

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

**Diätetische Intervention bei Patienten mit Fettleber  
(NAFLD) und *PNPLA3*-Genvariante p.I148M**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2020**

vorgelegt von: Clara-Sophie Kuttner  
geb. am: 20.10.1991 in Grevenbroich

Tag der Promotion: 03.11.2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Lammert

Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Zusammenfassung.....	7
1.1 Deutsche Zusammenfassung .....	7
1.2 English summary.....	9
1.3 Abkürzungsverzeichnis .....	11
2 Einleitung	
2.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD).....	13
2.2 Diagnostik der NAFLD.....	14
2.3 Endogene und exogene Risikofaktoren für die NAFLD .....	15
2.3.1 Genetische Einflüsse auf die NAFLD .....	15
2.3.2 Diätetische Einflüsse auf die NAFLD.....	17
2.4 Diätetische Einflüsse auf die <i>PNPLA3</i> -assoziierte NAFLD .....	19
3 Methodik und Patienten.....	21
3.1 Methodik.....	21
3.1.1 Fragestellung.....	21
3.1.2 Studiendesign.....	21
3.1.3 Patientenauswahl und Rekrutierung.....	21
3.1.4 Genotypisierung der <i>PNPLA3</i> -Risikovariante .....	22
3.1.5 Studiendauer .....	22
3.1.6 Diätetische Interventionen.....	22
3.2 Patienten .....	24
3.3 Bestimmung klinischer und anthropometrischer Daten .....	25
3.4 Laboranalysen .....	26
3.5 Transiente Elastographie.....	26
3.6 Bioimpedanzanalyse .....	27
3.7 Körperaktivität.....	28

3.8 Parameter des metabolischen Syndroms .....	28
3.9 Alkoholkonsum .....	29
3.10 Datenerhebung und statistische Auswertung.....	29
4 Ergebnisse	
4.1 Probanden-Charakteristika der gesamten Kohorte vor und nach der Omega3-Intervention .....	31
4.2 Charakteristika der Probanden mit den homozygoten Allel-Varianten p.148M und p.148I vor und nach der Omega3-Intervention .....	35
4.2.1 CAP-Messung, Transiente Elastographie und Serumparameter .....	35
4.2.2 Anthropometrische Parameter der Bioimpedanzanalyse .....	39
4.2.3 Systolische und diastolische Blutdruckmesswerte .....	40
4.2.4 Parameter des Glukosestoffwechsels im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests.....	41
4.2.5 Energie- und Nährstoffzufuhr.....	42
5 Diskussion .....	45
5.1 <i>PNPLA3</i> -Variante und deren Einfluss auf den Leberfettgehalt .....	45
5.1.2 Einflüsse der Omega3-Supplementation bei <i>PNPLA3</i> -Genotyp p.I148M.....	46
5.2 <i>PNPLA3</i> -Variante und deren Einfluss auf die freien Fettsäuren im Serum .....	48
5.3 Limitationen bei der Studiendurchführung und im Studiendesign.....	49
5.4 Schlussfolgerungen und Empfehlung an Patienten mit <i>PNPLA3</i> p.I148M-Risikoallel..	50
6 Literaturverzeichnis.....	52
7 Publikationen/Dank .....	58
8 Lebenslauf .....	59

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Varianten der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD).....	14
<b>Abbildung 2</b> Darstellung der <i>PNPLA3</i> -Funktion in der Leber und Einfluss der I148M-Variante auf den Progress der NAFLD. ....	17
<b>Abbildung 3</b> Darstellung des Triglycerid-Metabolismus in der Leber.....	19
<b>Abbildung 4</b> Verteilung des BMI (kg/m <sup>2</sup> ) der gesamten Kohorte im Überblick.. ....	34
<b>Abbildung 5</b> Absolute Häufigkeiten der Altersklassen für die Gesamtkohorte .....	34
<b>Abbildung 6</b> Darstellung der CAP-Werte zu den Zeitpunkten T0 und T1 .....	37
<b>Abbildung 7</b> Darstellung der Messwerte für freie Fettsäuren zum Zeitpunkt T0 und T1.....	38

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Prozentualer Anteil gesättigter Fettsäuren am gesamten Energiegehalt der Nahrung .....	23
<b>Tabelle 2</b> Baseline und Follow-up der gesamten Kohorte .....	32
<b>Tabelle 3</b> Messwerte der Transienten Elastographie und Serumparameter der zwei Gruppen .....	36
<b>Tabelle 4</b> Univariate Analyse mit CAP als abhängiger Variable .....	39
<b>Tabelle 5</b> Anthropometrische Parameter der zwei Gruppen <i>PNPLA3</i> p.148I und p.148M vor und nach der Omega3-Supplementation .....	40
<b>Tabelle 6</b> Blutdruckmessungen in den zwei Gruppen <i>PNPLA3</i> p.148I und p.148M vor und nach der Omega3-Supplementation .....	41
<b>Tabelle 7</b> Parameter des oralen Glukosetoleranztests für beide Gruppen .....	42
<b>Tabelle 8</b> Energie- und Nährstoffzufuhr .....	43

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die in den westlichen Ländern am weitesten verbreitete Lebererkrankung. Patienten mit NAFLD haben entweder eine einfache Steatosis der Leber oder eine alkoholische Steatohepatitis. Es besteht das Risiko des Progresses dieses Erkrankungsbildes mit Ausbildung einer Leberfibrose und einer Zirrhose bis hin zum hepatozellulären Karzinom. Es gibt bislang keine effektiven präventiven oder therapeutischen Optionen für diese Erkrankungen. Es liegen verschiedene Risikofaktoren für die Ausbildung einer NAFLD wie genetische, ethnische, umweltbedingte und hormonelle Faktoren, vor. Adipositas stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung und den Progress einer NAFLD dar. Dies erklärt, weshalb Leitlinien eine Lebensstiländerung mit Ernährungsumstellung im Sinne einer mediterranen Diät mit vielen ungesättigten Fettsäuren, Gewichtsreduktion und körperlicher Aktivität anraten.

Genomweite Assoziationsstudien haben die Variante p.I148M des Adiponutrin-Gens (*PNPLA3*), eines Mitglieds der Patatin-ähnlichen Phospholipase-Familie, als Risikofaktor für nicht-alkoholische und alkoholische Lebererkrankungen identifiziert. Es besteht eine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und erhöhten Transaminasewerten sowie einem höheren Risiko für Fettlebererkrankungen. Das *PNPLA3*-Gen kodiert für ein Enzym, das in der Leber exprimiert wird und den Lipidstoffwechsel reguliert. Dieses Enzym hat eine intrazelluläre Lipaseaktivität, die vor allem ungesättigte Fettsäuren abbaut. Die Isoleucin-zu-Methionin-Mutation an Position 148 dieses Gens bedingt einen Funktionsverlust des Enzyms. Ziel dieser Interventionsstudie ist es herauszufinden, ob sich eine über vier Wochen durchgeführte mediterrane Diät, die natürlicherweise reich an ungesättigten Fettsäuren ist, bei den Probanden mit der Variante im Adiponutrin-Gen schädlich auswirkt, insbesondere im Hinblick auf die Leberverfettung und die Leberfibrose. Dazu wurden die Lebersteifigkeit und der Leberfettgehalt nicht-invasiv mittels Transienter Elastographie und mittels Controlled Attenuation Parameter bestimmt. Weiterhin wurden verschiedene Leberparameter und Parameter des Glukosestoffwechsels in einer Kohorte, die 20 Studienteilnehmer umfasste, gemessen und ausgewertet. Dabei waren zehn Patienten homozygote Träger des p.148M Allels und weitere zehn Patienten homozygote Träger des p.148I Allels des *PNPLA3*-Gens. Die Patienten aus den beiden Gruppen stimmten in zuvor festgelegten Kriterien überein, um die Ergebnisse der verschiedenen Allelträger am Ende als Match-Partner vergleichen zu können. In dieser Interventionsstudie konnten weder bei den Patienten mit der Adiponutrin-Variante p.I148M noch bei der Wildtyp-Variante des *PNPLA3*-Gens signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Die Leberwerte blieben vor und nach der Intervention annähernd unverändert. Die Risikogruppe wies vor der Omega-3 Supplementation signifikant niedrigere Werte ( $P < 0,05$ ) für die freien Fettsäuren (334.5 (281.0–431.0) vs. 564.5 (509.0–682.0)

µmol/l) mit einem postinterventionellen Anstieg von 9.1% auf. Im Gegensatz hierzu kam es bei der Wildtyp-Gruppe nach der Intervention zu einer signifikanten Reduktion (P=0.01) von 28.3% der freien Fettsäuren im Serum.

Die Risikovariante des *PNPLA3*-Gens geht mit einem verminderten intrahepatischen Lipidumbau und letztendlich einer intrahepatischen Lipidakkumulation einher. Der gestörte Lipidumbau ist das Ergebnis einer reduzierten Fettsäuremobilisation mit postinterventionell steigenden Konzentrationen der freien Fettsäuren nach zusätzlicher oraler Fettsäure-Supplementation. Die Abnahme der Konzentration der freien Fettsäuren im Serum bei der Kontrollgruppe spiegelt den möglichen gesundheitlichen Nutzen der Omega-3 Fettsäuren-Supplementation wider. Im Gegensatz dazu konnte bei der Risikogruppe des *PNPLA3*-Gens ein potenziell schädlicher Effekt durch die Omega-3 Supplementation beobachtet werden. Ein möglicher Grund dafür, dass der Anstieg der Konzentrationen der freien Fettsäuren im Serum in der Risikogruppe kein signifikantes Ergebnis zeigte, kann der kleine Stichprobenumfang und die kurze Dauer der Supplementation sein.

## 1.2 English summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in Western countries. Patients with NAFLD present simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis, which can progress to liver fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular cancer. There are currently no effective prevention or therapeutic options for the above mentioned conditions. Different factors influence the development of NAFLD, i.e. genetic, ethnic, and environmental factors. Overweight and obesity are important risk factors for the development and progression of NAFLD. Consequently, guidelines advise changes in lifestyle, including a Mediterranean-style diet rich in unsaturated fatty acids, physical activity, and weight loss.

Genome-wide association studies report the polymorphism p.I148M of the adiponutrin gene (*PNPLA3*) as important risk factor for non-alcoholic and alcoholic liver diseases. There is an association between this polymorphism and an increase of aminotransferase activities as well as the progression of liver diseases. The *PNPLA3* gene encodes an enzyme that regulates lipid metabolism in liver and fat tissue. The enzyme has intracellular lipase activity to degrade unsaturated fatty acids. The mutation isoleucin-to-methionine at position 148 causes loss-of-function, hence the degradation of fatty acids is deranged. The aim of the study was to investigate whether omega-3 unsaturated fatty acids (typically found in the Mediterranean diet) could possibly have a detrimental effect on patients who carry this polymorphism.

To investigate this hypothesis, we supplemented twenty patients (ten with wildtype alleles matched to ten patients who were homozygous for the *PNPLA3* variant) with omega-3 fatty acids (4 g per day) for four weeks. Before and after the intervention, we measured hepatic fat content and liver stiffness using transient elastography as well as anthropometric parameters, serum surrogate markers of liver function and glucose metabolism, and dietary intake was documented via a daily food diary.

In this intervention study we could not find a significant increase of liver fat content in patients with the adiponutrin variant p.I148M in comparison to wild type allele carriers. Serum liver enzyme activities remained unchanged in both groups. The risk group displayed significantly ( $P < 0,05$ ) lower baseline free fatty acid concentrations (335 (281–431) vs. 565 (509–682)  $\mu\text{mol/l}$ ), which markedly increased by 9.1% post intervention. In contrast, free fatty acid concentrations decreased significantly ( $P = 0,01$ ) by 28.3% in the wild-type group.

The *PNPLA3* variant p.148M is related to reduced intrahepatic lipid remodeling and lipid accumulation by different pathobiochemical processes. The disturbed intrahepatic

remodeling is the result of reduced fatty acid mobilisation with higher concentrations of free fatty acids after an oral fatty acid challenge. The significant reduction in serum FFA concentrations observed in the control group reflects the widely reported health benefits of omega-3 fatty acids. In contrast, the potentially deleterious rigid response as observed in our risk group, might reflect the aforementioned *PNPLA3*-dependent mechanisms in these patients. The fact that the difference after the dietary challenge was non-significant might be attributed to sample size and supplementation period.

### 1.3 Abkürzungsverzeichnis

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUDIT	The Alcohol Use Disorders Identification Test
BD	Blutdruck
BIA	Bioimpedanzanalyse
BMI	Body-Mass-Index
CAGE	( <b>C</b> utting down drinking, <b>A</b> nnoying, <b>G</b> uilty, <b>E</b> ye opener)
CAP	Controlled Attenuation Parameter
CPG	Clinical Practice Guidelines
DHA	Docosahexaensäure
EASL	European Association for the Study of Liver
EPA	Eicosapentaensäure
ESPEN	European Society for Parenteral and Enteral Nutrition
FFA	Free Fatty Acids / Freie Fettsäuren
FFM	Freie Fettmasse
FM	Fettmasse
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
HDL-C	High-density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment-Index
JAK/STAT	Januskinase / Signal Transducers and Activators of Transcription
LDL-C	Low-density Lipoprotein
LSM	Liver Stiffness Measurement
MUFA	Mono-unsaturated fatty acid / Einfach ungesättigte Fettsäuren
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease / Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NAFLD-HCC	Non-alcoholic fatty liver disease – hepatocellular carcinoma

NASH	Non-alcoholic steatohepatitis / Nicht-alkoholische Steatohepatitis
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PASH	<i>PNPLA3</i> -associated Steatohepatitis
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PSC	Primärsklerosierende Cholangitis
PUFA	Poly-unsaturated fatty acids / mehrfach ungesättigte Fettsäuren
n-3 PUFA	Omega-3 polyunsaturated fatty acids
n-6 PUFA	Omega-6 polyunsaturated fatty acids
RCT	Randomized controlled trial
SSM	Skelettmuskelmasse
TE	Transiente Elastographie
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
WHO	World Health Organization
WHR/WC	Waist-to-hip ratio / waist circumference

## 2 Einleitung

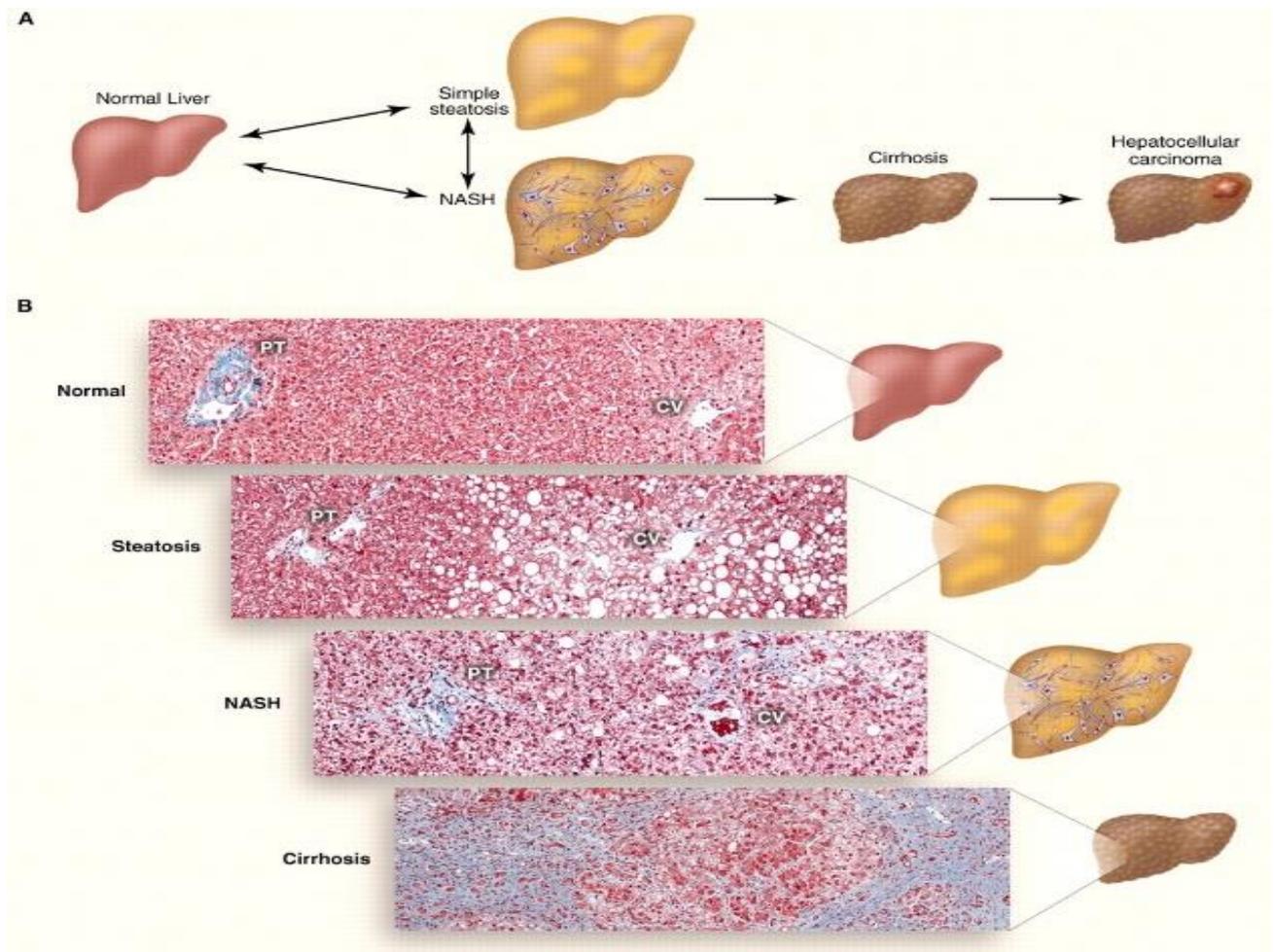
### 2.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) definiert die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) als den entweder bildgebenden oder histologischen Nachweis von Fett in der Leber, das nicht durch sekundäre Genese wie beispielsweise Alkoholkonsum oder die Einnahme von prosteatogenen Medikamenten beeinflusst wurde [11]. Die NAFLD ist mit Adipositas, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen, arterieller Hypertonie und Dyslipidämie assoziiert [22]. Als histologisches Kennzeichen für die NAFLD gilt die Einlagerung von grobtropfigen Fetten in mehr als 5% des Lebergewebes. Während die NAFLD die einfache hepatische Steatose der Leber darstellt, ist die Steatohepatitis (NASH) die fortgeschrittene Form der NAFLD, die neben der Steatose auch durch Inflammation mit Schädigung der Hepatozyten in Form von Ballonierung gekennzeichnet ist.

In Metaanalysen wurden Daten erfasst, um Werte für eine globale Prävalenz der NAFLD zu ermitteln. Für die mit bildgebenden Verfahren (Transiente Elastographie, Fibroscan, Magnetresonanztomographie) diagnostizierte NAFLD zeigte sich eine globale Prävalenz von 25% (95% Konfidenzintervall 13-58%). Die höchste Prävalenz lag im Mittleren Osten und Südamerika vor, die niedrigsten Werte in Afrika [11].

Es besteht bei jeder NAFLD das Risiko eines Krankheitsprogresses mit Übergang in die schwerere Form einer Steatohepatitis. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit NAFLD, bei denen eine Leberbiopsie durchgeführt wurde, zeigte sich das Bild einer NASH. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass 20-30% dieser Patienten mit NASH innerhalb von zehn Jahren einen Krankheitsprogress mit Entwicklung einer Leberfibrose aufwiesen [13]. Patienten mit NAFLD können einen Progress zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom entwickeln.

Pinero und Kollegen [44] haben in einer longitudinalen Kohortenstudie über einen Zeitraum von sieben Jahren insgesamt 708 Patienten und deren fortschreitenden Verlauf der NAFLD beobachtet. Dabei wurde eine wachsende Inzidenz des „NAFLD-HCC“ festgestellt. Dies spiegelt die Schwere und die Relevanz des Krankheitsbildes wieder. Die European Association for the Study of Liver (EASL) sagt vorher, dass dieses Krankheitsbild der Hauptgrund für Lebertransplantationen in Europa werden wird [6].



**Abbildung 1**  
 Varianten der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung ((NAFLD) (aus [13])).

## 2.2 Diagnostik der NAFLD

Die Leberbiopsie ist der Goldstandard zur sicheren Diagnostik einer Steatose, Steatohepatitis und Leberfibrose [46]. Allerdings ist sie ein invasives diagnostisches Verfahren, das mit Aufwand, Kosten und Komplikationen verbunden ist. Dagegen gibt es nun mehrere nicht-invasive Verfahren zur Bestimmung der Fibrosierung und Verfettung der Leber, darunter die Bildgebung durch Computertomographie und Magnetresonanztomographie sowie ultraschallbasierte Techniken. Mithilfe der Transienten Elastographie und des Controlled Attenuation Parameters (CAP) (FibroScan® Echosens, Paris) können die Leberfibrosierung und die Verfettung der Leber beurteilt werden. In Studien wurde berichtet, dass diese Methode sehr gut mit Ergebnissen von Leberbiopsien korreliert [48]. Die Vorteile dieser Methode sind das nicht-invasive und schmerzlose Verfahren ohne gesundheitliche Risiken, die kurzen Untersuchungszeiten und die leichte Handhabung. Die Diagnostik einer Leberfibrose mittels Transienter Elastographie wurde

bereits erfolgreich bei Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien durchgeführt [40], insbesondere auch bei Patientin mit NAFLD [38][63][68].

Die Transiente Elastographie zur Bestimmung der Fibrosierung der Leber mittels Fibroscan-Gerät wurde um die Funktion der Messung des CAP erweitert [49]. Mittels transientscher Elastographie wird die Scherwellen-Geschwindigkeit gemessen. Über den Schallkopf werden Scherwellen als mechanische Impulse ausgestrahlt, und die daraus entstehenden Ultraschallsignale werden durch die Messsonde des Gerätes erkannt, und die Dispersion der Scherwellen wird ermittelt. Höhere Messwerte für den CAP spiegeln einen höheren Fettgehalt wieder. Der CAP-Wert wird in Dezibel pro Meter angegeben und kann Werte zwischen 100 und 400 dB/m erreichen. Die Lebersteifigkeit (LSM) wird in kiloPascal (kPa) gemessen und reicht von 2.5 – 75 kPa. Das Verfahren der CAP-Messung wurde bereits in verschiedenen Studien angewendet [65] [50] [36].

## **2.3 Endogene und exogene Risikofaktoren für die NAFLD**

### **2.3.1 Genetische Einflüsse auf die NAFLD**

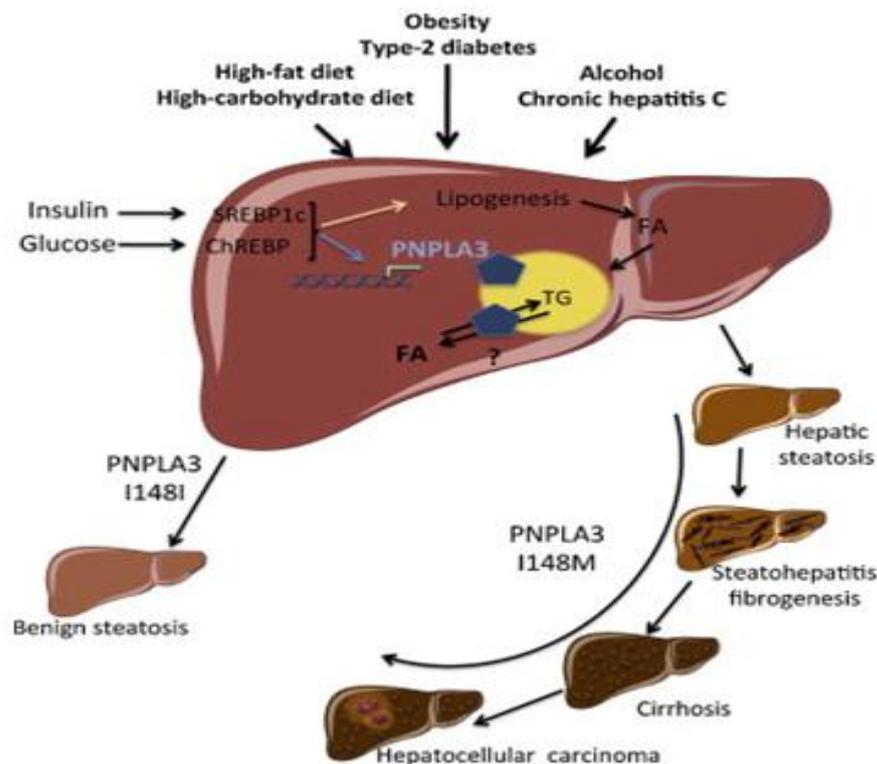
In den letzten Jahren wurde im Rahmen einer Untersuchung einer genomweiten Assoziationsstudie beobachtet, dass es zu einem gehäuften familiären Auftreten der NAFLD kommt. Dabei sind auch Patienten betroffen, die keine weiteren Risikofaktoren wie regelmäßigen Alkoholkonsum, viral bedingte Hepatitis und Zeichen des metabolischen Syndroms aufweisen [46]. Hier wurde zuerst von Romeo und Kollegen [47] entdeckt, dass es genetische Varianten gibt, die die Ausbildung einer Fettleber begünstigen. Darunter ist die p.I148M-Variante des *PNPLA3*-Gens (Patatin-like phospholipase domain containing protein 3), ein vorwiegend in der Leber exprimiertes Enzym, das die wichtigste genetische Variante mit dem größten Einfluss auf die Ausbildung einer NAFLD darstellt. Die Variante des Allels des *PNPLA3*-Gens (rs738409), bei der ein Polymorphismus zum C-zu-G Austausch der Basen und damit zu einer Umkodierung der Aminosäuren von Isoleucin zu Methionin im Codon 148 (p.I148M) führt, ist mit einer signifikanten Verfettung und Schädigung der Leber assoziiert. Bei Trägern des *PNPLA3* p.I148M liegt häufiger eine Fibrosierung der Leber vor, und das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose ist erhöht [31]. Homozygote Träger dieser Genvariante haben im Vergleich zu Trägern des Wildtyp-Allels ein dreifach erhöhtes Risiko, an einer NAFLD zu erkranken [58].

Das durch *PNPLA3* kodierte Enzym hydrolysiert Triglyzeride. In vitro Studien haben gezeigt,

dass bei Vorliegen der Variante p.I148M ein Funktionsverlust des Enzyms in Bezug auf die Hydrolyse der Triglyzeride vorliegt [25]. Diese spezifische Mutation im *PNPLA3*-Gen vermindert die Aktivität der Lipase und somit ungesättigte Fettsäuren abzubauen. Durch verschiedene Studien konnte eine Assoziation der Variante p.I148M im *PNPLA3*-Gen und der Ausbildung einer NAFLD bestätigt werden [29]. Chinchilla-López und Kollegen [12] testeten die Assoziation zwischen dem *PNPLA3*-Gen und NAFLD bei mexikanischen Patienten. Dabei ergaben sich hoch signifikante Ergebnisse. In einer weiteren Studie von Trunecka und Kollegen [57] konnte sogar gezeigt werden, dass Lebertransplantatempfänger, bei denen die gespendete Leber die p.I148M *PNPLA3*-Variante aufweist, nach der Transplantation ein höheres Risiko haben, eine hepatische Steatose zu entwickeln. Dabei wurde bei 176 Transplantatempfängern über einen Zeitraum von vier Jahren der Fettgehalt durch Leberbiopsien bestimmt.

Bei anderen Genvarianten wie zum Beispiel Polymorphismen von „Transmembrane 6 superfamily member 2“ (*TM6SF2*), „Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7“ (*MBOAT7*) und dem Glukokinase Regulatorprotein (*GCKR*) konnten auch Effekte im Hinblick auf die Ausbildung einer NAFLD beobachtet werden, allerdings haben diese einen geringeren Einfluss [18].

Interessant ist dabei, dass die genetischen Effekte unabhängig von umweltbedingten prosteatogenen Faktoren wie der Ernährung oder der körperlichen Inaktivität zu betrachten sind. Dies würde die Aussage, dass die Steatose der Leber die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms darstellt, widerlegen, vor allem bei Patienten mit vorliegender genetischer Prädisposition. Es wird geschätzt, dass 50% der Patienten mit einer NAFLD Träger einer Variante des *PNPLA3*-Gens sind [67]. Lammert und seine Kollegen [29] definieren daher den Begriff „*PNPLA3*-associated Steatohepatitis“ (PASH), um diese Gruppe mit hohem Risiko zu beschreiben.



**Abbildung 2**

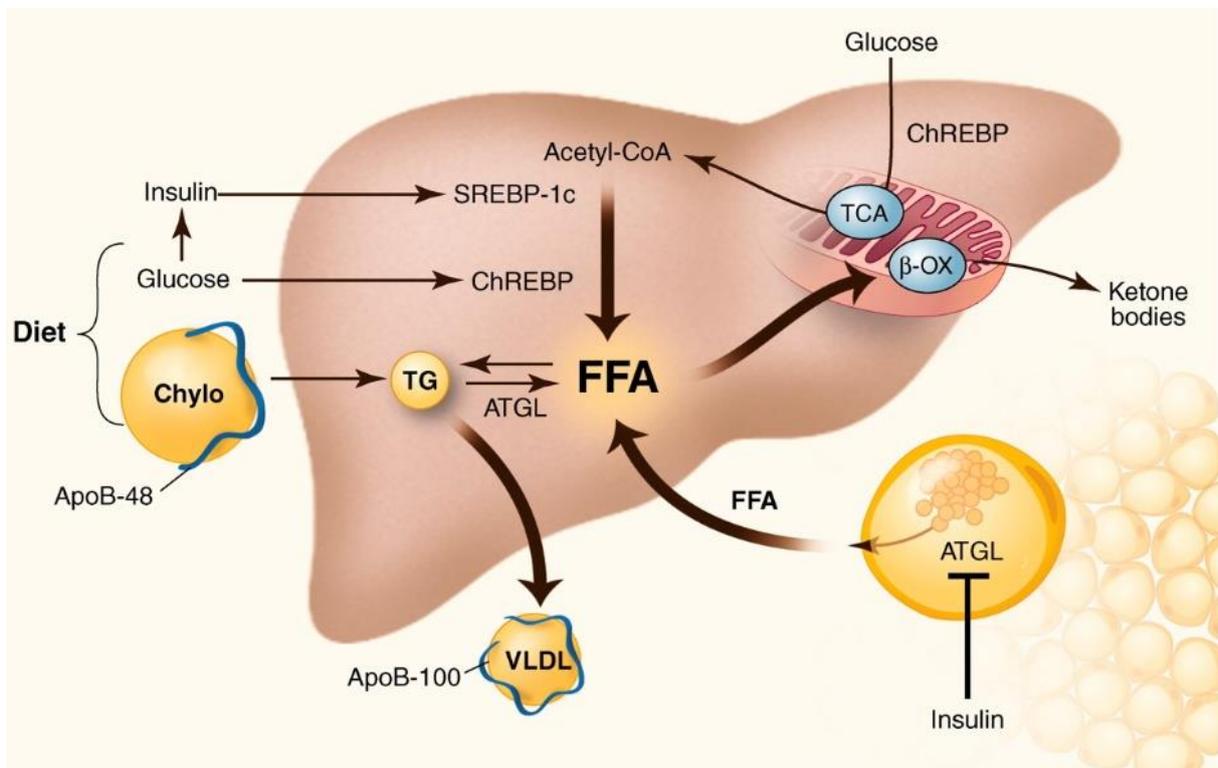
Darstellung der PNPLA3-Funktion in der Leber und Einfluss der p.I148M-Variante auf den Progress der NAFLD über NASH bis hin zu Fibrose und Zirrhose (aus [16]).

### 2.3.2 Diätetische Einflüsse auf die NAFLD

Es gibt bisher keinen pharmakotherapeutischen Ansatz zur Therapie der NAFLD. Daher empfehlen die Leitlinien eine kalorienarme Diät, vermehrte körperliche Betätigung und eine Gewichtsreduktion [19][10]. Bei NAFLD wird zunehmend eine mediterrane Diät, die natürlicherweise reich an ungesättigten Fettsäuren ist und damit Olivenöl, Fisch, Vollkorn, Früchte, Gemüse und Nüsse beinhaltet, vorgeschlagen [71]. In einer Querschnittsstudie konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der Patienten mit NAFLD deutlich mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren durch die Ernährung zu sich nahm [1]. Bei Patienten mit NAFLD wurde insbesondere über eine geringere Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (bei insgesamt geringerem Fischkonsum) berichtet [70]. Zivkovic und seine Kollegen [73] haben retrospektiv im Rahmen von 13 unterschiedlichen Diäten bei Patienten mit NAFLD verschiedene Parameter wie Gewicht, Taillenumfang, Insulinsensitivität, Lipidprofil und Steatose untersucht. Dabei war auffällig, dass nur die mediterrane Diät, die reich an einfach ungesättigten Fettsäuren ist, zu einer Abnahme des Leberfettes geführt hat. Eine achtwöchige Interventionsstudie, bei der eine Diät reich an einfach ungesättigten Fettsäuren in einer Gruppe von Patienten mit Diabetes Typ 2 untersucht wurde, zeigte eine signifikante Reduktion des Leberfettes [9].

Die Effekte mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA) wurden bei NAFLD ebenfalls untersucht. In verschiedenen Studien wurden eine insgesamt niedrigere PUFA-Einnahme (mit insgesamt niedrigerem Fischkonsum) sowie ein höheres Omega-6 zu Omega-3 Verhältnis dokumentiert [14]. In einer Metaanalyse, die den Effekt von einer mit ungesättigten Omega-3-Fettsäuren angereicherten Diät bei Patienten mit NAFLD untersuchte, konnten niedrigere Serumaktivitäten der ALT, die Abnahme von Triglyzeriden und LDL-Cholesterin im Serum sowie die Zunahme von HDL-Cholesterin festgestellt werden [69]. In einer weiteren randomisierten kontrollierten Studie (RCT) erhielten Patienten mit NAFLD und assoziierter Hyperlipidämie n-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Diese Diät führte zur Verbesserung von ALT und Lipiden im Serum. Außerdem zeigte sich sonographisch eine Abnahme der Verfettung der Leber [72]. Eine Interventionsstudie, bei der 108 adipöse Kinder mit diagnostizierter NAFLD und erhöhten Transaminasen in zwei Gruppen eingeteilt wurden, bei der eine Gruppe über 12 Monate täglich 1000 mg Omega-3 erhielt und alle eine Lebensstiländerung im Sinne von mehr körperlicher Aktivität und einer kalorienarmen Diät vornahmen, zeigte sich in der Gruppe mit der Nahrungsergänzung eine signifikante Reduktion der Lebersteatose und der Transaminasen im Serum [8]. Eine weitere Metaanalyse schlägt die Nahrungsergänzung mit Omega-3 Fettsäuren bei Patienten mit NAFLD zur Reduktion der hepatischen Steatose vor, wobei die Autoren keine optimale Dosierung und Dauer der Nahrungsergänzung empfehlen konnten [43]. Bei den untersuchten Studien reichte die Dauer der Einnahme von acht Wochen bis zu einem Jahr und die Dosierung von Omega-3 lag zwischen 0,83 g und 13,7 g pro Tag.

In einer Studie von Kalafati und Kollegen [27] konnte gezeigt werden, dass Träger des *TM6SF2*-Polymorphismus, bei denen eines der Risikoallele vorliegt, bei vermehrtem Konsum von Fisch, der besonders reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ist, ein höheres Risiko haben (51%), eine NAFLD zu entwickeln, als Patienten ohne diesen Genotyp ( $p=0,012$ ). Zuvor wurde beobachtet, dass der Konsum von Speisen, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, insgesamt das Risiko, eine NAFLD zu entwickeln, minimiert. Bei dem Vergleich verschiedener Genotypen konnte allerdings gezeigt werden, dass dieser Konsum nicht generell empfehlenswert ist, wenn eine NAFLD vorliegt.



**Abbildung 3**

Darstellung des Triglycerid-Metabolismus in der Leber (aus [13]).

ATGL, adipöse Triglycerid-Lipase; ChREBP, Carbohydrate-responsive element-binding protein; Chylo, Chylomikronen; FFA, Free fatty acids; SREBP-1c, Sterol regulatory element-binding protein; TG, Triglyceride; VLDL, Very low density lipoprotein; β-OX, β-Oxidation.

## 2.4 Diätetische Einflüsse auf die *PNPLA3*-assoziierte NAFLD

Die *PNPLA3* p.I148M Variante kann die Produktion hepatischer Triglyceride induzieren und die Zusammensetzung der hepatischen Fettsäuren durch die gestörte enzymatische Hydrolyse-Funktion verändern [56]. Die Expression von *PNPLA3* kann durch die Nahrungsaufnahme von Kohlenhydraten induziert werden [24]. Dieser nahrungsabhängige Effekt bei der *PNPLA3*-assoziierten NAFLD hat das Interesse mehrerer Arbeitsgruppen geweckt. Stojkovic und Kollegen [56] haben in einer Studie einen Zusammenhang zwischen der *PNPLA3* p.I148M Variante und einer kohlenhydratreichen Diät, besonders im Hinblick auf Saccharose, festgestellt. In einer Studie mit 200 übergewichtigen oder adipösen Kindern aus Italien haben Nobili und Kollegen [41] einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Genvariante *PNPLA3* p.I148M und der Aufnahme von gezuckerten Getränken im Hinblick auf die Ausprägung der Leberverfettung festgestellt. Der Grad der hepatischen

Steatose wurde in dieser Studie per Ultraschall ermittelt. Während der Studie wurde zwar die Ernährung überprüft, genauere Informationen über Mengenangaben und die Zusammensetzung der Nahrung jedoch fehlen.

In einer weiteren Studie der gleichen Autoren Nobili und Kollegen wurden 60 Kinder mit nachgewiesener p.I148M Variante des *PNPLA3*-Gens und NAFLD in drei Gruppen randomisiert, bei der zwei Gruppen täglich mit 250 mg oder 500 mg Omega-3-Fettsäuren in Form von Docosahexaensäure (DHA) substituiert wurden und eine dritte Gruppe ein Placebo erhielt. Hierbei zeigte sich, dass gerade die Gruppe mit der Variante *PNPLA3* p.I148M eine größere Wahrscheinlichkeit (37%, 95% Konfidenzintervall (KI) 26%-48%) hatte, eine schwerere Form der Steatose unter Nahrungssupplementation von DHA zu entwickeln als die Gruppe mit dem Genotyp II (-12%, 95% KI - 3%-21%). Dies untermauert die Hypothese, dass es einen Gen-abhängigen Effekt in Bezug auf die Nahrungsaufnahme von Fettsäuren gibt.

In einer doppelt verblindeten Placebo kontrollierten Studie haben insgesamt 103 Probanden mit NAFLD und bekannter *PNPLA3*-Genvariante über 15-18 Monate insgesamt 4 g Omega3-Fettsäuren pro Tag erhalten. Hier zeigten sich bei den Probanden mit der *PNPLA3* p.I148M Variante eine vermehrte Lebersteatose und eine Anreicherung von DHA im Gewebe, allerdings keine Veränderungen bei den Triglyzeridkonzentrationen im Serum [51].

## **3 Methodik und Patienten**

### **3.1 Methodik**

#### **3.1.1 Fragestellung**

Das *PNPLA3*-Gen kodiert ein multifunktionelles Enzym, das in der Leber exprimiert wird und den Lipidstoffwechsel reguliert. Dieses Enzym, das vor allem ungesättigte Fettsäuren abbaut, hat eine intrazelluläre Lipaseaktivität. Die Isoleucin-zu-Methionin-Mutation an Position 148 dieses Gens (rs738409) bedingt einen Funktionsverlust des Enzyms, wodurch der Abbau von ungesättigten Fettsäuren gestört sein könnte. Interessant ist dabei, dass gerade Patienten mit einer hepatischen Steatose oder Dyslipidämie eine mediterrane Diät, die reich an ungesättigten Fettsäuren ist sowie eine Lebensstiländerung im Sinne von vermehrtem körperlichen Ausdauertraining vorgeschlagen wird. Auf diesem Gedanken basierend untersuchten wir, ob Patienten mit diagnostizierter NAFLD, die den Wildtypen des *PNPLA3*-Gens tragen, von einer mediterranen Diät profitieren, wohingegen eine Diät mit PUFA (polyunsaturated fatty acids) bei homozygoten Trägern mit der Mutation p.I148M im *PNPLA3*-Gen möglicherweise schädlich sein könnte.

#### **3.1.2 Studiendesign**

Es handelt sich um eine Open Label-Interventionsstudie, bei der die Probanden zu Beginn in der zweiwöchigen „Run-in“-Phase ihren normalen Ernährungsgewohnheiten folgen und bei ihrer Ernährung auf einen hohen Gehalt von gesättigten Fettsäuren achten, um eine standardisierte Ausgangssituation aller Studienteilnehmer zu schaffen. An diese „Run-in“-Phase schließt sich eine vierwöchige Intervention mit täglicher Omega-3 Fettsäuren-Supplementation an (4g Docosahexaensäure (DHA) + Eicosapentaensäure (EPA) pro Tag).

#### **3.1.3 Patientenauswahl und Rekrutierung**

Es wurden Patienten, die bereits in der Hochschulambulanz der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg bei bekannter NAFLD in Behandlung waren, kontaktiert und über diese Studie informiert. Bei diesen Probanden wurde bereits im Vorfeld schon eine genetische Bestimmung der Varianten des *PNPLA3*-Gens durchgeführt, sodass hier gezielt Probanden als Wildtyp-Träger oder Träger der Mutation *PNPLA3* p.I148M

gesucht wurden. Die Patienten, die an der Studie interessiert waren und teilnehmen wollten, haben ein Informationsblatt mit allen Daten über die Studie erhalten sowie eine Einwilligungserklärung, die unterschrieben wurde. Anschließend durchliefen sie die Screening-Untersuchungen und wurden dabei auf die verschiedenen Ein- und Ausschlusskriterien untersucht.

### **3.1.4 Genotypisierung der *PNPLA3*-Risikovariante**

Bereits im Vorfeld wurde bei den Patienten eine Genotypisierung im Hinblick auf das *PNPLA3*-Gen durchgeführt. Hierfür wurde aus EDTA-Blutproben DNA membran-basiert nach dem QIAamp DNA Extraktionsprotokoll isoliert (Qiagen, Hilden). Die Genotypisierung des *PNPLA3*-Polymorphismus rs738409 wurde durch ein PCR-basiertes Verfahren mit 5'-Nuklease und Fluoreszenzdetektion durchgeführt (TaqMan®, Life Technologies, Darmstadt; rs738409: C\_7241\_10).

### **3.1.5 Studiendauer**

Die Studiendauer betrug für jeden Patienten insgesamt sechs Wochen mit zweiwöchiger „Run-in“-Phase und vierwöchiger Intervention.

### **3.1.6 Diätetische Interventionen**

#### *Run-in- Phase und standardisierte Diät*

Vor Beginn der Intervention durchliefen alle Patienten eine zweiwöchige „Run-in“-Phase, in der die Studienteilnehmer ihre gewöhnlichen Ernährungsgewohnheiten beibehielten. Während dieser Zeit wurden alle Studienteilnehmer gebeten, in einem fünftägigen Ernährungsprotokoll alle Speisen und die Getränke, die sie zu sich nahmen, mit genauen Mengenangaben und Rezepten zu notieren. Gemäß einer Auflistung der WHO ([www.who.int/bulletin/volumes/86/7/08-053728/en/](http://www.who.int/bulletin/volumes/86/7/08-053728/en/)) aus dem Jahre 2008, bei der der Anteil an gesättigten Fettsäuren in der Nahrung der Bevölkerung von 15 europäischen Ländern untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass in Deutschland der Gehalt an gesättigten Fettsäuren in der Nahrung besonders hoch ist. Deshalb wird erwartet, dass sich in der Auswertung der Ernährungsprotokolle in der Run-in-Phase ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren in der Nahrung widerspiegeln wird.

**Tabelle 1**

Prozentualer Anteil gesättigter Fettsäuren am gesamten Energiegehalt der Nahrung

Country	%(Range 10.6 – 15.5)
Portugal	10.6
Spain	10.9
Greece	11.1
Italy	11.8
Denmark	12.6
Sweden	12.8
Ireland	13.5
United Kingdom	13.5
Germany	13.7
Austria	13.9
Finland	14.4
Belgium + Luxembourg	14.5
Netherlands	14.6
France	15.5
<b>Average</b>	<b>13.1</b>

Quelle: [www.who.int/bulletin/volumes/86/7/08-053728-table-T1.html](http://www.who.int/bulletin/volumes/86/7/08-053728-table-T1.html)

Während der Run-in-Phase wurden alle Probanden gebeten, neben ihren gewöhnlichen Ernährungsgewohnheiten hauptsächlich gesättigte Fettsäuren (z.B. Butter) bei ihren Speisen zu verwenden, um anfangs eine möglichst standardisierte „westliche“ Diät, die auf gesättigten Fettsäuren basiert, einzuhalten. Während der zweiwöchigen Run-in-Phase wurden alle Patienten dazu instruiert, ein ausführliches fünftägiges Ernährungsprotokoll zu führen sowie während dieser fünf Tage einen Schrittmacher zu tragen. So konnte gleichzeitig die körperliche Aktivität während dieser Baseline-Phase beurteilt werden. Das Ernährungsprotokoll ist gegenüber anderen Methoden zur Erfassung der Nahrungsaufnahme wie zum Beispiel Fragebögen oder retrospektiven Befragungen, die auf Erinnerungen der Probanden basieren, überlegen. Hiermit ist eine genauere Dokumentation aller Nahrungsmittel und Getränke mit Mengenangaben und speziellen Zutaten/Rezepturen möglich. Den Probanden wurde zunächst genau erklärt, wie ein solches fünftägiges Ernährungsprotokoll zu führen ist. In den fünftägigen Protokollen mussten zwei Tage Wochenendtage sein. Alle Protokolle wurden mithilfe der Software EBISpro (Version 2009 Deutschland) analysiert und ausgewertet, bei der die Datenbank zur Analyse der Nahrungszusammensetzung auf den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Ernährung

(DEG) basiert. Die Probanden haben ein solches Ernährungsprotokoll zu zwei Zeitpunkten geführt, vor Beginn der Intervention und während der Intervention über jeweils fünf Tage.

#### *Interventionsdiät (Omega3-Diät / DHA+EPA)*

Während der vierwöchigen Intervention erhielten die Studienteilnehmer eine tägliche Dosis von 4 g DHA + EPA (Omacor). Ein Gramm Omacor enthält 460 mg EPA und 380 mg DHA als Ethylester. Während dieser vier Wochen wurden die Probanden erneut gebeten, ein ausführliches fünftägiges Ernährungsprotokoll zu führen und währenddessen erneut den Schrittmacher zu tragen, um die tägliche Schrittzahl und damit die körperliche Aktivität zu erfassen.

### **3.2 Patienten**

In diese Interventionsstudie wurden 20 Patienten nach einer Vorauswahl von insgesamt 23 Patienten mit einer NAFLD und bekanntem *PNPLA3*-Genotyp (p.148M und p.148I) aufgenommen. Dabei wurden jeweils zehn Patienten jedes Genotyps rekrutiert und in Matching-Gruppen eingeteilt. Von den 20 Studienteilnehmern waren zehn Probanden homozygote Träger des p.148M Allels (n=10) und weitere zehn Probanden homozygote Träger des p.148I Allels. Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Allel-Trägern durchführen zu können, stimmten sie in folgenden Matching-Kriterien überein:

- Geschlecht
- Alter ( $\pm 5$  Jahre)
- CAP-Wert ( $\pm 40$  dB/m)
- BMI Kategorie (normal, übergewichtig, adipös)

Alle Studienteilnehmer wurden nach den streng vorgegebenen Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt.

#### *Einschlusskriterien:*

- Männliche und weibliche Probanden, die mindestens 18 Jahre alt sind
- Einwilligungsfähige Patienten
- Diagnostizierte NAFLD
- Durchführung der Transienten Elastographie und Bioimpedanzanalyse mit gültigen Messergebnissen

#### *Ausschlusskriterien:*

- Vorliegen einer viralen Hepatitis, HIV oder cholestatischen Lebererkrankung (z.B. PBC, PSC)
- Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 ( $\text{HbA1c} \geq 7.5\% = 58 \text{ mmol/mol}$ )
- Vorliegen einer alkoholischen Fettlebererkrankung
- Wöchentlicher Alkoholkonsum von  $> 21$  alkoholischen Getränken pro Woche (entspricht  $> 30 \text{ g}$  Alkohol pro Tag) bei Männern und  $> 14$  Getränke pro Woche bei Frauen (entspricht  $> 20 \text{ g}$  Alkohol pro Tag)
- Vorliegen einer Leberzirrhose mit Lebersteifigkeit  $>13 \text{ kPa}$  in der Transienten Elastographie (FibroScan®, Echosens, Paris)
- Einnahme von Medikamenten mit prosteatogener Wirkung (z.B. Amiodaron, Methotrexat) oder mit antisteatogenem Effekt (z.B. Statine)
- Vegetarier oder Veganer
- Schwangerschaft
- Schrittmacher

### **3.3 Bestimmung klinischer und anthropometrischer Daten**

Der Blutdruck sowie die Herzfrequenz wurden mittels eines elektronischen Blutdruckmessgerätes zu jedem Untersuchungszeitpunkt bestimmt. Das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung wurden gemessen. Zudem wurde bei jedem Patienten der Body-Mass-Index ermittelt, indem das Gewicht in Kilogramm durch das Quadrat der Körpergröße (in m) geteilt wurde. Der Taillen- sowie der Hüftumfang wurden mit Hilfe eines Maßbandes gemessen. Der Punkt zum Ausmessen des Taillenumfangs lag mittig zwischen dem untersten Rippenbogen und oberhalb der Spina iliaca anterior superior an der schmalsten Spanne. Um den Hüftumfang zu messen, wurde hier die breiteste Stelle der Hüfte gewählt. Aus dem ermittelten Taillen- sowie Hüftumfang konnte die Waist-to-hip-Ratio berechnet werden.

### 3.4 Laboranalysen

Es wurden bei allen Studienteilnehmern nach einem zwölfstündigen nächtlichen Fasten Blutproben gesammelt. Hierzu wurde venöses Blut über einen peripheren Zugang entnommen, um laboratorisch die Leberfunktionsparameter (Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase, Bilirubin und Albumin), Entzündungsmarker, Blutglukose-Werte im Rahmen eines oralen Glukosetoleranz-Tests, HbA1c, Insulin, C-Peptid sowie freie Fettsäuren, Ketonkörper und Acetoacetat im Blut messen zu können. Der Grad der vorliegenden Insulinresistenz wurde mittels des HOMA-Index errechnet, der dem Homeostatic model assessment entspricht (Nüchternglukose mg/dl x Nüchterninsulin  $\mu$ U/ml/405).

Für die Bestimmung der freien Fettsäuren, Ketonkörper und des Acetoacetats wurden die Blutproben direkt im Anschluss zentrifugiert, um das Blutplasma zu erhalten, das bei  $-80^{\circ}$  Celsius gelagert wurde. Die freien Fettsäuren (FFA) wurden enzymatisch gemessen (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim). Ketone, Acetoacetat und Betahydroxybutyrat wurden mittels In-vitro-Tests mit enzymatischen Reaktionen bestimmt (Wako Diagnostics, Neuss).

### 3.5 Transiente Elastographie

Die transiente Elastographie stellt eine nicht-invasive Untersuchungsmethode dar, um die Verfettung (CAP) und Fibrose (Lebersteifigkeit) der Leber zu bestimmen. Die Messung der Transienten Elastographie ist erfolgreich, wenn die folgenden drei Kriterien zutreffen:  $\geq 10$  gültige Messungen je Untersuchung; Erfolgsrate mindestens 60% (Zahl der gültigen Messungen geteilt durch die Summe aller Versuche), und das Verhältnis des Interquartilenabstands zum Median (IQR/Median) bei 10 Messungen musste weniger als 30% betragen [64]. In dieser Interventionsstudie wurde bei allen Patienten die M-Sonde zur Ermittlung der Leberelastizität und des Fettgehaltes der Leber verwendet.

Eine Fettlebererkrankung liegt bei Controlled Attenuation Parameter-Werten ab  $>220$  dB/m vor [60]. Das Vorliegen einer Fibrose wird durch Messwerte  $>7.6$  kPa und das Vorliegen einer Zirrhose durch Messwerte  $>13,0$  kPa in der Transienten Elastographie angezeigt [63].

In verschiedenen Studien wird darüber berichtet, dass einige Faktoren die Messung der Lebersteifigkeit beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass die Lebersteifigkeit postprandial ansteigt [2][5]. Bisher gibt es noch keine Daten, die zeigen, ob sich der CAP-Wert durch die kurzfristige vorherige Nahrungsaufnahme vor der Untersuchung verändert. In der

durchgeführten Interventionsstudie wurde der CAP-Wert deshalb bei nüchternen Patienten mit einer Fastenzeit von 10-12 Stunden bestimmt.

### 3.6 Bioimpedanzanalyse

Im Rahmen der Messung der Körperzusammensetzung wurden zunächst die Körpergröße mit dem Stadiometer Seca217 sowie das Taille-Hüft-Verhältnis mit Hilfe eines Maßbandes bei den Studienpatienten bestimmt. Anschließend wurde die Messung der Körperzusammensetzung per Bioimpedanz-Analyse (BIA) unter Verwendung des medizinischen Body Composition Analyzer mBCA 515 (Seca, Hamburg) durchgeführt. Die elektrische Bioimpedanzanalyse ist ein nicht-invasives, schnelles und einfach durchführbares Verfahren zur Ermittlung der Körperzusammensetzung. Dabei können verschiedene Parameter wie das Gewicht, der BMI, die Fettmasse, der Anteil des viszeralen Fettes, die Skelettmuskelmasse, das Gesamtkörperwasser und der Phasenwinkel ermittelt werden. Diese Parameter werden in Bezug zu Alter und Geschlecht gesetzt, wodurch eine altersentsprechende Einschätzung des Ernährungs- und Trainingszustandes möglich ist. Nach den Leitlinien der ESPEN (European Society for Parenteral and Enteral Nutrition) wird die BIA-Messung bei Patienten mit stabilem Körperwasser und einem ausgeglichenen Elektrolythaushalt empfohlen [33][34]. Der mBCA515 ist eine segmentale multi-frequentielle BIA mit Hilfe von acht Elektroden, die Impedanzen von unterschiedlichen Frequenzen zwischen 5 kHz und 50 kHz verwendet, um die verschiedenen Parameter der Körperzusammensetzung zu ermitteln. Bosy-Westphal und Kollegen haben in Studien einen Vergleich zwischen der BIA-Messung und weiteren Referenz-Methoden wie Magnetresonanztomographie (MRT) und duale Röntgen-Absorptiometrie (DXA) zur Ermittlung der Körperzusammensetzung durchgeführt, wobei sich zeigte, dass die BIA eine probate Methode zur Quantifizierung der Körperzusammensetzung darstellt [7]. Über die acht Elektroden an Händen und Füßen des Patienten wird im Patienten ein homogenes elektrisches Feld mit hoher Frequenz produziert. Die BIA misst den Widerstand des Wechselstroms, die Impedanz. Messergebnisse des Wechselstromwiderstands sind die Resistanz und Reaktanz (jeweils in  $\Omega$ ) des Körpers. Die Resistanz verhält sich umgekehrt proportional zur Menge des elektrolythaltigen Gesamtkörperwassers. Mit der Reaktanz wird beschrieben, dass die Körperzellen dem Wechselstrom einen kapazitiven Widerstand entgegensetzen.

Es gilt damit als ein Maß für die Masse an Körperzellen. Der Phasenwinkel, der sich aus dem Unterschied der beiden Teilwiderstände ergibt, ist ein Anzeiger für den Zustand der Zelldichte, des Zellzustands und der Membranfunktion sowie -integrität. Ein abnehmender Phasenwinkel kann Muskelabbau oder Überwässerung des Extrazellulärtraumes anzeigen.

Andererseits kann ein steigender Phasenwinkel Zeichen von Dehydratation oder Muskelaufbau sein.

### **3.7 Körperaktivität**

Um die körperliche Aktivität über den Zeitraum dieser Interventionsstudie beobachten zu können, haben alle Probanden einen Schrittzähler (Hersteller: Zroven; Gerät: CR-733) und ein Tagebuch erhalten, in dem sie ihre körperlichen Aktivitäten festhalten sollten. Mithilfe des Schrittzählers konnte festgehalten werden, wieviele Schritte die Probanden pro Tag liefen und welche Distanz sie zurücklegten. Der Schrittzähler wurde für jeweils die fünf Tage, an denen die Probanden das Ernährungsprotokoll führten, getragen und gemessen. Zusätzlich wurde die Schrittlänge eines jeden Patienten gemessen, um rückwirkend die Distanz der zurückgelegten Strecke bestimmen zu können.

### **3.8 Parameter des metabolischen Syndroms**

Da die NAFLD auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen wird, wurden bei den Studienteilnehmern die verschiedenen metabolischen Risikofaktoren dokumentiert [46]. Bei allen Probanden wurden zu beiden Zeitpunkten der Blutdruck sowie der Taillenumfang gemessen. Außerdem führten wir vor und nach der Intervention jeweils einen oralen Glukosetoleranztest (OGTT) durch und bestimmten laborchemisch den HbA1c-Wert in %. Desweiteren testeten wir die Patienten auf das Vorliegen einer möglichen Insulinresistenz mithilfe des OGTT und der Messung der Nüchternkonzentrationen von Glukose im Plasma und Insulin im Serum, um hieraus den HOMA-Index bestimmen zu können [39].

HOMA-Index:

$\leq 1$  = Kein Hinweis auf eine Insulinresistenz

$> 2$  = Hinweis auf Insulinresistenz

$> 2,5$  = Insulinresistenz ist wahrscheinlich

$> 5,0$  = Durchschnittswert bei Typ2-Diabetes

### **3.9 Alkoholkonsum**

Der AUDIT-Test (the Alcohol Use Disorders Identification Test) ist ein von der World Health Organization (WHO) entwickelter Test, um eine Alkoholabhängigkeit oder auch einen gefährlichen/missbräuchlichen Alkoholkonsum erkennen zu können und um im Rahmen von Studien schnell Probanden mit vermehrtem Alkoholkonsum identifizieren zu können [3]. Der AUDIT ist ein Fragebogen aus zehn Fragen, bei dem in den ersten drei Fragen die Alkoholmenge und Frequenz erfragt werden. In den folgenden drei Fragen wird die Abhängigkeit vom Alkoholtrinken erfragt. In weiteren vier Fragen werden mögliche Probleme, die durch das Alkoholtrinken auftreten können, untersucht. Dieser auf Fragen basierende Test ist sehr schnell und einfach durchführbar. Je nach Antwort werden pro Frage unterschiedlich viele Punkte vergeben. Je höher am Ende die Summe der Punkte ist, desto höher ist das Risiko für das Vorliegen von alkoholbezogenen Problemen. Die Gesamtsumme der Punkte wird wie folgt berechnet:  $<8$  = keine durch Alkohol verursachten Probleme;  $8-15$  = mittleres Risiko für durch Alkohol verursachte Probleme;  $>16$  = hohes Risiko für das Vorliegen durch Alkohol verursachter Probleme [3].

Der AUDIT wurde innerhalb einer deutschen Populationsstudie an insgesamt 10.803 Probanden getestet. Dabei zeigte sich, dass dieser Test ein zuverlässiges Mittel darstellt, um Patienten mit erhöhtem Risiko in Bezug auf Alkoholabhängigkeit und gefährlichem Alkoholkonsum zu erkennen [17]. Der CAGE-Fragebogen ist einer der am weitesten verbreiteten Fragebögen, der dazu verwendet wird, vermehrten und gefährlichen Alkoholkonsum sowie eine Alkoholabhängigkeit zu erkennen [15]. Da dieser Test aus nur vier Fragen besteht, ist er ein sehr kurzer Fragentest, der schnell und einfach durchzuführen ist [20]. Beide Fragenkataloge, AUDIT und CAGE, wurden in dieser Studie zum Zeitpunkt des Screenings im Gespräch mit den Patienten angewendet, um mögliche Probanden mit vermehrtem Alkoholabusus oder einer Alkoholabhängigkeit zu identifizieren, was gleichzeitig einen Ausschluss aus dieser Studie bedeutete.

### **3.10 Datenerhebung und statistische Auswertung**

#### *Fragestellungen*

Der primäre Endpunkt dieser Studie ist es, Veränderungen des Leberfettgehalts unter der Omega3-Supplementation innerhalb einer Gruppe und im Vergleich zwischen den zwei Gruppen zu untersuchen. Um die Ergebnisse evaluieren zu können, wurde der Leberfettgehalt mittels Messung des CAP (Controlled Attenuation Parameter) ermittelt.

Sekundärer Endpunkt ist ein Vergleich von verschiedenen Messwerten zu Beginn und am Ende des Studienzeitraums innerhalb einer und zwischen den beiden Gruppen:

- Leberfunktionsparameter (AST, ALT, GGT, AP, Bilirubin, Albumin)
- Freie Fettsäuren, gesamte Ketone, Acetoacetat, Betahydroxybutyrat
- Plasma-Glukose und Insulin i.R. eines Glukosetoleranztests sowie der HOMA-IR
- Transiente Elastographie zur Bestimmung der Lebersteifigkeit
- Anthropometrische Daten durch die Bioimpedanzmessung

### *Statistische Verfahren*

Zunächst wurden die ermittelten Messwerte auf eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Je nachdem, ob bei den Messwerten eine Normalverteilung vorlag, wurden die Ergebnisse als Mittelwert (mit dazugehöriger Standardabweichung) oder als Median (mit dazugehörigem Quartilsabstand) angegeben. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs wurden für die statistischen Auswertungen nicht-parametrische Tests angewandt. Um bei nicht normalverteilten Messwerten Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu beurteilen, wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt. Bei normalverteilten Messwerten wurde der t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben angewandt.

Werte wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn ein zweiseitiger p-Wert  $\leq 0.05$  vorlag. Die statistischen Analysen wurden mit der Computer Software SPSS Statistics version 24.0 für Windows (IBM, Ehningen) durchgeführt.

Der CAP-Wert wurde im Hinblick auf Korrelationen mit drei verschiedenen Variablen (BMI, Nüchtern glukose und ALT) beim Zeitpunkt T0 univariat analysiert, wobei jeweils eine Korrelation nach Spearman und Pearson getestet wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Probanden-Charakteristika der gesamten Kohorte vor und nach der Omega3-Intervention

Bei allen Studienteilnehmern liegt entsprechend der Einschlusskriterien eine schon diagnostizierte NAFLD vor. Bei allen Probanden war der *PNPLA3*-Genotyp bekannt. Dabei wurden zehn Matchpartner erstellt, bei denen einer homozygoter Träger der p.148I und der andere homozygoter Träger der p.148M Allelvariante des *PNPLA3*-Gens war. Diese Matchpartner stimmen in den Kriterien Alter, Geschlecht, CAP-Wert und BMI-Kategorie überein. Auf diese Weise können innerhalb dieser Interventionsstudie, bei der alle Studienteilnehmer über vier Wochen täglich 4 g Omega3-Fettsäuren erhielten, Veränderungen vor und nach der Intervention anhand der gesamten Kohorte und zwischen den Matchpartnern untersucht werden. Von den initial 23 rekrutierten Patienten schlossen insgesamt 20 Studienteilnehmer die Studie ab. Zwei Patienten haben die Einschlusskriterien nicht erfüllt, und ein weiterer Patient wurde aufgrund einer Nebenwirkung während der Studie (Gichtanfall) aus der Studie ausgeschlossen. Andere schwere unerwünschte Ereignisse sind während der Studiendurchführung nicht aufgetreten. Zwei Probanden klagten über rezidivierendes Aufstoßen während der Supplementationsphase.

Verschiedene Messwerte wie die Transiente Elastographie, BIA-Messwerte, Blutparameter wie Leberfunktionsparameter und Parameter des Glukosestoffwechsels wurden zu zwei Zeitpunkten, vor der Intervention (T0) und nach der Intervention (T1) bestimmt. Die verschiedenen Probanden-Charakteristika aller Probanden, die die Studie abgeschlossen haben (n=20), sind in der **Tabelle 2** jeweils zum Zeitpunkt T0 und T1 aufgeführt.

Drei Studienteilnehmer haben während der Studie Schilddrüsenhormone bei bekannter Hypothyreose substituiert. Andere Medikamente, die während der Interventionsstudie von Probanden eingenommen wurden, waren: Protonenpumpeninhibitoren (n=2), Angiotensin-Rezeptorblocker (n=2), Betablocker (n=1), Calciumantagonist (n=1) und L-Dopa (n=1).

Bei der Betrachtung der gesamten Kohorte erkennt man anhand der Messwerte der Transienten Elastographie (CAP und LSM) insgesamt tendenziell eine Abnahme der hepatischen Steatose sowie der Lebersteifigkeit. In der statistischen Auswertung wurden hier allerdings keine signifikanten Ergebnisse ermittelt.

Im Rahmen der Bioimpedanzanalyse zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, allerdings eine tendenzielle Zunahme des Körpergewichts, des Body-Mass-Index und der Skelettmuskelmasse zwischen den Zeitpunkten T0 und T1 (alle  $P > 0.05$ ). Dagegen zeigt sich insgesamt eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Fettmasse. Bei den Blutdruckmessungen ergeben sich keine Unterschiede vor und nach der Intervention, lediglich der systolische Blutdruck stieg im Mittel in der gesamten Probandengruppe um 2 mmHg. Die Leberfunktionsparameter (Alanin-Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase) zeigen nicht signifikant niedrigere Aktivitäten ( $P > 0.05$ ) zum Zeitpunkt T1. Der Mittelwert der Gamma-Glutamyltransferase sank um 7 U/l nach der Intervention ( $P > 0.05$ ).

Bei den restlichen Serumparametern zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $P < 0,05$ ) bei den freien Fettsäuren im Serum, die insgesamt um 148  $\mu\text{mol/l}$  zum Zeitpunkt T1 niedriger waren. Das Betahydroxybutyrat und die Ketone waren nach Intervention auch tendenziell gesunken.

Die Glukosewerte im nüchternen Zustand sowie ein und zwei Stunden postprandial, die im Rahmen des oralen Glukosetoleranz-Tests bestimmt wurden, zeigten zum Zeitpunkt T1 tendenziell höhere Werte. So war beispielweise der Mittelwert der Glukosekonzentrationen nach einer Stunde um 4 mg/dl erhöht. Auch der HOMA-Index zeigte vor und nach der Intervention eine nicht signifikante Erhöhung um 0,6% ( $P > 0.05$ ).

## **Tabelle 2**

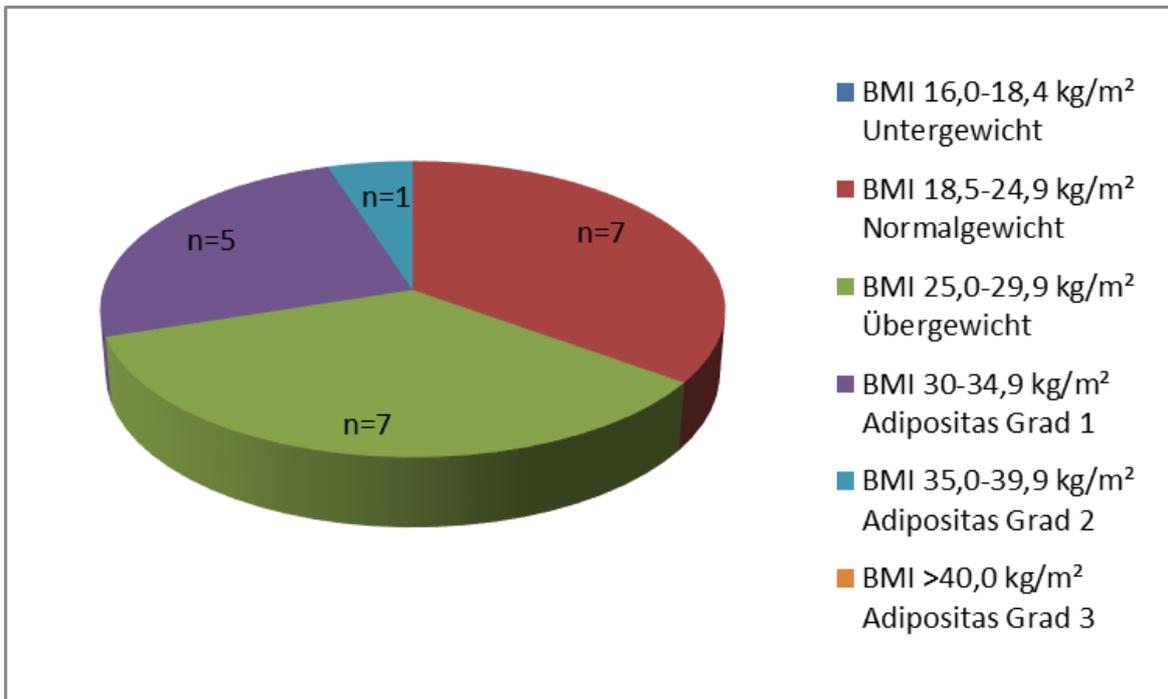
*Baseline und Follow-up der gesamten Kohorte mit n=20 Patienten (mittleres Alter: 42 ± 17 Jahre)*

	<b>Baseline, T0 (n=20)</b>	<b>Follow-up, T1 (n=20)</b>
<b><i>Transiente Elastographie</i></b>		
CAP (dB/m)	271 ± 45	270 ± 56
LSM (kPa), median (range)	5.3 (4.3 – 6.4)	5.2 (4.0 – 6.3)
<b><i>Anthropometrische Parameter</i></b>		
Körpergewicht (kg)	80.7 ± 15.8	81.2 ± 15.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.2 ± 4.8	27.4 ± 4.9
FM (%)	32.6 ± 10.2	32.3 ± 10.4
FFM (%)	67.3 ± 10.5	66.9 ± 10.1
SMM (kg)	26.2 ± 7.4	26.4 ± 7.4

Viszerales Fett (l)	1.6 ± 0.9	1.6 ± 0.9
<b>Blutdruckmessungen</b>		
Systolischer BD (mmHg)	119 ± 15	121 ± 15
Diastolischer BD (mmHg)	74 ± 12	74 ± 11
Herzfrequenz (Schläge/Minute)	72 ± 12	71 ± 10
<b>Serumparameter</b>		
ALT (U/l)	39 (22 – 56)	32 (25 – 58)
AST (U/l)	25 (23 – 31)	24 (22– 31)
γ-GT (U/l)	36 (26 – 59)	33 (28 – 51)
AP (U/l)	60.5 (48 – 78)	58 (47 – 79)
Total bilirubin (mg/dl)	0.60 (0.38 – 0.70)	0.50 (0.40 – 0.50)
Albumin (g/l)	45.0 ± 2.6	44.4 ± 3.0
Betahydroxybutyrat (μmol/l)	40.0 (28.5 – 57.5)	34.5 (22.3 – 51.3)
Freie Fettsäuren (μmol/l)	564.4 ± 234.6	416.0 ± 117.2*
Acetoacetat (μmol/l)	19.0 (14.8 – 25.8)	22.0 (14.3 – 33)
Ketone gesamt (μmol/l)	60.0 (42.8 – 80.3)	56.0 (34.8 – 84.3)
<b>Glukosestoffwechsel</b>		
Nüchternglukose (mg/dl)	88.7 ± 7.8	90.2 ± 9.5
Glukose 1h (mg/dl)	140.7 ± 42.4	144.6 ± 47.8
Glukose 2h (mg/dl)	110 (100 – 138)	111 (93 – 140)
Insulin nüchtern (μIU/ml)	6.2 (5.5 – 13.2)	11.0 (6.3 – 27.5)
Insulin 2h (μIU/ml)	40.8 (34.7 – 76.4)	53.9 (43.6 – 80.9)
C-Peptid nüchtern (ng/ml)	1.4 (1.1 – 2.2)	2.1 (1.2 – 3.6)
C-Peptid 2h (ng/ml)	7.8 (6.2 – 13.0)	9.9 (7.4 – 12.0)
HOMA-IR	1.3 (0.9 – 2.9)	1.9 (1.3 – 4.3)

Bei normalverteilten Werten ist der Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Bei nicht-normalverteilten Werten ist der Median (Quartil 25% - Quartil 75%) angegeben.

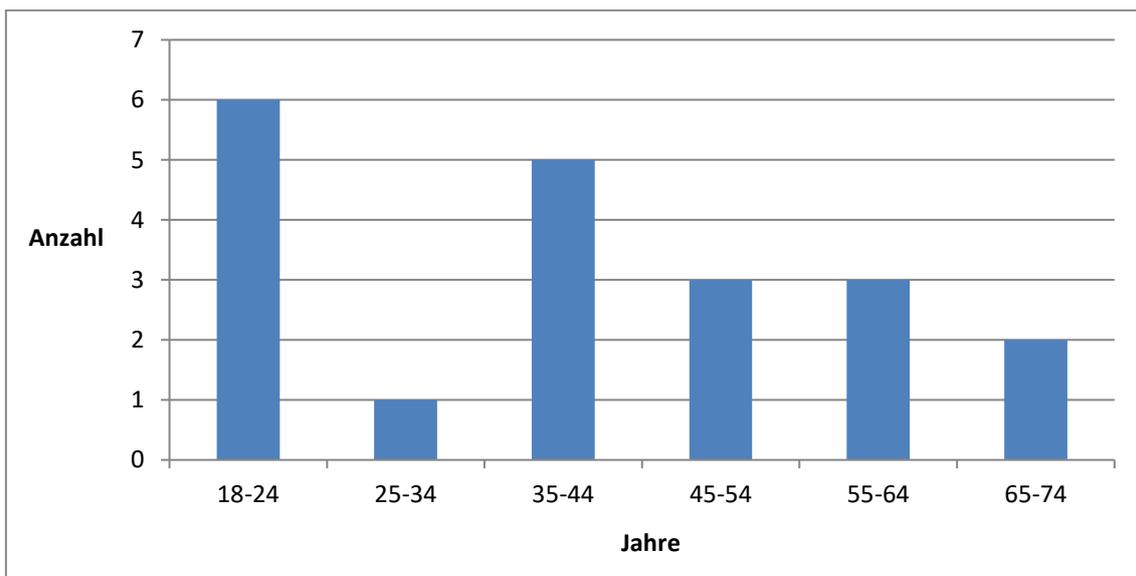
ALT, Alanin-Aminotransferase ; AP, Alkalische Phosphatase; AST, Aspartat-Aminotransferase; BD, Blutdruck; BMI, Body-Mass-Index; CAP, Controlled Attenuation Parameter; γ-GT, Gamma-Glutamyl-Transpeptidase; FFM, Freie Fettmasse; FM, Fettmasse; LSM, Liver stiffness measurement; SSM, Skelettmuskelmasse.



**Abbildung 4**

*Verteilung des BMI (kg/m<sup>2</sup>) der gesamten Kohorte im Überblick. Die Balkennummerierung entspricht der jeweiligen Anzahl der Personen, die der BMI-Gruppe zugeteilt sind.*

Anhand des Kuchendiagramms wird gezeigt, dass fast die Hälfte der Patienten mit NAFLD einen BMI zwischen 16,0 und 24,9 kg/m<sup>2</sup> (Unter- bis Normalgewicht) haben. Ebenso viele Patienten wiesen einen BMI-Wert zwischen 25,0 und 29,5 kg/m<sup>2</sup> auf und waren damit definitionsgemäß übergewichtig. Damit wird deutlich, dass eine NAFLD nicht zwangsweise mit Adipositas einhergehen muss.



**Abbildung 5**

*Absolute Häufigkeiten der Altersklassen für die Gesamtkohorte.*

Von den insgesamt 20 Studienteilnehmern waren zehn Probanden homozygot für das *PNPLA3* p.148M Risiko-Allel und weitere zehn Probanden homozygot für das *PNPLA3* Wildtyp-Allel mit einem jeweils durchschnittlichen Alter von  $42\pm 16$ , bzw.  $43\pm 18$ . Mit **Abbildung 5** soll veranschaulicht werden, dass auch gerade junge Patienten von dem Erkrankungsbild einer NAFLD betroffen sind. Die Hälfte der Studienteilnehmer war in einem Alter zwischen 18-44 Jahren.

## 4.2 Charakteristika der Probanden mit den homozygoten Allel-Varianten p.148M und p.148I vor und nach der Omega3-Intervention

### 4.2.1 CAP-Messung, Transiente Elastographie und Serumparameter

In **Tabelle 3** sind die Probanden-Charakteristika der beiden Gruppen mit den verschiedenen homozygoten Allel-Varianten *PNPLA3* p.148I und p.148M vor (T0) und nach (T1) der Intervention mit Omega3-Supplementation dargestellt. Tabellarisch sind hier die Messergebnisse des Controlled Attenuation Parameters, der Transienten Elastographie und der Serumparameter wiedergegeben. Beim CAP-Wert zeigt sich in der Gruppe der Patienten mit der p.148M-Variante zum Zeitpunkt T1 eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Messwerte um 1,3% ( $284\pm 55$  vs.  $287\pm 65$  dB/m;  $P > 0.05$ ). Bei der Wildtyp-Gruppe war eine Abnahme des CAP-Wertes vom Mittelwert um 2,5% erkennbar ( $262$  dB/m vs.  $256$  dB/m;  $P > 0.05$ ). In **Abbildung 6** ist diese Entwicklung mit Hilfe von Boxplots graphisch dargestellt. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei der Lebersteifigkeit (LSM, Liver Stiffness Measurement). Bei der Wildtyp-Gruppe sank sie im Verlauf um 0,3 kPa (6%;  $P > 0.05$ ), bei der Gruppe p.148M um 1,1 kPa (17%;  $P > 0.05$ ). Die Leberparameter AST, ALT, GGT, AP, Bilirubin und Albumin waren in der Gruppe p.148M im Vergleich vor und nach der Intervention annähernd konstant. Bei der Wildtyp-Gruppe hatten alle Messwerte eine abnehmende Tendenz. Die einzige Ausnahme bildete die GGT mit einem leichten, nicht signifikanten Anstieg um 7 U/l (17%) im Vergleich von T0 und T1 ( $P > 0.05$ ).

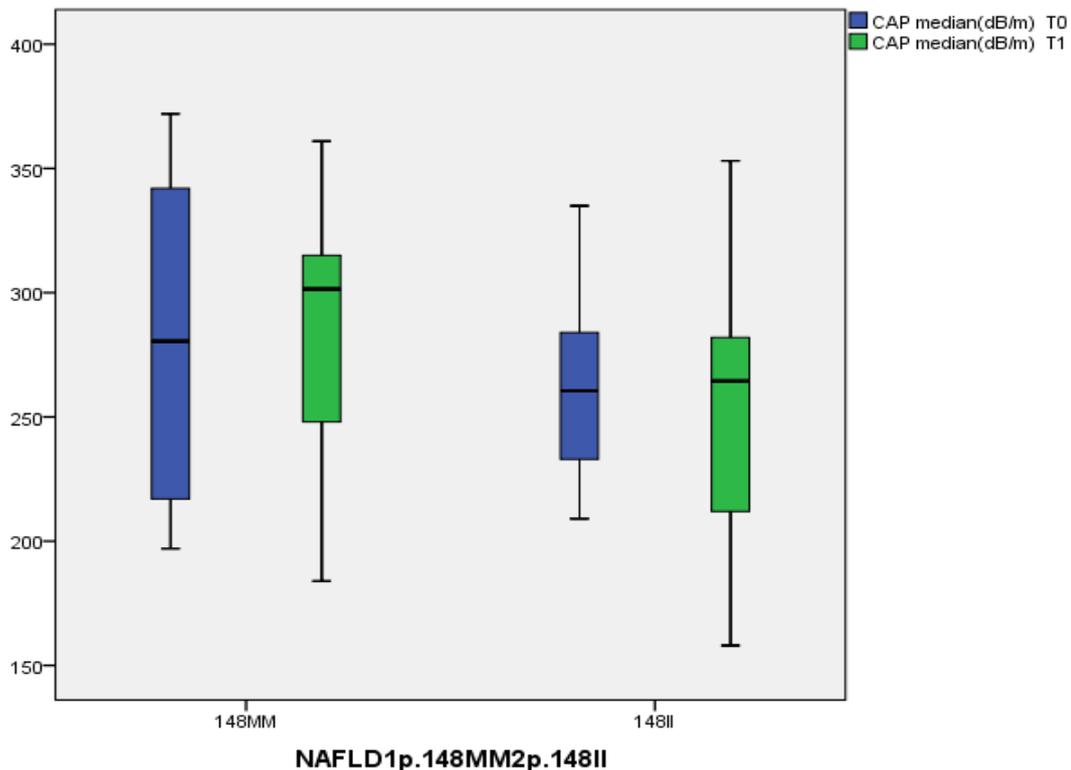
**Tabelle 3**

Messwerte der Transienten Elastographie und Serumparameter der zwei Gruppen PNPLA3 p.148I und p.148M (mittleres Alter:  $42 \pm 17$  Jahre) vor und nach der Intervention

	Baseline, MM (n=10)	Baseline, II (n=10)	Follow-up, MM (n=10)	Follow-up, II (n=10)
<b>Transiente Elastographie</b>				
CAP (dB/m)	287 $\pm$ 65	262 $\pm$ 55	284 $\pm$ 55	256 $\pm$ 56
LSM (kPa), Median (Spannweite)	6.3 (5.1 – 6.4)	5.4 (4.3 – 6.3)	5.2 (4.0 – 7.3)	5.1 (4.0 – 6.1)
<b>Serumparameter</b>				
ALT (U/l)	45 (26 – 64)	31 (21 – 53)	53 (26 – 69)	28 (19 – 38)
AST (U/l)	28 (21 – 32)	25 (23 – 27)	28 (22 – 44)	24 (20 – 30)
$\gamma$ -GT (U/l)	34 (27 – 42)	37 (24 – 101)	32 (28 – 46)	44 (27 – 64)
AP (U/l)	55 (47 – 94)	67 (48 – 77)	51 (47 – 92)	63 (51 – 77)
Gesamtbilirubin (mg/dl)	0.6 (0.4 – 0.6)	0.6 (0.3 – 0.7)	0.5 (0.3 – 0.5)	0.5 (0.4 – 1.0)
Albumin (g/l)	44.5 $\pm$ 2.9	45.5 $\pm$ 2.4	44.6 $\pm$ 3.6	44.1 $\pm$ 2.2
$\beta$ -Hydroxybutyrat ( $\mu$ mol/l)	37.0 (24.0 – 46.0)	40.0 (30.0 – 62.0)	43.0 (28.0- 49.0)	27.0 (20.0 – 58.0)
Freie Fettsäuren ( $\mu$ mol/l)	334.5 (289.0 – 431.0)*	564.5 (509.0 – 682.0)	380.5 (253.0 – 478.0)	436.5 (382.0 – 553.0) <sup>§</sup>
Acetoacetat ( $\mu$ mol/l)	15.0 (15.0 – 19.0)	19.5 (14.0 – 34.0)	23.0 (22.0 – 29.0)	16.0 (12.0 – 36.0)
Ketone ( $\mu$ mol/l)	52.0 (39.0 – 65.0)	61.0 (44.0 – 96.0)	67.5 (50.0 – 78.0)	40.5 (34.0 – 91.0)

Die Werte werden abhängig von der Verteilung der Messwerte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder Median (Interquartilabstand). Signifikante Messwerte zwischen den beiden Gruppen: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Signifikante Messwerte innerhalb einer Gruppe: <sup>§</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>§§</sup> $P < 0.01$ , <sup>§§§</sup> $P < 0.001$ .

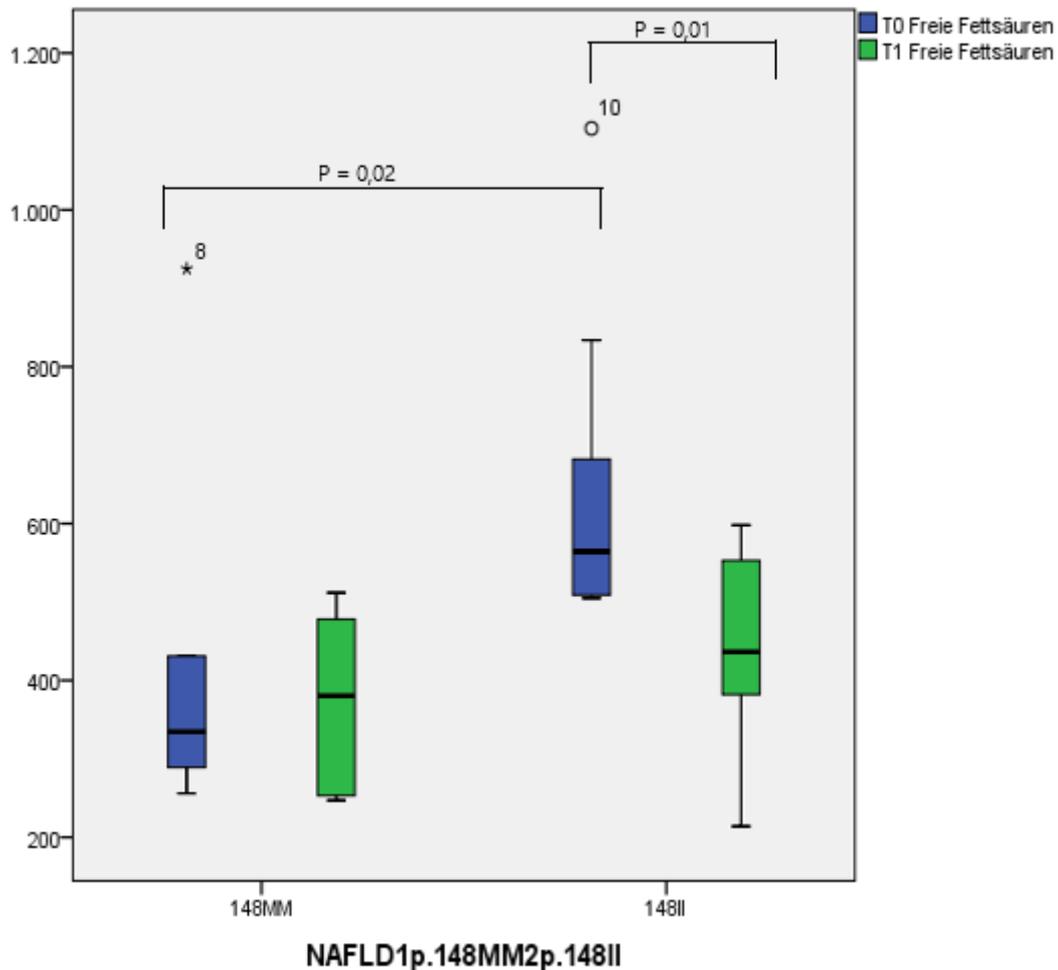
Abkürzungen: ALT, Alanin-Aminotranferase; AP, Alkalische Phosphatase; AST, Aspartat-Aminotranferase; CAP;  $\gamma$ -GT, Gamma-Glutamyltransferase; Controlled Attenuation Parameter; LSM, Liver Stiffness Measurement.



### Abbildung 6

Darstellung der CAP-Werte zu den Zeitpunkten T0 und T1 bei Trägern der verschiedenen PNPLA3-Allelvarianten p.148M und p.148I. Es gab keinen signifikanten Unterschied.

Bei den Messergebnissen der freien Fettsäuren, des  $\beta$ -Hydroxybutyrats und der Ketone zeigten sich in beiden Gruppen Unterschiede (mit bei der Wildtyp-Gruppe deutlich niedrigeren Werten zum Zeitpunkt T1) sowie ein gegensätzliches Verhältnis bei den homozygoten Trägern des Risikoallels (**Abbildung 7**). Dabei lagen die freien Fettsäuren zum Zeitpunkt T0 bei Patienten mit Wildtyp-Allel signifikant höher als bei den homozygoten Trägern der Risikovariante (564,5(508,5 – 720,0) vs. 334,5(280,8 – 554,5)  $\mu\text{mol/l}$ ,  $P = 0,02$ ). Vor und nach Intervention ließ sich für die Messwerte der freien Fettsäuren ein signifikanter Unterschied in der Wildtyp-Gruppe mit einer Reduktion um 28,3% nachweisen ( $P=0,01$ ). In der Gruppe mit der Variante PNPLA3 p.148M nahmen der Mittelwert der freien Fettsäuren zwischen T0 und T1 nicht signifikant um 9,1% zu ( $P>0,05$ ). Im Rahmen der Analyse der Ketonkörper zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion nach der Intervention (61,0 (44,0 – 96,0) vs. 40,5 (34,0 – 91,0) bei der Wildtyp-Gruppe ( $P>0,05$ ). In der Risikogruppe wurde eine nicht signifikante Erhöhung der Ketonkörper beobachtet (52,0 (39,0 – 65,0) vs. 67,5 (50,0 – 78,0;  $P>0,05$ ). Genauer betrachtet zeigte sich zum Zeitpunkt T1 eine leichte, nicht signifikante Erhöhung von Acetoacetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat in der Risikogruppe.



### Abbildung 7

Darstellung der Messwerte für freie Fettsäuren zum Zeitpunkt T0 und T1 bei den verschiedenen PNPLA3-Allelvarianten p.148M und p.148I.

Zum Zeitpunkt T0 ergibt sich für die Ergebnisse der freien Fettsäuren ein signifikanter Unterschied mit deutlich höheren Messwerten bei der Wildtyp-Gruppe (564.5 vs. 334.5,  $P=0.02$ ). Vor und nach Intervention lässt sich für die Messwerte der freien Fettsäuren ein signifikanter Unterschied in der Wildtyp-Gruppe mit einer Reduktion um insgesamt 28,3% nachweisen ( $P=0,01$ ). In der Gruppe mit der Variante PNPLA3 p.148M nimmt der Mittelwert der freien Fettsäuren im Vergleich T0 und T1 nicht signifikant um 12% zu ( $P>0,05$ ).

Die lineare Regressionsanalyse (Tabelle 4) zeigt, dass der Body-Mass-Index ( $P < 0,05$ ) und die Alanin-Aminotransferase, sowie die Aspartat-Aminotransferase ( $P < 0,05$ ) die CAP-Werte zum Zeitpunkt T0 signifikant beeinflussen. Allerdings lag keine Assoziation zwischen dem Nüchternblutglukosewert und der CAP-Messung vor. Eine multivariate Regressionsanalyse wurde aufgrund des kleinen Umfangs der Studienpopulation nicht durchgeführt.

**Tabelle 4**  
*Univariate Analyse mit CAP als abhängiger Variable*

	$\beta$ Koeffizient, T0	P, T0	$\beta$ Koeffizient, T1	P, T1
<b>Univariate Analyse</b>				
BMI	0.441	<b>0.052</b>	0.754	<b>0.000</b>
Glc nüchtern	0.268	>0.05	0.411	>0.05
ASAT	0.448	<b>0.047</b>	0.617	<b>0.004</b>
ALAT	0.466	<b>0.038</b>	0.740	<b>0.000</b>

*Abkürzungen: ALAT, Alanin-Aminotransferase; ASAT, Aspartat-Aminotransferase; BMI, body mass index; Glc nüchtern, Nüchtern glukose;.*

#### 4.2.2 Anthropometrische Parameter der Bioimpedanzanalyse

Die **Tabelle 5** zeigt die anthropometrischen Parameter vor Beginn und nach der Supplementation mit Omega3, wobei die Kohorte in zwei Gruppen mit den verschiedenen Allelvarianten des *PNPLA3*-Gens aufgeteilt ist. Hier wurden keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Körpergewichts, des BMI, des Taillen- und Hüftumfangs, des WHR/WC, oder der Fettmasse beobachtet. Auffällig waren dagegen eine Zunahme des Mittelwertes der fettfreien Masse bei den Patienten mit *PNPLA3* p.148M Variante im Vergleich zum Zeitpunkt T0 (P=0,001) Bei einem Vergleich des prozentualen Anteils der fettfreien Masse mit 68,2% vor der Intervention und 68,7% postinterventionell lässt sich hier kein signifikantes Ergebnis nachweisen (P=0,051). Der Anteil des viszeralen Fetts blieb bei beiden Gruppen annähernd konstant.

**Tabelle 5**

*Anthropometrische Parameter der zwei Gruppen PNPLA3 p.148I und p.148M vor und nach der Omega3-Supplementation*

	Baseline, MM (n=10)	Baseline, II (n=10)	Follow-up, MM (n=10)	Follow-up, II (n=10)
<b>Anthropometrische Parameter</b>				
Körpergewicht (kg)	80.0 ± 16.8	81.4 ± 15.6	80.5 ± 16.7	81.9 ± 15.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.7 ± 4.1	27.7 ± 5.6	26.9 ± 4.1	27.9 ± 5.8
Taillenumfang (cm)	85.3 ± 10.7	86.3 ± 12.1	85.2 ± 11.0	86.8 ± 11.4
Hüftumfang (cm)	98.8 ± 6.6	104.3 ± 8.3	100 ± 7.2	104.2 ± 8.8
WHR/WC	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
FM (kg)	25.0 ± 8.6	27.8 ± 12.2	24.8 ± 8.8	27.8 ± 12.3
FM (%)	31.8 ± 10.2	33.5 ± 10.7	31.4 ± 10.3	33.4 ± 10.9
FFM (kg)	54.9 ± 15.5	53.5 ± 10.8	55.6 ± 15.6 <sup>§§</sup>	57.1 ± 10.4
FFM (%)	68.2 ± 10.2	66.3 ± 11.4	68.6 ± 10.3	66.7 ± 10.9
Viszerales Fett (l)	1.6 ± 1	1.7 ± 1.1	1.5 ± 0.9	1.7 ± 1.1

*Die Werte werden, abhängig von der Verteilung der Messwerte, als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median (Interquartilabstand) angegeben. Signifikante Messwerte zwischen den beiden Gruppen: \*P ≤ 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001; Signifikante Messwerte innerhalb einer Gruppe: §P ≤ 0.05, §§P < 0.01, §§§P < 0.001.*

*Abkürzungen: FFM, Fettfreie Masse; FM, Fettmasse; WHR/WC, Waist-hip ratio/Waist circumference.*

#### **4.2.3 Systolische und diastolische Blutdruckmesswerte**

Die vierwöchige Supplementation mit Omega3-Fettsäuren zeigte in beiden Gruppen keine signifikanten Effekte auf den systolischen und diastolischen Blutdruck oder die Herzfrequenz (**Tabelle 6**).

**Tabelle 6**

*Blutdruckmessungen in den Gruppen PNPLA3 p.148I und p.148M vor und nach der Supplementation mit Omega3-Fettsäuren*

	<b>Baseline MM (n=10)</b>	<b>Baseline II (n=10)</b>	<b>Follow-up MM (n=10)</b>	<b>Follow-up II (n=10)</b>
<b>Blutdruckmessungen</b>				
Systolischer Blutdruck (mmHg)	118 ± 13	120 ± 16	118 ± 15	122 ± 17
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	73 ± 8	74 ± 15	71 ± 10	76 ± 10
Herzfrequenz (Schläge/Minute)	71 ± 16	73 ± 6	69 ± 13	73 ± 7

*Die Werte werden, abhängig von der Verteilung der Messwerte, als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median (Interquartilabstand) angegeben. Signifikante Messwerte zwischen den beiden Gruppen: \*P ≤ 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, Signifikante Messwerte innerhalb einer Gruppe: §P ≤ 0.05, §§P < 0.01, §§§P < 0.001.*

#### **4.2.4 Parameter des Glukosestoffwechsels im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests**

Im Rahmen der vierwöchigen Supplementation mit Omega3-Fettsäuren sind für die beiden unterschiedlichen Allelvarianten des *PNPLA3*-Gens unterschiedliche Tendenzen bei den Messwerten der Parameter des Glukosestoffwechsels zu erkennen. Insgesamt zeigen sich hier keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich vor und nach der Omega-3 Supplementation. Allerdings ergibt sich die deutliche Tendenz, dass nach der Intervention die verschiedenen Glukoseparameter bei der Risikogruppe (*PNPLA3* p.148M) einen nicht signifikanten Anstieg zeigen im Gegensatz zur Wildtyp-Gruppe, in der sich nach der Intervention niedrigere Glukoseparameter nachweisen ließen. Die Glukosewerte nach ein und zwei Stunden nach oraler Glukoseeinnahme, das gemessene Insulin im nüchternen Zustand und zwei Stunden postprandial, C-Peptid im nüchternen Zustand und der HOMA-Index zeigen in der Gruppe mit der *PNPLA3* p.148M-Variante jeweils steigende Werte im Vergleich zu den Messwerten vor der Supplementation und nach vier Wochen.

**Tabelle 7***Parameter des oralen Glukosetoleranztests für beide Gruppen*

	<b>Baseline, MM (n=10)</b>	<b>Baseline, II (n=10)</b>	<b>Follow-up, MM (n=10)</b>	<b>Follow-up, II (n=10)</b>
Nüchternglukose (mg/dl)	87.4 ± 7.4	89.9 ± 8.3	89.5 ± 11.0	90.9 ± 8.3
Glukose 1h (mg/dl)	136.2 ± 38.5	145.1 ± 47.6	149.3 ± 47.4	139.8 ± 50.2
Glukose 2h (mg/dl)	115.8 ± 16.9	121.1 ± 35.3	117.3 ± 33.6	117.4 ± 35.5
Insulin nüchtern (µIU/ml)	8.0 ± 6.3	8.2 ± 7.1	12.6 ± 9.4	9.9 ± 8.7
Insulin 2h (µIU/ml)	83.6 ± 65.7	53.2 ± 50.5	68.2 ± 63.3	41.6 ± 15.0
C-Peptid nüchtern (ng/ml)	2.1 ± 1.2	1.5 ± 1.0	3.7 ± 1.9	1.7 ± 0.8
HOMA-Index	2.6 ± 1.3	1.5 ± 1.3	2.7 ± 2.6	2.2 ± 2.0

*Die Werte werden, abhängig von der Verteilung der Messwerte, als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median (Interquartilsabstand) angegeben.*

#### **4.2.5 Energie- und Nährstoffzufuhr**

**Tabelle 8** stellt die Energie- und Nährstoffzufuhr über jeweils fünf Tage in den beiden verschiedenen Gruppen vor Beginn der Intervention und während der Intervention dar. Verglichen werden hier zunächst die durchschnittliche Energieaufnahme pro Tag, gemessen in Kcal, die gesamte Fettaufnahme, Eiweiße, Kohlenhydrate, Ballaststoffe und Cholesterin. Die diätetischen Lipide werden genauer aufgeführt in Form von Cholesterin, gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigten Fettsäuren, darunter Ölsäure sowie mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Die Gesamtmenge an Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren wurde ebenso wie die Menge der diätetisch aufgenommenen Linolensäure, EPA und DHA bestimmt.

Es ist zu erkennen, dass die Probanden vor der Intervention insgesamt mehr Fette, mehr Eiweiße, mehr Kohlenhydrate und Ballaststoffe zu sich nahmen und dementsprechend hier auch auf eine höhere Energiezufuhr kamen. Die Wildtyp-Gruppe wies zu den Zeitpunkten T0 und T1 jeweils niedrigere Gesamtenergiewerte auf (T0 1924 vs. 2594 und T1 1741 vs. 2250, P=0,014). Ein signifikanter Unterschied ließ sich hier nur bei der Risikoallel-Gruppe mit einer geringeren Energiezufuhr zum Zeitpunkt T1 (P=0,04) nachweisen. Während der anfänglichen zweiwöchigen Run-in-Phase war bei beiden Gruppen zu sehen, dass deutlich mehr gesättigte Fettsäuren aufgenommen wurden. Während der Intervention haben die Probanden weniger gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren zu sich genommen. Dabei hat die Risikoallel-Gruppe zum Zeitpunkt T0 mehr Fette konsumiert als die Kontrollgruppe (P=0,05). Zum Zeitpunkt T1 zeigte sich bei der

Risikoallel-Gruppe erneut ein höherer Konsum an Fetten (P=0,04) und Cholesterin (P=0,03). Bereits zum Zeitpunkt T0 zeigte sich in der Risiko-Gruppe ein höherer Cholesteringehalt als bei den Trägern des Wildtyp-Allels (358g vs. 268g; P>0,05); zum Zeitpunkt T1 stieg der Cholesteringehalt bei der Risiko-Gruppe weiter auf 368g und bei der Wildtyp-Gruppe sank der Wert auf 240g, sodass sich hier bei T1 ein signifikanter Unterschied ergab (P= 0,043).

Weiterhin wiesen beide Gruppen zum Zeitpunkt T1 einen signifikanten Anstieg der Omega-3-Fettsäuren sowie von DHA und EPA (bei allen P=0,001) als Ergebnis der Supplementation auf. Ein signifikanter Anstieg der Omega-6-Fettsäuren konnte ebenfalls in der Risikoallel-Gruppe beobachtet werden (P=0,004). In der **Tabelle 8** sind die freien Fettsäuren (Ölsäure und Linolensäure) im Serum dargestellt. Interessant ist hier, dass die Menge der freien Fettsäuren in der Wildtyp-Gruppe zu Beginn der Studie um 34% höher lag als bei Trägern der Adiponutrin-Variante. Dies spiegelte sich allerdings nicht im Ernährungsprotokoll wider. Hier war die Menge an aufgenommenen freien Fettsäuren in der Gruppe mit der p.148M Variante des *PNPLA3*-Gens höher.

**Tabelle 8**

*Energie- und Nährstoffzufuhr bei homozygoten Trägern der PNPLA3-Allele p.148M und p.148I vor und nach der Supplementation mit Omega3-Fettsäuren*

	Baseline, MM (n=10)	Baseline, II (n=10)	Follow-up, MM (n=10)	Follow-up, II (n=10)
Energie (kcal/d)	2594 ± 977	1924 ± 520	2250 ± 756 <sup>§</sup>	1741 ± 514
Fett (g)	104.1 ± 40.2*	74.4 ± 19.8	87.0 ± 29.3*	63.4 ± 18.0
Eiweiß (g)	114.5 ± 57.0	81.1 ± 26.3	110.8 ± 47.1*	59.4 ± 18.0 <sup>§§</sup>
Kohlenhydrate (g)	251.4 ± 105.1	219.2 ± 83.5	251.5 ± 96.3*	193.8 ± 63.7
Ballaststoffe (g)	27.2 ± 9.2	23.1 ± 10.4	23.3 ± 5.8 <sup>§</sup>	20.1 ± 10.6
Cholesterin (mg)	358 ± 156	268 ± 131	368 ± 148*	240 ± 87
Gesättigte Fettsäuren (g)	38.7 ± 19.7	28.5 ± 8.4	33.3 ± 14.6	26.9 ± 9.1
Palmitinsäure (g)	18.8 ± 9.3	14.3 ± 4.1	16.5 ± 8.3	13.3 ± 4.4
Stearinsäure (g)	8.2 ± 4.4	6.5 ± 2.1	7.3 ± 4.2	5.8 ± 2.0
MUFA (g)	31.4 ± 13.2	26.5 ± 8.0	26.9 ± 13.3	23.5 ± 9.2

Ölsäure (g)	29.5 ±13.2	24.1 ±7.4	26.3 ± 13.1	21.1 ± 8.6
PUFA (g)	14.0 ± 4.8	14.4± 5.9	13.4 ± 3.3	13.9 ± 5.6
n-6 PUFA	8.8 ± 3.3	10.0 ± 5.3	6.9 ± 2.9 <sup>§</sup>	7.0 ± 5.0
Linolensäure (g)	1.4 ± 0.6	1.7±1.4	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.9
Arachidonsäure (g)	0.1 ± 0.07	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
n-3 PUFA	1.4 ± 0.7	2.1 ± 1.5	4.7 ± 0.6 <sup>§§§</sup>	5.7± 1.5 <sup>§§§</sup>
DHA (g)	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.3	2.1 ± 0.3 <sup>§§§</sup>	2.3 ± 0.7 <sup>§§§</sup>
EPA (g)	0.1 ± 0.2	0.1± 0.2	2.4 ± 0.7 <sup>§§§</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>§§§</sup>
Durchschnittliche Schrittzahl/Tag	7913 ± 1903 <sup>***</sup>	4713 ± 1665	7183 ± 2135 <sup>*</sup>	4955 ± 1834

*Die Werte werden, abhängig von der Verteilung der Messwerte, als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median (Interquartilabstand), angegeben. Signifikante Messwerte zwischen den beiden Gruppen: \*P ≤ 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001; Signifikante Messwerte innerhalb einer Gruppe: <sup>§</sup>P ≤ 0.05, <sup>§§</sup>P < 0.01, <sup>§§§</sup>P < 0.001.*

*Abkürzungen: DHA, Docosahexaensäure; EPA, Eicosapentaensäure; MUFA, Mono-unsaturated fatty acid; n-3 PUFA, Omega-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren; Omega-6 mehrfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA, Poly-unsaturated fatty acid; n-6.*

Vor und während der Intervention wurde die tägliche Aktivität der Probanden in Form von absolvierten Schritten mittels Schrittzähler quantifiziert. Im Vergleich zwischen der Risikogruppe und der Kontrollgruppe wurde hier bei der Risikoallel-Gruppe während der Zeitpunkte T0 sowie T1 signifikant mehr körperliche Aktivität in Form von mehr Schritten pro Tag nachgewiesen (T0 P=0,001; T1 P=0,027). Es traten hier aber keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Gruppe auf, was anzeigt, dass das Aktivitätsniveau während der Interventionsstudie stabil war.

## 5 Diskussion

### 5.1 *PNPLA3*-Variante und deren Einfluss auf den Leberfettgehalt

Das Ziel dieser Open-Label Interventionsstudie ist es, die Effekte einer vierwöchigen Omega3-Supplementation (DHA+EPA) bei Patienten mit NAFLD und unterschiedlichen *PNPLA3*-Genotypen auf den Leberfettgehalt, die Lebersteife, anthropometrische Daten, Leberfunktionsparameter und Glukosestoffwechsel zu untersuchen. Das *PNPLA3*-Gen kodiert für ein Enzym, das in der Leber exprimiert wird und den Lipidstoffwechsel reguliert. Dieses Enzym hat eine intrazelluläre Lipaseaktivität, die vor allem ungesättigte Fettsäuren abbaut. Die Isoleucin-zu-Methionin-Mutation an Position 148 dieses Gens bedingt einen Funktionsverlust, wodurch der Abbau von ungesättigten Fettsäuren gestört wird. Da es bisher keine präventiven oder therapeutischen Ansätze zur Therapie einer NAFLD gibt, wird Patienten mit NAFLD in Leitlinien eine Lebensstiländerung mit mediterraner Diät, die reich an ungesättigten Fettsäuren ist, sowie vermehrte körperliche Betätigung und Gewichtsreduktion angeraten.

In dieser Studie konnte entgegen der Hypothese kein Effekt der vierwöchigen Omega-3-Supplementation auf den Leberfettgehalt bei Patienten mit NAFLD und Genotyp *PNPLA3* p.I148M im Sinne einer vermehrten Steatose festgestellt werden. Was wir dagegen beobachten konnten, ist ein unterschiedliches Verhalten der freien Fettsäurekonzentrationen im Blut je nach Genotyp. Die Risikogruppe hat zu Beginn der Studie signifikant niedrigere Messwerte für die freien Fettsäuren als die Wildtypen. Bei der Wildtyp-Gruppe zeigten sich postinterventionell um 28% signifikant verminderte Konzentrationen an freien Fettsäuren. In einer Metaanalyse über insgesamt 16 Studien mit 2937 Probanden wurde der starke genetische Effekt des *PNPLA3* p.I148M Genotyps auf den Leberfettgehalt bei Patienten mit NAFLD untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Leberfettgehalt bei Studienteilnehmern mit der p.I148M-Risikovariante um 73% höher war als bei Studienteilnehmern mit der *PNPLA3* p.148I-Variante [55]. Patienten mit NAFLD werden eine Lebensstiländerung mit vermehrter körperlicher Aktivität, Diätmodifikation und Gewichtsreduktion geraten [10][19]. Es wird darüber berichtet, dass Patienten mit NAFLD und homozygoter Variante des *PNPLA3*-Gens stärker von der besagten Lebensstiländerung profitieren als heterozygote Träger oder Wildtypträger des *PNPLA3*-Gens [54].

Die vermehrte Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren könnte sich positiv auf die hepatische Steatose auswirken, da durch die Omega-3-Fettsäuren die Expression des 'Sterol response element binding protein 1c (SREBP1c)' reduziert wird, welches die hepatische Lipogenese reguliert [62]. Des Weiteren konnte in einer randomisierten open-label crossover-Studie nachgewiesen werden, dass die Einnahme von täglich 4 g EPA und DHA über insgesamt

acht Wochen zu einer Veränderung des Darmmikrobioms und zu einer Zunahme der Produktion kurzkettiger Fettsäuren bei Gesunden führte [61]. Insgesamt wird der höhere Konsum von Omega-3-Fettsäuren bei Patienten mit NAFLD kontrovers diskutiert, und nicht alle randomisierten kontrollierten Studien haben hier positive Ergebnisse erzielt [42]. In einer Meta-Analyse wird der Therapieansatz mit Omega-3-Fettsäuren empfohlen, allerdings konnte keine optimale Therapiedauer vorgeschlagen werden. [43].

In einer vergleichbaren Interventionsstudie konnte eine deutlich zunehmende Verfettung nach Omega-3-Supplementation bei Patienten mit *PNPLA3* p.148M Genotyp und eine Abnahme des Leberfettgehaltes bei Probanden mit NAFLD und *PNPLA3* p.148I Genotyp gezeigt werden [51]. Scorletti et al. [51] rekrutierten insgesamt 103 Patienten mit NAFLD und bekanntem *PNPLA3*-Genotyp, von denen 95 Patienten die Studie abschlossen. Die Patienten erhielten innerhalb der randomisierten kontrollierten Studie täglich 4 g Omega-3-Fettsäuren (DHA+EPA) über einen Zeitraum von 15-18 Monaten. Unter den 103 Probanden gab es insgesamt 13 Studienteilnehmer mit dem Genotyp *PNPLA3* p.148M. Bei diesen konnte gezeigt werden, dass eine Omega-3-Supplementation den Leberfettgehalt im Sinne einer zunehmenden Steatose veränderte und zu einer verminderten Anreicherung von DHA führte. Die Messwerte von EPA veränderten sich nicht signifikant. Bei dieser Studie wurde der Leberfettgehalt mittels Magnetresonanz-Spektroskopie ermittelt.

In dieser Studie ist die Stichprobe der Probanden mit der Risikovariante p.148M des *PNPLA3*-Gens mit zehn Patienten ähnlich groß. Es wurde auch das gleiche Supplementations-Regime mit täglich 4 g Omega-3 Fettsäuren (DHA+EPA) gewählt. Lediglich der Zeitraum der Durchführung der Supplementation unterscheidet sich deutlich mit 15-18 Monaten statt vier Wochen, was möglicherweise der Grund für die unterschiedlichen Studienergebnisse ist. Dies zeigt, dass die Supplementation mit Omega-3 Fettsäuren länger als einen Monat durchgeführt werden sollte, um die Auswirkungen auf die Leber detektieren zu können. Weiterhin unterscheidet sich das durch uns durchgeführte Match-Design vom Studientyp der randomisierten kontrollierten Studie von Scorletti et al..

### **5.1.2 Einflüsse der Omega3-Supplementation bei *PNPLA3*-Genotyp p.148I und p.148M**

In einer Metaanalyse von insgesamt 13 randomisierten kontrollierten Studien wurde der Effekt einer Diät mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder mit Fischöl im Hinblick auf Leberparameter, Parameter des metabolischen Syndroms und Blutlipide untersucht. Dabei erhielten 266 Probanden eine PUFA-reiche Diät, und 402 Probanden stellten die Kontrollgruppe dar. Diese Metaanalyse zeigte einen signifikanten Effekt der PUFA-reichen Diät im Hinblick auf eine Senkung der ALAT und eine Verbesserung der Leberfunktion. [69].

In unserer Interventionsstudie gab es bei den Leberfunktionsparametern ALAT, ASAT und  $\gamma$ -GT keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich vor und nach der Intervention. Gerade bei der ALT war der Mittelwert der Gesamtkohorte nach der Intervention jedoch tendenziell gesunken.

Varela-Lopez und seine Kollegen [59] haben in einer Metaanalyse von insgesamt zehn Fall-Kontroll-Studien und 11 randomisierten kontrollierten Studien den Effekt einer Omega3-reichen Diät mit täglich 1 g EPA+DHA bei NAFLD untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Supplementation einen günstigen Einfluss auf die Leberenzyme ALT und AST sowie auf die Triacylglyceride und den Leberfettgehalt hatte. In einer weiteren Pilotstudie von Hodson und Kollegen [23] bei Patienten mit NAFLD erhielten acht Patienten 4 g DHA+EPA pro Tag und acht Patienten ein Placebo über 15 - 18 Monate. Bei den Patienten mit Omega-3-Supplementation zeigten sich eine erhöhte DHA-Anreicherung in den Erythrozyten und günstige Effekte im Sinne einer Abnahme des hepatischen Fettes und ein günstiger Einfluss auf die Insulinsensitivität.

In einer weiteren neuen Studie von Kalafati und Kollegen [27] wurde der Effekt einer Fischöl-reichen Diät im Hinblick auf Polymorphismen verschiedener Genotypen untersucht, die nachgewiesen ein erhöhtes Risiko in der Entwicklung einer NAFLD darstellen. Hier konnte beim genetischen Polymorphismus *TM6SF2* rs58542926 (transmembrane 6 superfamily member 2), bei dem im Nukleotid 499 die Substitution von Guanin durch Adenin vorliegt, ein besonderes Risiko für die Entwicklung einer NAFLD im Rahmen einer fischölrreichen Ernährung festgestellt werden. Die genetische Variante von *TM6SF2* ist ein Regulator des Leberfett-Metabolismus und erhöht das Risiko der NAFLD durch eine gestörte Lipoprotein-Produktion.

Somit kann auch gezeigt werden, dass eine einheitliche Therapie aller NAFLD-Patienten mit einer mediterranen Diät nicht sinnvoll ist. Stattdessen würde eine individualisierte, an den Genotyp angepasste Diät sinnvoll sein.

In einer Studie von Varela-Lopez und Kollegen [59] wurden Versuchsreihen bei Mäusen mit verschiedenen Öl-Diäten, einfach ungesättigtem Olivenöl, n6-mehrfach ungesättigtem Sonnenblumenöl und n3-mehrfach ungesättigtem Fischöl durchgeführt. Hier wurde nach 6 Monaten oder 24 Monaten der jeweiligen Diät die Leberhistologie, mitochondriale Strukturen, oxidativer Stress, Telomerlängen und die Genexpression untersucht. Bei der Diät mit einfach ungesättigtem Olivenöl ließ sich im Vergleich zu den anderen Diäten nach 24 Monaten eine weniger ausgeprägte Steatose und zentrolobuläre Inflammation nachweisen. Außerdem zeigte die Gruppe nach 24 Monaten einer Fischöl-Diät eine stärkere Verfettung und Inflammation mit Entwicklung von NASH und Fibrose. Jurado-Ruiz und Kollegen [26] untersuchten an Mäusen den Effekt von nativem Olivenöl auf Inflammation und Leberschädigung nach vorangegangener fettreicher Diät, durch die eine NAFLD verursacht

wurde. Durch die Olivenöl-Diät konnte eine Reduktion der Leberschädigung erzielt werden. Interessant wäre daher die Untersuchung, wie eine Diät reich an nativem Olivenöl eine NAFLD bei homozygotem Träger der *PNPLA3*-Genvariante p.1148M beeinflusste.

## **5.2 *PNPLA3*-Variante und deren Einfluss auf die freien Fettsäuren im Serum**

Freie Fettsäuren sind unveresterte Fettsäuren, die in Nahrungsmitteln oder im Organismus vorliegen. Sie können über die Nahrungsaufnahme, endogene Bildung oder aus dem viszeralen Fett in die Leber gelangen. Hier werden sie entweder verestert und als Triglyzeride in der Leber gelagert, sie gelangen nach Anlagerung von ApoB100 als VLDL in die Blutbahn, oder sie werden besonders in Fastenphasen mittels  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien zu Ketonkörpern umgewandelt. Kommt es zu einer vermehrten Aufnahme oder zu einem verminderten Abbau von freien Fettsäuren entwickelt sich eine hepatische Steatose.

Die zunehmende hepatische Steatose bei Patienten mit der Risikovariante des *PNPLA3*-Gens ist mit einem verminderten intrahepatischen Lipidumbau verbunden. Die Enzymdegradation durch Ubiquitinierung ist gestört. Stattdessen kommt es zur Akkumulation in Lipidtröpfchen, was zu einer zunehmenden Zahl und Größe dieser Tröpfchen führt [4]. Bei der Risikovariante des *PNPLA3*-Gens geht die intrahepatische Lipidakkumulation häufig mit einer erhöhten Verfügbarkeit von Fettsäuren einher, so zum Beispiel nach einer Omega-3-Supplementation. Rausch et al. [45] weisen darauf hin, dass bei der Risikovariante der gestörte intrahepatische Lipidumbau die Folge von einer reduzierten Fettsäuremobilisation ist. Folglich ist der reduzierte Umsatz von Lipiden bei der Risikogruppe eine mögliche Erklärung für die steigenden Konzentrationen der freien Fettsäuren, die im Serum postinterventionell bei unseren Studienteilnehmern nachgewiesen wurden. Diese Beobachtungen könnten die signifikanten Unterschiede der Konzentrationen der freien Fettsäuren im Serum mit deutlich niedrigeren Werten vor der Intervention bei der Risikogruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe erklären. Zusätzlich konnte ein unterschiedliches Ansprechen der Konzentrationen der freien Fettsäuren auf die Omega-3-Supplementation nachgewiesen werden. So konnte im Vergleich zwischen den beiden *PNPLA3* Genotypgruppen ein nicht signifikanter Anstieg der freien Fettsäuren von 9% bei der p.1148M Variante und eine signifikante Reduktion der freien Fettsäuren von 28% bei der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Im Ernährungsprotokoll ist die Aufnahme von Ölsäure und Linolensäure sowie der freien Fettsäuren insgesamt erhöht. Allerdings ist hier die größere Menge der freien Fettsäuren jeweils von der Gruppe mit der p.1148M Variante des *PNPLA3*-Gens konsumiert worden.

Die signifikante Abnahme der Konzentration der freien Fettsäuren im Serum bei der Kontrollgruppe spiegelt den gesundheitlichen Nutzen der Omega-3-Fettsäuren-Supplementation wider. Im Gegensatz dazu konnte bei der Risikogruppe des *PNPLA3*-Gens ein potentiell schädlicher Effekt durch die Omega-3-Supplementation beobachtet werden, der durch die *PNPLA3*-abhängigen Mechanismen hervorgerufen wird. Ein möglicher Grund dafür, dass der Anstieg der Konzentrationen der freien Fettsäuren im Serum bei der Risikogruppe kein signifikantes Ergebnis zeigt, können der kleine Stichprobenumfang und die eher kurze Dauer der Supplementation von vier Wochen sein.

Weiterhin kam es zu einem Anstieg des Nüchterninsulin-Spiegels zum Zeitpunkt T1 in der Risikogruppe und zu einer Reduktion bei der Kontrollgruppe. Die Ketonkörperkonzentration sowie die Konzentrationen für Acetoacetat und Betahydroxybutyrat spiegeln diese Veränderungen wider. Diese Veränderungen entsprechen den Änderungen der Konzentrationen der freien Fettsäuren. Solange wir nicht die genaue Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Serum kennen, können wir keine funktionellen Zusammenhänge zwischen den freien Fettsäuren, Insulin und der Ketonkörperproduktion herstellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die komplexen Interaktionen zwischen freien Fettsäuren, Insulin und Ketonkörperproduktion.

### **5.3 Limitationen bei der Studiendurchführung und im Studiendesign**

Eine mögliche Limitation der Studie ist der kleine Stichprobenumfang von insgesamt zwanzig Studienteilnehmern. Anhand der Betrachtung ähnlicher Interventionsstudien, bei denen der diätetische Einfluss von Lipiden auf die Lebersteatose untersucht wurde, kalkulierten wir mit einem Stichprobenumfang von zehn Patienten pro Gruppe. Dies war eine Schätzung und kann nicht genau auf diese Interventionsstudie angewandt werden, da in den Vergleichsstudien unterschiedliche Methoden verwendet wurden, um den Fettgehalt der Leber zu bestimmen. Es lagen nicht genug Daten vor, um vor Studienbeginn genau bestimmen zu können, wie groß der Stichprobenumfang und die Power sein müssen, um die zu erwartenden Veränderungen des CAP-Wertes belegen zu können. Eine weitere mögliche Limitation dieser Pilotstudie ist die Dauer der Supplementation. Scorletti und Kollegen [51] erzielten in ihrer randomisierten kontrollierten Studie Ergebnisse, die eine signifikante Zunahme der Lebersteatose bei den Patienten mit Adiponutrin p.I148M-Variante nach 15-18 Monaten Omega3-Supplementation zeigten. Im Durchschnitt lag der Leberfettgehalt bei den Patienten mit der p.I148M *PNPLA3*-Variante nach der Intervention um 10% höher als bei der Wildtyp-Gruppe.

In einer Studie von Fujimori und Kollegen [21] wurde die Aussagekraft der CAP-Messergebnisse untersucht. Sie verglichen bei 82 Patienten, bei denen zuvor eine Leberbiopsie durchgeführt wurde, das histologische Bild mit der CAP-Messung. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation der Messergebnisse bei Patienten mit einem BMI < 28 kg/m<sup>2</sup>. Bei Patienten mit einem BMI >28 kg/m<sup>2</sup> ließ sich keine Korrelation mit der histologisch nachgewiesenen Menge an Leberfetttröpfchen nachweisen. In unserer Interventionsstudie haben sieben Patienten mit BMI-Werten > 28 kg/m<sup>2</sup> teilgenommen. Dies könnte zu einer Verzerrung der gemessenen CAP-Werte geführt haben.

Des Weiteren war die Eingangsvoraussetzung, dass vor und während der Intervention die gleichen Ernährungsgewohnheiten beibehalten werden sollten. In der Auswertung der Ernährungsprotokolle ist allerdings ersichtlich, dass die Energiezufuhr mit Zufuhr von Eiweiß, Ballaststoffen, Kohlenhydraten und Fett vor Beginn der Intervention deutlich höher war als während der Intervention. Dieser ernährungsabhängige Effekt könnte auch zur Verzerrung der gemessenen CAP-Werte und der Parameter im Blut geführt haben.

#### **5.4 Schlussfolgerungen und Empfehlung an Patienten mit *PNPLA3* p.I148M-Risikoallele**

Mit diesem Studienergebnis ist eine Empfehlung für oder gegen eine Omega-3-Intervention bei NAFLD mit der Adiponutrin-Variante nicht möglich. Dagegen konnte in einer post hoc-Analyse nachgewiesen werden, dass Patienten, die Träger der Adiponutrin-Variante sind, stärker von einer Lebensstiländerung zur Behandlung der NAFLD als Träger des Wildtyp-Allels des *PNPLA3*-Gens profitieren [53]. Demnach sollten Patienten mit NAFLD und besonders diejenigen mit der Adiponutrin p.I148M-Variante zu einer Lebensstilmodifikation durch körperliche Aktivität und Ernährungsumstellung (Verzicht auf gezuckerte Getränke, Fruktose und gesättigte Fettsäuren) ermutigt werden [71]. Nach den Ergebnissen von Scorletti et al. [46] sollten Patienten mit NAFLD und *PNPLA3* p.I148M-Allel die Aufnahme ungesättigter Fettsäuren reduzieren.

Als Behandlungsansatz ist bei stark fettleibigen Patienten, die durch Lebensstiländerung mit körperlicher Aktivität und diätetischen Maßnahmen keine Gewichtsreduktion erzielen können, eine bariatrische Operation möglich [22]. In einer Studie wurde bei adipösen Patienten mit einer NAFLD, die sich einer bariatrischen Operation unterzogen, der Verlauf des intrahepatischen Fettgehalts untersucht. Hierbei zeigte sich, dass gerade das Vorliegen des *PNPLA3* p.I148M Allels nach einer bariatrischen Operation mit einer schnelleren Abnahme der Lebersteatose im Vergleich zu den Trägern des Wildtyp-Allels einherging [30]. Bezugnehmend auf die Studie von Varela-Lopez und Kollegen [59] ist zu überlegen, ob eine

Intervention mit einfach ungesättigtem Olivenöl bei Patienten mit NAFLD Verbesserungen bezüglich Leberfunktion, Steatose, Inflammation und Fibrose erzielen könnte. Im Rahmen der in dieser Studie nachgewiesenen negativen Ergebnisse sollten die nutrigenomischen und metabolischen Effekte von ungesättigten Fettsäuren und insbesondere von Omega-3-Fettsäuren bei Trägern der *PNPLA3* p.I148M Risikovariante weiter untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Allard, J.P. et al. 2008. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *Journal of Hepatology*. 48, 2 (2008), 300–307. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.09.009>.
- [2] Alvarez, D. et al. 2015. Meal ingestion markedly increases liver stiffness suggesting the need for liver stiffness determination in fasting conditions. *Gastroenterologia y Hepatologia*. 38, 7 (2015), 431–435. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.01.009>.
- [3] Babor, T. et al. 2001. The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for use in primary care. *Geneva: World Health Organization*. (2001), 1–40. DOI:<https://doi.org/10.1177/0269881110393051>.
- [4] BasuRay, S. et al. 2017. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*. 66, 4 (2017), 1111–1124. DOI:<https://doi.org/10.1002/hep.29273>.
- [5] Berzigotti, A. et al. 2013. Effect of Meal Ingestion on Liver Stiffness in Patients with Cirrhosis and Portal Hypertension. *PLoS ONE*. 8, 3 (2013). DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058742>.
- [6] Blachier, M. et al. 2013. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. 58, 3 (2013), 593–608. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>.
- [7] Bosy-Westphal, A. et al. 2017. Quantification of whole-body and segmental skeletal muscle mass using phase-sensitive 8-electrode medical bioelectrical impedance devices. *European Journal of Clinical Nutrition*. 71, 9 (2017), 1061–1067. DOI:<https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.27>.
- [8] Boyraz, M. et al. 2015. Long-Term Treatment with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids as a Monotherapy in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 7, 2 (2015), 121–127. DOI:<https://doi.org/10.4274/jcrpe.1749>.
- [9] Bozzetto, L. et al. 2012. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 35, 7 (2012), 1429–1435. DOI:<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2337/dc12-0033>.
- [10] Chalasani, N. et al. 2018. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 67, 1 (2018), 328–357. DOI:<https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- [11] Chalasani, N. et al. 2017. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. (2017). DOI:<https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- [12] Chinchilla-López, P. et al. 2018. More evidence for the genetic susceptibility of Mexican population to nonalcoholic fatty liver disease through PNPLA3. *Annals of Hepatology*. 17, 2 (2018), 250–255. DOI:<https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.8644>.
- [13] Cohen, J.C. et al. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, NY)*. 332, 6037 (2011), 1519–1523. DOI:<https://doi.org/10.1126/science.1204265>.

- [14] Cortez-Pinto, H. et al. 2006. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clinical Nutrition*. 25, 5 (2006), 816–823.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.01.027>.
- [15] Dhalla, S. and Kopec, J.A. 2007. The CAGE questionnaire for alcohol misuse: A review of reliability and validity studies. *Clinical and Investigative Medicine*.
- [16] Dubuquoy, C. et al. 2013. PNPLA3, A genetic marker of progressive liver disease, Still hiding its metabolic function? *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*.
- [17] Dybek, I. et al. 2006. The Reliability and Validity of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) in a German General Practice Population Sample. *Journal of Studies on Alcohol*. 12, 3 (2006), 473–481.  
DOI:<https://doi.org/10.15288/jsa.2006.67.473>.
- [18] Eslam, M. et al. 2017. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*.
- [19] European Association for the Study of the Liver (EASL) et al. 2016. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 64, 6 (2016), 1388–402.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
- [20] Ewing, J.A. 1984. Detectiong alcoholism: The CAGE questionnaire. *Journal of the American Medical Association*. 252, 14 (1984), 1905–1907.  
DOI:<https://doi.org/10.1001/jama.1984.03350140051025>.
- [21] Fujimori, N. et al. 2016. Controlled attenuation parameter is correlated with actual hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease with none-to-mild obesity and liver fibrosis. *Hepatology Research*. 46, 10 (2016), 1019–1027.  
DOI:<https://doi.org/10.1111/hepr.12649>.
- [22] Halmos, T. and Suba, I. 2017. [Non-alcoholic fatty liver disease, as a component of the metabolic syndrome, and its causal correlations with other extrahepatic diseases]. *Orvosi hetilap*. 158, 52 (2017), 2051–2061.  
DOI:<https://doi.org/10.1556/650.2017.30936>.
- [23] Hodson, L. et al. 2017. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: A pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 71, 8 (2017), 973–979.  
DOI:<https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.9>.
- [24] Huang, Y. et al. 2010. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 17 (2010), 7892–7897.  
DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.1003585107>.
- [25] Huang, Y. et al. 2011. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry*. 286, 43 (2011), 37085–37093.  
DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290114>.
- [26] Jurado-Ruiz, E. et al. 2017. An extra virgin olive oil rich diet intervention ameliorates the nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western-type” diet in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*. 61, 3 (2017).  
DOI:<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600549>.
- [27] Kalafati, I.P. et al. 2018. Fish intake interacts with TM6SF2 gene variant to affect NAFLD risk: results of a case–control study. *European Journal of Nutrition*.

- [28] Kim, D. et al. 2018. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome. *Clinics in Liver Disease*.
- [29] Krawczyk, M. et al. 2013. PNPLA3 -associated steatohepatitis: Toward a gene-based classification of fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*. 33, 4 (2013), 369–379. DOI:<https://doi.org/10.1055/s-0033-1358525>.
- [30] Krawczyk, M. et al. 2016. PNPLA3 p.I148M variant is associated with greater reduction of liver fat content after bariatric surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 12, 10 (2016), 1838–1846. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.soard.2016.06.004>.
- [31] Krawczyk, M. et al. 2011. Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: Non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*. 55, 2 (2011), 299–306. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.042>.
- [32] Kumari, M. et al. 2012. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metabolism*. 15, 5 (2012), 691–702. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>.
- [33] Kyle, U.G. et al. 2004. Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 23, (2004), 1430–1453. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.09.012>.
- [34] Kyle, U.G. et al. 2004. Bioelectrical impedance analysis - Part I: Review of principles and methods. *Clinical Nutrition*. 23, 5 (2004), 1226–1243. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.06.004>.
- [35] Leung, C. et al. 2016. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.
- [36] Liu, K. et al. 2017. Prognostic Value of Controlled Attenuation Parameter by Transient Elastography. *The American journal of gastroenterology*. 112, 12 (2017), 1812–1823. DOI:<https://doi.org/10.1038/ajg.2017.389>.
- [37] Liu, Z. et al. 2016. Overexpression of variant PNPLA3 gene at I148M position causes malignant transformation of hepatocytes via IL-6-JAK2/STAT3 pathway in low dose free fatty acid exposure: A laboratory investigation in vitro and in vivo. *American Journal of Translational Research*. 8, 3 (2016), 1319–1338.
- [38] M., L. et al. 2010. Performance of unidimensional transient elastography in staging non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*.
- [39] Matthews, D.R. et al. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28, 7 (1985), 412–419. DOI:<https://doi.org/10.1007/BF00280883>.
- [40] Nahon, P. et al. 2008. Assessment of liver fibrosis using transient elastography in patients with alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*. 49, 6 (2008), 1062–1068. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.011>.
- [41] Nobili, V. et al. 2014. Influence of dietary pattern, physical activity, and I148M PNPLA3 on steatosis severity in at-risk adolescents. *Genes and Nutrition*. 9, 3 (2014). DOI:<https://doi.org/10.1007/s12263-014-0392-8>.
- [42] Oscarsson, J. et al. 2018. Effects of free omega-3 carboxylic acids and fenofibrate on liver fat content in patients with hypertriglyceridemia and non-alcoholic fatty liver disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Lipidology*. 12, 6 (2018), 1390–1403.e4. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.08.003>.

- [43] Parker, H.M. et al. 2012. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*.
- [44] Piñero, F. et al. 2018. Fatty liver disease, an emerging etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina. *World Journal of Hepatology*. 10, 1 (2018), 41–50. DOI:<https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i1.41>.
- [45] Rausch, V. and Mueller, S. 2018. Suppressed fat mobilization due to PNPLA3 rs738409 -associated liver damage in heavy drinkers: The liver damage feedback hypothesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 153–172.
- [46] Roeb, E. et al. 2015. S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen AWMF Register Nr. 021-025 Version Januar 2015, Erstauflage. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 53, 7 (2015), 668–723. DOI:<https://doi.org/10.1055/s-0035-1553193>.
- [47] Romeo, S. et al. 2008. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*. 40, 12 (2008), 1461–1465. DOI:<https://doi.org/10.1038/ng.257>.
- [48] Sandrin, L. et al. 2003. Transient elastography: A new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 29, 12 (2003), 1705–1713. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2003.07.001>.
- [49] Sasso, M. et al. 2010. Controlled attenuation parameter (CAP): A novel VCTE™ guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: Preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 36, 11 (2010), 1825–1835. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.005>.
- [50] Sasso, M. et al. 2012. Novel controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of steatosis using Fibroscan((R)): validation in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 19, 4 (2012), 244–253. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01534.x>.
- [51] Scorletti, E. et al. 2015. Treating liver fat and serum triglyceride levels in NAFLD, effects of PNPLA3 and TM6SF2 genotypes: Results from the WELCOME trial. *Journal of Hepatology*. 63, 6 (2015), 1476–1483. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.036>.
- [52] Sekiya, M. et al. 2003. Polyunsaturated Fatty Acids Ameliorate Hepatic Steatosis in Obese Mice by SREBP-1 Suppression. *Hepatology*. 38, 6 (2003), 1529–1539. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.hep.2003.09.028>.
- [53] Shen, J. et al. 2014. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 30, (2014), 1–38. DOI:<https://doi.org/10.1111/jgh.12656>.
- [54] Shen, J. et al. 2015. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 30, 1 (2015), 139–146. DOI:<https://doi.org/10.1111/jgh.12656>.
- [55] Sookoian, S. and Pirola, C.J. 2011. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 53, 6 (2011), 1883–1894. DOI:<https://doi.org/10.1002/hep.24283>.
- [56] Stojkovic, I.A. et al. 2014. The PNPLA3 Ile148Met interacts with overweight and

- dietary intakes on fasting triglyceride levels. *Genes and Nutrition*. 9, 2 (2014). DOI:https://doi.org/10.1007/s12263-014-0388-4.
- [57] Trunečka, P. et al. 2018. Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study. *Digestive and Liver Disease*.
- [58] Valenti, L. et al. 2010. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 51, 4 (2010), 1209–1217. DOI:https://doi.org/10.1002/hep.23622.
- [59] Varela-Lopez, A. et al. 2018. Gene pathways associated with mitochondrial function, oxidative stress and telomere length are differentially expressed in the liver of rats fed lifelong on virgin olive, sunflower or fish oils. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 52, (2018). DOI:https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.09.007.
- [60] Wang, C.Y. et al. 2014. Diagnostic value of controlled attenuation parameter for liver steatosis in patients with chronic hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 30 (2014), 10585–10590. DOI:https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10585.
- [61] Watson, H. et al. 2018. A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. *Gut*. 67, 11 (2018), 1974–1983. DOI:https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314968.
- [62] Wójcik, C. et al. 2014. Modulation of adipocyte differentiation by omega-3 polyunsaturated fatty acids involves the ubiquitin-proteasome system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18, 4 (2014), 590–599. DOI:https://doi.org/10.1111/jcmm.12194.
- [63] Wong, V.W.S. et al. 2010. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 51, 2 (2010), 454–462. DOI:https://doi.org/10.1002/hep.23312.
- [64] Wong, V.W.S. et al. 2017. Validity criteria for the diagnosis of fatty liver by M probe-based controlled attenuation parameter. *Journal of Hepatology*. 67, 3 (2017), 577–584. DOI:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.005.
- [65] Yilmaz, Y. et al. 2013. Noninvasive detection of hepatic steatosis in patients without ultrasonographic evidence of fatty liver using the controlled attenuation parameter evaluated with transient elastography. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 25, 11 (2013), 1330–1334. DOI:https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283623a16.
- [66] Yki-Järvinen, H. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2, 11 (2014), 901–910.
- [67] Yki-Järvinen, H. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2, 11 (2014), 901–910. DOI:https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70032-4.
- [68] Yoneda, M. et al. 2008. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Digestive and Liver Disease*. 40, 5 (2008), 371–378. DOI:https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.10.019.
- [69] Yu, L. et al. 2017. The effect of omega-3 unsaturated fatty acids on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Pakistan Journal of Medical Sciences*.
- [70] Zelber-Sagi, S. et al. 2007. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic

fatty liver disease (NAFLD): A population based study. *Journal of Hepatology*. 47, 5 (2007), 711–717. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.06.020>.

- [71] Zelber-Sagi, S. et al. 2017. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. *Liver International*.
- [72] Zhu, F.-S. et al. 2008. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia. *World journal of gastroenterology : WJG*. 14, 41 (2008), 6395–6400. DOI:<https://doi.org/10.3748/wjg.14.6395>.
- [73] Zivkovic, A.M. et al. 2007. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *The American journal of clinical nutrition*. 86, 2 (2007), 285–300. DOI:<https://doi.org/86/2/285> [pii].

## 7 Publikation/Dank

Lammert F., Stokes C.S., Kuttner C.-S., Mancina R., Wagenpfeil G. *Four-Week Omega-3 Supplementation in Carriers of the Prosteatotic PNPLA3 p.I148M Genetic Variant: An Open-Label Study. Lifestyle Genomics*, 2019;12(1-6):10-17.

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Lammert und Frau Prof. Dr. C. S. Stokes für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

## **8 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

