

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen
Geschäftsführung
Naumannstr. 8
01309 Dresden

Abschlussbericht Projekt 4/16

Thema: Prävention von Lebererkrankungen im Erwachsenenalter durch neue nicht-invasive Methoden für die frühe Diagnose einer Fettleber bei Kindern und Jugendlichen

Kurzbezeichnung: Prävention und Diagnose der Fettlebererkrankung

Projektleiter:

Name, Vorname: Penke, Melanie
Dienstbezeichnung/Funktion: wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Postdoc
Hochschule: Universität Leipzig
Telefon: /e-mail: 0341/9726504 /melanie.penke@medizin.uni-leipzig.de

Name, Vorname: Kiess, Wieland
Dienstbezeichnung/Funktion: Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Hochschule: Universität Leipzig
Telefon/e-mail: 0341/9726000/ wieland.kiess@medizin.uni-leipzig.de

1. Thema

Prävention von Lebererkrankungen im Erwachsenenalter durch neue nicht-invasive Methoden für die frühe Diagnose einer Fettleber bei Kindern und Jugendlichen

2. Ausgangssituation

Laut aktuellen Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation wird jede 2. Frau und rund 2/3 der Männer im Jahr 2030 in Deutschland übergewichtig sein. Der Anteil an übergewichtigen Erwachsenen liegt in Sachsen bei 55,4% und damit über dem deutschen Durchschnitt (Quelle: Statistisches Bundesamt, Angaben für das Jahr 2013). Auch ein erheblicher Anteil der sächsischen Kinder ist von Adipositas (3,3%) und Übergewicht (8,4%) betroffen. Durch Übergewicht und damit verbundene Folgeerkrankungen entstehen neben einer reduzierten Lebensqualität für die Betroffenen und damit einem Verlust an Arbeitskraft auch erhebliche Kosten im Gesundheitswesen (25,7 Mrd. €, geschätzt für das Jahr 2020; Quelle: Deutsche Adipositas Gesellschaft). Eng verbunden mit Übergewicht sind Stoffwechselerkrankungen, wie die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung. Heute sind bereits mindestens 30% der adipösen Kinder und Jugendlichen in Deutschland von einer Fettlebererkrankung betroffen, was diese zu einer neuen Volkskrankheit macht. Die Fettlebererkrankung kann sich im weiteren Verlauf zu einer Leberentzündung entwickeln und im Erwachsenenalter zu einer starken Schädigung der Leber (Fibrose bzw. Leberzirrhose) und damit zur Lebertransplantation bzw. auch zum Leberkrebs (hepatozelluläres Karzinom) führen. Außerdem ist die Fettlebererkrankung ein unabhängiger Risikofaktor für Typ 2 Diabetes, Nierenerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zur wirksamen Prävention dieser schweren Folgeerkrankungen ist es wichtig, eine Fettlebererkrankung frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können. Jedoch ist sowohl die frühzeitige Diagnose als auch die Therapie der Fettlebererkrankung besonders bei Kindern und Jugendlichen zurzeit noch nicht möglich.

Das erste Problem besteht darin, dass es an sicheren nicht-invasiven Methoden für die frühe Diagnose einer Fettlebererkrankung fehlt. Der Goldstandard für die Diagnose einer Fettlebererkrankung ist zurzeit die Leberbiopsie. Diese Methode ist jedoch schmerzhaft, mit Risiken verbunden und daher für die Prävention von schweren Leberschäden durch Frühdiagnose, z.B. im Rahmen von Routineuntersuchungen bei schwer übergewichtigen Kindern, nicht geeignet. Nicht-invasive Diagnosemethoden, die auf Ultraschalluntersuchungen basieren (z.B. die FibroScan®-Untersuchung) wurden an erwachsenen Patienten mit Fettlebererkrankung erfolgreich getestet, allerdings gibt es bisher keine ausreichende Anzahl von Studien an Kindern mit Fettleber. Um die Verlässlichkeit der Diagnose zu erhöhen, ist es außerdem wichtig, weitere Parameter zu finden, die den Schweregrad der Lebererkrankung widerspiegeln. Einfach zu messende Blutparameter sind bisher aber nur unzureichend validiert.

Das zweite Problem ist das fehlende Verständnis für den Mechanismus der Krankheitsentstehung und -entwicklung. Deswegen ist die derzeit einzige mögliche Therapie bei Kindern und Jugendlichen mit Fettlebererkrankung den Lebensstil (Ernährung, Sport) zu ändern. Bekannt ist bereits, dass Veränderungen im zellulären Energiestoffwechsel wie z.B. eine Beeinträchtigung des Abbaus von Fettsäuren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression der Fettlebererkrankung spielen. Ein zentraler Regulator des Energiestoffwechsels ist das Coenzym NAD, welches unter anderem aus Vitamin B3 gebildet wird. In experimentellen Studien wurde bereits gezeigt, dass sich eine Aufrechterhaltung der zellulären NAD-Spiegel durch Gabe von Vitamin B3 als NAD-Vorstufe positiv auf den Energie- und Fettstoffwechsel in der Leber auswirkt. Damit ist Vitamin B3 eine potentielle Präventions- und Behandlungsmöglichkeit, um Kinder und Jugendliche vor den negativen Folgen einer Fettlebererkrankung zu schützen.

3. Forschungsziel

Aufgrund der beiden oben dargestellten Schwierigkeiten der Diagnostik und Therapie der Fettlebererkrankung bei Kindern gliedern sich die Ziele dieses interdisziplinären Projektes in zwei miteinander verknüpfte Arbeitspakete. Im **Arbeitspaket 1** ist es das Ziel, eine Kombination der auf Ultraschall basierenden FibroScan®-Untersuchung mit der Messung von Blutwerten als neue nicht-invasive Methode für die frühe Diagnose der Fettleber zu erarbeiten. Im **Arbeitspaket 2** soll in einem Mausmodell der Fettlebererkrankung untersucht werden, ob man mittels Gabe von Vitamin B3 den Energiestoffwechsel in der Leber aufrechterhalten kann und somit weitere Leberschäden verhindern kann. Das übergreifende Ziel dieses Projektes ist es insgesamt, die Grundlagen zu schaffen, um zukünftig eine Fettlebererkrankung frühzeitig und sicher diagnostizieren zu können und zusätzlich eine neue Präventions- und Therapiemöglichkeit für die Fettlebererkrankung anbieten zu können. Damit sollen schwere Leberschädigungen und Folgekrankheiten bereits im frühen Kindesalter verhindert werden und die Gesundheit der Kinder und Erwachsenen in Sachsen maßgeblich verbessert werden.

4. Ergebnisse

In den letzten Jahren wurde die FibroScan® Untersuchung (Echosens, Paris) als neue, nicht-invasive Methode zur Diagnose der Leberverfettung und -fibrose etabliert. Die Transiente Elastografie (TE) für die Bestimmung der Fibrose wurde bereits an Kindern (gesund bzw. mit chronischer Lebererkrankung) validiert [1–4]. Zudem ist zusätzlich zur Leberelastizität auch die Bestimmung des Fettgehalts des Lebergewebes möglich, das sogenannte CAP-Verfahren (*Controlled Attenuation Parameter*) [5,6]. Ersten Daten zu Folge ist das CAP-Verfahren mit MR-basierten Techniken der Leberfettquantifizierung vergleichbar [7].

Für das Arbeitspaket 1 wurde die FibroScan® Untersuchung an 416 Kindern und Jugendlichen durchgeführt. Eine Charakterisierung der Kohorte ist in Tabelle 1 zu finden. Weder der CAP, noch der TE Wert war zwischen Jungen und Mädchen unterschiedlich.

Tab 1 Demographische Merkmale und Laborparameter von Kindern und Jugendlichen mit Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Tukey HSD-Test berechnet. *p value<0.05 Normalgewicht vs. Übergewicht; †p value<0.05 Normalgewicht vs. Adipositas; #p value <0.05 Übergewicht vs. Adipositas

| | lean (n=221) | overweight (n=52) | obese (n=143) | all (n=416) |
|--|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| NAMPT (ng/ml) | 4.8 \pm 3.2 | 5.43 \pm 3.54 | 5.45 \pm 3.72 | 5.1 \pm 3.4 |
| Anthropometry | | | | |
| Age (y) ^{†*} | 13.6 \pm 2.9 | 13.5 \pm 2.2 | 12.3 \pm 2.8 | 13.1 \pm 2.8 |
| BMI-SDS ^{†*} | 0.1 \pm 0.6 | 1.6 \pm 0.18 | 2.5 \pm 0.4 | 1.1 \pm 1.2 |
| Height-SDS ^{†*} | 0.1 \pm 0.9 | 0.6 \pm 1.2 | 0.6 \pm 1.0 | 0.3 \pm 1.0 |
| Liver parameter | | | | |
| ALAT (U/l) ^{†*} | 18.3 \pm 7.8 | 20.9 \pm 8.8 | 24.2 \pm 13.9 | 21.0 \pm 11.1 |
| ASAT (U/l) | 24.7 \pm 6.4 | 24.2 \pm 5.2 | 25.7 \pm 8.3 | 25.0 \pm 7.1 |
| GGT (U/l) ^{†*} | 11.7 \pm 4.4 | 14.0 \pm 4.0 | 17.1 \pm 6.7 | 13.8 \pm 5.7 |
| CAP (dB/m) ^{†*} | 191.3 \pm 39.4 | 228.3 \pm 50.4 | 248.8 \pm 52.4 | 214.5 \pm 52.5 |
| TE (kPa) ^{†*} | 4.4 \pm 1.2 | 4.6 \pm 1.2 | 4.9 \pm 2.1 | 4.6 \pm 1.5 |
| Cytokeratin 18 (U/l) | 144.3 \pm 108.1 | 143.2 \pm 76.1 | 171.0 \pm 145 | 153.4 \pm 107.5 |
| Inflammation | | | | |
| CRP (mg/l) ^{†*} | 0.7 \pm 1.2 | 1.5 \pm 2.0 | 2.9 \pm 3.1 | 1.6 \pm 2.4 |
| Neutrophile (10 ⁹ /l) ^{†*} | 2.7 \pm 1.0 | 3.4 \pm 1.3 | 3.5 \pm 1.1 | 2.9 \pm 1.1 |
| Leucocyte (10 ⁹ /l) ^{†*} | 5.5 \pm 1.3 | 6.4 \pm 1.4 | 6.8 \pm 1.4 | 5.8 \pm 1.4 |
| Lymphocyte (10 ⁹ /l) ^{†*} | 2.0 \pm 0.5 | 2.3 \pm 0.4 | 2.4 \pm 1.2 | 2.1 \pm 0.7 |

Nach Unterteilung der Kohorte in normalgewichtige, übergewichtige und adipöse Kinder nach dem BMI-SDS konnte gezeigt werden, dass sich der CAP Wert, also der Grad an Leberverfettung, mit steigenden BMI-SDS erhöhte (Abb.1). Dies deutet darauf hin, dass übergewichtige und adipöse Kinder ein erhöhtes Risiko haben, an einer Leberverfettung zu erkranken. Der TE Wert war zwischen den schlanken und adipösen Kindern signifikant unterschiedlich (Abb. 1). In der Gruppe der adipösen Kinder besteht damit zudem ein erhöhtes Risiko eine Leberfibrose zu entwickeln, obwohl dieser Wert noch nicht über die publizierten Cut-off Werte für eine Leberfibrose in Erwachsenen liegt [8].

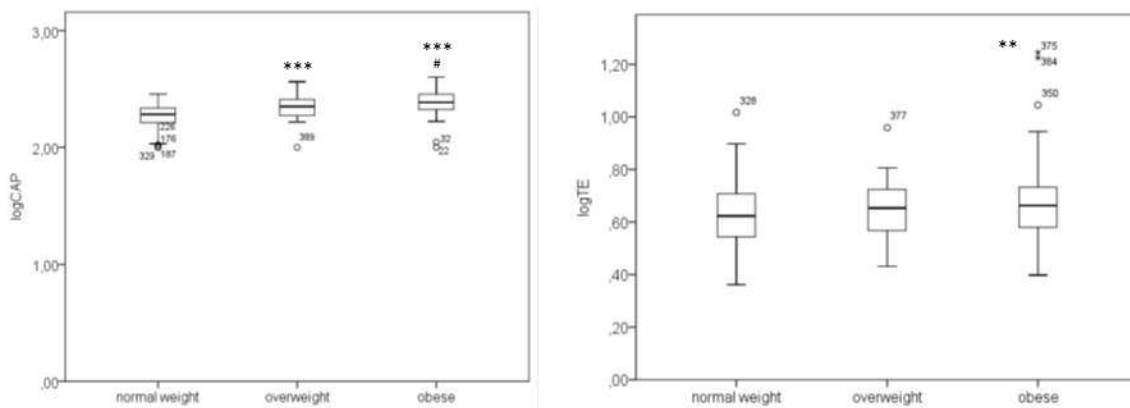


Abb. 1 Vergleich von logCAP und logTE zwischen den verschiedenen Gewichtsgruppen in Kindern und Jugendlichen. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Tukey HSD-Test berechnet.

Im Anschluss daran wurde der CAP Wert in Quartile eingeteilt. In der obersten Quartil waren die Kinder mit dem höchsten BMI-SDS im Vergleich zur untersten Quartil. Zudem fand man einen signifikanten Anstieg von γ -GT, CRP und TE (Abb. 2). Diese Daten zusammen genommen zeigen, dass Kinder mit

CAP-Werten in der obersten Quartil (>245 dB/m) bereits ein erhöhtes Risiko für eine Leberverfettung haben einhergehend mit einem verstärkten Risiko eine Fibrose auszubilden. Der durchschnittlich publizierte CAP Wert, der eine Leberverfettung von Grad 1 in Erwachsenen definiert liegt bei 252 dB/m. In unserer Gesamtkohorte haben 23,3% der Kinder und Jugendlichen einen CAP-Wert von über 245 dB/m. Dieser Wert erhöht sich bei den adipösen Kindern und Jugendlichen auf 43,4%.

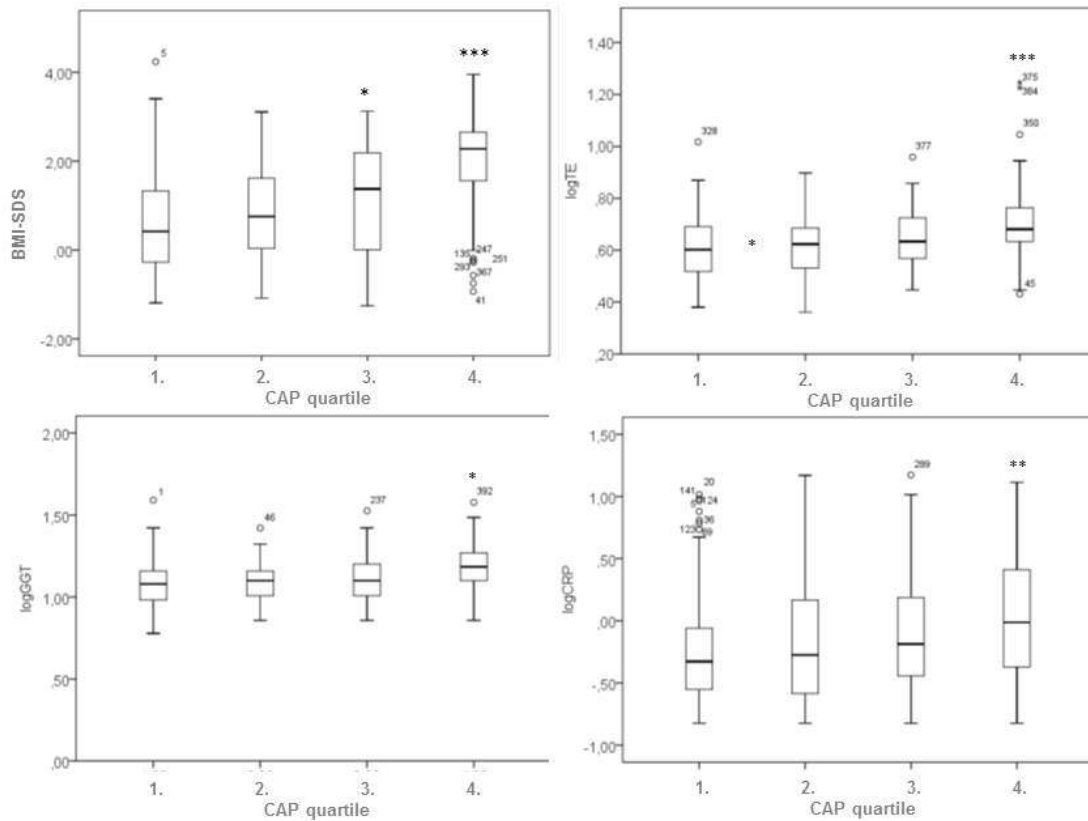


Abb. 2 Vergleich von BMI-SDS, logTE, logGGT and logCRP Konzentrationen zwischen den Quartilen des CAP Wertes. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Tukey HSD-Test berechnet.

Weitere Analysen zeigten, dass der CAP Wert, also der Grad der Leberverfettung, positive assoziiert war mit Parametern der Leber (TE, ALAT, GGT, Cytokeratin 18), Proinsulin, C-reaktives Protein und waist-to-hip ratio. Nach Adjustierung auf BMI-SDS, Alter und Geschlecht blieb die Assoziation mit TE, ALAT und waist-to-hip-ratio erhalten (Tab. 2, Abb. 3).

Tab. 2 Assoziation von logCAP mit Leber- und Inflamationsparameters in Kindern und Jugendlichen. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet und für * BMI-SDS, Alter und Geschlecht adjustiert. #logarithmisch transformierte Variablen

| | Pearson correlation | partial Pearson correlation* |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| TE# [kPa] | r=0.259 p=0.000 | r=0.181 p=0.000 |
| ALAT# [U/l] | r=0.232 p=0.000 | r=0.138 p=0.024 |
| GGT# [U/l] | r=0.307 p=0.000 | |
| Cytokeratin 18# [U/l] | r=0.164 p=0.003 | |
| Proinsulin# [pmol/l] | r=0.164 p=0.002 | |
| C-reactive protein# [U/l] | r=0.283 p=0.000 | |
| waist-to-hip# | r=0.323 p=0.000 | r=0.143 p=0.006 |

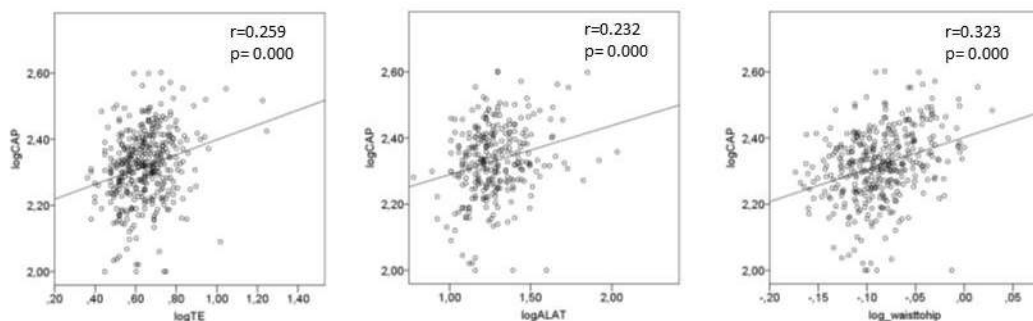


Abb. 3 Korrelation von logCAP mit logTE, logALAT und logWaist-to-hip in Kindern und Jugendlichen. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet.

NAMPT Serumspiegel waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen Mädchen und Jungen, sowie zwischen Kindern und Jugendlichen mit Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas. Die Korrelation nach Spearman ergab, dass NAMPT vor allem in den Kindern mit Übergewicht mit ALAT, γ -GT und Cytokeratin-18 positiv assoziiert waren, allerdings nicht mit Werten der FibroScan® Messung (Abb. 4). Weitere Analysen zeigten, dass NAMPT zudem mit Parametern der Inflammation (C-reaktives Protein, Leukozyten und Neutrophile) korreliert, v.a. in Kindern mit Übergewicht und Adipositas (Abb. 5). Adjustierung auf BMI-SDS, Alter und Geschlecht führte dazu, dass v.a. die Inflammationsmarker weiterhin stark mit NAMPT assoziiert waren und die Leberparameter nur noch eine schwache bis gar keine Korrelation aufwiesen (Tab. 3). Multiple Regressionsanalysen zeigten, dass NAMPT ein starker Prädiktor für die Inflammationsmarker ist, allerdings nicht für Parameter der Leber (Tab. 4). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass v.a. Kinder mit Adipositas in unsere Kohorte bereits ein erhöhtes Risiko haben einer Fettleber haben, die mit Hilfe der neuen nicht-invasiven Methode FibroScan® diagnostiziert werden kann. NAMPT ist allerdings nicht als Serummarker geeignet.

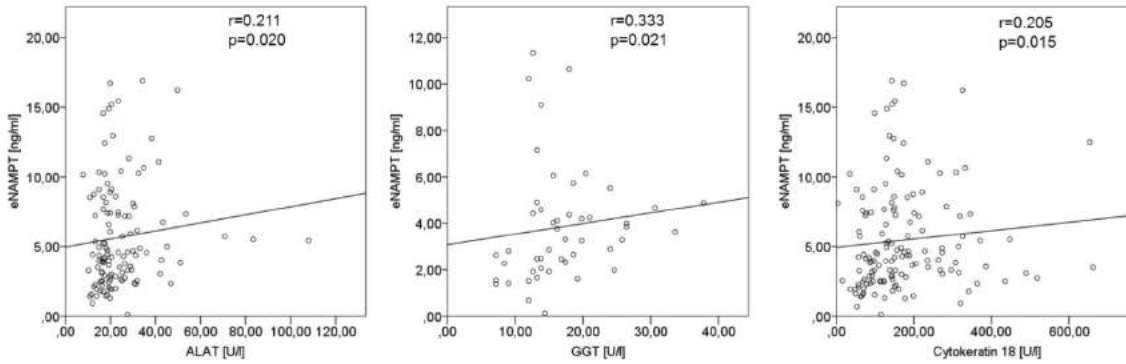


Abb. 4 Korrelation von NAMPT im Serum mit ALAT, GGT and Cytokeratin 18 in Kindern und Jugendlichen. Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman berechnet.

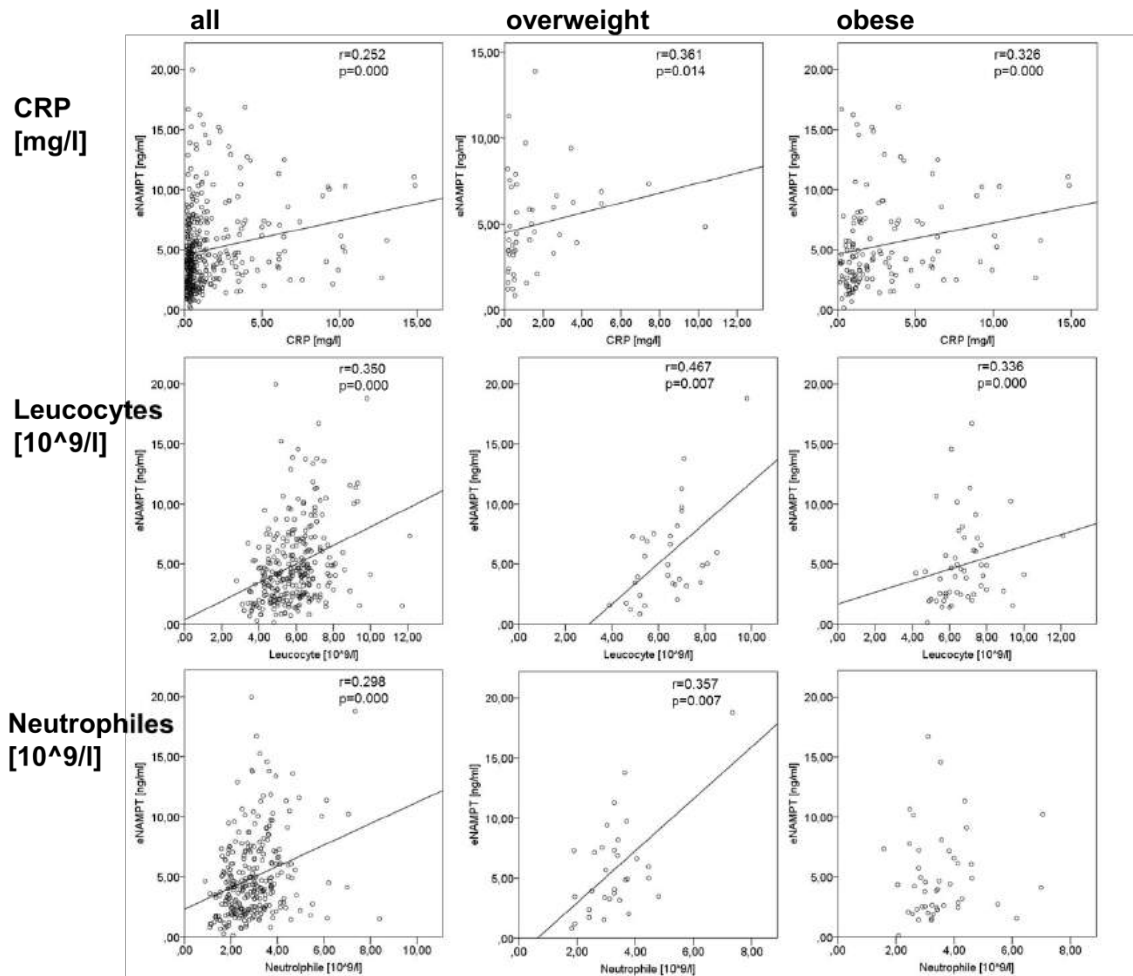


Abb. 5 Korrelation von NAMPT im Serum mit CRP, Leukozyten- und Neutrophilenzahl in Kindern und Jugendlichen. Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman berechnet.

Tab. 3 Assoziation von logNAMPT mit Leber- und Inflammationsparameter in Kindern und Jugendlichen nach adjustierung auf BMI-SDS, Alter und Geschlecht. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet. #logarithmisch transformierte Variablen.

| | all | overweight | obese |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Liver parameter | | | |
| ALAT (U/l) | r=0.099 [#] | r=-0.153 [#] | r=0.186 [#] p=0.045 |
| GGT (U/l) | r=0.163 [#] p=0.056 | r=0.051 [#] | r=0.296 p=0.048 |
| Cytokeratin 18 (U/l) | r=0.076 [#] | r=0.181 [#] | r=0.147 [#] |
| Inflammation | | | |
| CRP (mg/l) | r=0.272 [#] p=0.000 | 0.395 [#] p=0.010 | r=0.291 [#] p=0.001 |
| Neutrophile (10 ⁹ /l) | r=0.324 [#] p=0.000 | r=0.726 [#] p=0.000 | r=0.149 [#] |
| Leucocyte (10 ⁹ /l) | r=0.380 [#] p=0.000 | r=0.703 p=0.000 | r=0.282 p=0.052 |

Tab. 4 Multiple Regressionsanalysen für die unabhängige Assoziationen von eNAMPT-Serumspiegeln bei Kindern und Jugendlichen mit Übergewicht. Für multiple Regressionsanalysen wurde das schrittweise Vorwärtsmodell verwendet. Unabhängige Variablen: log NAMPT, log Alter, Geschlecht und BMI-SDS

| | Parameter | ΔR^2 | B \pm SEM | p |
|--|-----------|--------------|--------------------|-------|
| Dependent variable: log CRP ($R^2=0.197$; $p=0.010$) | | | | |
| 1 | log NAMPT | 0.100 | 0.630 \pm 0.014 | 0.014 |
| 2 | log age | 0.097 | -2.072 \pm 0.029 | 0.029 |
| Dependent variable: log neutrophile ($R^2=0.618$; $p=0.000$) | | | | |
| 1 | log NAMPT | 0.290 | 0.270 \pm 0.053 | 0.000 |
| 2 | BMI-SDS | 0.242 | 0.306 \pm 0.085 | 0.001 |
| 3 | sex | 0.086 | 0.078 \pm 0.032 | 0.023 |
| Dependent variable: leucocyte [10 ⁹ /l] ($R^2=0.505$; $p=0.000$) | | | | |
| 1 | log NAMPT | 0.300 | 2.772 \pm 0.566 | 0.000 |
| 2 | BMI-SDS | 0.205 | 3.161 \pm 0.928 | 0.002 |

Für das Arbeitspaket 2 wurden insgesamt 28 weibliche und 28 männliche Mäuse (Stamm C57Bl/6NCrl) in den Versuch eingeschlossen. Jeweils in 14 weiblichen und 14 männlichen Tieren wurde mit einer Hochfettdiät (TD88137 Western Type Diet, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) sowie einem Fructose/Glucose-Gemisch (55%/45%, 42 g/l) als Trinkwasserzusatz die Entstehung einer NAFLD induziert. Jeweils 14 weibliche/ 14 männliche Tiere erhielten eine Kontrolldiät (CDE88137, Ssniff). Die Tiere erhielten die Diät ab einem Alter von 2 Monaten.

Die Tötung der Tiere zum Sammeln der Gewebe erfolgte nach 4 bzw. 6 Monaten auf der jeweiligen Diät, sodass sich eine Anzahl von n=7 Tieren/Gruppe ergab.

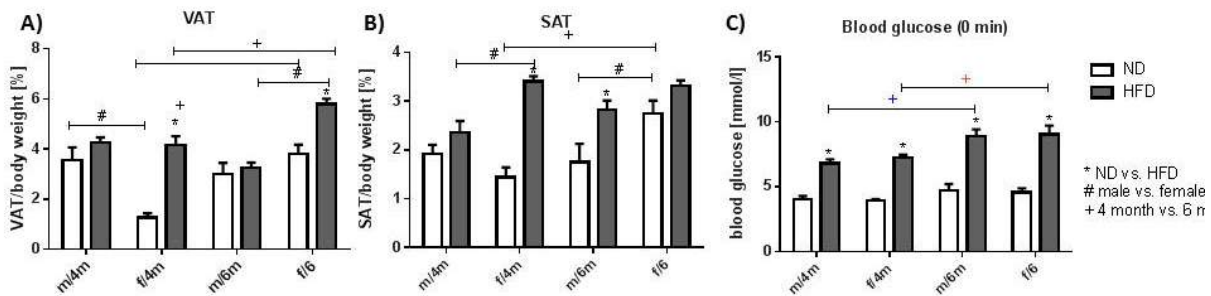


Abb. 6 Organgewicht und Glukosetoleranz männlicher und weiblicher Mäuse auf Hochfett-diät (HFD) im Vergleich zu Kontrolltieren (ND). A) Der Anteil von viszeralem Fett bezogen auf das Körpergewicht nahm bei weiblichen Mäusen nach 4 bzw. 6 Monaten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant zu. B) Der Anteil von viszeralem Fett bezogen auf das Körpergewicht nahm bei weiblichen Mäusen nach 6 Monaten Hochfett-diät stärker zu als bei männlichen Mäusen. C) Die Nüchternblutglukose war sowohl bei männlichen wie auch bei weiblichen Mäusen nach 4 und 6 Monaten auf Hochfett-diät signifikant erhöht. Die Glukosetoleranz nach 6 Monaten Hochfett-diät war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen im Gegensatz zu Kontrolltieren verschlechtert. n = 7 pro Gruppe, * p < 0.05 verglichen mit ND, # p < 0.05 männlich verglichen mit weiblich, + p < 0.05 Vergleich von Zeitpunkt 4 Monate mit 6 Monaten

Die Tiere wurden einmal pro Woche gewogen. Vor Tötung der Tiere wurden ein intraperitonealer Glukosetoleranztest sowie eine Fettverteilungsanalyse mittels EchoMRI vorgenommen. Wie zu erwarten war, nahmen die Mäuse auf der Hochfett-diät im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant an Gewicht. Weibliche Mäuse zeigten ab 5 Monaten Diät eine signifikant verringert Muskelmasse im Vergleich zu den männlichen Mäusen. Diese wurde aber nicht durch eine Hochfett-diät beeinflusst. Die Mäuse auf einer Hochfett-diät nahmen an Fettmasse zu. Dies konnte besonders stark bei den weiblichen Mäusen nach 4 Monaten Hochfett-diät beobachtet werden (3,9 facher Anstieg).

Zudem wurde nach Tötung der Mäuse die Leber, subkutanes und viszerales Fettgewebe wie auch anderes Gewebe entnommen und anschließend gewogen. Nach 4 bzw. 6 Monaten auf Hochfett-diät zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Fettverteilung. Weibliche Tiere auf Hochfett-diät hatten einen signifikanten Anstieg an viszeralem Fett (Abb. 6A). Zudem kam es nach 4 Monaten zu einem starken Anstieg an subkutanen Fettgewebe, welches sich bei den männlichen Tieren erst nach 6 Monaten signifikant vermehrte (Abb 6B).

Es gab keine Unterschiede hinsichtlich des oralen Glukosetoleranztests sowohl nach 4 als auch nach 6 Monaten. Allerdings führte eine Hochfett-diät in allen Gruppen zu einem Anstieg der Nüchternblutglukosewerte (Abb. 6C).

Die Lebern der männlichen Tieren auf einer Hochfett-diät waren bereits nach 4 Monaten schwerer und stark vergrößert, während es bei den weiblichen Tieren erst nach 6 Monaten zu einem Anstieg des Lebergewichtes kam (Abb. 7A, B). Im Gegensatz zum Fettgewebe, lagerten männliche Tiere bereits nach 4 Monaten mehr Fett in der Leber ein (Abb. 7C). Bei den weiblichen Tieren kam es erst nach 6 Monaten auf einer Hochfett-diät zu einer verstärkten hepatischen Lipidakkumulation, die mittels H&E Färbung nachgewiesen wurde (Abb. 7C). Dies stimmt überein mit dem Transkriptionsfaktor Sterol-regulatorisches Element-bindender Transkriptionsfaktor 1c (Srebp-1c), dessen Expression mittels SYBR Green qPCR gemessen wurde. Srebp-1c ist ein Marker der Fettsäuresynthese und spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung einer NAFLD. Die Expression von Srebp-1c war bei den männlichen Tieren auf einer Hochfett-diät bereits nach 4 Monaten erhöht, wohingegen es bei den weiblichen Tieren erst nach 6 Monaten zu einem signifikanten Anstieg kam (Abb. 7D). Nach Sirius Red Färbung konnte gezeigt werden, dass sich nur bei den männlichen Tieren auf einer Hochfett-diät Collagen in den Lebern einlagert (Abb.

7E), was wiederum durch eine erhöhte hepatische Expression von Collagen bestätigt wurde (Abb. 7F). Andere Marker der Mitochondrienfunktion, Glukoneogenese und de novo Lipogenese, die eine Rolle in der Entstehung der NAFLD spielen, waren unverändert.

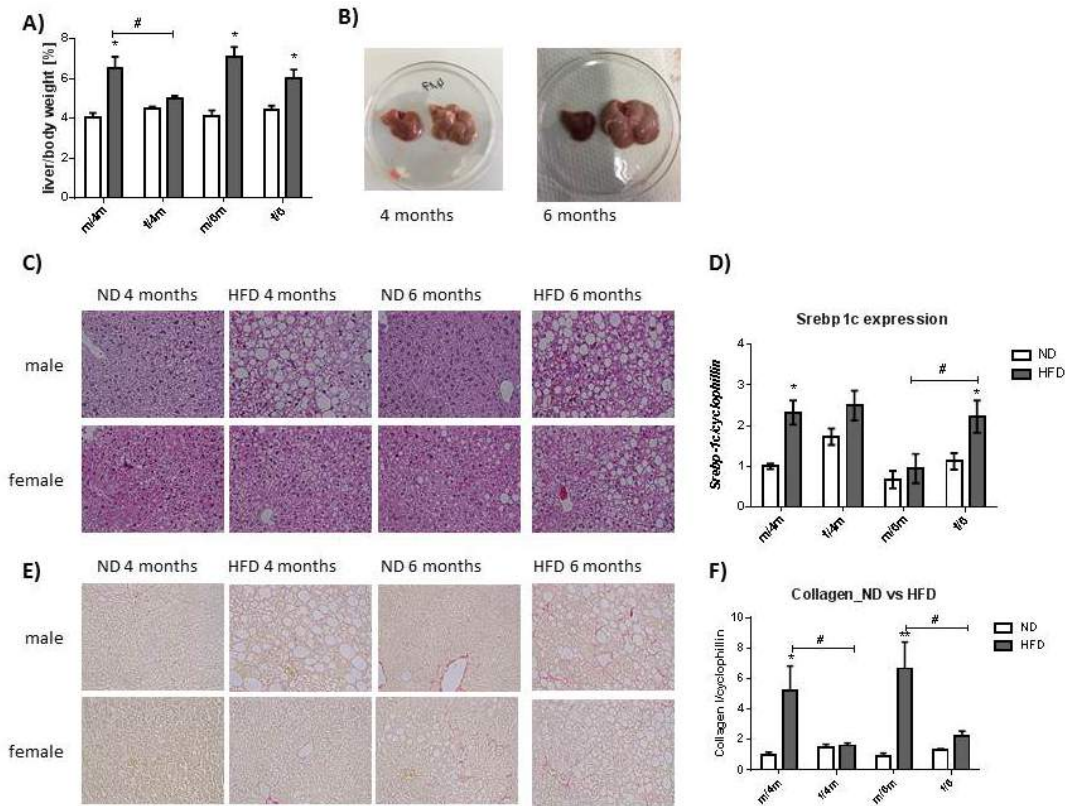


Abb. 7 Eine Hochfett-diät führt zu einer verstärkter hepatischen Fetteinlagerung und Collagenbildung in männlichen Mäusen A) Das Lebergewicht nahm bei männlichen Mäusen auf Hochfett-diät stärker zu als bei weiblichen Mäusen. B) Die Lebern der männlichen Tiere auf Hochfett-diät waren vergrößert. C) Männliche Tiere zeigten eine verstärkte Fetteinlagerung auf einer Hochfett-diät. D) Sterol-regulatorisches Element-bindender Transkriptionsfaktor 1c (Srebp-1c) als Marker der Fettsäuresynthese in männlichen Tieren bereits nach 4 Monaten hoch-exprimiert, wohingegen weibliche Tiere erst nach 6 Monaten eine erhöhte Expression auf Hochfett-diät zeigten. E) Eine Hochfett-diät führte zu einer erhöhten Kollagenbildung in männlichen Tieren. F) Die Collagen-Expression war nur bei männlichen Tieren nach 4 und 6 Monaten erhöht. n = 7 pro Gruppe, * p < 0.05 verglichen mit ND, # p < 0.05 männlich verglichen mit weiblich, + p < 0.05 Vergleich von Zeitpunkt 4 Monate mit 6 Monaten

Der NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) Metabolismus wurde durch die Fütterung einer Hochfett-diät sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen beeinträchtigt. Sowohl in männlichen als auch weiblichen Mäusen waren die Leber-NAD Spiegel, gemessen mittels HPLC, verringert, wobei es die weiblichen Tieren nach 6 Monaten wieder ausgleichen konnten (Abb. 8A). Die NAMPT Aktivität war unverändert (Abb. 8B). Proteinmenge wurde mittels Western Blot analysiert und im Anschluss densitometrisch ausgewertet. NAMPT Protein war bei weiblichen Mäusen auf einer Hochfett-diät signifikant erhöht im Vergleich zu den gleichaltrigen männlichen Mäusen (Abb. 8C). SIRT1 war in den Hochfett-diät-Tieren niedriger (Abb. 8D). SIRT1 ist ein Regulator des zellulären Energiestoffwechsels und deacetyliert Transkriptionsfaktoren und andere Enzyme, wofür es NAD verbraucht und als ein Endprodukt Nicotinamid herstellt. NAMPT ist das Schlüsselenzym beim Recycling von Nikotinamid in NAD. Andere gemessene Enzyme des NAD Stoffwechsels waren unverändert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch eine Hochfett-diät die Einlagerung von Fett in männlichen und weiblichen Mäusen unterschiedlich beeinflusst wird. Männliche Mäuse lagern Fett eher in der Leber ein, während weibliche Mäuse eine höhere Kapazität für Fetteinlagerung im subkutanen und viszeralen Fettgewebe haben. Der NAD Metabolismus wurde durch die Fütterung einer Hochfett-diät sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen beeinträchtigt, wobei NAMPT und SIRT1, zwei Schlüsselenzyme des NAD Metabolismus, in männlichen Mäusen niedriger sind als in weiblichen Mäusen. Damit sind beide Enzyme wichtige Zielmoleküle für pharmakologische Interventionen.

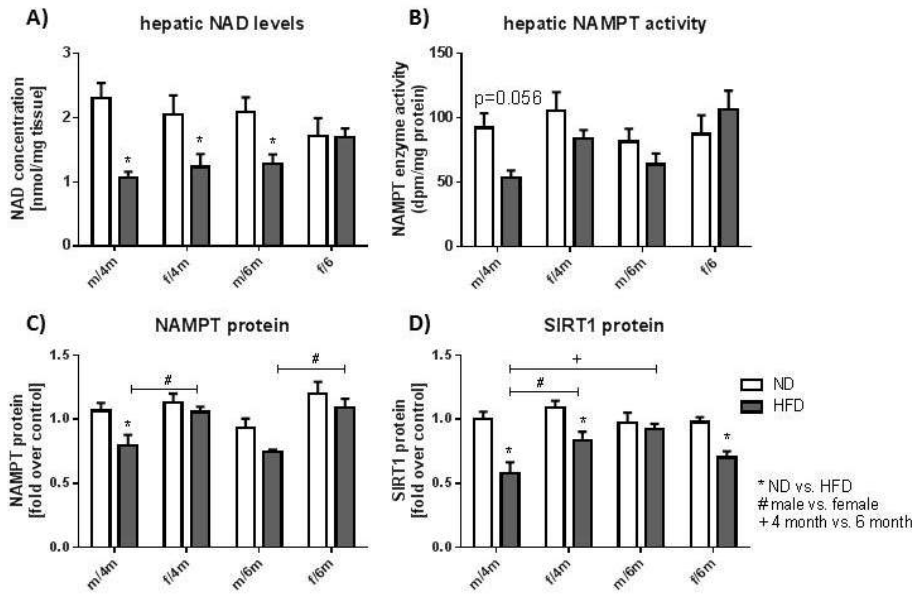


Abb. 8 Eine Hochfett-diät beeinträchtigt den NAD Stoffwechsel sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen. 2A) Leber- NAD Spiegel waren in männlichen und weiblichen Mäusen auf Hchfett-diät im Vergleich zur Normaldiät reduziert. 2B) die NAMPT Enzymaktivität nur in männlichen Mäusen zum Zeitpunkt 4 Monate beeinflusst ist. 2C,D) Die Menge an NAMPT und SIRT1 in der Leber ist in männlichen Mäusen auf Hochfett-diät niedriger als in weiblichen Mäusen, während (NAD Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NAMPT Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase, SIRT1 Sirtuin 1, HFD Hochfett-diät, ND Normaldiät), n = 7 pro Gruppe, * p < 0.05 verglichen mit ND, # p < 0.05 männlich verglichen mit weiblich, + p < 0.05 Vergleich von Zeitpunkt 4 Monate mit 6 Monaten

2.6 Referenzen

- [1] V. Nobili, F. Vizzutti, U. Arena, J.G. Abraldes, F. Marra, A. Pietrobbattista, R. Fruhwirth, M. Marcellini, M. Pinzani, Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis., *Hepatology*. 48 (2008) 442–8. doi:10.1002/hep.22376.
- [2] V. Nobili, L. Monti, A. Alisi, C. Lo Zupone, A. Pietrobbattista, P. Tomà, Transient elastography for assessment of fibrosis in paediatric liver disease., *Pediatr. Radiol.* 41 (2011) 1232–8. doi:10.1007/s00247-011-2143-y.
- [3] G. Engelmann, C. Gebhardt, D. Wenning, E. Wühl, G.F. Hoffmann, B. Selmi, J. Grulich-Henn, J.P. Schenk, U. Teufel, Feasibility study and control values of transient elastography in healthy children., *Eur. J. Pediatr.* 171 (2012) 353–60. doi: 10.1007/s00431-011-1558-7.
- [4] A. Rubio, F. Monpoux, E. Huguon, R. Truchi, V. Triolo, M.-A. Rosenthal-Allieri, A. Deville, E. Rosenthal, P. Boutté, A. Tran, Noninvasive procedures to evaluate liver involvement in HIV-1 vertically infected children., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 49 (2009) 599–606. doi:10.1097/MPG.0b013e3181a15b72.
- [5] M. Sasso, V. Miette, L. Sandrin, M. Beaugrand, The controlled attenuation parameter (CAP): a novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan., *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36 (2012) 13–20. doi:10.1016/j.clinre.2011.08.001.
- [6] M. Friedrich-Rust, D. Romen, J. Vermehren, S. Kriener, D. Sadet, E. Herrmann, S. Zeuzem, J. Bojunga, Acoustic radiation force impulse-imaging and transient elastography for non-invasive assessment of liver fibrosis and steatosis in NAFLD., *Eur. J. Radiol.* 81 (2012) e325-31. doi:10.1016/j.ejrad.2011.10.029.
- [7] T. Karlas, J. Wiegand, T. Berg, Gastrointestinal complications of obesity: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and

- its sequelae., *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27 (2013) 195–208. doi:10.1016/j.beem.2013.02.002.
- [8] I. Mikolasevic, L. Orlic, N. Franjic, G. Hauser, D. Stimac, S. Milic, 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 (2016) 7236–51. doi:10.3748/wjg.v22.i32.7236.