

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Jörn Schattenberg

**Der Einfluss des Darmmikrobioms und einer genetischen  
Prädisposition auf die Lebensqualität bei Patienten mit  
metabolischer dysfunktions-assoziiertes steatotischer  
Lebererkrankung (MASLD)**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von

**Jasmina Hähner**

geboren am 29.10.1996 in Waldbröl

Tag der Promotion: 01. April 2025

Dekan: Uni.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Marcin Jan Krawczyk

Prof. Dr. Sören Leif Becker

*Für Mama*

*Famiglia è dove la vita inizia  
e l'amore non finisce mai*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>2</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>3</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>VORWORT</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>METABOLISCHE DYSFUNKTIONS-ASSOZIIERTE STEATOTISCHE LEBERERKRANKUNG (MASLD)</b> .....	<b>6</b>
7.1	DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE.....	6
7.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE.....	7
7.3	GENETISCHE FAKTOREN.....	8
7.3.1	<i>PNPLA3</i> .....	8
7.3.2	<i>MBOAT7</i> .....	9
7.3.3	<i>TM6SF2</i> .....	10
7.4	KLASSIFIKATION .....	10
7.5	KLINIK UND DIAGNOSTIK.....	12
7.6	THERAPIE UND PROGNOSE .....	14
<b>8</b>	<b>SHORT-CHAIN FATTY ACIDS (SCFAS)</b> .....	<b>16</b>
8.1	DEFINITION UND KLASSIFIKATION .....	16
8.2	FUNKTION .....	17
8.3	SCFAS UND AFFEKTIVE STÖRUNGEN .....	20
<b>9</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>22</b>
<b>10</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
10.1	PATIENTENKOLLEKTIV UND STUDIENABLAUF.....	23
10.2	BESTIMMUNG DER PATIENTENSTAMMDATEN SOWIE DES BODY-MASS-INDEX.....	25
10.3	TRANSIENTE ELASTOGRAPHIE (FIBROSCAN).....	26
10.4	DNA-ISOLATION.....	27
10.5	GENOTYPISIERUNG DER RISIKOARIANTEN FÜR FETTLÉBERERKRANKUNGEN .....	27
10.6	MESSINSTRUMENTE DER LEBENSQUALITÄT .....	33
10.6.1	PHQ-9: Patient Health Questionnaire-9.....	33
10.6.2	GAD-7: Generalized Anxiety Disorder 7.....	34
10.6.3	FIS-D: Fatigue Impact Scale .....	35
10.6.4	SF-12: Short Form (12) Health Survey .....	36
10.7	ANALYSE VON SCFAS MITTELS GAS-CHROMATOGRAPHIE.....	37
10.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	39
<b>11</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
11.1	CHARAKTERISTIKA DER PATIENTENKOHORTE.....	40
11.2	GENOTYPISIERUNG FÜR DIE RISIKOGENE: <i>MBOAT7</i> , <i>PNPLA3</i> UND <i>TM6SF2</i> .....	51
11.3	UNTERSCHIEDE IN BEZUG AUF DIE DEPRESSIVITÄT, ANGST, MÜDIGKEIT UND DER ALLGEMEINEN LEBENSQUALITÄT UNTER DEM ASPEKT DES GESCHLECHTS UND DER MASLD 53	
11.4	SHORT-CHAIN FATTY ACIDS IM STUHL .....	60

11.4.1	Geschlechterspezifische Unterschiede .....	61
11.4.2	Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an SCFAs .....	62
11.4.3	SCFAs als mögliche Einflussfaktoren auf die Lebensqualität, Depressionen, Angst und Müdigkeit.....	65
11.4.4	Fäkale Propansäure korreliert mit einer stärker ausgeprägten Depression, Angst sowie mit vermehrter Müdigkeit .....	66
11.4.5	<i>PNPLA3</i> p.I148M Variante als möglicher Einflussfaktor auf SCFAs .....	70
11.4.6	Einfluss von Metformin auf das intestinale Mikrobiom .....	72
11.4.7	SCFAs korrelieren mit der Thrombozytenanzahl im Blut .....	75
<b>12</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
12.1	PATIENTEN MIT MASLD LEIDEN HÄUFIGER UNTER SCHWEREN DEPRESSIONEN, ÄNGSTEN UND HABEN EINE SCHLECHTERE MENTALE LEBENSQUALITÄT.....	76
12.2	PATIENTEN MIT MASLD HABEN HÖHERE KONZENTRATIONEN VON SHORT-CHAIN FATTY ACIDS IM STUHL .....	79
12.3	SHORT-CHAIN FATTY ACIDS IM STUHL KORRELIEREN MIT DEPRESSIONEN, ANGST, MÜDIGKEIT UND EINER SCHLECHTEREN MENTALEN LEBENSQUALITÄT.....	82
12.4	METFORMIN BEEINFLUSST DIE KONZENTRATIONSVERHÄLTNISSE VON FÄKALEN SHORT-CHAIN FATTY ACIDS .....	84
12.5	SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	85
<b>13</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>14</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>15</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>100</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

3-methyl	3-Methylvaleriansäure
4-methyl	4-Methylvaleriansäure
AMPK	AMP activated protein kinase
ALD	Alcohol-associated liver disease
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
C2	Essigsäure
C3	Propansäure
C4i	Isobuttersäure
C4n	Buttersäure
C5i	Isovaleriansäure
C5	Valeriansäure
C6	Capronsäure
C7	Heptansäure
CAP	Controlled attenuation parameter
CCL	CC-Chemokin-Ligand
DILI	Drug-induced Liver Injury
DMS-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Health Disorders
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	6-Carboxyfluorescein
FFAR	Free fatty acid receptor

FIS-D	Fatigue Impact Scale – Deutsch
FLI	Fettleberindex
g-GT	Gamma-Glutamyltransferase
GAD-7	Generalized Anxiety Disorder 7
GLP-1	Glukagon-like Peptide 1
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBA1c	Hämoglobin A1c
HE	Hepatische Enzephalopathie
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
HCL	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAC	Histondeacetylase
HDL	High-Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSI	Hepatischer Steatose Index
HSL	Hormone-sensitive lipase
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
IQR	Interquartilsbereich
KHK	Koronare Herzkrankheit
LC	Leberzirrhose
LCFA	Long-chain fatty acid
LPIAT1	Lysophosphatidylinositol acyltransferase 1
LPS	Lipopolysaccharide
LSD-1	Lysine-specific demethylase 1

LSM	Liver stiffness measurement
MASH	Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease
MBOAT7	Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 7
MCFA	Medium-chain fatty acid
MCS-12	Mental Score des SF-12
Met-ALD	MASLD and increasing alcohol intake
MGB	Minor Groove Binder
MOS	Medical Outcomes Study
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCL	Nucleus
NFG	Nicht fluoreszierende Quencher
NF-kB	Nuclear factor of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase chain reaction
PCS-12	Physical Score des SF-12
PGE-2	Prostaglandin E2
PH-Wert	Pondus hydrogenii Wert
PHQ-9	Patient Health Questionnaire 9
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
RPM	Revolutions per minute
PYY	Peptide YY
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCFA	Short chain fatty acid

SF-12	Short Form (12) Health Survey
SLD	Steatotic liver disease
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
TE	Transiente Elastographie
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
VIC	384-Well Dye Calibration Plate
VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> - Pathophysiologie und Risikofaktoren von MASLD.....	8
<b>Abbildung 2</b> - Histologische Merkmale von chronischen Lebererkrankungen. ....	12
<b>Abbildung 3</b> – Ultraschalldiagnostik einer Fettlebererkrankung.....	13
<b>Abbildung 4</b> - Allelische Diskriminierung für PNPLA3 p.I148M (1).....	29
<b>Abbildung 5</b> - Allelische Diskriminierung für PNPLA3 p.I148M (2).....	30
<b>Abbildung 6</b> - Allelische Diskriminierung für MBOAT7 p.G17E. ....	31
<b>Abbildung 7</b> - Allelische Diskriminierung für TM6SF2 p.E167K. ....	32
<b>Abbildung 8</b> - Sub- und Summenskalen des SF-12. ....	37
<b>Abbildung 9</b> - Häufigkeitsverteilung des Alters innerhalb der gesamten Kohorte. ....	40
<b>Abbildung 10</b> - Prävalenz der MASLD bei Männern und Frauen innerhalb der Kohorte.....	41
<b>Abbildung 11</b> - Prävalenz von Leberfibrose bei Männern und Frauen innerhalb der Kohorte. .....	41
<b>Abbildung 12</b> – Verteilung der verschiedenen BMI-Klassen gemäß der WHO innerhalb der Kohorte.....	43
<b>Abbildung 13</b> - BMI-Werte bei Patienten mit und ohne MASLD.....	44
<b>Abbildung 14</b> - BMI-Werte bei Patienten mit und ohne Leberfibrose. ....	45
<b>Abbildung 15</b> – CAP-Werte bei Patienten mit und ohne MASLD.....	46
<b>Abbildung 16</b> – LSM-Werte bei Patienten mit und ohne Leberfibrose.....	46
<b>Abbildung 17</b> – CAP-Werte bei Patienten verschiedener Gewichtsklassen gemäß dem BMI. .....	47
<b>Abbildung 18</b> – Die Einnahme von Metformin ist mit einem höheren CAP-Wert assoziiert.	50
<b>Abbildung 19</b> - LSM-Werte bei MBOAT7 p.G17E Genotypen.....	53
<b>Abbildung 20</b> – Patienten mit MASLD haben eine schlechtere mentale Lebensqualität. ....	56
<b>Abbildung 21</b> – Patienten mit MASLD leiden unter einer stärkeren Müdigkeit als Patienten ohne MASLD. ....	56
<b>Abbildung 22</b> - Korrelation zwischen höheren CAP-Werten und einer schlechteren mentalen Lebensqualität. ....	57
<b>Abbildung 23</b> - Patienten mit schwerer Angstsymptomatik haben höhere CAP-Werte.....	58
<b>Abbildung 24</b> - Geschlechterspezifische Konzentrationsunterschiede der fäkalen Essigsäure. .....	62
<b>Abbildung 25</b> - Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an fäkaler Essigsäure. .....	63

<b>Abbildung 26</b> - Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an fäkaler Propansäure. .....	63
<b>Abbildung 27</b> – Isovaleriansäure im Stuhl bei Patienten mit und ohne MASLD.....	64
<b>Abbildung 28</b> – Korrelation zwischen höheren Propansäurekonzentrationen im Stuhl und einer stärker ausgeprägten Depression.....	67
<b>Abbildung 29</b> – Patienten mit schwerer Angstsymptomatik haben höhere Propansäurekonzentrationen im Stuhl.....	68
<b>Abbildung 30</b> - Korrelation zwischen höheren Propansäurekonzentrationen im Stuhl und einer stärker ausgeprägten Angst.....	68
<b>Abbildung 31</b> - Korrelation zwischen der fäkalen Propansäurekonzentration und einer stärker ausgeprägten Müdigkeit.....	69
<b>Abbildung 32</b> - Fäkale Buttersäure bei PNPLA3 p.I148M Genotypen.....	70
<b>Abbildung 33</b> - Fäkale Isovaleriansäure bei PNPLA3 p.I148M Genotypen.....	71
<b>Abbildung 34</b> – Zusammenhang zwischen der Metformin-Einnahme und einer höheren Essigsäurekonzentration im Stuhl.....	73
<b>Abbildung 35</b> - Zusammenhang zwischen der Metformin-Einnahme und einer höheren Propansäurekonzentration im Stuhl.....	74
<b>Abbildung 36</b> - Korrelation zwischen fäkaler Essigsäure und der Anzahl an Thrombozyten im Blut.....	75

### 3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> - Charakteristika der Patientenkohorte. ....	24
<b>Tabelle 2</b> – BMI-Klassifikation gemäß der WHO.....	25
<b>Tabelle 3</b> - Herstellung des Mastermixes. ....	28
<b>Tabelle 4</b> - PCR-Schritte.....	28
<b>Tabelle 5</b> - Auswertungsschema des PHQ-9. ....	34
<b>Tabelle 6</b> - Auswertungsschema des GAD-7. ....	35
<b>Tabelle 7</b> - Häufigkeiten der Genotypen innerhalb der Patientenkohorte. ....	42
<b>Tabelle 8</b> - Häufigkeitsverteilung der BMI-Kategorien innerhalb der Patientenkohorte. ....	43
<b>Tabelle 9</b> – Häufigkeitstabelle von Diabetes mellitus innerhalb des Patientenkollektivs. ....	48
<b>Tabelle 10</b> – Prävalenz von Diabetes mellitus bei Patienten mit und ohne MASLD.....	48
<b>Tabelle 11</b> – Prävalenz von Diabetes mellitus bei Patientin mit und ohne Leberfibrose. ....	49
<b>Tabelle 12</b> – CAP und LSM-Werte bei PNPLA3, MBOAT7 und TM6SF2 Genotypen. ....	52
<b>Tabelle 13</b> - Häufigkeitstabelle der verwendeten Messinstrumente zur Bewertung der Lebensqualität in kategorischen Untergruppen.....	54
<b>Tabelle 14</b> - Korrelationen zwischen den verwendeten Messinstrumenten der Lebensqualität. ....	59
<b>Tabelle 15</b> - Übersichtstabelle der gemessenen fäkalen SCFAs in mM bei Patienten mit und ohne MASLD. ....	60
<b>Tabelle 16</b> - Übersichtstabelle der gemessenen fäkalen SCFAs in % bei Patienten mit und ohne MASLD. ....	61
<b>Tabelle 17</b> - Fäkale SCFA-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden von Depressionen. ....	65
<b>Tabelle 18</b> - Fäkale SCFA-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden von Angst. ....	66
<b>Tabelle 19</b> – SCFAs Konzentrationen unter dem Aspekt der Metformin-Einnahme.....	72

## 4 Zusammenfassung

Die metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung (MASLD), früher NAFLD, ist die häufigste chronische Lebererkrankung mit einer multifaktoriellen Genese. Hauptursache stellt vor allem das metabolische Syndrom dar. Dieses setzt sich unter anderem aus abdomineller Fettleibigkeit, arterieller Hypertonie, einer Fettstoffwechselstörung mit Hypertriglyceridämie und Diabetes mellitus zusammen. In selteneren Fällen kann eine MASLD auch durch bestimmte Medikamente, wie z.B. Amiodaron und Glucocorticoiden oder durch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, ausgelöst werden. Da die Prävalenz der MASLD besonders in den Industrienationen mit ca. 30% sehr hoch ist und die genauen Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, ist es essenziell wichtig, weitere Einflussfaktoren zur Entstehung einer MASLD zu untersuchen. Patienten mit steatotischer Lebererkrankung haben oft eine eingeschränkte Lebensqualität oder leiden sogar an Depressionen und Ängsten. Frühere Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom und der Lebensqualität dieser Patientengruppe hin.

Daher befasst sich die vorliegende Dissertation mit der Lebensqualität bei Patienten mit MASLD und setzt diese in Zusammenhang mit Metaboliten von Darmbakterien (SCFAs). Dies könnte zudem durch eine genetische Prädisposition (*PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E und *TM6SF2* p.E167K) moduliert werden.

Insgesamt wurden 78 Patienten (30 Männer, Alter zwischen 23 und 78 Jahren, 62,8 % mit MASLD) in diese Studie aufgenommen. Alle Patienten unterzogen sich einer nicht-invasiven transienten Elastographie (TE), wodurch der Grad der Steatose (mittels CAP, controlled attenuation parameter) und Fibrose (mittels LSM, liver stiffness measurement) ermittelt wurde. Um die Lebensqualität der Patienten zu messen, nutzten wir vier verschiedene Fragebögen: PHQ-9 für Depression, GAD-7 für Angst, FIS-D für Müdigkeit und SF-12 (bestehend aus einer physischen und mentalen Komponente) für die allgemeine Lebensqualität. Insgesamt erhielten wir von 45 Patienten eine Stuhlprobe (30 von Patienten mit MASLD und 15 von Kontrollpersonen), in der wir mittels Gaschromatographen kurzkettige Fettsäuren (short-chain fatty acids) gemessen haben. Zudem wurden alle Patienten für *PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E und *TM6SF2* p.E167K genotypisiert.

Wir konnten sehen, dass Patienten mit MASLD mehr als dreimal so häufig an schweren Depressionen und Ängsten litten im Vergleich zu Patienten ohne MASLD. Zudem hatten

diejenigen Patienten mit einer stärker ausgeprägten Steatose eine schlechtere mentale Lebensqualität ( $P = 0.011$ ). Die Konzentrationen an SCFAs im Stuhl waren, mit Ausnahme der Isovaleriansäure und Valeriansäure, bei Patienten mit steatotischer Lebererkrankung höher. Insbesondere Essigsäure ( $P = 0.024$ ) und Propansäure ( $P = 0.028$ ) waren in einer signifikant höheren Konzentration vorhanden. Darüber hinaus war die Propansäure auch signifikant mit Depressionen ( $P = 0.021$ ) und Angst ( $P = 0.009$ ) assoziiert. Diese Beobachtungen scheinen durch eine genetische Prädisposition moduliert zu werden, denn die genetische Variante *PNPLA3* p.I148M ist signifikant mit höherer Buttersäure ( $P = 0.042$ ) und niedriger Isovaleriansäure ( $P = 0.027$ ) im Stuhl in Verbindung zu setzen.

Unsere vorläufigen Ergebnisse deuten auf einen bemerkenswerten Zusammenhang zwischen SCFAs im Stuhl und der Lebensqualität bei Patienten mit MASLD hin. Dieser Zusammenhang scheint durch das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition moduliert zu werden. Weitere Studien in größeren Patientenkohorten sind erforderlich, um diese Beobachtungen zu bewerten.

## 5 Summary

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), formerly NAFLD, is the most common chronic liver disease with a multifactorial etiology. The main cause is metabolic syndrome which consists of abdominal obesity, arterial hypertension, a lipid metabolism disorder with hypertriglyceridemia and diabetes mellitus. In rarer cases, MASLD can also be triggered by certain medications such as amiodarone and glucocorticoids or by chronic inflammatory bowel disease. As the prevalence of MASLD is very high, particularly in industrialized nations, at around 30%, and the exact pathomechanisms are not yet fully understood, it is essential to investigate other factors that influence the development of MASLD. Patients with steatotic liver disease often have a reduced quality of life or even suffer from depression and anxiety. Previous studies have indicated a link between the gut microbiome and quality of life in this patient group.

Therefore, this dissertation focuses on the quality of life in patients with MASLD and relates it to metabolites of gut bacteria (SCFAs) and to the genetic predisposition to develop MASLD (i.e. the *PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E and *TM6SF2* p.E167K polymorphisms).

A total of 78 patients (30 men, age range 23-78 years, 62.8% with MASLD) were prospectively enrolled in this study. All patients underwent non-invasive transient elastography (TE), whereby the degree of steatosis (using CAP, controlled attenuation parameter) and fibrosis (using LSM, liver stiffness measurement) was determined. To measure the patients' quality of life, we used four different questionnaires: PHQ-9 for depression, GAD-7 for anxiety, FIS-D for fatigue and SF-12 (consisting of a physical and mental component) for overall quality of life. In total, we obtained stool samples from 45 individuals (30 with MASLD and 15 from controls) in which we measured short-chain fatty acids using gas chromatography. In addition, all patients were genotyped for *PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E and *TM6SF2* p.E167K.

We could see that patients with MASLD were three times more likely to suffer from major depression and anxiety compared to patients without MASLD. In addition, those patients with more severe steatosis had poorer mental quality of life ( $P = 0.011$ ). The concentrations of SCFAs in the stool were higher in patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, with the exception of isovaleric acid and valeric acid. In particular, the concentrations of acetic acid ( $P = 0.024$ ) and propanoic acid ( $P = 0.028$ ) were significantly higher in patients with fatty liver. Furthermore, propanoic acid was also significantly associated with depression

( $P = 0.021$ ) and anxiety ( $P = 0.009$ ). These associations seem to be modulated by a genetic predisposition: the *PNPLA3* p.I148M variant was linked to higher butyric acid ( $P = 0.042$ ) and low isovaleric acid ( $P = 0.027$ ) in stool.

Our preliminary results suggest an association between fecal SCFAs and quality of life in patients with MASLD. This association seems to be modulated by the presence of a genetic predisposition. Further studies in larger patient cohorts are needed to evaluate these observations.

## **6 Vorwort**

Im Juni 2023 wurde von der AASLD und ihren Mitgliedern eine neue Nomenklatur für Lebererkrankungen bekanntgegeben. Steatotic liver disease (SLD) dient von nun an als ein Überbegriff für Fettlebererkrankungen. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) wurde durch metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) ersetzt. Ebenso wurde die non-alcoholic steatohepatitis (NASH) durch die metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) abgelöst. ALD (Alcohol-Associated/Alcohol-related Liver Disease) repräsentiert ab jetzt den Aspekt des Alkoholkonsums. Eine MASLD mit erhöhtem Alkoholkonsum wird nun als MetALD bezeichnet.

Die vorliegende Arbeit entstand bereits vor Bekanntgabe der neuen Nomenklatur und da diese Nomenklatur neu ist, beziehen sich die in dieser Arbeit verwendeten Quellen noch auf die alten Begrifflichkeiten (NAFLD, NASH). Um dennoch die neuen Begrifflichkeiten zu integrieren, werden im Rahmen dieser Dissertation die neuen Begriffe MASLD und MASH anstelle von NAFLD und NASH verwendet.

## 7 Metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung (MASLD)

### 7.1 Definition und Epidemiologie

Die steatotische Lebererkrankung (SLD), früher nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), ist ein Sammelbegriff für alle Fettlebererkrankungen und bezieht keine Ursachen in die Begriffsdefinition mit ein. Der Begriff „nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)“ wurde erst kürzlich durch den Begriff „Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)“ abgelöst, da die alte Nomenklatur eine potenziell stigmatisierende Wirkung hatte [126].

Weltweit gilt die metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung als die häufigste chronische Lebererkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 30% [16,125,130]. Sie ist definiert als eine übermäßige Steatose in den Hepatozyten [33]. Eine MASLD liegt per Definition vor, wenn zusätzlich zur Lebersteatose mindestens eines der folgenden fünf kardiometabolischen Kriterien erfüllt wird: Bluthochdruck, Übergewicht oder Adipositas, ein gestörter Glukosestoffwechsel zum Beispiel im Rahmen eines (Prä-)Diabetes, erniedrigtes HDL-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride [126]. *Mandala et al.*, haben gezeigt, dass zunehmend auch Kinder und Jugendliche von einer MASLD betroffen sind. So beträgt die Gesamt-Prävalenz unter den Kindern und Jugendlichen schätzungsweise 10%, und unter den fettleibigen Jugendlichen ist diese mit ca. 40% nochmal deutlich höher [77,89,160].

Die klinischen Manifestationen der steatotischen Lebererkrankung können auch über die Leber hinaus gehen. Die MASLD ist als eine multifaktorielle Erkrankung anzusehen, durch deren Progression auch vermehrt extrahepatische Gewebe, wie beispielsweise das Herz-Kreislauf-System oder die Niere, geschädigt werden können (siehe Kapitel 7.5) [16]. Progressivere Formen der Fettlebererkrankung zeigen vor allem eine erhöhte Entzündungsaktivität, wie es bei der Metabolic dysfunction-associated Steatohepatitis (MASH), früher nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), der Fall ist. Unbehandelt oder durch eine starke Progression kann eine MASLD demnach in eine MASH, Fibrose oder sogar in eine Zirrhose übergehen [101]. All diese Krankheitsbilder, beziehungsweise das Krankheitsspektrum rund um die steatotische Lebererkrankung, stellen wichtige Risikofaktoren für das Auftreten von Leberkrebs, insbesondere dem HCC, dar [60,121].

## 7.2 Ätiologie und Pathophysiologie

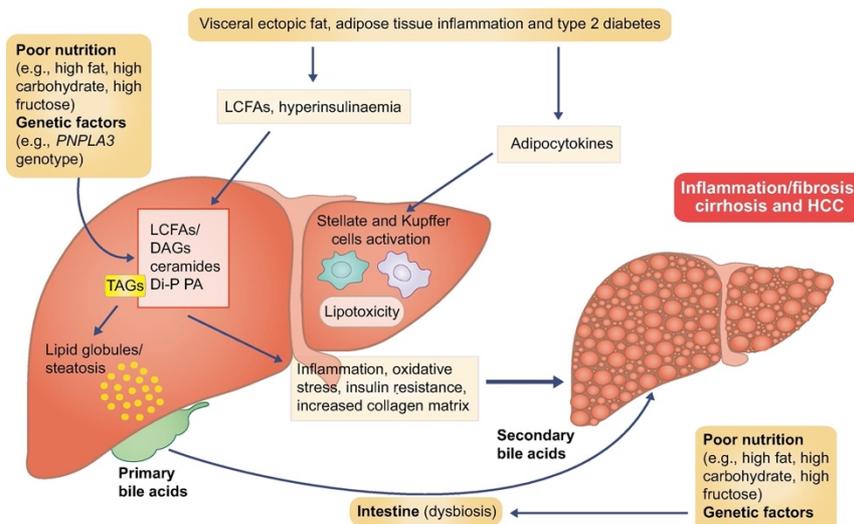
Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es handelt sich bei der MASLD jedoch, wie bereits erwähnt, um eine Erkrankung, die durch viele Faktoren und Einflüsse begünstigt wird und bei der neben dem metabolischen Syndrom auch Infektionen, genetische Faktoren sowie Essgewohnheiten und Umweltfaktoren zur Krankheitsentstehung beitragen können [15]. Eine mögliche Pathophysiologie der MASLD ist eng mit dem metabolischen Syndrom verbunden [120]. Das metabolische Syndrom lässt sich zum einen durch eine Insulinresistenz [61] und zum anderen durch die folgenden Kriterien klassifizieren: erhöhter Taillenumfang, erhöhte Triglyceride, erniedrigtes HDL-Cholesterin, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus [3]. Es stellt damit den Hauptrisikofaktor für das Auftreten einer metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung dar.

Adipositas führt unter anderem dazu, dass vermehrt freie Fettsäuren vorhanden sind [41], welche dann schließlich in den Hepatozyten gespeichert werden. Dies lässt sich auch als eine mitochondriale Dysfunktion beschreiben, welche wiederum zur Ausschüttung von toxischen Metaboliten führen kann, sowie von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und darüber hinaus auch zur Ausschüttung von einer übermäßigen Anzahl an ROS [8,122]. Eine mitochondriale Dysfunktion führt zu oxidativem Stress, welcher ebenfalls eine schädigende Wirkung auf die Hepatozyten hat und so die Entstehung von Entzündungen im Rahmen einer MASH oder einer Leberfibrose begünstigen kann [8,34].

Als zentrales Stoffwechselorgan ist die Leber unter anderem an der  $\beta$ -Oxidation, der Fettsäuresynthese sowie an der Speicherung von Fettsäuren in Form von Lipoproteinen beteiligt. Kommt es zu Störungen in einer dieser Stoffwechselwege, kann dies eine MASLD begünstigen, da es durch das Ungleichgewicht von Lipogenese und Lipidabbau zu einer Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten kommt, wobei der zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismus nur unzureichend geklärt ist [64].

Neben dem metabolischen Syndrom gibt es noch eine Reihe von weiteren Risikofaktoren wie genetischen Markern, Infektionen (z.B. HCV, HIV), Medikamenten (z.B. Methotrexat, Glucocorticoide) und der Ernährung, die das Risiko zur Ausbildung einer MASLD erhöhen können [38,120]. Dabei sind wichtige genetische Varianten insbesondere die Risikogene *PNPLA3*, *MBOAT7* und *TMS6F2* [38,71,128]. Auch die Essgewohnheiten sowie die Bewegungsaktivität spielen eine Rolle bei der Entstehung von Fettlebererkrankungen. Besonders eine hyperkalorische Ernährung führt zur Ablagerung von Triglyceriden und damit zu den oben genannten pathophysiologischen Mechanismen [26]. Zudem wird in mehreren Studien ein Zusammenhang mit dem Zuckerkonsum und Stoffwechselerkrankungen diskutiert

[65,139]. Fruktose und andere Zucker sind dafür bekannt, dass sie die Ausbildung einer Fettlebererkrankung begünstigen können. Nicht zuletzt kann der regelmäßige Verzehr von Fruktose auch zu einer Hypertonie, einer Hypertriglyceridämie und einer Insulinresistenz führen [65]. Darüber hinaus gelangt seit geraumer Zeit das Darmmikrobiom immer öfter in den Fokus von Forschungsarbeiten, die sich unter anderem auch mit der metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung beschäftigen [29,131,132].



**Abbildung 1 - Pathophysiologie und Risikofaktoren von MASLD.**

Dargestellt ist hier der Zusammenhang von viszeralem Fettgewebe, Adipositas, Diabetes mellitus Typ II sowie der Ernährung und genetischen Faktoren in Bezug auf die Entstehung einer MASLD. Durch das metabolische Syndrom kommt es unter anderem zu einer Hyperinsulinämie, welche die Lipidakkumulation in den Hepatozyten fördert. Über Aktivierung der Stellat- und Kupfferzellen kann es zu Entzündungsprozessen in der Leber kommen, die wiederum zu einer Fibrose, Zirrhose und einem HCC führen können. Ungesunde Ernährung und genetische Faktoren können zu einer Darmdysbiose führen, welche ebenfalls an Entzündungsprozessen in der Leber beteiligt ist [16].

## 7.3 Genetische Faktoren

### 7.3.1 *PNPLA3*

Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 ist auch unter dem Namen Adiponutrin, Acylglycerin-O-Acyltransferase oder Calcium-unabhängige Phospholipase A2-epsilon bekannt. Es ist durch eine Substitution der Aminosäure Isoleucin zu Methionin an Position 148 gekennzeichnet und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 22 [38]. Die Länge von *PNPLA3* beträgt 481 Aminosäuren [5]. *PNPLA3* ist Gegenstand von zahlreichen Studien und gilt als eines der am weitverbreitetsten und häufigsten untersuchten Gene für Fettlebererkrankungen, wobei es darüber hinaus auch ein Risikofaktor für weitere

Lebererkrankungen wie eine MASH, eine Leberzirrhose oder ein HCC ist [14]. Die *PNPLA3* p.I148M Variante ist zudem diejenige genetische Variante, die am häufigsten mit dem Progress von einer Fettlebererkrankung zu einem HCC in Verbindung gebracht wird [81]. *Unalp-Arida et al.* zeigten in einer Studie mit 13.298 Hepatitis-negativen Erwachsenen, die im Median über 20 Jahre nachbeobachtet wurden, dass die *PNPLA3*-Varianten I148M und 148M mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate bei Lebererkrankungen assoziiert sind [147].

Exprimiert wird dieses Protein vor allem in der Leber und in der Retina. Hepatozyten, Stellatzellen und Sinusoidalzellen sind diejenigen Zellen der Leber, welche *PNPLA3* exprimieren [4,66,135]. Innerhalb der Hepatozyten befindet sich *PNPLA3* in den Lipidtröpfchen und dient durch seine Triacylglycerol-Hydrolase Aktivität dem Abbau von ungesättigten Fettsäuren [161]. Durch die p.I148M Variante wird diese Funktion stark reduziert, was in einem verminderten Abbau von ungesättigten Fettsäuren resultiert und das Auftreten einer Lebersteatose bei Trägern dieser Variante fördert, nicht aber bei den Wildtypen [6]. Letztendlich sind jedoch die genauen Funktionen sowie die Regulierung dieses Gens noch nicht vollständig erforscht. Laut neuesten Studienergebnissen wird *PNPLA3* vermutlich durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zumindest teilweise reguliert, welcher vor allem an der Entstehung von Entzündungen, welche schließlich auch in der Pathogenese der MASLD eine Rolle spielen, beteiligt ist [162].

### 7.3.2 *MBOAT7*

Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 wird auch Lysophospholipid acyltransferase 1 (LPIAT1) genannt und ist ein Transmembranprotein mit sechs Domänen. Es besitzt eine Länge von 472 Aminosäuren und befindet sich an Endomembranen, wie z.B. in den Lipidtröpfchen [18]. Dieses Protein wird vor allem in Immunzellen exprimiert [2]. *MBOAT7* kodiert für ein Acyltransferaseenzym, welches am Lands-Zyklus maßgeblich beteiligt ist, indem es durch einen enzymatischen Schritt eine Vorstufe von Phosphatidylinositol herstellt [145].

Nach Erkenntnissen der neuesten Studien wird vermutet, dass *MBOAT7* neben den oben genannten Risikofaktoren auch an der Pathogenese von einer MASLD [144], einer Leberfibrose und an der Entstehung von einem HCC beteiligt ist bzw. dass das Vorhandensein dieses Polymorphismus das Risiko für diese Erkrankungen erhöht [63]. *Mancina et al.* zeigten in einer Arbeit, dass *MBOAT7* mit der Triglyceridkonzentration korreliert [88]. So hatten Träger des Minor-T-Allels höhere Konzentrationen an Triglyceriden im Serum im Vergleich zu den anderen Gruppen. Ebenso war bei den Trägern des Minor-T-Allels das Risiko für die

Ausbildung einer Fettleber erhöht. Andere Studien belegen ebenfalls die Assoziation zwischen einer solchen genetischen Prädisposition und dem Risiko für eine MASLD. Eine Meta-Analyse mit über einer Millionen Patienten aus insgesamt 42 Studien veranschaulichte die Zusammenhänge zwischen *MBOAT7* und dessen Einfluss auf die Leber [144]. So zeigten sich positive Zusammenhänge zwischen der genetischen Variante und einem erhöhten Leberfettanteil sowie einer Erhöhung der ALT und eine begrenzte Verbindung zur Fibrose. *MBOAT7* schien weitergehend jedoch nicht mit einer MASH assoziiert zu sein.

### 7.3.3 *TM6SF2*

*TM6SF2* ist ein Gen aus der Familie der Transmembran 6-Superfamilie 2 und codiert ebenfalls für dieses Protein. Es ist durch eine Länge von 350 bzw. 377 Aminosäuren charakterisiert, da es zwei Isoformen gibt, und befindet sich auf dem Chromosom 19 im Bereich 19p13.3-p.12 [84]. Genauso wie bei den oben beschriebenen Genen scheint es auch bei *TM6SF2* einen Zusammenhang mit der metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung zu geben [33,38]. Es ist zu vermuten, dass dies auf eine gestörte Produktion von VLDL zurückzuführen ist, wodurch sich der intrahepatische Fettgehalt erhöht und die Ausbildung einer Lebersteatose gefördert wird [70,81,104]. Zudem wurden auch weitere Parameter im Zusammenhang mit *TM6SF2* untersucht und so ergaben sich signifikante Korrelationen zu erhöhten Transaminasen [71,84]. Ebenfalls von Bedeutung ist, dass die aktuelle Studienlage nicht nur einen Zusammenhang zu Fettlebererkrankungen beschreibt, sondern dass diese genetische Variante auch mit einem erhöhten Risiko für eine Leberfibrose oder einem HCC verbunden ist [63,104].

## 7.4 Klassifikation

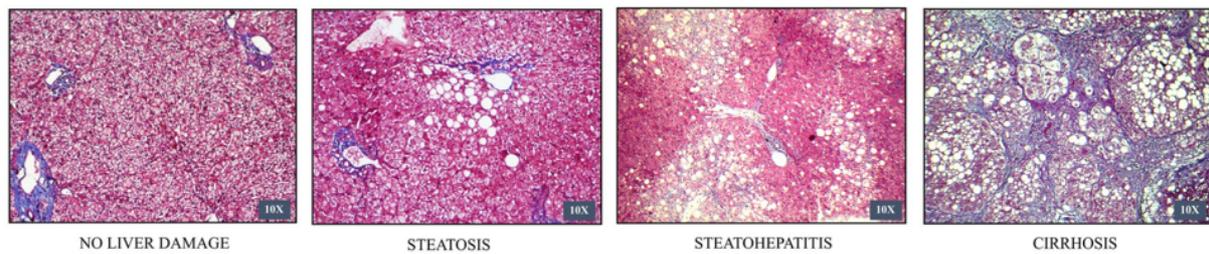
Seit der Änderung der Nomenklatur für Fettlebererkrankungen im Jahre 2023 gibt es bei der Klassifikation dieser Erkrankungen einige Veränderungen. Als Oberbegriff dieser Erkrankungsgruppe wird der Begriff Steatotic Liver Disease (SLD) verwendet. Dieser lässt sich folgendermaßen klassifizieren: Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD), MetALD (MASLD mit erhöhten Alkoholkonsum, d.h. 140g Alkohol pro Woche bei Frauen und 210g Alkohol pro Woche bei Männern) [126], Alcohol-Associated (Alcohol-related) Liver Disease (ALD), SLD mit spezifischer Ursache wie z.B. durch Drogenkonsum (Drug-Induced Liver Injury, DILI) und kryptogener SLD.

Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten zur Klassifizierung bzw. Einteilung einer steatotischen Lebererkrankung. Eine dieser Möglichkeiten unterscheidet dabei grundlegend drei histologische Schweregrade der metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung [13,33]:

- Grad 1 = milde MASLD mit Fetteinlagerung in unter 1/3 der Hepatozyten
- Grad 2 = mäßige MASLD mit Fetteinlagerung in unter 2/3 der Hepatozyten
- Grad 3 = schwere MASLD mit Fetteinlagerung in über 2/3 der Hepatozyten

Darüber hinaus gibt es einige Scores, wie zum Beispiel den Fettleberindex (FLI) oder den hepatischen Steatose-Index (HSI) [93]. Diese Scores werden aus klinischen oder laborchemischen Parametern bestimmt. Zur Berechnung des Fettleberindex wird der BMI, der Taillenumfang, eine Bestimmung der g-GT sowie der Triglyceridkonzentration im Serum benötigt. Der FLI kann Werte zwischen 0 und 100 annehmen. Bei Werten unter 30 wird noch keine MASLD klassifiziert, Werte zwischen 30-60 beschreiben eine Zwischenstufe zwischen keiner MASLD und dem Vorhandensein einer MASLD. Ab einem Wert über 60 wird schließlich eine metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung klassifiziert [23,59]. Dieser Score dient neben einer klinischen Einschätzung, ob eine MASLD vorliegt oder nicht, auch zur Risikostratifizierung derselben. Die diagnostische Wertigkeit des Fettleberindex ist jedoch gerade für die Diagnosestellung oder den Ausschluss einer MASLD nicht ausreichend. Bei der Risikostratifizierung hingegen erzielte dieser Test bessere Ergebnisse und ist demnach für Fragestellungen in Bezug auf eine Risikostratifizierung besser geeignet [23].

Wie bereits in Kapitel 7.1 erwähnt wurde, sind mögliche Komplikationen einer MASLD eine MASH und eine MASH-Zirrhose. Die histologischen Merkmale der verschiedenen Stadien sind in **Abbildung 2** dargestellt und erläutert.



**Abbildung 2** - Histologische Merkmale von chronischen Lebererkrankungen.

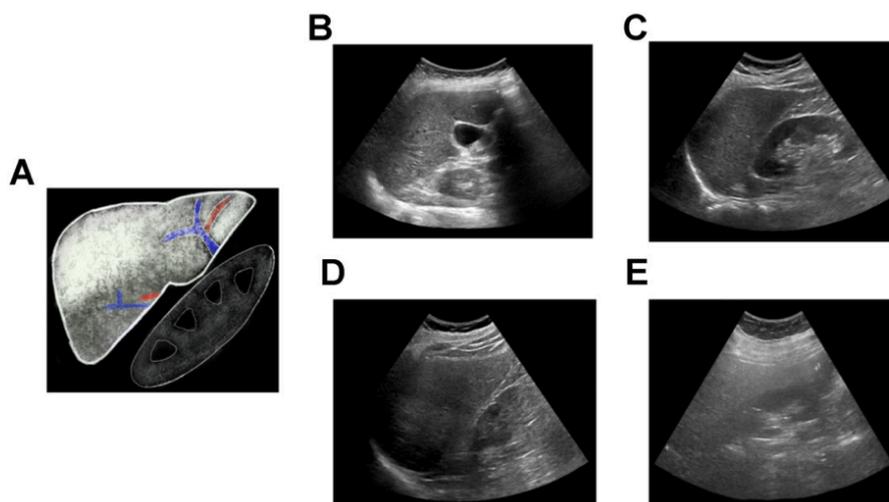
Die vier Abbildungen zeigen jeweils die histologischen Merkmale der verschiedenen Stadien von chronischen Lebererkrankungen. Von links nach rechts sind hier der Normalbefund, die Fettleber, die Fettleber mit Entzündungszeichen und zum Schluss die Leberzirrhose zu sehen. Die histologischen Aufzeichnungen sind aus einer Studie von *Chaim et al.* entnommen [25]. Die Histologie einer MASLD zeigt im zunehmenden Stadium die vermehrte Einlagerung von Fett, insbesondere in Form von Triglyceriden, die dann als Fettvakuolen gespeichert werden. Beim Übergang einer MASLD in eine MASH wird durch die Zunahme der Einlagerung von Triglyceriden vermehrt oxidativer Stress auf die Leber ausgeübt, was eine Entzündungsreaktion und schließlich eine Fibrogenese zur Folge haben kann. Daraus resultierend kann sich eine Leberzirrhose mit zunehmenden bindegewebige Umbau entwickeln [76,113,141].

## 7.5 Klinik und Diagnostik

Patienten mit steatotischer Lebererkrankung sind meistens asymptomatisch, bis ihre Leberfunktion stärker beeinträchtigt ist [53,120]. Es gibt jedoch einige unspezifische Symptome, die nicht direkt auf diese Erkrankung zurückzuführen sind, aber durchaus im Rahmen dieser auftreten können. Dazu zählen unter anderem rechtsseitige Oberbauchschmerzen, Abgeschlagenheit bzw. vermehrte Erschöpfung oder auch eine Hepatomegalie [120]. Das klinische Erscheinungsbild der MASLD ist weitreichend und kann sich auch extrahepatisch manifestieren. Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen, extrahepatische Tumorerkrankungen, kardiovaskuläre Ereignisse und auch kognitive Veränderungen wie Depressionen sind nur einige Beispiele für Erkrankungen, für die Patienten mit MASLD ein erhöhtes Risiko haben [24,43,47,73,136,159].

*Newton J et al.* [105] zeigten in ihrer Studie, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen des Schweregrades von Müdigkeit und der MASLD gibt. So waren Patienten mit MASLD deutlich stärker von Müdigkeit betroffen als die Kontrollpersonen [105]. Außerdem gab es einige Studien, die die Beziehung zwischen Depressionen und Angststörungen und der steatotischen Lebererkrankung untersuchten. So konnte auch hier ein Zusammenhang hergestellt werden, wodurch die Depressionen und Angststörungen als eine mögliche extrahepatische Manifestation der MASLD angesehen werden können [31,35,136].

Die Diagnose der MASLD lässt sich klinisch vor allem durch das Anamnesegespräch und nicht-invasive Methoden, wie einer Ultraschalluntersuchung und einer transienter Elastographie (TE), stellen [1,53,111]. Im Anamnesegespräch ist vor allem die Frage bezüglich des Alkoholkonsums relevant, um somit einen potenziell schädlichen Alkoholkonsum zu identifizieren (siehe Kapitel 7.4). Bei der TE ist insbesondere der CAP von Bedeutung, da dieser Rückschlüsse auf das Ausmaß der Leberverfettung geben kann. Je höher der CAP-Wert ist, desto stärker ausgeprägt ist die Steatose [96]. Im Ultraschall (**Abbildung 3**) kann sich die Leber homogen verdichtet mit einem abgerundeten Leberunterrand und mit einer Gefäßunschärfe präsentieren [53].



**Abbildung 3** – Ultraschalldiagnostik einer Fettlebererkrankung.

Hier dargestellt sind Ultraschallaufnahmen zur Diagnostik einer Fettlebererkrankung. **(A)** Schematische Darstellung einer Fettleber mit den typischen Ultraschallbefunden: erhöhte Echogenität, Gefäßunschärfe und einer Abschwächung des hinteren Strahls. **(B)** Normaler Leberbefund. **(C)** Leichte Fettleber. **(D)** Mittel schwere Fettleber. **(E)** Schwere Fettleber. Die Abbildung ist entnommen aus einer Arbeit von *Pirmoazen et al* [118].

Invasive Methoden wie eine Leberbiopsie stellen dennoch den Goldstandard in der Diagnostik dar, wenn die Progression einer Fettlebererkrankung abgeschätzt werden soll. Die Leberbiopsie dient vor allem zur histologischen Unterscheidung zwischen einer MASH, einer Leberfibrose und einer Leberzirrhose (**Abbildung 2**). Jedoch ist dies keine Routineuntersuchung im klinischen Alltag, da eine Biopsie ein sehr aufwändiges und teures Verfahren ist was, wie jeder medizinisch invasive Eingriff, mit zahlreichen Komplikationen, wie zum Beispiel Blutungen und Infektionen, einhergehen kann, sodass eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen sollte [1,117]. Zudem gibt es auch einige Biomarker [93], die nachgewiesen werden bzw.

Scores, die errechnet werden können. Dazu zählen vor allem die Transaminasen und Lebersyntheseparameter, die für die Berechnung vieler Scores benötigt werden. Bei manchen Patienten finden sich im Labor erhöhte Transaminasen, vor allem eine Erhöhung der ALT. Dies ist aber kein zuverlässiges Diagnosekriterium, da viele Patienten normwertige Leberwerte aufweisen [106]. Ebenso relevant sind auch genetische Biomarker wie beispielsweise *PNPLA3* [117]. Auf die Rolle von genetischen Faktoren wird in Kapitel 7.3 detaillierter eingegangen.

## 7.6 Therapie und Prognose

Bis vor kurzem gab es keine spezifische medikamentöse Therapie zur Behandlung von steatotischen Lebererkrankungen. In erster Linie sollten Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder eine arterielle Hypertonie optimal eingestellt sein, Übergewicht reduziert und eine allgemeine Lebensstilveränderung vollzogen werden [91,130]. Als mögliches Medikament zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II kommt vor allem Metformin in Frage. Es senkt den Blutzuckerwert, was sich wiederum positiv auf die Steatose auswirkt. In einer Studie von *Marchesini et al.* konnte bei Patienten mit MASH ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Metformin Einnahme und der Reduktion von Transaminasen erkannt werden [92]. Die Wirkung von Metformin wurde dahingehend weiter erforscht und die jüngsten Studien zeigten Hinweise auf eine potenziell triglyceridsenkende Wirkung in den Hepatozyten. Zudem gab es Anzeichen auf einen tumorprotektiven Mechanismus [165]. Das Antidiabetikum hat auch eine kardioprotektive Wirkung und aufgrund eines erhöhten kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit MASLD ist dieser Effekt zusätzlich von Nutzen [95]. Außerdem ist es wichtig Risikofaktoren wie Adipositas zu minimieren. So zeigte eine Studie, dass bereits ein Gewichtsverlust von über 10% des ursprünglichen Körpergewichts einen positiven Effekt auf den Schweregrad einer MASH oder einer Leberfibrose haben kann. Zudem wirkt sich ein erhöhtes Aktivitätslevel und der damit potenziell einhergehende Gewichtsverlust auch positiv auf den intrahepatischen Fettgehalt aus [129]. Insbesondere solche Grunderkrankungen, die das Herz-Kreislauf-System betreffen, aber auch Nierenfunktionsstörungen oder Diabetes mellitus gelten als wichtige Risikofaktoren für das Ausbilden einer Fibrose oder sogar Zirrhose [82]. Dies kann zu irreversiblen Schäden in den Hepatozyten führen und die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) fördern [60,63].

Seit Anfang 2024 gerät das Medikament Resmetirom immer mehr in den Fokus als erstes mögliches Medikament gegen Fettlebererkrankungen. Resmetirom ist ein Leber-selektiver Thyroid-Hormon-Rezeptor- $\beta$ -Agonist (THR- $\beta$ -Agonist). Bei Patienten mit NASH ist die THR- $\beta$ -Funktion herabreguliert, wodurch es zu einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion

sowie der  $\beta$ -Oxidation kommt, was das Auftreten einer Leberfibrose begünstigt. In einer Phase-3-Studie mit 966 Patienten mit bioptisch gesicherter NASH wurden die Patienten zufällig in drei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe erhielt eine Gabe von 80 mg Resmetirom, eine weitere Gruppe eine Gabe von 100 mg Resmetirom sowie eine Placebo-Gruppe [51]. Es zeigte sich, dass das Medikament signifikant zur Auflösung einer NASH sowie zur Verbesserung der Fibrose beitragen konnte.

Falls in seltenen Fällen Medikamente wie z.B. Amiodaron oder Methotrexat als Auslöser für eine Fettlebererkrankung identifiziert werden, sollten diese selbstverständlich sofort abgesetzt werden [110].

Die Prognose der MASLD ist bei jedem Patienten individuell. Diejenigen Patienten mit einer leichten Steatose weisen ein sehr geringes Risiko für eine Dekompensation der zugrundeliegenden Fettlebererkrankung auf. In bis zu 30% der Fälle kann es jedoch zu einer metabolischen dysfunktions-assoziierten Steatohepatitis kommen [44].

## 8 Short-chain fatty acids (SCFAs)

### 8.1 Definition und Klassifikation

Short-chain fatty acids (SCFAs) sind kurzkettige Fettsäuren und besitzen weniger als sechs Kohlenstoffatome. Medium-chain fatty acids (MCFAs) haben sechs bis zwölf Kohlenstoffatome und Fettsäuren mit über zwölf Kohlenstoffatome werden als Long-chain fatty acids (LCFAs) bezeichnet [114]. SCFAs entstehen bei der Fermentation von unverdaulichen Nahrungsmitteln, wie z.B. Ballaststoffen oder resistenter Stärke durch Darmbakterien [99]. Durch die Fermentation entstehen saure Produkte, die den pH-Wert im proximalen Kolon reduzieren. Diese pH-Wert Reduktion fördert wiederum die Bildung von Butyrat [19]. Die Konzentrationsverhältnisse von SCFAs sind im Magen-Darm-Trakt nicht konstant, sondern nehmen von proximal nach distal ab [57]. Die höchsten Konzentrationen von diesen kurzkettigen Fettsäuren befinden sich demnach im proximalen Kolon, wo sie schließlich den Enterozyten zur Verfügung stehen oder in den Blutkreislauf abgegeben werden [142]. Die am häufigsten vorkommenden SCFAs sind Acetat, Propionat und Butyrat mit einem Konzentrationsverhältnis im proximalen Kolon von 60% Acetat, 25% Propionat und 15% Butyrat [19]. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es zeigte sich aber, dass die SCFAs über zwei Signalwege Einfluss auf den Organismus haben. Dies geschieht zum einen über die Hemmung von Histon-Deacetylasen (HDACs), welche wiederum an der Genexpression beteiligt sind und zum anderen über die Aktivierung von G-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Die GPCRs sind an der Modulation von verschiedenen Stoffwechselprozessen, Entzündungsvorgängen und an der Pathophysiologie von Krankheiten beteiligt [55,86,98,140,142]. Hier spielen insbesondere autoimmun-vermittelte Prozesse eine Rolle, bei denen Antikörper gegen GPCRs (z.B. GPCR-AABs) beispielsweise mit einer Kardiomyopathie einhergehen können [7].

In einigen Studien wurde darüber berichtet, dass die Ernährung Einfluss auf den Gehalt der SCFAs hat und sich dieser je nach Ernährungsweise verändern kann [56]. Dabei ist vor allem die Ballaststoffaufnahme relevant, da sich eine unzureichende Zufuhr von Ballaststoffen negativ auf den Gehalt an SCFAs auswirken kann [143].

Der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von short-chain fatty acids im Stuhl und chronischen Lebererkrankungen wurde bereits von *Rau et al.* beschrieben [124]. In dieser Arbeit wurden SCFAs bei insgesamt 59 Patienten (14 mit MASLD, 18 mit MASH und 27 Kontrollpersonen) mittels Gaschromatographie im Stuhl gemessen. Patienten mit MASLD wiesen höhere Konzentrationen an Acetat, Propionat und Butyrat im Stuhl auf im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf die MASH-Patienten, mit

Ausnahme von Butyrat, übertragen. Darüber hinaus konnten auch wesentliche Unterschiede in den Spezies von Bakterien bei Patienten mit MASLD im Vergleich zu Patienten mit MASH festgestellt werden.

In dieser Dissertation wird der noch unzureichende Wissensstand über den Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom und chronischen Lebererkrankungen, speziell der steatotischen Lebererkrankung, weiter untersucht.

## 8.2 Funktion

Short-chain fatty acids haben Einfluss auf verschiedene Stoffwechsel- und Entzündungsprozesse im Organismus und wirken darüber hinaus auch modulierend auf das Immunsystem [142]. Darunter fallen bei den Stoffwechselprozessen insbesondere der Glucose- und Lipidmetabolismus. Hierbei sind vor allem die Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat von Bedeutung. Die Lipolyse wird über höhere Konzentrationen an Butyrat und Propionat zum einen über den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPCR43 gehemmt, welcher vor allem auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird [58], und zum anderen über die Expression von Genen, die an der Lipolyse beteiligt sind, wie zum Beispiel Atgl und Hsl [150]. Atgl ist das Schrittmacherenzym der Lipolyse und katalysiert die Hydrolyse von Triacylglycerol zu Diacylglycerol und Fettsäuren [134]. Hsl ist ebenfalls an der Hydrolyse von Lipiden beteiligt, wobei die Fähigkeit der Lipolyse für Diacylglycerole stärker ist als für Triacylglycerole [74]. Insgesamt führte dies zu einer Senkung der Triglyceride in den Enterozyten und zu einer Förderung der Lipolyse über die Aktivierung von p-AMPK und LSD1 [150]. AMPK wird bei sinkenden ATP-Konzentrationen in der Zelle aktiviert und hat über eine Phosphorylierung Einfluss auf den Lipidstoffwechsel [151]. Dieser Effekt wird von Propionat induziert [150].

Weitergehend zeigte sich, dass Propionat einen hemmenden Effekt auf Acetat hat, indem es dessen Aufnahme hemmt. Acetat wiederum wird für die De-novo-Lipogenese benötigt [39,164]. Diese Ergebnisse stützen sich jedoch auf Studien mit Tieren und sind daher nicht zwangsläufig eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Außerdem hat Propionat einen positiven Effekt auf das Körpergewicht. So modulierte es die Gewichtsreduktion und führte zu einer Verringerung sowohl der viszeralen-, als auch der intrahepatischen Fettverteilung. Darüber hinaus verringerte Propionat die Energieaufnahme. Diese Erkenntnisse sind wahrscheinlich auf eine Stimulation der Freisetzung von PYY und GLP-1 aus den Kolonzellen durch Propionat zurückzuführen [27]. PYY ist ein Peptidhormon aus 36 Aminosäuren und wird

in den neuroendokrinen Zellen im Ileum sowie im Kolon produziert. Die Sekretion wird durch die Nahrungsaufnahme, insbesondere durch eine sehr fettreiche Nahrung, stimuliert und hat dadurch eine appetitsenkende Wirkung [115]. GLP-1 ist ebenfalls ein Peptidhormon und wird von den gleichen Zellen synthetisiert wie PYY. Es besitzt eine wichtige Rolle im Glucosestoffwechsel und besitzt unter anderem den Effekt einer verzögerten Magenentleerung. Außerdem ist es für den Inkretin-Effekt verantwortlich, der, im Vergleich zur parenteralen Zufuhr von Glucose, bei der enteralen Zufuhr eine erhöhte Insulinausschüttung herbeiführt [67].

In einem Experiment von *Li et al.* [79] wurde Mäusen orales Butyrat (0,15 ml) nach 13 Stunden Fasten verabreicht und anschließend wurde die Nahrungsaufnahme in den darauffolgenden 24 Stunden gemessen. Die orale Gabe von Butyrat hatte einen signifikanten Effekt auf die Nahrungsaufnahme. So sank die Nahrungsaufnahme nachweislich und hatte bei chronischer Verabreichung von Butyrat auch Auswirkungen auf den Insulin- und Triglyceridspiegel. Beides konnte auch hier gesenkt werden, was wahrscheinlich durch die verringerte Nahrungsaufnahme zustande kam. Zudem verringerte es eine Adipositas und eine intrahepatische Steatose. Somit scheint Butyrat einen regulatorischen Einfluss auf das Appetitverhalten zu haben. Dies könnte im Zusammenhang mit der Aminosäure Neuropeptid Y stehen, da auch diese durch die orale Gabe von Butyrat sank [79]. Neuropeptid Y besitzt eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Hunger. Es wird von dem Ncl. arcuatus aus dem Hypothalamus ausgeschüttet und hat einen stimulierenden Effekt auf das Hungerzentrum [137]. Durch die verringerten Konzentrationen von Neuropeptid Y gab es auch weniger Stimuli auf das Hungerzentrum und führte dadurch zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme. In einigen Tiermodellen wurde demnach der Zusammenhang zwischen den SCFAs und der Appetitregulation untersucht. Humane Studien gibt es derzeit nur unzureichend und sind daher weniger aussagekräftig. Es zeigte sich jedoch in den Tiermodellen, dass SCFAs einen positiven Effekt auf die Appetitregulation haben [17,28]. So wird derzeit vermutet, dass erhöhte SCFA-Spiegel als eine mögliche Präventionsmaßnahme für Adipositas, Diabetes mellitus und weitere Stoffwechselerkrankungen angesehen werden könnten [11,20].

*Ohira et al.* veranschaulichten in ihrer Studie, dass Butyrat die PGE<sub>2</sub>-Produktion erhöht [109]. PGE<sub>2</sub> ist ein Hormon und wird aus der Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen katalysiert. Die Wirkung entfaltet Prostaglandin E<sub>2</sub> überwiegend über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Zu dessen Wirkungen gehören zum einen die Vasodilatation, eine verringerte Lipolyse und zum anderen erhöht es die Körpertemperatur sowie die Schmerzsensibilität und Entzündungsreaktionen [112]. Die Butyrat-induzierte Erhöhung der Prostaglandin-E<sub>2</sub>-

Expression hatte zur Konsequenz, dass die Freisetzung von freien Fettsäuren und Glycin gehemmt wurde. Dies wurde über eine Reduktion der Gesamtlipaseaktivität reguliert und hatte letztendlich einen hemmenden Effekt auf die Lipolyse. Dabei hemmt Butyrat die Lipolyse nicht nur über einen PGE2-vermittelten Weg, sondern auch über einen PGE2-unabhängigen Weg, wobei letzteres mit 60% den größeren Anteil an der Gesamtinhibition ausmacht [109].

Neben Stoffwechselprozessen werden auch Entzündungsreaktionen durch short-chain fatty acids moduliert. Entzündungsreaktionen werden durch verschiedene Stoffe, vor allem durch Zytokine und Chemokine, ausgelöst [85]. Zu den entzündungsauslösenden Mediatoren gehören auch Lipopolysaccharide (LPS). Sie bilden den Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran von gram-negativen Bakterien und können über die Stimulation des Immunsystems oder beteiligten Zellen eine Entzündungsreaktion auslösen [163]. Dieser Prozess kann von den SCFAs durch die Regulation von bestimmten Enzymen, wie Histon-Deacetylasen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren, nachweislich gehemmt werden [55]. *He J et al.* beschrieben in ihrer Studie, dass die Hemmung der HDACs abhängig von der Konzentration der short-chain fatty acids ist. So ist die Inhibition stärker, je höher die Konzentration von SCFAs ist (mit Ausnahme von Acetat) [55]. Dabei wies sich Butyrat als stärkster Inhibitor von allen SCFAs heraus. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren wirken über Liganden. Die wichtigsten Rezeptoren für SCFAs stellen dabei GPR41 (=FFAR3) und GPR43 (=FFAR2) dar [75]. Beide sind mittlerweile von relevanter Bedeutung, wenn es um neue Therapieansätze bei Stoffwechselkrankheiten geht. Insbesondere bei Propionat und Butyrat ist bekannt, dass sie eine anti-inflammatorische Wirkung haben, die unter anderem darauf beruht, dass sie die NO-Produktion, welche durch LPS-stimulierte neutrophile Granulozyten ausgelöst wird, hemmen [149]. Beide können darüber hinaus auch die Aktivität von TNF- $\alpha$  herabregulieren [149]. Speziell Butyrat weist jedoch noch eine Reihe von weiteren modulatorischen Effekten auf. So zeigte *Lühns et al.*, dass die Gabe von Butyrat zu einer Verringerung der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten führte [83]. Eine weitere Studie zeigte, dass die Behandlung mit Butyrat einen positiven Effekt auf die Leber hatte. Dies zeigte sich in fallenden Transaminasewerten sowie in einer Verbesserung der Histologie [123]. Viele Studien zeigten in der Vergangenheit demnach, dass Butyrat eine anti-inflammatorische Wirkung hat, die darauf zurückzuführen ist, dass es den Transkriptionsfaktor NF-kB [83,123], Zytokine wie IL-6 [103,123] und TNF- $\alpha$  [123] sowie proinflammatorische Chemokine wie CCL3 und CCL4 [103] positiv beeinflusst. Außerdem führen die short-chain fatty acids Propionat und Butyrat zu einer Verringerung der Produktion von Zytokinen und NO durch LPS-stimulierte neutrophile Granulozyten [149].

Diese Funktion wird auch der Fettsäure Acetat zugeschrieben, die TNF- $\alpha$  über FFAR-Rezeptoren moduliert [148].

Über Butyrat ist zusätzlich bekannt, dass es Einfluss auf die Darmintegrität hat und daher wichtig für das Dickdarmepithel ist, indem es an verschiedenen Prozessen wie der Darmmotilität, Abwehrfunktionen, transepithelialer Flüssigkeitstransport und an der Reduktion von oxidativem Stress sowie an der Steigerung der Regeneration nach Schleimhautschäden beteiligt ist [19]. Zudem stellt es den Hauptenergielieferanten für die Kolonzellen dar [148]. Der Einfluss der short-chain fatty acids im Organismus ist daher weitreichend. Insbesondere Propionat und Butyrat sind Modulatoren an zahlreichen Prozessen im Körper.

### **8.3 SCFAs und affektive Störungen**

Der Zusammenhang zwischen dem intestinalen Mikrobiom und affektiven Störungen ist bisher nur unzureichend erforscht. Es gibt jedoch eine Auswahl an Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben. In einer Arbeit von *Müller et al.* wurden Stuhlproben von 164 Personen gesammelt, wovon 125 Proben von Patienten mit einer psychiatrischen Erkrankung waren und 39 Proben von Kontrollpersonen. In den Stuhlproben wurden Acetat, Butyrat und Propionat gemessen. Dort konnte ein Zusammenhang zwischen der Acetat- und Butyratkonzentration und der Einnahme von psychiatrischen Medikamenten beobachtet werden und auch eine Korrelation zwischen Depressionen und allen drei gemessenen SCFAs [102]. In einer weiteren Studie konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom und der Depression dargestellt werden. Es zeigte sich, dass weibliche Patienten ohne Depression höhere Konzentrationen an allen SCFAs, mit Ausnahme der Capronsäure, hatten im Vergleich zu denjenigen mit Depression [138]. Diese Beobachtung konnte auch in Tiermodellen mit depressiven Mäusen bestätigt werden. Depressive Mäuse hatten verminderte Konzentrationen an z.B. Essigsäure oder Propansäure im Vergleich zu den nicht-depressiven Mäusen [156]. So konnten sowohl in Tierstudien als auch in humanen Studien gezeigt werden, dass sich das intestinale Mikrobiom bei depressiven Individuen von denjenigen ohne Depression in Hinblick auf das Konzentrationsverhältnis von SCFAs aber auch von den Bakterientaxa wesentlich unterscheidet [72,97,102,138,156].

Wie bereits in Kapitel 8.1 erwähnt, spielt eine ballaststoffreiche Ernährung eine essenzielle Rolle, um im Darm SCFAs produzieren zu können. In einer bevölkerungsbezogenen Querschnittsstudie mit 988 weiblichen Patienten aus dem Iran im Alter zwischen 12 und 18 Jahren zeigte sich, dass Patienten mit keiner bis minimaler depressiver Symptomatik eine

deutlich höhere Zufuhr an Ballaststoffen aufwiesen als die Patienten mit einer schwereren depressiven Symptomatik [68]. Eine höhere Ballaststoffaufnahme wirkte sich demnach positiv auf die emotionale Stabilität der Patienten aus. Diese Beobachtung wurde auch in weiteren Studien bestätigt. *Liu et al.* beschäftigen sich in einer Arbeit mit dem Zusammenhang zwischen Depressionen und Angst und der Ballaststoffzufuhr bei Patienten mit essenzieller Hypertonie. Die Patientengruppe mit einer Ballaststoffzufuhr von unter 15,4 g/d zeigte eine 2.641-fach höhere Prävalenz an Depressionen [80]. Diese Erkenntnis war auch auf die Prävalenz von Angst zu übertragen.

## 9 Zielsetzung

Die Prävalenz für steatotische Lebererkrankungen liegt aktuell in Europa bei ca. 30%. Damit ist sie die häufigste chronische Lebererkrankung. Durch die steigenden Zahlen von Adipositas, Diabetes mellitus und anderen prädisponierenden Faktoren der Fettlebererkrankung, ist dessen Prävalenz tendenziell weiter steigend und rechtfertigt dadurch die weitere Untersuchung von Ursachen, Progressionsfaktoren sowie möglichen Therapieansätzen oder Möglichkeiten, die Lebensqualität dieser Patienten zu verbessern.

Einige Arbeiten haben sich bereits mit der Lebensqualität von Patienten mit steatotischer Lebererkrankung beschäftigt und konnten zeigen, dass Patienten mit MASLD, früher nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, eine schlechtere Lebensqualität haben, häufiger an Depressionen und Ängsten erkranken und öfter unter verstärkter Müdigkeit leiden als Patienten ohne Fettlebererkrankung.

Zudem haben verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen chronischen Lebererkrankungen und Metaboliten von Darmbakterien dargestellt und gezeigt, dass diese Metabolite (SCFAs) auch Auswirkungen auf die kognitive Gesundheit haben können.

Da der Zusammenhang zwischen dem intestinalen Mikrobiom und Fettlebererkrankungen aber bisher nur unzureichend erforscht ist, wurde als zentrales Studienthema die weitere Untersuchung von möglichen Zusammenhängen zwischen dem Darmmikrobiom und steatotischen Lebererkrankungen festgelegt. Darüber hinaus war auch der Einfluss von speziellen Risikogenen wie *PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E und *TM6SF2* p.E167K interessant, um eine mögliche Prädisposition zu erkennen.

Zusammengefasst war das Ziel dieser Studie einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom, der Lebensqualität bei Patienten mit metabolischer dysfunktions-assoziiertes steatotischer Lebererkrankung und genetischen Varianten zu untersuchen.

## 10 Material und Methoden

### 10.1 Patientenkollektiv und Studienablauf

Im Rahmen dieser Querschnittsstudie wurden 78 Patienten (zwischen 23 und 78 Jahren, 30 Männer und 48 Frauen) prospektiv zwischen Oktober 2021 und April 2022 in der endokrinologischen, diabetologischen und hepatologischen Ambulanz (Innere Medizin II) des Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert. Die Patienten wurden am Tag ihres Termins in einer der oben genannten Ambulanzen auf diese Studie aufmerksam gemacht und bezüglich einer Teilnahme an derselben befragt. Wichtige Voraussetzungen für die Teilnahme an dieser Studie waren die Vollendung des 18. Lebensjahres sowie eine Einwilligungserklärung nach Aufklärung des Patienten über den gesamten Studienverlauf und die zugehörigen Datenschutzverordnungen. Zudem waren Schwangere und Patienten mit aktiven Virushepatitiden von einer Teilnahme ausgeschlossen. Nach Einwilligung des Patienten für die Studie wurde eine Blutentnahme mit kleinem Blutbild, Nieren- und Leberwerten, Elektrolyten, Blutfette, Gerinnungsparametern, TSH, Glucose und HbA1c durchgeführt. Gleichzeitig wurde EDTA-Blut für die spätere Genotypisierung spezieller Risikogene für Lebererkrankungen abgenommen. Weiter erfolgte eine transiente Elastographie sowie die Bestimmung des Body-Mass-Index. Um einen Überblick über die erhobenen klinischen Parameter zu bekommen, wurde **Tabelle 1** aufgestellt. Den Patienten wurden die Fragebögen zur Beurteilung der Lebensqualität sowie ein Stuhlprobenentnahme-Set mit nach Hause gegeben. Es wurde darum gebeten, die Stuhlprobe bei dem nächsten Besuch in einer der Ambulanzen im Universitätsklinikum des Saarlandes wieder mitzubringen und abzugeben. Das Stuhlprobenentnahme-Set enthielt eine kleine Kühltasche mit zwei Kühlakkus, sowie einen Stuhlauffänger, damit die Stuhlproben nicht durch das Toilettenwasser kontaminiert wurden. Die Stuhlprobe wurde in ein zugehöriges Stuhlprobenröhrchen gepackt und direkt in der Kühltasche gelagert. Alle Patienten wurden über die Durchführung der Probenentnahme sowie dessen Aufbewahrung aufgeklärt. Dabei war es insbesondere wichtig, die Stuhlprobe nicht länger als 24 Stunden zuhause zu lagern. Sobald die Patienten die Stuhlprobe bei ihrem nächsten Termin wieder abgegeben hatten, wurden diese an das hiesige gastroenterologische Labor geschickt und dort bei -20°C gelagert. Nach kollektivem Sammeln der Stuhlproben wurden diese mit Expressversand auf Trockeneis nach Polen an die Pomeranian Medical University in Stettin (Polen) geschickt und dort mittels Gaschromatographie analysiert.

Ein positives Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingeholt (Kenn-Nr.: 256/19).

**Tabelle 1** - Charakteristika der Patientenkohorte.

<b>Parameter</b>	<b>Gesamte Kohorte</b>	<b>Patienten mit MASLD</b>	<b>Patienten ohne MASLD</b>
<b>Stammdaten</b>			
N (w/m)	78 (48/30)	49 (30/19)	29 (18/11)
Alter (in Jahren)	60 (23-78)	61 (28-77)	58 (23-78)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31 (17-56)	33 (20-56)	26 (17-43)
<b>Transiente Elastographie</b>			
CAP (dB/m)	323 (161-400)	348 (289-400)	231 (161-287)
LSM (kPa)	6.2 (3-75)	7 (3-75)	5.3 (3.3-75)
<b>Klinische Chemie</b>			
Harnstoff (mg/dl)	34 (14-102)	34 (16-61)	34 (14-102)
Glucose (mg/dl)	144 (80-395)	140 (89-333)	149 (80-395)
Albumin (g/l)	44 (26-51)	44 (35-51)	43 (26-50)
Cholesterin (mg/dl)	178 (85-321)	182 (85-321)	171 (109-313)
Triglyceride (mg/dl)	128 (35-540)	133 (35-540)	92 (39-282)
AST (U/l)	27 (11-81)	27 (11-81)	27 (17-50)
ALT (U/l)	26 (12-59)	28 (12-59)	24 (13-58)
g-GT (U/l)	30 (8-1095)	30 (10-869)	30 (8-1095)
Bilirubin ges. (mg/dl)	0.5 (0.2-2.2)	0.5 (0.2-2.2)	0.5 (0.2-1.8)
<b>Kleines Blutbild</b>			
Leukozyten (10 <sup>9</sup> /l)	7.2 (3.6-13.8)	7.5 (3.6-13.8)	7.1 (3.6-11.8)
Thrombozyten (10 <sup>9</sup> /l)	249 (60-426)	254 (60-402)	231 (76-426)
<b>Gerinnung</b>			
Quick (%)	109 (20-126)	111 (46-126)	107 (20-126)
INR	0.98 (0.87-2.95)	0.97 (0.88-1.51)	0.99 (0.87-2.95)
<b>Hormone</b>			
TSH (μIU/ml)	1.47 (0.3-5.95)	1.22 (0.3-4.57)	1.91 (0.69-5.95)
<b>Spezialparameter</b>			
HbA1c (%)	7.2 (5-12.4)	7.2 (5-12.2)	7.4 (5.2-12.4)

Sofern nicht anders angegeben, werden die Variablen als Median mit dem jeweiligen Minimum und Maximum angegeben.

Abkürzungen: ALT, Alanin Aminotransferase; AST, Aspartat Aminotransferase; BMI, Body-Mass-Index; CAP, controlled attenuation parameter; g-GT, gamma-Glutamyl Transferase; HbA1c, Hämoglobin A1c; INR, international normalized ratio; LSM, liver stiffness measurement; MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; TSH, Thyreoidea-stimulierendes Hormon.

## 10.2 Bestimmung der Patientenstammdaten sowie des Body-Mass-Index

Die Patientenstammdaten wurden dem SAP-Software Programm entnommen. Körpergröße und Körpergewicht wurden gemessen und daraus schließlich der BMI berechnet.

Der BMI gibt Auskunft über das Körpergewicht in Relation zur Körpergröße und wurde erstmals 1832 von Adolphe Quetelet definiert [42].

Berechnet wird der Body-Mass-Index wie folgt:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{\text{Körpergröße in cm}^2}$$

Er dient jedoch lediglich als Orientierungs- und Richtwert, da er sonstige Parameter wie das Geschlecht, die Körperstatur oder die Fett- und Muskelmasse nicht berücksichtigt.

Der BMI wird in die Kategorien Untergewicht, Normalgewicht, Präadipositas und Adipositas Grad I-III eingeteilt. Die jeweiligen Grenzwerte für die einzelnen Kategorien sind der **Tabelle 2** zu entnehmen [155].

**Tabelle 2** – BMI-Klassifikation gemäß der WHO.

<b>Body-Mass-Index (BMI)</b>	<b>Kategorie</b>
<16.5	Starkes Untergewicht
< 18.5	Untergewicht
18.5 – 24.9	Normalgewicht
25.0 – 29.9	Präadipositas
30.0 – 34.9	Adipositas Grad I
35.0 – 39.9	Adipositas Grad II
> 40.0	Adipositas Grad III

### 10.3 Transiente Elastographie (FibroScan)

Die transiente Elastographie ist ein nicht-invasives Verfahren zur Diagnostik von Lebererkrankungen. Sie wurde 1995 am Langevin Institut entwickelt und diente dort vorrangig zur Überprüfung der Lebensmittelqualität. Erst 2001 wurde es zur medizinischen Diagnostik eingesetzt [96]. Das Gerät besitzt eine Ultraschallsonde mit einem Vibrator, wodurch Schwingungen mit niedriger Amplitude sowie Frequenzen auf das Gewebe übertragen werden [46,48]. Hierbei gilt: Je steifer das Gewebe ist, desto schneller wird die ausgelöste Scherwelle übertragen. Die Scherwelle breitet sich dabei transversal aus. Bevor die Untersuchung gestartet werden kann, muss zunächst Ultraschallgel auf die Ultraschallsonde aufgetragen werden. Es gibt zwei verschiedene Ultraschallsonden: M und XL. Die Wahl der geeigneten Sonde richtet sich dabei nach den Untersuchungsbedingungen des Patienten, wie z.B. der Körperstatur oder der Breite der Interkostalräume. Der Patient liegt während der Untersuchung in Rückenlage und hält den rechten Arm hinter dem Kopf, sofern dies möglich ist. Im Idealfall wird die rechte Seite etwas gestreckt, sodass der Schallkopf besser in die Interkostalräume gelangen kann. Dabei orientiert sich der Untersucher zunächst am Xiphoid und geht dann eine gestreckte Handbreite zur Seite, sodass er ungefähr im 9.-11. Interkostalraum auf der Axillarlinie landet. Diese Messungen werden durch einen Knopf an der Ultraschallsonde ausgelöst. Es ist von Vorteil, wenn die Patienten bei der Untersuchung nüchtern sind, da die Leber durch die Nahrungsaufnahme steifer wird und dies zu falsch-positiv hohen Werten der Lebersteifigkeit führen kann [9,12,94,116]. Die Lebersteifigkeit wird mit dem LSM-Wert (in kPa) gemessen. Dieser reicht von 1,5 kPa bis 75 kPa [107]. Je höher die LSM-Werte sind, desto steifer ist die Leber. Die Untersuchung wird als gültig gewertet, wenn 10-12 Messungen erfolgreich durchgeführt werden konnten. Zudem ist es auch wichtig zu beachten, dass der IQR (Interquartilsbereich) nicht mehr als 30% beträgt, da die Untersuchung sonst als ungültig zu bewerten ist [12,146]. Neben der Messung der Lebersteifigkeit kann mit Hilfe des FibroScans auch die Leberverfettung gemessen werden [107]. Dies wird mithilfe des CAP (= controlled attenuation parameter) angegeben, welcher von 100 bis 400 dB/m reicht [146]. Auch hierbei gilt: Je höher der CAP, desto stärker ausgeprägt ist die Steatose.

In dieser Studie haben wir den Cut-off Wert für das Vorhandensein einer Fettlebererkrankung orientierend an neuesten Studien auf 288 dB/m festgelegt [127]. Leberfibrose wurde ab einem LSM-Wert von 8 kPa diagnostiziert [10].

#### 10.4 DNA-Isolation

Die Isolierung der DNA erfolgte aus Vollblut, welches zuvor in einem EDTA-Röhrchen abgenommen wurde. Die Durchführung lief nach dem QIAamp DNA-Extraktionsprotokoll (Qiagen, Hilden) ab. Die Arbeiten wurden stets unter einer Sterilbank ausgeführt. Für jede DNA-Isolierung wurden 200 µl der jeweiligen Patientenprobe mit 20 µl Protease-Lösung (QIAamp DNA Mini Kit) sowie 200 µl des Puffers AL (QIAamp DNA Mini Kit) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und im Anschluss für 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät gemischt. Anschließend wurde die Probe bei 56°C für 10 Minuten inkubiert und dann bei 8000 rpm für 5 Sekunden zentrifugiert. Nach der Zugabe von 200 µl Äthanol puriss wurde die Probe erneut für 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät gemischt und wieder bei 8000 rpm für 5 Sekunden zentrifugiert. Das Gemisch wurde folgend in eine Spin-Säule gegeben und erneut bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Bevor eine erneute Zentrifugation stattfand, wurden 500 µl Puffer AW1 (QIAamp DNA Mini Kit) zum Gemisch hinzugegeben. Weitere 500 µl Puffer AW2 wurden hinzugefügt und in Folge bei 13000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das in diesem Prozess entstandene DNA-Isolat wurde schließlich bei -20°C gelagert.

#### 10.5 Genotypisierung der Risikovarianten für Fettlebererkrankungen

Die Genotypisierung für die Varianten *PNPLA3* p.I148M, *MBOAT7* p.G17E und *TM6SF2* p.E167K wurde im gastroenterologischen Labor der Klinik für Innere Medizin II an der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt. Dafür wurde eine allelische Diskriminierung (TaqMan Applied Biosystems) ausgeführt, bei der sich die 5' → 3' Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase zunutze gemacht wird. Der zu untersuchende Bereich des SNPs wird mit einem Primerpaar amplifiziert und anschließend mit den Sonden VIC und FAM, welche fluoreszenzmarkiert sind, nachgewiesen. VIC und FAM werden durch die Taq-DNA-Polymerase gespalten. Das hat zur Folge, dass die Sonden von dem Quencher (MGB) getrennt werden.

Zuerst wird ein Mastermix angesetzt (**Tabelle 3**). Daraufhin werden 4 µl des Mastermixes in eine sterile PCR-Platte pipettiert und 1 µl der jeweiligen DNA-Probe hinzugegeben. In jeder Analyse sollten drei Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle vorhanden sein. Die PCR-Platte wird anschließend luftdicht mit einer Folie verschlossen und dann abzentrifugiert. Im Anschluss wird eine Real-Time-PCR durchgeführt. Die einzelnen Schritte dieses PCR-Verfahrens sind dabei in **Tabelle 4** dargestellt. Nach 30 Minuten ist die Analyse abgeschlossen und die Proben werden automatisch über die 7500 FAST 2.3 Software ausgewertet. Die

Ergebnisse der allelischen Diskriminierung für unsere Patientenkohorte sind in **Abbildung 4** bis **Abbildung 7** dargestellt.

**Tabelle 3** - Herstellung des Mastermixes.

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
2x Genotyping Mastermix	1x	2,5
40x Genotyping Assay	1x	0,125
DNA	10-50 ng	1,0
Steriles Wasser		1,375

Die Tabelle wurde aus der Arbeitsanweisung aus dem Bereich der Methodik von Fettlebererkrankungen und der allelischen Diskriminierung des Gastroenterologischen Labor des Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen.

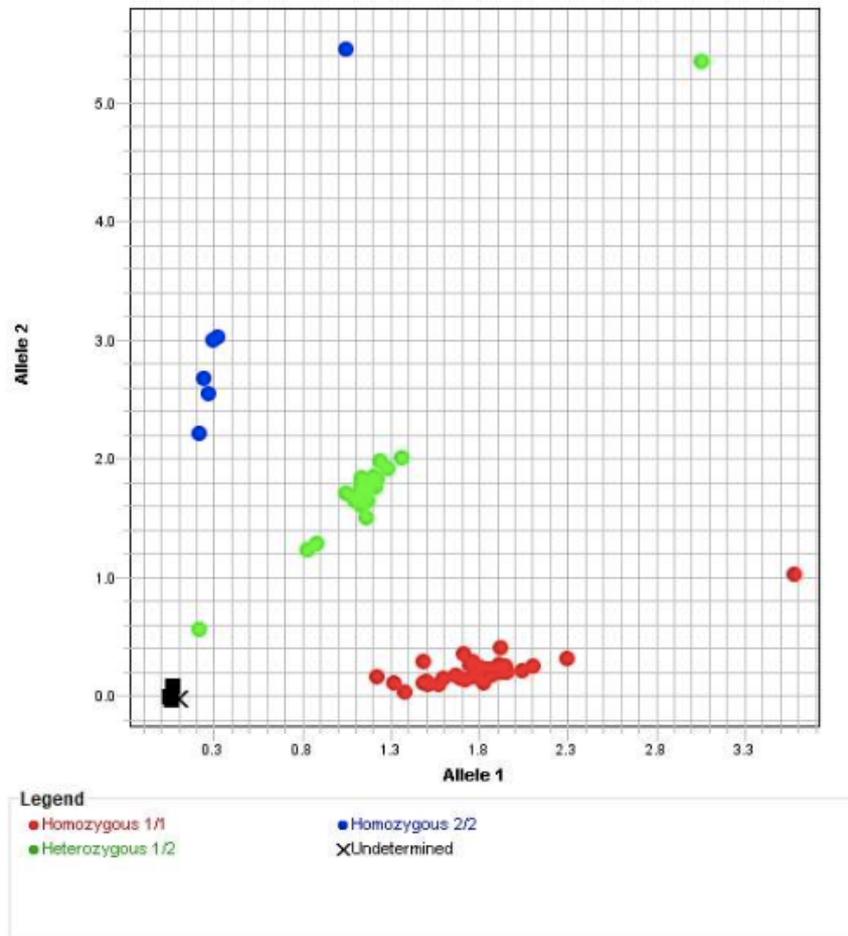
**Tabelle 4** - PCR-Schritte.

Schritt	Temperatur/Zeit
Pre Read	25°C / 1 min
Aktivierung AmpliTaq Gold	95°C / 20 sek
Amplifikation	95°C / 3 sek
Amplifikation 30 Zyklen	60°C / 30 sek
Post Read (Messung der End-Fluoreszenz)	25°C / 1 min

Die Tabelle wurde aus der Arbeitsanweisung aus dem Bereich der Methodik von Fettlebererkrankungen und der allelischen Diskriminierung des Gastroenterologischen Labor des Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen.

## Allelic Discrimination Plot

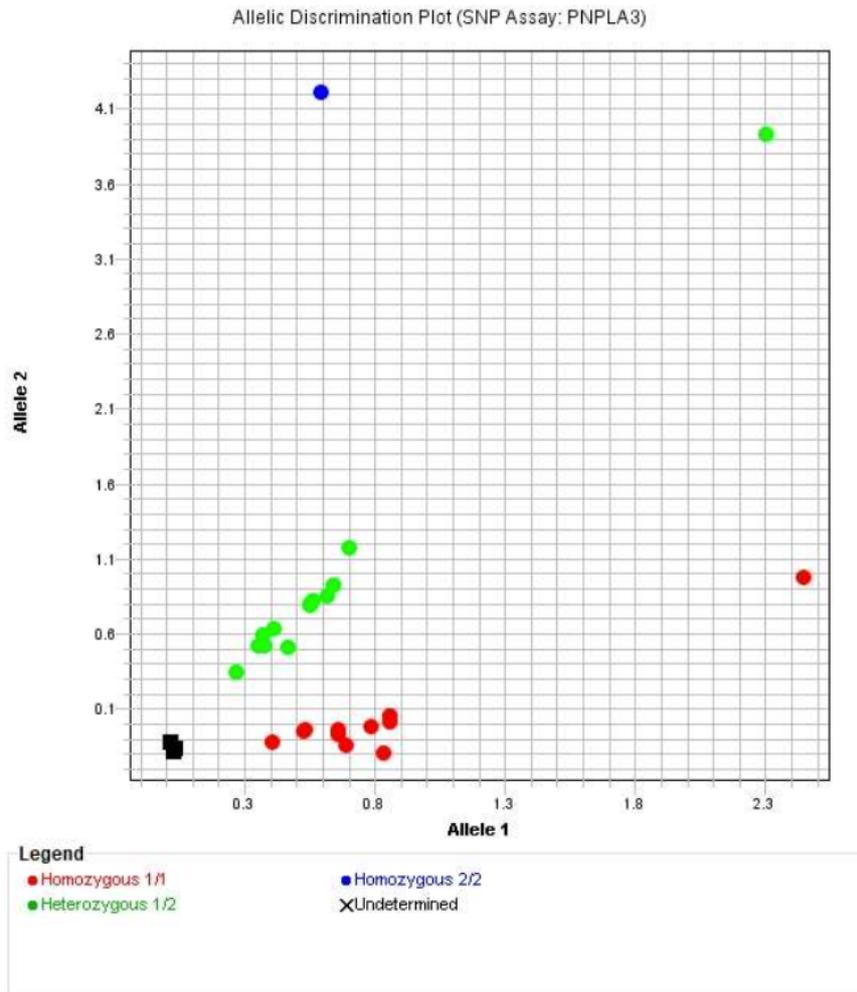
Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: PNPLA3)



**Abbildung 4** - Allelische Diskriminierung für *PNPLA3* p.I148M (1).

Hier dargestellt ist die Allelische Diskriminierung für die *PNPLA3* p.I148M Variante. Für diese Genvariante wurden zwei allelische Diskriminierungen durchgeführt, da dies für Zwischenergebnisse notwendig war und die Patientenkohorte dementsprechend aufgeteilt wurde. Die zweite allelische Diskriminierung ist in der nachfolgenden Abbildung (**Abbildung 5**) dargestellt. Die blauen und roten Punkte spiegeln dabei die Homozygoten und die grünen Punkte die Heterozygoten für *PNPLA3* wider. Ausgewertet wurde dies automatisch durch die 7500 FAST 2.3 Software, nachdem die Real Time PCR via TaqMan Assays abgeschlossen war. Das genaue Prozedere wurde in Kapitel 10.5 erläutert.

## Allelic Discrimination Plot



**Abbildung 5** - Allelische Diskriminierung für *PNPLA3* p.I148M (2).

Hier dargestellt ist die Allelische Diskriminierung für die *PNPLA3* p.I148M Variante. Für diese Genvariante wurden zwei allelische Diskriminierungen durchgeführt, da dies für Zwischenergebnisse notwendig war und die Patientenkohorte dementsprechend aufgeteilt wurde. Die erste allelische Diskriminierung ist in der vorherigen Abbildung (**Abbildung 4**) dargestellt. Die blauen und roten Punkte spiegeln dabei die Homozygoten und die grünen Punkte die Heterozygoten für *PNPLA3* wider. Ausgewertet wurde dies automatisch durch die 7500 FAST 2.3 Software, nachdem die Real Time PCR via TaqMan Assays abgeschlossen war. Das genaue Prozedere wurde in Kapitel 10.510.5 erläutert.

## Allelic Discrimination Plot

Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: MBOAT7)

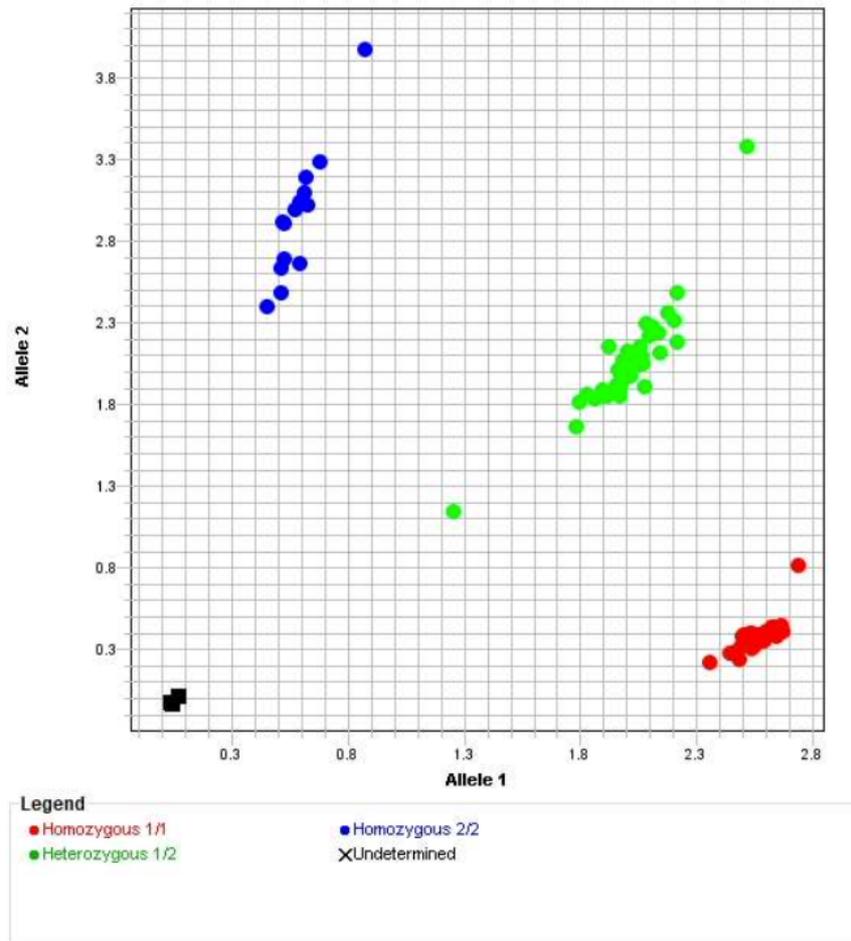
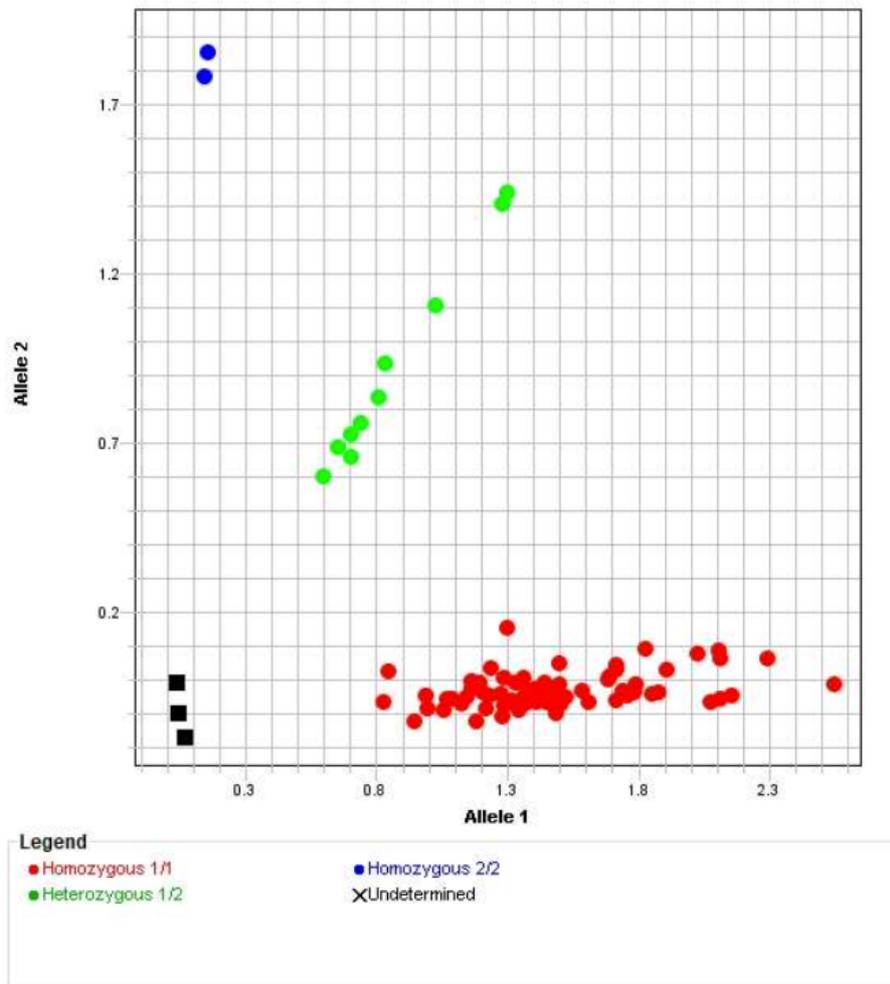


Abbildung 6 - Allelische Diskriminierung für *MBOAT7* p.G17E.

Hier dargestellt ist die Allelische Diskriminierung für die *MBOAT7* p.G17E Variante. Die blauen und roten Punkte spiegeln dabei die Homozygoten und die grünen Punkte die Heterozygoten für *MBOAT7* wider. Ausgewertet wurde dies automatisch durch die 7500 FAST 2.3 Software, nachdem die Real Time PCR via TaqMan Assays abgeschlossen war. Das genaue Prozedere wurde in Kapitel 10.5 erläutert.

## Allelic Discrimination Plot

Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: TM6SF2)



**Abbildung 7** - Allelische Diskriminierung für *TM6SF2* p.E167K.

Hier dargestellt ist die Allelische Diskriminierung für die *TM6SF2* p.E167K Variante. Die blauen und roten Punkte spiegeln dabei die Homozygoten und die grünen Punkte die Heterozygoten für *TM6SF2* wider. Ausgewertet wurde dies automatisch durch die 7500 FAST 2.3 Software, nachdem die Real Time PCR via TaqMan Assays abgeschlossen war. Das genaue Prozedere wurde in Kapitel 10.5 erläutert.

## 10.6 Messinstrumente der Lebensqualität

Im Folgenden wird auf die einzelnen Fragebögen, die zur Messung der Lebensqualität genutzt wurden, eingegangen und zudem genauer erläutert. Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer Depressivität, Ängstlichkeit, Müdigkeit sowie nach ihrer physischen und mentalen Verfassung befragt. Die Beantwortung der Fragen geschah nicht im Beisein einer der an dieser Arbeit beteiligten Personen, sodass die Patienten in Ruhe und ohne Zeitdruck die Fragen beantworten konnten.

### 10.6.1 PHQ-9: Patient Health Questionnaire-9

Der PHQ-9 ist ein Screening Test für Depressionen und umfasst neun Items [45]. Für die Diagnose einer schweren Depression (Major Depression) gibt es die DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) Kriterien. Für jedes Kriterium des DMS-IV gibt es eine zugehörige Frage im PHQ-9. Somit wird der Patient in den Fragen a-i nach den Kernsymptomen einer schweren Depression befragt und soll sich dabei auf seine Gefühlslage in den letzten zwei Wochen beziehen. Es werden die Themen depressive Verstimmung, Interessenverlust, Veränderung des Appetits, gestörtes Schlafverhalten, psychische Unruhe, Müdigkeit und Energieverlust, Wertlosigkeit, verminderte Konzentrationsfähigkeit sowie wiederkehrende Gedanken an den Tod abgefragt.

Die Auswertung erfolgt durch Summierung der einzelnen Punktwerte in den Fragen a-i und kann insgesamt Werte zwischen 0 und 27 Punkten annehmen. Die einzelnen Fragen können mit folgenden Antwortmöglichkeiten beantwortet werden und werden wie folgt ausgewertet:

0 Punkte = Überhaupt nicht.

1 Punkt = An einzelnen Tagen.

2 Punkte = An mehr als der Hälfte der Tage.

3 Punkte = Beinahe jeden Tag.

Die Interpretation des errechneten Gesamtpunktwertes kann der **Tabelle 5** entnommen werden.

**Tabelle 5** - Auswertungsschema des PHQ-9.

<b>Berechneter Gesamtpunktwert</b>	<b>Schweregrad der Depression</b>
0-4	Minimale depressive Symptomatik
5-9	Milde depressive Symptomatik
10-14	Mittelgradig depressive Symptomatik
15-27	Schwere depressive Symptomatik

### **10.6.2 GAD-7: Generalized Anxiety Disorder 7**

Der GAD-7 Fragebogen dient der Identifikation von generalisierten Angststörungen, beziehungsweise der Einschätzung des Schweregrades von Angst [119]. Er enthält sieben Fragen, die sich, ähnlich wie bei dem PHQ-9, nach den DSM-IV Kriterien einer generalisierten Angststörung orientieren. Dabei wird der Patient gebeten, die Fragen in Bezug auf die letzten zwei Wochen zu beantworten. Hierbei handelt es sich um Fragen, die auf Nervosität und Ängstlichkeit, auf vermehrte Sorge, der Unfähigkeit zu entspannen, Rastlosigkeit, schnelle Verärgerung und auf das Gefühl, dass etwas schlimmes passieren könnte, abzielen.

Die Auswertung erfolgt durch Summierung der einzelnen Punktwerte in den Fragen und kann insgesamt Werte zwischen 0 und 21 Punkten annehmen. Die einzelnen Fragen können mit folgenden Antwortmöglichkeiten beantwortet werden und werden wie folgt ausgewertet:

0 Punkte = Überhaupt nicht.

1 Punkt = An einzelnen Tagen.

2 Punkte = An mehr als der Hälfte der Tage.

3 Punkte = Beinahe jeden Tag.

Die Interpretation des errechneten Gesamtpunktwertes kann der **Tabelle 6** entnommen werden.

**Tabelle 6** - Auswertungsschema des GAD-7.

<b>Berechneter Gesamtpunktwert</b>	<b>Schweregrade der Angstsymptomatik</b>
0-4	Minimale Angstsymptomatik
5-9	Mild ausgeprägte Angstsymptomatik
10-14	Mittelgradig ausgeprägte Angstsymptomatik
15-21	Schwer ausgeprägte Angstsymptomatik

### **10.6.3 FIS-D: Fatigue Impact Scale**

Der Fatigue Impact Scale dient zur Einschätzung, wie stark die Müdigkeit des Patienten Einfluss auf dessen Alltag genommen hat. Dabei sollten sich die Antworten des Patienten auf die letzten vier Wochen beziehen. Es gibt in der Kurzversion des Fatigue Impact Scale 15 Fragen, wovon jeweils fünf Fragen zur kognitiven, körperlichen und psychosozialen Dimension gehören. Die Auswertung erfolgt auch hier über Summation der Gesamtpunktzahl aus allen 15 Fragen. Die einzelnen Fragen können mit folgenden Antwortmöglichkeiten beantwortet werden und werden wie folgt bewertet:

0 Punkte = nie

1 Punkt = selten

2 Punkte = manchmal

3 Punkte = oft

4 Punkte = sehr oft

Die Gesamtskala reicht demnach von 0 bis 60 Punkte. Werte über drei Punkte in den jeweiligen Subskalen, sollten als klinisch auffällig betrachtet werden. Dabei gilt auch hier: Je höher die erreichte Punktzahl ist, desto stärker ist die Beeinträchtigung des Patienten durch seine Müdigkeit.

Die Testinterpretation sowie die Testdurchführung wurden nach dem Testschema von Herrn Dr. Häuser (Klinikum Saarbrücken) durchgeführt [54]. Eine Nutzungsgenehmigung wurde im Vorfeld bei Herrn Dr. Häuser eingeholt.

#### 10.6.4 SF-12: Short Form (12) Health Survey

Der SF-12 Fragebogen besteht aus 12 Items und dient zur Erfassung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Er wurde erstmals 1995 als ein Teil der Medical Outcomes Study (MOS) veröffentlicht und stellt eine Kurzversion des SF-36 dar. Diese verkürzte Version des ursprünglichen Fragebogens soll den Beantwortungsaufwand der Patienten reduzieren. Die Untergliederung der Subskalen erfolgt in eine körperliche (PCS-12, Physical Score) und eine psychische Dimension (MCS-12, Mental Score) [153]. Zur besseren Darstellung der Verteilung der einzelnen Dimensionen dient **Abbildung 8**. Die Beantwortung durch den Patienten soll auf Grundlage der subjektiv empfundenen Lebensqualität innerhalb der letzten vier Wochen erfolgen. Dabei kann der Gesamtpunktwert zwischen 0 und 100 liegen. Niedrige Werte spiegeln dabei eine schlechte und hohe Werte eine bessere Lebensqualität wider.

Die einzelnen Fragen können mit folgenden Antwortmöglichkeiten beantwortet werden und werden wie folgt bewertet:

1 Punkt = ausgezeichnet

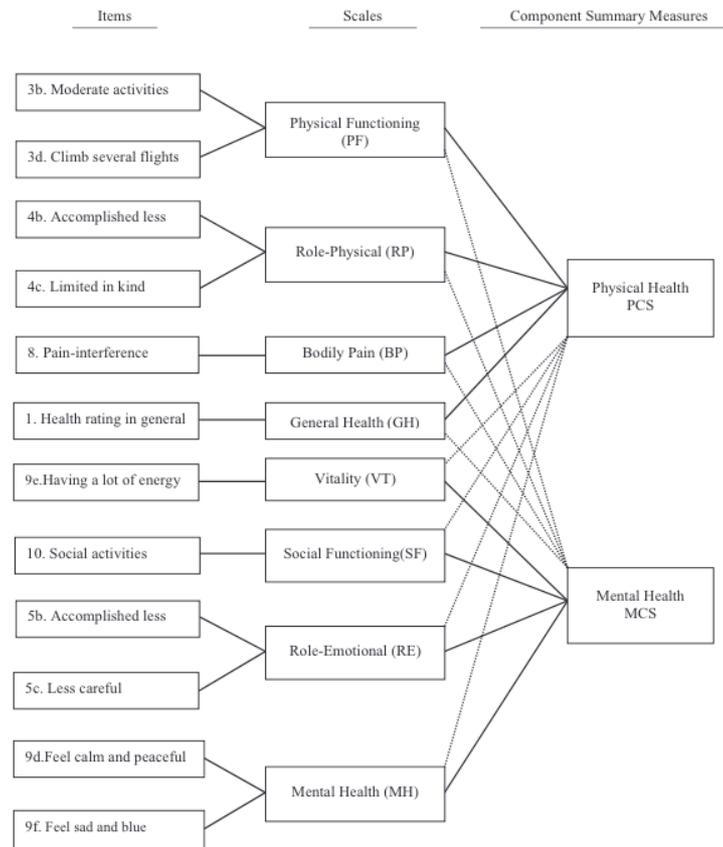
2 Punkte = sehr gut

3 Punkte = gut

4 Punkte = weniger gut

5 Punkte = schlecht

Die Auswertung erfolgte mit dem SF-12 OrthoToolKit.



**Abbildung 8** - Sub- und Summenskalen des SF-12.

Darstellung der Sub- und Summenskalen des SF-12 nach *Ware et al.* [153].

### 10.7 Analyse von SCFAs mittels Gas-Chromatographie

Alle Patienten bekamen am Tag der Aufnahme in die Studie ein Stuhlprobenentnahme-Set (EasySampler, GP Medical Devices, Dänemark) mit nach Hause. Dieses beinhaltete eine kleine Kühltasche mit jeweils zwei Kühllakkus, einen Stuhlauffänger für die Toilette, sowie Handschuhe und ein Stuhlprobenentnahmeröhrchen. Die Studienteilnehmer wurden über die Durchführung und die Aufbewahrung der Stuhlprobe im Vorfeld ausführlich aufgeklärt. Dabei war es vor allem wichtig, die Stuhlprobe maximal 24 Stunden vor dem nächsten Termin am Universitätsklinikum des Saarlandes zu entnehmen. Nachdem die Patienten die Stuhlprobe am Tag ihres Termins abgegeben haben, wurden die Proben schließlich im gastroenterologischen Labor der Klinik für Innere Medizin II bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Aufbereitung und Analyse der Stuhlproben erfolgte an der Pomeranian Medical University in Szczecin (Polen). Dafür wurden die Stuhlproben mittels Express-Versand auf Trockeneis verschickt. Die Stuhlanalyse beinhaltete zwei grundlegende Schritte: Isolation von SCFAs und eine anschließende Gas-Chromatographie. Die Isolation von SCFAs benötigt im Wesentlichen drei Substanzen: eine Stuhlprobe (0,5g), 5ml H<sub>2</sub>O und 5 M HCl. Zuerst werden die Stuhlprobe

und das Wasser zusammengegeben und für 5 Minuten gemischt. Der zweite Schritt besteht in der Zugabe von 5 M HCl, um einen pH-Wert von 2-3 zu erreichen. Nachfolgend werden die Substanzen für weitere 10 Minuten gemischt. Abschließend erfolgt eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 5000 U/min, um den Überstand dann für die Gas-Chromatographie mittels Agilent Technologies 1260 A GC-System mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), nach dem in [138] beschriebenem Schema, nutzen zu können.

Gegenstand unserer Studie waren dabei folgende SCFAs:

- C2 (Essigsäure)
- C3 (Propionsäure)
- C4i (Isobuttersäure)
- C4n (Buttersäure)
- C5i (Isovaleriansäure)
- C5n (Valeriansäure)
- 3-Methylvaleriansäure
- 4-Methylvaleriansäure
- C6 (Capronsäure)
- C7 (Heptansäure)

Die Ergebnisse der Stuhlanalyse wurden zum einen als Prozentsatz (%) aus der Fläche des Peaks und zum anderen in Millimolar (mM) angegeben.

## 10.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS Statistic Programm (Version 27, IBM, Deutschland) sowie mit Microsoft Excel. Sofern es nicht anders angegeben ist, beziehen sich die erhobenen Parameter auf den Median mit zugehörigem Minimum und Maximum. Mittels Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Daten zunächst auf eine Normalverteilung geprüft. Da der Shapiro-Wilk Test im Vergleich zum Kolmogorov-Smirnov-Test eine höhere Power/Effektstärke besitzt, wurde dieser vorrangig verwendet.

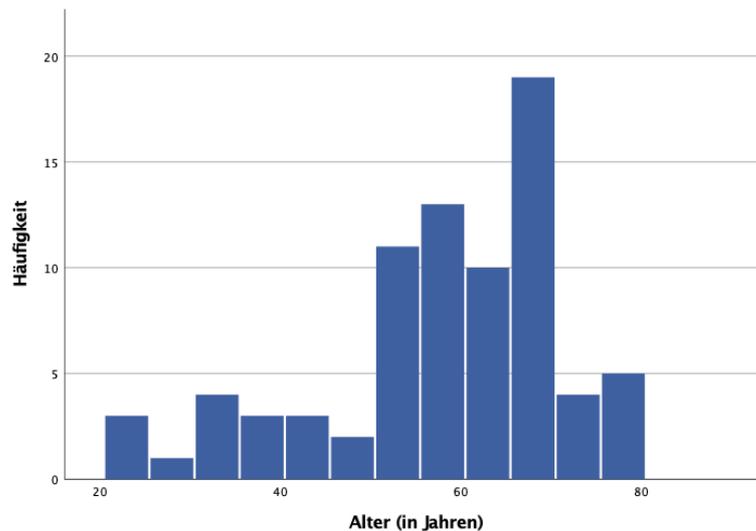
Sollte ein Zusammenhang zwischen zwei qualitativen Merkmalen, wie zum Beispiel dem Vorhandensein einer steatotischen Lebererkrankung und dem Geschlecht, untersucht werden, wurde der Chi-Quadrat-Test genutzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die minimale Häufigkeit  $>1$  ist und nicht mehr als 20% der Zellen eine Häufigkeit kleiner als 5% haben. Waren diese Voraussetzungen nicht gegeben, wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Zur Bestimmung eines Zusammenhangs von zwei quantitativen Variablen, wie beispielsweise Laborparametern wie AST, ALT und Punktwerten aus Messinstrumenten der Lebensqualität (FIS-D, SF-12), wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson genutzt, sofern die Parameter eine Normalverteilung aufwiesen. Werte galten als signifikant, wenn der zweiseitige p-Wert  $\leq 0,05$  betrug.

Zur Auswertung, ob die Risikogene *PNPLA3*, *MBOAT7* und *TM6SF2* mit anderen Parametern aus der Studie in Assoziation stehen, wurde eine ANOVA oder der Student's t-Test durchgeführt, sofern eine Normalverteilung bestand. Bei nicht normal verteilten Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

## 11 Ergebnisse

### 11.1 Charakteristika der Patientenkohorte

Unsere Patientenkohorte bestand aus 78 Patienten, wovon 30 männlich und 48 weiblich waren. Die Altersspanne reichte von 23 bis 78 Jahren. **Abbildung 9** dient als graphische Übersicht der Häufigkeitsverteilung des Alters innerhalb des Patientenkollektivs. **Tabelle 1** fasst die Charakteristika der Kohorte zusammen.

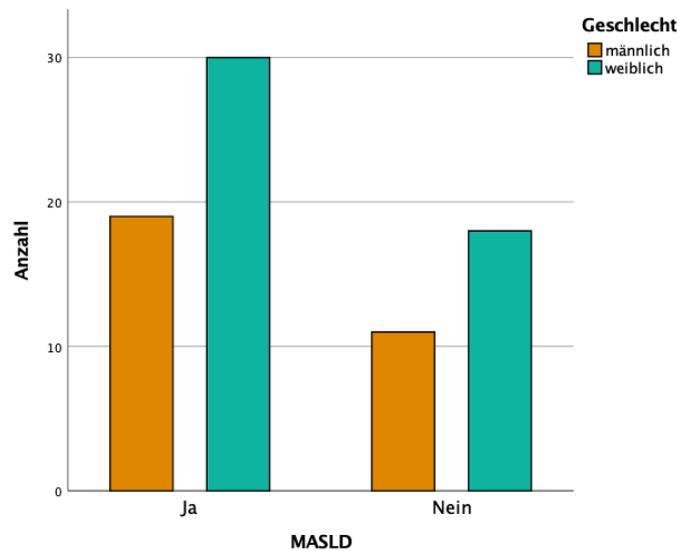


**Abbildung 9** - Häufigkeitsverteilung des Alters innerhalb der gesamten Kohorte.

Histogramm zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung des Lebensalters. Auf der X-Achse ist das jeweilige Lebensalter zu finden und auf der Y-Achse die Häufigkeitsangabe. Im Median waren die Patienten innerhalb dieser Kohorte 60 Jahre alt.

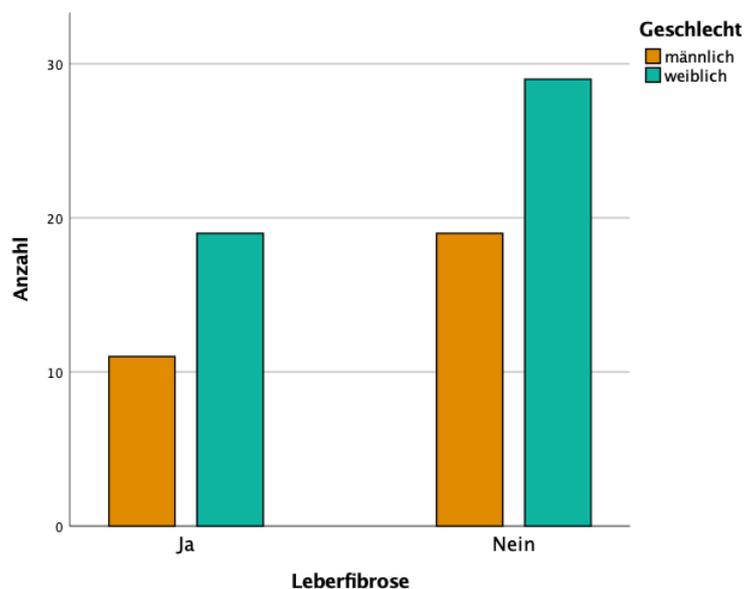
Innerhalb dieser Patientenkohorte betrug die Prävalenz für eine metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung 62,8% (n=49) und die der Leberfibrose 38,5% (n=30). Diejenigen Patienten, die in der transienten Elastographie keine MASLD diagnostiziert bekommen haben, dienten dabei als Kontrollpersonen. Dies traf auf insgesamt 29 Patienten (18 Frauen und 11 Männer) zu.

Unter den Männern betrug die Prävalenz der MASLD 63,3% (n=19). Bei den Frauen innerhalb unserer Kohorte betrug die Prävalenz für eine MASLD 62,3% (n=30) und war demnach fast genauso hoch wie bei den Männern. Somit konnten wir keine geschlechterspezifischen Unterschiede in Bezug auf das Vorhandensein einer Fettlebererkrankung feststellen. In Bezug auf das Vorhandensein einer Leberfibrose, konnten wir ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen Frauen und Männern feststellen (n=19; 39,6% bei Frauen vs. n=11; 36,7% bei Männern). **Abbildung 10** und **Abbildung 11** geben einen grafischen Überblick über die Prävalenz der MASLD und der Leberfibrose unter dem Aspekt des Geschlechts.



**Abbildung 10** - Prävalenz der MASLD bei Männern und Frauen innerhalb der Kohorte.

Balkendiagramm zur Darstellung der Prävalenz der MASLD bei Männern und Frauen innerhalb der gesamten Patientenkohorte. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung der Patienten (Patienten mit MASLD und Kontrollpersonen) und auf der Y-Achse die jeweilige Häufigkeit. Die orangenen Balken repräsentieren die männlichen und die grünen Balken die weiblichen Patienten.



**Abbildung 11** - Prävalenz von Leberfibrose bei Männern und Frauen innerhalb der Kohorte.

Balkendiagramm zur Darstellung der Prävalenz von Leberfibrose bei Männern und Frauen innerhalb der gesamten Patientenkohorte. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung der Patienten (Patienten mit Leberfibrose und Kontrollpersonen) und auf der Y-Achse die jeweilige Häufigkeit. Die orangenen Balken repräsentieren die männlichen und die grünen Balken die weiblichen Patienten.

Am Tag des Einschlussdatums für diese Studie wurde den Patienten Blut, bevorzugt aus einer Cubitalvene, entnommen, um wie in Kapitel 10.1 beschrieben, neben der Genotypisierung für die Risikogene *PNPLA3*, *MBOAT7* und *TM6SF2* einige Laborparameter zu bestimmen. Die jeweiligen Ergebnisse der Genotypisierung sowie der Blutuntersuchung werden in **Tabelle 1** und **Tabelle 7** dargestellt. Die Ergebnisse der Laborwerte beziehen sich dabei auf den Median inklusive jeweiliges Minimum und Maximum.

**Tabelle 7** - Häufigkeiten der Genotypen innerhalb der Patientenkohorte.

<b>Genotypen (N)</b>	<b>Gesamte Kohorte (n=78)</b>	<b>MASLD (n=49)</b>	<b>Kontrollpersonen (n=29)</b>
<b><i>PNPLA3</i> p.I148M</b>			
Wildtyp (p.148II)	41	25	16
Heterozygot (p.148IM)	32	20	12
Variante (p.148MM)	5	4	1
<b><i>MBOAT7</i> p.G17E</b>			
Wildtyp (p.17GG)	28	19	9
Heterozygot (p.17GE)	37	24	13
Variante (p.17EE)	13	6	7
<b><i>TM6SF2</i> p.E167K</b>			
Wildtyp (p.167EE)	68	40	28
Heterozygot (p.167EK)	9	8	1
Variante (p.167KK)	1	1	0

Abkürzungen: MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; *MBOAT7*, Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 7; *PNPLA3*, Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; *TM6SF2*, Transmembrane 6 superfamily 2.

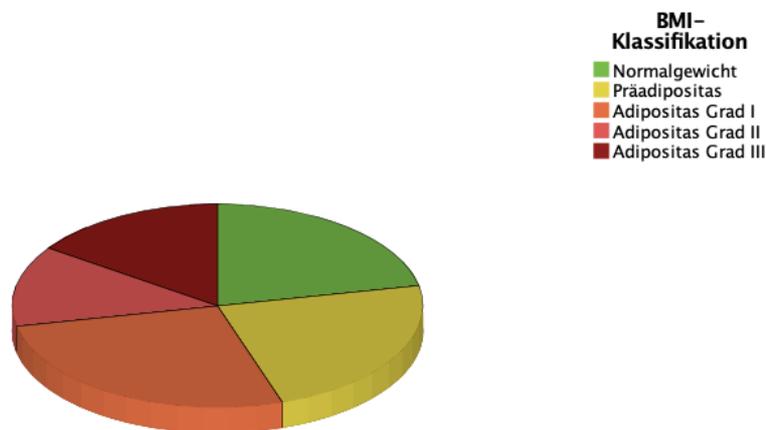
Weitergehend wurde bei allen Patienten der BMI bestimmt und alle unterzogen sich einer transienten Elastographie. Die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen werden nachfolgend aufgeführt und es wird dabei zeitgleich erläutert, welche Zusammenhänge wir zwischen dem BMI und den Messgrößen der transienten Elastographie im Rahmen dieser Studie innerhalb unserer Kohorte feststellen konnten.

Die Einteilung der jeweiligen BMI-Klassifikation richtete sich dabei nach der WHO-Klassifikation (siehe Kapitel 10.2). In dem nachfolgenden Kreisdiagramm (**Abbildung 12**) ist die BMI-Verteilung in unserer Patientenkohorte dargestellt.

Die Häufigkeiten in den Kategorien Untergewicht, Normalgewicht, Präadipositas und Adipositas Grad I-III werden in **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 8** - Häufigkeitsverteilung der BMI-Kategorien innerhalb der Patientenkohorte.

	<b>Gesamt</b>	<b>Frauen</b>	<b>Männer</b>
Untergewicht	0	0 (0%)	0 (0%)
Normalgewicht	17	13 (27,1%)	4 (13,3%)
Präadipositas	18	10 (20,8%)	8 (26,7%)
Adipositas Grad I	21	9 (18,8%)	12 (40%)
Adipositas Grad II	10	6 (12,5%)	4 (13,3%)
Adipositas Grad III	12	10 (20,8%)	2 (6,7%)

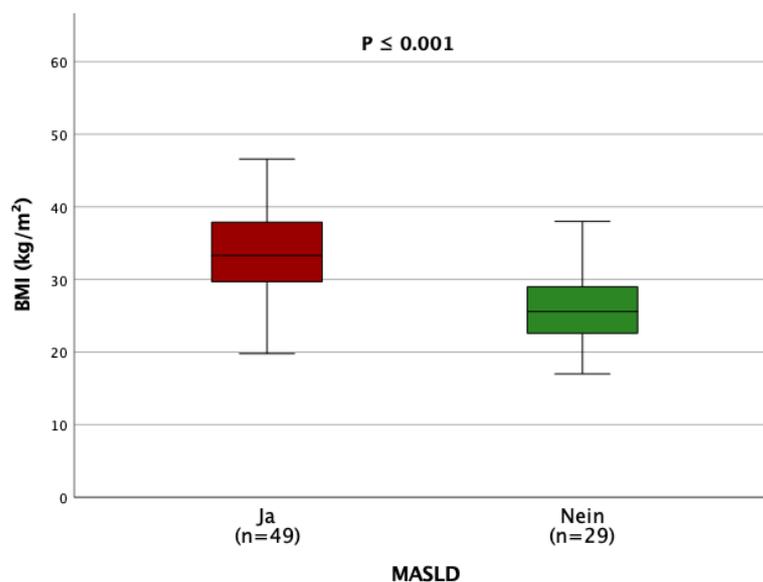


**Abbildung 12** – Verteilung der verschiedenen BMI-Klassen gemäß der WHO innerhalb der Kohorte.

Kreisdiagramm zur Darstellung der jeweiligen BMI-Klassen nach der WHO innerhalb der gesamten Patientenkohorte. Eine zugehörige Legende kann dem Kreisdiagramm entnommen werden. Die Kategorie Untergewicht wird nicht miteinbezogen, da wir keinen einzigen Patienten hatten, der dieser Kategorie zuzuordnen war.

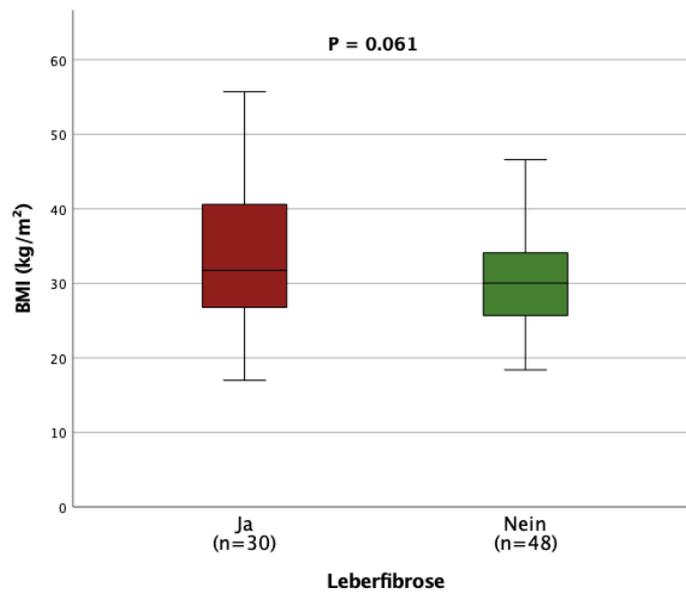
Wir konnten in Bezug auf den BMI keine geschlechterspezifischen Unterschiede feststellen. Sowohl die Frauen als auch die Männer unserer Kohorte hatten im Median einen BMI von 30,5

kg/m<sup>2</sup>. Frauen war jedoch mehr als dreimal so häufig von einer Adipositas Grad III betroffen im Vergleich zu den Männern (20,8% bei Frauen vs. 6,7% bei Männern). Ein weiterer Unterschied ließ sich im Bereich des Normalgewichtes feststellen. Hier waren die Frauen mit 27,1%, im Vergleich zu den Männern mit 13,3%, ebenfalls häufiger vertreten. Der Body-Mass-Index korrelierte mit dem Vorhandensein einer MASLD ( $P \leq 0.001$ ), jedoch nicht mit Leberfibrose ( $P = 0.061$ ). Patienten mit MASLD hatten im Median einen BMI von 33 kg/m<sup>2</sup> und Patienten ohne MASLD lediglich 26 kg/m<sup>2</sup> (**Abbildung 13**). Bei Patienten mit und ohne Leberfibrose waren hingegen kaum Unterschiede vorhanden. So betrug der BMI im Median 31,8 kg/m<sup>2</sup> bei Patienten mit Leberfibrose und bei Patienten ohne Fibrose 30,1 kg/m<sup>2</sup> (**Abbildung 14**). Patienten mit MASLD hatten demnach einen deutlich höheren Body-Mass-Index als unsere Kontrollpersonen.



**Abbildung 13** - BMI-Werte bei Patienten mit und ohne MASLD.

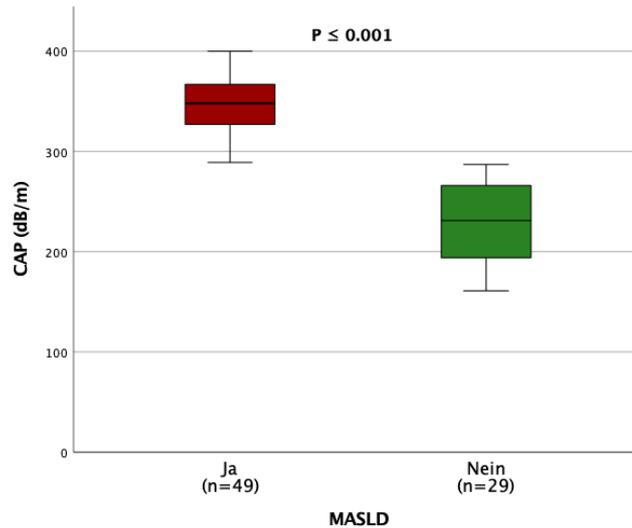
Boxplot zur Darstellung des BMI bei Patienten mit und ohne steatotische Lebererkrankung. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit MASLD und Kontrollpersonen und auf der Y-Achse die BMI-Werte in kg/m<sup>2</sup>. Der Median lag bei Patienten mit MASLD bei 33 kg/m<sup>2</sup> und bei den Kontrollpersonen bei 26 kg/m<sup>2</sup>. Somit zeigte sich, dass Patienten mit MASLD einen höheren BMI haben als die Kontrollpersonen ( $P \leq 0.001$ ).



**Abbildung 14** - BMI-Werte bei Patienten mit und ohne Leberfibrose.

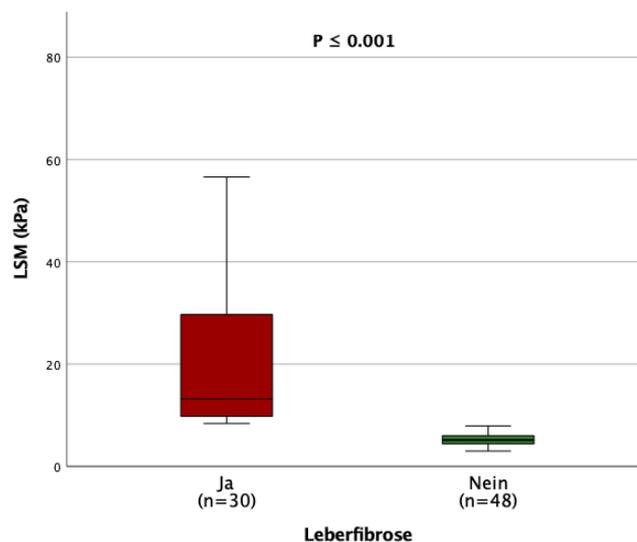
Boxplot zur Darstellung des BMI bei Patienten mit und ohne Leberfibrose. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit Leberfibrose und Kontrollpersonen und auf der Y-Achse die BMI-Werte in  $\text{kg/m}^2$ . Der Median lag bei Patienten mit Fibrose bei  $31,8 \text{ kg/m}^2$  und bei Patienten ohne Fibrose bei  $30,1 \text{ kg/m}^2$ . Somit zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Leberfibrose und einem höheren BMI ( $P = 0.061$ ).

Bei der Auswertung der Messgrößen der transienten Elastographie ergaben sich weder für den CAP noch für die Lebersteifigkeit signifikante geschlechter- oder altersspezifische Unterschiede. Die Frauen innerhalb unserer Kohorte hatten dennoch leicht höhere CAP-Werte im Vergleich zu den Männern ( $323 \text{ dB/m}$  bei den Frauen vs.  $318 \text{ dB/m}$  bei den Männern). Sowohl der CAP ( $P \leq 0.001$ ) als auch der LSM-Wert ( $P = 0.017$ ) korrelierten mit dem Body-Mass-Index. Außerdem stand der CAP in Beziehung zur steatotischen Lebererkrankung ( $P \leq 0.001$ ) und der LSM-Wert zur Leberfibrose ( $P \leq 0.001$ ). Die CAP- und LSM-Werte werden in **Tabelle 1** dargestellt. Zudem dienen **Abbildung 15** und **Abbildung 16** als graphische Übersicht.



**Abbildung 15** – CAP-Werte bei Patienten mit und ohne MASLD.

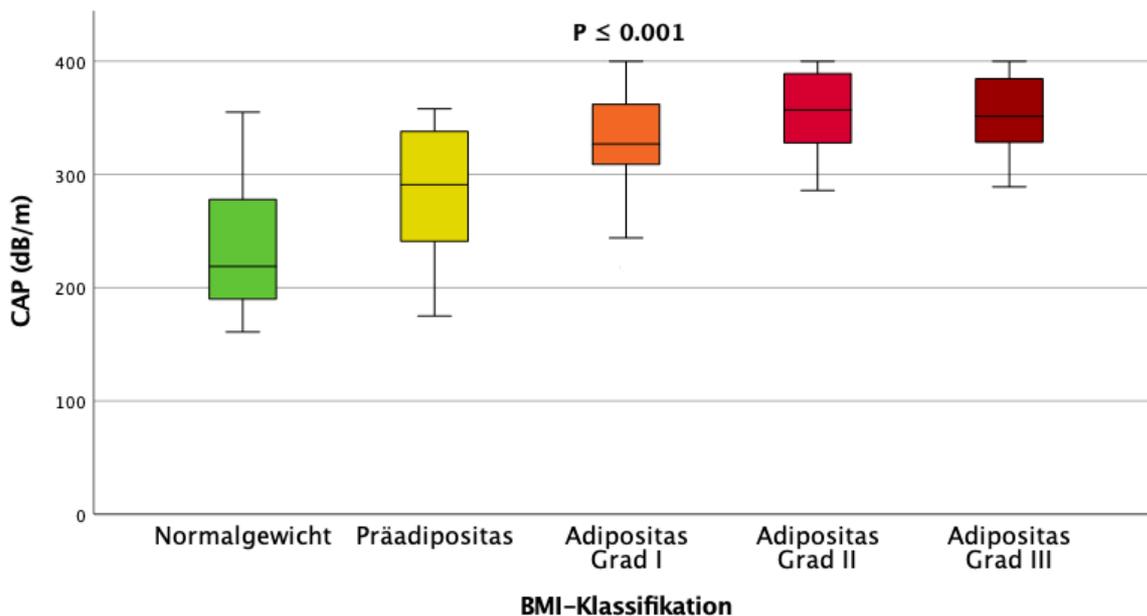
Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen MASLD und dem controlled attenuation parameter (CAP). Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit und ohne MASLD und auf der Y-Achse der CAP in dB/m. Der Median betrug bei Patienten mit steatotischer Lebererkrankung 340 dB/m und ohne MASLD 207 dB/m. Patienten mit MASLD haben deutlich höhere CAP-Werte als Patienten ohne MASLD ( $P \leq 0.001$ ).



**Abbildung 16** – LSM-Werte bei Patienten mit und ohne Leberfibrose.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs von Leberfibrose und dem LSM-Wert. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit und ohne Fibrose und auf der Y-Achse der LSM-Wert in kPa. Der Median betrug bei Patienten mit Leberfibrose 13,2 kPa und ohne Fibrose 5,2 kPa. Patienten mit Leberfibrose haben deutlich höhere LSM-Werte als Patienten ohne Leberfibrose ( $P \leq 0.001$ ).

Die Patienten wurden, wie bereits beschrieben, anhand ihres Body-Mass-Index gemäß der WHO-Klassifikation in sechs Gruppen eingeteilt: Untergewicht, Normalgewicht, Präadipositas, Adipositas Grad I, II und III. Dabei stieg der CAP mit steigendem BMI ( $P \leq 0.001$ ). Bei Normalgewichtigen betrug er im Median 219 dB/m, bei präadipösen Patienten 291 dB/m, bei Adipositas Grad I 327 dB/m, bei Adipositas Grad II 357 dB/m und bei Adipositas Grad III 351 dB/m (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17** – CAP-Werte bei Patienten verschiedener Gewichtsklassen gemäß dem BMI.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem controlled attenuation parameter (CAP) und den einzelnen BMI-Kategorien. Auf der X-Achse befindet sich die jeweilige Kategorie des BMI und auf der Y-Achse der CAP in dB/m. Patienten mit dem höchsten BMI (Adipositas Grad I-III) wiesen die höchsten CAP-Werte in der transienten Elastographie auf ( $P \leq 0.001$ ).

Hinsichtlich des Vorhandenseins eines Diabetes mellitus ergaben sich innerhalb dieser Kohorte folgende Prävalenzen: 21,8% (n=17) mit Diabetes mellitus Typ-1, 56,4% (n=44) mit Diabetes mellitus Typ-2, 1,2% (n=1) mit Diabetes mellitus Typ-3 und 20,5% (n=16) ohne Diabetes mellitus. Innerhalb unseres Patientenkollektivs waren weibliche Patienten prozentual gesehen seltener von einem Diabetes mellitus betroffen als die männlichen Patienten (22,9% bei Frauen vs. 16,7% bei Männern). Von einem Diabetes mellitus Typ-1 waren die Frauen etwas häufiger betroffen im Vergleich zu den Männern und von einem Diabetes mellitus Typ-2 waren die Männer öfter betroffen als die Frauen (**Tabelle 9**). Lediglich bei einer Patientin wurde ein Diabetes mellitus Typ-3 diagnostiziert.

**Tabelle 9** – Häufigkeitstabelle von Diabetes mellitus innerhalb des Patientenkollektivs.

	<b>Gesamt</b> (n=78)	<b>Frauen</b> (n=48)	<b>Männer</b> (n=30)
Kein Diabetes mellitus	16	11 (22,9%)	5 (16,7%)
Diabetes mellitus Typ-1	17	11 (22,9%)	6 (20%)
Diabetes mellitus Typ-2	44	25 (52,1%)	19 (63,3%)
Diabetes mellitus Typ-3	1	1 (2,1%)	0 (0%)

Diabetes mellitus war in dieser Studie mit dem Alter ( $P = 0.028$ ), dem BMI ( $P = 0.015$ ), dem CAP ( $P = 0.001$ ) und dem LSM-Wert ( $P = 0.026$ ) signifikant assoziiert.

Patienten mit MASLD waren beinahe zweimal so häufig von einem Diabetes mellitus Typ-2 betroffen im Vergleich zu den Patienten ohne MASLD (67,3% bei Patienten mit MASLD vs. 37,9% bei Patienten ohne MASLD). Patienten ohne MASLD hatten hingegen häufiger keinen Diabetes mellitus und waren fast doppelt so häufig von einem Diabetes mellitus Typ-1 betroffen (**Tabelle 10**). Patienten mit Leberfibrose waren ebenfalls häufiger von einem Diabetes mellitus Typ-2 betroffen (73,3% bei Patienten mit Leberfibrose vs. 45,8% bei Patienten ohne Leberfibrose). Ein Typ-1 Diabetes mellitus kam fast fünfmal so häufig bei Patienten ohne Leberfibrose vor (6,7% bei Patienten mit Leberfibrose vs. 31,3% bei Patienten ohne Leberfibrose). Ebenfalls gab es prozentual gesehen mehr Patienten ohne Diabetes mellitus in der nicht-Fibrose Gruppe (**Tabelle 11**).

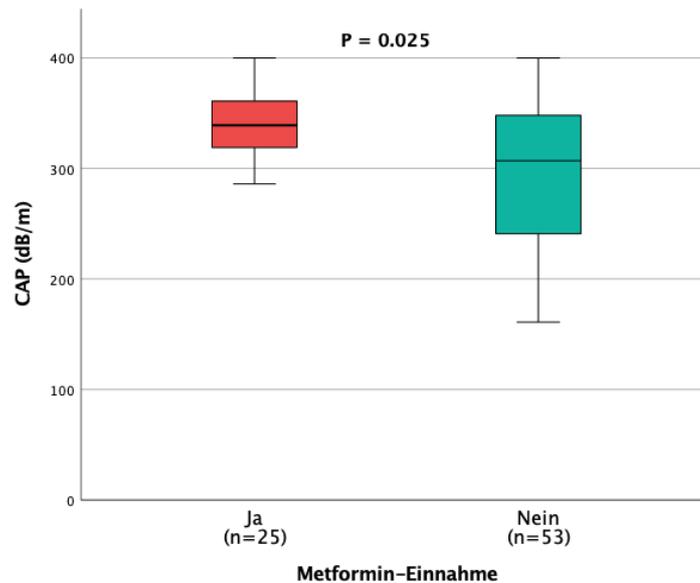
**Tabelle 10** – Prävalenz von Diabetes mellitus bei Patienten mit und ohne MASLD.

	<b>Gesamt</b> (n=78)	<b>MASLD</b> (n=49)	<b>Kontrollpersonen</b> (n=29)
Kein Diabetes mellitus	16	8 (16,3%)	8 (27,6%)
Diabetes mellitus Typ-1	17	8 (16,3%)	9 (31%)
Diabetes mellitus Typ-2	44	33 (67,3%)	11 (37,9%)
Diabetes mellitus Typ-3	1	0 (0%)	1 (3,4%)

**Tabelle 11** – Prävalenz von Diabetes mellitus bei Patienten mit und ohne Leberfibrose.

	<b>Gesamt</b> (n=78)	<b>Fibrose</b> (n=30)	<b>Kontrollpersonen</b> (n=48)
Kein Diabetes mellitus	16	5 (16,7%)	11 (22,9%)
Diabetes mellitus Typ-1	17	2 (6,7%)	15 (31,3%)
Diabetes mellitus Typ-2	44	22 (73,3%)	22 (45,8%)
Diabetes mellitus Typ-3	1	1 (3,3%)	0 (0%)

Die Einnahme von Metformin wurde in dieser Studie ebenfalls berücksichtigt. Von insgesamt 78 Studienteilnehmern nahmen 25 Patienten Metformin ein. Bezüglich der Metformin-Einnahme gab es keine geschlechter- oder altersspezifischen Unterschiede, dafür aber eine signifikante Korrelation mit dem BMI ( $P = 0.039$ ). Diejenigen Patienten, die Metformin einnahmen, hatten im Median einen höheren BMI als jene, die dieses Medikament nicht einnahmen ( $33,5 \text{ kg/m}^2$  bei Patienten mit Metformin-Einnahme vs.  $30 \text{ kg/m}^2$  bei Patienten, die kein Metformin einnahmen). Steatotische Lebererkrankungen waren signifikant mit der Metformin-Einnahme ( $P = 0.031$ ) assoziiert, nicht aber das Vorhandensein einer Leberfibrose. Zudem schien die Metformin-Einnahme, unabhängig von dem Vorhandensein einer Fettlebererkrankung, mit dem Steatosegrad in Verbindung zu stehen. So hatten Patienten, die Metformin einnahmen, im Median einen CAP-Wert von 339 dB/m. Im Vergleich dazu hatte die Patientengruppe ohne eine Metformin-Einnahme lediglich einen CAP-Wert von 307 dB/m ( $P = 0.025$ ). Dieser Zusammenhang wird in **Abbildung 18** dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Metformin-Einnahme und dem LSM-Wert konnten nicht beobachtet werden.



**Abbildung 18** – Die Einnahme von Metformin ist mit einem höheren CAP-Wert assoziiert.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Einnahme von Metformin und dem controlled attenuation parameter (CAP). Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit und ohne Einnahme von Metformin und auf der Y-Achse der CAP-Wert in dB/m. Der Median betrug bei Patienten mit Metformin-Einnahme 339 dB/m und ohne Metformin-Einnahme 307 dB/m ( $P = 0.025$ ).

Das Biguanid Metformin war des Weiteren mit dem TSH-Wert ( $P = 0.011$ ), dem Cholesterinwert ( $P \leq 0.001$ ), den Triglyceriden ( $P = 0.043$ ) und der Leukozytenanzahl im Blut ( $P \leq 0.001$ ) signifikant assoziiert. Der Cholesterinwert war bei Patienten, die das Antidiabetikum einnahmen, deutlich niedriger als bei den Patienten, die es nicht einnahmen. So betrug der mediane Cholesterinwert in der Metformin-Gruppe 146 mg/dl und in der Gruppe ohne Metformin-Einnahme 201 mg/dl. Die Anzahl der Leukozyten im Blut war bei Patienten mit Metformin-Einnahme höher als bei denen ohne Metformin-Einnahme (8.400 Zellen/ $\mu$ l bei Patienten mit Metformin-Einnahme vs. 6.700 Zellen/ $\mu$ l bei Patienten ohne dessen Einnahme).

## 11.2 Genotypisierung für die Risikogene: *MBOAT7*, *PNPLA3* und *TM6SF2*

Alle Patienten innerhalb unserer Kohorte wurden auf die Risikogene *MBOAT7*, *PNPLA3* und *TM6SF2* genotypisiert. Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen sind dabei der **Tabelle 7** zu entnehmen.

Für *MBOAT7* konnten wir 28 Patienten den Wildtypgenotyp zuordnen, dies entspricht 35,9% des Patientenkollektivs. Heterozygot waren 37 Patienten (47,4%) und homozygot mutiert waren 13 Patienten, was 16,7% des Gesamtkollektivs entsprach.

41 Patienten sind für den *PNPLA3*-Wildtypgenotyp vorhanden, entsprechend 52,5%. Weiter standen uns 32 Heterozygote (41%) sowie 5 homozygot mutierte Patienten zur Verfügung. Letzteres entspricht 6,4% des Patientenkollektivs.

87,1% (n=68) waren dem *TM6SF2*-Wildtypgenotyp zuzuordnen. Es standen zudem 9 Heterozygote (11,5%) zur Verfügung. Innerhalb unserer Patientenkohorte gab es demnach nur eine homozygot mutierte Variante, was lediglich einem Prozentsatz von 1,3% am Gesamtkollektiv ausmachte. Hier konnten wir vor allem beobachten, dass keine unserer Kontrollpersonen ein Allel des *TM6SF2*-Genotyps hatte im Vergleich zu den Patienten mit NAFLD. Dort konnten wir 9 heterozygote und einen homozygot mutierten Patienten ausmachen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch geprüft, ob sich der controlled attenuation parameter und der liver stiffness measurement durch genetische Faktoren beeinflussen lassen. Daher wurden die CAP- und LSM-Werte innerhalb der einzelnen Genotypengruppen dargestellt, was in **Tabelle 12** veranschaulicht wird. Dabei wird deutlich, dass bei den *PNPLA3*-Genotypen sowohl der CAP als auch der LSM-Wert bei den Wildtypen deutlich niedriger ist als bei den Patienten mit der homozygot mutierten Variante.

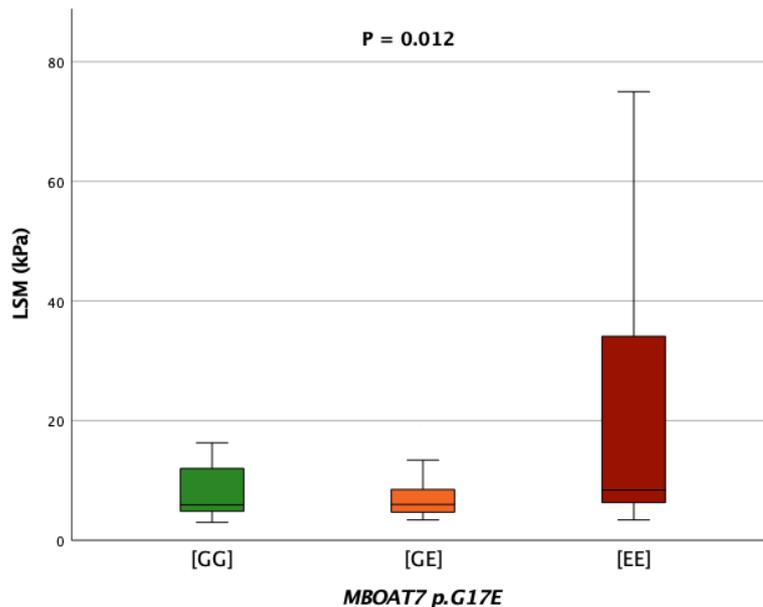
Bei den *MBOAT7*-Genotypen konnte genau das Gegenteil in Bezug auf den CAP beobachtet werden: hier hatten die Wildtypen deutlich höhere Werte als die Patienten mit der homozygot mutierten Variante. Der LSM-Wert verhielt sich ähnlich wie bei den *PNPLA3*-Genotypen, nur ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass zwar leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen zu beobachten sind, diese aber in der statistischen Auswertung nicht signifikant waren. Einzig der LSM-Wert und die *MBOAT7*-Variante waren signifikant miteinander assoziiert ( $P = 0.012$ ). Dieser Zusammenhang wird in **Abbildung 19** dargestellt. Wildtypen für *TM6SF2* hatten ebenso niedrigere CAP-Werte als Patienten mit der heterozygoten und homozygot mutierten Variante. LSM-Werte waren bei den Wildtypen höher, was wahrscheinlich auf die recht ungleiche Verteilung der einzelnen Genotypen für *TM6SF2* zurückzuführen ist.

**Tabelle 12** – CAP und LSM-Werte bei *PNPLA3*, *MBOAT7* und *TM6SF2* Genotypen.

<b>Genotypen</b>	<b>Anzahl (N)</b>	<b>CAP (dB/m)</b>	<b>LSM (kPa)</b>
<b><i>PNPLA3</i> p.I148M</b>			
Wildtyp (p.148II)	41	321 (176-400)	6,1 (3,0-75,0)
Heterozygot (p.148IM)	32	323 (161-400)	6,2 (3,4-75,0)
Variante (p.148MM)	5	348 (231-355)	9 (4,3-34,1)
<b><i>MBOAT7</i> p.G17E</b>			
Wildtyp (p.17GG)	28	327 (180-400)	6,0 (3,0-30,8)
Heterozygot (p.17GE)	37	327 (161-400)	6,0 (3,4-75,0)
Variante (p.17EE)	13	278 (175-395)	8,4 (3,4-75,0)
<b><i>TM6SF2</i> p.E167K</b>			
Wildtyp (p.167EE)	68	312 (161-400)	6,3 (3,0-75,0)
Heterozygot (p.167EK)	9	362 (273-400)	5,9 (5,3-50,9)
Variante (p.167KK)	1	338 (338-338)	4,3 (4,3-4,3)

Sofern nicht anders angegeben, werden die Variablen als Median mit dem jeweiligen Minimum und Maximum angegeben.

Abkürzungen: CAP, controlled attenuation parameter; LSM, liver stiffness measurement; *MBOAT7*, Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 7; *PNPLA3*, Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; *TM6SF2*, Transmembrane 6 superfamily 2.



**Abbildung 19** - LSM-Werte bei *MBOAT7* p.G17E Genotypen.

Boxplot zur Darstellung der LSM-Werte bei den *MBOAT7*-Genotypen. Auf der X-Achse befindet sich der jeweilige Genotyp (GG = Wildtypen, GE = Heterozygote und EE = Variante) und auf der Y-Achse der LSM-Wert in kPa. Der Median betrug bei den Wildtypen sowie bei den Heterozygoten 6 kPa und bei der Variante 8,4 kPa. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem LSM-Wert und den *MBOAT7*-Genotypen ( $P = 0.012$ ).

### 11.3 Unterschiede in Bezug auf die Depressivität, Angst, Müdigkeit und der allgemeinen Lebensqualität unter dem Aspekt des Geschlechts und der MASLD

Es werden nun die verwendeten Fragebögen PHQ-9, GAD-7, FIS-D und SF-12 zur Beurteilung der Lebensqualität zunächst bei Männern und Frauen und dann im Vergleich zwischen Patienten mit und ohne MASLD ausgewertet. Zuletzt wird auch gemessen, ob es einen Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren gibt. Die Zusammenhänge zwischen der Lebensqualität und Metaboliten der Darmbakterien (SCFAs) werden hingegen in den Kapiteln 11.4.3 und 11.4.4 aufgeführt.

Zur Bewertung der Lebensqualität unserer Studienteilnehmer standen uns 62 PHQ-9 und GAD-7, 53 FIS-D und 54 SF-12 Fragebögen zur Verfügung. Unvollständig ausgefüllte Fragebögen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Um eine allgemeine Übersicht der Ergebnisse bei Männern und Frauen, Patienten mit MASLD und den Kontrollpersonen zu bekommen, dient Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.. Die Ergebnisse des FIS-D und SF-12 Fragebogen beziehen sich jeweils auf den Median und der dazugehörigen Standardabweichung.

**Tabelle 13** - Häufigkeitstabelle der verwendeten Messinstrumente zur Bewertung der Lebensqualität in kategorischen Untergruppen.

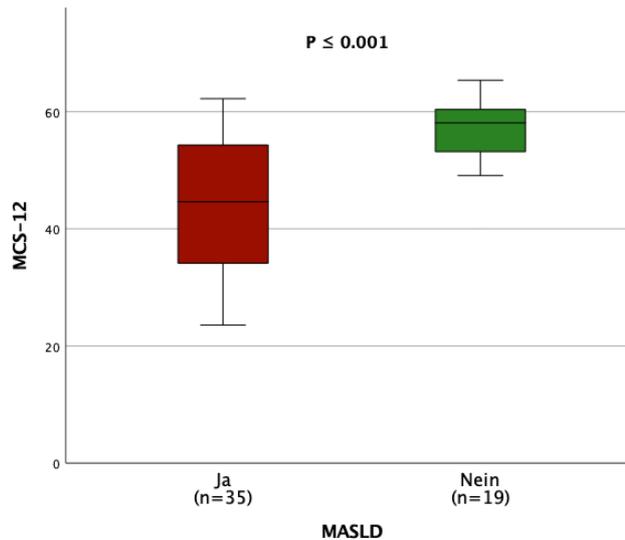
Messinstrument	Gesamt	Männer	Frauen	MASLD	Kontroll- personen
<b>PHQ-9</b>	62	25	37	39	23
<b>(Depression)</b>					
minimal	29 (46,8%)	13 (52%)	16 (43,2%)	15 (38,5%)	14 (60,9%)
mild	13 (21%)	4 (16%)	9 (24,3%)	8 (20,5%)	5 (21,7%)
mittelgradig	13 (21%)	7 (28%)	6 (16,2%)	10 (25,6%)	3 (13%)
schwer	7 (11,3%)	1 (4%)	6 (16,2%)	6 (13,4%)	1 (4,3%)
<b>GAD-7</b>	62	25	37	39	23
<b>(Angst)</b>					
minimal	36 (58,1%)	13 (52%)	23 (62,1%)	17 (43,6%)	19 (82,6%)
mild	14 (22,6%)	6 (24%)	8 (21,6%)	12 (30,8%)	2 (8,7%)
mittelgradig	8 (12,9%)	4 (16%)	4 (10,8%)	6 (15,4%)	2 (8,7%)
schwer	4 (6,5%)	2 (8%)	2 (5,4%)	4 (10,3%)	0 (0%)
<b>FIS-D</b>	53	21	32	33	20
<b>(Müdigkeit)</b>					
	15 ± 17	15 ± 15	15 ± 18	24 ± 18	9 ± 14
<b>SF-12</b>	54	21	33	35	19
PCS-12	44,41 ± 10,85	49,27 ± 11,97	40,71 ± 10,21	42,27 ± 11,53	47,57 ± 9,58
MCS-12	52,34 ± 12,14	48,65 ± 11,11	53,58 ± 12,89	44,63 ± 11,21	58,09 ± 11,28

Sofern nicht anders angegeben, werden die Variablen als Median mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.

Abkürzungen: FIS-D, Fatigue Impact Scale Deutsch; GAD-7, Generalized Anxiety Disorder Scale-7; MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; MCS-12, Mental Score des SF-12; PCS-12, Physical Score des SF-12; PHQ-9, Patient Health Questionnaire-9; SF-12, Short-Form (12) Health Survey.

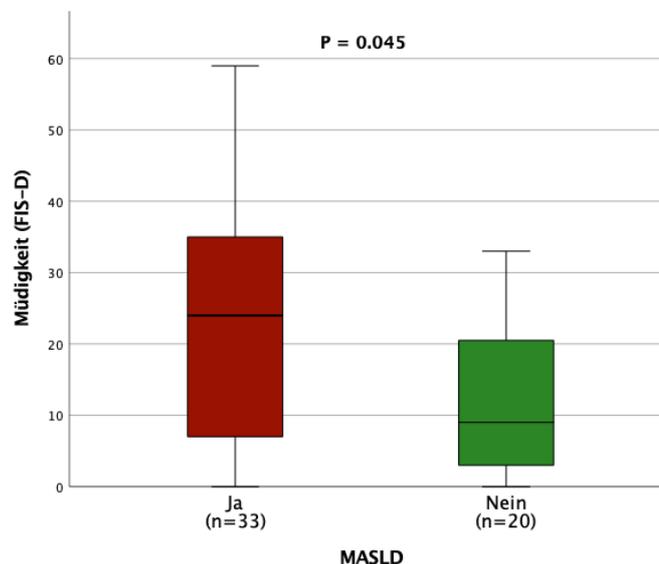
Frauen waren im Vergleich zu Männern viermal so häufig von einer schweren Depression betroffen (16,2% bei Frauen vs. 4% bei Männern). Zudem erzielten Frauen deutlich niedrigere Werte im PCS-12 des SF-12. Im MCS-12 des SF-12 hatten hingegen die Männer niedrigere Werte im Vergleich zu den Frauen. Die Frauen innerhalb unserer Kohorte hatten demnach eine schlechtere körperliche Lebensqualität und die Männer eine schlechtere mentale Lebensqualität. In Bezug auf Angst und vermehrte Müdigkeit konnten wir keine wesentlichen geschlechterspezifischen Unterschiede feststellen.

Patienten mit MASLD zeigten mehr als dreimal so häufig schwere Depressionen und Angstzustände als Patienten ohne nachgewiesene chronische Lebererkrankung. Eine stark ausgeprägte Angstsymptomatik zeigte keine unserer Kontrollpersonen. So zeigte sich im Vergleich dazu jedoch, dass vier Patienten mit MASLD eine schwere Angststörung gemäß dem GAD-7 hatten. Sowohl die mentale als auch die physische Lebensqualität war bei Patienten mit steatotischer Lebererkrankung schlechter als bei den Kontrollpersonen. Patienten mit Fettleber hatten im Median 44,63 Punkte im MCS-12 des SF-12 und im Vergleich dazu hatten Patienten ohne MASLD einen Median von 58,09 Punkten ( $P \leq 0.001$ ) (**Abbildung 20**). Niedrigere Werte spiegeln hier eine schlechtere Lebensqualität wider. Die Ausprägung der Müdigkeit war ebenfalls bei Patienten mit Fettlebererkrankung stärker als bei jenen ohne. So zeigte sich, dass Patienten mit MASLD im Median einen Punktwert von 24 im FIS-D erzielten und Patienten ohne MASLD einen Wert von 9 ( $P = 0.045$ ) (**Abbildung 21**). Höhere Punktwerte im FIS-D sind als eine stärker ausgeprägte Müdigkeit zu bewerten.



**Abbildung 20** – Patienten mit MASLD haben eine schlechtere mentale Lebensqualität.

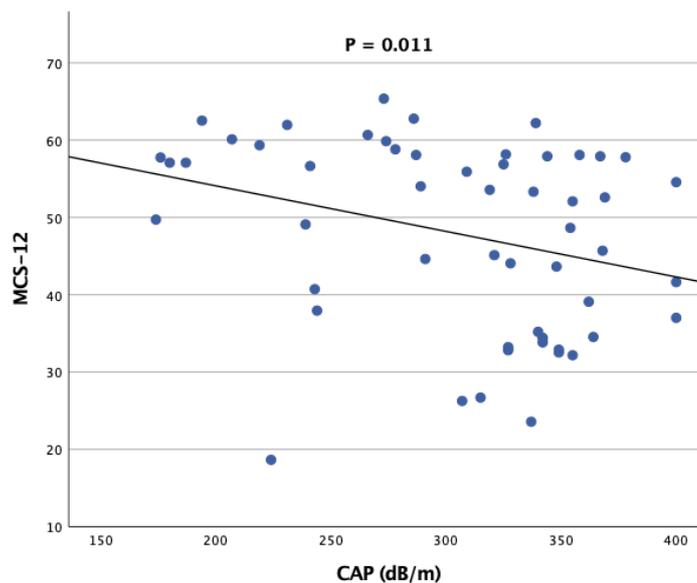
Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der steatotischen Lebererkrankung und einer schlechteren mentalen Lebensqualität. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit und ohne MASLD und auf der Y-Achse ist die mentale Lebensqualität gemäß dem MCS-12 des SF-12 dargestellt. Patienten mit MASLD haben im Median einen Punktwert von 44,63 im MCS-12 und Patienten ohne MASLD einen Punktwert von 58,09 ( $P \leq 0.001$ ). Niedrigere Werte spiegeln hier eine schlechtere mentale Lebensqualität wider.



**Abbildung 21** – Patienten mit MASLD leiden unter einer stärkeren Müdigkeit als Patienten ohne MASLD.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der steatotischen Lebererkrankung und einer stärkeren Müdigkeit. Auf der X-Achse befindet sich die Einteilung in Patienten mit und ohne MASLD und auf der Y-Achse ist die Müdigkeit gemäß dem FIS-D dargestellt. Patienten mit MASLD haben im Median einen Punktwert von 24 im FIS-D und Patienten ohne MASLD einen Punktwert von 9 ( $P = 0.045$ ).

Unter den getesteten Fragebögen zur Beurteilung der Lebensqualität innerhalb unserer Kohorte zeigten sich lediglich die mentale Lebensqualität ( $P \leq 0.001$ ) und die Müdigkeit ( $P = 0.045$ ) in der statistischen Analyse signifikant mit steatotischen Lebererkrankungen. Die übrigen festgestellten Unterschiede in Bezug auf die Lebensqualität waren zwar deutlich, erreichten jedoch nicht die statistische Signifikanz von  $P = \leq 0.05$ . Außerdem zeigte sich, dass auch der CAP-Wert mit der mentalen Lebensqualität assoziiert war ( $P = 0.011$ ). Demnach hatten Patienten mit einem höheren CAP-Wert, unabhängig von dem Vorhandensein einer Fettlebererkrankung, eine geringere Punktzahl im MCS-12 des SF-12, was, wie eingangs beschrieben, mit einer schlechteren mentalen Lebensqualität assoziiert ist (**Abbildung 22**).

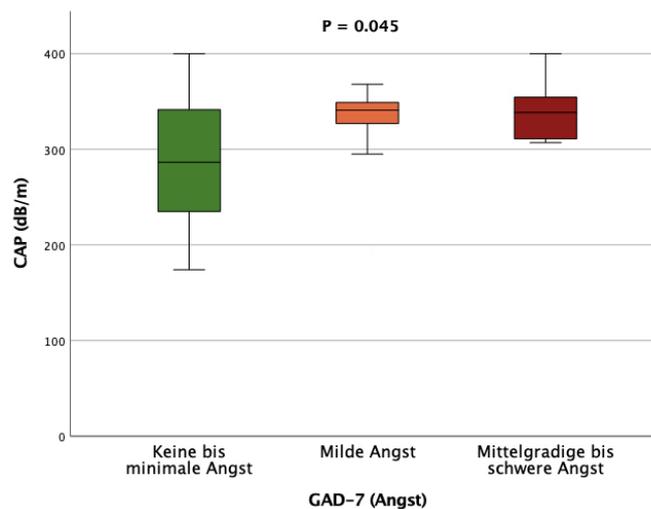


**Abbildung 22** - Korrelation zwischen höheren CAP-Werten und einer schlechteren mentalen Lebensqualität.

Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen höheren CAP-Werten in der transienten Elastographie und einer schlechteren mentalen Lebensqualität gemäß dem MCS-12 des SF-12. Niedrigere Werte im MCS-12 spiegeln dabei eine schlechtere mentale Lebensqualität wider ( $P = 0.011$ ). Auf der X-Achse befinden sich die CAP-Werte in dB/m und auf der Y-Achse die Ergebnisse des MCS-12.

Zudem wurde überprüft, ob die CAP- und LSM-Werte einen Einfluss auf weitere kognitive Veränderungen haben. Höhere CAP-Werte waren mit stärkerer Angst in Verbindung zu setzen ( $P = 0.045$ ). Patienten mit keiner bis minimaler Angstsymptomatik hatten einen medianen CAP von 287 dB/m, Patienten mit milder Angst 341 dB/m und Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Angst 338 dB/m (**Abbildung 23**).

Weder der controlled attenuation parameter noch der liver stiffness measurement zeigten in der Analyse einen relevanten Einfluss auf die Ausprägung von Depressionen, Müdigkeit und der körperlichen Lebensqualität. Auch die Einnahme des Antidiabetikums Metformin schien sich nicht auf diese Aspekte auszuwirken.



**Abbildung 23** - Patienten mit schwerer Angstsymptomatik haben höhere CAP-Werte.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem controlled attenuation parameter (CAP) und Angststörungen. Auf der X-Achse befinden sich die kategorischen Untergruppen von Angststörungen gemäß dem GAD-7 Test und auf der Y-Achse die CAP-Werte in dB/m, die in der transienten Elastographie gemessen wurden. Diejenigen Patienten mit keiner bis minimaler Angstsymptomatik zeigten niedrigere CAP-Werte im Vergleich zu den Patienten mit einer schweren Form der Angst ( $P = 0.045$ ).

Neben einer Prüfung der Unterschiede in der Lebensqualität bei Patienten mit und ohne steatotische Lebererkrankung, war es ebenfalls Teil dieser Arbeit, Bezug auf genetische Risikofaktoren wie *PNPLA3*, *MBOAT7* und *TM6SF2* zu nehmen. Hierbei konnten wir ebenfalls keine relevanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Genotypen feststellen.

In der anschließenden Auswertung wurden die einzelnen Messinstrumente zur Bewertung der Lebensqualität gegenübergestellt, um zu überprüfen, wie sich beispielsweise eine Depression auf die Ängstlichkeit oder Müdigkeit eines Patienten auswirkt bzw. ob eine kognitive Veränderung auf weitere Faktoren, die eine Lebensqualität definieren, Einfluss hat. Demnach stellte sich uns die Frage, ob Patienten, die schon beispielsweise unter einer Depression leiden, auch häufiger von einer Angststörung oder vermehrter Müdigkeit betroffen sind.

In der Korrelationsanalyse zeigte sich, dass dies zutraf. Das Vorhandensein einer Messvariable für kognitive Veränderungen, wie beispielsweise der Depression, schien das Vorhandensein für eine weitere Messvariable (z.B. Ängstlichkeit oder stark ausgeprägte Müdigkeit) zu begünstigen. Mit Ausnahme des PCS-12 und des MCS-12 waren alle Messinstrumente der Lebensqualität untereinander hoch signifikant (**Tabelle 14**). Das Vorhandensein einer Depression korrelierte also zum Beispiel mit dem Vorhandensein einer starken Angst oder vermehrter Müdigkeit. Im Gegensatz dazu war eine schlechtere körperliche Lebensqualität nicht mit einer schlechteren mentalen Lebensqualität assoziiert.

**Tabelle 14** - Korrelationen zwischen den verwendeten Messinstrumenten der Lebensqualität.

	<b>PHQ-9</b>		<b>GAD-7</b>		<b>FIS-D</b>		<b>PCS-12</b>		<b>MCS-12</b>	
	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r
PHQ-9			<0.001	0.84	<0.001	0.85	<0.001	-0.53	<0.001	-0.76
GAD-7					<0.001	0.76	0.002	-0.41	<0.001	-0.77
FIS-D							<0.001	-0.57	<0.001	-0.74
PCS-12									0.73	0.24

Abkürzungen: FIS-D, Fatigue Impact Scale Deutsch; GAD-7, Generalized Anxiety Disorder Scale-7; MCS-12, Mental Score des SF-12; PCS-12, Physical Score des SF-12; PHQ-9, Patient Health Questionnaire-9; SF-12, Short-Form (12) Health Survey.

#### 11.4 Short-chain fatty acids im Stuhl

Wir haben von 45 Patienten eine Stuhlprobe erhalten und darin verschiedene Fettsäuren gemessen. 30 Stuhlproben waren von Patienten mit einer steatotischen Lebererkrankung und 15 Stuhlproben von Kontrollpersonen. Das genaue Prozedere und die Auflistung der gemessenen Fettsäuren sind dabei in Kapitel 10.7 beschrieben. Um einen Überblick der gemessenen SCFAs innerhalb unserer Patientenkohorte zu erhalten, dienen **Tabelle 15** und **Tabelle 16**. Im Folgenden wird auf die geschlechterspezifischen Unterschiede der fäkalen SCFAs eingegangen, auf die Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne MASLD, auf Zusammenhänge mit der Lebensqualität und auf einen möglichen Einfluss einer genetischen Komponente.

**Tabelle 15** - Übersichtstabelle der gemessenen fäkalen SCFAs in mM bei Patienten mit und ohne MASLD.

SCFAs (mM)	MASLD (n=30)		Kontrollpersonen (n=15)		P
	Median	IQR	Median	IQR	
C2 (Essigsäure)	6.50	1.64	5.21	2.55	<b>0.024</b>
C3 (Propansäure)	2.13	1.80	1.29	1.13	<b>0.028</b>
C4i (Isobuttersäure)	0.06	0.11	0.05	0.15	n.s.
C4n (Buttersäure)	1.27	1.72	1.03	1.62	n.s.
C5i (Isovaleriansäure)	0.07	0.19	0.09	0.25	n.s.
C5n (Valeriansäure)	0.02	0.16	0.05	0.09	n.s.
3-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
4-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C6 (Capronsäure)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C7 (Heptansäure)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.

Abkürzungen: IQR, Interquartilsabstand; MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; n.s., nicht signifikant (d.h.:  $P \geq 0.05$ ), SCFAs; short-chain fatty acids.

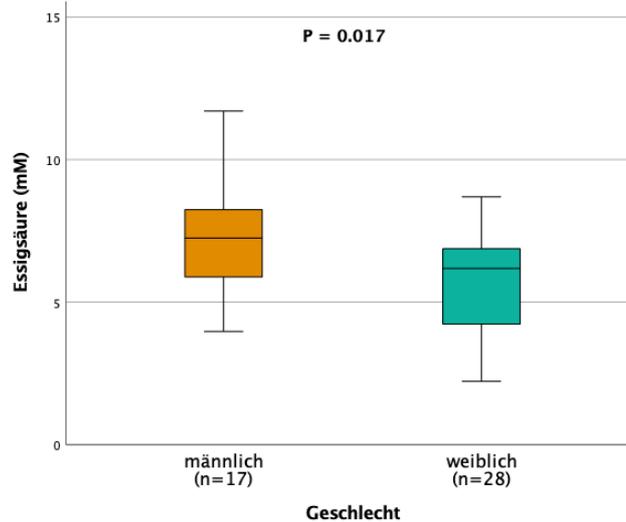
**Tabelle 16** - Übersichtstabelle der gemessenen fäkalen SCFAs in % bei Patienten mit und ohne MASLD.

SCFAs (%)	MASLD (n=30)		Kontrollpersonen (n=15)		P
	Median	IQR	Median	IQR	
C2 (Essigsäure)	35.40	14.43	35.53	4.70	n.s.
C3 (Propansäure)	22.23	10.23	22.33	10.00	n.s.
C4i (Isobuttersäure)	2.82	2.24	4.33	4.33	<b>0.043</b>
C4n (Buttersäure)	24.71	15.98	22.09	12.58	n.s.
C5i (Isovaleriansäure)	5.33	5.47	11.46	10.21	<b>0.005</b>
C5n (Valeriansäure)	4.47	2.81	5.44	1.46	<b>0.007</b>
3-Methylvaleriansäure	0.30	0.18	0.20	0.20	n.s.
4-Methylvaleriansäure	0.02	0.02	0.02	0.02	n.s.
C6 (Capronsäure)	0.43	2.86	0.37	1.30	n.s.
C7 (Heptansäure)	0.07	0.46	0.06	0.19	n.s.

Abkürzungen: IQR, Interquartilsabstand; MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; n.s., nicht signifikant (d.h.:  $P \geq 0.05$ ), SCFAs; short-chain fatty acids.

#### 11.4.1 Geschlechterspezifische Unterschiede

Zur Analyse der Stuhlproben standen uns 17 Stuhlproben von Männern und 28 Stuhlproben von Frauen zur Verfügung. Männliche Patienten hatten im Median höhere Konzentrationen (gemessen in mM) an fäkaler Essig-, Propan- und Buttersäure. Die restlichen SCFAs waren bei Männern im Vergleich zu Frauen in einer niedrigeren Konzentration vorhanden. Unter den gemessenen SCFAs war die Essigsäure die einzige Fettsäure, die signifikant mit dem Geschlecht assoziiert war ( $P = 0.017$ ). In **Abbildung 24** wird der Zusammenhang zwischen fäkaler Essigsäure und dem Geschlecht dargestellt.

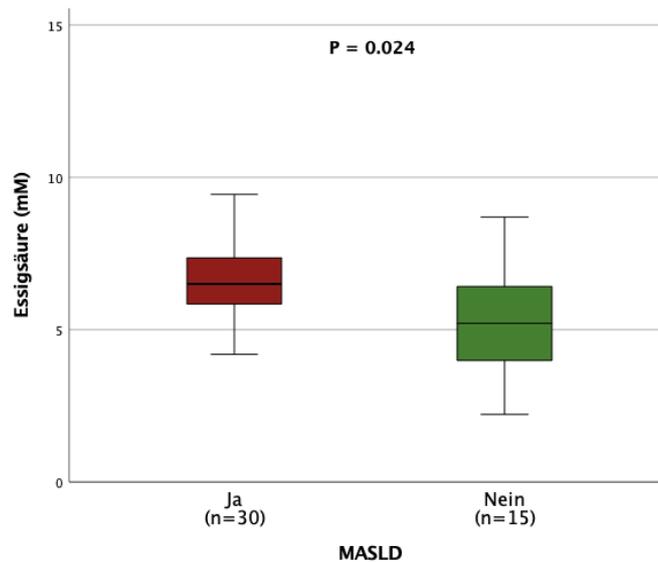


**Abbildung 24** - Geschlechterspezifische Konzentrationsunterschiede der fäkalen Essigsäure.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen fäkaler Essigsäure bei Männern und Frauen im Vergleich. Auf der X-Achse werden die Patientengruppen (männlich und weiblich) dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Essigsäure in mM im Stuhl angegeben. Männliche Patienten haben deutlich höhere Konzentrationen an Essigsäure im Stuhl ( $P = 0.017$ ).

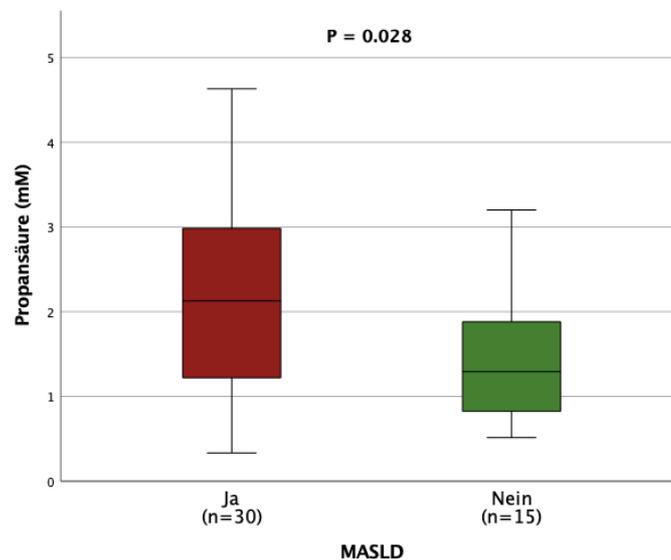
#### 11.4.2 Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an SCFAs

Der Gehalt an fäkalen SCFAs in mM bei Patienten mit MASLD war bei allen gemessenen Fettsäuren im Median höher als bei Patienten ohne MASLD (**Tabelle 15**). Die einzigen Ausnahmen stellten hierbei die Isovaleriansäure und die Valeriansäure dar, die minimal höher bei Patienten ohne Fettleber waren. So ergab sich beispielsweise eine mediane Konzentration von fäkaler Isovaleriansäure von 0.07 mM bei Patienten mit MASLD und 0.09 mM bei Patienten ohne MASLD. Bei beiden Patientengruppen waren die Essig- und Propansäure diejenigen SCFAs mit dem höchsten Anteil im Stuhl. Unter den getesteten Fettsäuren waren Essigsäure ( $P = 0.024$ ) und Propansäure ( $P = 0.028$ ) in der statistischen Analyse signifikant mit MASLD assoziiert. Diese Ergebnisse sind in **Abbildung 25** und **Abbildung 26** dargestellt. Für die übrigen SCFAs konnten keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden.



**Abbildung 25** - Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an fäkaler Essigsäure.

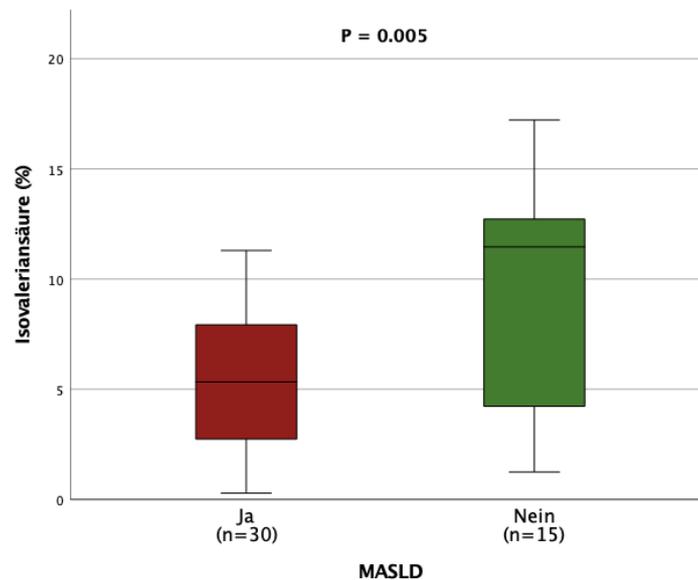
Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen fäkaler Essigsäure und der MASLD. Auf der X-Achse werden die Patientengruppen (Patienten mit und ohne MASLD) dargestellt und auf der Y-Achse die Essigsäure in mM im Stuhl. Patienten mit MASLD haben deutlich höhere Konzentrationen an Essigsäure im Stuhl (P = 0.024).



**Abbildung 26** - Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen an fäkaler Propansäure.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen fäkaler Propansäure und der MASLD. Auf der X-Achse werden die Patientengruppen (Patienten mit und ohne MASLD) dargestellt und auf der Y-Achse die Propansäure in mM im Stuhl. Patienten mit MASLD haben deutlich höhere Konzentrationen an Propansäure im Stuhl (P = 0.028).

Der Prozentsatz, der nach dem Peak für jede Fettsäure bestimmt wurde, war für Essigsäure, Propansäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Valeriansäure bei Patienten ohne steatotische Lebererkrankung höher als bei denen mit Fettleber. Bei der Isovaleriansäure gab es deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten mit und ohne MASLD ( $P = 0.005$ ). So hatten MASLD-Patienten einen Median von 5,33% und vergleichend dazu die Kontrollpersonen 11,46%. Zudem zeigten sich auch die Isobuttersäure ( $P = 0.043$ ) und die Valeriansäure ( $P = 0.007$ ) als signifikant in der statistischen Auswertung (siehe **Tabelle 16** und **Abbildung 27**). Im Rahmen dieser Arbeit wird sich jedoch weiterführend auf die Konzentrationen in mM beschränkt und die Angaben im prozentualen Verhältnis werden nur der Veranschaulichung und vollständigkeitshalber angegeben.



**Abbildung 27** – Isovaleriansäure im Stuhl bei Patienten mit und ohne MASLD.

Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen fäkaler Valeriansäure und der MASLD. Auf der X-Achse werden die Patientengruppen (Patienten mit und ohne MASLD) dargestellt und auf der Y-Achse die Isovaleriansäure in % im Stuhl. Patienten mit MASLD haben deutlich höhere Konzentrationen an Isovaleriansäure im Stuhl ( $P = 0.005$ ).

### 11.4.3 SCFAs als mögliche Einflussfaktoren auf die Lebensqualität, Depressionen, Angst und Müdigkeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand unter anderem auch darin, zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den SCFAs im Stuhl und kognitiven Veränderungen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen wie der MASLD gibt. In der statistischen Auswertung konnten einige SCFAs identifiziert werden, die einen möglichen Einfluss auf Depressionen, Angstzustände und vermehrte Müdigkeit haben. 44 Patienten gaben sowohl einen vollständig ausgefüllten PHQ-9 und GAD-7 Fragebogen als auch eine Stuhlprobe ab.

Die Verteilung innerhalb der Schweregrade der Depression sah wie folgt aus: 19 Patienten mit keiner bis minimaler Depression, 10 Patienten mit milder Depression sowie 15 Patienten mit mittelgradiger bis schwerer Depression (**Tabelle 17**). Für den GAD-7 Fragebogen standen uns 26 Stuhlproben von Patienten mit keiner bis minimaler Angstsymptomatik, 13 Stuhlproben von Patienten mit milder Angstsymptomatik und 5 Stuhlproben von Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Angstsymptomatik zur Verfügung (**Tabelle 18**).

**Tabelle 17** - Fäkale SCFA-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden von Depressionen.

SCFAs (mM)	Keine bis minimale Depression (n=19)	Milde Depression (n=10)	Mittelgradige bis schwere Depression (n=15)	P
C2 (Essigsäure)	6.29	6.22	6.44	n.s.
C3 (Propansäure)	1.44	1.41	1.95	n.s.
C4i (Isobuttersäure)	0.063	0.027	0.07	n.s.
C4n (Buttersäure)	0.78	1.21	1.33	n.s.
C5i (Isovaleriansäure)	0.085	0.01	0.153	n.s.
C5n (Valeriansäure)	0.047	0.021	0.032	n.s.
3-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
4-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C6 (Capronsäure)	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C7 (Heptansäure)	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.

Abkürzungen: n.s., nicht signifikant (d.h.:  $P \geq 0.05$ ), SCFAs; short-chain fatty acids.

**Tabelle 18** - Fäkale SCFA-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden von Angst.

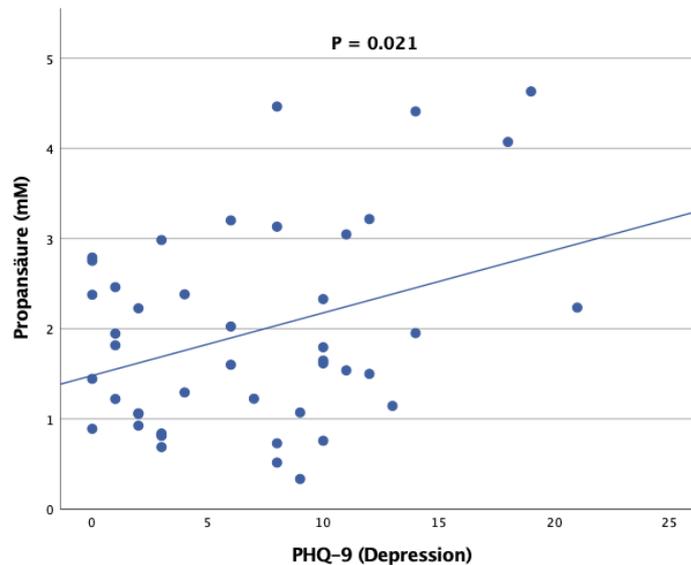
SCFAs (mM)	Keine bis minimale Angst (n=26)	Milde Angst (n=13)	Mittelgradige bis schwere Angst (n=5)	P
C2 (Essigsäure)	6.17	6.30	6.55	n.s.
C3 (Propansäure)	1.52	1.79	2.23	<b>0.025</b>
C4i (Isobuttersäure)	0.07	0.02	0.04	n.s.
C4n (Buttersäure)	0.77	1.78	1.26	n.s.
C5i (Isovaleriansäure)	0.11	0.008	0.13	n.s.
C5n (Valeriansäure)	0.04	0.03	0.001	n.s.
3-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
4-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C6 (Capronsäure)	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.
C7 (Heptansäure)	<0.01	<0.01	<0.01	n.s.

Abkürzungen: n.s., nicht signifikant (d.h.:  $P \geq 0.05$ ), SCFAs; short-chain fatty acids.

#### **11.4.4 Fäkale Propansäure korreliert mit einer stärker ausgeprägten Depression, Angst sowie mit vermehrter Müdigkeit**

Zunächst konnte beobachtet werden, dass Patienten mit mittelgradiger oder schwerer Depression höhere Konzentrationen an SCFAs im Stuhl hatten im Vergleich zu Patienten mit milder ausgeprägter oder keiner Depression (**Tabelle 17**). Eine Ausnahme stellte hierbei die Valeriansäure dar, die bei Patienten mit mittelgradiger bis schwerer Depression in einer niedrigeren Konzentration im Stuhl vorhanden war.

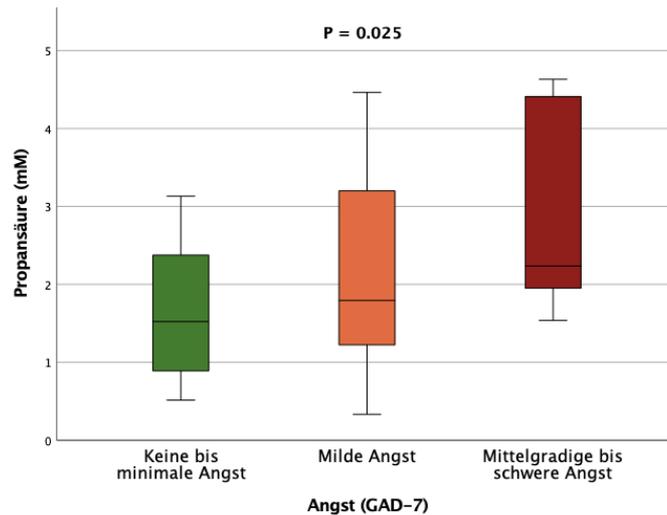
Zwar korrelierten die SCFAs nicht direkt mit dem Schweregrad der Depression, dafür aber mit dem berechneten Skalensummenwert im PHQ-9. Höhere Konzentrationen an Propansäure im Stuhl waren demnach mit einer höheren Punktzahl im PHQ-9 assoziiert ( $P = 0.021$ ). Höhere Punktwerte im PHQ-9 sind als eine stärker ausgeprägte Depressivität zu interpretieren. Hier lässt sich also ein Zusammenhang zwischen SCFAs, genauer gesagt der Propansäure, im Stuhl und Depressionen erkennen. Die Ergebnisse dieser Korrelation sind in **Abbildung 28** veranschaulicht.



**Abbildung 28** – Korrelation zwischen höheren Propansäurekonzentrationen im Stuhl und einer stärker ausgeprägten Depression.

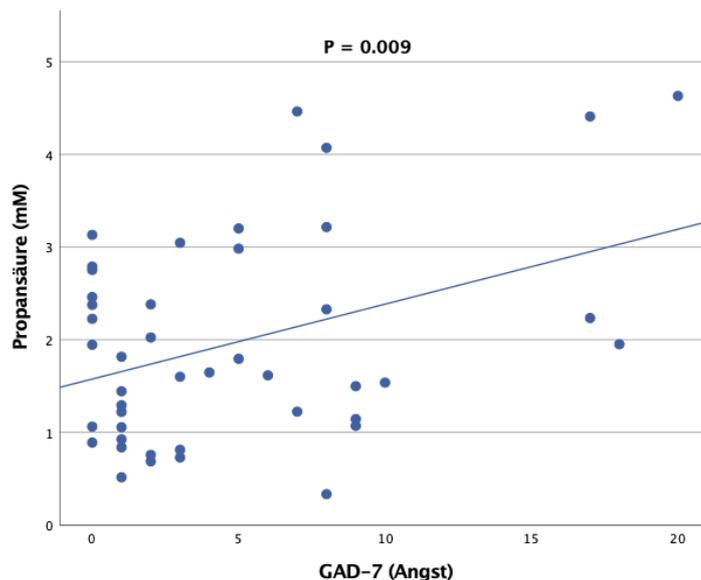
Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Propansäurekonzentration im Stuhl und höheren Werten im PHQ-9 für depressive Störungen ( $P = 0.021$ ). Höhere Punktwerte spiegeln eine ausgeprägtere Depression wider. Auf der X-Achse sind die Punktwerte des PHQ-9 aufgeführt und auf der Y-Achse die Propansäure im Stuhl gemessen in mM.

In Bezug auf die Ängstlichkeit unserer Patienten konnten wir ebenfalls feststellen, dass es Konzentrationsunterschiede bei den verschiedenen Schweregraden von Angst gibt. Ähnlich wie bei Depressionen, hatten auch hier Patienten mit mittelgradiger bis schwerer Angst höhere Konzentrationen einiger SCFAs im Stuhl, im Vergleich zu denjenigen Patienten, die keine oder eine weniger stark ausgeprägte Form der Ängstlichkeit, gemessen mit dem GAD-7, hatten. Isobuttersäure, Isovaleriansäure sowie die Valeriansäure waren jedoch Ausnahmen, denn hier waren die Patienten mit den ausgeprägtesten Angstsymptomen diejenigen, die niedrigere Konzentrationen dieser Fettsäuren im Stuhl aufwiesen. **Tabelle 18** dient dabei als Übersichtstabelle der gemessenen SCFAs bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden von Angst. Unter den gemessenen Fettsäuren zeigte sich hier die Propansäure als die einzige Fettsäure, die signifikant mit dem Schweregrad von Angst korrelierte ( $P = 0.025$ ). Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Angst hatten deutlich höhere Konzentrationen an Propansäure im Stuhl als Patienten mit milder, minimaler oder keiner Angst. Diese Beobachtung wird in **Abbildung 29** veranschaulicht. Die Propansäure korrelierte auch mit den Punktwerten im GAD-7 (**Abbildung 30**). Je höher die fäkale Propansäurekonzentration war, desto höher war die Gesamtpunktzahl im GAD-7 unabhängig von den verschiedenen Schweregraden von Angst ( $P = 0.009$ ).



**Abbildung 29** – Patienten mit schwerer Angstsymptomatik haben höhere Propionsäurekonzentrationen im Stuhl.

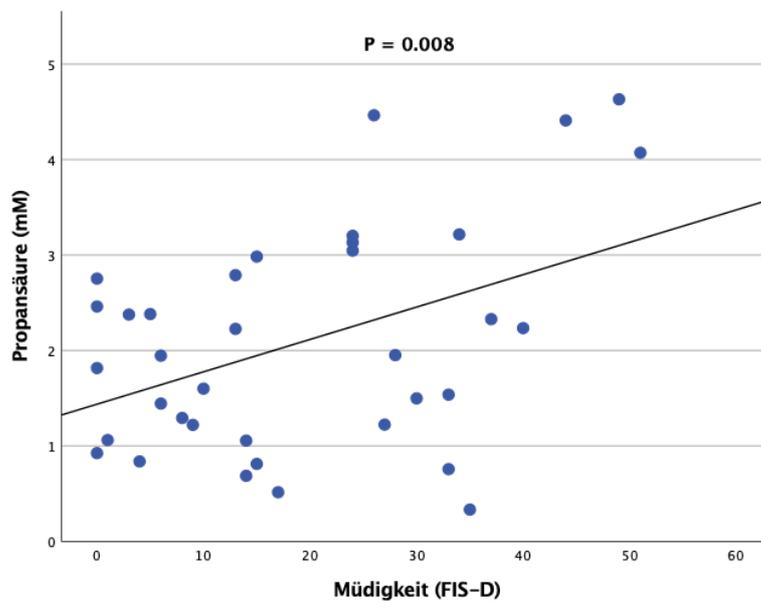
Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen fäkaler Propionsäure und Angst ( $P = 0.025$ ). Auf der X-Achse sind die verschiedenen Schweregrade von Angst gemäß dem GAD-7 dargestellt und auf der Y-Achse die fäkale Propionsäure in mM. Die Propionsäurekonzentration war bei Patienten mit keiner bis minimaler Angst am niedrigsten und bei Patienten mit mittelgradiger bis schwerer Angst am höchsten ( $P = 0.025$ ).



**Abbildung 30** - Korrelation zwischen höheren Propionsäurekonzentrationen im Stuhl und einer stärker ausgeprägten Angst.

Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Propionsäurekonzentration im Stuhl und höheren Werten im GAD-7 für Angst ( $P = 0.009$ ). Auf der X-Achse sind die Punktwerte des GAD-7 aufgeführt und auf der Y-Achse die Propionsäure im Stuhl gemessen in mM. Höhere Punktwerte spiegeln eine ausgeprägtere Angst wider.

Die Ausprägung der Müdigkeit wurde mit dem FIS-D erfasst. Wir bekamen von 35 Patienten, die den FIS-D vollständig ausgefüllt hatten, eine Stuhlprobe zur Analyse. Die Propansäure zeigte sich nicht nur, wie bereits beschrieben, signifikant mit Depressionen und Angst, sondern auch mit vermehrter Müdigkeit ( $P = 0.008$ ). Höhere Konzentrationen an Propansäure im Stuhl korrelierten mit einer höheren Punktzahl im FIS-D. Eine höhere Punktzahl spiegelt dabei eine stärker ausgeprägte Müdigkeit wider. **Abbildung 31** dient als Veranschaulichung dieser Korrelation.



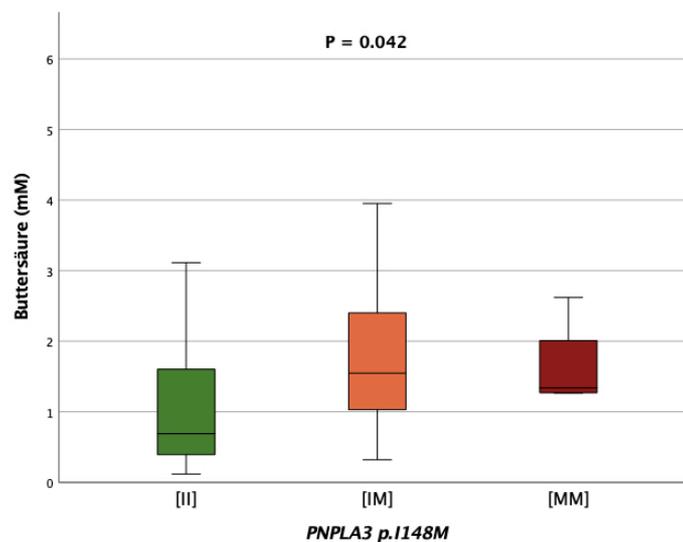
**Abbildung 31** - Korrelation zwischen der fäkalen Propansäurekonzentration und einer stärker ausgeprägten Müdigkeit.

Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Konzentration von Propansäure im Stuhl und vermehrter Müdigkeit ( $P = 0.008$ ). Auf der X-Achse befinden sich die Punktwerte des FIS-D Fragebogens zur Müdigkeit und auf der Y-Achse die Propansäure im Stuhl gemessen in mM.

Unsere Patienten erhielten auch einen Fragebogen, der sich auf die allgemeine Lebensqualität bezog. Dieser bestand aus einer physischen und mentalen Komponente. An dieser Stelle sei jedoch zu erwähnen, dass keine der gemessenen Fettsäuren im Stuhl signifikant mit dem PCS-12 oder MCS-12 des SF-12 war.

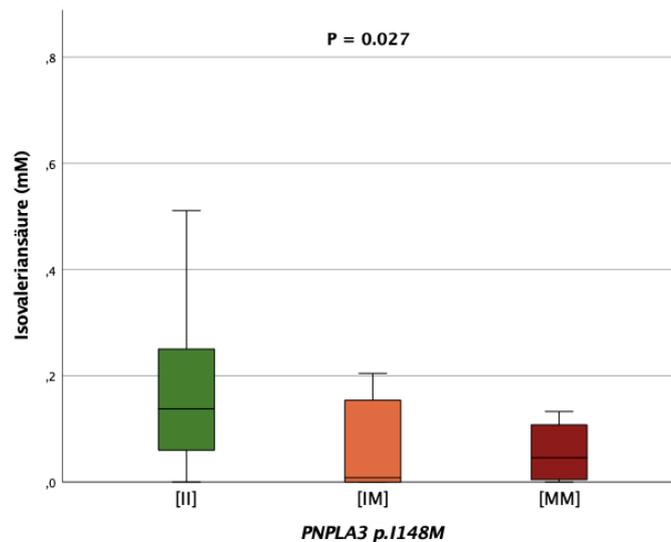
### 11.4.5 *PNPLA3* p.I148M Variante als möglicher Einflussfaktor auf SCFAs

Die Zusammenhänge von short-chain fatty acids im Stuhl und affektiven Störungen bei Patienten mit steatotischer Lebererkrankung könnten womöglich auch durch eine genetische Komponente moduliert werden. Uns standen insgesamt 45 Stuhlproben zur Verfügung. Die Verteilung der Genotypen für *PNPLA3* p.I148M sah dabei wie folgt aus: 23 Wildtypen, 18 Heterozygote und 4 homozygot mutierte Varianten. Innerhalb unserer Kohorte war die *PNPLA3* p.I148M Variante signifikant mit höheren Konzentrationen an Buttersäure ( $P = 0.042$ ) sowie mit niedrigeren Konzentrationen an Isovaleriansäure ( $P = 0.027$ ) im Stuhl assoziiert. Dabei zeigt sich, dass die Träger von mindestens einer Kopie des *PNPLA3* p.I148M-Minor-Allels im Vergleich zu Wildtypen höhere Konzentrationen an Buttersäure und niedrigere Konzentrationen an Isovaleriansäure im Stuhl aufwiesen (**Abbildung 32** und **Abbildung 33**). Bei den anderen getesteten Varianten *MBOAT7* p.G17E und *TM6SF2* p.E167K ergaben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von short-chain fatty acids im Stuhl.



**Abbildung 32** - Fäkale Buttersäure bei *PNPLA3* p.I148M Genotypen.

Boxplot zur Darstellung der Konzentrationsunterschiede von fäkaler Buttersäure bei *PNPLA3* p.I148M Genotypen. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen (II = Wildtypen, IM = Heterozygote und MM = Variante) dargestellt und auf der Y-Achse die Buttersäure in mM. Wildtypen hatten im Median eine Buttersäurekonzentration von 0,69 mM, Heterozygote einen Median von 1,54 mM und homozygot mutierte Träger einen Median von 1,33 mM. Somit haben Heterozygote und homozygot mutierte Träger signifikant höhere Konzentrationen an Buttersäure im Stuhl ( $P = 0.042$ ).



**Abbildung 33** - Fäkale Isovaleriansäure bei *PNPLA3* p.I148M Genotypen.

Boxplot zur Darstellung der Konzentrationsunterschiede von fäkaler Isovaleriansäure bei *PNPLA3* p.I148M Genotypen. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen (II = Wildtypen, IM = Heterozygote und MM = Variante) dargestellt und auf der Y-Achse die Isovaleriansäure in mM. Wildtypen hatten im Median eine Isovaleriansäurekonzentration von 0,13 mM, Heterozygote einen Median von 0,008 mM und homozygot mutierte Träger einen Median von 0,45 mM. Somit haben Wildtypen signifikant höhere Konzentrationen an Isovaleriansäure im Stuhl ( $P = 0.027$ ).

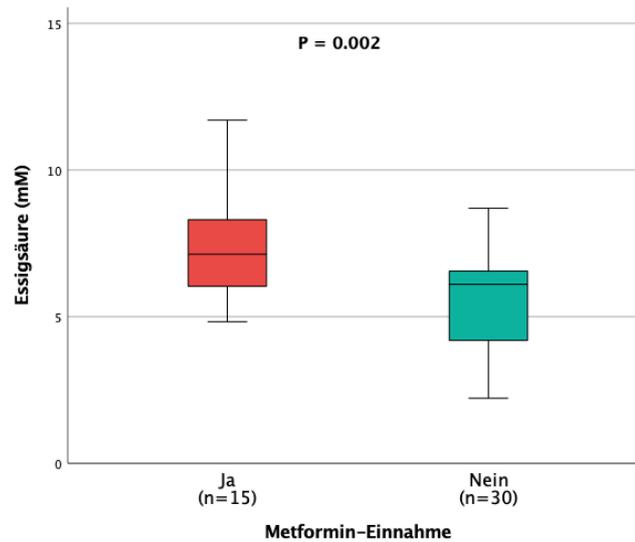
### 11.4.6 Einfluss von Metformin auf das intestinale Mikrobiom

Verschiedene Faktoren können das intestinale Mikrobiom beeinflussen. So spielen neben der Ernährung auch Medikamente eine zentrale Rolle. Folgend wird auf den Einfluss des Antidiabetikums Metformin auf die Konzentrationen von fäkalen short-chain fatty acids eingegangen. Dabei konnten wir einige Konzentrationsunterschiede feststellen. Diese Ergebnisse sind in **Tabelle 19** aufgeführt. Patienten, die das Biguanid Metformin einnahmen, wiesen höhere fäkale Konzentrationen an allen gemessenen SCFAs auf. Eine Ausnahme stellte die Isovaleriansäure dar, die bei Patienten mit und ohne Metformin-Einnahme in der gleichen Konzentration vorhanden war. Die Einnahme von Metformin war signifikant mit höheren Konzentrationen an Essigsäure ( $P = 0.002$ ) sowie mit höheren Konzentrationen an Propansäure ( $P = 0.016$ ) im Stuhl assoziiert. Dabei betrug die mediane Konzentration von Essigsäure in der Metformin-Gruppe 7,13 mM und bei Patienten ohne Metformin Einnahme 6,11 mM (**Abbildung 34**). Für die Propansäure ergab sich eine mediane Konzentration von 2,75 mM bei Patienten, die Metformin einnahmen und 1,47 mM bei denen, die das Antidiabetikum nicht einnahmen (**Abbildung 35**). Bei den übrigen SCFAs ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede.

**Tabelle 19** – SCFAs Konzentrationen unter dem Aspekt der Metformin-Einnahme.

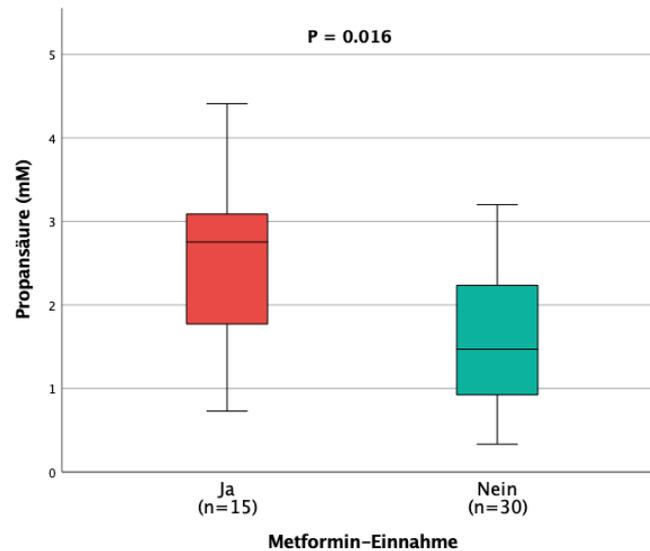
SCFAs (mM)	<u>Metformin-Einnahme</u>		P
	Ja (n=15)	Nein (n=30)	
C2 (Essigsäure)	7.13	6.11	<b>0.002</b>
C3 (Propansäure)	2.75	1.47	<b>0.016</b>
C4i (Isobuttersäure)	0.08	0.06	n.s.
C4n (Buttersäure)	1.35	1.06	n.s.
C5i (Isovaleriansäure)	0.08	0.08	n.s.
C5n (Valeriansäure)	0.08	0.03	n.s.
3-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	n.s.
4-Methylvaleriansäure	<0.01	<0.01	n.s.
C6 (Capronsäure)	<0.01	<0.01	n.s.
C7 (Heptansäure)	<0.01	<0.01	n.s.

Abkürzungen: n.s., nicht signifikant (d.h.:  $P \geq 0.05$ ), SCFAs; short-chain fatty acids.



**Abbildung 34** – Zusammenhang zwischen der Metformin-Einnahme und einer höheren Essigsäurekonzentration im Stuhl.

Boxplot zur Darstellung der Konzentrationsunterschiede von fäkaler Essigsäure bei Patienten mit und ohne Metformin-Einnahme. Auf der X-Achse sind die Patienten mit und ohne Einnahme des Antidiabetikums dargestellt und auf der Y-Achse die Essigsäure in mM. Patienten mit Metformin-Einnahme hatten im Median eine Essigsäurekonzentration von 7,13 mM und Patienten ohne dessen Einnahme eine Konzentration von 6,11 mM. Somit wiesen Patienten, die Metformin einnahmen, signifikant höhere Konzentrationen an fäkaler Essigsäure im Stuhl auf im Vergleich zu den Patienten, die kein Metformin einnahmen ( $P = 0.002$ ).

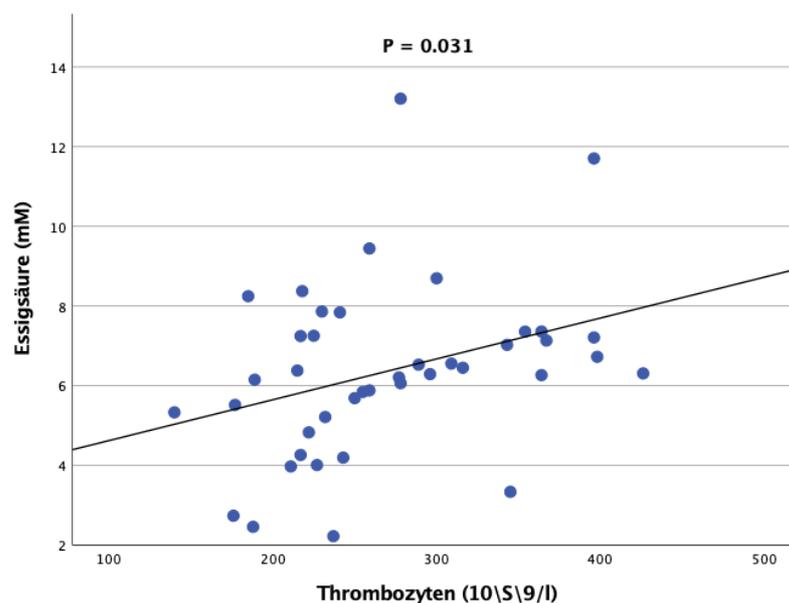


**Abbildung 35** - Zusammenhang zwischen der Metformin-Einnahme und einer höheren Propansäurekonzentration im Stuhl.

Boxplot zur Darstellung der Konzentrationsunterschiede von fäkaler Propansäure bei Patienten mit und ohne Metformin-Einnahme. Auf der X-Achse sind die Patienten mit und ohne Einnahme des Antidiabetikums dargestellt und auf der Y-Achse die Propansäure in mM. Patienten mit Metformin-Einnahme hatten im Median eine Propansäurekonzentration von 2,75 mM und Patienten ohne dessen Einnahme eine Konzentration von 1,47 mM. Somit wiesen Patienten, die Metformin einnahmen, signifikant höhere Konzentrationen an fäkaler Propansäure im Stuhl auf im Vergleich zu den Patienten, die kein Metformin einnahmen ( $P = 0.016$ ).

### 11.4.7 SCFAs korrelieren mit der Thrombozytenanzahl im Blut

Nachdem wir Korrelationen zwischen SCFAs im Stuhl und bei Patienten mit MASLD finden konnten und dies vermutlich auch durch eine genetische Variante moduliert wird, war es weiter auch von Interesse zu analysieren, ob SCFAs auch Einfluss auf Laborparameter, insbesondere Leberfunktions- und syntheseparameter, haben. Wir konnten keinerlei Zusammenhänge zwischen AST, ALT, g-GT, Bilirubin, Albumin, Gerinnungsparametern und SCFAs feststellen. Jedoch gab es dafür signifikante Ergebnisse mit der Anzahl an Thrombozyten im Blut. So korrelierte die Essigsäure mit der Anzahl an Thrombozyten ( $P = 0.031$ ). Diese Beobachtung wird in **Abbildung 36** dargestellt.



## 12 Diskussion

Übergewicht und Adipositas haben in unserer heutigen Gesellschaft einen immer höheren Stellenwert, da die Prävalenz fortdauernd zunimmt und damit nicht zuletzt auch die der metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung, früher nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung. Fast 20% der Erwachsenen in Deutschland sind nach Selbstangaben von Adipositas betroffen [133] und insgesamt um die 30% der gesamten Weltbevölkerung leiden unter einer Fettlebererkrankung [125]. Zudem steigt die Prävalenz der MASLD unter den Kindern und Jugendlichen zunehmend [52,77,90]. Einflussfaktoren auf die Entstehung und die Progression dieser Erkrankung sind daher äußerst wichtig, um die vollständige Pathologie mit all ihren Auswirkungen auf den Organismus, unter anderem auch auf die Lebensqualität, zu verstehen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen den SCFAs im Stuhl und der Lebensqualität bei Patienten mit und ohne MASLD innerhalb einer Patientenkohorte mit 78 Teilnehmern untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Patienten mit MASLD häufiger unter schweren Depressionen und Ängsten leiden im Vergleich zu unseren Kontrollpersonen. Dies könnte durch das intestinale Mikrobiom und dessen Metaboliten sowie durch eine genetische Disposition moduliert werden.

### 12.1 Patienten mit MASLD leiden häufiger unter schweren Depressionen, Ängsten und haben eine schlechtere mentale Lebensqualität

Wie in der Zielsetzung bereits beschrieben wurde, ist das zentrale Thema dieser Arbeit, die Lebensqualität bei Patienten mit MASLD im Vergleich zu Patienten ohne nachgewiesene Lebererkrankung, zu vergleichen und dabei den Einfluss von SCFAs im Stuhl und einer möglichen genetischen Prädisposition zu untersuchen.

In einigen Studien wurde bereits die Lebensqualität oder andere kognitive Veränderungen wie z.B. Depressionen bei Patienten mit MASLD untersucht. *Xiao et al.* führten eine Meta-Analyse mit 2.041.752 MASLD-Patienten aus insgesamt 10 verschiedenen Studien durch. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die gepoolte Gesamtprävalenz von Depressionen bei Patienten mit MASLD 18,21% betrug. Im Vergleich dazu, war die gepoolte Gesamtprävalenz unter denjenigen Patienten mit einer metabolischen dysfunktions-assoziierten Steatohepatitis (MASH) sogar mehr als doppelt so hoch. Zudem hatten Patienten mit metabolischer dysfunktions-assoziiierter steatotischer Lebererkrankung ein deutlich höheres Risiko an einer Depression zu erkranken [157]. Diese Beobachtung machten auch *Gu et al.*, die ebenfalls eine Meta-Analyse zum Thema MASLD und Depressionen durchführten, in welcher ebenso gezeigt

werden konnte, dass Patienten mit MASLD ein signifikant höheres Risiko haben, an Depressionen zu erkranken als welche ohne eine metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung. Des Weiteren beschrieben sie auch, dass depressive Patienten eher eine MASLD entwickeln als nicht-depressive Patienten [50]. In einer weiteren Studie wurden in einem Gesamtzeitraum von 15 Jahren in über 1000 allgemeinärztlichen Praxen Patienten mit und ohne MASLD oder MASH rekrutiert. Nach 10 Jahren zeigte sich, dass die Prävalenz von Depressionen und Angststörungen in der MASLD-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe höher war [73].

In verschiedenen Studien [35,50,73,136,157] wird von einer höheren Prävalenz von Depressionen und Angststörungen oder einem erhöhten Risiko für diese Erkrankungen im Zusammenhang mit einer metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung oder einer metabolischen dysfunktions-assoziierten Steatohepatitis berichtet. Depressionen und Angststörungen können demnach sehr wahrscheinlich als extrahepatische Manifestationen von chronischen Lebererkrankungen angesehen werden.

Nicht nur Patienten mit einer MASLD oder einer MASH haben ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Depression, sondern auch Patienten mit Virushepatitiden [154]. Insbesondere bei Patienten mit einer Hepatitis-C (HCV) scheint die Prävalenz der Depression besonders hoch zu sein und ist damit leicht höher als die Prävalenz der Depression bei MASLD-Patienten.

Eine weitere Arbeit zeigte, dass Patienten mit MASLD im Vergleich zur gesunden Allgemeinbevölkerung eine schlechtere Lebensqualität haben und dass der BMI in Assoziation zur Lebensqualität bei Patienten mit MASLD steht [49]. Weitere Studien beschreiben auch Zusammenhänge zwischen der metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung und weiteren kognitiven Veränderungen wie Angstzuständen und verstärkter bzw. anhaltender Müdigkeit. In einer retrospektiven Querschnittsstudie mit 25.333 Patienten (Prävalenz von MASLD 30,9%) haben *Choi et al.* beschrieben, dass eine schwere MASLD neben Depressionen auch signifikant mit Ängstlichkeit korreliert [31].

Zur Beurteilung der Lebensqualität in unserer Patientenkohorte wurden vier Fragebögen ausgewählt, die unterschiedliche Themen umfassten und insgesamt die Lebensqualität unserer

Auffassung nach gut widerspiegeln. Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer Depressivität, Ängstlichkeit, Müdigkeit sowie nach ihrer physischen und mentalen Verfassung befragt.

In dieser Studie konnten wir feststellen, dass Frauen häufiger von schweren Depressionen betroffen waren im Vergleich zu Männern. Ebenfalls waren MASLD-Patienten mehr als dreimal so häufig von schweren Depressionen betroffen im Vergleich zu Patienten ohne MASLD. Dies traf nicht nur für die Depressivität zu, sondern auch für schwere Formen von Angst. Innerhalb unserer Studie gab es lediglich Patienten mit MASLD, die eine schwere Form von Angst hatten.

An dieser Stelle sei anzumerken, dass die Kontrollgruppe einen wesentlich kleineren Stichprobenumfang bildete. Um diese Beobachtungen weiter zu bewerten, benötigt es Studien, die eine etwa gleich verteilte Anzahl an Patienten und Kontrollpersonen umfängt.

Weiter wurden die Patienten zu ihrer Müdigkeit befragt bzw. wie sich die Müdigkeit auf ihren Alltag auswirkt und ob die Patienten durch die Ausprägung ihrer Müdigkeit Einschränkungen im Alltag festgestellt haben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MASLD deutlich stärker von Müdigkeit betroffen waren als die Kontrollpersonen. Somit scheint das Ausmaß der Müdigkeit in unserer Patientenkohorte deutlich abhängig von einer chronischen Lebererkrankung zu sein. Es gibt weitere Studien, die dies gezeigt haben. So haben *Golubeva et al.* in ihrer Studie mit 95 MASLD-Patienten und 37 Kontrollpersonen unter anderem gezeigt, dass diejenigen Patienten mit einer metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung signifikant öfter unter Müdigkeit litten [49].

Eine frühere Studie befasste sich ebenfalls mit der Lebensqualität von Patienten mit MASLD. Im Rahmen dessen wurde der SF-36 zur Quantifizierung der physischen und mentalen Lebensqualität verwendet und die Ergebnisse aus der Studienkohorte mit den Ergebnissen der britischen Allgemeinbevölkerung verglichen. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit MASLD sowohl niedrigere Werte im PCS als auch im MCS des SF-36 hatten und damit eine schlechtere physische und mentale Lebensqualität als in dem Fall die britische Allgemeinbevölkerung [78].

Sowohl die physische als auch die psychische Lebensqualität schien sich innerhalb unserer Patientenkohorte wesentlich zu unterscheiden. Patienten mit MASLD zeigten eine deutlich schlechtere physische als auch psychische Lebensqualität im Vergleich zu den Patienten ohne MASLD. Insbesondere die mentale Lebensqualität war bei Patienten mit MASLD deutlich

niedriger als bei den Patienten ohne MASLD. Der CAP-Wert korrelierte ebenfalls signifikant mit der mentalen Lebensqualität. Je stärker die Steatose war, desto niedrigere Werte erzielten die Patienten im MCS-12 und umso schlechter war demnach die mentale Lebensqualität.

Bemerkenswert war auch, dass die einzelnen Messinstrumente der Lebensqualität untereinander stark korrelierten. Patienten, die an Depressionen litten, waren demnach auch häufig von Angststörungen betroffen oder hatten niedrigere Werte im MCS-12 und hatten demnach eine schlechtere mentale Lebensqualität. Das gemeinsame Auftreten von Depressionen und Angststörungen ist eine häufig vorkommende Komorbidität [32,40].

Die metabolische dysfunktions-assoziierte steatotische Lebererkrankung scheint also mit all diesen kognitiven Veränderungen im Zusammenhang zu stehen und dessen Progression scheint sich negativ auf das Wohlbefinden der Patienten auszuwirken. Dies zeigt wiederum die Wichtigkeit, diesen Beobachtungen im klinischen Alltag mehr Aufmerksamkeit zu schenken und weitere Ursachenforschung zu betreiben, weshalb Patienten mit MASLD öfter von kognitiven Veränderungen, wie beispielsweise einer Depression, sowie einer schlechteren Lebensqualität betroffen sind als Patienten ohne MASLD.

## **12.2 Patienten mit MASLD haben höhere Konzentrationen von short-chain fatty acids im Stuhl**

Seit geraumer Zeit gerät das Darmmikrobiom immer mehr in den Fokus von zahlreichen Studien mit unterschiedlichsten Fragestellungen und möglichen Auswirkungen von SCFAs auf den gesamten Organismus. Im Rahmen dieser Arbeit soll aufgeführt werden, welche Unterschiede sich in Bezug auf die Konzentrationen von SCFAs im Stuhl bei Patienten mit und ohne MASLD aufstellen lassen.

Wichtige Aspekte zu den SCFAs, wie Funktionen und aktueller Wissensstand in Bezug auf die Zusammenhänge zu kognitiven Veränderungen, sind in Kapitel 8 ausführlich aufgeführt.

Im Rahmen dieser Dissertation haben wir 45 Stuhlproben (30 Stuhlproben von Patienten mit MASLD und 15 Stuhlproben von Kontrollpersonen) analysiert. Patienten mit metabolischer dysfunktions-assoziiertes steatotischer Lebererkrankung haben höhere Konzentrationen, gemessen in mM, aller innerhalb dieser Studie gemessenen SCFAs mit Ausnahme der Isovaleriansäure sowie der Valeriansäure. Dass sich hierbei zwei Fettsäuren als Ausreißer

herausstellen, könnte durch die relativ geringe Anzahl an verfügbaren Stuhlproben entstanden sein. Daher bedarf es Studien mit einer höheren Anzahl an Stuhlproben, um diese Ergebnisse zu prüfen. Dennoch stützen unsere Ergebnisse jene von bisherigen Studien. So zeigten *Rau et al.*, dass Patienten mit MASLD höhere Konzentrationen an Essig-, Propan- und Buttersäure im Stuhl aufwiesen [124].

Die Essig- und Propansäure waren sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollpersonen die Fettsäuren, die in den höchsten Konzentrationen im Stuhl vorhanden waren. Das waren zugleich auch die SCFAs, die innerhalb unserer Kohorte signifikant mit MASLD assoziiert waren. In der Vergangenheit haben sich Studien auch mit den Plasma-Konzentrationen von SCFAs beschäftigt und konnten auch dort wesentliche Unterschiede zwischen Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen und gesunden Kontrollpersonen feststellen. Die Plasma-Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat waren bei Patienten mit MASLD im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen deutlich erhöht. MASLD-Patienten wiesen ebenfalls erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu Patienten mit MASLD-Zirrhose und MASH auf [158]. Vorherige Studien beschreiben hier auch einen möglichen Zusammenhang mit einer immunologischen Komponente, die sich modulierend darauf auswirkt [124].

Insbesondere die Buttersäure ist schon in den Fokus vorheriger Arbeiten geraten, da sie durch Reduktion von Übergewicht einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung einer metabolischen dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung haben soll [108]. Der genaue Wirkmechanismus ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, ob Butyrat durch eine Förderung des Energieverbrauches oder einer Reduktion der Energieaufnahme den Energiehaushalt positiv beeinflusst [36]. Eine höhere fäkale Butyratausscheidung ist nicht nur mit abdomineller Fettleibigkeit assoziiert, sondern auch mit einer metabolischen Dysregulation und einem Hypertonus [37]. Dieser Zusammenhang wurde in einer Arbeit mit 441 Patienten beobachtet. Zudem wurde auch beschrieben, dass eine höhere Ausscheidung an SCFAs mit einer geringeren Vielfalt an Darmmikrobiota einhergeht. Eine erhöhte Ausscheidung dieser Fettsäuren scheint sich wohl negativ auf den Organismus auszuwirken und insbesondere mit einer metabolischen sowie kardiologischen Dysregulation einherzugehen. Innerhalb unserer Studie konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der fäkalen Buttersäurekonzentration und Übergewicht beziehungsweise dem BMI feststellen.

Unseres Wissens nach gibt es jedoch nur wenige Studien, die die Konzentrationen von short-chain fatty acids im Stuhl bei Patienten mit MASLD gemessen und sie dahingehend mit Proben von gesunden Kontrollpersonen verglichen haben, sodass es schwer ist, weitere Aussagen und Vergleiche dahingehend zu ziehen. Einige Arbeiten beschäftigen sich jedoch mit dem Zusammenhang zwischen SCFAs und weiteren Erkrankungen, wie zum Beispiel mit Morbus Parkinson. *Chen et al.* haben dahingehend bei 181 Patienten (96 Patienten mit Morbus Parkinson und 85 Kontrollpersonen) sowohl die fäkalen Konzentrationen als auch die Plasma-Konzentrationen von short-chain fatty acids gemessen [30]. Patienten mit Parkinson hatten signifikant niedrigere Konzentrationen an Essig-, Propan- und Buttersäure im Stuhl im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Die Plasma-Konzentrationen einiger SCFAs, wie zum Beispiel der Propan- und Buttersäure, waren dahingegen bei Patienten mit Morbus Parkinson in einer höheren Konzentration vorhanden.

Es sind weitere Studien bekannt, die sich sowohl mit den Plasma-Konzentrationen als auch mit den fäkalen Konzentrationen von SCFAs beschäftigt haben. Dabei wurden sowohl die Plasmakonzentrationen als auch die fäkalen Konzentrationen von short-chain fatty acids bei Patienten mit Leberzirrhose (LC) oder einer hepatischen Enzephalopathie (HE) gemessen [152]. In Bezug auf die fäkalen Konzentrationen von SCFAs konnten zwischen der LC-Gruppe und der HE-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Jedoch zeigten sich Unterschiede im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Patienten mit Leberzirrhose hatten im Vergleich zu den Kontrollpersonen niedrigere Konzentrationen an Essigsäure, Propansäure, Isobuttersäure, Buttersäure und Isovaleriansäure. Propansäure und Buttersäure waren ebenfalls in einer niedrigeren Konzentration bei Patienten mit hepatischer Enzephalopathie vorhanden im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Die Konzentrationen von einigen SCFAs (z.B. der Propansäure) im Serum waren hingegen bei den Patienten mit LC oder HE in einer höheren Konzentration vorhanden. Es konnten weiterhin Unterschiede in der Artenvielfalt und Diversität der Darmbakterien festgestellt werden. Eine deutlich niedrigere Artenvielfalt und Diversität dieser Bakterien waren den Patienten mit Leberzirrhose und hepatischer Enzephalopathie zuzuordnen.

*Cao et al.* beschäftigten sich ebenfalls mit den fäkalen Konzentrationen von SCFAs bei Patienten mit Leberzirrhose [21]. Dabei wurden bei 24 Patienten mit einer durch MASLD und erhöhtem Alkoholkonsum (Met-ALD) induzierter Leberzirrhose und 16 Patienten mit MASLD-induzierter Leberzirrhose sowie 20 gesunden Kontrollpersonen die Konzentrationen

von SCFAs im Stuhl gemessen. Patienten mit Leberzirrhose wiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen eine Abnahme der Gesamtkonzentration von fäkalen short-chain fatty acids auf. Dabei war die Abnahme der MASLD-induzierten Zirrhose stärker als die der Met-ALD-induzierten Zirrhose. Diese Abnahme bezog sich insbesondere auf die Gesamtkonzentration von SCFAs und der Konzentration von Acetat, Propionat und Butyrat. Isovaleriat war als einzige Fettsäure in einer höheren Konzentration vorhanden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MASLD und minimaler hepatischer Enzephalopathie höhere Konzentrationen der gesamten SCFAs, Acetat, Propionat und Butyrat im Stuhl aufwiesen im Vergleich zu denen mit MASLD und keiner hepatischen Enzephalopathie. Umgekehrtes konnte man in Bezug auf die Met-ALD beobachten. Dort hatten Patienten mit Met-ALD sowie einer minimalen hepatischen Enzephalopathie eine niedrigere Gesamtkonzentration von short-chain fatty acids sowie niedrigere Konzentrationen an Acetat, Propionat und Butyrat. Damit würden sich diese Ergebnisse mit denen von *Wang et al.* decken, die beide in ihren Arbeiten aufzeigten, dass Patienten mit Leberzirrhose niedrigere Konzentrationen an fäkalen SCFAs haben im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen [21,152].

### **12.3 Short-chain fatty acids im Stuhl korrelieren mit Depressionen, Angst, Müdigkeit und einer schlechteren mentalen Lebensqualität**

Um weiterführend Risiko- und/oder Einflussfaktoren auf eine schlechtere Lebensqualität bei Patienten mit MASLD zu identifizieren, haben wir short-chain fatty acids, sogenannte Metabolite von Darmbakterien, im Stuhl bei beiden Patientengruppen, mit und ohne MASLD, gemessen und diese auf Zusammenhänge mit der Lebensqualität sowie mit Depressionen, Angst und vermehrter Müdigkeit geprüft.

Das intestinale Mikrobiom wurde bereits in früheren Arbeiten mit dem Auftreten einer Depression in Verbindung gesetzt. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer schweren Depression verminderte Konzentrationen an SCFAs haben. Als eine mögliche Ursache wird dabei eine Störung der Darm-Gehirn-Achse bereits im frühen Lebensalter angesehen, in der es durch eine unzureichende Darmbesiedelung durch Mikrobiota zu einer Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse auf insbesondere Stressreize kommt, was im Laufe des Lebens die Ausbildung einer affektiven Störung wie beispielsweise einer Depression fördern kann [22].

Verschiedene Faktoren haben dabei einen Einfluss auf das Darmmikrobiom. So kann beispielsweise eine sehr ballaststoffreiche Ernährung die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms beeinflussen. Nicht aber nur die Ernährung spielt dabei eine Rolle, sondern auch chirurgische Eingriffe können das Darmmikrobiom beeinflussen. In einer kürzlich erschienenen Studie wurden bei Patienten, die sich einer bariatrischen Operation unterzogen (Roux-en-Y-Magenbypass oder Sleeve Gastrektomie) und depressive Symptome gemäß der Beck-Skala zur Identifikation der Schwere von depressiven Symptomen hatten, unter anderem short-chain fatty acids im Stuhl gemessen. Es gab wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Patienten mit diesen zwei verschiedenen Arten von chirurgischen Eingriffen. Höhere Punkte in der Beck-Skala, was einer stärker ausgeprägten Depression entspricht, waren mit einer verringerten Konzentration an Isobuttersäure und mit einer erhöhten Konzentration an Essigsäure im Stuhl assoziiert [69].

Frühere Studien beschäftigten sich bereits mit den Konzentrationsunterschieden von SCFAs im Stuhl bei Patienten mit und ohne Depressionen. Eine Studie von *Skonieczna-Zydecka et al.* untersuchte den Gehalt von SCFAs bei polnischen Frauen mit Depressionen [138]. Innerhalb dieser Studie konnten sie zeigen, dass die Konzentrationen von insbesondere Essigsäure sowie Propansäure bei depressiven Frauen deutlich niedriger waren als bei denen ohne depressive Symptomatik. Eine weitere Arbeit zeigte ebenfalls, dass Depressionen mit Acetat, Butyrat und Propionat assoziiert sind [102].

Diese Annahme konnten wir in unserer Studie nur teilweise bestätigen, da es innerhalb unserer Patientenkohorte keine signifikanten Korrelationen zwischen den SCFAs und Depressionen gab, mit Ausnahme der Propansäure. Im Rahmen unserer Studie konnten wir also das Gegenteilige zu der Studie von *Skonieczna-Zydecka et al.* beobachten: Patienten mit schwereren Formen von Depressionen hatten leicht höhere Konzentrationen von sowohl Essigsäure als auch Propansäure im Vergleich zu Patienten mit keiner bis nur minimaler depressiver Symptomatik. Dieses Phänomen konnten wir auch für einige short-chain fatty acids (z.B. Propan- und Buttersäure) in Bezug auf die Schwere von Angst feststellen. *Müller et al.*, zeigten ebenfalls eine Korrelation zwischen Depressionen und SCFAs im Stuhl. Dabei wird auch eine Assoziation zu der Einnahme von psychiatrischer Medikation aufgeführt [102].

Über die Darm-Hirn-Achse kann das intestinale Mikrobiom sehr wahrscheinlich Einfluss auf verschiedene Bereiche des Gehirns nehmen. So wurde bereits gezeigt, welche Zusammenhänge

es zwischen SCFAs und Depressionen, Angst oder Müdigkeit gibt. Darüber hinaus scheint sich eine Überwindung der Darm-Hirn-Achse auch auf das Schlafzentrum auszuwirken. *Magzal und Kollegen* zeigten in ihrer Arbeit, welche Zusammenhänge es zwischen dem Darmmikrobiom und dem Schlaf gibt. Dabei wurden 59 Erwachsene, die unter Insomnie litten, gekennzeichnet durch beispielsweise Probleme beim Ein- und Durchschlafen, in die Studie aufgenommen und es wurden schließlich bei ihnen fäkale SCFAs bestimmt. Höhere Konzentrationen an Acetat, Propionat sowie Butyrat im Stuhl waren mit einer verminderten Schlafeffizienz und einer längeren Einschlafdauer assoziiert. Ebenfalls stand die Gesamtkonzentration der gemessenen short-chain fatty acids mit diesen beiden Aspekten in Verbindung [87].

Der Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom und der Lebensqualität bei Patienten mit MASLD ist derzeit nicht eindeutig geklärt. Wie bereits angemerkt, werden auch immunologische Prozesse erwähnt. Wir konnten weiterführend zeigen, dass dieser Zusammenhang jedoch auch durch eine genetische Prädisposition moduliert werden könnte. Innerhalb unserer Patientenkohorte zeigte sich, dass die Träger von mindestens einem Allel der Genvariante *PNPLA3* p.I148M höhere Konzentrationen an Buttersäure und niedrigere Konzentrationen an Isovaleriansäure im Stuhl hatten im Vergleich zu den Wildtypen.

#### **12.4 Metformin beeinflusst die Konzentrationsverhältnisse von fäkalen short-chain fatty acids**

Bestimmte Faktoren können die Zusammensetzung und die Artenvielfalt des intestinalen Mikrobioms beeinflussen. Nicht nur Patienten mit einer sehr ballaststoffreichen Ernährung, chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise der MASLD, oder mit affektiven Störungen zeigen Unterschiede in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms, sondern auch Patienten, die bestimmte Medikamente einnehmen. Wir haben gezeigt, dass Patienten, die das Antidiabetikum Metformin einnehmen, höhere Konzentrationen an SCFAs im Stuhl haben. Signifikante Unterschiede konnten wir hierbei für die Essig- und Propansäure feststellen.

*Mueller et al.* rekrutierten für ihre Arbeit 121 übergewichtige und adipöse Patienten mit einem Tumor in der Vorgeschichte, der jedoch zum Zeitpunkt der Studie nicht behandelt wurde [100]. Die Studienteilnehmer wurden in drei Gruppen eingeteilt: Patienten die Metformin bekamen, Patienten, die sich einer verhaltensorientierten Gewichtsabnahme mit Unterstützung eines Trainers unterzogen und Patienten, die als Kontrollgruppe dienten, in der sie sich selbst betreuten. Im Rahmen dieser Studie wurden Nüchternserum und Stuhlproben der Patienten zu Beginn der Studie und jeweils nach sechs und zwölf Monaten gesammelt. Metformin

beeinflusste das Darmmikrobiom dahingehend, dass es die Anzahl verschiedener Spezies verringerte oder erhöhte. So erhöhte die Einnahme von Metformin beispielsweise die Anzahl an *Escherichia coli* und verringerte die Anzahl an *Roseburia intestinalis*. Ebenfalls erhöhte Metformin die Konzentrationen von short-chain fatty acids, insbesondere von Butyrat, Acetat und Valerat im Serum. Jedoch bezogen sich die Ergebnisse bezüglich der SCFAs im Serum lediglich auf einen sechsmonatigen Zeitraum, nach zwölf Monaten konnten diese erhöhten Konzentrationen an SCFAs nicht mehr nachgewiesen werden.

In einer weiteren Arbeit konnte ebenfalls aufgeführt werden, dass die Einnahme von Metformin das intestinale Mikrobiom beeinflusst. Im Rahmen dessen wurden fäkale SCFAs bei 50 Patienten mit einem neu diagnostiziertem Diabetes mellitus Typ 2 vor und nach Therapiebeginn mit einer täglichen Dosis von 1500 mg Metformin gemessen. Dabei zeigte sich, dass die fäkalen Konzentrationen von Essigsäure, Propansäure sowie Buttersäure nach einer 12-wöchigen Therapie mit Metformin anstiegen [62].

Die genauen Zusammenhänge zwischen dem Darmmikrobiom und dem Antidiabetikum Metformin sind noch nicht vollständig erklärt und dessen Zusammenhänge werden nur in wenigen Studien untersucht. Unsere Studie weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Metformin und short-chain fatty acids im Stuhl hin. Es benötigt weitere Studien, um diese Beobachtungen genauer einzuordnen.

## **12.5 Schlussfolgerungen**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Patienten mit Fettlebererkrankungen eine deutlich schlechtere Lebensqualität haben als jene Patienten ohne eine solche chronische Erkrankung. Insbesondere die mentale Lebensqualität scheint durch Lebererkrankungen beeinflusst zu werden. Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Leberverfettung mit der Stärke der Beeinträchtigung der mentalen Lebensqualität korreliert. Obendrein litten Patienten mit metabolisch dysfunktions-assoziiertes steatotischer Lebererkrankung deutlich öfter unter starken Depressionen und Ängsten im Vergleich zu den Kontrollpersonen.

Depressionen, Ängste, chronische Müdigkeit und eine schlechtere mentale sowie körperliche Lebensqualität können nur als ein Bruchteil von möglichen extrahepatischen Manifestationen von chronischen Lebererkrankungen, wie beispielsweise einer Fettlebererkrankung, einer Leberfibrose oder einer Leberzirrhose, angesehen werden.

Erwähnenswert ist auch, dass es eine hohe Komorbidität unter den kognitiven Veränderungen gibt. So haben Patienten, die unter Depressionen leiden, häufig auch Ängste oder leiden unter chronischer Müdigkeit.

Das Darmmikrobiom, genauer gesagt SCFAs, scheinen mit dem Vorhandensein einer metabolisch dysfunktions-assoziierten steatotischen Lebererkrankung in Verbindung zu stehen. Diese Metabolite von Darmbakterien sind bei Patienten mit MASLD in einer höheren Konzentration im Stuhl zu finden im Vergleich zu Patienten ohne MASLD. Insbesondere die Propansäure sticht dabei heraus. Höhere Konzentrationen an fäkaler Propansäure waren signifikant mit Depressionen und Ängsten assoziiert. Die übrigen gemessenen SCFAs waren ebenfalls in einer höheren Konzentration bei Patienten mit schwereren Formen von Depressionen, und teilweise auch Ängsten, vorhanden.

Der Zusammenhang zwischen dem intestinalen Mikrobiom und affektiven Störungen, wie beispielsweise Depressionen und Angststörungen, bei Patienten mit MASLD kann wohl möglich auch durch eine genetische Komponente moduliert werden. Die *PNPLA3* p.I148M Variante war signifikant mit höheren Konzentrationen an fäkaler Buttersäure und niedrigeren Konzentrationen an fäkaler Isovaleriansäure assoziiert.

Es benötigt weitere Studien, um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu verfolgen. Unsere Patientenkohorte könnte mit 78 Studienteilnehmern zu gering sein, um alle möglichen Assoziationen zu erfassen. Außerdem erhielten wir nur 45 Stuhlproben, sodass auch hier eine größere Anzahl an verfügbaren Stuhlproben oder eine vollständige Mikrobiomanalyse mittels Shotgun-Metagenomik sinnvoll sein kann, um noch exaktere Ergebnisse und Zusammenhänge zwischen dem intestinalen Mikrobiom, der Leber und dem Gehirn zu bekommen. Um weitere mögliche genetische Modulatoren ausfindig zu machen, könnte es zudem von Nutzen sein, die Studienteilnehmer auf weitere genetische Varianten zu genotypisieren.

### 13 Literaturverzeichnis

1. Ajmera V, Loomba R (2021) Imaging biomarkers of NAFLD, NASH, and fibrosis. *Mol Metab* 50:
2. Alharthi J, Bayoumi A, Thabet K, Pan Z, Gloss BS, Latchoumanin O, Lundberg M, Twine NA, Mcleod D, Alenizi S, Adams LA, Weltman M, Berg T, Liddle C, George J, Eslam M A metabolic associated fatty liver disease risk variant in MBOAT7 regulates toll like receptor induced outcomes.
3. Alkhulaifi F, Darkoh C (2022) Meal Timing, Meal Frequency and Metabolic Syndrome. *Nutrients* 14:
4. Banini BA, Kumar DP, Cazanave S, Seneshaw M, Mirshahi F, Santhekadur PK, Wang L, Guan HP, Oseini AM, Alonso C, Bedossa P, Koduru S V., Min HK, Sanyal AJ (2021) Identification of a metabolic, transcriptomic and molecular signature of PNPLA3-mediated acceleration of steatohepatitis. *Hepatology* 73:1290–1306
5. BasuRay S (2019) PNPLA3-I148M: a problem of plenty in non-alcoholic fatty liver disease. *Adipocyte* 8:201–208
6. BasuRay S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH (2019) Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:9521–9526
7. Becker NP, Müller J, Göttel P, Wallukat G, Schimke I (2017) Cardiomyopathy — An approach to the autoimmune background. *Autoimmun Rev* 16:269–286
8. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6:1–28
9. Berzigotti A, De Gottardi A, Vukotic R, Siramolpiwat S, Abraldes JG, García-Pagan JC, Bosch J (2013) Effect of meal ingestion on liver stiffness in patients with cirrhosis and portal hypertension. *PLoS One* 8:
10. Berzigotti A, Tsochatzis E, Boursier J, Castera L, Cazzagon N, Friedrich-Rust M, Petta S, Thiele M (2021) EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update. *J Hepatol* 75:659–689
11. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, Nauta A, Scott K, Stahl B, van Harsseelaar J, van Tol R, Vaughan EE, Verbeke K (2020) Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes* 11:411–455
12. Boursier J, Decraecker M, Bourlière M, Bureau C, Ganne-Carrié N, de Lédinghen V (2022) Quality criteria for the measurement of liver stiffness. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 46:
13. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA (2011) Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 53:810–820
14. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M (2017) PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepat Med* 9:55–66
15. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65:1038–1048
16. Byrne CD, Targher G (2015) NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 62:S47–S64
17. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G (2015) The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 39:1331–1338
18. Caddeo A, Jamialahmadi O, Solinas G, Pujia A, Mancina RM, Pingitore P, Romeo S (2019) MBOAT7 is anchored to endomembranes by six transmembrane domains. *J Struct Biol* 206:349–360
19. Canani RB, Costanzo M Di, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A (2011) Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol* 17:1519–1528

20. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE (2015) Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 11:577–591
21. Cao X, Zolnikova O, Maslennikov R, Reshetova M, Poluektova E, Bogacheva A, Zharkova M, Ivashkin V (2023) Differences in Fecal Short-Chain Fatty Acids between Alcoholic Fatty Liver-Induced Cirrhosis and Non-alcoholic (Metabolic-Associated) Fatty Liver-Induced Cirrhosis. *Metabolites* 2023, Vol 13, Page 859 13:859
22. Caspani G, Kennedy S, Foster JA, Swann J, Foster J Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. 6:
23. Castellana M, Donghia R, Guerra V, Procino F, Lampignano L, Castellana F, Zupo R, Sardone R, De Pergola G, Romanelli F, Trimboli P, Giannelli G (2021) Performance of fatty liver index in identifying non-alcoholic fatty liver disease in population studies. A meta-analysis. *J Clin Med* 10:
24. Caussy C, Aubin A, Loomba R (2021) The Relationship Between Type 2 Diabetes, NAFLD, and Cardiovascular Risk. *Curr Diab Rep* 21:
25. Chaim FDM, Pascoal LB, Chaim FHM, Palma BB, Damázio TA, da Costa LBE, Carvalho R, Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, Milanski M, Chaim EA, Leal RF (2020) Histological grading evaluation of non-alcoholic fatty liver disease after bariatric surgery: a retrospective and longitudinal observational cohort study. *Scientific Reports* 2020 10:1 10:1–11
26. Chakravarthy M V., Waddell T, Banerjee R, Guess N (2020) Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives. *Gastroenterol Clin North Am* 49:63–94
27. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillo WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G (2015) Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64:1744–1754
28. Chambers ES, Morrison DJ, Frost G (2015) Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proc Nutr Soc* 74:328–336
29. Chen J, Vitetta L (2020) Gut Microbiota Metabolites in NAFLD Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 21:1–19
30. Chen S-J, Chen C-C, Liao H-Y, Lin Y-T, Wu Y-W, Liou J-M, Wu M-S, Kuo C-H, Lin C-H (2022) Association of Fecal and Plasma Levels of Short-Chain Fatty Acids With Gut Microbiota and Clinical Severity in Patients With Parkinson Disease.
31. Choi JM, Chung GE, Kang SJ, Kwak MS, Yang JI, Park B, Yim JY (2021) Association Between Anxiety and Depression and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Front Med (Lausanne)* 7:
32. Choi KW, Kim YK, Jeon HJ (2020) Comorbid anxiety and depression: Clinical and conceptual consideration and transdiagnostic treatment. *Adv Exp Med Biol* 1191:219–235
33. Cobbina E, Akhlaghi F (2017) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev* 49:197–211
34. Colak Y, Yesil A, Mutlu HH, Caklili OT, Ulasoglu C, Senates E, Takir M, Kostek O, Yilmaz Y, Enc FY, Tasan G, Tuncer I (2014) A potential treatment of non-alcoholic fatty liver disease with SIRT1 activators. *J Gastrointestin Liver Dis* 23:311–319
35. Colognesi M, Gabbia D, De Martin S (2020) Depression and Cognitive Impairment-Extrahepatic Manifestations of NAFLD and NASH. *Biomedicines* 8:
36. Coppola S, Avagliano C, Calignano A, Berni Canani R (2021) The protective role of butyrate against obesity and obesity-related diseases. *Molecules* 26:

37. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Álvarez-Quintero R, Velásquez-Mejía EP, Sierra JA, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS (2018) Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Nutrients* 11:
38. Del Campo JA, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L (2018) Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 19:
39. Demigné C, Morand C, Levrat M-A, Besson C, Moundras C, Rémésy C (1995) Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 74:209–219
40. Demyttenaere K, Heirman E (2020) The blurred line between anxiety and depression: hesitations on comorbidity, thresholds and hierarchy. *Int Rev Psychiatry* 32:455–465
41. E B, S M, MF C, G M (2010) Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 16:16–30
42. Eknoyan G (2008) Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant* 23:47–51
43. Ferguson D, Finck BN (2021) Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 17:484–495
44. Fernando DH, Forbes JM, Angus PW, Herath CB (2019) Development and Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Advanced Glycation End Products. *Int J Mol Sci* 20:
45. Ford J, Thomas F, Byng R, McCabe R (2020) Use of the Patient Health Questionnaire (PHQ-9) in Practice: Interactions between patients and physicians. *Qual Health Res* 30:2146–2159
46. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, De Lédinghen V (2006) Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 55:403
47. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ (2018) Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 24:908–922
48. Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C (2010) Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol* 10:
49. Golubeva JA, Sheptulina AF, Yafarova AA, Mamutova EM, Kiselev AR, Drapkina OM (2022) Reduced Quality of Life in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease May Be Associated with Depression and Fatigue. *Healthcare (Basel)* 10:
50. Gu Y, Zhang W, Hu Y, Chen Y, Shi J (2022) Association between nonalcoholic fatty liver disease and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Affect Disord* 301:8–13
51. Harrison SA, Bedossa P, Guy CD, Schattenberg JM, Loomba R, Taub R, Labriola D, Moussa SE, Neff GW, Rinella ME, Anstee QM, Abdelmalek MF, Younossi Z, Baum SJ, Francque S, Charlton MR, Newsome PN, Lanthier N, Schiefke I, Mangia A, Pericàs JM, Patil R, Sanyal AJ, Noureddin M, Bansal MB, Alkhouri N, Castera L, Rudraraju M, Ratziu V (2024) A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 390:497–509
52. Hartmann P, Zhang X, Loomba R, Schnabl B (2023) Global and national prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in adolescents: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019.
53. Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K (2013) Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol* 28 Suppl 4:64–70
54. Häuser W, Almouhtasseb R, Muthny FA, Grandt D (2003) [Validation of a German Version of the Fatigue Impact Scale FIS-D]. *Z Gastroenterol* 41:973–982

55. He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Y, Chen L, Zhao Y, Bai L, Hao X, Li X, Zhang S, Zhu L (2020) Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci* 21:1–16
56. Holmes E, Li J V., Marchesi JR, Nicholson JK (2012) Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab* 16:559–564
57. Holscher HD (2017) Gut Microbes Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota.
58. Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi KC, Feng DD, Chen C, Lee HG, Katoh K, Roh SG, Sasaki S (2005) Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146:5092–5099
59. Hospital C, System H, Lee Y-J, Chung T-H, Kim J-K, Kim J-H (2021) Fatty Liver Index as a Simple and Useful Predictor for 10-year Cardiovascular Disease Risks Determined by Framingham Risk Score in the General Korean Population. *J Gastrointest Liver Dis* 30:221–226
60. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R (2021) Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18:223–238
61. Huang PL (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 2:231–237
62. Huang Y, Lou X, Jiang C, Ji X, Tao X, Sun J, Bao Z (2022) Gut microbiota is correlated with gastrointestinal adverse events of metformin in patients with type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:1044030
63. Ioannou GN (2021) Epidemiology and risk-stratification of NAFLD-associated HCC. *J Hepatol* 75:1476–1484
64. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P (2018) Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 75:3313–3327
65. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH, Tolan DR, Sanchez-Lozada LG, Rosen HR, Lanasa MA, Diehl AM, Johnson RJ (2018) Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 68:1063–1075
66. Kabbani M, Michailidis E, Steensels S, Ersoy BA, Rice CM, De YP, Correspondence J, Fulmer CG, Luna JM, Ré Mie Le Pen J, Tardelli M, Razooky B, Ricardo-Lax I, Zou C, Zeck B, Stenzel AF, Quirk C, Foquet L, Ashbrook AW, Schneider WM, Belkaya S, Lalazar G, Liang Y, Pittman M, Devisscher L, Suemizu H, Theise ND, Chiriboga L, Cohen DE, Copenhaver R, Grompe M, Meuleman P, De Jong YP (2022) Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid non-alcoholic fatty liver disease development in chimeric mice In brief Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid non-alcoholic fatty liver disease development in chimeric mice. *CellReports* 40:111321
67. Kanoski SE, Hayes MR, Skibicka KP (2016) GLP-1 and weight loss: unraveling the diverse neural circuitry. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310:R885–R895
68. Khayyat-zadeh SS, Omran-zadeh A, Miri-Moghaddam MM, Arekhi S, Naseri A, Ziaee A, Khajavi L, Nejati Salehkhani F, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M (2021) Dietary antioxidants and fibre intake and depressive symptoms in Iranian adolescent girls. *Public Health Nutr* 24:5650–5656
69. Komorniak N, Martynova-Van Kley A, Nalian A, Wroński M, Kaseja K, Kowalewski B, Kaźmierczak-Siedlecka K, Łoniewski I, Kaczmarczyk M, Podsiadło K, Bogdański P, Palma J, Stachowska E (2022) Association between Fecal Microbiota, SCFA, Gut Integrity Markers and Depressive Symptoms in Patients Treated in the Past with Bariatric Surgery-The Cross-Sectional Study. *Nutrients* 14:

70. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, Vogt TF, Hobbs HH, Cohen JC (2014) Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 46:352
71. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg RM, Bantel H, Pathil A, Demir M, Kluwe J, Boettler T, Lammert F, Geier AA (2017) Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *J Lipid Res* 58:247–255
72. Kumar A, Pramanik J, Goyal N, Chauhan D, Sivamaruthi BS, Prajapati BG, Chaiyasut C (2023) Gut Microbiota in Anxiety and Depression: Unveiling the Relationships and Management Options. *Pharmaceuticals (Basel)* 16:
73. Labenz C, Huber Y, Michel M, Nagel M, Galle PR, Kostev K, Schattenberg JM (2020) Nonalcoholic Fatty Liver Disease Increases the Risk of Anxiety and Depression. *Hepatol Commun* 4:1293–1301
74. Lan YL, Lou JC, Lyu W, Zhang B (2019) Update on the synergistic effect of HSL and insulin in the treatment of metabolic disorders. *Ther Adv Endocrinol Metab* 10:
75. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M (2003) Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry* 278:25481–25489
76. Li B, Zhang C, Zhan YT (2018) Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018:
77. Li J, Ha A, Rui F, Zou B, Yang H, Xue Q, Hu X, Xu Y, Henry L, Barakat M, Stave CD, Shi J, Wu C, Cheung R, Nguyen MH (2022) Meta-analysis: global prevalence, trend and forecasting of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescents, 2000-2021. *Aliment Pharmacol Ther* 56:396–406
78. Li W, Kadler BK, Brindley JH, Hood G, Devalia K, Loy J, Syn W kin, Alazawi W (2022) The contribution of daytime sleepiness to impaired quality of life in NAFLD in an ethnically diverse population. *Scientific Reports* 2022 12:1 12:1–9
79. Li Z, Yi CX, Katiraei S, Kooijman S, Zhou E, Chung CK, Gao Y, Van Den Heuvel JK, Meijer OC, Berbée JFP, Heijink M, Giera M, Van Dijk KW, Groen AK, Rensen PCN, Wang Y (2018) Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut* 67:1269–1279
80. Liu Y, Ju Y, Cui L, Liu T, Hou Y, Wu Q, Ojo O, Du X, Wang X (2021) Association between Dietary Fiber Intake and Incidence of Depression and Anxiety in Patients with Essential Hypertension. *Nutrients* 13:
81. Longo M, Meroni M, Paolini E, Erconi V, Carli F, Fortunato F, Ronchi D, Piciotti R, Sabatini S, Macchi C, Alisi A, Miele L, Soardo G, Comi G Pietro, Valenti L, Ruscica M, Fracanzani AL, Gastaldelli A, Dongiovanni P (2022) ORIGINAL RESEARCH TM6SF2/PNPLA3/MBOAT7 Loss-of-Function Genetic Variants Impact on NAFLD Development and Progression Both in Patients and in In Vitro Models.
82. Loomba R, Wong R, Fraysse J, Shreay S, Li S, Harrison S, Gordon SC (2020) Nonalcoholic fatty liver disease progression rates to cirrhosis and progression of cirrhosis to decompensation and mortality: a real world analysis of Medicare data. *Aliment Pharmacol Ther* 51:1149–1159
83. Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W, Menzel T (2009) Butyrate Inhibits NF- $\kappa$ B Activation in Lamina Propria Macrophages of Patients with Ulcerative Colitis. <http://dx.doi.org/101080/003655202317316105> 37:458–466

84. Luo F, Oldoni F, Das A (2021) TM6SF2: A Novel Genetic Player in Nonalcoholic Fatty Liver and Cardiovascular Disease. REVIEW | Hepatology Communications 6:2022
85. Luster AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338:436–445
86. Lymperopoulos A, Suster MS, Borges JI (2022) Short-Chain Fatty Acid Receptors and Cardiovascular Function. Int J Mol Sci 23:
87. Magzal F, Even C, Haimov I, Agmon M, Asraf K, Shochat T, Tamir S (2021) Associations between fecal short-chain fatty acids and sleep continuity in older adults with insomnia symptoms. Scientific Reports 2021 11:1 11:1–8
88. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, Borén J, Montalcini T, Pujia A, Wiklund O, Hindy G, Spagnuolo R, Motta BM, Pipitone RM, Craxi A, Fargion S, Nobili V, Käkelä P, Kärjä V, Männistö V, Pihlajamäki J, Reilly DF, Castro-Perez J, Kozlitina J, Valenti L, Romeo S (2016) The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. Gastroenterology 150:1219-1230.e6
89. Mandala A, Janssen RC, Palle S, Short KR, Friedman JE (2020) Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Nutritional Origins and Potential Molecular Mechanisms. Nutrients 12:1–23
90. Mann JP, Valenti L, Scorletti E, Byrne CD, Nobili V (2018) Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. Semin Liver Dis 38:1–13
91. Mantovani A, Dalbeni A (2021) Molecular Sciences Treatments for NAFLD: State of Art. Int J Mol Sci
92. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N (2001) Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. Lancet 358:893–894
93. Mauro S Di, Scamporrino A, Filippello A, Pino A Di, Scicali R, Malaguarnera R, Purrello F, Piro S (2021) Molecular Sciences Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. Int J Mol Sci 22:11905
94. Mederacke I, Wurstthorn K, Kirschner J, Rifai K, Manns MP, Wedemeyer H, Bahr MJ (2009) Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection. Liver International 29:1500–1506
95. Messaoudi S El, Rongen GA, De Boer RA, Riksen NP (2011) The cardioprotective effects of metformin. Curr Opin Lipidol 22:445–453
96. Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S (2016) Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand? World J Gastroenterol 22:7236–7251
97. Mirzaei R, Bouzari B, Hosseini-Fard SR, Mazaheri M, Ahmadyousefi Y, Abdi M, Jalalifar S, Karimitabar Z, Teimoori A, Keyvani H, Zamani F, Yousefimashouf R, Karampoor S (2021) Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders. Biomed Pharmacother 139:
98. Moniri NH, Farah Q (2021) Short-chain free-fatty acid G protein-coupled receptors in colon cancer. Biochem Pharmacol 186:
99. Morrison DJ, Preston T (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes 7:189
100. Mueller NT, Differding MK, Zhang M, Maruthur NM, Juraschek SP, Miller ER, Appel LJ, Yeh HC (2021) Metformin Affects Gut Microbiome Composition and Function and Circulating Short-Chain Fatty Acids: A Randomized Trial. Diabetes Care 44:1462–1471
101. Muhammad A (2019) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, an Overview. Integrative Medicine: A Clinician's Journal 18:42

102. Müller B, Rasmusson AJ, Just D, Jayarathna S, Moazzami A, Novicic ZK, Cunningham JL (2021) Fecal Short-Chain Fatty Acid Ratios as Related to Gastrointestinal and Depressive Symptoms in Young Adults. *Psychosom Med* 83:693–699
103. Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, Geisler C, Hansen M, Krejsgaard T, Biagi E, Andersen MH, Brigidi P, Ødum N, Litman T, Woetmann A (2015) The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci Rep* 5:
104. Newberry EP, Hall Z, Xie Y, Molitor EA, Bayguinov PO, Strout GW, Fitzpatrick JAJ, Brunt EM, Griffin JL, Davidson NO (2021) Liver-Specific Deletion of Mouse Tm6sf2 Promotes Steatosis, Fibrosis, and Hepatocellular Cancer. *Hepatology* 74:1203–1219
105. Newton JL, Jones DEJ, Henderson E, Kane L, Wilton K, Burt AD, Day CP (2008) Fatigue in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is significant and associates with inactivity and excessive daytime sleepiness but not with liver disease severity or insulin resistance. *Gut* 57:807–813
106. Nouredin M, Loomba R (2012) Nonalcoholic fatty liver disease: Indications for liver biopsy and noninvasive biomarkers. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 1:104
107. Oeda S, Tanaka K, Oshima A, Matsumoto Y, Sueoka E, Takahashi H (2020) Diagnostic Accuracy of FibroScan and Factors Affecting Measurements. *Diagnostics (Basel)* 10:
108. Oh S, Lee J, Chun S, Choi JE, Kim MN, Chon YE, Ha Y, Hwang SG, Choi SW, Hong KW (2022) Interaction between the PNPLA3 Gene and Nutritional Factors on NAFLD Development: The Korean Genome and Epidemiology Study. *Nutrients* 15:
109. Ohira H, Tsutsui W, Mamoto R, Yamaguchi S, Nishida M, Ito M, Fujioka Y (2016) Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through non-prostaglandin E2-mediated and prostaglandin E2-mediated pathways. *Lipids Health Dis* 15:
110. Omanovic Kolaric T, Nincevic V, Kuna L, Duspara K, Bojanic K, Vukadin S, Raguz-Lucic N, Wu GY, Smolic M (2021) Drug-induced Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Treatment. *Journal of Clinical and Translational Hepatology Review Article Journal of Clinical and Translational Hepatology* 9:731–737
111. Papatheodoridi M, Cholongitas E (2018) Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts. *Curr Pharm Des* 24:4574–4586
112. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 119:229–240
113. Paternostro R, Trauner M (2022) Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Intern Med* 292:190–204
114. Perna M, Hewlings S (2022) Saturated Fatty Acid Chain Length and Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review.
115. Persaud SJ, Bewick GA (2014) Peptide YY: more than just an appetite regulator. *Diabetologia* 57:1762–1769
116. Petzold G, Porsche M, Ellenrieder V, Kunsch S, Neesse A (2019) Impact of Food Intake on Liver Stiffness Determined by 2-D Shear Wave Elastography: Prospective Interventional Study in 100 Healthy Patients. *Ultrasound Med Biol* 45:402–410
117. Piazzolla VA, Mangia A cells Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH.
118. Pirmoazen AM, Khurana A, Kaffas A El, Kamaya A (2020) Quantitative ultrasound approaches for diagnosis and monitoring hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *10:4277–4289*
119. Plummer F, Manea L, Trepel D, McMillan D (2016) Screening for anxiety disorders with the GAD-7 and GAD-2: a systematic review and diagnostic metaanalysis. *Gen Hosp Psychiatry* 39:24–31
120. Pouwels S, Sakran N, Graham Y, Leal A, Pintar T, Yang W, Kassir R, Singhal R, Mahawar K, Ramnarain D (2022) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review

- of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr Disord* 22:
121. Powell EE, Wong VWS, Rinella M (2021) Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet* 397:2212–2224
  122. Prasun P (2020) Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866:
  123. Qiao YL, Qian JM, Wang FR, Ma ZY, Wang QW (2014) Butyrate protects liver against ischemia reperfusion injury by inhibiting nuclear factor kappa B activation in Kupffer cells. *J Surg Res* 187:653–659
  124. Rau M, Rehman A, Dittrich M, Groen AK, Hermanns HM, Seyfried F, Beyersdorf N, Dandekar T, Rosenstiel P, Geier A (2018) Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease. *United European Gastroenterol J* 6:1496–1507
  125. Riazi K, Azhari H, Charette JH, Underwood FE, King JA, Afshar EE, Swain MG, Congly SE, Kaplan GG, Shaheen AA (2022) The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 7:851–861
  126. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, Romero D, Abdelmalek MF, Anstee QM, Arab JP, Arrese M, Bataller R, Beuers U, Boursier J, Bugianesi E, Byrne CD, Castro Narro GE, Chowdhury A, Cortez-Pinto H, Cryer DR, Cusi K, El-Kassas M, Klein S, Eskridge W, Fan J, Gawrieh S, Guy CD, Harrison SA, Kim SU, Koot BG, Korenjak M, Kowdley K V., Lacaille F, Loomba R, Mitchell-Thain R, Morgan TR, Powell EE, Roden M, Romero-Gómez M, Silva M, Singh SP, Sookoian SC, Spearman CW, Tiniakos D, Valenti L, Vos MB, Wong VWS, Xanthakos S, Yilmaz Y, Younossi Z, Hobbs A, Villota-Rivas M, Newsome PN (2023) A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol* 79:1542–1556
  127. Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, Abdelmalek MF, Caldwell S, Barb D, Kleiner DE, Loomba R (2023) AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 77:1797–1835
  128. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40:1461–1465
  129. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M (2017) Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 67:829–846
  130. S R, S R, A U, A T, R AS (2021) Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Front Biosci (Landmark Ed)* 26:4892
  131. Safari Z, Gérard P (2019) The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci* 76:1541–1558
  132. Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, Mujagic Z, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Franke L, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, McCarthy MI (2019) Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet* 51:600–605
  133. Schienkiewitz A, Kuhnert R, Blume M, Mensink GBM (2022) Overweight and obesity among adults in Germany – Results from GEDA 2019/2020-EHIS. *Journal of Health Monitoring* 7:21
  134. Schreiber R, Xie H, Schweiger M (2019) Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864:880–899
  135. Schwartz BE, Rajagopal V, Smith C, Cohick E, Whissell G, Gamboa M, Pai R, Sigova A, Grossman I, Bumcrot D, Sasidharan K, Romeo S, Sehgal A, Pingitore P (2247)

- Discovery and Targeting of the Signaling Controls of PNPLA3 to Effectively Reduce Transcription, Expression, and Function in Pre-Clinical NAFLD/NASH Settings. 9:
136. Shea S, Lionis C, Kite C, Atkinson L, Chaggar SS, Randeve HS, Kyrou I (2021) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Potential Links to Depression, Anxiety, and Chronic Stress. *Biomedicines* 9:
  137. Shende P, Desai D (2020) Physiological and Therapeutic Roles of Neuropeptide Y on Biological Functions. *Adv Exp Med Biol* 1237:37–47
  138. Skonieczna-zydecka K, Grochans E, Maciejewska D, Szkup M, Schneider-Matyka D, Jurczak A, Łoniewski I, Kaczmarczyk M, Marlicz W, Czerwińska-Rogowska M, Pełka-Wysiecka J, Dec K, Stachowska E (2018) Faecal Short Chain Fatty Acids Profile is Changed in Polish Depressive Women. *Nutrients* 10:
  139. Stanhope KL, Schwarz JM, Havel PJ (2013) Adverse metabolic effects of dietary fructose: Results from recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Curr Opin Lipidol* 24:198
  140. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong • Yingzi Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 52:
  141. Takahashi Y, Fukusato T (2014) Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20:15539
  142. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L (2014) The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 121:91–119
  143. Tan JK, Macia L, Mackay CR (2023) Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 151:361–370
  144. Teo K, Abeysekera KWM, Adams L, Aigner E, Anstee QM, Banales JM, Banerjee R, Basu P, Berg T, Bhatnagar P, Buch S, Canbay A, Caprio S, Chatterjee A, Ida Chen Y Der, Chowdhury A, Daly AK, Datz C, de Gracia Hahn D, DiStefano JK, Dong J, Duret A, Vreugdenhil A, Alisi A, Socha P, Jańczyk W, Baumann U, Rajwal S, van Mourik I, Lacaille F, Dabbas M, Kelly DA, Nobili V, Emdin C, Fairey M, Gerhard GS, Eiriksdottir G, Garcia ME, Gudnason V, Harris TB, Kim LJ, Launer LJ, Nalls MA, Smith A V., Clark JM, Hernaez R, Kao WHL, Mitchell BD, Shuldiner AR, Yerges-Armstrong LM, Borecki IB, Carr JJ, Feitosa MF, Wu J, Butler JL, Fox CS, Hirschhorn JN, Hoffmann U, Hwang SJ, Massaro JM, O'Donnell CJ, Palmer CD, Sahani D V., Speliotes EK, Guo X, Hampe J, Hickman M, Heintz L, Hudert C, Hunter H, Kelly M, Kozlitina J, Krawczyk M, Lammert F, Langenberg C, Lavine J, Li L, Lim HK, Loomba R, Luukkonen PK, Melton PE, Mori TA, Palmer ND, Parisinos CA, Pillai SG, Qayyum F, Reichert MC, Romeo S, Rotter JI, Im YR, Santoro N, Schafmayer C, Stender S, Stickel F, Still CD, Strnad P, Taylor KD, Tybjærg-Hansen A, Umano GR, Utukuri M, Valenti L, Wagenknecht LE, Wareham NJ, Watanabe RM, Wattacheril J, Yaghootkar H, Yki-Järvinen H, Young KA, Mann JP (2021) rs641738C>T near MBOAT7 is associated with liver fat, ALT and fibrosis in NAFLD: A meta-analysis. *J Hepatol* 74:20–30
  145. Thangapandi VR, Knittelfelder O, Brosch M, Patsenker E, Vvedenskaya O, Buch S, Hinz S, Hendricks A, Nati M, Herrmann A, Rekhade DR, Berg T, Matz-Soja M, Huse K, Klipp E, Pauling JK, Wodke JAH, Miranda Ackerman J, Bonin M von, Aigner E, Datz C, Von Schönfels W, Nehring S, Zeissig S, Röcken C, Dahl A, Chavakis T, Stickel F, Shevchenko A, Schafmayer C, Hampe J, Subramanian P (2021) Loss of hepatic Mboat7 leads to liver fibrosis. *Gut* 70:940–950
  146. Turankova T, Blyuss O, Brazhnikov A, Svistunov A, Ks G, Cs P (2020) Cochrane Library Cochrane Database of Systematic Reviews Transient elastography with controlled attenuation parameter (CAP) for diagnosis of moderate or severe steatosis in people with suspected non-alcoholic fatty liver disease (Protocol).

147. Unalp-Arida A, Ruhl CE (2020) Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 I148M and Liver Fat and Fibrosis Scores Predict Liver Disease Mortality in the U.S. Population. *Hepatology* 71:820–834
148. Venegas DP, De La Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA (2019) Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 10:
149. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R (2011) Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem* 22:849–855
150. Wang D, Liu CD, Tian ML, Tan CQ, Shu G, Jiang QY, Zhang L, Yin YL (2019) Propionate promotes intestinal lipolysis and metabolic benefits via AMPK/LSD1 pathway in mice. *J Endocrinol* 243:187–197
151. Wang Q, Liu S, Zhai A, Zhang B, Tian G (2018) AMPK-Mediated Regulation of Lipid Metabolism by Phosphorylation. *Biol Pharm Bull* 41:985–993
152. Wang Q, Chen C, Zuo S, Cao K, Li H (2023) Integrative analysis of the gut microbiota and faecal and serum short-chain fatty acids and tryptophan metabolites in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *J Transl Med* 21:1–21
153. Ware JE, Kosinski M, Keller SD (1996) A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 34:220–233
154. Weinstein AA, Kallman Price J, Stepanova M, Poms LW, Fang Y, Moon J, Nader F, Younossi ZM (2011) Depression in patients with nonalcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis B and C. *Psychosomatics* 52:127–132
155. Weir CB, Jan A (2023) BMI Classification Percentile And Cut Off Points. *StatPearls*
156. Wu M, Tian T, Mao Q, Zou T, Zhou C-J, Xie J, Chen J-J Associations between disordered gut microbiota and changes of neurotransmitters and short-chain fatty acids in depressed mice.
157. Xiao J, Lim LKE, Ng CH, Tan DJH, Lim WH, Ho CSH, Tan EXX, Sanyal AJ, Muthiah MD (2021) Is Fatty Liver Associated With Depression? A Meta-Analysis and Systematic Review on the Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Depression and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Med (Lausanne)* 8:
158. Xiong J, Chen X, Zhao Z, Liao Y, Zhou T, Xiang Q (2022) A potential link between plasma short-chain fatty acids, TNF- $\alpha$  level and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease: A retrospective study. *Exp Ther Med* 24:
159. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E (2018) Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15:11–20
160. Yu EL, Schwimmer JB (2021) Epidemiology of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 17:196
161. Yuan L, Terrault NA (2020) PNPLA3 and nonalcoholic fatty liver disease: towards personalized medicine for fatty liver. *Hepatobiliary Surg Nutr* 9:353
162. Yuan S, Liu H, Yuan D, Xu J, Chen Y, Xu X, Xu F, Liang H (2020) PNPLA3 I148M mediates the regulatory effect of NF- $\kappa$ B on inflammation in PA-treated HepG2 cells. *J Cell Mol Med* 24:1541–1552
163. Yücel G, Zhao Z, El-Battrawy I, Lan H, Lang S, Li X, Buljubasic F, Zimmermann WH, Cyganek L, Utikal J, Ravens U, Wieland T, Borggrefe M, Zhou XB, Akin I (2017) Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Sci Rep* 7:

164. Zambell KL, Fitch MD, Fleming SE (2003) Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells. *J Nutr* 133:3509–3515
165. Zhou J, Massey S, Story D, Li L (2018) Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int J Mol Sci* 19:

## 14 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Marcin Krawczyk für die Möglichkeit unter seiner Aufsicht zu promovieren und auch für die Bereitstellung sämtlicher Utensilien, die für Arbeit unersetzlich waren. Für die wirklich ausnahmslos tolle, fördernde und motivierende Unterstützung im gesamten Prozess dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich auch bedanken für die zahlreichen Möglichkeiten an Tagungen teilzunehmen und meine Arbeit vorzustellen. Danke auch für die Zeit, die Sie investiert haben, um mich zu fördern, mich an weiteren Projekten teilhaben zu lassen und schließlich, um meine Arbeiten zu korrigieren.

Ein besonderer Dank gilt auch Stephanie Jürgen, die mich während der gesamten Zeit der Patientenrekrutierung unterstützt hat und innerhalb ihrer Ambulanz jederzeit willkommen geheißen hat. Danke für die vielen Gespräche und Hilfestellungen und vor allem für deine unfassbare Gelassenheit.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Silva Yusefpur, die mich stets mit offenen Armen in Ihrer Sprechstunde zur Patientenrekrutierung empfangen hat.

Vielen Dank an Irina Lambert und Dr. Susanne Weber für die geduldigen Einarbeitungen im Labor und dafür, dass es jederzeit möglich war, Fragen zu stellen.

Prof. Dr. Ewa Stachowska und Dr. Arleta Drozd danke ich für die Möglichkeit der aufwändigen Mikrobiom-Analysen in Ihrem Labor. Ich bedanke mich auch, für die stetige Beantwortung jeglicher Fragen.

Ein weiterer Dank gilt auch Karen Schneider und den Studienschwestern Ute Kemnade und Birgit Scheidweiler. Vielen Dank für Eure Mühe und sämtliche Hilfestellungen vor allem zu Beginn dieser Arbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mama, ohne die ich meinen Weg nicht so hätte gehen können, wie es jetzt möglich war. Danke für alles, was du für mich getan hast und danke, dass du mich so positiv geprägt hast.

Ich möchte mich auch bedanken bei Rudi und Rainer, für jegliche Unterstützung vor und während meines Studiums und für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen. Nicht zuletzt auch für all die lieben und motivierenden Worte. Danke auch an alle anderen, die mich, während diesem Prozess unterstützt und aufgebaut haben, die mich motiviert haben und an mich geglaubt haben.

## **15 Lebenslauf**

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