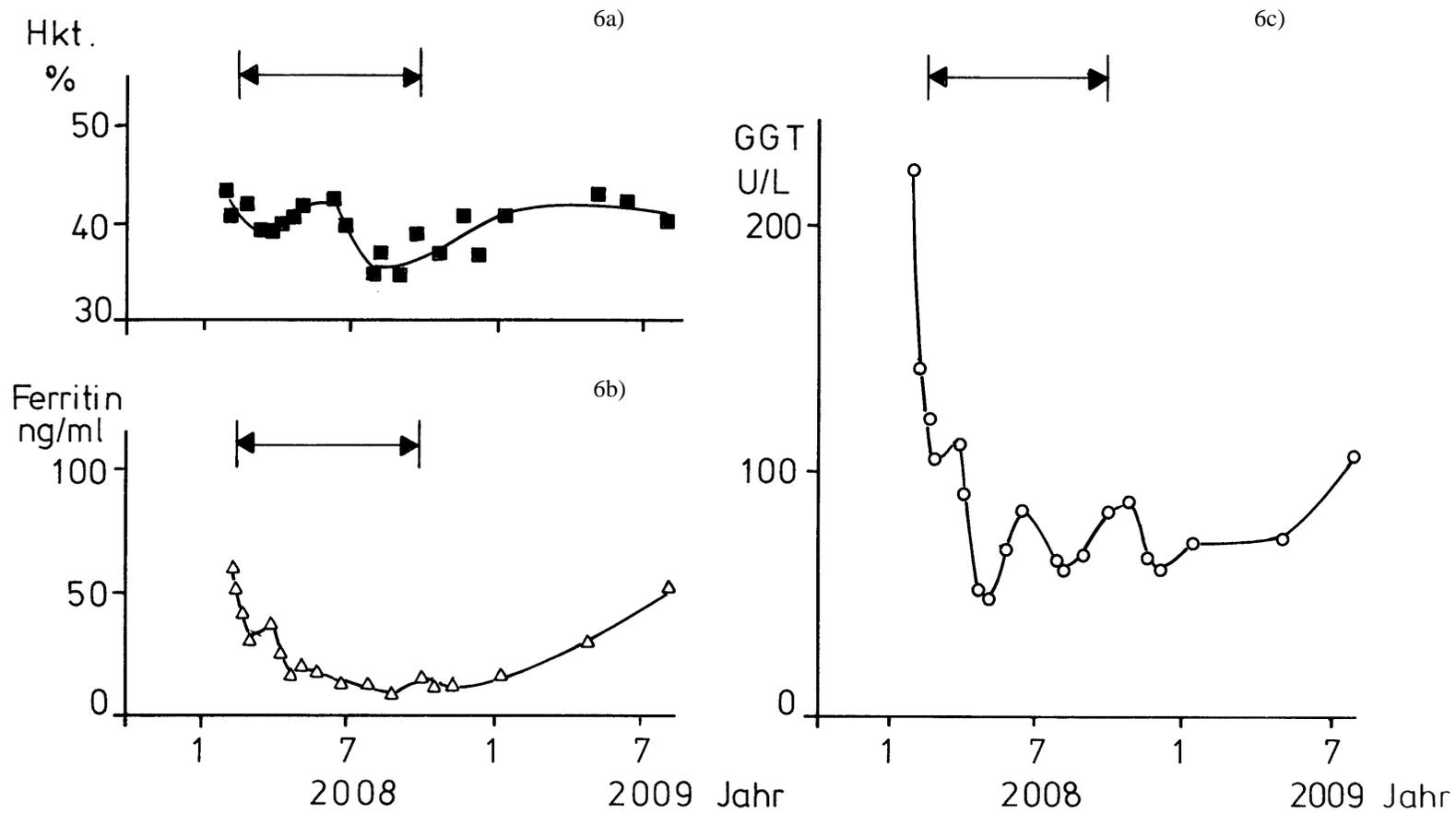


Abb. 6. Effekt von Aderlässen auf eine alkoholbedingte Leberkrankheit: Verlauf der Werte von Hkt, Serumferritin und GPT während der Periode der Phlebotomie (Pfeile) sowie in der Vor- und Nachbeobachtungszeit.

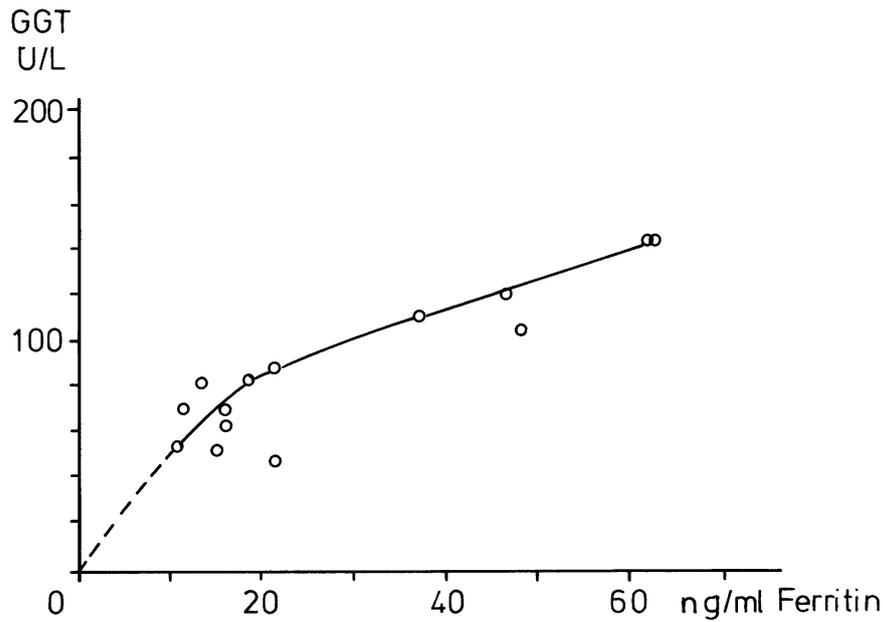


Abb. 7. GGT-Werte in Relation zum Serumferritin. Die Kurve wurde durch eine polynomiale Approximation ermittelt.

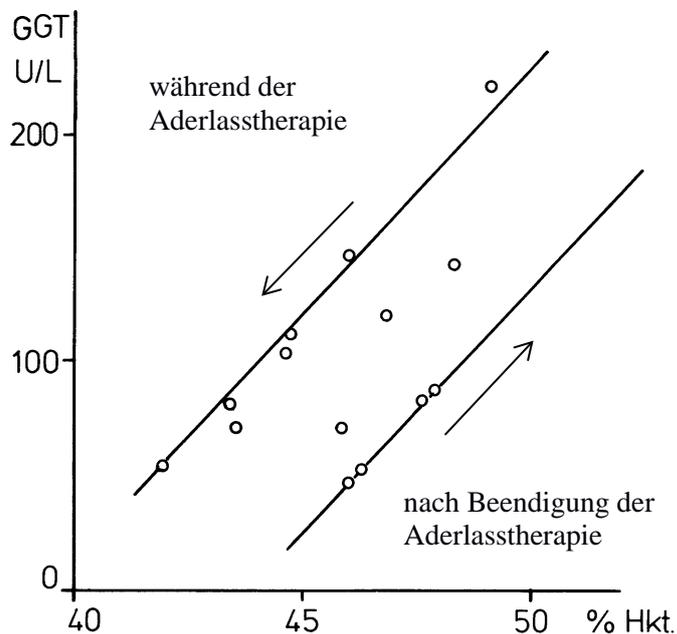


Abb. 8. Zusammenhang von Hämatokritwert und GGT während einer Aderlasstherapie (obere Gerade) und in der Periode nach Aussetzen der Aderlässe (untere Gerade). Die Daten wurden an einem Probanden mit alkoholisch bedingter Transaminasenerhöhung gewonnen. Es zeigt sich eine sehr gute (lineare) Korrelation der beiden Geraden mit r-Werten $> 0,85$. Die beiden Geraden verlaufen parallel ($p = 0,01$).

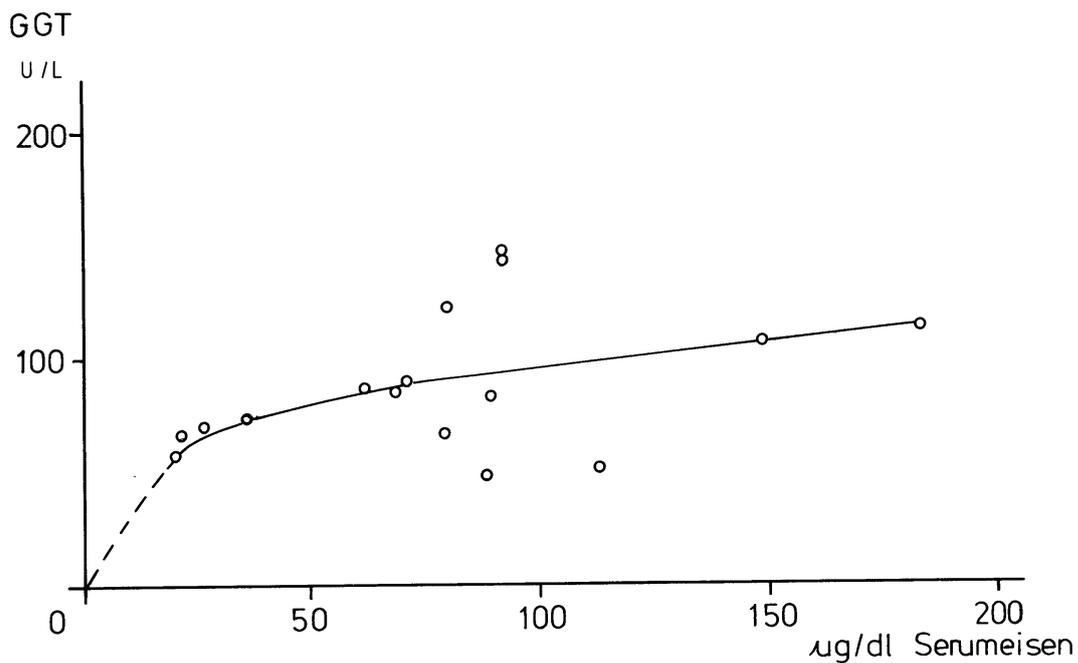


Abb. 9. Abhängigkeit der Plasma-Aktivitäten des Leberenzym GGT vom Serumeisen. Durch Phlebotomie konnte die Konzentration des Serumeisens während einer Phlebotomiebehandlung eines Patienten mit chronischen Alkoholabusus von einem Ausgangswert von 190 $\mu\text{g/dl}$ bis auf Werte im unteren Normbereich reduziert werden. Die hyperbole Kurve wurde aus den Rohdaten mit GraphPad prism-Software ermittelt.

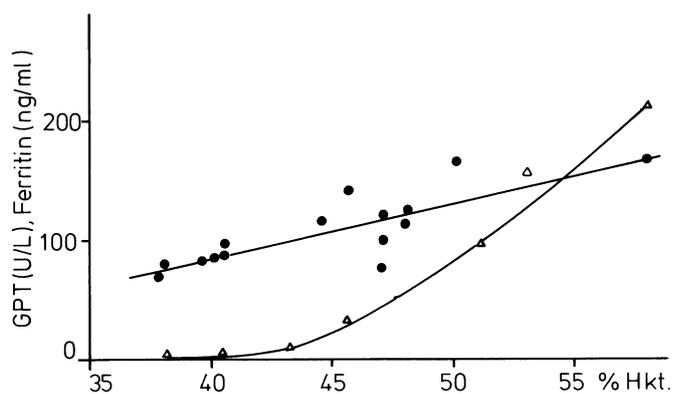


Abb. 10. Kumulative Darstellung des Einflusses einer Aderlasstherapie zur Hämatokritabsenkung auf das Serumferritin (Δ) sowie auf die Aktivität der GPT (\bullet). Die Werte sind aus den zur Abb. 6 führenden Daten zusammengestellt und statistisch als Kurven zusammengefasst worden.

5. Diskussion

Fettstoffwechselstörungen der Bevölkerung haben in vielen Ländern der Erde bereits epidemische Ausmaße erreicht (1, 6, 12). Ihre Prävalenz ist sogar im Steigen begriffen. Eine Sonderstellung wegen eines potentiell fatalen Verlaufs nimmt hier das NASH-Syndrom und dessen Vorstufe (NAFLD) ein. Aus diesem Grund sind Fettstoffwechselstörung sehr intensiv untersucht worden. Dafür sprechen die große Zahl von Veröffentlichungen, die notwendigermaßen oft nur durch das Studium von Übersichtsartikeln inhaltlich zusammengefasst werden können. Trotz Anwendung vielfältiger Techniken besteht bezüglich der Pathophysiologie dieser Volkskrankheiten kein Konsens (110). Als Grund hierfür werden die zahlreichen Variablen angeführt, die den Verlauf der Erkrankung modifizieren können. Dazu zählen in erster Linie die Essgewohnheiten der modernen Gesellschaft, die als Auslöser für die Entwicklung einer Adipositas anzusehen sind. Durch Adipositas wird oft eine genetisch determinierte, aber latente Diabeteserkrankung schon in frühen Jahren manifest. Als Konsequenz kann sich eine Insulinresistenz zeigen. Kontroverse Ansichten bestehen hinsichtlich der Faktoren, die die zunächst relativ benigne Fettlebererkrankung zu dem potentiell lebensbedrohlichen NASH-Syndrom eskalieren lassen.

Wegen der Myriade von modifizierenden Einflussmöglichkeiten sind keine einheitliche Beurteilungen aus der Literatur bekannt. Als mögliche komplizierende Gegebenheiten wurden die genetische Disposition (z.B. HH, PNPLA3, ethnische Gruppen) und externe Faktoren (Zusammensetzung der Nahrung, Medikamente, Alkoholkonsum) identifiziert (10, 11, 14, 15, 18, 19). Eine mögliche Voreingenommenheit (= Bias) von Forschern ist ebenfalls von Bedeutung. Diese bedingt oft fundamentale Meinungsunterschiede bei der systematischen Einordnung der Fettstoffwechselstörungen. So werden das NASH-Syndrom und dessen Vorstufen von endokrinologisch orientierten Forschungsgruppen als Teil des die Leber betreffenden MS angesehen. Forschergruppen mit Fokus auf das Studium des Eisenmetabolismus vermuten hingegen eine Anreicherung von katalytisch aktivem Eisen in der Leber als Auslöser dieser Erkrankungen bzw. Syndrome.

Bei dieser komplexen Ausgangssituation sollten die Wahl eines geeigneten experimentellen Designs in dieser Dissertation weitere Erkenntnisse über die Pathogenese und Ansätze zu einer rationalen Therapie liefern. Das gewählte Studiendesign sah zunächst eine umfangreiche statistische Analyse der Daten eines großen Patientenkollektivs mit den entsprechenden Störungen des Fettmetabolismus vor. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Analysen boten sich Strategien zu einer experimentellen Überprüfung der von der Statistik

„demaskierten“ metabolischen Zusammenhänge an. Es wurde aufgrund dieser statistischen Auswertung von einer potentiellen Verknüpfung des Eisen- mit dem Fettstoffwechsel ausgegangen. Diese Hypothese wurde an ausgesuchten Patienten überprüft.

Hierzu wurden verschiedene Behandlungsstrategien verfolgt und deren Wirksamkeit durch eingehende laborchemische und morphologische Verfahren über längere Zeiträume beurteilt. Bei diesen Untersuchungen mit verschiedenen Therapieansätzen fungierten ausgewählte Patienten nach gesicherter Diagnosestellung als ihre eigene Kontrolle. Mit dieser Vorgehensweise konnten komplizierende Störfaktoren ausgeschlossen werden. Die Langzeitbeobachtungen an den hochmotivierten Patienten waren sehr arbeitsintensiv und erforderten neben aufwändigen Laboruntersuchungen auch den Einsatz komplementärer Techniken der Bildgebung und histologischer Methoden. Die Realisierung vergleichbarer Studien in einem größeren Patientenkollektiv wäre somit aus verschiedensten Gründen (nicht zuletzt auch wegen der sehr hohen Kosten) nicht ohne Weiteres möglich gewesen.

Einen breiten Raum nimmt in der folgenden Diskussion die Beurteilung der Wirksamkeit häufig angewandter Verfahren („etablierte Methoden“) zur Behandlung von NASH ein. Hierbei wird insbesondere die Validität des Serumferritins zur Abschätzung einer fundamentalen Grundgröße (d.h. des Gesamteisens im Körper) einer kritischen Bewertung unterzogen.

5.1 Zur Datenbasis des Universitätsklinikums des Saarlandes

Erst nach Reorganisation der umfangreichen Datenbasis des Homburger Patientenguts konnten Hinweise auf Zusammenhänge des Eisenmetabolismus mit den Stoffwechselstörungen des NASH-Syndroms und verwandter Störungen statistisch gesichert werden. Dazu wurden die Patienten je nach nach Geschlecht und Alter in Gruppen aufgeteilt. Durch dieses Vorgehen wurde den bekannten Besonderheiten des Eisenstoffwechsels bei Mann und Frau sowie den Änderungen des Gesamteisens im Alter Rechnung getragen.

5.1.1 Variationsbreite der Parameter von Hämoglobin und Hämatokrit

Männer haben gegenüber Frauen bei gleichem Schweregrad einer Adipositas mit BMI von ca. 30 kg/qm um ca. 10% höhere Hämoglobin- bzw. Hämatokritwerte. Bei Frauen mit NASH oder besonders NAFLD im Alter von unter 50 Jahren ist die Erniedrigung des Blutfarbstoffs gegenüber der Männervergleichsgruppe noch ausgeprägter. Diese Unterschiede können durch menstruelle Blutverluste sowie auf eine veränderte Muskelmasse und eine unterschiedliche Verteilung des Körperfetts zurückgeführt werden. Somit stehen die Daten der Homburger Datenbank mit Literaturangaben in Einklang (35).

Der Blutfarbstoffgehalt wird offenbar nicht vom Schweregrad der Adipositas (definiert durch den BMI) beeinflusst. In Anbetracht des hohen Energie- und Sauerstoffbedarfs von Fettzellen bei Fettlebererkrankungen war dieses Ergebnis überraschend, da Hämoglobin und andere Hämproteine als wesentliche Faktoren bei der Energieproduktion in der Atmungskette mitwirken. Somit hätte man bei hohem Fettgehalt des Körpers eine Erhöhung des Blutfarbstoffes erwarten können.

5.1.2 Aussagekraft des Serumferritins

Die Bestimmung des Gesamteisens im Körper ist wichtig, um Zustände eines Eisenmangels oder einer Eisenüberladung von Normalwerten (ca. 4 - 5 g Eisen) unterscheiden zu können. Während Zustände des Eisenmangels auch durch erniedrigte Werte des Hämoglobins, des Serumeisens und durch Blässe von Haut und Schleimhäuten diagnostiziert werden können, ist dies bei Zuständen einer Eisenüberladung (Werte oft > 20 g) nicht der Fall. Die Hämoglobinwerte und Serumeisenwerte liegen dann zwar meist im höheren Normbereich, sind aber für eine direkte Diagnose einer Eisenüberladung ungeeignet. Da jedoch schon bei geringer hepatozytärer Eisenbelastung bereits im jugendlichen Alter fatale Folgen berichtet wurden, hat man lange nach alternativen Labormethoden zur Abschätzung des Körpereisens gesucht. Schließlich wurde vor etwa 30 Jahren die Bestimmung der Werte des Serumferritins als wichtige Methode zur indirekten Abschätzung des Gesamtkörpereisens vorgeschlagen (64). Allerdings kann das Serumferritin nichts über die Lokalisation des Eisens in den Körperzellen aussagen und ist somit ungeeignet, eine toxische Beladung parenchymaler Gewebe von Zellen und Strukturen des retikuloendothelialen Systems differenzieren zu können. Serumferritinwerte werden trotz dieser Einschränkungen heutzutage routinemäßig bestimmt. Bei Frauen unter 50 Jahren mit NASH sind die Serumferritinwerte gegenüber entsprechenden Vergleichswerten stark erniedrigt (vgl. Tab. 2). Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Befund bietet der Blut- bzw. Eisenverlust durch die Monatsblutungen. Deshalb wurde bei NASH-Patientinnen die Gruppe von unter 50 Jahren gesonderten Analysen zugeführt.

Bei den Gruppen NASH, NAFLD und Verdacht auf NASH sind die Serumferritinwerte bei Frauen bis zu 80% gegenüber der Männergruppe gleichen Alters vermindert. Beim Vergleich jüngerer Patientinnen mit der Gruppe von über 50 Jahren liegt eine Verminderung des Serumferritins auf 10 - 40% der Norm vor. Auch dies kann durch Eisenverluste während und nach der Menstruation erklärt werden.

5.2 Einfluss von Adipositas und pathologischer Glukosetoleranz

Bei der Frauengruppe im fortgeschrittenen Alter ist ein signifikanter Anstieg des BMI von 26 auf 30 kg/qm vorhanden. Eine Korrelation mit dem BMI könnte bei dem 16-30 prozentigen Anstieg des HbA1c und der Nüchtern glukosewerte vermutet werden. Bei der Gruppe von Männern mit NASH ist ebenfalls ein deutlicher Anstieg des HbA1c und der Nüchtern glukosewerte während des Alterungsprozesses auffällig. Jedoch bleiben die erhöhten gefundenen BMI-Werte bei NASH und NAFLD unabhängig vom Alter nahezu unverändert.

Bei Frauen mit NASH kommt es mit dem Fortschreiten der Adipositas im Alter zu einer weiteren Belastung des Zuckerstoffwechsels und einer prädiabetischen, mit OGGT erkennbaren Stoffwechsellaage. Es kann daher vermutet werden, dass bei der diabetogenen Entwicklung die starke Erhöhung des Speichereisens nach der Menopause bedeutsam ist. Als Zielorgane für die Eisendeposition sind parenchymatöse Organe wie Leber und Pankreas betroffen. Funktionssörungen dieser Organe können bereits bei kleinsten Konzentrationen von katalytisch wirksamem Eisen auftreten.

5.3 Signifikanz des Eisenstatus bei NASH

Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer auslösenden Rolle von Eisen für das NASH-Syndrom kompatibel. Allerdings sind die bei NASH gefundenen Werte für Serumferritin deutlich niedriger als bei der HH (110, 111, 147). Bei der HH ist bei hoher Eisenbelastung der Leber eine Erhöhung aller Transaminasen festzustellen. Im übrigen werden massive Zellschädigungen bis hin zu einer Zirrhose ausgelöst.

Die verminderte Inzidenz des Auftretens von NASH bei Frauen im menstruationsfähigen Alter ist ähnlich zu interpretieren wie das analoge Verhalten bei der HH. Die Blutverluste durch Menstruation scheinen sowohl bei der NASH als auch der HH einen wirksamen Schutz für die Leber zu gewährleisten.

5.4 Zur Hypothese eines „second hit“

Eine Kompatibilität zu den diskutierten Theorien besteht in der Hypothese, dass das NASH-Syndrom eine besondere Form des MS ist (16, 29, 67, 72, 79, 101, 131, 140, 142, 152). Hier sind die Daten dieser Arbeit mit endokrinen Störungen im Zuckerstoffwechsel kompatibel. Kompatibel sind sie ferner auch deshalb, weil das NASH-Syndrom vorwiegend bei Patienten mit Adipositas aufzutreten scheint. Allerdings sind in der umfassenden

Datenbasis von NASH-Patienten in Homburg meist keine Anzeichen einer Hyperlipidämie nachweisbar. Eine starke Hyperlipidämie ist bei Vorliegen eines metabolischen Syndroms normalerweise augenfällig. In der NASH-Patientengruppe aus Homburg sind dagegen die Lipidwerte sowie die Werte für Triglyceride und das Gesamt-Cholesterin nur marginal erhöht (Tab. 5).

Die HbA1c-Werte sind nur bei der Gruppe von älteren Männern mit NASH mit 6,7% erhöht. Ansonsten gibt es keine eindeutigen Zeichen für das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Ein klinisch signifikanter Diabetes hätte neben einer stärkeren Erhöhung des HbA1c Wertes auch durch Nüchternwerte des Blutzuckers von über 120 mg/dl auffallen müssen. Diese Feststellungen werden auch durch die Tatsache bestätigt, dass im Nüchternurin des Patientenguts mit NASH nur gelegentlich eine Glukosurie zu verzeichnen war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind insgesamt mit den Vorstellungen der „first hit“ und eines weiteren Ereignisses, d.h. „second hit“, als Voraussetzungen zur Entwicklung des NASH-Syndroms kompatibel. Die Ergebnisse der Dissertation bestätigen die bisherigen Vermutungen, dass NASH durch zwei unabhängige Ereignisse entweder simultan oder in Folge (Fettleber mit Eisenbelastung oder Eisenbelastung mit anschließender Fettleber) ausgelöst werden kann.

Mit diesen erweiterten Erkenntnissen zur möglichen Genese des NASH-Syndroms wird ersichtlich, dass man die entscheidenden Faktoren für die Entwicklung des NASH-Syndroms nicht ohne Weiteres mit Hilfe umfangreicher Datenbanken ermitteln kann. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Hinweise aus den statistischen Analysen der NASH-Patienten dazu benutzt, interventionelle Forschungsansätze zu entwickeln. Diese waren experimenteller Natur und bezogen sich vor allem auf Beobachtungen an Patienten, bei denen eine eindeutige diagnostische Abklärung des NASH-Syndroms vorgenommen wurde. Es wurde der Verlauf der Erkrankung unter verschiedenen Formen einer Therapie analysiert. Hochmotivierte Patienten mit NASH fungierten in den verschiedenen Perioden von Therapien als eigene Kontrolle. Diese Beobachtungen mussten sich naturgemäß über lange Zeiträume erstrecken und die Compliance der Patienten und anderer freiwilligen Probanden zur Voraussetzung haben.

5.5 Angenommene Wirkmechanismen

In dieser Arbeit war es möglich, die wichtigsten Laborparameter über Monate ohne jede Pharmakotherapie oder andere Maßnahmen wie Sport oder strikte Diät zu verfolgen (= dynamische Beobachtungen). Die Resultate zeigen, dass die erhöhten GPT-Aktivitäten in

nahezu periodischer Weise über Zeiträume von 3-4 Monaten fluktuieren. Auffallend ist, dass sich GPT-Werte gegenüber der Ausgangswerten auch ohne jegliche Therapie ständig verändern und dass es somit Perioden von Anstieg und Abfall gibt. Zudem ist auffällig, dass die Änderungen der GPT mit Werten des Serumferritins parallel verlaufen. Dieses Verhalten ist für Änderungen im Serumeisen nicht feststellbar: Hier ist eher eine Tendenz zu höheren Werten zu beobachten. Verglichen mit dem Ausgangswert des Serumeisens tritt am Ende des Beobachtungszeitraums ohne jede Medikation eine Erhöhung um das Doppelte auf; ein ähnliches Verhalten zeigen die Hämatokritwerte.

Als Konsequenz dieser Langzeitbeobachtungen ergibt sich für eine belastbare Diagnosestellung des NASH-Syndroms die Notwendigkeit zu engmaschigen Analysen. Erst unter Berücksichtigung der Variabilität der Laborwerte bei deutlicher Tendenz einer pathologischen Erhöhung sollte mit einer pharmakologischen Intervention bzw. mit nicht medikamentösen Behandlungsversuchen (z.B. Aderlasstherapie) begonnen werden. Während dieser Therapien bieten sich die Bestimmung der Hämatokritwerte, des Serumeisens und der Transferrinsättigung mit Eisen als geeignete Parameter zur Beurteilung des Behandlungserfolgs an.

5.6 Kinetik der Behandlung mit UDC

Bei langfristiger oraler Gabe von Ursodesoxycholsäure ändern sich die Werte der relevanten Parameter GPT, Hämatokrit, Serumeisen und Serumferritin im Vergleich zur Vorperiode ohne Therapie eindrucksvoll. Die Daten zeigen, dass unter einer längeren Behandlung mit Ursodesoxycholsäure ein überschießender Rebound auf die Laborparameter des Eisenstoffwechsels eintritt. Dieser ist von einer subjektiven und objektiven Verschlechterung im Allgemeinbefinden des Patienten begleitet. Über einen derartigen Effekt bei einer Anwendung von UDC bei NASH über längere Zeiträume liegen bisher in der Literatur keine Berichte vor.

In einer aktuellen randomisierten Studie mit der Verabreichung von UDC in hoher Dosierung (13-15 mg/kg/d) über 12 Monaten zeigte sich konkordant zu dieser Arbeit eine Verbesserung der Leberenzyme GPT, GOT und GGT; eine Angabe über das Serumferritin ist der Publikation nicht zu entnehmen. Die histologischen Leberbiopsien zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu der Placebogruppe (74).

Wegen des Abfalls des Serumferritin unter der UDC-Behandlung muss ferner eine weitere, bisher unbekannte Eigenschaft von UDC diskutiert werden. Man kann dabei das

Vermögen des UDC-Moleküls zur Bindung von dreiwertigem Eisen diskutieren. Bei dieser zu postulierenden Eigenschaft liegen Analogien zu dem Verhalten von Desferrioxamin (DFO) vor. Mit DFO kann man toxisches Eisen bei entsprechender Therapiedauer selektiv aus den Eisenspeichern des Hepatozyten entfernen. Dadurch kann einer toxischen Eisenüberladung des Hepatozyten bei transfusionspflichtigen Thalassämiepatienten entgegengewirkt werden. Allerdings sind bei diesen Erkrankungen mit gesteigerter erythropoetischer Aktivität keine Aderlässe möglich, und die Chelat-Therapie mit DFO kann auch nicht für längere Zeit unterbrochen werden. Dies kann ein Grund dafür sein, dass man bei DFO (im Gegensatz zu UDC) bisher keinen ungünstigen Rebound-Effekt auf Parameter des Eisenmetabolismus und ausgewählter Leberenzyme feststellen konnte.

5.7 UDC als möglicher Eisenchelatbildner

Mit Blick auf die Strukturformel von UDC (Abb. 11) ist es nicht überraschend, dass diese Substanz über die Möglichkeit der Eisenbindung verfügen sollte. Es finden sich zwei freie Hydroxylgruppen und eine Carboxylgruppe (Carbonsäuregruppe) am Cholangerüst. Die Carboxylgruppe ist endständig in einer aliphatischen Seitenkette und daher ohne sterische Einschränkungen verfügbar. Ähnliche Voraussetzungen sind in einer Reihe von bekannten Chelatbildnern für dreiwertiges Eisen vorhanden. Als Beispiele sollen Hadacin und phenolische Chelatbildner mit Strukturbeziehung zu BHBEDA(N, N1-Bis(2-hydroxybenzyl) ethylendiamin-N,N1-diacetessigsäure angeführt werden. Aber auch eine ganze Reihe natürlich vorkommender Chelatbildner für Eisen wie die Salicylsäure und die Benzoesäure (Abb. 14) verfügen über die notwendigen Liganden (Hydroxyl- und Carboxylgruppen) zur festen Bindung von Metallen, insbesondere von dreiwertigem Eisen.

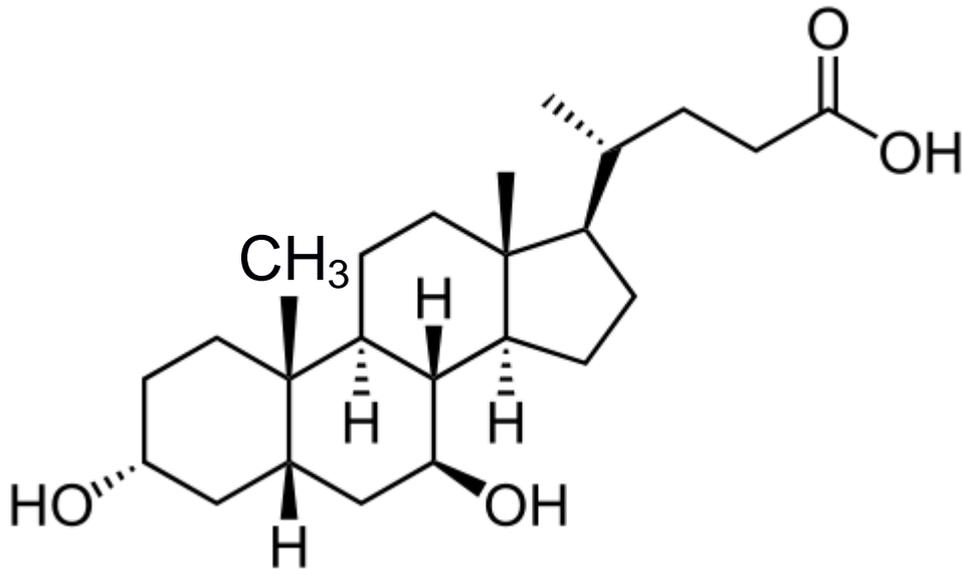


Abb. 11. Strukturformel des hier eingesetzten Epimers von Ursodesoxycholsäure (UDC).
 Eigenschaften: Ursodesoxycholsäure (UDC) ist eine weiße bis gelbliche kristalline Substanz. Sie enthält 99-101 % 3- α -7- β -dihydroxy-5- β -cholan-24-säure (C 24, H40; O4) bezogen auf die getrocknete Substanz. Molekulargewicht: 392,6. Löslich in Methanol, Ethanol und Essigsäure. Praktisch unlöslich in Wasser. pK_a-Wert 5. Ursodesoxycholsäure ist relativ unempfindlich gegenüber dem Einfluss von Sauerstoff, Licht, Feuchtigkeit und hohen Temperaturen.

5.8 Andere Wirkmechanismen von UDC

Neben dem in dieser Arbeit erstmals gezeigten Vermögen der Ursodesoxycholsäure, Serumferritinwerte bei NASH-Patienten stark zu senken, werden für UDC noch vielfältige weitere Wirkmechanismen diskutiert, die die NASH-Symptomatik günstig beeinflussen können. Dazu gehören antioxidative Effekte, antifibrotische Wirksamkeit, antiinflammatorische Wirkung und eine fördernde Wirkung auf die Leberzellregeneration (Tab. 7). Auch ein therapeutisch bedeutsamer Einfluss von UDC auf Enzyme des hepatischen Lipidmetabolismus mit Senkung des Serumcholesterins wird diskutiert.

Tabelle 7: Überblick über mögliche Wirkungsmechanismen der Ursodesoxycholsäure (UDC).

- Antiinflammatorisch
- Vasoaktiv

- Immunmodulation
- Leberregeneration
- Choleretisch
- Verminderte Hydrophobizität des Gallensäurepools
- Antifibrotisch
- Mastzellstabilisierung
- Anti-apoptotisch
- Stabilisierung der Mitochondrienintegrität
- Antioxidativ
- Detoxifikation über CYP450-Induktion
- Hemmung der intestinalen Cholesterinresorption
- Senkung des Cholesterinsättigungsindex
- Gallensteinauflösung

5.9 Laborparameter während einer konsequenten Aderlasstherapie

Ganz anders als bei UDC-Behandlung müssen die Effekte einer Aderlasstherapie diskutiert werden. Alle vier untersuchten Parameter fallen bereits nach 2 Aderlässen von etwa 200 ml drastisch ab. Während die Werte für Serumferritin nach initialen Aderlässen stets im unteren Normbereich bleiben oder sich bereits der Nachweisgrenze nähern, steigen die Werte für den Hämatokrit und die GPT-Aktivitäten bei weniger konsequenter Aderlasstherapie mit längeren Therapiepausen wieder an. Wird die Aderlasstherapie wieder aufgenommen, so sind die beobachtende Anstiege von GPT und Hämatokrit rückläufig. Die Werte für diese Laborparameter erreichen schließlich wieder Normalbereiche.

Das Gesamtvolumen des durch Aderlässe beim NASH-Patienten entfernten Blutes betrug 10.000 ml. Dadurch konnte der Hämatokritwert während der Aderlasstherapie von 57% auf 37% gesenkt werden. Insgesamt wurden dem Körper durch Aderlässe ca. 10 g Eisen entzogen. Der Effekt durch diese Aderlasstherapie auf die Serumferritinwerte des Patienten war mehrere Jahre lang anhaltend. In dieser Zeit wurden ausschließlich Werte im unteren Normbereich gemessen. Es besteht keine lineare Korrelation der Serumferritinwerte mit Hämatokrit und GPT. Dies bedeutet, dass kurz nach Beginn einer Aderlasstherapie die Serumferritinwerte für diagnostische Zwecke und für die Beurteilung des Verlaufs einer NASH-Erkrankung ungeeignet sind. Eine sichere Prädiktion durch Messung des Hämatokritwerts und der GPT scheint dagegen gegeben.

Umgekehrt haben die Serumferritinwerte für die Abschätzung des Gesamteisens im Körper keine Aussagekraft, wenn dieses als Hämosiderineisen vorliegt. So werden im Gegensatz zur NASH während der Aderlasstherapie bei Patienten mit schwerer HH zunächst unverändert konstante Werte für das Serumferritin über längere Zeiträume gefunden. Erst wenn die Hämosiderindepots in der Leber durch Aderlässe erschöpft sind, zeigt das Serumferritin einen linearen Abfall und kann somit als Indikator für die Effektivität der Aderlasstherapie bei HH herangezogen werden. Beim NASH-Syndrom sind offenbar keine Hämosiderin granula vorhanden, so dass das Serumferritin rasch in die Nähe der Nachweisgrenze abfällt und dort verharrt.

Obige Ausführungen legen nahe, dass durch Bestimmung des Serumferritins während einer Aderlasstherapie bei NASH keine Vorhersagen über den Verlauf von GPT und Serumeisen (bzw. Transferrinsättigung) gemacht werden können. Niedrige Serumferritinwerte bei NASH schließen jedoch eine Beteiligung toxischen Eisens in besonderen Kompartimenten des Hepatozyten nicht aus. Möglicherweise ist hierbei Eisen nur in Spuren als Katalysator für die schädigende Hydroxylradikalbildung erforderlich. Dabei könnte es sich durchaus auch um Spuren von Hämosiderineisen handeln, das durch die Bestimmung von Serumferritin nicht erfasst wird. Zur weiteren Klärung dieser Möglichkeiten wären quantitative Untersuchungen in biotisch gewonnenem Lebermaterial mit Differenzierung in Ferritin und Hämosiderinanteile notwendig.

In früheren Berichten über den Effekt einer Aderlasstherapie auf die NASH-Symptomatik hat man sich lediglich darauf beschränkt, einen Zustand nahe eines Eisenmangels (NID = Near Iron Deficiency) zu erreichen (54, 59, 64, 68, 110, 129, 138, 147, 150). Als Indikatorgröße wurde in diesen Studien vor allem die Bestimmung des Serumferritins verwendet. Dieser Parameter hat jedoch nach den Erkenntnissen dieser Arbeit für die Ausprägung des NASH-Syndrom wohl keine Bedeutung, besonders nicht im Anfangsstadium der Aderlasstherapie. In diesen Bereichen waren in auffälliger Weise die Hämatokritwerte vor und nach der Aderlasstherapie mit Abfall um nur einen Punkt der Hämatokritskala statistisch von der Ausgangssituation nicht unterscheidbar. In dieser Arbeit wurden dagegen Unterschiede im Hämatokrit von bis zu 20 Punkten erreicht. Hieraus resultieren Beobachtungen, die bei geringfügigen Aderlässen mit Reduktion um nur einen Hämatokritpunkt und bei Vorliegen einer nur minimalen Eisendepletion (NID) nicht gesehen werden konnten.

5.10 Eisen beim NASH-Syndrom: Verursacher oder Zuschauer?

Die Beobachtungen mit Unterschieden im Hämatokritwerten bis zu 20 Punkten legen nahe, dass die charakteristische Erhöhung der GPT-Werte bei NASH in erster Linie mit einer Erhöhung der Hämatokritwerte einhergeht. Dies ist nicht überraschend, denn das Hämoglobin steht mit dem erythrozytären Hämoglobin durch basale (spontane) Hämolyse in einem Fließgleichgewicht. Hämoglobin verfügt nun selbst aber über ausgeprägte katalytische Eigenschaften. Dies gilt insbesondere für die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Haber-Weiss-Reaktion oder auch durch Katalyse bei der Fenton-Reaktion (vgl. Anhang). Hämoglobin vermag experimentell die Bildung aggressiver sauerstoffhaltigen Radikalen um nahezu das Hundertfache zu beschleunigen.

5.10.1 Zelltoxische Wirkungen chemischer Radikale

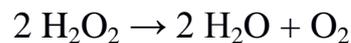
Im Falle der HH kann man ebenfalls davon ausgehen, dass durch toxisch wirkendes Eisen der Hepatozyten (und auch freies Hämoglobin) die Geschwindigkeit der Bildung freier Sauerstoffradikale durch Katalyse um mehr als das Hundertfache gesteigert werden kann. Diese katalytische Steigerung der Radikalbildung durch Eisen ist durch in vitro Beobachtungen schon seit vielen Jahrzehnten bekannt (Haber-Weiss-Reaktion) (10, 12, 14). Die durch Eisen oder freies Hämoglobin hundertfach verstärkt gebildeten aktivierten Sauerstoffradikale haben eine Überlebenszeit von Millisekunden bei einer freien Wegstrecke von 5 Angström. Dann reagieren sie mit jeder Form von biologischem Material, insbesondere leicht mit Zellmembranstrukturen. Wegen der intrazellulären Produktion von Radikalen in direkter Nachbarschaft von Membranen werden diese Membran-Strukturen gewissermaßen durchlöchert. Bei den Membranen von Hepatozyten führt diese Schädigung schließlich zum Austritt der Transaminasen. Fortlaufende Schädigungen über Jahre überfordern dann die Reparaturmechanismen des Organismus und bedingen eine Leberfibrosierung mit anschließendem Übergang in eine Leberzirrhose.

Im Rahmen der Lipidakkumulation beim NASH-Syndrom hat man bisher keine konkreten Hinweise auf möglicherweise fettinduzierte, toxische Triggermechanismen zur Bildung freier Sauerstoffradikale. Es ist aber naheliegend, ähnliche Mechanismen anzunehmen, die dann Ähnlichkeiten in der Symptomatik und der Pathophysiologie des NASH-Syndroms und der HH bedingen. Während man durch Entfernung von Eisen aus dem Körper durch einfache Phlebotomie die Bildung exzessiver freier intrazellulärer Radikale

limitieren kann, so kann das Verschwinden von Fettvakuolen aus den Hepatozyten durch geeignete Methoden (z.B. durch Diät und Gewichtsabnahme) beim NASH-Syndrom einen modulierenden Effekt auf die überschießende Produktion freier Radikale zu haben. Bei NASH und HH sind demzufolge durch Reduktion der Zellakkumulation potentieller Noxen (Fett und Eisen) klinische Verbesserungen bis hin zu Normalbefunden vorstellbar.

5.10.2 Hämoglobin als Katalysator von Zellschädigungen

Bekannt ist in der Biochemie die Fähigkeit von Hämoglobin und bestimmten Katalasen (z.B. in den Leukozyten) die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu initiieren und dabei die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Katalyse um mehr als das Hundertfache zu steigern. Dabei kommt es nach intermediärer Radikalbildung letztlich zum Zerfall des Wasserstoffperoxids in Wasser und Sauerstoff:



Die bei dieser Zersetzung als kurzlebige Zwischenprodukte gebildeten aggressiven chemischen Radikale können wie bereits oben ausgeführt Membranschädigungen bis hin zur Ausbildung einer Fibrose mit Übergang in eine Leberzirrhose auslösen. Selbstverständlich kann die rasche Zersetzung von Wasserstoffperoxid auch durch verschiedene Metallionen und vor allem durch Eisenionen in zwei- oder dreiwertigen Form ausgelöst werden. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Zersetzung durch substantielle Konzentrationen von ionisiertem Eisen erheblich langsamer als die rein katalytische Zersetzung durch die Anwesenheit von Spuren von Hämoglobin.

5.11 Aderlasstherapie bei alkoholgeschädigter Leber

In dieser Arbeit wurde eine Aderlasstherapie bei einem Patienten ohne NASH aber mit zugegebenem chronischen Alkoholkonsum mit Erhöhung der GGT als weitere Kontrolle ausgeführt. Auch in diesem Fall wird durch Aderlässe ein eindrucksvoller Abfall der pathologischen GGT-Werte erreicht. Dieser Abfall geht wie bei der Aderlasstherapie bei NASH wiederum mit Verminderung des Hämatokrits und damit auch mit einer entsprechenden Minderung des katalytisch wirkenden Hämoglobins einher. Diese Beobachtungen basieren auf der Hypothese, dass Schädigungen an den Hepatozyten der Leber vorwiegend durch katalytische Wirkungen des Hämoglobins oder seine Abbauprodukte ausgelöst werden können. Selbstverständlich kann durch die Noxe Alkohol diese Schädigung

noch erheblich modifizierend verstärkt werden. Hier kann man einen (hyper)synergistischen Effekt vermuten.

5.12 Lipide als mögliche Noxen für Hepatozyten

Zweifellos kann die Deposition von überschüssigen Lipiden in der Leber für die Hepatozyten eine Noxe darstellen. Im Hinblick auf Lipidperoxidationsvorgänge mit Bildung toxischer Oxidationsprodukte ist es mehr wahrscheinlich, dass bei Anwesenheit von Fetten die vulnerablen Leberstrukturen durch die katalytische Wirkungen von Hämoglobin oder von toxischen, niedermolekularem Eisen intensiver geschädigt werden können. Diese Eigenschaft könnte zum Verständnis der Theorie von zwei Noxen („two hits“) bei NASH hilfreich sein und somit diese Hypothese weiter stützen. Damit wäre auch erklärbar, dass bei der HH, bei der keine nennenswerte Fettbelastung in den Hepatozyten vorliegt, ein viel höherer Grad einer Eisenüberladung notwendig ist, bevor Membranschädigungen mit entsprechenden metabolischen Konsequenzen auftreten.

5.13 Validierung der Behandlungsergebnisse

Die Schlussfolgerungen aus der Analyse der Laborparameter konnte durch eine Reihe von histologischen Untersuchungen an Leberbiopsien des Patienten bestätigt werden. Auch die Auswertung der sonographischen Untersuchungen legte eine eindeutige Besserung durch die gewählten Therapieverfahren mit Aderlässen und den Einsatz von UDC nahe.

Auf mögliche Einschränkungen einer sicheren Diagnosestellung durch die Analyse von Leberbiopsien wurde bereits hingewiesen. Neben dem Problem der Entnahme aus einem nicht repräsentativen Areal der Leber kann auch ein Bias des auswertenden Pathologen zu Unsicherheiten Anlass geben. Daher wurden zur Begutachtung der Biopsien unabhängige Pathologen aus verschiedenen Instituten beauftragt. Die Beurteilungen von zwei Pathologen vor Behandlungsbeginn mit UDC waren vergleichbar. Wichtig war die eindeutige Diagnose einer Fettleber bei NASH. 18 Monate nach der Behandlung mit UDC wurden die gewonnenen Biopsate wieder demselben Pathologen wie bei der Eingangsuntersuchung zur Beurteilung vorgelegt. Der Pathologe beschreibt am Ende der Behandlung mit UDC einen deutlich verbesserten Befund. Der Anteil der fetthaltigen Hepatozyten ist von 75% auf 60 - 70% gesunken. Die portalen Fibrosezeichen sind rückläufig, und es wurde nur eine mäßige Ballonierung der Hepatozyten berichtet. Eine Siderose wird nicht beobachtet.

Die Sonographie wird allgemein als eine sehr empfindliche, nicht invasive Methode

zur Beurteilung einer Fettleber angesehen (16). Bei dem NASH-Patienten zeigt sich bereits bei Beginn der Behandlung mit UDC eine merkliche Abnahme des Fettgehalts der Leber. Diese war zuvor mit Grad 3 einer Fettleber beschrieben worden. Der Grad der Verfettung beträgt nach UDC-Therapie nur noch 2 und am Ende der Behandlung mit zusätzlicher Aderlasstherapie nur noch Grad 1.

5.14 Ist NASH "heilbar" ?

Bereits nach der UDC-Therapie konnte in den Leberstanzen eine wesentliche Besserung der histopathologischen Veränderungen festgestellt werden. Das klinische Befinden des Patienten hat sich in puncto Müdigkeit, Antriebslosigkeit und körperliche Leistungsfähigkeit ebenfalls verbessert. Bei diesem Patienten war jetzt keines der klassischen Symptome eines NASH-Syndroms mehr vorhanden. Diese Besserung wurde ohne die normalerweise vorgeschlagenen Behandlungsansätze wie Reduktion des BMI, strikte Diät, Ausdauersport, antioxidativ wirkende Vitamine und Therapie eines vorbestehenden Diabetes durch Medikation erzielt. Es wurden in dieser Studie keine Cholesterinsynthesehemmer oder die Cholesterinresorption blockierende Pharmaka eingesetzt. Diese zuletzt genannten Maßnahmen werden oft zur Therapie bei NASH vorgeschlagen, haben sich aber bei dem in dieser Dissertation gewählten Therapieansatz mit Aderlässen und UDC-Pharmakotherapie als entbehrlich erwiesen.

5.15 Diskussion zur Problematik der Diagnosestellung bei NASH

5.15.1 Bildgebende Verfahren

Das NASH-Syndrom ist mit einfachen Laborparametern des Eisen- und Zuckermetabolismus nicht mit der erforderlichen Eindeutigkeit zu diagnostizieren. Auf der anderen Seite sind routinemäßige histologische Untersuchungen an Leberbiopsien aufgrund verschiedener Erwägungen und ethischer Vorbehalte nicht möglich. Sonographische Techniken zur unterstützenden Abschätzung des Grades einer Leberverfettung sind dagegen empfehlenswert. Diese Untersuchungen sind nur mit geringen Kosten verbunden und haben für die Diagnostik und den Verlauf der Therapie beim NASH-Syndrom einen hohen Stellenwert.

5.15.2 Morphologische Untersuchungen

Gezielte histologische Untersuchungen erlauben, eine morphologische Schädigung der

Leberstruktur an Biopsaten zu erkennen. Zur semiquantitativen Abschätzung des Grades der Eisenbeladung der Leberzellen sind die herkömmlichen Färbemethoden für Eisen (z.B. Berliner Blau-Reaktion) jedoch nicht geeignet. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass zwei verschiedene Eisenproteide in der Leber gespeichert sind. Neben Ferritin ist dies Hämosiderin, das einen sehr viel höheren Eisenanteil als Ferritin aufweist. Das Eisen im Hämosiderin entzieht sich aber bei den bisher gebräuchlichen Färbemethoden einem quantitativen oder auch nur semiquantitativen Nachweis.

5.15.3 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektroskopie kann nicht routinemäßig als „Goldstandard“ für die Bestimmung des Gesamtlebereisens und schon gar nicht für eine Differenzierung des Ausmaßes der Eisenbelastung von Hepatozyten bzw. Makrophagen eingesetzt werden. Dieses Verfahren gibt daher keinen Aufschluss über eine benigne Eisenbeladung der Kupffer-Zellen und der mit toxischen Auswirkungen verbundenen Eisenüberladung von Hepatozyten.

5.16 Eisenstatus und NASH

5.16.1 NASH aus endokrinologischer Sicht

Die vorwiegend mit endokrinologischen Problemen befassten Forscher sehen in NASH im Wesentlichen die Folgen eines sich auf Leber und Pankreas auswirkenden MS. Diese Annahme wird durch die bei NASH meist zu beobachtende relative Insulinresistenz gestützt. Als Folge entwickelt sich in Analogie zu den Vorgängen bei Diabetes mellitus Typ 2 eine androgene Adipositas mit Fettleber. Diese „endokrinologisch“ orientierten Forscher nehmen wegen einer nur geringen bis mäßigen Erhöhung der Serumferritinwerte (und damit der Annahme einer nur geringfügigen Eisenbelastung verschiedener Organe) lediglich eine passive Rolle („bystander“) für Eisen beim NASH-Syndrom an. Ein kausaler Zusammenhang von Eisen bei der Pathogenese von NASH wird von diesen Forschern nicht für wahrscheinlich gehalten.

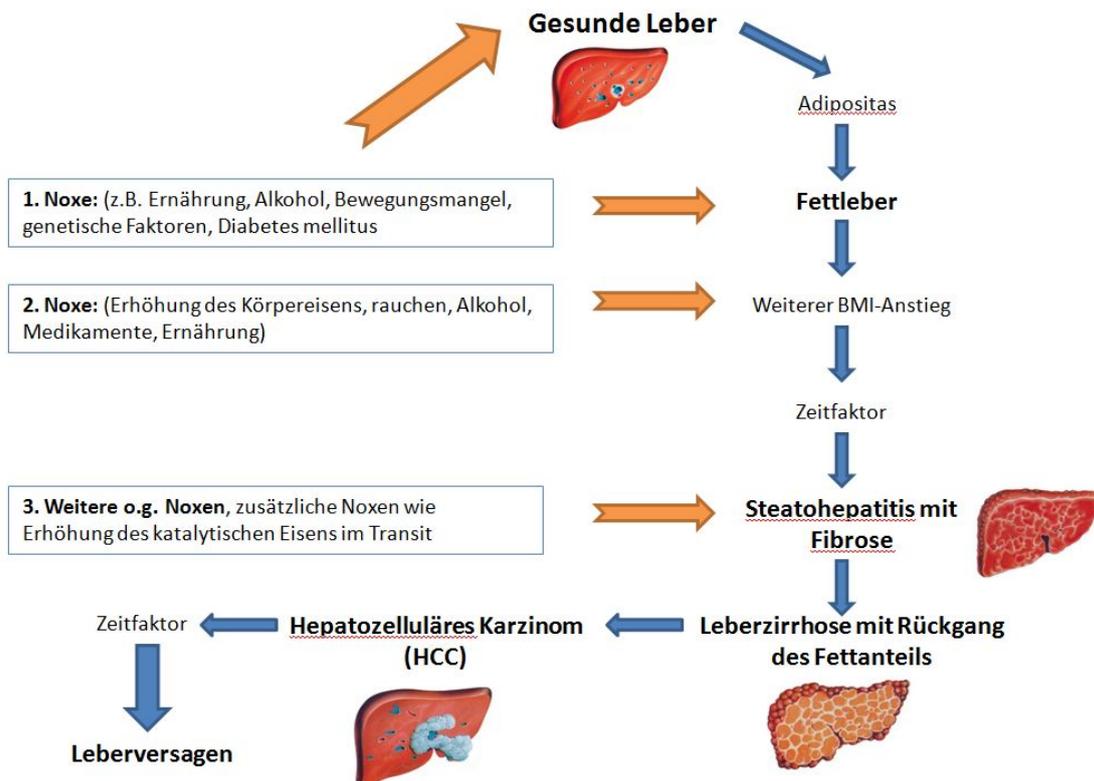
5.16.2 NASH als Eisenspeicherkrankheit

Auf der anderen Seite des wissenschaftlichen Disputs stehen vorwiegend Forscher, die sich mit dem Eisenmetabolismus und dessen Pathophysiologie beschäftigen. Diese Gruppe von Forschern weisen besonders auf die Ähnlichkeiten zwischen der HH und dem NASH-

Syndrom hin. So zeigen sich während der Entwicklung der HH besonders im zweiten Dezenium zunächst eine Erhöhung von Leberwerten und eine mäßige bis starke Erhöhung der Serumferritinwerte. Störungen durch Eisenbeladung parenchymaler Organe (z.B. Pankreas) lösen Veränderungen im Hinblick auf den Zuckermetabolismus aus; bei höherer Eisenbeladung tritt ein Diabetes mellitus auf. Die Leber reagiert auf das toxische Eisen durch Fibrosierung. Die Frage, ob vor Übergang der fibrotischen Veränderungen in eine Zirrhose das Stadium einer für das NASH-Syndrom typischen Fettleber als Zwischenstadium zu durchlaufen ist, ist nicht eindeutig geklärt.

5.17 Erweiterung der „second hit“ Hypothese

In diesem Streit zwischen den zwei wissenschaftlichen Lagern (Diabetologen vs. „Eisenforscher“) wurde versucht, die konträren Ansichten beider Gruppen zu einem Konsens zusammenzuführen. Bei diesen Bemühungen geht man von zwei obligaten Vorbedingungen („two hits“) für die pathophysiologischen Veränderungen beim NASH-Syndrom aus. Die erste Vorbedingung ist die Entwicklung einer Fettleber im Gefolge einer androgenen Adipositas mit Insulinresistenz. In diesem Stadium wird noch keine Leberdysfunktion beobachtet. Käme es aber in diesem Stadium zu einer geringen zusätzlichen Einlagerung von Eisen („second hit“; z.B. durch eisenreiche Diät, kohlenhydratreiche Kost, verstärkte Eisenresorption, lebertoxische Medikamente, Alkohol) in die vulnerablen Leberzellen, so zeigten sich dann laborchemisch Zeichen einer Leberdysfunktion. Diese Noxen bedingen im Verlauf der NASH-Erkrankung Änderungen der Leberstruktur mit Ausbildung einer Leberfibrose, die später in eine Zirrhose übergehen kann (Schema 1). Man könnte die erste Noxe (Leberverfettung) bei NASH mit dem Zünder einer Bombe vergleichen, der nur bei Anwesenheit von toxischem Eisen oder anderer Noxen („multiple hits“) die nachfolgend Leberdysfunktion auszulösen vermag.



Schema 1. Pathophysiologische Vorgänge während der Genese der NASH und ihrer Progression zur Leberzirrhose. (cf Finch und Huebers p. 91)

5.18 Vergleich von NASH und Hämochromatose

5.18.1 Aderlasstherapie bei Hämochromatose

Die wichtigste Maßnahme bei der HH-Behandlung ist die Entfernung von überschüssigem und toxisch aktivem Eisen aus dem Körper. Dies wird einfach und kostengünstig durch Aderlasstherapie erreicht. Mitunter muss diese Therapie ein Leben lang ausgeführt werden. Bei Kenntnis des Hämatokritwertes und der entnommenen Blutvolumina kann der durch Phlebotomie verursachte Eisenverlust des eisenüberladenen Körpers sehr genau bilanziert werden.

5.18.2 Aderlässe und Parameter des Eisenstoffwechsels

Im Körper selbst wird der Erfolg der Phlebotomie durch Kenngrößen des Eisenmetabolismus erfasst. Neben dem einfachen Hämatokritwert haben hier die Bestimmungen von Serumeisen, Serumtransferrin und Serumferritin zur Steuerung der

Aderlasstherapie die größte Bedeutung. Durch einfache Messung des Hämatokritwertes vermeidet man exzessive Absenkungen, die zu einer Eisenmangelanämie mit reaktiver Steigerung der Erythropoese und der Aktivität der Eisenresorption führen. Dies wäre für die Therapie kontraproduktiv.

Die Aderlasstherapie verlängert das Leben der Patienten mit HH, weil dadurch insbesondere die Dysfunktionen parenchymatöser Organe (z.B. Herz, Leber, Pankreas) reduziert werden können. Die bei HH beobachtete vermehrte Inzidenz des Entstehens eines HCC kann durch die Aderlasstherapie allerdings kaum beeinflusst werden. Dies deutet auf eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischer Determinierung hin, der durch Änderung der Eisenbelastung nicht entgegengetreten werden kann.

5.18.3 Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen NASH und Hämochromatose

Neben den oben vorgestellten Gemeinsamkeiten zwischen NASH und der HH existieren auch spezifische Unterschiede. So werden beim NASH-Syndrom nie sehr hohe Werte einer Eisenüberladung im Körper beobachtet. Die Werte der Laborparameter für Körpereisen sind meist nur leicht erhöht oder liegen sogar im Normbereich.

Der Mechanismus, der zu einer Eisenüberladung der Leber mit verschiedener Präferenz für die Hepatozyten oder die Kupfferzellen führt, ist bisher unklar (13, 45, 55, 94, 95, 96, 139). Man kann aber davon ausgehen, dass es sich um eine multifaktorielle Vorgänge handelt, wobei das Geschlecht, das Alter, Blutverluste durch Menstruation und Adipositas eine Rolle spielen. Dies konnte auch im Rahmen dieser Dissertation bestätigt werden. Inwiefern genetische Faktoren wie bei der HH eine Rolle spielen, ist zur Zeit nicht abschließend geklärt. Einige Arbeiten auf diesem Forschungsgebiet vermuten einen solchen Zusammenhang, während andere Arbeiten dieses Konzept eher als unwahrscheinlich erscheinen lassen (3, 43, 50, 55, 56, 109, 137). Man wird also weiter auf den „Goldstandard“ histologischer Untersuchungen für eine verlässliche Diagnose für das NASH-Syndrom angewiesen bleiben.

Mit einiger Sicherheit kann auch eine Beziehung von NASH zu dem Peptidhormon Hecpidin erwartet werden (22, 45, 53, 70, 107, 108, 141). Dieses Schlüsselpetid zur Steuerung der intestinalen Eisenresorption wird allerdings durch sehr viele Faktoren beeinflusst. Neben Zuständen des Eisenmangels und der Eisenüberladung und einer großen Anzahl weiterer metabolischen Faktoren kommt auch der Zusammensetzung der Nahrung in Bezug auf resorbierbares Eisen eine besondere Bedeutung zu (9, 53, 63, 70, 94, 95, 96). Alkohol fördert die Eisenresorption und kann im Zusammenhang mit Eisen zu einer

Eisenüberladung des Körpers führen.

5.18.4 Bestimmungsmethoden für das Gesamteisen im Körper

Die Bestimmung von Gesamteisen in biotisch gewonnenen Leberzellgewebe (Leberstanzen) ist durch Verwendung hochempfindlicher Techniken mit hoher Präzision möglich. Dafür muss aber das biologische Material zunächst einem Aufschluss in Mineralsäuren unterworfen werden. Nur so gelingt es, das im Ferritin und Hämosiderin gebundene Eisen in eine lösliche, ionisierte Form zu überführen. Diese Lösung kann dann mittels Atomabsorptionsspektroskopie auf ihren Eisengehalt untersucht werden. Die Präzision der Bestimmung des Eisengehalts ist bei diesem Vorgehen sehr viel höher als bei den flammenlosen Verfahren mit einer Hochtemperaturküvette aus Graphit. Alternativ kann man die mit Mineralsäuren aufgeschlossene Probe nach Reduktion zu zweiwertigem Eisen auch direkt einer chemischen Quantifizierung mit einem Farbreagenz zuführen.

Bei dem flammenlosen Verfahren der Atomabsorptionsspektrometrie werden die Eisenwerte wegen eines störenden Matrixeffektes von Proteinen stets zu niedrig ausfallen. Zudem liegt das Eisen in den Eisenspeicherproteinen Ferritin und Hämosiderin nahezu vollständig als unlösliches Poly-Eisenhydroxid vor, was eine vollständige Atomisierung selbst bei sehr hohen Temperaturen in der Graphit-Küvette nicht erlaubt. Eine vollständige Atomisierung ist aber Vorbedingung für quantitative Messungen bei der Atomabsorptionsspektroskopie.

Mit diesen aufwändigen Techniken hat man ermittelt, dass ein dreifach den Normalwert gesunder Menschen übersteigenden Eisenwert pro mg Lebergewebe als positiver Parameter für eine klinisch relevante Eisenüberladung angesehen werden kann. Leider gibt die Bestimmung des Gesamteisens pro mg Gewebe keinerlei Auskunft über die Verteilung des Eisens auf die Hepatozyten und die Kupffer-Zellen (vgl. Abb. 12). Aber genau dieses Kenntnis wäre von elementarer Bedeutung, da das Eisen in den Hepatozyten in Bezug auf toxische Auswirkungen von viel größerer Bedeutung ist als das Eisen im retikuloendothelialen System.

5.19 Ferritin und seine Beziehung zu Hämosiderin

Ferritin kann bis zu 20% Eisen in einer zentralen Höhle („inner core“) binden. Normalerweise ist die Bindungskapazität für Eisen im Ferritinmolekül aber nur zu 30 % ausgeschöpft. Das Eisen im Zentrum von Ferritin ist im Hinblick auf eine katalytische

Funktion praktisch inert. Dagegen kann Eisen im Ferritin, aber auch außen am Molekül, an den 24 bekannten Untereinheiten gebunden werden. Dieses Eisen ist im Gegensatz zu dem Eisen im „inner core“ des Ferritinmoleküls katalytisch hochaktiv. Vermutlich beruht die Berliner Blau-Reaktion des histologischen Eisennachweis auch auf der Anwesenheit von Degradationsprodukten des Ferritins, d.h. von Hämosiderin, oft in Form von Granula.

Hinsichtlich des Hämosiderin-Moleküls, das gegenüber dem Ferritin einen noch erheblich höheren Eisengehalt besitzt, gibt es keine verlässlichen Angaben über Beziehungen zwischen Farbintensität und der tatsächlichen Gewebekonzentration von Hämosiderin. Da das Hämosiderin-Molekül im Wesentlichen aber aus hochpolymeren und vernetzten Hydroxyhydraten von dreiwertigem Eisen besteht, muss eine schlechte Reaktionsbereitschaft bei Kontakt mit farbgebenden Eisenreagenzien angenommen werden. In jedem Fall wird eine hinreichende Quantifizierung des intrazellulären Eisens allein auf Grund der Intensität der Eisenfärbung im histologischen Präparat nicht gelingen.

5.20 Eisen in metabolischem Transit

Ein niedermolekularer, chelatierbarer Pool von Eisen resultiert im Gefolge ständiger Degradation und Neusynthese von Ferritinmolekülen im Hepatozyten (Abb. 12). Dieses intrazellulär in den Hepatozyten und im retikuloendotheliale System vorkommende oder freigesetzte niedermolekulare Eisen kann mit bestimmten Chelatbildnern (z.B. DFO) durch Ausscheidung des Eisen-DFO (FO) Komplexes im Urin und in den Faeces nachgewiesen werden (Abb. 12). Dies ist die Grundlage des DFO-Tests zur Bestimmung des Beladungszustandes einzelner Körperzellen mit Eisen. Der DFO-Test ermöglichte erstmals eine Differenzierung zwischen der Eisenüberladung im Parenchym oder im retikuloendothelialen System der Leber. Niedermolekulares, chelatierbares Eisen besitzt eine hohe katalytische Aktivität zur Auslösung der Haber-Weiss- und der Fenton-Reaktion (vgl. Anhang).

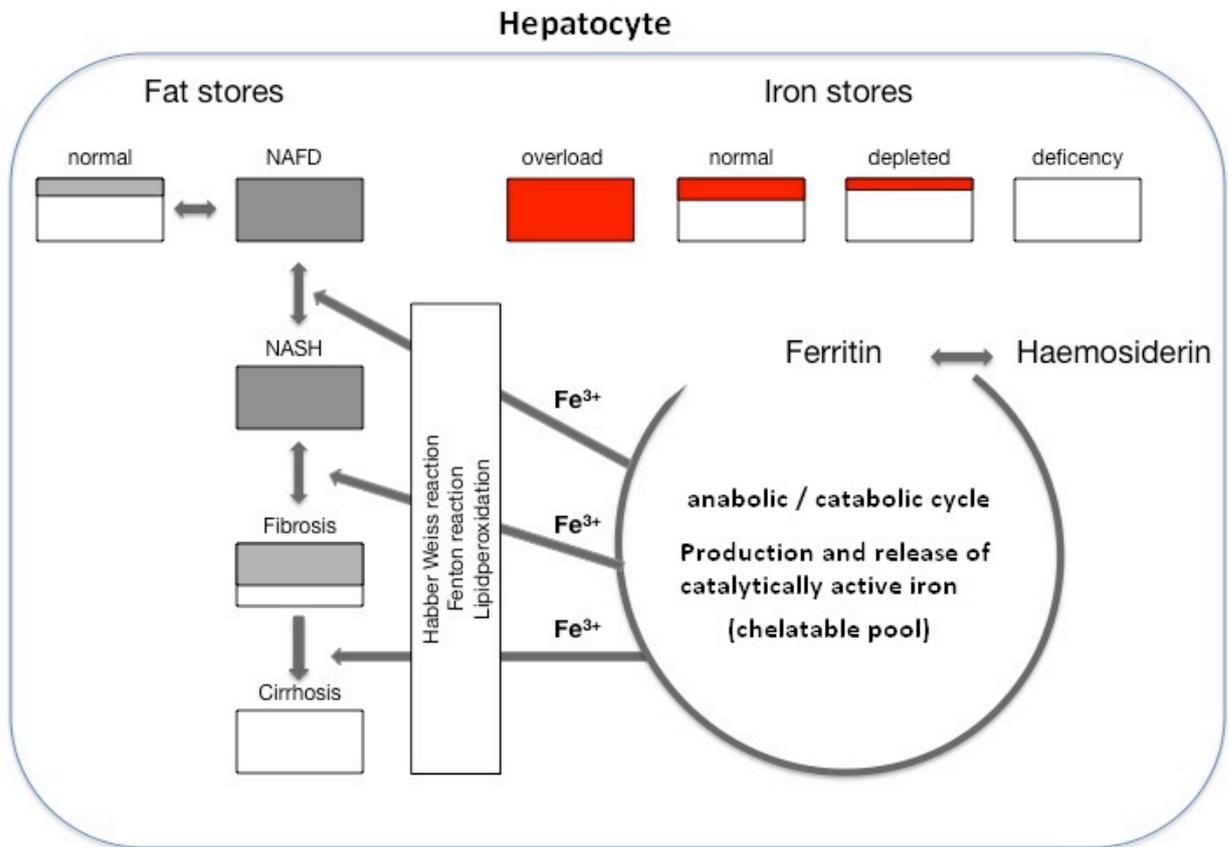


Abb. 11. Modellhafte Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit: Zusammenhänge zwischen der Fettbelastung des Körpers und der Eisenbelastung in Hepatozyten und Konsequenzen für die Entstehung von NASH mit Übergang in eine irreversible Leberzirrhose. Grundlage zum Verständnis ist die Tatsache, dass bei NASH und verwandten Symptomen zwei Voraussetzungen zu einer Schädigungen des Hepatozyten führen können. Es handelt sich dabei um erhöhte Speicher für intrazelluläres, toxisches Eisen und für intrazelluläre Lipide. Je mehr Eisen in den Zellen vorhanden ist, um so mehr wird in dem anabolen/katabolen Zyklus des Ferritins niedermolekulares, katalytisch aktives Eisen vorhanden sein. Dieses Eisen kann durch geeignete Chelatbildner für dreiwertiges Eisen gebunden werden (vgl. Abb. 12). Das katalytisch aktive Eisen beteiligt sich an einer Reihe von chemischen Prozessen (Lipidperoxidation, Haber-Weiss-Reaktion, Fenton-Reaktion, vgl. Anhang). Das gespeicherte Fett dient dabei als Substrat für diese Reaktionen und wird in zellschädigende Peroxiverbindungen umgewandelt. Infolge der Toxizität der Reaktionsprodukte werden die Zellmembranen der Hepatozyten geschädigt. Werden durch Aderlasstherapie die Eisenspeicher im Parenchym wirksam reduziert oder gar ein Zustand einer Eisenverarmung erzeugt, so bleibt der durch Eisenionen katalysierte Angriff auf die Hepatozyten und Fette aus. Es kommt zur Rückbildung der klinischen NASH-Symptomatik, einer Besserung der Leberwerte und zur Rückbildung einer Insulinresistenz. Bei bereits ausgebildeter Leberzirrhose ist dieser Zustand schließlich irreversibel und kann durch Verminderung der Eisenbelastung der Leber nicht mehr verbessert werden.

Internal Iron Exchange

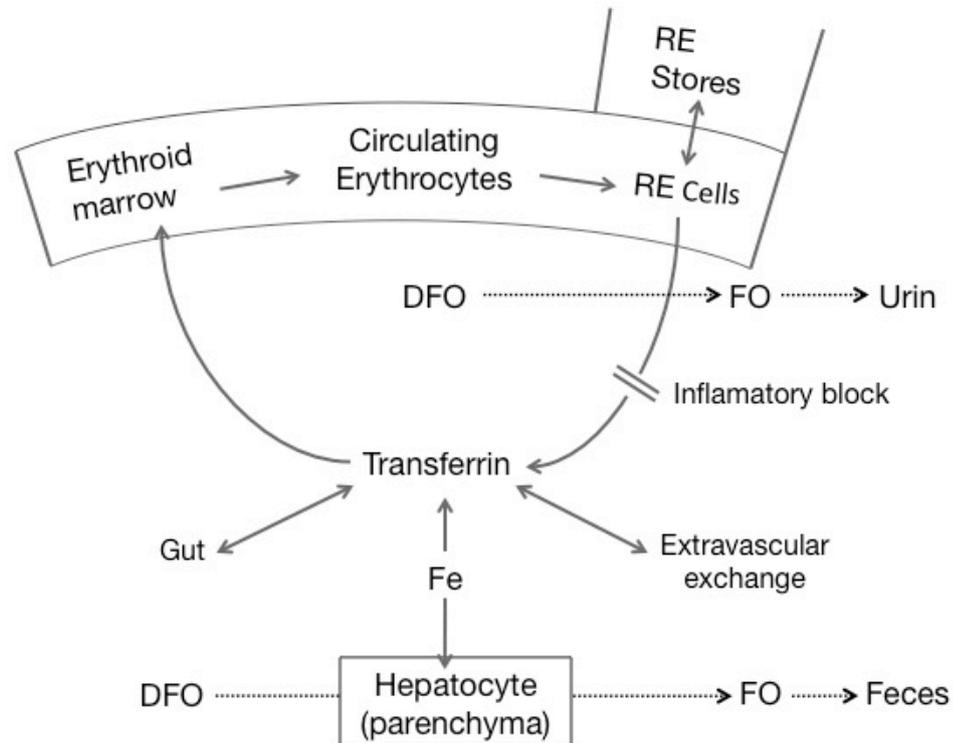


Abb. 12. Schematische Darstellung des internen Eisenmetabolismus unter Einbeziehung des Auftretens von niedermolekularem, katalytisch aktiven Eisen („iron on transit“). Dieses kann durch spezifische Chelatbildner für dreiwertiges Eisen wie DFO abgefangen werden. Bei dieser Reaktion wird Ferrioxamin (FO) gebildet. Im Falle einer Eisenbelastung des Hepatozyten wird FO in den Faeces ausgeschieden. Das aus dem retikuloendotheliale System stammende chelierbare Eisen erscheint dagegen im Urin. Dieser Test erlaubt, das im Hepatozyten gebildete katalytisch aktive Eisen bei entsprechender Therapiedauer teilweise zu entfernen. Eine Aderlasstherapie führt jedoch schneller zum Erfolg. Besteht eine Entzündung wird vom retikuloendothelialen (RE) System weniger Eisen an das Transferrinmolekül im Plasma abgegeben (RE-Block mit Infektanämie). Bei länger bestehender Entzündung kann daher eine milde Eisenüberladung des RE-Systems resultieren. Dieser Umstand ist jedoch nicht von toxischer Natur und unterscheidet sich somit deutlich von der Eisenüberladung des Hepatozyten. Nach Sistieren der Entzündung wird der RE-Block rasch aufgehoben. (cf. Finch at al. p. 91)

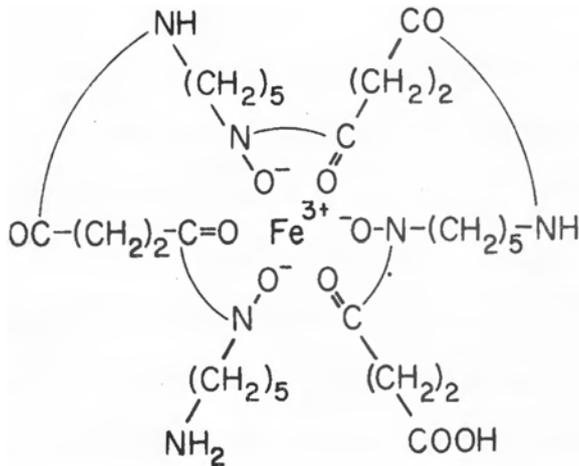


Abb. 13. Struktur von Ferrioxamin (FO) in planarer Darstellung.

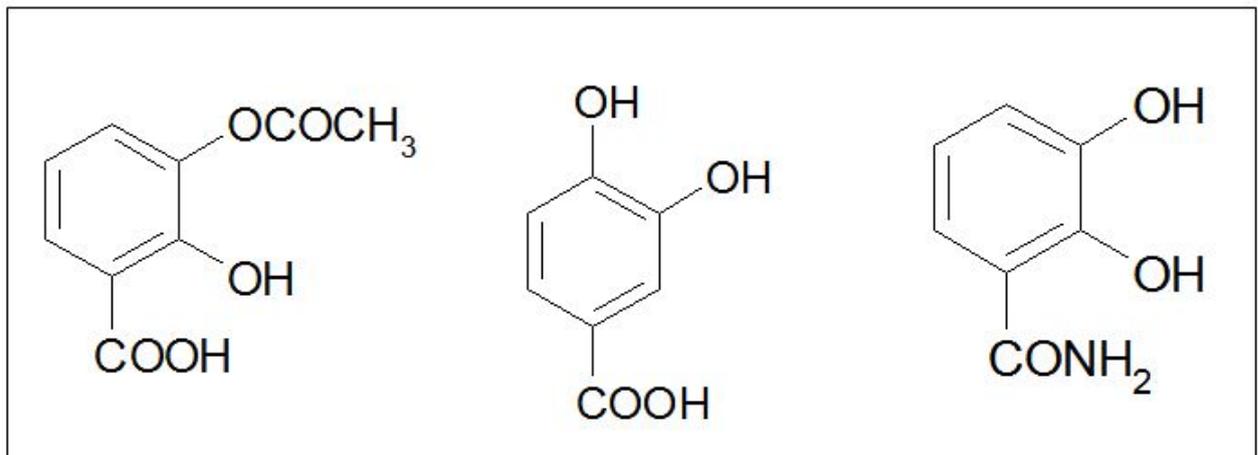
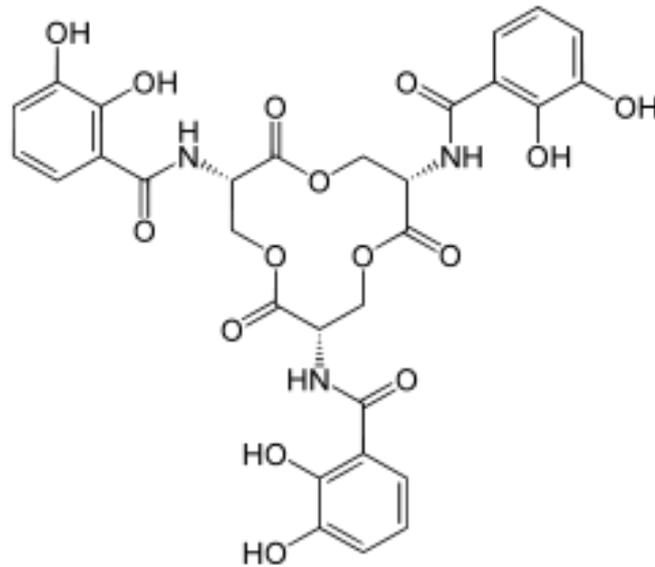


Abb. 14. Charakteristika eisenbindender, aromatischer Verbindungen.

a) Analoge der 2,3 Dihydroxybenzoesäure. Diese besitzen die Fähigkeit zur Bindung von dreiwertigem Eisen. Die gebildeten Komplexe sind oft tiefblau und wurden zur Herstellung von Tinten benutzt. Wichtige Strukturmerkmale zur Bindung von Eisen sind die Hydroxyl- und die Carboxylgruppen, die das dreiwertige Eisen in Form von ringförmigen Chelatkomplexen stabil binden können.



b) Enterochelin. Enterocholin ist ein in der Natur vorkommendes, sehr spezifisch dreiwertiges Eisen bindendes Molekül mit höherem Molekulargewicht. Enterocheline sind in niedrigen Organismen (z. B. Moose) weit verbreitet.

c) Ursodeoxycholsäure (UDC). UDC besitzt die erforderlichen Merkmale zur Bindung von dreiwertigem Eisen. Insbesondere sind Hydroxyl- und Carboxylgruppen in sterisch guter Position zur spezifischen Bindung von dreiwertigem Eisen vorhanden. Das Molekül zeigt Ähnlichkeiten zu Enterochelin. Die in dieser Arbeit gefundene Verringerung des Serumferritins bei Langzeitbehandlung mit UDC legt eine chelierende Wirkung des UDC mit anschließender Umverteilung und Ausscheidung des Eisenkomplexes aus dem Körper nahe.

5.21 Probleme bei der Interpretation des Serumferritins

Bei dem analytischen Dilemma der Quantifizierung von Eisen in der Leber und der Zuordnung auf hepatozytäre und retikuloendotheliale Kompartimente hat das Verfahren der Bestimmung von Serumferritin neue experimentelle Ansätze ermöglicht. Grundlage der Methode ist der immunologische Nachweis von reaktivem Material („Serumferritin“) mit einem polyklonalen oder monoklonalen Antikörper gegen isoliertes Ferritin aus der menschlichen Leber. Durch Verwendung einer ELISA-Technik ist es möglich, „Serumferritin“ auch in niedrigsten Konzentrationen im Blut zu bestimmen.

Die früheren Untersuchungen haben nahegelegt, dass das Serumferritin mit steigendem Körpereisengehalt ansteigt. Bei einer Eisenüberladung ist dieser Anstieg sehr ausgeprägt. Diese Untersuchungen wurden besonders bei Patienten mit schwerer HH oder bei Entwicklung einer HH durchgeführt. Aber auch bei transfusionsbedingter, sekundärer Eisenüberladung ist das Serumferritin ein häufig bestimmter Parameter zur Abschätzung der

Eisenbelastung des Körpers.

Bei der theoretischen Deutung des beobachteten Zusammenhangs zwischen intrazellulären Eisendepots und zirkulierenden Serumferritin ist man davon ausgegangen, dass jede Zelle Ferritin durch zellulären Umbau, Zelltod oder aktive Transportprozesse in das Blut entlässt. Durch eine Reihe von Folgereaktionen wird schließlich ein „steady state“ erreicht, der die Abschätzung des Körpereisens verlässlicher gestattet. Allerdings findet man schon bei gesunden Normalpersonen eine große Variation der Messwerte des Serumferritins über einen Bereich von 15 ng/ml bis 400 ng/ml Serum. Es wurden zudem geschlechtsspezifische Normalbereiche vorgeschlagen. So wird bei Frauen der obere Grenzwert für Serumferritin mit 150 ng/ml angesetzt, bei Männern wird der obere Normalwert mit 400 ng/ml festgelegt. Wegen Verlusten von Eisen durch Menstruation müssen die Normalwerte für Serumferritin bei Frauen ebenfalls einer Altersnormierung mit einem anzunehmenden Grenzwert von ca. 49 Jahren unterzogen werden. Diesem zusätzlichen Einfluss des Alters und Geschlechts auf die Serumferritinwerte und auf andere Parameter des Eisenmetabolismus und der Leberfunktion wurde in dieser Dissertation besondere Beachtung geschenkt.

Weitere Einschränkungen für die Verwendbarkeit des Serumferritin als Marker für den Eisengehalt im Körper ergeben sich aus der Tatsache, dass Ferritin zu den akuten Phaseproteinen gehört. Dadurch werden die Werte bei Entzündungen oder Infekten verfälscht. Erinnerung muss auch an die Tatsache, dass das Serumferritin bei normaler Stoffwechsellage praktisch kein Eisen enthält. Es müsste daher streng genommen als Serum-Apoferritin bezeichnet werden. Inwieweit sich dieser Umstand auf immunologische Reaktionen auswirkt, ist nicht bekannt. Allerdings ist durch Studien an Patienten mit einer extremen Eisenbelastung mit Thalassemia major bekannt, dass in diesem Fall das Serum nahezu eisengesättigtes Ferritin enthält (109). Ein Teil dieses Ferritineisens wird bei der Ausführung einfacher Analysen des Serumeisens miterfasst und täuscht rechnerisch eine Überschreitung der Bindungsfähigkeit des Serumtransferrins für Eisen vor (109). Fälschlicherweise hat man dieses Eisen als „freies Eisen“ im Blut aufgefasst (13,44).

Intrazelluläres Ferritin unterliegt im Hepatozyten einem ständigen katabolen/anabolen Zyklus. Während dieser Vorgänge ist stets ein niedrigmolekularer, mit DFO chelatierbarer Eisenpool vorhanden, der durch Chelatbildner nachgewiesen werden kann. Dieser katalytisch aktive Eisenpool ist vermutlich für die toxischen Auswirkungen bei der Haber-Weiss-Reaktion und der Fenton-Reaktion bei NASH und Thalassämie major bedeutsam.

5.22 Empfehlungen zur Diagnosesicherung und der Behandlung von NASH aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit gestatten eine rationale Vorgehensweise zur Diagnosestellung und Therapie des NASH-Syndroms:

1. Es sollten wegen einer großen Variationsbreite und offenbar periodischer Veränderungen von Laborparametern in einer therapiefreien Vorperiode mehrere Untersuchungen in wöchentlichen Abständen ausgeführt werden. Die Untersuchungen sollten neben den Leberenzymen die Bestimmung der Hämatokritwerte, des Serumeisens, des Serumferritins und die Durchführung eines OGTT umfassen.

2. Bei Verdacht auf NASH können exploratorisch 3-5 Aderlässe von ca. 200 ml Blut in wöchentlichen Abständen ausgeführt werden. Der Effekt dieser Aderlasstherapie auf die o.g. Laborparameter sollte geprüft werden. Bei einem positiven Ansprechen sollte die Aderlasstherapie solange fortgesetzt werden, bis Hämatokritwerte im niedrigen Normbereich erreicht werden. Der Einfluss der Therapie sollte ggf. durch Vergleich der Histologie vor und nach der Aderlasstherapie dokumentiert werden.

3. Ist eine Aderlasstherapie wegen Kontraindikationen nicht möglich, so kann auch eine Behandlung mit Ursodesoxycholsäure über mehrere Monate erwogen werden. Auch hier sollten die o.g. Leitparameter des Eisen- und Zuckermetabolismus im Verlauf kontrolliert werden.

4. Nach Absetzen der UDC-Therapie ist auf einen möglichen überschießenden Rebound der Werte des Hämatokrits, des Serumeisens und des Serumferritins zu achten. Gelegentliche Aderlässe mit kleinen Volumen können diesem Rebound entgegenwirken.

5. Bei der Einstufung von Schweregraden des NASH-Syndroms sollten alters- und geschlechtsspezifische Normwerte der entsprechenden Gruppen berücksichtigt werden.

5.23 Ausblick auf weitere Entwicklungen

(1) Es spricht theoretisch und pharmakologisch nichts dagegen, das NASH-Syndrom in Simultantherapie mit Aderlässen und UDC zu therapieren. Dieses Vorgehen könnte den Vorteil haben, die günstigen Effekte von UDC in synergistischer Weise mit der

Aderlasstherapie zu nutzen.

(2) Als Nebenbefund dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei einer alkoholbedingten Schädigung der Leber eine Aderlasstherapie einen günstigen Einfluss auf eine Normalisierung pathologisch erhöhter Transaminasen und auf die Serumferritinwerte hat. Auch hier sollte die Behandlung bis zum Erreichen von Hämatokritwerten im unteren Normbereich (NID) konsequent fortgeführt werden.

(3) Bei anderen Lebererkrankungen sollten - unter Berücksichtigung möglicher Kontraindikationen - explorative Aderlässe evaluiert werden. Im Falle positiver Effekte (u.a. auf Leberwerte, Glukosehomöostase und Eisenstoffwechsel) sollte die Therapie ebenfalls bis zum Erreichen von niedrigen Hämatokritwerten fortgesetzt werden. Zur Vermeidung einer überschießenden resorptiven oder erythropoetischen Aktivität ist kleineren Aderlässen im wöchentlichen Abstand der Entnahme größerer Blutvolumina auf monatlicher Basis der Vorzug zu geben.

(4) Körperliche Aktivität mit dem Ziel der Vermeidung oder Reduktion einer Adipositas ist von grundlegender Bedeutung. Nicht zuletzt soll auf andere präventive Maßnahmen wie eine gesunde Diät hingewiesen werden. Die Praxis vieler Patienten, mit Vitaminen und Spurenelementen eine gesundheitliche Verbesserung zu erreichen, könnte kontraproduktiv sein. Diese Präparate enthalten meist Ferroeisen und würden die durch Eisen bedingten Störungen des NASH-Syndrom durch Bildung toxischer Sauerstoffradikale verstärken.

(5) Es wäre erstrebenswert, bei Patienten mit NASH und verwandten Syndromen auch Messungen des löslichen Serumtransferrinrezeptors mit einzubeziehen (50). Dies ist ein empfindliches Verfahren zum Nachweis eines funktionellen Eisenmangels und ergänzt die Bestimmung des nicht immer ausreichend zuverlässigen Serumferritins. Die Transferrinrezeptor-Konzentration ist bei mangelnder Versorgung der Vorläuferzellen der Erythropoese mit Funktionseisen erhöht (63, 96, 107).

(6) Durch diese o.g. einfachen diätetischen, labortechnischen und therapeutischen Maßnahmen könnte die Prävalenz des NASH-Syndroms möglicherweise kosteneffektiv in allen Bevölkerungsgruppen entscheidend gesenkt werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Adler M, Schaffner F (1979) Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J* 67:811-375
- 2) Angulo P (2010) Long-Term Mortality in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Is Liver Histology of Any Prognostic significance? *Hepatology* 51: 373-375
- 3) Anstee QM, Daly AK, Day CP (2011) Genetic modifiers of non-alcoholic fatty liver disease progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1812: 1557-66
- 4) Asanuma T, Ono M, Kubota K et al. (2010) Super Paramagnetic Iron Oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 59: 258-266
- 5) Bacon BR (2008) Genetische, metabolische und infiltrierende Erkrankungen der Leber. *Harrisons Innere Medizin*, 17. Auflage: 2446-2449
- 6) Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander Tetri BA (1994) Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107: 1103-1109
- 7) Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C. Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Bwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K (2006) A Placebo-controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 355: 2297-2307
- 8) Bell CD, Whitney B, Dowling RH (1972) Gallstone dissolution in man using chenodeoxycholic acid. *Lancet* 11: 1213-1216
- 9) Bertelsen M, Anggard EE, Carrier MJ (2001) Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologica* 44: 605-13
- 10) Blendis L, Oren R, Halpern Z, (2000) NASH: Can we Iron out the Pathogenesis? *Gastroenterology* 118: 981-983
- 11) Bonkovsky HL (2002) Iron as a co-morbid factor in chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 97:1-4
- 12) Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, Banner BF (1999) Non-alcoholic Steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31: 421-429
- 13) Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y (2003) Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*. 30: 137-44
- 14) Bonnefont-Rousselot D, Ratzin V, Giral P (2006) Blood oxidative stress makers are unreliable makers of hepatic steatosis. *Aliment pharmacol Ther* 23: 91-98

- 15) Brunst EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR (1999) Nonalcoholic Steatohepatitis: a proposal for Grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474
- 16) Bugianesè E, Marchesini G, Gentilcore E, Cua IHY, Vanni E, Rizzetto M, George J (2006) Fibrosis in Genotype 3 chronic Hepatitis C and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Role of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *Hepatology* 44: 1648-1655
- 17) Buch S, Stickel F, Trepo E, Way M, Herrmann A (2015) A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol related cirrhosis. *Nature America* 47: 1443-1447
- 18) Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespdenheide EE, Parks JK, Parker WD Jr. (1999) Mitochondrial abnormalities in non-alkoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31: 430-434
- 19) Cassman C, Jackson J (2008) NASH may be trash. *Gut* 57: 141-144
- 20) Chávez-Tapia N, Uribe M, Ponciano-Rodriguez G, Medina Santillan R, Mèndez Sánchez N (2009) New insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology* 8:59-517
- 21) Chitturi S (2008) Review: Treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 1: 173-189
- 22) Corradini E, Pietrangelo A (2012) Cell death regulation in ASH and alcoholic pancreatitis. Iron and steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27: Suppl. 2; 42-46
- 23) Cotrim HP, Andrace ZA, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas LA (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers (see comments). *Liver* 19: 299-304
- 24) Danzinger RG, Hofmann AF, Schoenfeld LS et al (1972) Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *N Eng J Med* 289: 1-8
- 25) DeFronzo RA, Ferrannini E (1991) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyolipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14: 173-194
- 26) Dhillon BK, Das R, Garewal G, Chawla Y, Dhiman RK, Das A, Duseja A, Chandale GR (2007) Frequency of Primary iron overload and HFE gene mutations (C282Y, H630 and S65C) in chronic liver disease patients in north India. *World Journal of Gastroenterology* 13: 2956-2959
- 27) Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG (1988) Alkoholic liver disease in nonalkoholics. A clinical and histroic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 95: 1056-1062

- 28) Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE (1979) Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121: 91-100
- 29) Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE (2006) Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: falls in gamma glutamyl transaminase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg* 16:1278-1286
- 30) Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A et al (2008) Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver: *Am J Pathol* 172: 738-747
- 31) Eriksson S, Eriksson KF, Bondesson L (1986) Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand* 220:83-88
- 32) Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S (2008) Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134: 424-431
- 33) Fabbrini E, Sullivan S, Klein S (2010) Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatology* 51:679-689
- 34) Farcchini FS, Hwa NW, Stooks RA (2002) Effect of Iron Depletion in Carbohydrate-Intolerant Patients with Clinical Evidence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 122: 931-939
- 35) Fargion S, Mattioli M, Francenzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G (2001) Hyperferritinemia, Iron Overload, and Multiple Metabolic Alterations Identify Patients at Risk for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Gastroenterology* 96:2448-2455
- 36) Feelders RA, Vrengdenhil G, Eggermont AM et al (1998) Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients. *Eur J Clin Invest* 28: 520-527
- 37) Ferrara F, Ventura P, Vegetti A, Guido M, Abbati G et al (2009) Serum Ferritin as a Predictor of Treatment Outcome in Patients with chronic Hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 104:605-616
- 38) Fernandez-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E et al (1998) Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 21: 62-68
- 39) Fiel MI, Shiano TD, Guido M et al (2000) Increased hepatic iron deposition resulting from treatment of chronic hepatitis C with ribavirin. *Am J Clin Pathol* 113: 35-39

- 40) Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and Obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 39-47
- 41) French SW, Eidus LB, Freeman J (1989) Nonalcoholic fatty hepatitis: an important clinical condition. *Can J Gastroenterol* 3: 189-197
- 42) Friedman M (1937) The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J Am Stat Assoc* 32: 657-701
- 43) Fujita N, Miyachi H, Tanaka H et al (2009) Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18: 424-32.
- 44) Ganz T (2008) Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab* 7: 288-290
- 45) Ganz T (2005) Hepcidin- a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Prac Res Clin Haematol.* 18: 171-82
- 46) Gao B, Bataller R (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*: 141 (5): 1572-85
- 47) Gao W, Connor HD, Lemasters JJ, Mason RP, Thuman RG (1995) Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new antioxidant insensitive free radical species. *Transplantation* 59: 674-679
- 48) Gao Y, Song LX, Jiang MN et al (2008) Effect of traditional chinese medicine on endotoxin and its receptors in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Inflammation* 31: 121-132
- 49) George DK, Goldwurm S, Macdonald GA et al (1998) Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 114: 311-318
- 50) Goswami T, Andrews NC (2006) Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem.* 281: 28494-8
- 51) Hail PD (1994) Pathological spectrum of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl* 2: 303-313
- 52) Harris RB, Kor H (1992) Insulin insensitivity is rapidly reversed in rats by reducing dietary fat from 40 to 30% of energy. *J Nutr* 122: 1811-1822
- 53) Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E et al. (2006) Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem.* 281: 22974-82

- 54) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N et al (1994) Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis c and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 89: 986-988
- 55) Hernaez R, Yeung E, Clark JM et al (2011) Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 55: 1079-1085
- 56) Hoeblinger A, Erdmann C, Strassburg CP, Sauerbruch T, Lammert F (2009) Coinheritance of hereditary spherocytosis and reversibility of cirrhosis in a young female patient with hereditary hemochromatosis. *Eur J Med Res* 14: 182-184
- 57) Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K (2015) Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 62: 751-760
- 58) Hornboll P, Olsen TS (1982) Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 90: 199-205
- 59) Hutchinson C, Geissler C, Powell J, Bomford A (2007) Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemochromatosis. *Gut* 6 :1291-1295
- 60) Itoh S, Yongel T, Kawagoe K (1987) Comparison between nonalcoholic Steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 82: 650-654
- 61) Johnson-Down L, O'Loughlin J, Koski KG, Gray-Donald K (1997) High prevalence of obesity in low income and multiethnic school children: a diet and physical activity assessment. *J Nutr* 127: 2310-2315
- 62) Kadiika MB, Burkitt MJ, Xiang QH et al (1995) Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spintrapping investigations. *J Clin Invest* 96:1653-1657
- 63) Kaji K, Yoshiji H, Kitade M et al (2011) Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300: G 1094-104
- 64) Kaltwasser J, Caspary WF (2001) Hämochromatose (hereditäre Hämachromatose, sekundäre Eisenüberladungssyndrome). *Therapie von Leber- und Gallenkrankheiten* 2. Auflage: 79-90
- 65) Kechagias S, Ernersson A, Cahllquist O, Lundberg P, Lindstrom T, Nystrom FH (2008) Fast-Food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects, *Gut* 57: 649-654

- 66) Kirk F, Reeds DN, Finck BN, Mayurranjan MS, Patterson BW, Kleins (2009) Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology* 136: 1552-1560
- 67) Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi UR, Wagsuter C, Yetukuri L, Makkonen J et al (2007) Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes* 56: 1960-1968
- 68) Kowdley KV (2010) The Role of Iron in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The story continues. *Gastroenterologie*: 1-3
- 69) Kreft B, Tanimoto A, Baba Y, Zhao L, Chen J, Middleton MA, Compton CC, Finn JP, Stark DD (1992) Diagnosis of fatty liver with MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2: 463-471
- 70) Kulaksiz H, Fein E, Redecker P et al (2008) Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron uptake regulatory peptide. *J Endocrinol.* 197: 241-9
- 71) Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J (1996) Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 23: 1464-1467
- 72) Lee RG (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 20: 594-598
- 73) Leon A (2009) Transient Elastography in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Making Sense of Echos. *Hepatology* 51: 1-3
- 74) Leuschner U, Lindenthal B, Herrmann G, Arnold JC, Rössle M, Cordes HJ, Zeuzem S, Hein J, Berg T (2010) High-Dose Ursodeoxycholic Acid Therapy for Nonalcoholic Steatohepatitis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Hepatology* 52: 472-479
- 75) Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ et al (2004) Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 39: 770-778
- 76) Lonardo A (1999) Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. Where do we stand and where are we going? *Dig Dis* 17: 80-89
- 77) Ludwig J, McGill DB, Lindor KD (1997) Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 12: 398-403
- 78) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980) Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-438

- 79) Marchesini G, Bugianeri E, Forlani G et al (2003) Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37:917-923
- 80) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Lin YC, McCullough AJ (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116: 1413-1419
- 81) McNear S, Harrison SA (2009) Review current status of therapy in nonalcoholic fatty liver disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2: 29-43
- 82) Mehta K, Van Thiel DH, Shah N et al (2002) Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 60: 289-293
- 83) Mendler MH, Bouillet P, Le Sidaner A, Lavoine E, Labrousse F, Santereau D, Pillegand B (1998) Dual-energy CT in the diagnosis and qualification of fatty liver: limited clinical value in comparison to ultrasound scan and single-energy CT, with special reference to iron overload. *J Hepatol* 28: 785-794
- 84) Menzol J (2009) Die Fettleber – Ein harmloses Phänomen? *Der niedergelassene Arzt* 8:33-36
- 85) Mingrone G, DeGaetano A, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Castagneto M, Gasbarrini G (1997) Reversibility of insulin resistance in obese diabetic patients: role of plasma lipids. *Diabetologia* 40: 599-605
- 86) Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S (2009) Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity* 17: 1872-1877
- 87) Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL (1983) Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 78: 374-377
- 88) Müller MJ (1995) Hepatic fuel selection. *Proc Nutr Soc* 54: 139-150
- 89) Musso G, Gambino R, Cassader M (2009) Recent insights into hepatic lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 18: 1-26
- 90) MW (2010) Das Leberfett ist ein guter Prädiktor für die metabolische Gefahr. *Kolloquium* 1: 12
- 91) Nalpas B, Vassault A, Charpin S, Lacour B, Berthelot P (1984) Serum mitochondrial aspartate aminotransferase: a sensitive maker of alcoholism with or without alcoholic hepatitis. *Hepatology* 4: 893-896
- 92) Nash S, Marconi S, Sikorska K, Nasem R, Nash G (2002) Role of Liver Biopsy in the Diagnosis of Hepatic Iron Overload in the Era of Genetic Testing. *Am J Clin Pathol* 118: 73-81

- 93) Nasrallan SM, Wills CE, Galambos JT (1981) Hepatic morphology in obesity. *Dig Dis Sci* 26: 325-327
- 94) Nelson JE, Klintworth H, Kowdley KV (2012) Iron metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 14: 8-16
- 95) Nelson JE, Wilson L, Brunt EM et al. (2011) Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 53: 448-457
- 96) Nemeth E. (2008) Iron regulation and erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 15: 169-75
- 97) Niskanen L, Kusitupa M, Sarlund H, Siitonen O, Paljarvi L, Laakso M (1996) The effects of weight loss on insulin sensitivity, skeletal muscle composition and capillary density in obese non-diabetic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 154-160
- 98) Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Tani S, Goto M (1988) Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jap J Med* 27: 142-149
- 99) Nonomura A, Mizukami Y, Unoura M, Kobayashi K, Takeda Y, Takeda R (1992) Clinicopathologic study of alcohol-like liver disease in non-alcoholics: non alcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Gastroenterol Jpn* 27: 521-528
- 100) Nomura F, Ohnishi K, Koen H, Hiyama Y, Nakayama T, Itoh Y, Shirai K, Saitoh Y, Okuda K (1986) Serum cholinesterase in patients with fatty liver. *J Clin Gastroenterol* 8: 599-602
- 101) Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW (1997) Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 46: 1768-1774
- 102) Otogawa K, Kinoshita K, Fujii H et al (2007) Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathology* 170: 967-980
- 103) Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NW, Ozdelen E et al (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action and type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461
- 104) Park HS, Kim MW, Shin ES (1995) Es effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver. *J Korean Med Sci* 10: 414-421
- 105) Paumgartner G, Beuers U (2002) Ursodeoxycholic Acid in Cholestatic Liver Disease: Mechanisms of Action and Therapeutic Use Revisited. *Hepatology* 36: 525-531

- 106) Perez-Carreras M, Del Moyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Catellano G et al (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38: 999-1007
- 107) Pietrangelo A (2011) Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J. Hepatol* 54: 173-81
- 108) Pietrangelo A (1998) Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis *J Hepatol* 28: 8-13
- 109) Pootrakul P, Huebers HA, Finch CA (1988) Iron metabolism in thalassemia. *Proceedings of the International meeting on thalassemia. Birth defects* 23: 3-8
- 110) Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW (1990) The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 11: 74-80
- 111) Prett DS, Knox TA, Erban J (1995) Tamoxifen-induced steatohepatitis. *Ann Intern Med* 123: 236
- 112) Rashid M, Roberts EA (2000) Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 48-53
- 113) Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM (1999) Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 29: 1131-1138
- 114) Ratzin V, Charlotte F, Heurtier A, Gomberrs, Giral P, Bruckert E et al (2005) Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 128: 1898-1906
- 115) Riva A, Trombini P, Mariani R, Salvioni A, Coletti S, Bonfadini S, Paolini V, Pozzi M, Facchetti R, Bovo G, Piperno A (2008) Reevaluation of clinical and histological criteria for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J. Gastroenterol* 14: 4745-4752
- 116) Saadeh S, Younossi ZM (2000) The spectrum of nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. *Cleve Clin J Med* 67: 96-97, 101-104
- 117) Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilzs, Betroy D et al (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279: 32345-32353
- 118) Sanson-Fisher R (1986) The measurement of alcohol consumption and alcohol-related problems. *Aust Drug Alcohol Rev* 5: 309-310
- 119) Sanyal AJ (2002) AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty liver Disease. *Gastroenterology* 123: 1705-1725

- 120) Sanyal AL, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al (2001) Nonalcoholic steatohepatitis association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183-1192
- 121) Shenk S, Saberi M, Olefsky JM (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118: 2992-3002
- 122) Shiffman ML, Kaplan GD, Brinkman-Kaplan V, Vickers FF (1995) Prophylaxis against gallstone formation with ursodeoxycholic acid in patients participating in a very-low-calorie diet program. *Ann Intern Med* 122: 899-905
- 123) Simon T, Chung R (2015) The (il)logic of iron reduction therapy for steatohepatitis. *Hepatology* 62: 668-670
- 124) Sonsuz A, Basaronoglu M, Ozbay G (2000) Relationship between aminotransferase levels and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis (letter). *Am J Gastroenterol* 95: 1370-1371
- 125) Sorbi D, Boyton J, Lindor KD (1999) The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 94: 1018-1022
- 126) Sorbi D, McGill, Thistle JL, Thermean TM, Henry J, Lindor KD (2000) An assessment of the role of liver biopsies in asymptomatic patients the chronic liver test abnormalities. *Am J Gastroenterol* 95: 3206-3210
- 127) Stiehl A, Raedsch R, Czygan P, Götz R, Männer CH, Walker S, Kommerell B (1980) Effects of Biliary Bile Acid composition on Biliary Cholesterol Saturation in Gallstone Patients Treated with Chenodoxycholic Acid and/or Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 79: 1192-1198
- 128) Storey E, Anderson GJ, Mack U, Powell LJ, Halliday JW (1987) Desialylated transferrin as a serologic maker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet* 1: 1292-1294
- 129) Sumida Y, Kanemasa K, Fukumoto K et al (2006) Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Hepatol Res* 36: 315-321
- 130) Tajiri K, Takenawa H, Yamaoka K, Yamane M, Marumo F, Sato C (1997) Nonalcoholic steatohepatitis masquerading as autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 25: 538-540
- 131) Talwalkar JA (2009) One Step at a Time: Identification and Validation of Biomarkers for NASH. *Hepatology* 50: 1000-1003
- 132) Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP (1996) The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 22: 1714-1719

- 133) Thomas EL, Brynes AE, Hamilton G, Patel N, Spong A, Goldin RD, Frost G, Bell JD, Taylor-Robinson SD (2006) Effect of nutritional counseling on hepatic, muscle and adipose tissue fat content and distribution in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 12: 5813-5819
- 134) Torti FM, Torti SV (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99: 3505-3516
- 135) Torres DM, Harrison SA (2008) Diagnosis and Therapy of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 134: 1682-1698
- 136) Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K (1997) Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 27: 103-107
- 137) Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviario G, Marchesini G, Fargion S (2010) HFE genotype, parenchymal iron accumulation and liver fibrosis in parents with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 138: 905-912
- 138) Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, Fargion S (2007) Iron Depletion by Phlebotomy Improves Insulin Resistance in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hyperferritinemia: Evidence from a Case-Control Study. *AM J Gastroenterol* 102: 1251-1258
- 139) Valenti L, Fracanzani AL, Fargion S (2003) Effect of Iron Depletion in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease without Carbohydrate Intolerance. *Gastroenterology* 124: 866
- 140) Van Ness MM, Diehl AM (1989) Is liver biopsy useful in the evaluation of parents with chronically elevated liver enzymes? *Ann Intern Med* 111: 473-478
- 141) Vecci C, Montosi G, Zhang K et al. (2009) ER Stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325: 877-80
- 142) Vega GI, Chandalia M, Szczepaniak LS, Grundy SM (2007) Metabolic correlates of nonalcoholic fatty liver in woman and man. *Hepatology* 46: 716-722
- 143) Wang RT, Koretz RL, Yee HF (2003) Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver disease? A systematic review. *Am J Med* 115: 554-559
- 144) Watt MJ (2009) Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 5-11
- 145) Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM et al (2006) In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 44: 27-33

- 146) Wilcoxon F, Wilcox RA (1964) Some rapid approximate statistical procedures. Pearl River, New York: Lederle Laboratories
- 147) Wood MJ, Skoien R, Powell LW (2009) The global burden of iron overload. *Hepatol Int* 3: 434-444
- 148) Yajima Y, Okta K, Narui T, Abe R, Suzuki H, Oktsuki M (1983) Ultrasonographical diagnosis of fatty liver: significance of the liver-kidney contrast. *Tokoku J Exp Med* 139: 43-50
- 149) Yilmaz Y, Dolar F, Ulakaya E et al (2007) Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 13: 837-844
- 150) Yoneda M, Nozaki Y, Endo H, Mawatari H, Iida H, Fujita K, Yoneda K, Takahashi H, Kikikoshi H, Inamori M, Kobayashi K, Kubota K, Saito S, Maeyama S, Hotta K, Nakajima A (2009) Serum Ferritin Is a Clinical Biomarker in Japanese Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Independent of HFE Gene Mutation. *Dig Dis Sci* 55: 808-814
- 151) Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, Matteonè CA, Boparai N, O'Neill R, McCullough AJ (1999) Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 30: 847-850
- 152) Zelman S (1958) The liver in obesity. *Arch Intern Med* 90: 141-156

7. Publikation von Teilergebnissen dieser Arbeit

Teilergebnisse der experimentellen Untersuchungen (UDC- und Aderlasstherapie beim NASH-Syndrom) und die zahlreichen Beobachtungen an NASH-Patienten der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikum des Saarlandes sind in die folgende Publikation der Studie eingegangen: Leuschner U, Lindenthal B, Herrmann G, Arnold JC, Rössle M, Cordes HJ, Zeuzem S, Hein J, Berg T. High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 2010; 52: 472-479

8. Danksagung

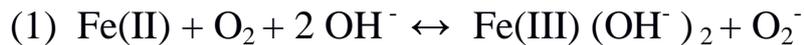
Diese Arbeit enthält Ergebnisse, die in einem Zeitraum von mehr als fünf Jahren gewonnen wurden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Zeuzem, der mich für eine Studie über eine mögliche therapeutische Bedeutung der Ursodesoxycholsäure (UDC) bei der Behandlung des NASH-Syndroms rekrutiert hat. Gleichfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Frank Lammert für seine Bereitschaft zur Fortsetzung und weiteren Betreuung dieser Forschungsarbeit. Ihm verdanke ich auch den Zugang zu den umfangreichen Daten eines großen NASH-Patientenkollektivs am Universitätsklinikum des Saarlandes. Die erweiterte Themenstellung für diese Dissertation resultiert aus Anregungen und Diskussionen mit Herrn PD Dr. Vincent Zimmer. Auch den Mitarbeitern des Rechenzentrums und Dr. G. Mitov gebührt Dank und Anerkennung.

9. Anhang

Zur Haber-Weiss-Reaktion:

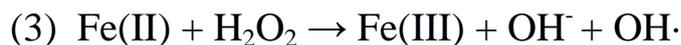
Voraussetzung für die Haber-Weiss Reaktion ist die Bildung von Superoxid in einem leicht alkalischen Zellmilieu, das in den Zellen des Körper vorherrscht. Ein Reaktionskette wird durch Reaktion (1) gestartet:



Danach werden in der **Haber-Weiss-Reaktion** Hydroxylradikale gebildet:



Auch bei der **Fenton-Reaktion** kommt es in ähnlicher Weise zur Bildung von Hydroxylradikalen:



Das Hydroxylradikal (oder vielleicht auch ein Folgeprodukt wie das Ferryl-Eisen-Ion, Fe 0) ist für die Membran-und Zellschädigungen verantwortlich zu machen. Bei Vorliegen einer Eisenbeladung der Leberzellen wird die Produktion von Hydroxylradikalen katalytisch (Haber-Weiss-Reaktion), aber auch durch Stoffänderungen in der Fenton-Reaktion, stark gesteigert. Mitunter kann man diese Steigerung durch Messung der ROS auch verfolgen. Dies ist aber wegen der extrem kurzen Halbwertszeit der Radikale nur mit starken Einschränkungen möglich. Zur Vertiefung biochemischer Fakten diesbezüglich zu empfehlende Literatur:

Dunford HB, Dolphin D, Raymond KN, Sieker J (1982) The biological chemistry of iron.

D. Reidel Publishing Company, The Netherlands

Finch CA, Huebers HA (1986) Iron Metabolism. Clin. Physiol. Biochem. 4:5-70

Moon J (2011) Iron: the most toxic metal. George Ohsawa Macrobiotic Foundation, California

Lönnerdal B (1990) Iron metabolism in infants, CRC Press, Florida

Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ.

Mayo Clin Proc. 1980 Jul;55(7):434-8