

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss einer weizenreduzierten Ernährung auf die hepatische Fibrose
und auf die transiente Elastographie der Leber
bei Nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Helena Bespaljko
aus Essen

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06.12.2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) | 3 |
| 2.1.1 Epidemiologie | 3 |
| 2.1.2 Pathogenese | 6 |
| 2.1.3 Diagnostik..... | 9 |
| 2.1.3.1 Biomarker | 10 |
| 2.1.3.2 Fibrose-Scores | 10 |
| 2.1.3.3 Bildgebende Verfahren | 11 |
| 2.1.3.4 Perkutane Leberbiopsie und Histologie..... | 14 |
| 2.1.4 Therapie | 16 |
| 2.2 Getreideproteine..... | 18 |
| 2.3 Gluten-assoziierte Erkrankungen..... | 19 |
| 2.3.1 Zöliakie | 19 |
| 2.3.2 Weizenallergie | 20 |
| 2.3.3 Weizensensitivität | 21 |
| 2.4 Glutenfreie Ernährung | 22 |
| 3 Material und Methoden | 24 |
| 3.1 Patientenkollektiv..... | 24 |
| 3.2 Studiendesign..... | 25 |
| 3.3 Visiten | 26 |
| 3.4 Fragebögen | 27 |
| 3.5 Transiente Elastographie..... | 28 |
| 3.6 Laborwerte | 30 |
| 3.7 Patientenschulung..... | 30 |
| 3.8 Statistische Analyse | 33 |
| 4 Ergebnisse | 34 |
| 4.1 Patientenkollektiv..... | 34 |
| 4.1.1 Ausgeschlossene Probanden..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Steatose und Fibrose..... | 39 |
| 4.3 Werte der transienten Elastographie..... | 41 |
| 4.3.1 Elastizität (E)..... | 41 |
| 4.3.1.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz..... | 41 |
| 4.3.1.2 in Abhängigkeit des NAFLD-Stadiums..... | 43 |
| 4.3.2 Controlled-Attenuation-Parameter (CAP)..... | 44 |
| 4.3.2.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz..... | 44 |
| 4.3.2.2 in Abhängigkeit der körperlichen Aktivität | 46 |
| 4.3.2.3 in Zusammenhang mit der ALT-Reduktion..... | 48 |
| 4.3.2.4 in Zusammenhang mit Alter und Geschlecht..... | 50 |
| 4.3.2.5 in Zusammenhang mit anthropometrischen Werten | 50 |
| 4.3.2.6 in Zusammenhang mit Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus.... | 51 |
| 5 Diskussion..... | 52 |
| 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 52 |
| 5.2 Vor- und Nachteile des Studiendesigns..... | 53 |
| 5.3 Verteilung von Steatose und Fibrose..... | 55 |
| 5.4 Elastizität (E)..... | 55 |
| 5.4.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz..... | 55 |
| 5.4.2 in Abhängigkeit des NAFLD-Stadiums..... | 56 |
| 5.5 Controlled-Attenuation-Parameter (CAP)..... | 57 |
| 5.5.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz..... | 57 |
| 5.5.2 in Abhängigkeit der körperlichen Aktivität..... | 57 |
| 5.5.3 in Zusammenhang mit der ALT-Reduktion..... | 58 |
| 5.5.4 in Zusammenhang mit Alter, Geschlecht, anthropometrischen Werten und Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus..... | 59 |
| 6 Zusammenfassung..... | 61 |
| 7 Literaturverzeichnis | 63 |
| 8 Anhang..... | 69 |
| 8.1 International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)..... | 69 |
| 9 Danksagung..... | 75 |
| 10 Lebenslauf..... | 76 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AFLD | alcoholic fatty liver disease |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APC | Antigen-präsentierende Zellen |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| ATIs | Amylase-Trypsin-Inhibitoren |
| AUROC | area under receiver operation characteristics-curve |
| BMI | body mass index |
| ca. | circa |
| CAP | Controlled Attenuation Parameter |
| CD4 | cluster of differentiation 4 |
| ChE | Cholinesterase |
| CLDQ | Chronic Liver Disease Questionnaire |
| CRN | Clinical Research Network |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CT | Computertomographie |
| d | day |
| DGE | Deutsche Gesellschaft für Ernährung |
| DNL | De-Novo Lipogenese |
| E | Elastizität |
| EASL | European Association for the Study of the Liver |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FFA | free fatty acids |
| g | Gramm |
| GFD | glutenfreie Diät |
| GGT | Gamma-Glutamyltransferase |
| GLDH | Glutamat-Dehydrogenase |

Abkürzungsverzeichnis II

| | |
|---------|--|
| GLP- 1 | Glucagon-like Peptide- 1 |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| GT 2 | Gewebstransglutaminase 2 |
| HbA1c | Hämoglobin A1c |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| HOMA-IR | Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance Index |
| HSC | Hepatische Sternzellen |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IPAQ | International Physical Activitiy Questionnaire |
| IQR | Interquartile range |
| IU | international unit |
| kcal | Kilokalorien |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |
| kPa | Kilopascal |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LSM | liver-stiffness measurement |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M. | Morbus |
| MBOAT7 | Membrane- bound O- acyltransferase domain containing protein 7 |
| MET | Metabolisches Äquivalent |
| mg | Milligramm |
| Mio. | Millionen |
| MR | Magnetresonanz |
| MRE | Magnetresonanzelastographie |
| MRS | Magnetresonanzspektometrie |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |

Abkürzungsverzeichnis III

| | |
|---------------|--|
| n | Anzahl |
| NAFL | Nicht-alkoholische Fettleber |
| NAFLD | Non-alcoholic fatty liver disease |
| NAS Score | NAFLD Activity Score |
| NASH | Nicht-alkoholische Steatohepatitis |
| NFS | NAFLD Fibrosis Score |
| P | Punkte |
| PDFF | Proton Density Fat Fraction |
| PNPLA3 | Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 |
| ppm | parts per million |
| SAF Score | Steatose, Aktivität und Fibrose Score |
| SD | Standardabweichung |
| SNP | Single-nucleotid-polymorphism |
| Tab. | Tabelle |
| TE | transiente Elastographie |
| TGF- α | Transforming growth factor alpha |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| TH1 | T-Helferzellen 1 |
| TM6SF2 | Transmembrane 6 superfamily member 2 |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TLR4 | Toll-like Rezeptor 4 |
| T1DM | Diabetes mellitus Typ I |
| T2DM | Diabetes mellitus Typ II |
| USA | United States of America |
| VCTE | vibration-controlled transient elastography |
| Vit. | Vitamin |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| γ -GT | γ -Glutamyltransferase |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der NAFLD..... | 7 |
| Abbildung 2: Studiendesign der NASH-ATI-Studie..... | 25 |
| Abbildung 3: Anwendungsprinzip des FibroScan..... | 29 |
| Abbildung 4: Beispiel für Liver-stiffness measurement (LSM) und Controlled- Attenuation-Parameter (CAP)- Messung mittels FibroScan Mini+430..... | 29 |
| Abbildung 5: Flussdiagramm zur Darstellung des Patientenkollektivs im Verlauf der Studie..... | 34 |
| Abbildung 6: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Lebersteatose in ATI-frei bzw. weizenhaltig startender Gruppe nach NAS und SAF-Score... | 39 |
| Abbildung 7: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Leberfibrose in ATI-frei bzw. weizenhaltig startender Gruppe nach SAF-Score..... | 40 |
| Abbildung 8: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von E unter ATI-freier Diät in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe | 41 |
| Abbildung 9: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von E unter weizenhaltiger Ernährung in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe..... | 42 |
| Abbildung 10: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von CAP unter ATI-freier Diät in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe..... | 44 |
| Abbildung 11: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von CAP unter weizenhaltiger Ernährung in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe..... | 45 |
| Abbildung 12: Streudiagramm zur Darstellung der Veränderung des CAP in Abhängigkeit der Veränderung der körperlichen Aktivität unter ATI-freier Diät..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 13: Streudiagramm zur Darstellung der Veränderung des CAP in Abhängigkeit der Veränderung der körperlichen Aktivität unter weizenhaltiger Diät..... | 47 |
| Abbildung 14: Boxplots zur Darstellung der Veränderung des CAP unter ATI-freier Diät unter Non-Respondern und Respondern..... | 48 |
| Abbildung 15: Boxplots zur Darstellung der Veränderung des CAP unter weizenhaltiger Diät bei Probanden ohne und mit ALT-Reduktion..... | 49 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Übersicht dreier relevanter Gene mit Einfluss auf die NAFLD..... | 8 |
| Tabelle 2: Vergleich der Grenzwerte für LSM bei TE aus (99) und (100)..... | 12 |
| Tabelle 3: Sensitivität und Spezifität der CAP-Messung in Bezug auf den Steatosegrad aus (13)..... | 13 |
| Tabelle 4: Vergleichende Darstellung des NAS und SAF-Scores nach (104) und (105).. | 15 |
| Tabelle 5: Eigenschaften der drei Gluten-assoziierten Erkrankungen aus (17)..... | 22 |
| Tabelle 6: Einschluss- und Ausschlusskriterien für Probanden der NASH-ATI Studie.... | 24 |
| Tabelle 7: Übersicht glutenhaltiger und glutenfreier Lebensmittel, die im Rahmen der Patientenschulung vorgestellt wurden..... | 31 |
| Tabelle 8: Die 10 Regeln der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) (133)..... | 32 |
| Tabelle 9: Eigenschaften des Patientenkollektivs zum Zeitpunkt V1 (Baseline)..... | 35 |
| Tabelle 10: Kovarianzanalyse zur CAP-Veränderung unter ATI-freier und weizenhaltiger Ernährung..... | 46 |
| Tabelle 11: Korrelation des CAP mit Alter und Geschlecht..... | 50 |
| Tabelle 12: Korrelation zwischen Veränderung des CAP und Veränderung von anthropometrischen Werten..... | 50 |
| Tabelle 13: Korrelation zwischen Veränderung des CAP und Veränderung von Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus..... | 51 |

1 Einleitung

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas stieg in den vergangenen Jahrzehnten global an. In Deutschland sind durchschnittlich 54% der Erwachsenen mit einem BMI $>25 \text{ kg/m}^2$ übergewichtig. Unter ihnen sind 18,1% mit einem BMI $>30 \text{ kg/m}^2$ von Adipositas betroffen (1). Somit besteht eine enorme Relevanz der Erkrankung für das Gesundheitswesen. Das gehäufte Auftreten von Übergewicht und der Folgeerkrankung Diabetes mellitus Typ II (T2DM) korreliert mit der steigenden Inzidenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease), die auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet wird (2). Ca. 24% der Weltbevölkerung sind von ihr betroffen, was die NAFLD zu einer der führenden Lebererkrankungen weltweit macht (3-5). Unter dem Begriff der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) werden die Stadien der Fettleber (NAFL), der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und der NASH-Zirrhose zusammengefasst (6, 7). In einer Fettleber kann es durch inflammatorische Prozesse zum fibrotischen Umbau des Organs kommen, bis hin zum Endstadium der Leberzirrhose (8). NAFLD-Patienten haben aufgrund ihrer Lebererkrankung und eines deutlich erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse eine gesteigerte Mortalität (9-12). Bei NASH und NASH-Zirrhose besteht zudem die Gefahr der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) (13). Da Patienten mit einer Fettleber kaum Leidensdruck verspüren und eine NASH meist nur unspezifische Symptome verursacht, wird die NAFLD oft spät erkannt und kann sich über Jahre entwickeln. Eine spezielle medikamentöse Therapie ist für die NAFLD bislang nicht zugelassen. Deshalb bilden Life-Style-Modifikationen, die mit ausreichend Bewegung und einer ausgewogenen Ernährung zur Gewichtsreduktion führen, die wichtigste Therapieoption (14).

Die weit verbreitete weizenbasierte Ernährung könnte bei Patienten mit unerkannter Weizensensitivität jedoch zur Progredienz der NAFLD führen. Ursächlich für die Weizensensitivität als dritte Gluten-assoziierte Erkrankung, sind die Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs). Sie machen neben Gluten die zweithäufigste Proteinfraktion in vielen Getreidesorten aus und sind für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems des Darms verantwortlich. Im Mausmodell konnte festgestellt werden, dass es durch die Aufnahme von ATIs nicht nur bei intestinalen, sondern auch bei extraintestinalen entzündlichen Erkrankungen zu einer klinischen Verschlechterung kommt (15-18). Es konnte ein negativer Einfluss von ATIs auf den Verlauf der experimentellen NASH und des experimentellen metabolischen Syndroms nachgewiesen werden (18, 19).

Im Rahmen unserer klinischen Studie „Einfluss einer weizenhaltigen Ernährung auf die NASH“ (Kurzform: „NASH-ATI“) sollten präklinische, tierexperimentelle und klinische Daten bestätigt werden, die eine Stimulation des angeborenen Immunsystems des Darms durch ATIs

darlegen. Zudem sollte erstmalig der Einfluss einer ATI-freien Ernährung auf die entzündliche Aktivität der Leber an NAFLD-Patienten untersucht werden. Im Verlauf der Studie wurden einige laborchemische Parameter bestimmt, darunter Leberenzyme, Entzündungsparameter und metabolische Parameter. Die Lebersteifigkeit wurde mehrfach per transienter Elastographie beurteilt, sowie der Status von Körpergewicht, körperlicher Aktivität und Lebensqualität beobachtet. Zusätzlich wurden Analysen des Tryptophanstoffwechsels und des intestinalen Mikrobioms angestrebt.

Diese medizinische Dissertation hat zum Ziel, den speziellen Einfluss einer ATI-freien Ernährung auf die Leberfibrose und die gemessenen Werte der transienten Elastographie bei Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung darzustellen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Laut den europäischen Leitlinien stellt die reine Fettleber (NAFL) das erste Stadium der NAFLD dar. Für die Diagnose einer NAFL müssen mindestens 5% der Hepatozyten von Steatose betroffen sein (6, 7). Bei der Art der Lipideinlagerung kann zwischen makrovesikulärer, mikrovesikulärer und gemischter Form der zytoplasmatischen Fettvakuolen unterschieden werden.

10-20% der Patienten mit einer NAFL entwickeln im Verlauf das Stadium einer NASH, die durch Steatose, lobuläre Inflammation und Ballonierung der Hepatozyten charakterisiert ist (7, 13). Im Falle einer NASH kommt es in weniger als 5% zu einer NASH-Zirrhose. Auf diesem Boden entwickelt sich in 1-2% ein HCC (13, 20).

Um die Diagnose der primären NAFLD stellen zu können, müssen zunächst sekundäre Ursachen ausgeschlossen werden. Diese können infektiös (HCV), genetisch, medikamentös-toxisch oder umweltbedingt sein können. Zusätzlich muss die NAFLD von einer Lebererkrankung mit alkoholischer Genese (AFLD) abgegrenzt werden. Die Grenzwerte des täglichen Alkoholkonsums liegen bei 20g für Männer und 10g für Frauen (13). Der größte Risikofaktor für die Entstehung der deutlich häufigeren primären NAFLD ist das metabolische Syndrom. Es ist definiert als kombiniertes Auftreten von arterieller Hypertonie, Dyslipidämie, erhöhtem Taillenumfang und einer erhöhten Nüchtern glukose oder T2DM. Die Diagnose kann gestellt werden, wenn drei der vier Komponenten vorliegen (21-23). Um den sozialen Alkoholkonsum der Patienten zu berücksichtigen und die metabolische Ursache der NAFLD hervorzuheben, wurde die metabolisch-assoziierte Fettlebererkrankung (MALFD) ergänzend als neuer Begriff definiert (24).

2.1.1 Epidemiologie

Parallel zur globalen Expansion von Übergewicht und Adipositas ist auch die NAFLD inzwischen von epidemischem Ausmaß. So liegen die heterogenen Angaben der Prävalenzen weltweit zwischen 14% in Afrika und 32% im mittleren Osten. Der globale Durchschnitt liegt bei 24%, in Europa sind es 23% (5). Ein Modell von *Estes et al.* prognostiziert für Deutschland bis zum Jahr 2030 einen Anstieg der NAFLD um 15% (von 18,4 auf ca. 21 Mio. Fälle), ebenso

wie einen 2,5-fachen Anstieg der NASH von 200.000 auf eine halbe Million Fälle (25). Jeder vierte Deutsche wäre demnach von der Lebererkrankung betroffen. Alter und männliches Geschlecht sind dabei als Prädiktoren der NAFLD zu werten (13). Neben den Unterschieden zwischen Industrie- und Entwicklungsländern, konnten auch ethnische Unterschiede in Bezug auf das Auftreten der NAFLD festgestellt werden. So konnte unter Hispanics die größte NAFLD-Prävalenz entdeckt werden, während sie unter Afroamerikaner, die ebenfalls in den USA leben, am niedrigsten war (5).

In den Risikogruppen von Übergewichtigen und Typ II Diabetikern ist die Prävalenz der NAFLD, im Vergleich zur Gesamtbevölkerung, deutlich erhöht. Den Zusammenhang von NAFLD und BMI konnte die *Dionysos Study* in der italienischen Allgemeinbevölkerung darstellen. Sonographisch wurde eine Prävalenz von 91% bei adipösen, 67% bei übergewichtigen und 25% bei normalgewichtigen Personen nachgewiesen (26). Im Rahmen der britischen *Edinburgh Type 2 Diabetes Study* wurde bei 43% der Patienten mit T2DM eine NAFLD per Ultraschall diagnostiziert (27). Eine Multicenter-Studie legte sogar eine Prävalenz von 60-70% bei Menschen mit T2DM dar (28).

Deutlich schwieriger ist die Datenlage speziell zur Prävalenz der NASH, da die eindeutige Diagnose bislang nur per Leberbiopsie gestellt werden kann. In Griechenland wurde bei 31,3% von insgesamt 498 post mortem biopsierten Menschen eine NAFL und bei 39,8% eine NASH festgestellt (29). In Spanien wurde bei Patienten vor geplanter Cholezystektomie zu 51,6% eine NAFL und zu 19,4% eine NASH per Biopsie nachgewiesen (30).

In einem Teil der niederländischen *The Rotterdam Study* wurde bei 5,6% der Allgemeinbevölkerung (n=3041) und 8,4% der NAFLD-Patienten (n=822) eine Leberfibrose per transientser Elastographie entdeckt (Cut off \geq 8kPa). Dabei war eine deutliche positive Korrelation zwischen den Vorerkrankungen Fettleber und T2DM und der Entwicklung einer Leberfibrose zu erkennen ($p < 0.001$) (31). Für NAFLD-Patienten mit T2DM ist ein 2,6-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer NASH beschrieben (6). Gleichzeitig haben NAFLD-Patienten mit Prädiabetes ein erhöhtes Risiko für die Manifestation eines T2DM (32). Die beiden Erkrankungen begünstigen sich gegenseitig. Adipositas steigert ebenso das Risiko für die Progredienz der NAFLD. In einer Studie unter adipösen Patienten ist eine NASH-Prävalenz von über 60% histologisch nachgewiesen worden (23).

Die NASH ist, nach der chronischen HCV-Infektion, die zweithäufigste Ursache einer Lebertransplantation in den USA und wird in den nächsten Jahren voraussichtlich zur häufigsten Ursache werden (33). Im Jahr 2001 lag in den USA der Anteil an Lebertransplantationen aufgrund einer NASH bei 1,2%, 2009 waren er bereits 9,7% (34). Es ist jedoch anzunehmen, dass die Zahlen weitaus höher liegen, da sich voraussichtlich hinter der Diagnose der kryptogenen Leberzirrhose zu > 50% eine NASH als Grunderkrankung

verbirgt (35, 36). Auch das NAFLD-assoziierte HCC hat eine steigende Prävalenz. Es machte in den USA 8,3% aller HCCs im Jahr 2002 aus, 2012 lag der Anteil bei 13,5% (37). Ca. 40% aller NASH-HCCs entwickeln sich ohne Hinweis auf eine bestehende NASH-Zirrhose. Da im Stadium einer NASH nicht flächendeckend ein HCC-Screening durchgeführt wird, werden viele Karzinome erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und sind damit seltener kurativ therapierbar, als HCCs anderer Ätiologien (38-40).

Kinder und Jugendliche werden immer öfter zu NAFLD-Patienten, da viele bereits im frühen Kindesalter an Übergewicht leiden. 1960 waren 5% der Kinder übergewichtig, 2010 waren es bereits 17% (41). Eine dänische Studie zeigte, dass übergewichtige Schulkinder ein 16% höheres Risiko für eine NAFLD im Erwachsenenalter haben als ihre normalgewichtigen Mitschüler (42). Eine weitere Studie machte deutlich, dass auch die Wahrscheinlichkeit für ein NASH-HCC 30 Jahre später bei diesen Kindern, im Vergleich zu normalgewichtigen Gleichaltrigen, um 20-30% höher ist (43).

Die häufigsten Todesursachen bei NAFLD-Patienten sind kardiovaskuläre Ereignisse, gefolgt von Leber- und Tumorerkrankungen. Bei fortgeschrittener NAFLD ist die Lebererkrankung selbst häufiger die Todesursache als bei reiner Fettleber, da die Fibrose den entscheidenden Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität darstellt (44, 45).

2.1.2 Pathogenese

Um die Entstehung und den Progress der NAFLD zu erläutern, wurden zahlreiche Theorien aufgestellt. Der „two hit“-Hypothese von *Day et al.* zufolge, ist die Ablagerung von Fett in der Leber als „first hit“ zu betrachten, welcher die Leber empfänglich macht für Inflammation und Fibrogenese als „second hit“ (46). Dieser Ansatz gilt jedoch als zu schmal, da die Entwicklung der NASH deutlich komplexer ist. Die „multiple-hit“ Hypothese von *Tilg et al.* scheint repräsentativer zu sein. Demnach spielen Umwelteinflüsse, genetische und epigenetische Faktoren eine Rolle für den Progress der NAFLD, die bei der Mehrheit der Patienten ausbleiben (47).

Ursächlich für die NAFL ist ein Überschuss an Lipiden im Körper durch fetthaltige Ernährung, Übergewicht und Insulinresistenz (48, 49). Körperzellen reagieren nicht mehr adäquat auf das Hormon Insulin und können daher keine ATP-Gewinnung per Glykolyse leisten. Um Lipide als Energiequelle zu nutzen, werden eine vermehrte Lipolyse im Fettgewebe und eine gesteigerte De-novo-Lipogenese (DNL) in der Leber induziert, sodass es zu einer Anreicherung von freien Fettsäuren in der Leber kommt (50). In einer Studie wurde besonders eine gesteigerte DNL als Lipidquelle bei NAFLD-Patienten beobachtet (51). Aufgrund der gleichzeitigen Hemmung der β -Oxidation durch die Insulinresistenz, kommt es zur Veresterung der anflutenden

Fettsäuren zu Triglyceriden und zu deren Einlagerung in die Leber. Dadurch entstehen Störungen der Insulinsignalkaskaden, was die Insulinresistenz weiter aufrechterhält (52-54). Es entsteht ein Circulus vitiosus. Ist eine β -Oxidation nicht möglich, der Lipidspeicher der Leber aber bereits gefüllt, kommt es durch Anreicherung von Lipidmetaboliten, wie freien Fettsäuren, freiem Cholesterin und Ceramiden zur sogenannten Lipotoxizität (8, 55, 56). Sie führt zu oxidativem Stress durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, zur Störung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und zur Aktivierung des Inflammasoms (57-61). Alle Vorgänge verursachen gemeinsam die hepatische Inflammation, die mit Zelldestruktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen aus den Hepatozyten einhergeht. Zusätzlich sorgt die Insulinresistenz für die Freisetzung von Adipokinen und inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-6 aus dem Fettgewebe, die ebenfalls die hepatische Inflammation begünstigen und die Insulinresistenz weiterhin aufrechterhalten (62). Somit sind die typischen Veränderung der NASH mit Steatose, lobulärer Inflammation und Ballonierung der Hepatozyten erklärbar (6, 7).

Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Entwicklung einer NAFL, über die NASH bis zur Leberfibrose.

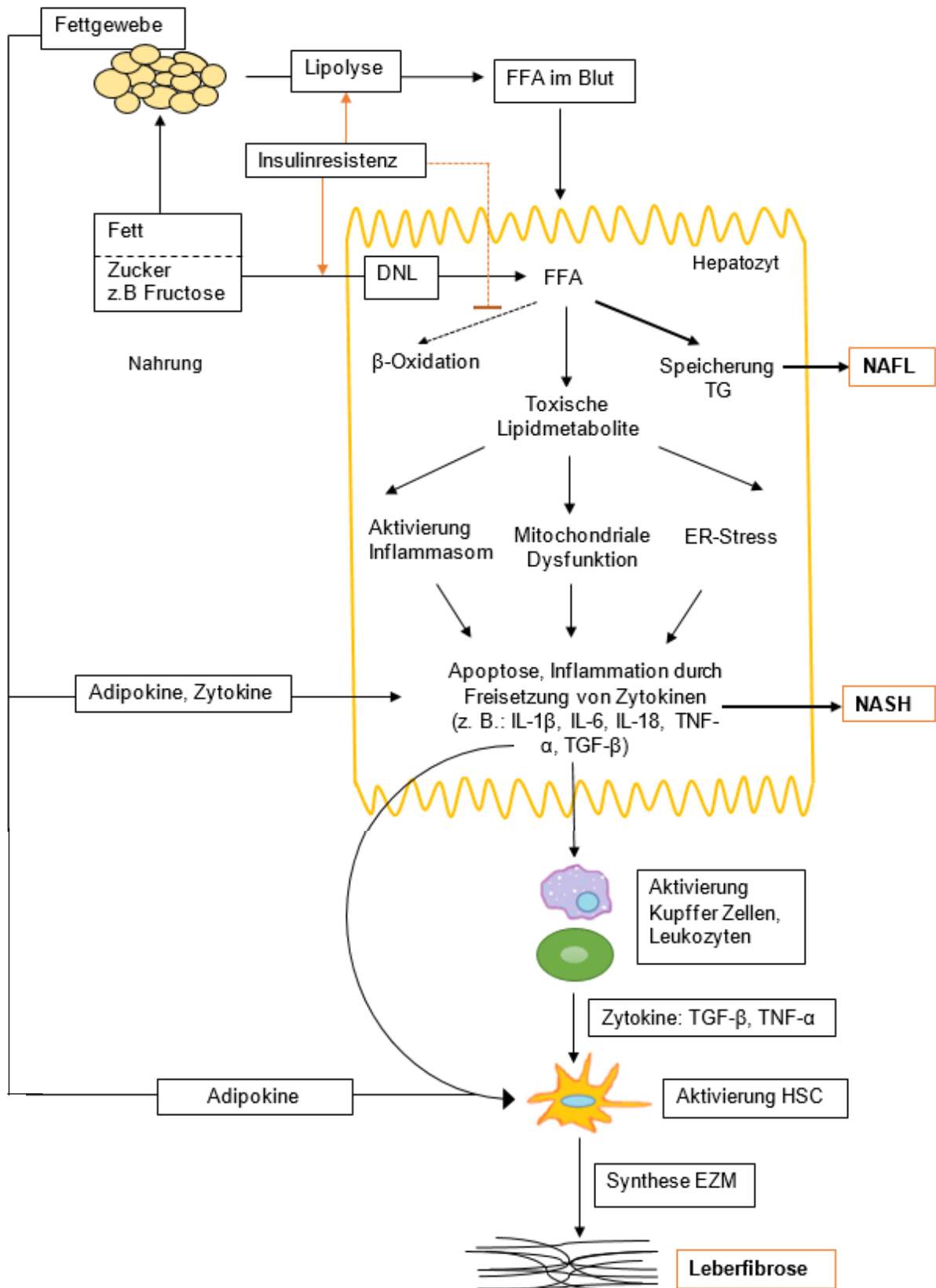


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der NAFLD, DNL= De novo Lipogenese, ER= endoplasmatisches Retikulum, EZM= Extrazelluläre Matrix, FFA= freie Fettsäuren, HSC= hepatische Sternzellen, ROS= reaktive Sauerstoffspezies, TG= Triglyceride, eigene Darstellung angelehnt an (63) und (64)

Die Leberfibrose entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von extrazellulärer Matrix. Als Hauptproduzenten gelten die hepatischen Sternzellen, die sich im Perisinusoidalraum befinden und in ihrer inaktiven Form für die Speicherung von Vitamin A zuständig sind (65, 66). Sie werden durch pro-fibrotische Zytokine aus rekrutierten Kupffer-Zellen aktiviert und synthetisieren die EZM überwiegend in Form von Kollagen (67). Das Fettgewebe beeinflusst die Aktivierung der Sternzellen über Ausschüttung von pro-fibrotisch (Leptin) oder anti-fibrotisch (Adiponektin) wirkenden Adipokinen (68).

Durch Ersatz des funktionellen Leberparenchyms mit fibrotischem Material kommt es einerseits zur Störung der hepatischen Funktion, die in einem Leberversagen münden kann, und andererseits zu erhöhter Lebersteifigkeit sowie gesteigertem Gefäßwiderstand, was eine portale Hypertension nach sich zieht (69).

Bei Fibrosierung der Leber kommt es jedoch nicht nur zur Vermehrung der EZM, sondern auch zur Veränderung ihrer Zusammensetzung. Es bilden sich vermehrt Crosslinks, wodurch die EZM an Stabilität gewinnt. Dies hat zur Folge, dass eine fortgeschrittene Fibrose bei NASH meist nicht vollständig reversibel ist (70). Bei anderen Ätiologien konnte ein deutlicher Rückgang der Fibrose nach Behandlung der Grunderkrankung beobachtet werden. Außer der NAFLD können auch die AFLD, medikamentös-toxische, biliäre oder infektiöse Erkrankungen zu progressiver Leberfibrosierung führen (65).

Neben der Funktion als Zellgerüst, ist die EZM auch Bestandteil der interzellulären Signaltransduktion, sodass es bei einer Störung zu unkontrollierter Zellproliferation und Karzinogenese kommen kann (69).

Außer den Umweltfaktoren gibt es auch Gene, deren Einfluss auf die NAFLD in genomweiten Assoziationsstudien nachgewiesen wurde. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht an relevanten Genen mit Einfluss auf die NAFLD.

Tabelle 1: Übersicht dreier relevanter Gene mit Einfluss auf die NAFLD, SNP= Single- Nucleotid-Polymorphismus, eigene Darstellung

| Gen + Variante | Effekt | Referenzen |
|--|---|-------------------|
| PNPLA3, SNP Variante I148M rs738409 | Funktionsstörung des Triglycerid- spaltenden Enzyms Adiponutrin, dadurch vermehrt Steatose und Fibrose, erhöhtes Risiko für NAFLD | (64, 71) |
| MBOAT7, SNP Loss-of-function-Mutation Variante rs641738 | erhöhtes Fibrosierisiko bei chronischer Virushepatitis, AFLD und NAFLD erhöhtes HCC-Risiko bei NAFLD ohne bestehende Zirrhose | (72) |
| TM6SF2 Loss-of-function-Mutation Variante rs58542926 | verminderte Abgabe von VLDL an die Peripherie, dadurch Steatose und nachfolgend Fibrose der Leber | (64) |

Vor allem das PNPLA-3 Gen wird mit der sogenannten „Lean NAFLD“ in Verbindung gebracht. Von dieser Form der NAFLD sind normalgewichtige Personen betroffen, besonders häufig in der asiatischen Bevölkerung (73). Es handelt sich, im Vergleich zu übergewichtigen Patienten, oft um jüngere Patienten mit geringerer Prävalenz des metabolischen Syndroms (2-48% vs. 22-64% bei Übergewichtigen). Dennoch werden bei diesen Patienten, im Vergleich zu Gleichaltrigen gleichen Geschlechts ohne NAFLD, oft eine Insulinresistenz und erhöhte Triglyceridwerte im Blut festgestellt (74-76). Als Auslöser werden neben den genetischen auch endokrine, medikamentös-toxische und ernährungsbedingte Ursachen diskutiert. Daten des *National Health and Nutrition Examination Survey III* zeigen, dass Patienten mit einer Lean NAFLD häufig einen symptomarmen Verlauf ohne erhöhte Mortalität haben (77).

Der Einfluss der Darmmikrobiota auf die Entwicklung der NAFLD ist derzeit ebenfalls Bestandteil intensiver Forschung.

Bereits bekannt ist, dass über die Darm-Leber-Achse ein reger Informationsaustausch zwischen den beiden Organen stattfindet. Als Kommunikationswege dienen der portale und systemische Kreislauf sowie die Gallenwege. Ein wichtiger Mediator sind die Gallensäuren, die mehrfach täglich im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren. Die Leber ist durch den venösen Blutstrom über die Pfortader stetig Produkten und Bestandteilen des Mikrobioms ausgesetzt. Dabei dient sie als Schutzsystem vor bakterieller Translokation und nachfolgenden Infektionen im Körperkreislauf (78).

Adipositas steht im Verdacht, die NAFLD nicht nur durch Insulinresistenz und Ausschüttung von Zytokinen und Adipokinen zu begünstigen, sondern auch durch den Einfluss auf das intestinale Mikrobiom. Sie sorgt für ein Ungleichgewicht der mikrobiellen Zusammensetzung mit verringerter Diversität, was ein pro-inflammatorisches Milieu begünstigt (79).

Zudem kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der Darmwand, wodurch die Translokation von bakteriellen Toxinen, wie Lipopolysacchariden (LPS) ermöglicht wird (80). Als Liganden des Toll-Like-Rezeptors (TLR) sind LPS in der Lage, inflammatorische Kaskaden in der Leber auszulösen. Sie stehen im Verdacht, über denselben Mechanismus die Entwicklung eines HCC zu begünstigen (81-83).

In einem tierexperimentellen Modell konnte der Zusammenhang zwischen Adipositas, NAFLD und dem Mikrobiom beobachtet werden. Keimfreie Mäuse ohne Darmmikrobiota entwickelten, trotz extrem fetthaltiger Nahrung, keine Adipositas, Fettleber oder Insulinresistenz (84). Nach Übertragung des Mikrobioms eines adipösen Artgenossen, entwickelten die bislang keimfreien Tiere ebenfalls einen adipösen Phänotyp. Das Mikrobiom einer adipösen Maus war, im Vergleich zum Mikrobiom einer normalgewichtigen Maus, durch seine Zusammensetzung in der Lage, für eine vermehrte Absorption von Fettsäuren zu sorgen (85). Somit wurde dem Körper mehr Energie zu Verfügung gestellt und die Adipositas unterhalten. Nach dem oben beschriebenen Prinzip gelang in einer weiteren Studie auch die Übertragung einer NAFLD (86).

2.1.3 Diagnostik

Bei der Diagnostik von Fettlebererkrankungen sollten zunächst eine alkoholische Genese und sekundäre Ursachen ausgeschlossen werden. Für die NAFLD stehen nicht-invasive und invasive Untersuchungsmethoden zu Verfügung. Dazu zählen blutbasierte, bildgebende und histologische Verfahren.

Ein Screening auf NAFLD in der Allgemeinbevölkerung wird nicht empfohlen. Für Hochrisikogruppen, wie adipöse Patienten und Diabetiker, kann dies in Erwägung gezogen werden (13).

2.1.3.1 Biomarker

Zu den etablierten Standardlaborparametern gehören Leberenzyme (ALT, AST, γ -GT, ChE, GLDH, AP), Thrombozyten, Albumin und Bilirubin, die als indirekte Biomarker eine initiale Einschätzung akuter Entzündungen und Lebersynthesestörungen ermöglichen (87).

Die NAFLD gilt in den USA als die häufigste Ursache von inzidentell entdeckten erhöhten Leberenzymen (13). In einer retrospektiven Studie mit 222 Teilnehmern und bioptisch gesicherter NAFLD konnte bei normwertiger Alanin-Aminotransferase (ALT) (<35 U/L) ein NASH-Anteil von 11% festgestellt werden, unter Teilnehmern mit erhöhter ALT (≥ 35 U/L) waren es 29%. Auch bei einer Verdopplung der ALT oberhalb des Grenzwertes (> 70 U/L) blieben die Sensitivität mit 50% und die Spezifität mit 61% für eine NASH niedrig. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die fortgeschrittene Fibrose (88). Da die Standardlaborparameter auch bei Progress der NAFLD normwertig oder im Rahmen einer anderen Erkrankung verändert sein können, sind sie nicht zur Erkennung einer NASH oder einer fortgeschrittenen Fibrose geeignet (87). Sie können jedoch den initialen Hinweis auf eine Leberschädigung geben, sodass diese früh entdeckt wird.

Als direkte Biomarker können Substanzen wie Hyaluronsäure und Prokollagen III (AUROC 0,8) bezeichnet werden, die für die Produktion von EZM notwendig sind und als Fibrosemarker eingesetzt werden. Ihre Kombination erhöhte die diagnostische Genauigkeit für die fortgeschrittene Leberfibrose (87).

2.1.3.2 Fibrose-Scores

Durch die Kombination von klinischen und laborchemischen Parametern sind einige Scores entwickelt worden, die für die Prädiktion der fortgeschrittenen Fibrose geeignet sind. Der NAFLD-Fibrosis Score (NFS) kombiniert die Parameter Alter, BMI, Diabetes, Thrombozyten, Albumin und AST/ALT-Ratio. Die AUROC für die fortgeschrittene Fibrose liegt bei 0,85. Aufgrund der vielfältigen Zusammensetzung ist er für den klinischen Alltag jedoch kaum geeignet.

Der Fibrosis 4 Calculator (FIB-4) besteht aus den Komponenten Alter, Lebertransaminasen, und Thrombozyten. Durch den hohen negativen, prädiktiven Wert von 95% ist er gut für den Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose geeignet und erweist sich durch die simple Zusammensetzung in der klinischen Anwendung als vorteilhaft (87).

2.1.3.3 Bildgebende Verfahren

Ein wichtiger Bestandteil der NAFLD-Diagnostik sind die bildgebenden Verfahren. Dazu zählen Ultraschall- und Magnetresonananz(MR)-basierte Bildgebungen.

Die Sonographie stellt das primäre Diagnostikum aufgrund der breiten, kostengünstigen Verfügbarkeit und fehlender Strahlungsexposition dar. Im Rahmen einer Lipideinlagerung zeigt sich eine Hyperechogenität des Leberparenchyms im Vergleich zur rechten Niere (13). Der Befund kann grob in eine milde (<33%), mäßige (33-66 %) oder schwere Steatose (>66%) eingeteilt werden (89, 90).

Da Steatosen erst ab einem Anteil von ca. 20% festgestellt werden können, ist die Aussagekraft der Sonographie limitiert (13). Eine große Metaanalyse von *Hernaez et al.*, die insgesamt 49 Studien mit 4720 Patienten einschloss, stellte bei moderater und schwerer Lebersteatose eine hohe Sensitivität der Sonographie von 85%, mit einer Spezifität von 94% fest (91). Bei geringem Verfettungsgrad oder mikrovessikulärer Verfettung ist die Sensitivität mit 40% deutlich geringer (13). Somit ist der Ausschluss einer Fettleber per Sonographie nicht sicher möglich. Zudem kann eine Differenzierung zwischen NAFL und NASH nicht erfolgen, da inflammatorische Prozesse nicht sichtbar sind und fibrotische Prozesse erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkennbar werden (23, 87). Die Sonographie ist zudem stets untersucherabhängig und hat bei adipösen Patienten eine eingeschränkte Aussagekraft (92). Trotz der genannten Einschränkungen gilt die Ultraschalluntersuchung als wichtiges Basisdiagnostikum für Patienten mit erhöhtem NAFLD- Risiko und wird in den europäischen Leitlinien als solches empfohlen (6).

Die MR- basierte Bildgebung bietet eine genauere Quantifizierung von Steatosen. Mit Hilfe der Magnetresonananzspektometrie (MRS) und der speziellen MRT-Proton Density Fat Fraction (PDFF) kann die Menge an Triglyceriden im Leberparenchym ab einem Anteil von 5% erfasst

werden (93, 94). Eine Metaanalyse von *Bohte et al.*, die insgesamt 4715 Patienten aus 46 Studien einschloss, verglich die Ergebnisse verschiedener bildgebender Verfahren mit dem histologischen Befund als Referenzmethode. In der Gruppe von Steatosen mit einem Anteil von 1-10% in der Leberbiopsie wurden eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 90% für das MRT erfasst, 88,5% und 92% für die MRS. Die MR-basierten Verfahren waren in diesem Messbereich der Sonographie und der Computertomographie (CT) überlegen (95). Als großer Vorteil ist die objektive Beurteilbarkeit, ohne Einfluss des BMI oder begleitender Lebererkrankungen, auf den Befund zu nennen (93). Die hohen Kosten der MR-basierten Verfahren sind jedoch als Einschränkung zu sehen (87, 96). Daher kommt die Technik bislang überwiegend im Rahmen von Studien zum Einsatz. Da die MRS zudem nicht auf den üblichen MR-Tomogrammen durchgeführt werden kann, ist eine schlechte Verfügbarkeit limitierend.

Die Leberfibrose kann mit den oben genannten bildgebenden Verfahren nur unzulänglich beurteilt werden. Als Maß für die Fibrose wird die Steifigkeit der Leber erfasst. Dies kann durch Ultraschall- oder MR- basierte Elastographie erfolgen.

Die vibrationskontrollierte transiente Elastographie (VCTE) beruht auf einer ultraschallbasierten Scherwelle, die mit einer Frequenz von 50 Hz über einen Schallkopf impulsartig ins Lebergewebe abgegeben wird. Durch Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwelle in der Leber kann die Steifigkeit des Organs beurteilt werden (liver-stiffness measurement, LSM). Da Bindegewebe dichter ist als Leberparenchym, kommt es bei Einlagerung von Kollagen zur Versteifung der Leber. Je stärker die Versteifung ist, umso schneller breitet sich der Impuls aus. Die Messwerte werden in Kilopascal (kPa) angegeben (97). Der Messbereich liegt zwischen 1,5 und 75 kPa, als Normbereich gelten $5,3 \pm 1,5$ kPa (98). In einer US-amerikanischen Studie konnte an 164 Patienten mit histologisch gesicherter NAFLD und einem Cut-Off Wert von 9,9 kPa die fortgeschrittene Fibrose mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 77% ermittelt werden. Die AUROC lag bei 0,93 für die fortgeschrittene Fibrose (F3) und Leberzirrhose (F4). Zusätzlich konnte bei allen Patienten mit einem Messwert $< 7,9$ kPa eine fortgeschrittene Fibrose sicher ausgeschlossen werden (99). Somit ist die TE zum Ausschluss einer relevanten Fibrose geeignet (13). Für die Differenzierung der einzelnen Fibrotestadien sind in der Literatur heterogene Angaben zu den Grenzwerten gegeben (13, 100). Tabelle 2 zeigt dazu vergleichend zwei Beispiele.

Tabelle 2: Vergleich der Grenzwerte für LSM bei TE aus (97) und (100), eigene Darstellung

| Fibrosestadium | Castera et al. (2008) | Wong et al. (2010) |
|-----------------------|------------------------------|---------------------------|
| F0/ F1 | 2,5-7,0 kPa | ≤ 7,0 kPa |
| F2 | > 7,0 kPa | > 7,0 kPa |
| F3 | > 9,5 kPa | > 8,7 kPa |
| F4 | >12,5 kPa | > 10,3 kPa |

Bei Messwerten < 7,0 kPa sind eine fehlende (F0) oder milde Fibrose (F1) zu erwarten. Diese beiden Stadien lassen sich per TE kaum voneinander unterscheiden. Oberhalb dieses Wertes wird der Befund als mäßige Fibrose (F2) eingestuft. Für eine fortgeschrittene Leberfibrose (F3) und den Übergang zu einer Leberzirrhose (F4) werden die Differenzen der angegebenen Grenzwerte größer (97, 100).

Eine erfolgreiche Messung gelingt in 95 % aller Untersuchungen, was die TE breit einsetzbar macht. Zurückzuführen ist dieses gute Ergebnis auf die Einführung der XL-Sonde, die im Vergleich zur M-Sonde eine größere Schalleindringtiefe hat und somit auch die Untersuchung an adipösen Patienten ermöglicht (101). Es ist zu beachten, dass die Messwerte per XL-Sonde bei fortgeschrittener Leberfibrose oder Zirrhose geringer ausfallen als per M-Sonde (13). Ab einem Wert von 7,9 kPa (M-Sonde) bzw. 7,2 kPa (XL-Sonde) wird eine Leberbiopsie in den deutschen Leitlinien empfohlen (13). Eine Nahrungsaufnahme vor der Untersuchung, mechanische Cholestase oder kardial bedingte Stauung der Leber können zu falsch hohen Werten führen (98).

Parallel zur LSM wird die Steatose mittels Controlled-Attenuation-Parameter (CAP) quantifiziert, der in den FibroScan integriert ist. Es wird die Schallabschwächung in dB/m gemessen. Dabei korreliert eine starke Schalldämpfung mit starker Steatose (87). In einer Metaanalyse mit sieben eingeschlossenen Studien wurden CAP-Messungen bei 1471 Studienteilnehmern mit den Befunden der Leberbiopsien verglichen und nachfolgende Sensitivitäten und Spezifitäten für die einzelnen Steatosegrade ermittelt.

Tabelle 3: Sensitivität und Spezifität der CAP-Messung in Bezug auf den Steatosegrad aus (13), eigene Darstellung

| Grad der Steatose (S) | Sensitivität (in %) | Spezifität (in %) |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1 (5-33%) | 73 | 81 |
| 2 (34-66%) | 82 | 79 |
| 3 (>66%) | 82 | 80 |

Als Cut-off- Werte gelten 302 dB/m für $S \geq 1$, 331 dB/m für $S \geq 2$ und 337 dB/m für $S \geq 3$. Die simple Handhabung und gleichzeitige Erfassung von Steatose und Fibrose machen die TE, neben der Sonographie, zu einem nützlichen Diagnostikum in der Erst- und

Verlaufsdagnostik. Durch den sicheren Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose, die den größten Risikofaktor für erhöhte Morbidität und Mortalität bei NAFLD darstellt, kann sie zu einem besseren Outcome der Patienten beitragen (13, 44, 45).

Die Magnetresonanzelastographie (MRE) ist neben der TE ein zweites Verfahren zur Bestimmung der Lebersteifigkeit und beruht ebenfalls auf der Aussendung einer mechanischen Schallwelle (87). In einer US-amerikanischen Studie erhielten 111 adipöse Patienten eine MRE. Die Ergebnisse wurden mit den histologischen Befunden der Leberbiopsien dieser Patienten verglichen. Dabei ergab sich für die fortgeschrittene Fibrose (F3) eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 91% (102). Die AUROC für die fortgeschrittene Fibrose (F3) und Zirrhose (F4) beträgt 0,95 (14). Da die MRE jedoch selten verfügbar und ebenso wie die übrigen MR-basierten Verfahren teuer ist, hat sie trotz ihrer hohen diagnostischen Genauigkeit bislang noch keinen Stellenwert im klinischen Alltag eingenommen (87).

2.1.3.4 Perkutane Leberbiopsie und Histologie

Die Leberbiopsie stellt bis heute die Referenzmethode in der Diagnostik der NAFLD dar (6, 7). Unter sterilen Bedingungen wird mit Hilfe einer Grobnadel ein Stanzzylinder aus dem rechten Leberlappen entnommen. Dabei muss sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Gewebeprobe mit mindestens acht Portalfeldern für die histologische Beurteilung gewonnen wird (103). Durch anschließende Aufarbeitung und Färbung der Gewebeprobe können die histologischen Veränderungen beurteilt werden. Eine NAFL liegt definitionsgemäß ab einer Steatose von 5% vor. Für die Diagnose einer NASH müssen zusätzlich lobuläre Inflammation und ballonierte Hepatozyten vorliegen (6, 7).

Um die Befunde quantifizieren zu können, entwickelte das *NASH Clinical Research Network* (CRN) im Jahr 2005 den semiquantitativen NAFLD Activity Score (NAS). Er sollte zur Verlaufsbeurteilung der NAFLD im Rahmen von Therapiestudien eingesetzt werden und besteht aus den Komponenten Steatose (0-3), lobuläre Inflammation (0-3) und Ballonierung der Hepatozyten (0-2). Der NAS ist die Summe dieser drei Komponenten und kann Werte von 0 bis 8 annehmen. Das Fibroestadium ist nicht Bestandteil des NAS und wird nach der NASH CRN separat bewertet (104). Eine Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen NAS und der Diagnose NASH anhand von 50 Leberbiopsien. Demnach war ein $NAS \geq 5$ mit dem Vorliegen einer NASH assoziiert, bei Werten < 3 war meist keine NASH nachweisbar. Ein NAS zwischen 3 und 4 beschrieb die Borderline Kategorie, in der eine NASH nicht auszuschließen war (104). Eine weitere Studie schloss 679 adipöse Patienten mit verwertbarer Leberbiopsie ein, unter denen die histologischen Befunde von 204 Teilnehmern mit einem NAS von 3 oder

4 eingeschätzt wurden. Aus dieser Gruppe konnte bei 43% (n=88) eine NASH nachgewiesen werden, 57% (n= 116) hatten jedoch keine NASH (105). Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft ist der NAS somit nicht zur Diagnosestellung geeignet (106).

Bedossa et al. entwickelten im Jahr 2012 den Steatosis-Activity-Fibrosis Score (SAF) zur Quantifizierung der histologischen Befunde im Rahmen der Diagnosestellung.

Die Steatose (S) wird hier ebenfalls nach den Kriterien des NASH CRN klassifiziert, wird jedoch im Gegensatz zum NAS separat von der Aktivität beurteilt. Die Aktivität (A) ist die Summe aus den Werten der lobulären Inflammation (0-2) und der Zellballonierung (0-2) und kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. In der zuletzt erwähnten Studie konnte zusätzlich eine starke Korrelation zwischen Aktivitätsgrad und NASH nachgewiesen werden. Bei 92% aller Patienten mit $A \geq 2$ wurde eine NASH korrekt diagnostiziert. Bei allen Patienten mit $A < 2$ lag keine NASH vor (105). Zudem ist das Fibrorestadium (F), im Gegensatz zum NAS, Bestandteil des SAF-Score und wird ebenfalls nach dem NASH CRN klassifiziert. Histologische Befunde mit einer Aktivität ≥ 2 und/ oder einer Fibrose ≥ 2 werden per Definition als fortgeschrittene NAFLD eingestuft.

Tabelle 4 : Vergleichende Darstellung des NAS und SAF-Scores nach (104) und (105)

| NAFLD-Activity Score (NAS) | Steatosis, Activity, Fibrosis Score (SAF) |
|--|--|
| S (Steatosis) 0: < 5 % 1: 5-33% 2: 34-66 % 3: > 66% | S (Steatosis) 0: < 5 % 1: 5-33% 2: 34-66 % 3: > 66% |
| | A (Aktivität) = lobuläre Inflammation+ Ballonierung A ₀ : A = 0: keine A ₁ : A = 1: mild A ₂ : A = 2: moderat A ₃ : A \geq 3: stark |
| Lobuläre Inflammation 0: keine 1: < 2 Foci pro 20x Feld 2: 2-4 Foci pro 20x Feld 3: > 4 Foci pro 20x Feld | Lobuläre Inflammation 0: keine 1: \leq 2 Foci pro 20x Feld 2: > 2 Foci per 20x Feld |
| Ballonierung 0: keine 1: wenig 2: zahlreich | Ballonierung 0: keine 1: wenig 2: zahlreich |
| | F (Fibrose) 0 keine 1 perisinusoidal oder periportal A mild, Zone 3, perisinusoidal B moderat, Zone 3, perisinusoidal C portal/ periportal 2 perisinusoidal und portal/periportal 3 Brückenbildung 4 Zirrhose |

Im Hinblick auf auszuschließende Differentialdiagnosen ist die Leberbiopsie den nicht-invasiven diagnostischen Mitteln überlegen. Dazu zählen autoimmune Lebererkrankungen oder Stoffwechselstörungen wie der Morbus Wilson (107). Allerdings bringt auch die Leberbiopsie Einschränkungen mit sich. Da es sich um eine invasive Methode handelt, ist sie mit einem Blutungsrisiko verbunden, wenn auch dieses bei unauffälligem Gerinnungsstatus sehr niedrig ist und die Probenentnahme meist komplikationsarm verläuft (13).

Da nur ein sehr geringer Anteil des gesamten Lebergewebes erfasst wird, kann die Diagnose auf Basis der Leberbiopsie durch einen Stichprobenfehler verfälscht sein, welcher durch die unterschiedliche Verteilung der histologischen Veränderungen zu einer Fehleinschätzung der Erkrankung führt (108). Dies betrifft zum einen die Unterscheidung zwischen NAFL und NASH, zum anderen das Ausmaß der Fibrose (13). Zusätzlich kann es zu variablen Ergebnissen bei der Begutachtung der Gewebeproben durch verschiedene Pathologen kommen (107, 109). Insgesamt sollte der Einsatz der Leberbiopsie gut abgewägt werden. Lediglich Patienten mit unklaren Befundkonstellationen oder mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine fortgeschrittene NAFLD sollten biopsiert werden (13).

2.1.4 Therapie

Die Reduktion der metabolischen Risikofaktoren gilt als Schlüssel der NAFLD-Therapie. Veränderungen des Lebensstils, die mit einer Ernährungsumstellung und vermehrter körperlicher Aktivität zu einem Gewichtsverlust und zur Reduktion der Insulinresistenz führen, gelten als Mittel der ersten Wahl (13). Wird der Progress der Insulinresistenz verlangsamt oder gänzlich unterbunden, können kardiovaskuläre Endorganschäden und die Mortalität gesenkt werden (14).

Ein systematisches Review über 23 Studien zeigte, dass eine Gewichtsreduktion von 4-14% mit einer Verringerung der Lebersteatose um 35-81% assoziiert war und gleichzeitig einen Rückgang der Insulinresistenz bewirkte (110). In einer Lifestyle-Interventionsstudie erhielten 261 Patienten sowohl zu Beginn der Studie, als auch am Ende der Intervention nach 52 Wochen eine Leberbiopsie. Es korrelierte ein Gewichtsverlust von 5% mit einer Reduktion des NAFLD-Activity Score (NAS), während ein Rückgang der Fibrose ab einer Gewichtsreduktion von 10% beobachtet werden konnte (111). In den europäischen Leitlinien wird ein tägliches Kaloriendefizit von 500 bis 1000 kcal empfohlen, um eine wöchentliche Gewichtsreduktion von 0,5 bis 1 kg zu erreichen (6, 13).

Die westliche Ernährung ist reich an Kohlenhydraten und Fetten und trägt vor allem in Form von Snacks, die zwischen den Hauptmahlzeiten eingenommen werden, entscheidend zu stammbetonter Adipositas und Lebersteatose bei. Besonders Fruktose, die in hohen Mengen

in gezuckerten Getränken als Saccharose enthalten ist, begünstigt über mehrere Effekte die NAFLD. Sie stellt Substrate für die DNL zur Verfügung, verstärkt die Insulinresistenz, wirkt durch oxidativen Stress und TNF- α Anstieg pro-inflammatorisch und ist mit vermehrter Leberfibrose assoziiert (64). Daher gibt es eine Empfehlung zum Verzicht auf stark mit Fruktose zugesetzte Lebensmittel (6, 13).

Im Gegensatz zur westlichen Ernährung ist die mediterrane Kost reich an ungesättigten Fettsäuren und basiert auf einem hohen Anteil von Obst und Gemüse, Hülsenfrüchten, Vollkornprodukten und nativem Olivenöl sowie mäßigem Fisch- und Geflügelkonsum. Im Rahmen der *PRIMED-Studie* wurde ein verringertes Risiko für die Entwicklung eines T2DM und der Rückgang eines vorbestehenden metabolischen Syndroms durch die mediterrane Diät beobachtet (112). In einer Interventionsstudie wurden ihre Effekte mit einer fettarmen/kohlenhydratreichen Diät an Patienten mit bioptisch gesicherter NAFLD verglichen. Dabei konnte eine Reduktion der Lebersteatose und eine Steigerung der Insulinsensitivität durch die mediterrane Ernährung erreicht werden (113). Sie wird in den Leitlinien der EASL für NAFLD-Patienten als geeignete Ernährungsform empfohlen (6).

Körperliche Aktivität zeigt auch unabhängig von der Gewichtsreduktion einen positiven Einfluss auf die NAFLD. Eine Studie beschrieb eine positive Korrelation zwischen der Intensität der körperlichen Aktivität und den Effekten auf NASH und Fibrose (114).

Neben den Lebensstilmodifikationen ist eine gute medikamentöse Einstellung der metabolischen Grunderkrankungen wichtig (13, 14). Da es keine zugelassenen Pharmaka für die Indikation NAFLD gibt, spielen unter anderem die Effekte von Antidiabetika eine Rolle in der NAFLD-Therapie. Da Patienten mit einer reinen Fettleber keine erhöhte leberspezifische Morbidität und Mortalität aufweisen, wird eine medikamentöse Therapie in Anbetracht der Nebenwirkungen erst ab dem Stadium einer NASH empfohlen (6, 13). Liraglutid, ein GLP-1 Analogon, zeigte in einer Phase-II-Studie über 48 Wochen im Vergleich zu Placebo eine Rückbildung der NASH ohne Progress der Fibrose (115). Im Rahmen der *PIVENS-Studie* wurden die Effekte des PPAR γ -Agonisten Pioglitazone (30mg/d) und die des antioxidativ wirkenden Vitamin E (800 IU/d) mit Placebo an 247 NASH-Patienten ohne T2DM verglichen. Beide Substanzen zeigten eine Reduktion von Steatose und lobulärer Inflammation, jedoch keinen Einfluss auf die Fibrose. Gleichzeitig wurde eine Gewichtszunahme als Nebenwirkung der Pioglitazone-Gruppe beschrieben (116). Andere Studien nannten Frakturen und Herzinsuffizienz als weitere Nebenwirkungen dieser Stoffgruppe. Die EASL gibt für Pioglitazone eine schwache Empfehlung bei NASH-Patienten mit T2DM (6).

Der Einsatz von Vitamin E bleibt umstritten. In Langzeitstudien wurde eine Steigerung der Gesamtmortalität sowie eine Häufung von Prostatakarzinomen und hämorrhagischen Schlaganfällen beschrieben. Die amerikanischen und europäischen Leitlinien geben eine schwache Empfehlung für Vitamin E bei NASH-Patienten ohne Zirrhose und T2DM, die deutschen Leitlinien haben diese Empfehlung nicht übernommen (6, 7, 13).

Als letzte Option steht die bariatrische Chirurgie für Patienten mit einem BMI ≥ 35 kg/m² und ausbleibendem Erfolg bei Lebensstilmodifikationen sowie medikamentöser Therapie zur Verfügung. Hierbei können durch eine Gewichtsreduktion positive Effekte auf die Leber erwartet werden. In einer Studie wurden NASH-Patienten nach bariatrischem Eingriff in einem 5-Jahres-Follow-up begleitet. 85% zeigten eine Rückbildung der NASH, bei 70% konnte eine Besserung der Fibrose festgestellt werden (117).

Als Ausblick in die Zukunft könnte die fäkale Mikrobiotatransplantation eine weitere Option in der NAFLD-Therapie werden. Da bereits im Tiermodell metabolische Eigenschaften durch den Transfer des Mikrobioms übertragen wurden, könnte der Ansatz auch beim Menschen genutzt werden (13, 86). Dazu fehlen jedoch bislang entsprechende Studien.

Zusätzlich zu den bereits genannten Therapieoptionen wird NAFLD-Patienten vom Rauchen gänzlich abgeraten (13, 14). Für den mäßigen Konsum von Alkohol unterhalb der kritischen Grenzwerte wird ein selteneres Auftreten von Lebersteatose, NASH und sogar Fibrose beschrieben (118).

Insgesamt haben alle Maßnahmen zum Ziel, im Stadium einer NAFL den Krankheitsprogress zu einer NASH oder einem HCC zu verhindern. Liegt eine NASH bereits vor, soll die Entwicklung einer fortgeschrittenen Fibrose oder Leberzirrhose mit entsprechenden Folgen unterbunden werden (13, 44, 45).

2.2 Getreideproteine

Getreide stellt eines der Grundnahrungsmittel in den meisten Teilen der Welt dar. Vor allem Weizen wird auf Grund seiner positiven Eigenschaften in großen Mengen gezüchtet und angebaut. Gluten ist mit einem Anteil von 80-90% das Hauptweizenprotein und besteht als Proteinkomplex überwiegend aus den beiden gleichgroßen Fraktionen Gliadin und Glutenin. Verschiedene Getreidesorten können sich in ihrer Glutenzusammensetzung unterscheiden, was die Eigenschaften des Glutens beeinflusst. Durch seine biochemische Struktur reich an kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen, spielt es als hitzestabiles Binde- und Triebmittel eine wichtige Rolle in der Nahrungsmittelindustrie. Es wird zur Verbesserung von Geschmack und Konsistenz in Fertigprodukten wie Wurstwaren, Backwaren und Süßwaren verarbeitet. Auch bei der Herstellung von Medikamenten und Kosmetika kommt es zum Einsatz. Die wichtigsten Glutenquellen sind neben Weizen die mit ihm verwandten Getreidesorten Roggen und Gerste. Allerdings ist Gluten auch in älteren Getreidesorten wie Dinkel, Emmer und Einkorn zu finden, ebenso wie in den seltener verwendeten Sorten Grünkern, Kamut und Triticale. Aufgrund der großen Beliebtheit von Getreideprodukten werden in unseren Breiten durchschnittlich 5-20g Gluten täglich pro Kopf aufgenommen (119).

Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) sind Bestandteile der Albumin-Fraktion von Weizenproteinen. Sie machen 2-4% des Gesamtproteins in modernem Weizen aus und sind fast ausschließlich in glutenhaltigen Getreiden zu finden. Die Tagesmenge an ATIs beläuft sich auf 0,5-1g. Ihre Funktion besteht in der Abwehr von Schädlingen, weshalb ihr Anteil in gezüchtetem Weizen stark gestiegen ist (16, 119). Es sind 17 ATI-Varianten bekannt, die sich in ihrer Primärstruktur unterscheiden, in der Sekundärstruktur durch Disulfidbrücken jedoch hochkonserviert und kompakt sind. Diese Eigenschaft macht sie resistent gegenüber dem Backprozess und den Verdauungsenzymen des Gastrointestinaltraktes (120, 121). Aufgrund ihrer Effekte auf das Immunsystem werden ATIs mit den Gluten-assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht.

2.3 Gluten-assoziierte Erkrankungen

Es sind drei Gluten-assoziierte Erkrankung in den internationalen Fachgesellschaften anerkannt, die sich in Pathogenese, Diagnostik und Therapie unterscheiden und deshalb differenziert werden müssen. Es handelt sich um die Zöliakie, die Weizenallergie und die Nicht-Zöliakie-Nicht-Allergie Weizensensitivität, kurz Weizensensitivität (WS) (122-124).

2.3.1 Zöliakie

Die Zöliakie ist eine entzündliche, autoimmune Dünndarmerkrankung, von der ca. 1% der Bevölkerung in Deutschland betroffen ist. Die Dunkelziffer liegt wohl weitaus höher. Sie ist von den drei Gluten-assoziierten Erkrankungen die meist erforschte Entität.

Bei der Zöliakie, auch als Glutensensitive Enteropathie bezeichnet, besteht eine Unverträglichkeit gegenüber der Gliadin-Fraktion des Glutens. Gliadin ist teilweise resistent gegen die Verdauungsenzyme von Magen und Pankreas, sodass Gliadinpeptide bis in den Dünndarm gelangen und dort aufgrund von erhöhter Mukosapermeabilität aufgenommen werden. Die in der Dünndarmwand enthaltene Gewebstransglutaminase 2 (TG2) deamidiert das Gliadin, was anschließend in genetisch prädisponierten Patienten über die MHC- Moleküle HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 auf antigenpräsentierenden Zellen zu einer T-Zell-Aktivierung führt. Durch die T-Zell-Reaktion kommt es in aktivierten Plasmazellen zur Produktion von Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase, das Endomysium und deamidiertes Gliadin. Gleichzeitig differenzieren sich CD4+- T-Zellen zu TH1-Zellen, die durch Zytokinausschüttung die Freisetzung von Matrix-Metallo-Proteinasen aus Fibroblasten anregen und es somit über

zwei Mechanismen zur Destruktion der Dünndarmmukosa kommt. Betroffene leiden jedoch oft nicht an den klassischen Symptomen der Zöliakie wie Bauchschmerzen, Diarrhöen oder Folgen der Malabsorption. Häufiger stellt sich ein atypisches Bild der Erkrankung mit extraintestinalen Symptomen wie chronischer Müdigkeit, Anämie, Infertilität, Osteoporose oder Fettleber dar. Aufgrund dieser vielfältigen Klinik und trotz guter diagnostischer Mittel, wird die Zöliakie oft nicht oder erst spät erkannt. Daraus folgt der Beinamen „Chamäleon der Gastroenterologie“.

Die Diagnose wird meist durch Nachweis der beschriebenen Antikörper und einer Dünndarmbiopsie gestellt. In dieser stellen sich ein entzündlicher Umbau der Mukosa mit Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie dar. Die derzeit einzige Therapieoption besteht für die Betroffenen in der Einhaltung einer lebenslang strikt glutenfreien Ernährung.

Des Weiteren ist die Zöliakie mit anderen Autoimmunerkrankungen wie dem T1DM, der Hashimoto-Thyreoiditis, dem M. Basedow, der Dermatitis herpetiformis Dühring und der Autoimmunhepatitis vergesellschaftet (125-127).

2.3.2 Weizenallergie

Die Weizenallergie stellt die zweite Entität der Gluten-assoziierten Erkrankungen dar. Ca. 0,4-2% der Weltbevölkerung sind von der Weizenallergie betroffen, meist Kinder, bei denen sich die Krankheit im Laufe des Lebens zurückbildet. Bei der Weizenallergie kommt es zu einer IgE-vermittelten und / oder T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen Weizenproteine, beispielsweise Gliadine, Glutenine, ATIs oder Lipid-Transferproteine. Minuten bis Stunden nach der Aufnahme von weizenhaltigen Nahrungsmitteln kommt es zu einer allergischen Reaktion, die mit Juckreiz, Schwellungen und Urtikaria an Haut und Schleimhäuten, Atemnot, Übelkeit, Erbrechen, Blähungen und Diarrhoen einhergehen kann. Als Beispiel ist das Bäckerasthma zu nennen, wo sich die allergische Reaktion an Atemwegen und Lunge manifestiert. Haut- und IgE-Serumtests sind bei der Diagnostik der Weizenallergie oft negativ. Auch hier besteht die Therapie in der Vermeidung glutenhaltiger Lebensmittel (125, 127).

2.3.3 Weizensensitivität

Die Nicht-Zöliakie-Nicht-Allergie-Weizensensitivität, kurz Weizensensitivität (WS), ist die dritte anerkannte Entität der Gluten-assoziierten Erkrankungen. In Experten-Konferenzen wurden im vergangenen Jahrzehnt Konsensusdokumente erstellt, in denen die Erkrankung definiert

wurde. Demnach liegt eine WS bei intestinalen und / oder extraintestinalen Symptomen vor, die durch glutenhaltige Ernährung verursacht werden und durch glutenfreie Ernährung Besserung zeigen, wenn Zöliakie und Weizenallergie zuvor ausgeschlossen wurden (122-124). Die Prävalenz der WS kann nur schwer eingeschätzt werden, da Patienten mit Gluten-assoziierten Beschwerden oft eigenständig eine glutenfreie Ernährung initiieren, ohne einen Arzt zu konsultieren. Der Anteil wird zwischen 0,6 und 6 % geschätzt, junge Frauen scheinen besonders häufig betroffen zu sein (128, 129).

Als Ursache für die Weizensensitivität wurden ATIs aus glutenhaltigen Getreidesorten identifiziert. Im Darm angelangt können ATIs durch die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR-4) auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen der Darmwand die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-8, CCL2) auslösen und so das angeborene Immunsystem des Darms aktivieren. Gleichzeitig scheinen sie in der Lage zu sein, neben der intestinalen Entzündungsreaktion, auch das angeborene Immunsystem in der Peripherie stimulieren zu können (z.B. in darmnahen Lymphknoten) (15, 19).

Klinisch kann sich die WS mit einem breiten Spektrum präsentieren, was die Diagnosestellung erschwert. Intestinale Symptome wie Bauchschmerzen, Blähungen, Übelkeit und Erbrechen können in Kombination mit extraintestinalen Symptomen wie Kopfschmerzen, Migräne, Depression, Anämie, chronischer Müdigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen und Kribbeln oder Taubheit der Extremitäten auftreten (16).

Klassische diagnostische Mittel wie Serumparameter, Dünndarmhistologie und Funktionsuntersuchungen des GIT zeigen oft keine, oder nur diskrete Veränderungen. Serummarker speziell für die Diagnostik der WS sollen in aktuellen Studien identifiziert werden (129). Den Salerno Kriterien zufolge, soll nach Ausschluss von Zöliakie und Weizenallergie, zunächst eine sechswöchige glutenfreie Phase folgen. Zeigt sich dabei eine klinische Besserung, soll eine doppelt verblindete, Placebo-kontrollierte Glutenexposition mit Wash-Out-Phase erfolgen. Kommt es unter glutenfreiem Placebo zu einer Besserung von mindestens 30% im Vergleich zur verblindeten Glutengabe, ist eine WS wahrscheinlich (124). Die Therapie der WS besteht aus einer glutenfreien und damit gleichzeitig ATI-freien Diät, wobei eine ATI-Reduktion von >90% als ausreichend gilt, um den Dosis-abhängigen Effekt der ATIs zu minimieren (17).

Tabelle 5 stellt einige Charakteristika der Gluten-assoziierten Erkrankungen vergleichend dar.

Tabelle 5: Eigenschaften der drei Gluten-assoziierten Erkrankungen aus (17)

| Merkmale | Zöliakie | Weizenallergie | Weizensensitivität |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Latenzzeit | Tage bis Wochen | Minuten bis Stunden | Stunden bis Tage |
| Pathogenese | T-Zell-Aktivierung | B/T-Zell-Reaktion | Angeborene Immunität |
| HLA-Abhängigkeit | HLA-DQ2,HLA DQ8 | Unbekannt | Unbekannt |
| Autoantikörper | Vorhanden | Nicht vorhanden | Nicht vorhanden |
| Enteropathie | Ausgeprägt | Gering | Gering |
| Symptome | Intestinal und extraintestinal | Intestinal und extraintestinal | Intestinal und extraintestinal |

Insgesamt wird die ATI-induzierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei gesunden Personen als mild bis moderat eingestuft, sodass es zu keinerlei Symptomen nach ATI-Aufnahme kommt. Ist jedoch eine Autoimmun-, chronisch entzündliche oder metabolische Erkrankung vorbestehend, steht die Immunantwort im Verdacht zur Exazerbation der Vorerkrankung zu führen.

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Aufnahme kalorisch irrelevanter Mengen an ATIs die Immunreaktion bei der Zöliakie verstärkt werden konnte sowie experimentelle chronisch entzündliche Darmerkrankungen und die MS einen Progress zeigten (15, 17, 124). Es wurde der sogenannte Adjuvans-Effekt der ATIs beobachtet. Demnach verstärken ATI-induzierte antigenpräsentierende Zellen (APC) zusätzlich eine T-Zell-vermittelte Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Ihre Migration aus dem Intestinum wird wahrscheinlich durch eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere ermöglicht, was gleichzeitig auch eine vermehrte Resorption von ATIs begünstigt (17, 18).

Des Weiteren wird ATIs eine direkte Wechselwirkung mit dem intestinalen Mikrobiom zugesprochen, sodass das Wachstum anti-inflammatorischer Bakterien zugunsten pro-inflammatorischer Bakterien gehemmt wird. Ein somit weiterer möglicher Mechanismus, um die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu fördern und die Darmbarriere zu stören (130).

Im speziellen Zusammenhang mit der NAFLD wurden Mäuse in einer experimentellen Studie von *Ashfaq-Khan et al.* nur fettreich oder fettreich und ATI-haltig ernährt. Die ATI-Menge war kalorisch irrelevant und entsprach der Tagesdosis eines Erwachsenen (1g). Tiere unter fettreicher/ATI-haltiger Ernährung zeigten verstärkt einige Merkmale des metabolischen Syndroms und der NASH. Es konnten erhöhte Serumtriglyzeride und Transaminasen sowie eine Verstärkung der Insulinresistenz festgestellt werden. Außerdem kam es zu einer Vermehrung des viszeralen Fettgewebes und dessen Entzündung. Ähnliches spielte sich in

der Leber ab. Hepatische Steatose, Inflammation und Fibrose wurden durch ATIs gefördert (19).

2.4 Glutenfreie Ernährung

Die glutenfreie Diät (GFD) impliziert den Verzicht auf alle glutenhaltigen Getreidesorten (Weizen, Roggen, Gerste, Dinkel, Kamut, Emmer, Einkorn, Grünkern) und deren Produkte. Als glutenfrei gelten nach dem Codex alimentarius Lebensmittel mit < 20 ppm (parts per million), was 0,002 % Gluten entspricht und auch für empfindliche Patienten als sicherer Wert gilt. Nur solche Produkte können das Label „glutenfrei“ erhalten. Da ATIs vorwiegend in glutenhaltigen Getreidesorten zu finden sind, ist eine GFD gleichzeitig ATI-frei.

Die Zöliakie ist bislang die einzige Erkrankung, bei der die GFD erfolgreich eingesetzt wird. Ca. 70% der Patienten geben nach 14 Tagen eine Besserung ihrer Symptome an. Nach 3-12 Monaten kann eine Besserung der Serologie erwartet werden, während der Mukosaschaden sich erst nach Jahren zurückbildet (125). Aber auch in Bezug auf andere Autoimmunerkrankungen wird der Nutzen einer GFD überprüft. Dazu zählen die rheumatoide Arthritis, MS, Psoriasis, T1DM und autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (Hashimoto-Thyreoiditis und M. Basedow). Allerdings erlaubt die aktuelle Datenlage keine Empfehlung einer GFD für diese Erkrankungen. Es fehlen randomisierte, kontrollierte, doppelt- verblindete Studien mit einem größeren Patientenkollektiven (131, 132).

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der NASH-ATI Studie zum Einfluss von weizenreduzierter Ernährung auf die NAFLD, wurden im Zeitraum von Februar 2019 bis September 2020 47 Probanden in der Leberambulanz der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz rekrutiert. Die Teilnehmer hatten bereits bei Studienbeginn eine bekannte NAFLD, in 45 Fällen war diese histologisch gesichert. Vor Beginn der Probandenrekrutierung wurden Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie definiert.

Tabelle 6: Einschluss- und Ausschlusskriterien für Probanden der NASH-ATI Studie

| Einschlusskriterien |
|---|
| 1) Alter: 18 bis 75 Jahre |
| 2) Histologisch gesicherte NAFL / NASH innerhalb von 3 Jahren oder Hinweis auf NAFLD im Fibroscan (E < 9,6 kPa, CAP >250 db/m), jeweils mit min. 1,2-fach erhöhter ALT: M > 60, F > 42 U/ml |
| 3) Keine Körpergewichtsänderung von >10% in den letzten 6 Monaten |
| 4) Keine neuen Medikamente zur Behandlung der Komponenten des metabolischen Syndroms in den letzten 3 Monaten |
| 5) Bei Vorliegen eines Diabetes: HbA1c Wert < 8.6% |
| 6) Fähigkeit, die Studie und die individuellen Konsequenzen einer Studienteilnahme zu verstehen |
| 7) Unterschriebene und datierte Einverständniserklärung vor Beginn jeglicher Studienaktivität |
| Ausschlusskriterien |
| 1) Instabile KHK, Schlaganfall in den letzten 6 Monaten |
| 2) Andere Lebererkrankungen |
| 3) Fortgeschrittene Fibrose (E ≥ 9.6 kPa) oder histologische Leberzirrhose |
| 4) HCC oder nicht-kurativ behandelte Karzinome |
| 5) Alkoholkonsum >10g (Frauen) und >20 g (Männer) / Tag |
| 6) Schwangerschaft |
| 7) Medikamente, die sekundär eine NASH hervorrufen (z.B. Tamoxifen, Kortikosteroide) oder Entzündung beeinflussen (TNF-Antagonisten) |
| 8) Immunologische oder entzündliche Erkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematodes) |
| 9) Marcumar-Therapie |
| 10) Durchführung einer einschränkenden, speziellen Diät |
| 11) Patienten mit Organtransplantationen |
| 12) Mangelnde oder fehlende Einwilligungsfähigkeit |

Die vor Studienbeginn durchgeführten Leberbiopsien wurden fast ausschließlich in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt und anschließend durch das pathologische Institut der Universitätsmedizin Mainz histologisch aufbereitet und durch NAS und SAF-Score bewertet.

3.2 Studiendesign

Die NASH-ATI Studie ist bei ClinicalTrials.gov unter der Kennnummer NCT04066400 registriert. Vorab gab es für das Vorhaben ein positives Votum der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz.

Der Ablauf der prospektiven, randomisierten, kontrollierten, open-label Cross-over Studie beinhaltete zunächst eine Randomisierung der Studienteilnehmer in zwei Gruppen.

Die Teilnehmer einer Gruppe ernährten sich glutenfrei mit einer Reduktion der ATI-Aufnahme auf < 5% (als ATI-frei definiert). Die zweite Gruppe ernährte sich nach den Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) und somit weizen(ATI)-haltig. Nach einer Dauer von sechs Wochen wurde das Cross-over durchgeführt und die Ernährungsform in die jeweils andere geändert. Nach weiteren sechs Wochen der jeweils anderen Ernährungsweise, begann eine 12-wöchige Follow-up Phase, in der die Studienteilnehmer ihre Ernährungsform frei wählen konnten, sodass die Studie insgesamt 24 Wochen andauerte. Die Studienteilnehmer wurden zu vier Visiten in die Leberambulanz der Universitätsmedizin Mainz eingeladen (V1, V3, V5, V6) und zweifach telefonisch kontaktiert (V2, V4). Abbildung 2 stellt den Ablauf der Studie schematisch dar.

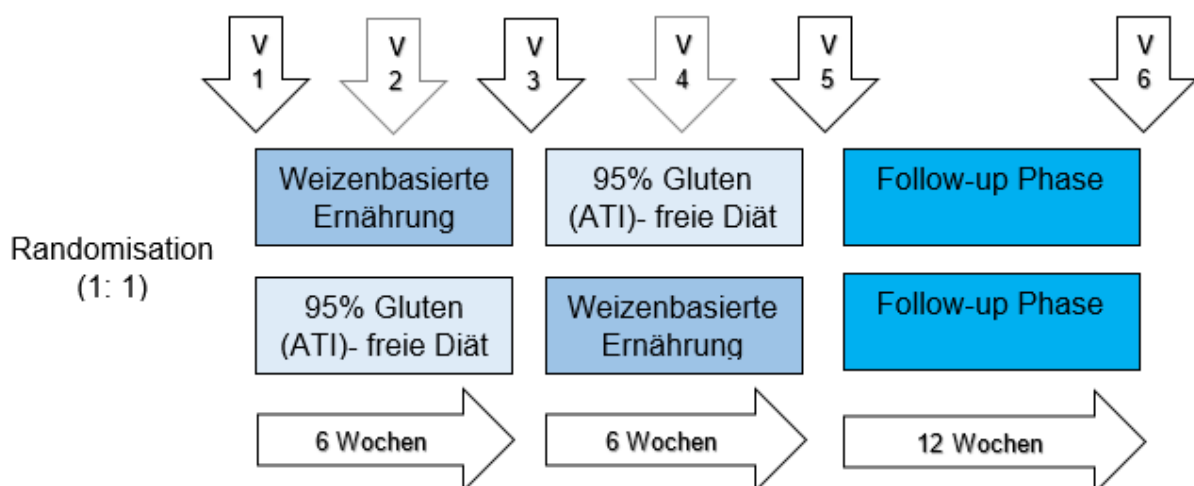


Abbildung 2: Studiendesign der NASH-ATI Studie; (V1) Baseline und Radomisierung, (V2) und (V4) telefonische Recalls, (V3) Cross-Over, (V5) End of Treatment, (V6) End of Follow-up

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Reduktion der ALT nach sechswöchiger ATI-freier Diät festgelegt. Zu den sekundären Endpunkten unter ATI-freier Ernährung gehörten positive Auswirkungen auf die TE und neue explorative Fibrosemarker, der Abfall von pro-inflammatorischen Zytokinen/ Chemokinen und Surrogatparametern der Leberfibrose im Blut, die Besserung der leberspezifischen Lebensqualität (CLDQ) und metabolischer Parameter sowie günstige Veränderungen von Tryptophan-Metaboliten im Urin und des intestinalen Mikrobioms.

3.3 Visiten

Nachdem sich die Patienten in der Leberambulanz der Universitätsmedizin Mainz mit einer Überweisung des Hausarztes angemeldet haben, erfolgte in der ersten Studienvisite (V1) eine ausführliche Aufklärung durch den Studienleiter und die Unterzeichnung der schriftlichen Einverständniserklärung zur Studienteilnahme durch Patient und Arzt. Anschließend wurde eine Erstanamnese erhoben, um Einschluss- und Ausschlusskriterien erfassen zu können. Dabei wurden die Patienten zu weiteren Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und Gewichtsveränderungen in den vergangenen sechs Monaten befragt. Außerdem wurde der Alkohol- und Nikotinkonsum, sowie eine mögliche Schwangerschaft erfragt. In den folgenden Visiten (V3, V5, V6) wurden die Erstangaben reevaluiert.

In den Behandlungsvisiten erfolgte zudem eine körperliche Untersuchung, die zur Bestimmung von Blutdruck, Puls, Körpergewicht, Körpergröße, Bauch- und Hüftumfang diente. Die Körpergröße und das Gewicht wurden am stehenden, bekleideten Patienten gemessen. Aus den Werten wurde anschließend der BMI berechnet. Blutdruck und Puls wurden in sitzender Position nach fünfminütiger Ruhepause erfasst. Der Bauchumfang wurde stehend auf Höhe des Bauchnabels gemessen, der Hüftumfang auf Höhe der Spina iliaca anterior superior. Zusätzlich erhielten die Patienten Fragebögen zu den Themen Ernährung, aktueller Gesundheitszustand, leberspezifische Lebensqualität und körperliche Aktivität. Nach der Messung der Lebersteifigkeit mittels TE folgte die Blutentnahme. Die Probanden gaben zudem eine Urinprobe aus Mittelstrahlurin in einem Urinbecher ab, um einerseits die Compliance anhand des Glutenpeptidspiegels überprüfen, und andererseits Metabolite des Entzündungsstoffwechsels (Kynurenin, Chinolinsäure) bestimmen zu können. Stuhlproben wurden in Stuhlröhrchen zum Vorstellungstermin mitgebracht, um Veränderung des intestinalen Mikrobioms analysieren zu können. Die Proben wurden anschließend bei -80°C eingefroren und im Laborgebäude 208 der Universitätsmedizin Mainz gelagert. Für alle genannten Untersuchungen sollten die Patienten nüchtern sein, definiert als mindestens sechsstündige Nahrungskarenz und zweistündige Flüssigkeitskarenz. Die Einnahme von

Medikamenten mit einer geringen Menge Wasser am Morgen des Vorstellungstermins war ausdrücklich erlaubt. Abschließend erhielten die Patienten eine Schulung, passend zu der für sie anstehenden Ernährungsform (V1, V3). Die telefonischen Recalls (V2, V4) wurden genutzt, um die Studienteilnehmer nach der Verträglichkeit und möglichen unerwünschten Ereignissen der aktuellen Ernährungsform zu befragen sowie die Compliance zu stärken. Zusätzlich wurde der Termin für die nächste Behandlungsvisite (V3, V5) vereinbart.

3.4 Fragebögen

Die Fragebögen wurden in der Wartezeit zwischen den Untersuchungen ausgefüllt. Bei Fragen oder Schwierigkeiten während der Beantwortung, stand das Studienteam jederzeit zur Verfügung. Mit Hilfe von vier Fragebögen wurden die Probanden an jedem der vier Visitermine zu den Themen Ernährung, aktueller Gesundheitszustand, leberspezifische Lebensqualität und Bewegung befragt.

Der an der Universitätsmedizin Mainz entwickelte Fragebogen „Ernährung“ hat in seiner Kurzversion in 16 Kategorien vor allem die Ernährungsgewohnheiten in Bezug auf glutenhaltige Lebensmittel erfragt (Cornflakes, Müsli, Vollkorn-, Grau-, Misch- und Weißbrot, Hamburger/Döner, Bratwurst/Currywurst, Nudeln, Reis, Couscous/Bulgur, Kartoffeln, Pommes, Pizza, Kuchen, Kekse, Salzgebäck/Cracker) (V3). Die ausführliche Version des Fragebogens hat zusätzlich Fragen zum Konsum von Obst und Gemüse, Milchprodukten, Fisch und Fleisch sowie zuckerhaltigen und alkoholhaltigen Getränken beinhaltet (V1, V5, V6). Der Fragebogen „Gesundheit“ diente der Einschätzung des aktuellen Gesundheitszustands der Probanden. In 29 Fragen wurden allgemeine Symptome wie Müdigkeit, Schlafprobleme und Konzentrationsschwierigkeiten abgefragt, aber auch Leber- und GIT-spezifische Symptome wie Bauchschmerzen, Blähungen und Veränderungen des Stuhlgangs (V1, V3, V5, V6).

Der CLDQ-D Fragebogen zur Lebensqualität bei chronischen Lebererkrankungen besteht aus 29 Items zu den Kategorien abdominale Symptome, Müdigkeit, systemische Symptome, Aktivität, emotionale Funktionen und Sorgen. Aus den angekreuzten Antwortmöglichkeiten immer(=7P), meistens(=6P), häufig(=5P), wiederholt(=4P), manchmal(=3P), selten(=2P) oder nie(=1P) wurde mit Hilfe des Auswertungsbogens ein Gesamtscore errechnet, der Werte zwischen 1 und 7 annehmen kann. Niedrige Werte gehen mit einer reduzierten leberspezifischen Lebensqualität einher, hohe Werte mit einer wenig eingeschränkten Lebensqualität. Der CLDQ ist ein bewährtes Mittel in klinischen Studien infolge hoher Validität und Reliabilität (V1, V3, V5, V6).

Der International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) ermöglicht mit 27 Fragen die Beurteilung der körperlichen Aktivität der Probanden in den letzten sieben Tagen in den Kategorien am Arbeitsplatz, zur Beförderung, bei der Hausarbeit und in der Freizeit. Ebenso wurde die im Sitzen verbrachte Zeit angegeben. Die Angaben der Studienteilnehmer (Minuten/Tage pro Aktivität) wurden je nach Anstrengungsgrad der Aktivität mit dem entsprechenden metabolischen Äquivalent (MET) multipliziert und so in MET-Minuten umgerechnet. Die körperliche Aktivität kann anschließend in die Kategorien gering (< 600 MET-Minuten/Woche), moderat (≥ 600 MET-Minuten/Woche) und hoch (≥ 3000 MET-Minuten/Woche) eingestuft werden (V1, V3, V5, V6).

Alle schriftlichen Unterlagen wurden in der Leberambulanz der Universitätsmedizin Mainz aufbewahrt.

3.5 Transiente Elastographie

Für die Durchführung der VCTE wurde der FibroScan Mini+ 430 (Echosens, Paris, Frankreich) eingesetzt. Die Patienten sollten für die Untersuchung nüchtern sein. Die Messung der Lebersteifigkeit erfolgte in Rückenlage und leichter Linksseitenlage des Patienten. Die rechte Hand wurde hinter dem Kopf verschränkt. Die Sonde wurde über dem rechten Leberlappen im Bereich des 7.-9. Interkostalraums zwischen vorderer und hinterer Axillarlinie positioniert. Für normalgewichtige Patienten wurde grundsätzlich die M-Sonde verwendet, für übergewichtige Patienten die XL-Sonde. Bei stark adipösen Patienten kann eine Messung trotz XL-Sonde erschwert sein. Bei grenzwertigem BMI (ca. 30 kg/m^2) wurde die Empfehlung des Gerätes befolgt und die entsprechende Sonde angewendet. Durch die Bedienung des Auslösers wurde die niederfrequente Scherwelle ausgesendet, die durch ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit einen Aufschluss über die Lebersteifigkeit ermöglicht. Je schneller die Ausbreitungsgeschwindigkeit (kPa), umso steifer ist die Leber.

Der vermessene Gewebsabschnitt hat eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Länge von 4 cm und ist somit um ein Vielfaches größer als eine Gewebeprobe im Rahmen der Leberbiopsie (97). Es wurde bei der Messung darauf geachtet, keine Lungenabschnitte mitzuerfassen. Dafür wurden die Patienten gebeten, während der Messung kurzzeitig die Luft anzuhalten. Es wird der Median aus mindestens 10 Messungen durch den FibroScan ermittelt. Jede Messung wird durch das Gerät als gültig oder ungültig bewertet. Es können Werte im Bereich von 1,5 bis 75 kPa gemessen werden, der Normbereich wird auf $5,3 \pm 1,5$ kPa geschätzt. Der Interquartilsabstand (interquartile range, IQR) beschreibt die Variabilität der gemessenen Werte und sollte im Median $\leq 30\%$ sein. Die Erfolgsquote als Anteil

der erfolgreichen Messungen an allen Messungen sollte > 60% betragen. Diese beiden Kriterien bestimmen die Validität der Messergebnisse und wurden im Rahmen unserer Studie zu 95% erfüllt. Parallel zur LSM erfolgte die Quantifizierung der Lebersteatose per CAP, der die Schalldämpfung erfasst (dB/m). Eine starke Schallabschwächung geht mit einer vermehrten Steatose einher.

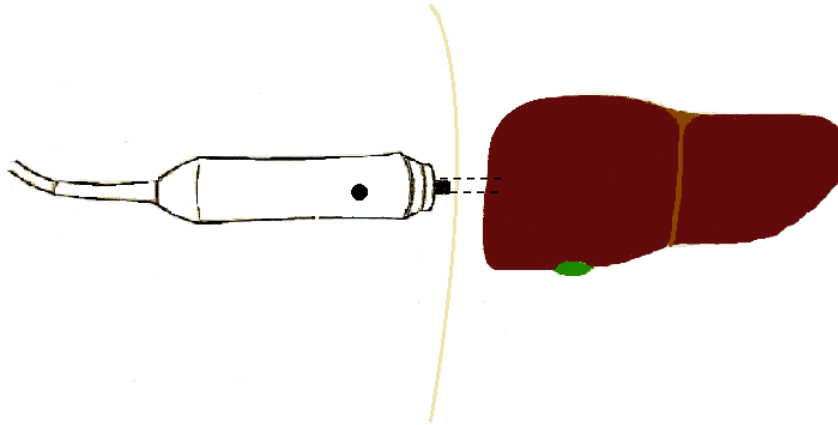


Abbildung 3: Anwendungsprinzip des FibroScan, eigene Darstellung

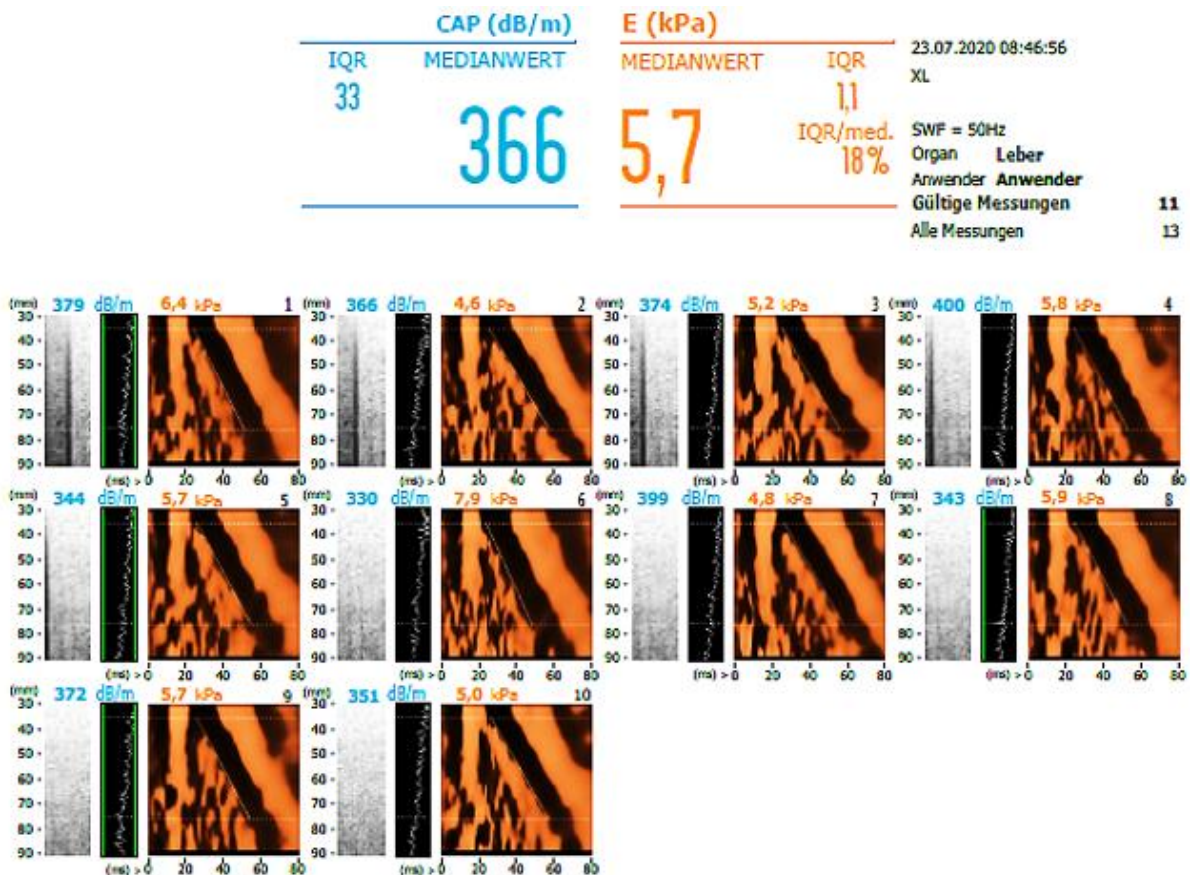


Abbildung 4: Beispiel für Liver-stiffnes measurement (LSM) und Controlled-Attenuation-Parameter (CAP)- Messung mittels FibroScan Mini +430, die dargestellte Messung wurde eigenständig im Rahmen der Studie durchgeführt

3.6 Blutentnahme und Laborwerte

Zu jeder Behandlungsvisite wurden den nüchternen Studienteilnehmern ca. 63 ml venöses Blut entnommen. Dafür wurden jeweils neun S-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet: 2x EDTA (9ml), 4x Serum-Gel (7,5 ml), 1x Lithium-Heparin (7,5 ml), 1x Tri-Natriumcitrat (4,3 ml), 1x EDTA (2,7 ml). 30ml wurden für die Bestimmung der Standardlaborparameter im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz benötigt.

Als Laborwerte wurden ein großes Blutbild erhoben sowie Elektrolyte, Kreatinin, Harnsäure, ALT, AST, γ GT, Bilirubin, AP, Albumin, Amylase, Lipase, CRP und metabolische Parameter wie HbA1c, Nüchtern glukose, Nüchterninsulin, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride bestimmt. Zusätzlich wurden IL-6 und IL-8 als Marker der ATI- induzierten Aktivierung von APC gemessen. 33ml (2x Serum-Gel-, 2x EDTA 9ml Monovetten) wurden für die Bestimmung von weiteren Zytokinen, Chemokinen, explorativen Fibrosemarkern und metabolische Analysen abgenommen und dafür ebenfalls bei -80 Grad Celsius im Laborgebäude 208 der Universitätsmedizin Mainz aufbewahrt.

3.7 Patientenschulung

Um die Studienteilnehmer bestmöglich auf die Ernährungsumstellung vorzubereiten, wurden Patientenschulungen zur entsprechenden Ernährungsform durchgeführt (V1, V3).

Anhand einer selbsterstellten PowerPoint-Präsentation (Microsoft, PowerPoint 2016) wurden geeignete Lebensmittel sowie Beispiele für entsprechende Mahlzeiten dargestellt. Zusätzlich erhielten die Teilnehmer ein Handout, um bei Fragen oder Schwierigkeiten in der Umsetzung eine verlässliche Informationsquelle zu haben.

Für die Patientenschulung zur ATI-freien Ernährung wurden die internationalen Vorgaben der Zöliakiegesellschaften beachtet. Da in der Studie keine ATI-Reduktion um 100% angestrebt wurde, waren Nahrungsmittel, die Spuren von Gluten enthalten können, z.B. Soßen, Süßigkeiten, Nüsse und Hafer, erlaubt. Diese Lebensmittel werden für Zöliakiepatienten als riskant eingestuft. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Lebensmittel, die den Probanden vorgestellt wurden.

Tabelle 7: Übersicht glutenhaltiger und glutenfreier Lebensmittel, die im Rahmen der Patientenschulung vorgestellt wurden

| Gluten (ATI-)haltig | Gluten (ATI-)frei |
|--|--|
| <p>Getreidesorten und deren Produkte</p> <ul style="list-style-type: none"> • Weizen, Roggen, Gerste, Dinkel, Grünkern, Einkorn, Emmer, Triticale, Kamut • Mehl, Schrot, Flocken, Graupen, Grieß, Kleie • Brote, auch Mais-, Reis-, Soja-, Buchweizenbrot, Backwaren • Nudeln, Kritharaki, Udon, Somen • Müsli, Cornflakes • Bulgur, Couscous | <ul style="list-style-type: none"> • Amaranth, Buchweizen, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Wildreis, Quinoa, Hülsenfrüchte, Kartoffeln, Maniokmehl, Traubenkernmehl, Kastanien, Asiatische Glasnudeln, Reissnudeln aus Reismehl • Eier, Öl, Butter, Schmalz, Essig Zucker, Marmeladen, Konfitüren Nüsse, Gewürze, Kräuter <p>Alle Produkte mit der Aufschrift „Glutenfrei“ z.B. Mehle, Brote, Backwaren, Nudeln</p> |
| <p>Fertigprodukte</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pizza, Döner, Burger, Pommes Frites, Reibekuchen, Rösti, Kroketten, Gnocchi, Schupfnudeln, Kartoffelpüree, Kuchen, Backwaren | <p>Obst und Gemüse</p> |
| <p>Müsli im Joghurt</p> | <p>Milch und Milchprodukte</p> <ul style="list-style-type: none"> • Buttermilch, Joghurt, Sahne, Quark, Käse |
| <p>Panaden</p> <ul style="list-style-type: none"> • z.B. Chicken Nuggets, Fischstäbchen, paniertes Schnitzel | <p>Fisch und Fleisch</p> |
| <p>Weizenbier</p> | <p>Getränke</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wasser, Saft, Kaffee, Tee, Wein |

Im Rahmen der Schulung wurden die Probanden darauf hingewiesen, dass glutenfreie Alternativen oft teurer sind als glutenhaltige Produkte und diese Mehrkosten von den Probanden selbst zu tragen sind. Es wurde kein Probandenhonorar gezahlt.

Zum Abschluss wurden aufgekommene Fragen durch das Studententeam beantwortet und ein Quiz durchgeführt, in dem die Schulungsteilnehmer Produkte der Kategorie glutenfrei oder glutenhaltig zuordnen sollten. Dabei wurde das vermittelte Wissen praktisch angewendet und das Verständnis gefördert sowie überprüft. In der Patientenschulung zur ausgewogenen, weizenhaltigen Ernährung wurden die 10 Regeln der DGE vorgestellt. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht.

Tabelle 8: Die 10 Regeln der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) (133)

| Die 10 Regeln der DGE |
|--|
| 1. Lebensmittelvielfalt nutzen |
| 2. Obst und Gemüse- nimm 5 am Tag |
| 3. Vollkorn wählen |
| 4. Tierische Produkte ergänzen |
| 5. Gesundheitsfördernde Fette nutzen |
| 6. Zucker und Salz einsparen |
| 7. Am besten Wasser trinken |
| 8. Schonend zubereiten |
| 9. Achtsam essen |
| 10. Auf das Gewicht achten und in Bewegung bleiben |

Die DGE empfiehlt eine abwechslungsreiche Ernährung mit täglich fünf Portionen Obst und Gemüse (400g Gemüse, 250 g Obst). Eine Portion kann täglich durch Hülsenfrüchte oder Nüsse ersetzt werden. Bei der Auswahl von Brot, Reis, Nudeln und Mehl ist die Vollkornvariante zu bevorzugen. Milch und Milchprodukte sollen täglich in den Speiseplan eingebaut werden. Fisch, Fleisch und Wurstwaren werden lediglich ein- bis zweimal pro Woche empfohlen. Gesättigte Fettsäuren, die oft versteckt in Wurst, Gebäck und Süßwaren enthalten sind, sollen gemieden werden. Als Hauptgetränk sollte Wasser gewählt werden, Tee oder selbstgemachte Limonaden können Abwechslung schaffen. Gesüßte oder alkoholische Getränke gelten nicht als Alternativen. Für die Zubereitung von Nahrungsmitteln werden pflanzliche Öle wie Sonnenblumen-, Oliven-, oder Rapsöl aufgrund ihrer ungesättigten Fettsäuren empfohlen. Die Lebensmittel sollten schonend zubereitet werden und nur so lange wie nötig gegart werden, um Nährstoffe zu erhalten.

Es sollten ausreichende Pausen für das Essen eingeplant werden, damit gut gekaut und langsam gegessen werden kann, um so geringere Mengen zu sich zu nehmen. Neben der Ernährung ist auch körperliche Aktivität wichtig. Daher sollte der Alltag aktiv gestaltet werden, zum Beispiel durch Spaziergänge oder Fahrradfahren und regelmäßig Sport getrieben werden.

3.8 Statistische Auswertung

Die probandenbezogenen Daten wurden in einer eigens für die Studie angelegten Excel-Datenbank (Microsoft Excel 2016) gespeichert. Dazu erhielt jeder Proband ein Pseudonym in der Form: ATI_XX; XX= zweistellige Zahl, fortlaufend ab 01. Die Standardlaborparameter wurden aus der Kliniksoftware SAP entnommen und übertragen. Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics, Version 23 durchgeführt. Dafür wurden die Daten aus der Excel-Datenbank in SPSS transferiert und ausgewertet.

Die statistische Beratung für diese Dissertation erfolgte durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde als Test auf Normalverteilung der Daten der Shapiro-Wilk Test durchgeführt und die Schiefe im Histogramm betrachtet.

Bei Vorliegen einer stetigen Variable wurden Mittelwert, Median, Minimum, Maximum und Standardabweichung bestimmt. Bei kategorialen Variablen wurden absolute und relative Häufigkeiten bestimmt und als Balkendiagramm dargestellt.

Zur Darstellung einer stetigen und einer kategorialen Variable wurden Boxplots gewählt. Zwei stetige Variablen wurden als Streudiagramm dargestellt. Die Linearität wurde durch die Darstellung der Regressionsgrade bestimmt.

Für die explorative Analyse wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Um den Zusammenhang zwischen zwei stetigen Variablen zu überprüfen wurde bei nicht normalverteilten Daten der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet.

Als Test auf Unterschied wurden bei nicht normalverteilten Daten nichtparametrische Tests angewendet. Bei verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test angewendet, bei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test.

Um den Einfluss einer kategorialen unabhängigen Variablen auf eine metrische abhängige Variable zu überprüfen und für den Einfluss einer Kovariate zu bereinigen, wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Bei Heteroskedastizität in den Daten wurden robuste Standardfehler angewendet.

Es erfolgte eine per-Protocol Analyse, sodass 40 Probanden mit vollständig durchlaufener 12-wöchiger Interventionsphase in die Auswertung eingeschlossen wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar 2019 bis März 2020 wurden insgesamt 64 Patienten durch das Studienteam kontaktiert, die bereits als NAFLD-Patienten in der Leberambulanz der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz vorbekannt waren. Abbildung 5 stellt das Patientenkollektiv im Verlauf der Studie dar.

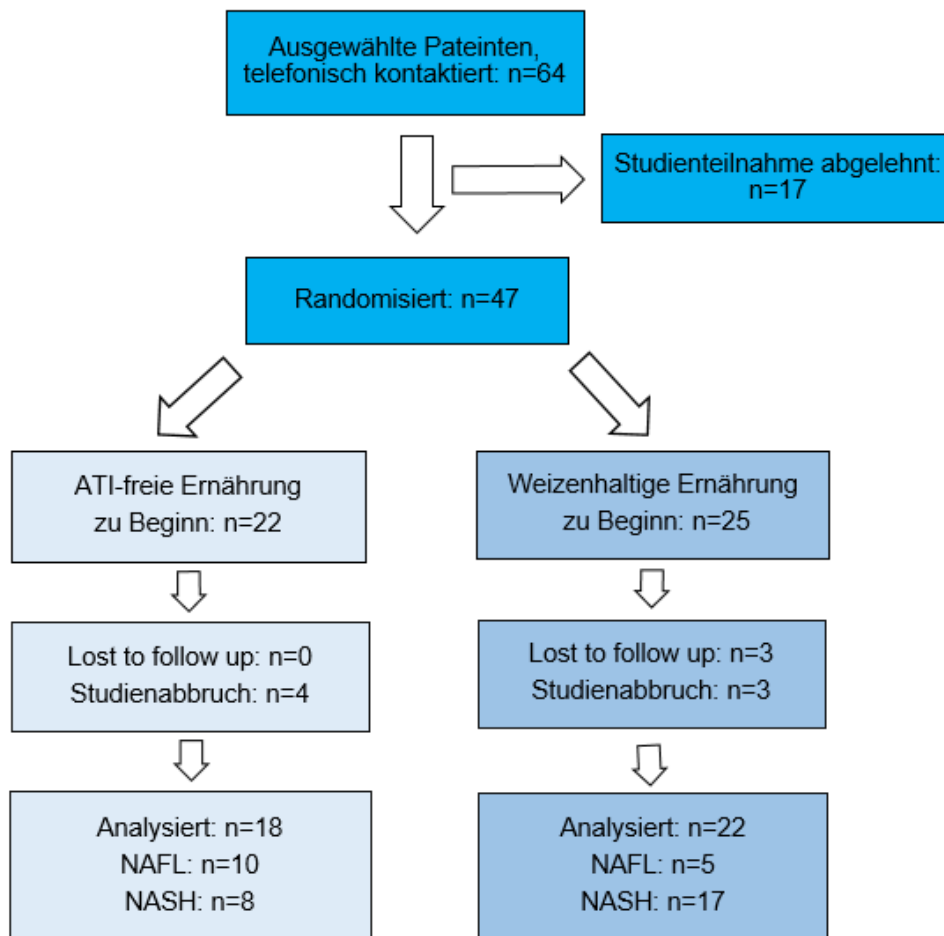


Abbildung 5: Flussdiagramm zur Darstellung des Patientenkollektivs im Verlauf der Studie

17 der 64 telefonisch kontaktierten Patienten lehnten eine Studienteilnahme ab. Alle Absagen beruhten auf fehlendem Interesse an einer Studienteilnahme oder Zeitmangel, bzw. langen Anfahrtszeiten. Demnach erfolgte bei 47 Patienten zum Zeitpunkt V1 Screening und Einschluss in die Studie. Die Randomisierung erfolgte in zwei Gruppen.

22 Studienteilnehmer starteten mit der ATI-freien Ernährung, während 25 Probanden mit der weizenhaltigen Ernährung begannen. Insgesamt brachen sieben Probanden die Studie im

Verlauf der 12-wöchigen Interventionsphase ab, vier aus der ATI-frei gestarteten Gruppe (ATI-freie-Gruppe) und drei aus der weizenhaltig gestarteten Gruppe (Weizen-Gruppe). Zudem erschienen drei Patienten der weizenhaltig gestarteten Gruppe nicht zum Follow-up Termin (V6) nach 24 Wochen.

4.1.1 Baseline-Charakteristika

Tabelle 8 zeigt die Charakteristika des Patientenkollektivs zum Zeitpunkt des Einschlusses in der ersten Studienvisite (Baseline, V1), je nach erster Ernährungsform.

Tabelle 9: Eigenschaften des Patientenkollektivs bei Einschluss zum Zeitpunkt V1, Baseline

| Parameter | ATI-frei-Gruppe | Weizen-Gruppe | p-Wert |
|---|-----------------|---------------|--------------|
| Studienteilnehmer, n | 22 | 25 | |
| Alter, Jahre (mean±SD) | 49,2 ± 10,9 | 55,3 ± 12,2 | 0,092 |
| Geschlecht, n (%) | | | 0,92 |
| Männlich | 12 (55) | 14 (56) | |
| Weiblich | 10 (45) | 11 (44) | |
| Ethnizität, n (%) | | | 0,286 |
| Kaukasisch | 21 (95) | 25 (100) | |
| Asiatisch | 1 (5) | 0 (0) | |
| Körpergewicht, kg (mean±SD) | 90,6 ± 18,7 | 99,3 ± 20,4 | 0,153 |
| Größe, cm (mean±SD) | 172 ± 10 | 171 ± 8 | 0,781 |
| Body Mass Index (mean±SD) | 30,7 ± 5,5 | 33,9 ± 6,3 | 0,068 |
| BMI-basierte Einteilung, kg/m², n (%) | | | |
| Normalgewicht (18,5-24,9) | 3 (13) | 0 (0) | |
| Übergewicht (25-29,9) | 10 (45) | 5 (20) | |
| Adipositas Grad I (30-34,9) | 5 (23) | 8 (32) | |
| Adipositas Grad II (35-39,9) | 2 (9) | 4 (16) | |
| Adipositas Grad III (>40) | 2 (9) | 8 (24) | |
| Bauchumfang, cm (mean±SD) | 105,1 ± 15,4 | 114,3 ± 14,3 | 0,02 |
| Hüftumfang, cm (mean±SD) | 108,2 ± 8,7 | 114,5 ± 12,1 | 0,071 |
| Systolischer Blutdruck, mmHg (mean±SD) | 143 ± 19 | 138 ± 19 | 0,387 |
| Diastolischer Blutdruck, mmHg (mean±SD) | 94 ± 13 | 88 ± 12 | 0,058 |
| Komorbiditäten, n (%) | | | |
| Arterielle Hypertonie | 9 (41) | 13 (52) | 0,452 |
| Hypercholesterinämie | 13 (59) | 16 (64) | 0,73 |
| Kardiovaskuläre Vorerkrankungen | 0 (0) | 5 (20) | 0,028 |
| Glukosestoffwechselstörung | | | 0,124 |
| Keine | 13 (54) | 9 (36) | |
| Prädiabetes | 6 (32) | 10 (40) | |
| T2DM | 3 (14) | 6 (24) | |

| | | | |
|---|-------------------|-------------------|--------------|
| Medikamente, n (%) | | | |
| ASS | 0 (0) | 5 (20) | 0,028 |
| Orale Antidiabetika | 3 (14) | 5 (20) | 0,82 |
| Insulin / GLP1-Agonist | 1 (5) | 3 (12) | 0,361 |
| Statine | 4 (18) | 7 (28) | 0,433 |
| Antihypertensiva | 8 (36) | 15 (60) | 0,106 |
| Antidepressiva | 3 (14) | 3 (12) | 0,867 |
| L-Thyroxin | 5 (23) | 2 (8) | 0,162 |
| Vitamine / Nahrungsergänzungsmittel | 3 (14) | 3 (12) | 0,479 |
| Leberwerte, U/L, Median (Min; Max) | | | |
| ALT | 77 (22; 458) | 58 (20; 235) | 0,272 |
| AST | 47 (19; 170) | 43 (18; 115) | 0,468 |
| γ -GT | 89 (20; 1608) | 71 (27; 671) | 0,873 |
| AP | 93 (54;184) | 84 (52; 172) | 0,947 |
| Metabolismus, Median (Min; Max) | | | |
| Nüchtern glukose,mg/dl | 95 (80, 310) | 101 (79; 226) | 0,351 |
| Nüchtern insulin, μ U/ml | 10,6 (5,3; 30,2) | 16,4 (4,7; 105,5) | 0,051 |
| HOMA-IR | 2,6 (1,1;23,1) | 3,6 (1,1;48,2) | 0,115 |
| HbA1c, % | 5,5 (4,9; 9,7) | 6,0 (4,5; 9,5) | 0,116 |
| Gesamt-Cholesterin, mg/dl | 224 (111; 310) | 214 (113; 348) | 0,949 |
| HDL-Cholesterin, mg/dl | 50 (30; 59) | 49 (36; 89) | 0,326 |
| LDL-Cholesterin, mg/dl | 134 (31; 227) | 122 (34; 273) | 0,773 |
| Triglyceride, mg/dl | 147 (21; 228) | 130 (56; 279) | 0,924 |
| Entzündung, Median (Min; Max) | | | |
| CRP, mg/l | 3 (0,4; 14) | 4 (0,1; 18) | 0,749 |
| IL-6, pg/ml | 3 (2; 12) | 4 (0; 9) | 0,369 |
| IL-8, pg/ml | 6 (0; 134,7) | 4 (0; 17,9) | 0,199 |
| Blutbild, Median (Min; Max) | | | |
| Hb, g/dl | 15,0 (11,6; 17,8) | 14,6 (12,8; 17,4) | 0,21 |
| MCV, fl | 90 (84,2; 101,2) | 89 (81,5; 96,3) | 0,379 |
| Leukozyten, $\times 10^9/l$ | 6,26 (3,63; 11,2) | 7,28 (3,57; 11,8) | 0,141 |
| Thrombozyten, /nl | 239 (141; 372) | 235 (126; 778) | 0,782 |
| NAFLD-Stadium, n (%) | | | |
| NAFL | 11 (50) | 6 (24) | 0,064 |
| NASH | 11 (50) | 19 (76) | |
| Transiente Elastographie | | | |
| E, Median (Min; Max) | 6,15 (3,7; 24,3) | 5,4 (3,7; 20,8) | 0,529 |
| CAP, Median (Min; Max) | 314 (100; 400) | 330 (207; 400) | 0,583 |
| Technical reliable, n (%) | 21 (95) | 25 (100) | 0,281 |
| IQR, Median (Min; Max) | 20 (8; 32) | 17 (6; 28) | 0,227 |
| Körperliche Aktivität, n (%) | | | |
| gering | 4 (18) | 9 (36) | 0,51 |
| moderat | 6 (27) | 3 (12) | |
| hoch | 12 (55) | 13 (52) | |

| | | | |
|---|-------------------|------------------|-------|
| Lebensqualität, Median (Min;Max) | | | 0,322 |
| CLDQ Gesamt | 5,66 (3,75; 6,82) | 5,2 (3,14; 6,75) | |

Die ATI-frei startende Gruppe bestand zu Beginn aus 12 Männer und zehn Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 42,9 Jahren. In der weizenhaltig gestarteten Gruppe waren es 14 Männer und elf Frauen mit einem höheren mittleren Alter von 55,3 Jahren. 46 Teilnehmer des Gesamtkollektivs waren kaukasischer Ethnizität, ein Proband war asiatischer Herkunft. In beiden Gruppen betrug der mittlere BMI $>30 \text{ kg/m}^2$, sodass es sich um zwei adipöse Kollektive handelt. In der Weizen-Gruppe lag der BMI mit $33,9 \text{ kg/m}^2$ höher als in der ATI-freien Gruppe mit $30,7 \text{ kg/m}^2$. Sowohl der mittlere Bauch- als auch Hüftumfang war in der Weizen-Gruppe mit 114,3 cm und 114,5 cm höher als in der ATI-freien Gruppe. Für den Bauchumfang ergab sich im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,02$). Bezüglich der Komorbiditäten lag in der ATI-freien Gruppe bei neun Probanden eine arterielle Hypertonie vor, in der Weizen-Gruppe waren es 13. Die ATI-freie Gruppe wies einen mittleren Blutdruck von 143/94 mmHg auf, was eine leichte Hypertonie bedeutet, in der Weizen-Gruppe wurden mittlere Werte von 138/88 mmHg als hoch normal eingestuft. In der ATI-freien Gruppe hatten 13 Probanden eine Hypercholesterinämie, 16 in der Weizen-Gruppe. Das Gesamt-Cholesterin war in beiden Gruppen über den Normwert von 200 mg/dl erhöht. Das LDL-Cholesterin war dagegen nur in der ATI-freien Gruppe mit 134 mg/dl erhöht. Die Triglyceride waren in beiden Gruppen normwertig. In der ATI-freien Gruppe hatten drei Probanden einen T2DM und sechs in der Weizen-Gruppe. Der HbA1c war in beiden Gruppen normwertig wobei er in der Weizen-Gruppe mit 6,0 mg/dl über dem Wert von 5,5 mg/dl in der ATI-freien Gruppe lag. Die Nüchtern glukose war mit 101 mg/dl nur in der Weizen-Gruppe erhöht. Somit waren alle drei Komorbiditäten in der Weizen-Gruppe häufiger vertreten. Mit Hinblick auf die Leberwerte konnten in beiden Gruppen erhöhte Werte der ALT, AST und γ -GT festgestellt werden. Lediglich die AP war sowohl in der ATI-freien Gruppe mit 93 U/L, als auch in der Weizen-Gruppe mit 84 U/L im Median normwertig. Bezüglich der histologischen Befunde waren NAFL und NASH in der ATI-freien Gruppe zu gleichem Anteil von je 50% vertreten. In der Weizen-Gruppe machte die NASH hingegen 76% aus. Werte der TE ergaben für die Lebersteifigkeit in der ATI-freien Gruppe 6,15kPa, in der Weizen-Gruppe 5,4kPa, womit beide Gruppen im Normbereich liegen. Der CAP als Maß der Lebersteatose war mit 314 und 330 dB/m in beiden Gruppen erhöht.

Anhand des IPAQ-Fragebogen konnte die körperliche Aktivität der Probanden quantifiziert werden. In beiden Gruppen machte die hohe körperliche Aktivität $>50\%$ aus. Der CLDQ-Fragebogen für leberbezogene Lebensqualität ergab für die ATI-freie Gruppe einen Median von 5,66 für den Gesamtwert, wonach die Lebensqualität in dieser Gruppe höher war als in der Weizen-Gruppe mit 5,2.

4.1.2 Ausgeschlossene Probanden

Bei den sieben Probanden, die die Studie abbrachen (Drop-outs), handelte es sich um vier Männer und drei Frauen. Vier Probanden gehörten zur ATI-freien Gruppe, drei zur Weizen-Gruppe. Die vier Drop-outs der ATI-freien Gruppe waren im Durchschnitt deutlich übergewichtiger (KG: 111 kg, BMI: 37,1 kg/m²) und wiesen im Median höhere Werte für E (8,1 kPa), CAP (356 dB/m) und die ALT (104 U/L) auf als die gesamte ATI-freie Gruppe. Die drei Drop-outs der Weizen-Gruppe lagen hingegen durchschnittlich unter dem Gewicht der gesamten Weizen-Gruppe (KG: 89 kg, BMI: 31,3 kg/m²) und hatten im Median niedrigere Werte für E (4 kPa) CAP (294 dB/m) und die ALT (33 U/L). Fünf Personen hatten eine histologisch nachgewiesene NASH, zwei hatten eine NAFL.

Als Gründe für den Studienabbruch gaben drei Teilnehmer gesundheitliche Gründe an (1x Infektsymptome, 1x Mamma-Karzinom, 1x keine genauere Begründung). Zwei Patienten gaben zeitliche Gründe und die lange Anreise an. Zwei weitere Patienten fühlten sich zu sehr durch die vorgegebene Ernährungsform eingeschränkt (1x ATI-frei, 1x weizenhaltig), sodass die Studieneinwilligung widerrufen wurde. Fünf Patienten erschienen nur zur ersten Studienvisite (V1). Ein Proband nahm an V1 und V3 teil, nicht aber an V5, sodass nur die ATI-freie Phase sicher durchlaufen wurde. Ein Proband verpasste das Cross-Over zu V3, sodass nicht zwei verschiedene Ernährungsformen in den 12 Wochen durchgeführt wurden. Die Drop-outs wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen, sodass die Ergebnisse von 18 Probanden aus der ATI-frei-Gruppe und 22 aus der Weizen-Gruppe in der Per-Protocol Analyse ausgewertet wurden.

4.2 Steatose und Fibrose

Vor Beginn der Studie hatten 45 der 47 eingeschlossenen Patienten eine histologisch gesicherte NAFLD. Davon wurden 21 Personen in die ATI-frei startende Gruppe randomisiert, 24 in die weizenhaltig startende Gruppe. Der Grad der Lebersteatose konnte dem NAS und SAF- Score entnommen werden. Abbildung 6 stellt die Verteilung der Steatose in den beiden Untergruppen als Balkendiagramm dar.

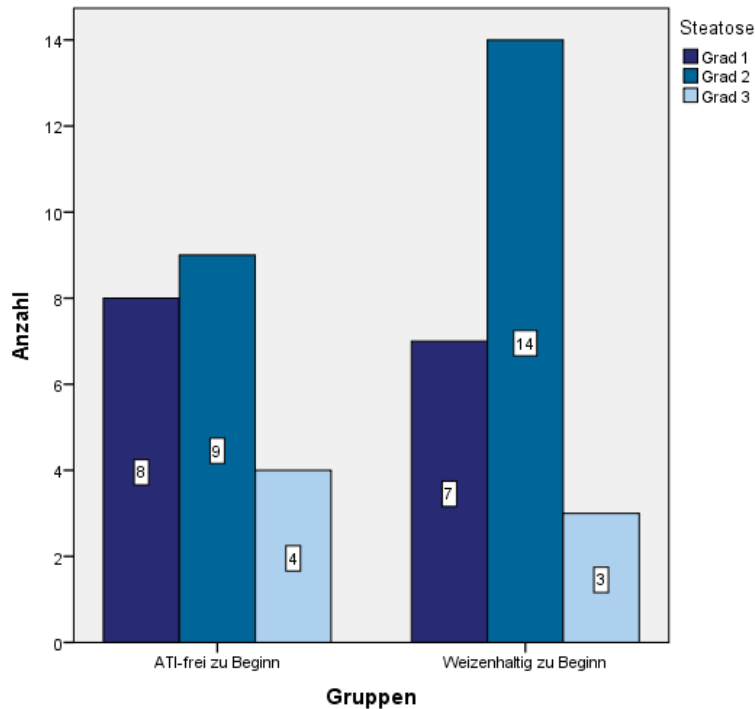


Abbildung 6: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Lebersteatose in ATI-frei bzw. weizenhaltig startender Gruppe nach NAS und SAF-Score

Demnach macht die milde Steatose (Grad 1, 5-33% Verfettung) in der ATI-frei gestarteten Gruppe 38% (n=8) aus, während es in der weizenhaltig gestarteten Gruppe 29% sind (n=7). Die mäßige Steatose (Grad 2, 34-66% Verfettung) macht als größter Anteil 43% (n=9) vs. 58% (n=14) aus. Die schwere Steatose (Grad 3, >66% Verfettung) stellt mit 19% (n=4) vs. 13% (n=3) den geringsten Anteil in beiden Untergruppen dar.

Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich bezüglich der Verteilung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($Z = -0,2$, $p = 0,841$).

Die Einschätzung der Leberfibrose konnte dem SAF-Score entnommen werden. Abbildung 7 zeigt die Verteilung in den beiden Untergruppen.

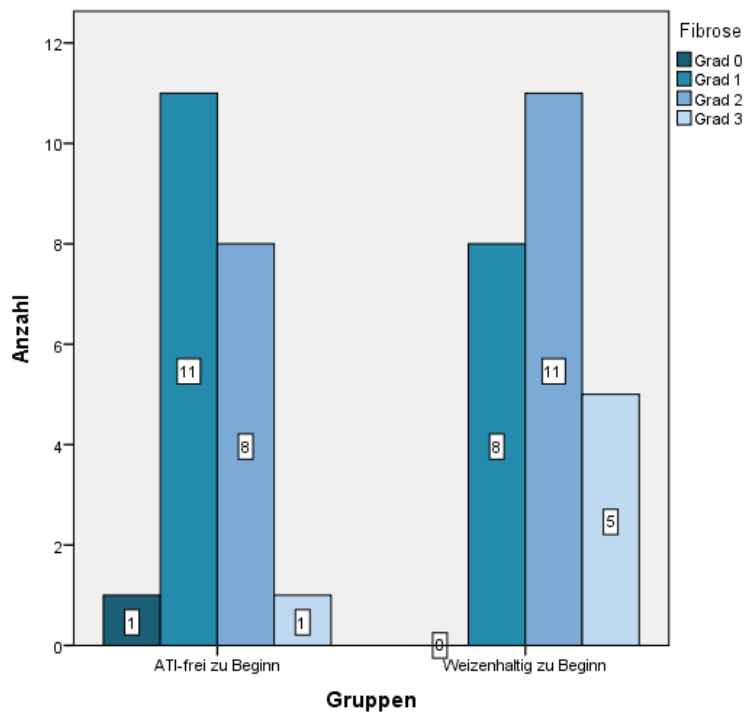


Abbildung 7: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Leberfibrose in ATI-frei bzw. weizenhaltig startender Gruppe nach SAF-Score

In der ATI-frei gestarteten Gruppe wies ein Proband keine Hinweise auf eine Fibrose (F0) auf. Die milde Fibrose (F1) machte in der ATI-freien-Gruppe 52% (n=11) aus vs. 33% (n=8) in der Weizen-Gruppe. Der Anteil der mäßigen Fibrose (F2) betrug 38% (n=8) vs. 46% (n=11). Die fortgeschrittene Fibrose (F3) wurde in 5% (n=1) vs. 21% (n=5) der Fälle festgestellt. Ein Proband der Weizen-Gruppe wurde als grenzwertig in Bezug auf die Leberzirrhose eingestuft (F3-F4). Da die Zirrhose jedoch nicht eindeutig war, wurde er hier der fortgeschrittenen Fibrose zugeteilt.

Der Mann-Whitney-U-Test ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Verteilung in den beiden Gruppen ($Z = -1,94$, $p = 0,052$).

Im nachfolgenden werden die Ergebnisse der 40 Probanden dargestellt, die in die Auswertung einbezogen wurden.

4.3 Werte der transienten Elastographie

4.3.1 Elastizität (E)

4.3.1.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz

Die Veränderungen der Lebersteifigkeit wurden mithilfe der transienten Elastographie im Verlauf der beiden Ernährungsphasen beobachtet. Abbildung 8 stellt die Veränderung von E als Maß der Lebersteifigkeit in den Untergruppen unter ATI-freier Ernährung dar.

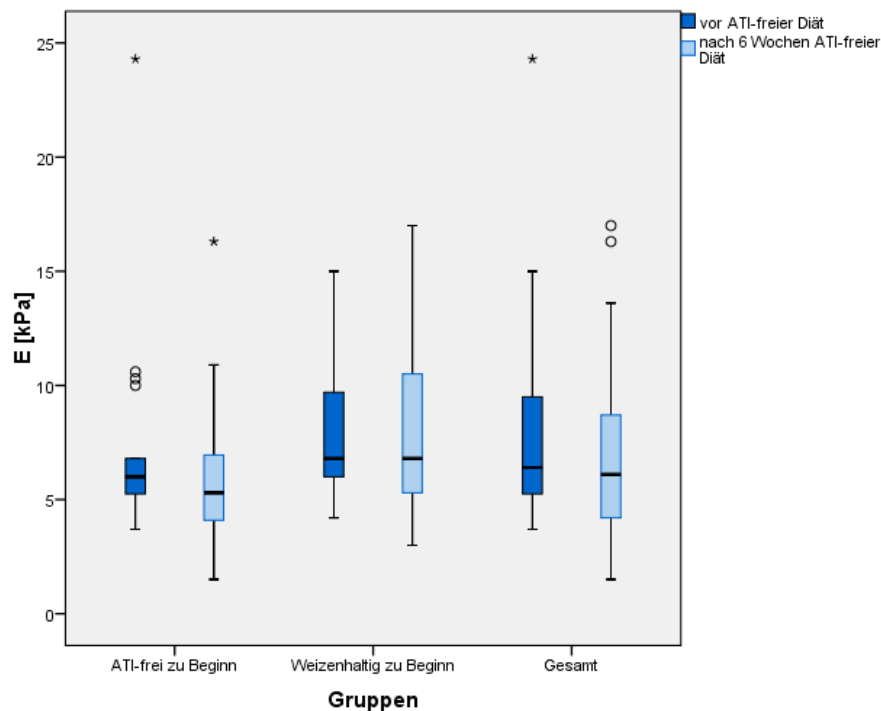


Abbildung 8: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von E unter ATI-freier Diät in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe

In der sechswöchigen ATI-freien Phase reduzierte sich der Median in der Gesamtgruppe von 6,4 auf 6,1 kPa. In der Gruppe, die sich zunächst weizenhaltig ernährte, blieb die Lebersteifigkeit konstant bei 6,8 kPa (V3 bis V5). Die ATI-frei gestartete Gruppe konnte eine Reduktion der Lebersteifigkeit von 6 auf 5,3 kPa erreichen (V1 bis V3).

Im Wilcoxon-Test zeigte sich, dass die ATI-freie Diät die E-Werte in der Gesamtgruppe im Median nicht statistisch signifikant senkte ($Z = -1,738$, $p = 0,082$).

Das gleiche Ergebnis ergab sich für die ATI-frei gestartete Untergruppe ($Z = -1,59$, $p = 0,112$).

In der weizenhaltig gestarteten Gruppe gab es keine Veränderung von E.

Abbildung 9 stellt die Veränderung von E unter weizenhaltiger Diät dar.

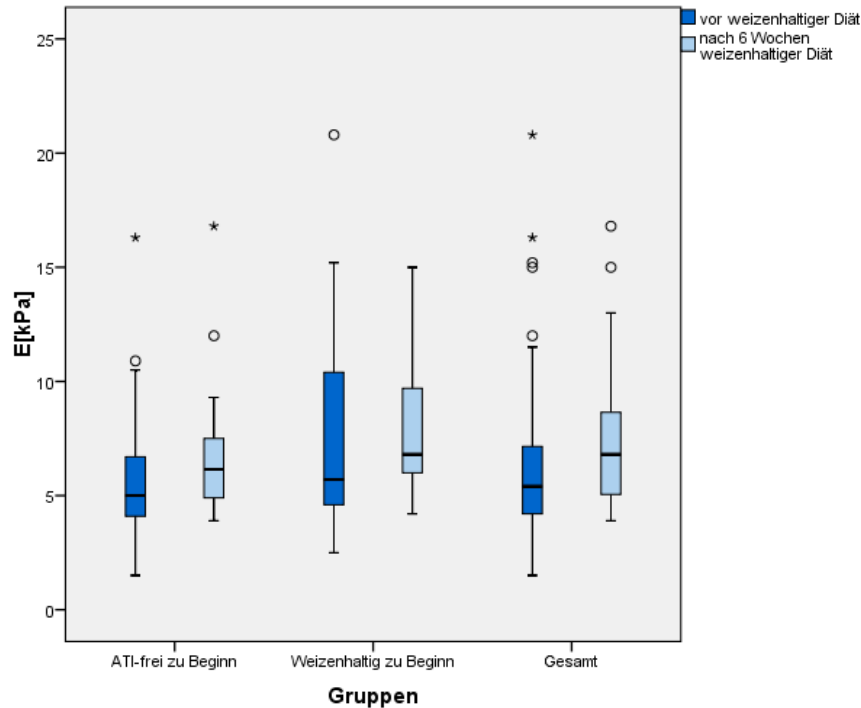


Abbildung 9: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von E unter weizenhaltiger Ernährung in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe

Unter der sechswöchigen weizenhaltigen Ernährung erhöhte sich die Lebersteifigkeit im Median von 5,4 auf 6,8 kPa in der Gesamtgruppe.

In der weizenhaltig gestarteten Gruppe wurde ein Anstieg von 5,7 auf ebenfalls 6,8 kPa gemessen (V1 bis V3). In der ATI-frei gestarteten Gruppe stieg die Lebersteifigkeit von 5 auf 6,15 kPa im Median an (V3-V5).

Im Wilcoxon-Test war der Anstieg der Lebersteifigkeit unter weizenhaltiger Diät in der Gesamtgruppe nicht statistisch signifikant ($Z = -1,741$, $p = 0,082$). Ebenso in den Untergruppen: Weizen-Gruppe ($Z = -0,635$, $p = 0,526$), ATI-freie- Gruppe ($Z = -1,263$, $p = 0,206$).

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E zwischen den beiden Ernährungsformen ($Z = -2,599$, $p = 0,009$) mit einer mittleren Effektstärke ($r = 0,29$). Demnach zeigten sich unter weizenhaltiger Ernährung signifikant höhere Werte als unter ATI-freier Diät.

4.3.1.2 in Abhängigkeit des NAFLD-Stadiums

Insgesamt hatten 15 der 40 Probanden nachweislich eine NAFL, 25 hatten eine NASH. Bei der Betrachtung der Veränderung von E unter ATI-freier Ernährung, kam es in der NAFL-Gruppe zu einer Reduktion von E im Median von 6 auf 4,2 kPa, während es in der NASH-Gruppe zu einem minimalen Anstieg von 6,75 auf 6,8 kPa kam. Unter weizenhaltiger Ernährung kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg von E, in der NAFL-Gruppe von 4,5 auf 5,9 kPa und in der NASH-Gruppe von 5,9 auf 7,4 kPa.

Im Wilcoxon-Test ergab sich unter ATI-freier Ernährung keine signifikante Veränderung von E in beiden Gruppen: NAFL ($Z = -1,079$, $p = 0,281$), NASH ($Z = -1,051$, $p = 0,293$).

Unter weizenhaltiger Ernährung zeigte sich ein ähnliches Bild: NAFL ($Z = -1,386$, $p = 0,166$), NASH ($Z = -1,445$, $p = 0,148$).

Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich für die NAFL-Gruppe kein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E unter den beiden Ernährungsformen ($Z = -1,431$, $p = 0,161$). In der NASH-Gruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E ($Z = -2,207$, $p = 0,027$). Demnach lagen die Werte der NASH-Gruppe unter weizenhaltiger Ernährung signifikant höher als unter ATI-freier Ernährung.

4.3.2 Controlled-Attenuation-Parameter (CAP)

4.3.2.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz

Die Veränderungen der Lebersteatose wurden ebenfalls mithilfe der transienten Elastographie im Verlauf der beiden Ernährungsphasen beobachtet. Abbildung 10 stellt die Veränderung von CAP als Maß der Lebersteatose in den Untergruppen unter ATI-freier Ernährung dar.

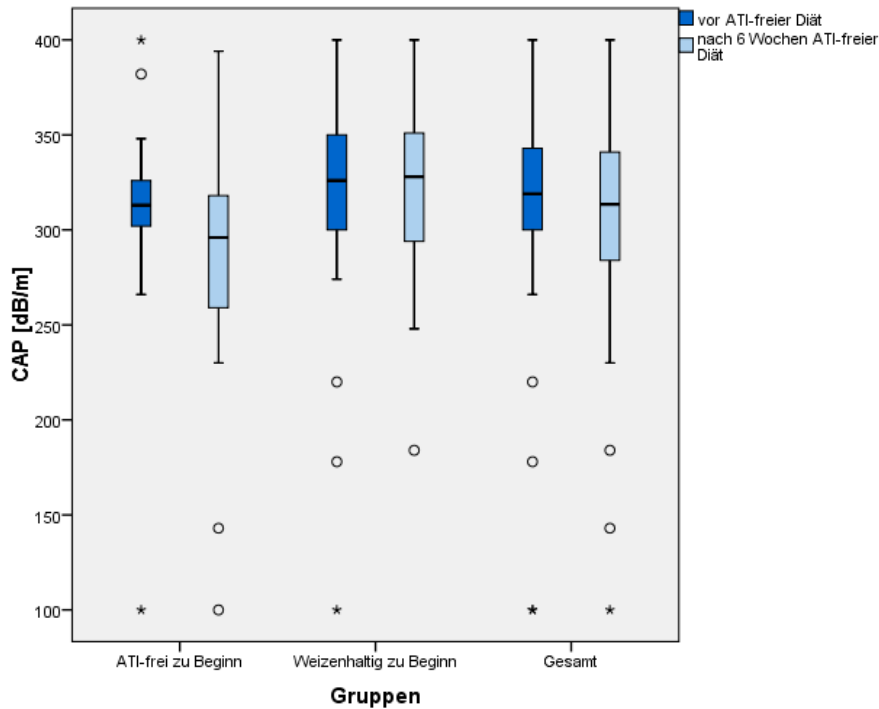


Abbildung 10: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von CAP unter ATI-freier Diät in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe

In der Gesamtgruppe reduzierte sich der CAP unter sechswöchiger ATI-freier Diät von 319 auf 313,5 dB/m. In der weizenhaltig gestarteten Gruppe kam es zu einem leichten Anstieg von 326 auf 328 dB/m (V3 bis V5), während in der ATI-freien gestarteten Gruppe eine Reduktion von 313 auf 296 dB/m gelang (V1 bis V3).

Im Wilcoxon-Test ergab es für die Gesamtgruppe unter ATI-freier Diät keine signifikante Reduktion des CAP im Median ($Z = -1,147$, $p = 0,251$). Ebenso ergab sich keine signifikante Reduktion in der ATI-frei gestarteten Untergruppe ($Z = -1,634$, $p = 0,10$) und kein signifikanter Anstieg in der weizenhaltig gestarteten Gruppe ($Z = -0,355$, $p = 0,723$).

Abbildung 11 stellt die Veränderung von CAP unter weizenhaltiger Diät dar.

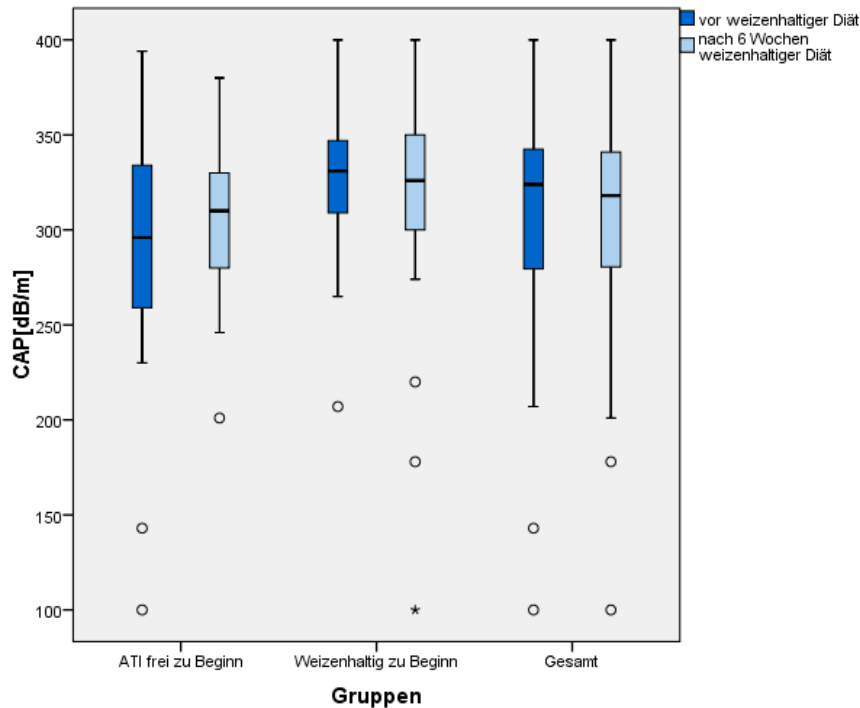


Abbildung 11: Boxplots zur Darstellung der Veränderung von CAP unter weizenhaltiger Ernährung in ATI-frei gestarteter Gruppe, weizenhaltig gestarteter Gruppe und Gesamtgruppe

Unter weizenhaltiger Ernährung konnte die Gesamtgruppe eine Reduktion von 324 auf 318 dB/m erzielen. Die weizenhaltig gestartete Gruppe zeigte eine Reduktion des medianen CAP von 331 auf 326 dB/m (V1 bis V3). Die ATI-frei-Gruppe zeigte eine einen Anstieg von 296 auf 310 dB/m (V3 bis V5).

Im Wilcoxon-Test zeigte sich für die Gesamtgruppe unter weizenhaltiger Ernährung keine signifikante Reduktion der CAP-Werte im Median ($Z=-0,399$, $p=0,69$). Für die Untergruppen ergab sich in der ATI-frei-Gruppe kein signifikanter Anstieg ($Z=-1,914$, $p=0,56$). In der Weizen-Gruppe gab es keine signifikante Reduktion ($Z= -1,269$, $p= 0,204$).

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich für die Veränderung des CAP kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ernährungsformen ($Z= -1,741$, $p= 0,082$).

In der Kovarianzanalyse wurde die Veränderung des CAP unter ATI-freier oder weizenhaltiger Ernährung untersucht, wobei für den Ausgangswert zum Zeitpunkt Baseline kontrolliert wurde. Nach Bereinigung um den Baseline-Wert ergibt sich für beide Gruppen eine Erhöhung des CAP im Mittel von Woche 6 zu Woche 12. Für die ATI-frei-Gruppe ist dies die Phase der weizenhaltigen Ernährung, wo die Zunahme stärker ist ($B= -9,974$) als in Weizen-Gruppe, die sich zu diesem Zeitpunkt in der Phase der ATI-freien Ernährung befindet ($B= -0,604$). Das Ergebnis ist jedoch nicht signifikant ($p=0,437$). Bei der Anwendung von robusten

Standardfehlern aufgrund von Heteroskedastizität in den Daten ändert sich die Signifikanz nur gering ($p=0,513$).

Tabelle 10: Kovarianzanalyse zur CAP-Veränderung unter ATI-freier und weizenhaltiger Ernährung

| Kovarianzanalyse | | | | | | |
|-------------------|-----------------|----------|-----------------------------|-------------|------------------|---------|
| Parameter | Regressions | Standard | 95% Wald-Konfidenzintervall | | Hypothesentest | |
| | koeffizient B | Fehler | Unterer Wert | Oberer Wert | Wald-Chi-Quadrat | df Sig. |
| (Konstanter Term) | -0,604 | 8,3660 | -17,001 | 15,793 | 0,005 | 1 0,942 |
| ATI-frei-Gruppe | -9,974 | 12,8302 | -35,121 | 15,172 | 0,604 | 1 0,437 |
| Weizen-Gruppe | 0 | . | . | . | . | . |
| Baseline-W6 | -0,512 | 0,0926 | -0,693 | -0,330 | 30,537 | 1 0,00 |
| (Skala) | 1464,830 | 340,566 | 928,724 | 2310,401 | | |

4.3.2.2 in Abhängigkeit der körperlichen Aktivität

Abbildung 14 stellt den Einfluss der körperlichen Aktivität, die per IPAQ erfasst wurde, auf die Veränderung des CAP unter ATI-freier Diät graphisch dar.

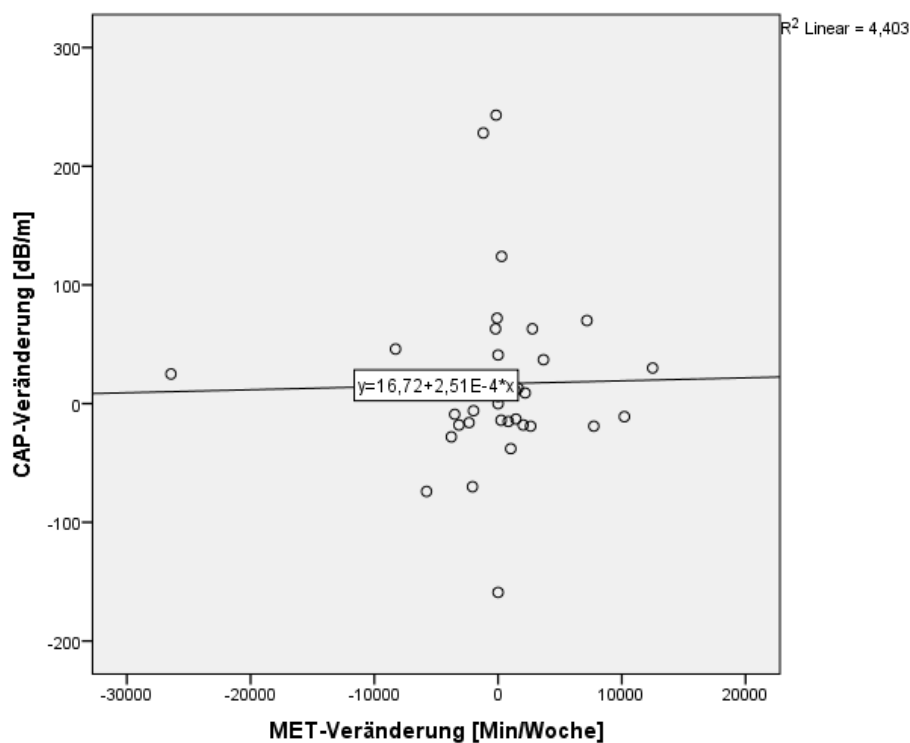


Abbildung 12: Streudiagramm zur Darstellung der Veränderung des CAP in Abhängigkeit der Veränderung der körperlichen Aktivität unter ATI-freier Diät

Anhand der Streuung der Werte und der Steigung der Regressionsgrade ist sichtbar, dass die Veränderung der körperlichen Aktivität als unabhängige Variable keinen Einfluss auf die Veränderung des CAP unter ATI-freier Ernährung nimmt. Auch in der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden stetigen Variablen ($r = 0,062$, $p = 0,712$).

Dieselbe Analyse wurde für die weizenhaltige Diät durchgeführt, wie Abbildung 13 zeigt.

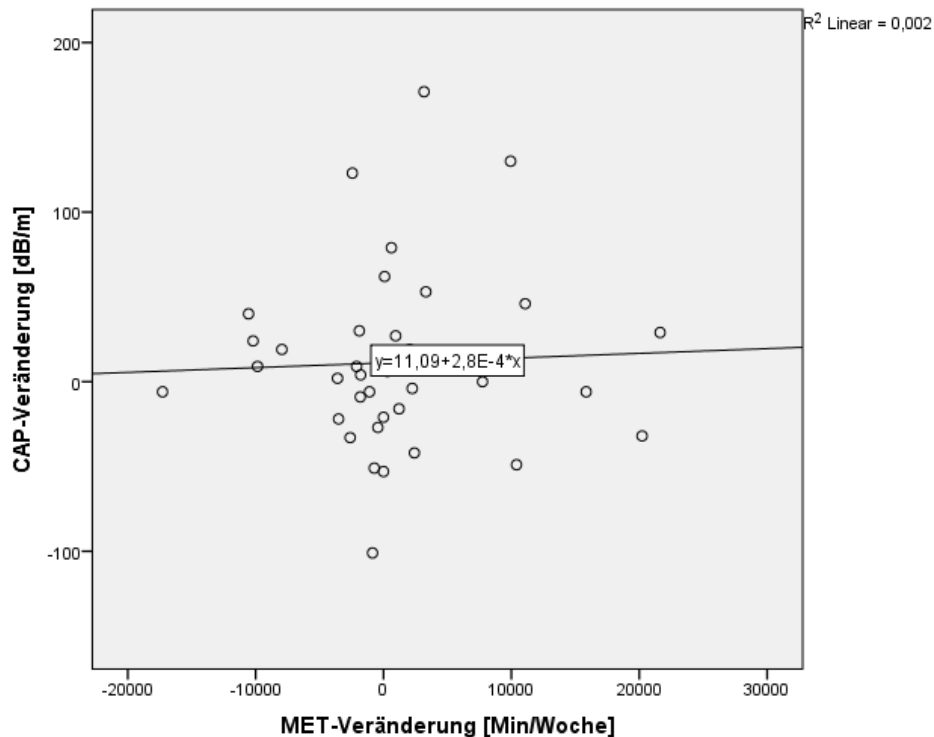


Abbildung 13: Streudiagramm zur Darstellung der Veränderung des CAP in Abhängigkeit der Veränderung der körperlichen Aktivität unter weizenhaltiger Diät

Auch hier zeigt sich kein linearer Zusammenhang im Streudiagramm. In der Korrelationsanalyse nach Spearman wurde ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung der körperlichen Aktivität und der CAP-Veränderung unter weizenhaltiger Diät entdeckt ($r = 0,09$, $p = 0,586$).

4.3.2.3 in Zusammenhang mit der ALT-Reduktion

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Reduktion der ALT nach sechswöchiger ATI-freier Diät definiert. 20 Probanden zeigten eine ALT-Reduktion und gelten somit als Responder. Elf gehörten zu der ATI-frei gestarteten Gruppe, neun zur weizenhaltig gestarteten Gruppe. Ebenfalls 20 Probanden zeigten keine ALT-Reduktion und werden somit als Non-Responder bezeichnet. Es wurde die CAP-Veränderung unter Respondern und Non-Respondern untersucht.

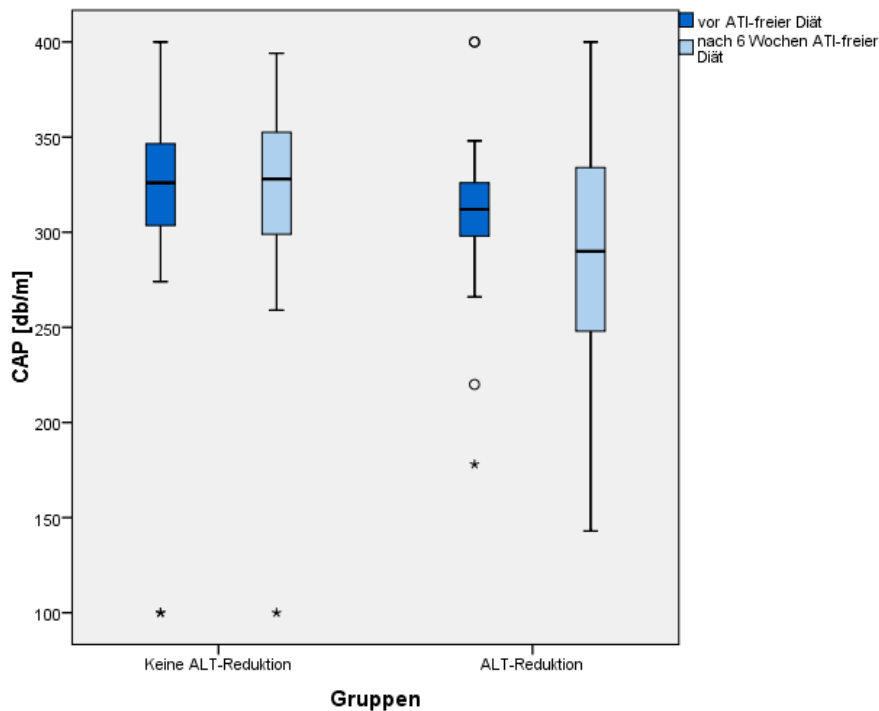


Abbildung 14: Boxplots zur Darstellung der Veränderung des CAP unter ATI-freier Diät unter Non-Respondern und Respondern

Abbildung 14 zeigt eine Erhöhung des CAP von 326 auf 328 dB/m unter den Non-Respondern, während unter den Respondern eine mediane Reduktion des CAP von 312 auf 290 dB/m gemessen werden konnte.

Im Wilcoxon-Test ergab sich für die Non-Responder kein signifikanter Anstieg ($Z = -0,221$ $p = 0,825$). Für die Responder konnte eine signifikante Reduktion verzeichnet werden ($Z = -2,036$ $p = 0,042$).

Der Unterschied der beiden Gruppen zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test jedoch als nicht signifikant ($Z = -1,748$, $p = 0,081$).

Unabhängig des primären Endpunktes haben 28 Probanden unter weizenhaltiger Diät eine ALT-Reduktion erreicht, 12 hingegen nicht.

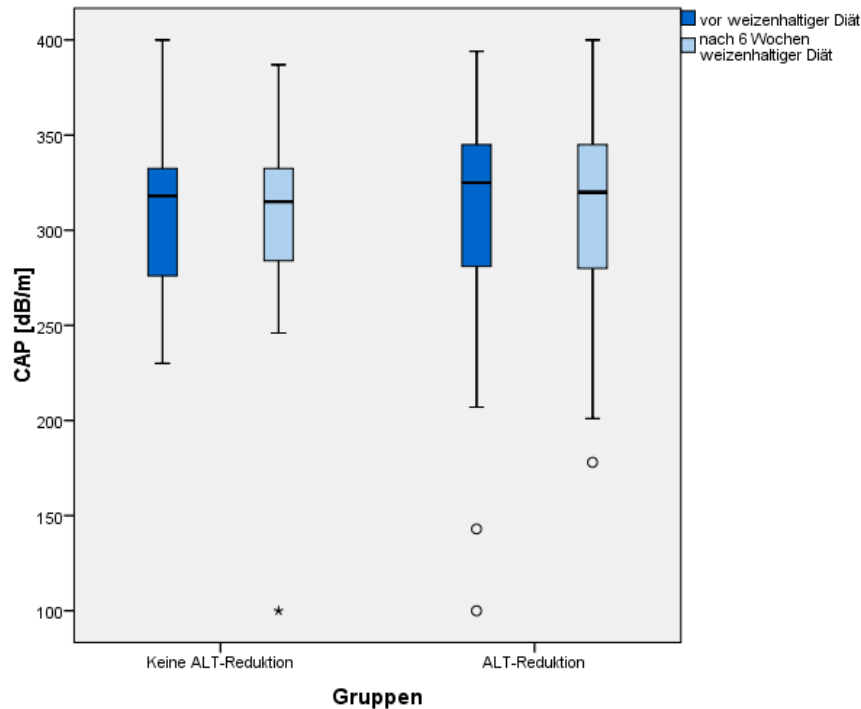


Abbildung 15: Boxplots zur Darstellung der Veränderung des CAP unter weizenhaltiger Diät bei Probanden ohne und mit ALT-Reduktion

In der Gruppe ohne ALT-Reduktion sank der CAP von 325 auf 321 dB/m. In der Gruppe mit ALT-Reduktion kam es ebenfalls zu einer Reduktion des CAP von 315,5 auf 311 dB/m. Im Wilcoxon-Test ergab sich für beide Gruppen keine signifikante Reduktion, ohne ALT-Reduktion ($Z = -0,153$, $p = 0,878$), mit ALT-Reduktion ($Z = -0,513$, $p = 0,608$).

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich im Mann-Whitney-U als nicht signifikant ($Z = -0,656$, $p = 0,512$).

Zusätzlich ergab sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman weder unter ATI-freier Diät (Responder $r = 0,307$, $p = 0,216$; Non-Responder $r = -0,081$, $p = 0,742$) noch unter weizenhaltiger Ernährung (keine ALT-Reduktion: $r = 0,191$, $p = 0,574$; ALT-Reduktion: $r = -0,131$, $p = 0,506$) ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Veränderung von CAP und ALT in den jeweiligen Gruppen.

4.3.2.4 in Zusammenhang mit Alter und Geschlecht

Da sowohl das Alter als auch das Geschlecht einen Einfluss auf CAP haben können, wurde dieser Zusammenhang untersucht.

Tabelle 10: Korrelation des CAP mit Alter und Geschlecht

| | | | Alter | Geschlecht |
|-----------|-----|-------------------------|-------|------------|
| Spearman- | CAP | Korrelationskoeffizient | 0,051 | 0,011 |
| Rho | | Sig. (2-seitig) | 0,732 | 0,941 |

In der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CAP gemessen zu V1 und dem Alter sowie dem Geschlecht der Probanden gezeigt werden.

4.3.2.5 in Zusammenhang mit anthropometrischen Werten

Übergewicht, erhöhter Hüft- und Bauchumfang gelten als metabolische Risikofaktoren und können die Lebersteatose und somit den CAP negativ beeinflussen. Daher wurde auch deren Zusammenhang mit CAP überprüft.

Tabelle 11: Korrelation zwischen Veränderung von CAP und Veränderung von anthropometrischen Werten

| | | | Gewicht | BMI | Hüftumfang | Bauchumfang | |
|--------------|--------------|-----|-------------------------|-------|------------|-------------|--------|
| Spearman-Rho | ATI-frei | CAP | Korrelationskoeffizient | 0,085 | 0,013 | 0,046 | -0,002 |
| | | | Sig. (2-seitig) | 0,619 | 0,940 | 0,797 | 0,989 |
| | Weizenhaltig | CAP | Korrelationskoeffizient | 0,173 | 0,131 | 0,051 | -0,023 |
| | | | Sig. (2-seitig) | 0,291 | 0,427 | 0,756 | 0,887 |

In der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Veränderung des CAP und der Änderung von Gewicht, BMI, Hüft- oder Bauchumfang unter ATI-freier, ebenso wie unter weizenhaltiger Ernährung, festgestellt werden.

4.3.2.6 in Zusammenhang mit Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus

Zuletzt sollte der Zusammenhang von Glukose- und Lipidwerten mit dem CAP überprüft werden, da auch diese bei Erhöhung als metabolische Risikofaktoren den CAP negativ beeinflussen können.

Tabelle 12: Korrelation zwischen Veränderung des CAP und Veränderung von Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus

| Ernährung | | | Nüchtern | | | Gesamt- | |
|-------------------|-----|-------------------------|----------|-------|--------------|-------------|-------|
| | | | -glukose | HbA1c | Triglyceride | Cholesterin | LDL |
| Spearman ATI-frei | CAP | Korrelationskoeffizient | 0,095 | 0,198 | 0,063 | 0,146 | 0,287 |
| | | Sig. (2-seitig) | 0,577 | 0,240 | 0,713 | 0,390 | 0,086 |
| Weizenhaltig | CAP | Korrelationskoeffizient | 0,293 | 0,055 | -0,009 | 0,057 | 0,200 |
| | | Sig. (2-seitig) | 0,078 | 0,739 | 0,954 | 0,732 | 0,222 |

In der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Veränderung des CAP und der Änderung von Nüchternglukose, HbA1c, Triglycerid- und Cholesterinwerten unter ATI-freier, ebenso wie unter weizenhaltiger Ernährung festgestellt werden.

5 Diskussion

Im Hinblick auf die global ansteigende Inzidenz der NAFLD und eine fehlende spezielle medikamentöse Therapie, stellen Life-Style-Modifikationen, wie Veränderung der Ernährungsgewohnheiten und vermehrte körperliche Aktivität, die wichtigsten Therapieoptionen dar (14). Der Vermeidung von weizenbasierter Kost könnte dabei eine besondere Rolle zukommen. In tierexperimentellen und präklinischen Studien wurden Amylase-Trypsin-Inhibitoren als Auslöser der Weizensensitivität beschrieben.

Die Getreideproteine sind in der Lage, die Aktivierung des angeborenen Immunsystem des Darms zu verursachen, führen aber auch bei extraintestinalen entzündlichen Erkrankungen, wie der NASH, zu einer klinischen Verschlechterung (15-19).

Daher sollte im Rahmen unserer klinischen Studie erstmalig der Einfluss einer sechswöchigen ATI-freien Ernährung durch die Vermeidung glutenhaltiger Lebensmittel an NAFLD-Patienten untersucht werden. In der Kontrollphase ernährten sich die Probanden weizenhaltig nach den Vorgaben der DGE, sodass im Cross-over Design jeder Proband beide Ernährungsphasen durchlief. Besonders der Einfluss der ATI-freien Ernährung auf die Leberfibrose und die Werte der transienten Elastographie sollten dargestellt werden. Da es bisher keine vergleichbaren klinischen Studien gibt, werden im folgenden auch präklinische und tierexperimentelle Studien diskutiert.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Folgende Aussagen lassen sich aus dem Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit ableiten:

1. Unter ATI- freier Diät zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E im Vergleich zur weizenhaltigen Diät, allerdings in dieser Studie in einem Wertebereich ohne klinische Relevanz.
2. Sowohl unter ATI-freier als auch unter weizenhaltiger Ernährung kam es zu einer Reduktion von CAP, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Ernährungsformen.
3. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des CAP sowie Alter und Geschlecht der Probanden.
4. Die Reduktion der Körpermaße und der Metabolismusparameter korrelierte nicht signifikant mit der Reduktion von CAP.

5.2 Vor- und Nachteile des Studiendesigns

Das Cross-over Studiendesign bietet den Vorteil einer Minimierung des Confounding-Risikos, da jeder Patient als seine eigene Kontrolle fungiert und gleichzeitig eine Erhöhung der statistischen Power erreicht werden kann (134).

Obwohl andere Ernährungsstudien zur NAFLD eine Wash-Out-Phase zwischen den Interventionen einhielten, wurde in dieser explorativen Pilotstudie kein Carry-Over-Effekt vermutet und daher die Wash-out-Phase ausgelassen (113, 135). Die Dauer der Ernährungsphasen beruhte auf Empirie, da es bislang keine vergleichbaren Studien gibt. Den Salerno Kriterien zufolge soll bei einem Verdacht auf Weizensensitivität der Glutenexposition eine sechswöchige glutenfreie Phase voraus gehen, sodass mögliche positive Effekte in dieser Zeitspanne feststellbar sein könnten (124). Auch die Auswahl der Fallzahlen beruhte auf Empirie. Das die Daten Tendenzen zeigen, aber selten Signifikanz, könnte auf eine zu geringe Zahl an Studienteilnehmern zurückzuführen sein. Die vorab geschätzte Drop-out Rate lag bei 15%, die tatsächliche Rate bei 17,5%.

Durch Randomisierung der Probanden in eine der beiden Ernährungsgruppen zu Beginn der Studie ist eine homogene Verteilung in Bezug auf demographische Variablen und viele anthropometrische Werte gelungen. Zudem wurden Körpergröße, Gewicht, Hüft- und Bauchumfang überwiegend durch dieselbe Person gemessen, sodass die Messvariabilität verringert wurde. Dies gilt auch für die Durchführung der TE, wobei durch erschwerte Messbedingungen bei Adipositas Messfehler in den Daten nicht ausgeschlossen sind.

Da das Screening der Patienten und der Einschluss in die Studie zum selben Zeitpunkt erfolgten (Baseline, V1), wurden nicht alle Einschluss- und Ausschlusskriterien eingehalten. So wurden Patienten eingeschlossen, deren ALT sich nicht als mindestens 1,2-fach erhöht herausstellte, der HbA1c über dem definierten Grenzwert von 8,6% lag oder Werte der Lebersteifigkeit > 9,6 kPa betrug. Alternativ hätte ein Screening-Termin vor Studienbeginn mit den Patienten vereinbart werden können, was jedoch den Zeitaufwand von vier Beobachtungsvisiten und zwei telefonischen Recalls für die Probanden weiter gesteigert hätte. Die Studie wurde ohne die Begleitung einer Ernährungsassistenz durchgeführt. Gute Sprachkenntnisse waren besonders wichtig für das selbstständige Ausfüllen der Fragebögen, das Verständnis in den Patientenschulungen und die Auseinandersetzung mit Inhaltsangaben auf Produkten.

Neben der Fähigkeit ist auch der Wille zur Ernährungsumstellung entscheidend, da starke Veränderungen der Lebensgewohnheiten, wie eine GFD, mit geringer Adhärenz verbunden sein können. Studien unter Zöliakie-Patienten zeigten, dass die Adhärenz an die GFD von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist, vor allem aber von der Symptomschwere vor Therapiebeginn und der Qualität der Ernährungsberatung (136). Da unsere Probanden vorab nicht von Symptomen bei Glutenaufnahme berichteten, sollte die Adhärenz durch eine qualitative Patientenschulung und entsprechende Handouts sowie durch telefonische Recalls

und die dauerhafte Erreichbarkeit über eine eigens eingerichtete E-Mail-Adresse gesteigert werden. Auch das Pausieren der Probandenrekrutierung über die Weihnachtsfeiertage sollte der Compliance-Steigerung dienen.

Da ein einheitliches Instrument zur Compliance-Messung fehlt, ist der Vergleich von Studien erschwert. Eine Metaanalyse schloss 38 Studien zur Adhärenz von Zöliakie-Patienten an die glutenfreie Ernährung ein (bis 2007) und gab Werte von 42 bis 91% an (137). Zwölf weitere Studien (2007-2018) kamen auf Werte von 53-76% (136). Da viele Probanden von positiven Effekten wie Gewichtsverlust und besserem Allgemeinbefinden durch die GFD berichteten, kann von einer hohen Compliance in unserem Kollektiv ausgegangen werden. Einschränkend ist zu nennen, dass wenige Probanden von Obstipation als unerwünschter Nebenwirkung berichteten, was negativen Einfluss auf die Adhärenz gehabt haben könnte. Es gab einzelne Fälle von wissentlicher Glutenaufnahme oder der Durchführung einer anderen einschränkenden Diät während der Interventionsphase. Das Essen in Restaurants, auf Feiern oder Reisen sei erschwert gewesen, sodass es im Rahmen dessen zu Ernährungsfehlern gekommen sein könnte. Zudem können die hohen Kosten der GFD ebenfalls zu Non-Compliance beitragen. In unserer Studie wurde kein Probandenhonorar gezahlt, welches die Mehrkosten hätte ausgleichen können. Auch die Vielfalt und Verfügbarkeit glutenfreier Produkte bringen trotz deutlicher Verbesserung in den vergangenen Jahren immer noch Limitationen mit sich (138).

Zur Überprüfung der Compliance waren Urinuntersuchungen auf Glutenpeptide vorgesehen. In der randomisierten, kontrollierten Studie von *Monachesi et al.* aus dem Jahr 2021 sorgten jedoch bereits Spuren von Gluten, die im Rahmen einer GFD vorkommen können, für positive Ergebnisse. Dagegen kam es unter der Aufnahme von 10-1000mg Gluten zu falsch negativen Ergebnissen, sodass die Detektion von Glutenpeptiden im Urin keine optimale Methode zur Compliance-Messung darstellt (139).

5.3 Verteilung von Steatose und Fibrose

Vor der Auswertung der Messdaten der transienten Elastographie wurde die Verteilung der Lebersteatose- und fibrose anhand des NAS und SAF-Score aus den vorangegangenen Leberbiopsien von 45 Probanden beurteilt. Sowohl für die Verteilung der Steatose als auch der Fibrose ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ATI-frei startenden Gruppe und der weizenhaltig beginnenden Gruppe, was eine gute Ausgangslage für die weiteren Vergleiche zwischen den beiden Gruppen bildete. In beiden Gruppen waren vorwiegend milde und mäßige Steatosen (S1, S2) und Fibrosen (F1, F2) vertreten.

5.4 Elastizität (E)

5.4.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz

Unter sechswöchiger ATI-freier Ernährung kam es in der ATI-frei gestarteten Gruppe zu einer Reduktion der Lebersteifigkeit um 0,3 kPa, während in der weizenhaltig gestarteten Gruppe keine Veränderung zu verzeichnen war. Somit könnte die Reihenfolge der Ernährungsformen einen Einfluss auf das Ergebnis gehabt haben. Möglicherweise war in den ersten sechs Wochen der Studie die Motivation höher, als in der zweiten Hälfte der Interventionsphase. Daher könnte sich die Compliance im Verlauf der Studie reduziert haben.

Im Vergleich dazu kam es unter sechswöchiger weizenhaltiger Ernährung in beiden Untergruppen zu einem Anstieg der Lebersteifigkeit (Weizen-Gruppe + 1,4 kPa, ATI-freie Gruppe +1,15 kPa). Da sich in beiden Untergruppen eine Erhöhung der Lebersteifigkeit abzeichnete, scheint die Interventionssequenz hier keinen Einfluss gehabt zu haben. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E zwischen den beiden Ernährungsformen. Unter weizenhaltiger Ernährung ergaben sich signifikant höhere Werte als unter ATI-freier Diät. Somit könnte die zuvor beschriebene Reduktion von E tatsächlich auf die Vermeidung der ATIs zurückzuführen sein. Einschränkend ist für dieses Ergebnis zu nennen, dass Tabelle 8 zwei Patientenkollektive mit niedrigem Median (6,15 bzw. 5,4 kPa) zum Zeitpunkt V1 und insgesamt 19 Probanden mit milder (F1) oder mäßiger Fibrose (F2) pro Untergruppe beschreibt. Daher ist eine weitere Reduktion von E nicht mit einer klinischen Besserung assoziiert. Zusätzlich müsste der Einfluss weiterer Faktoren wie körperlicher Aktivität und Gewichtsreduktion auf die Lebersteifigkeit überprüft werden. Somit können unsere Daten die Ergebnisse der tierexperimentellen Studie von *Ashfaq-Khan et al.* nicht sicher bestätigen. In dem Versuch wurden Mäuse nur fettreich oder fettreich und ATI-haltig ernährt. Die ATI-Menge war kalorisch irrelevant und entsprach der Tagesdosis eines Erwachsenen (1g). Unter fettreicher/ATI-haltiger Ernährung wurde die hepatische Fibrose gefördert (19). Für künftige Studien könnte ein Kollektiv mit mindestens fortgeschrittener Fibrose (F3) gewählt werden, um Veränderungen der Lebersteifigkeit per TE besser beschreiben zu können. Die transiente Elastographie eignet sich besonders, um eine fortgeschrittene Fibrose mit großer Sicherheit auszuschließen. Eine Unterscheidung zwischen geringen Fibrosegraden (F0/F1; F1/F2) ist per TE kaum möglich (13, 99). Auch eine Erfolgskontrolle per Leberbiopsie, die weiterhin als Referenzmethode in der Diagnostik der NAFLD gilt, wäre denkbar (6, 7).

5.4.2 in Abhängigkeit des NAFLD-Stadiums

In Bezug auf das NAFLD-Stadium kam es unter ATI-freier Ernährung in der NAFL- Gruppe zu einer Reduktion von E um 1,8 kPa und damit in allen Analysen zu E zur deutlichsten Veränderung. In der NASH-Gruppe kam es zu einem minimalen Anstieg des Medians um 0,05 kPa. Unter weizenhaltiger Ernährung kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg von E (NAFL-Gruppe +1,4 kPa, NASH-Gruppe +1,5 kPa). Für die NAFL-Gruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied für die Veränderung von E unter den beiden Ernährungsformen ($p=0,161$) für die NASH-Gruppe hingegen schon ($p= 0,027$). Demnach lagen die Werte bei NASH unter weizenhaltiger Ernährung signifikant höher als unter ATI-freier Ernährung. Für die NASH-Gruppe wären höhere Baseline-Werte zu erwarten gewesen, da bei diesen Patienten aufgrund der inflammatorischen Prozesse eine hepatische Fibrose begünstigt wird. Patienten mit einer NAFL sind per Definition von einer reinen Fettleber betroffen und sollten daher keine erhöhte Lebersteifigkeit aufweisen. In unserem Patientenkollektiv sind jedoch die Baseline-Werte der NAFL (vor ATI-freier Ernährung: 6kPa; vor weizenhaltiger Ernährung: 4,5 kPa) als auch der NASH-Patienten (vor ATI-freier Ernährung 6,75 kPa; vor weizenhaltiger Ernährung: 5,9 kPa) normwertig, sodass auch hier die Reduktion von E keinen klinischen Effekt zeigt (98). In weiteren klinischen Studien zum Einfluss einer ATI-freien Diät auf die NAFLD wäre womöglich der Ausschluss von Probanden mit reiner NAFL sinnvoll, um ein Patientenkollektiv mit erhöhter Lebersteifigkeit zu bilden, sodass eine Verbesserung deutlich messbar wird.

5.5 Controlled-Attenuation-Parameter (CAP)

5.5.1 in Abhängigkeit der Interventionssequenz

Unter ATI-freier Ernährung kam es in der ATI-frei gestarteten Gruppe zu einer Reduktion des CAP um 17 dB/m, in der weizenhaltig gestarteten Gruppe zu einem Anstieg des CAP um 2dB/m. Unter weizenhaltiger Ernährung kam es in der weizenhaltig gestarteten Gruppe zu einer Reduktion des CAP um 5dB/m, in der ATI-frei gestarteten Gruppe zu einem Anstieg des CAP um 14 dB/m, was eine entgegengesetzte Entwicklung der Werte beschreibt.

Hier könnte unter beiden Ernährungsformen ein Effekt der Interventionssequenz in Betracht kommen, ebenso wie eine Reduktion der Compliance im Vergleich zwischen erster und zweiter Ernährungsphase. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der CAP-Veränderung ist nicht signifikant. In den Gesamtgruppen zeigte sich sowohl unter ATI-freier, als auch unter weizenhaltiger Ernährung eine Reduktion des CAP, sodass eine

Ernährungsumstellung laut unseren Daten auch mit gängigem Weizenanteil zu einer CAP-Reduktion führen kann. Der Effekt kann nicht speziell auf die Reduktion der ATIs zurückgeführt werden.

In der Kovarianzanalyse wurde die Veränderung des CAP unter ATI-freier und weizenhaltiger Ernährung untersucht, wobei für den Ausgangswert zum Zeitpunkt Baseline kontrolliert wurde. Hiermit sollte der Einfluss eines extrem hohen oder extrem niedrigen Baseline-Wertes auf die folgenden Messungen minimiert werden. Unter beiden Ernährungsformen ergab sich eine Erhöhung des CAP im Mittel von Woche 6 (V3) zu Woche 12 (V5). Unter weizenhaltiger Ernährung zeigte sich ein stärkerer Anstieg als unter ATI-freier Ernährung, was jedoch kein signifikantes Ergebnis darstellt ($p=0,437$).

Insgesamt können unsere Daten auch bezüglich der Leberverfettung die Ergebnisse von *Ashfaq et al.* nicht bestätigen. In dem Versuch wurde die hepatische Steatose in Mäusen durch ATIs gefördert (19).

5.5.2 in Abhängigkeit der körperlichen Aktivität

Die körperliche Aktivität ist neben der Ernährung ein zweiter wichtiger Faktor, der zu einer Reduktion der Lebersteatose und der metabolischen Risikofaktoren führen kann (13). Auch unabhängig von der Gewichtsreduktion zeigt vermehrte Bewegung einen positiven Effekt auf die NAFLD und die Insulinresistenz (140). Einige Studien beschrieben eine Reduktion der Lebersteatose um 20-30% bei körperlicher Aktivität ohne Gewichtsreduktion (141). Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen der Intensität der Bewegung und den Effekten auf die NAFLD beschrieben (114). Um die körperliche Aktivität der Probanden im Rahmen der Studie zu erfassen, wurde der International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) angewendet. Die Angaben der Studienteilnehmer wurden in MET-Minuten umgerechnet, um die körperliche Aktivität anschließend in die Kategorien gering, moderat und hoch einzustufen zu können. Im Rahmen der Patientenschulung zur weizenhaltigen Diät wurde den Probanden gemäß den zehn Regeln der DGE, auch ein aktiver Alltag bzw. Sport empfohlen (133).

Da der CAP somit auch von der körperlichen Aktivität beeinflusst werden kann, wurde der Zusammenhang zwischen der Veränderung des CAP und der Veränderung der MET-Minuten untersucht. Hier konnte kein signifikanter Zusammenhang unter ATI-freier ($r= 0,062$, $p= 0,712$) und weizenhaltiger ($r= 0,09$, $p= 0,586$) Ernährung gesehen werden, sodass die Reduktion des CAP nicht auf die körperliche Aktivität zurückzuführen ist, sondern durch die Ernährungsumstellung begründet sein könnte. Zu beachten ist, dass der Fragebogen selbstständig von den Probanden ausgefüllt wurde und daher limitiert in seiner Aussagekraft

ist. Zum einen kann eine Fehleinschätzung von Dauer und Frequenz der Aktivitäten vorliegen, zum anderen könnten die Antworten dem Bias der sozialen Erwünschtheit unterliegen (141).

5.5.3 in Zusammenhang mit der ALT-Reduktion

Da die Reduktion der ALT, als Surrogatparameter der hepatischen Entzündung, unter sechswöchiger ATI-freier Diät als primärer Endpunkt der Studie definiert wurde, erfolgte die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Veränderung der ALT und Veränderung des CAP unter ATI-freier Diät. In der Gruppe der Non-Responder kam es zu einer CAP-Erhöhung um 2 dB/m, während unter den Respondern eine signifikante mediane Reduktion des CAP um 22 dB/m gemessen werden konnte ($p=0,042$). Der Zusammenhang zwischen ALT und CAP könnte durch eine Verminderung der Lebersteatose erklärt werden, was inflammatorische Prozesse und den Untergang von Hepatozyten verringert und damit die Transaminasenfreisetzung senkt, auch wenn diese Korrelation nicht statistisch signifikant ist ($r = 0,307$ $p=0,216$) (63).

Unabhängig des primären Endpunktes war zu beobachten, dass mehr Probanden unter weizenhaltiger Diät eine ALT-Reduktion zeigten als unter ATI-freier Diät ($n=28$ vs. $n= 20$), weshalb die ALT-Reduktion nicht allein auf den Effekt der ATIs zurückgeführt werden kann. In der Gruppe ohne ALT-Reduktion sank der CAP um 4 dB/m unter weizenhaltiger Diät. In der Gruppe mit ALT-Reduktion kam es zu einer minimal stärkeren CAP-Reduktion um 4,5 dB/m, was deutlich unter dem Wert der ATI-freien Diät lag (22 dB/m). Auch unter weizenhaltiger Ernährung zeigte keine der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung des CAP und der ALT.

Erhöhte Lebertransaminasen geben häufig den ersten Hinweis auf eine Leberschädigung, sodass diese früh erkannt werden kann. Jedoch können sie bei einer NAFL, ebenso wie in fortgeschrittenen Stadien normwertig sein oder durch andere Erkrankungen verändert sein (23, 87). In einer Metanalyse wurden elf Studien mit insgesamt 4000 Probanden auf die Normwertigkeit der ALT trotz NAFLD untersucht. Dabei zeigten 25% aller NAFLD-Patienten und 19% der NASH-Patienten eine normwertige ALT (142). In der retrospektiven Analyse einer weiteren Studie mit 222 Teilnehmern ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Hier zeigte sich bei 11% der Probanden mit normwertiger ALT eine NASH (88). Im Rahmen unserer Studie hätte das Ausmaß der Reduktion der ALT als primärer Endpunkt genauer definiert werden können. Insgesamt sind Lebertransaminasen nicht optimal zur Einschätzung der hepatischen Inflammation, stellen aktuell jedoch das beste Basisdiagnostikum dar.

5.5.4 in Zusammenhang mit Alter, Geschlecht, anthropometrischen Werten und Parametern des Glukose- und Lipidmetabolismus

Da ein fortgeschrittenes Alter und das männliche Geschlecht als Prädiktoren der NAFLD gelten, wurde der Zusammenhang zwischen Alter, Geschlecht und Höhe des CAP zum Zeitpunkt Baseline untersucht (13). Hier konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden, sodass in diesem Probandenkollektiv Männer oder ältere Personen nicht häufiger von einer CAP-Erhöhung betroffen waren.

Zusätzlich wurde die Veränderung der anthropometrischen Werte wie Gewicht, BMI, Hüft- und Bauchumfang und der Parameter von Glukose- und Lipidmetabolismus (Nüchternglukose, HbA1c, Triglyceride, Gesamt-Cholesterin, LDL) im Zusammenhang mit der CAP-Veränderung unter den beiden Ernährungsformen betrachtet. Erhöhungen dieser Werte im Sinne einer Adipositas, Dyslipidämie oder T2DM stellen Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD dar (2, 6, 13). Lediglich die Nüchternglukose unter weizenhaltiger Diät und das LDL unter ATI-freier Diät zeigten eine schwache, fast mäßige Korrelation mit der CAP-Veränderung, die jedoch nicht signifikant ist ($r = 0,293$, $p=0,078$; $r = 0,287$, $p= 0,086$). Auch die übrigen Daten zeigten keinen signifikanten Zusammenhang, sodass die Daten einen Einfluss dieser Parameter auf den CAP nicht bestätigen können.

Aus Studien mit Zöliakie-Patienten ist bereits bekannt, dass eine glutenfreie und somit ATI-freie Diät eine NAFLD begünstigen kann. Produkte, die nicht von Natur aus glutenfrei sind, sondern industriell verarbeitet werden, enthalten oftmals mehr Kohlenhydrate, gesättigte Fettsäuren und Salz, als ihre glutenhaltigen Pendanten. Ein Beispiel ist das glutenfreie Brot (143). Durch die vermehrte Aufnahme von Kohlenhydraten und Fetten kommt es unter GFD oft zu einer Gewichtszunahme, Erhöhung von Lipid- und Glukosewerten im Serum sowie zur Lipidablagerung in den Hepatozyten und neben der Steatose auch zur Inflammation der Leber (144). Zöliakie-Patienten, die eine lebenslang strikt glutenfreie Ernährung einhalten müssen, sind in 3-7% der Fälle von einer NAFLD betroffen und haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein vier bis sechsfach erhöhtes Risiko eine NAFLD im Verlauf zu entwickeln (144, 145). Neben der Zusammensetzung der Makronährstoffe wird die gesteigerte Resorption im Dünndarm, aufgrund rückläufiger Zottenatrophie, bei diesen Patienten als weiterer Grund für die NAFLD-Entwicklung beschrieben. In einer klinischen Studie mit ca. 26.000 eingeschlossenen Zöliakie-Patienten wurde ein erhöhtes Risiko einer NAFLD ein Jahr nach Diagnosestellung beschrieben, welches auch nach 15 Jahren weiterhin persistierte (146). Obwohl die NAFLD häufig mit dem T2DM vergesellschaftet ist, konnte bei Zöliakie-Patienten trotz erhöhter Glukosewerte keine erhöhte Inzidenz an T2DM gemessen werden (138).

Zusätzlich enthalten glutenfreie Produkte im Vergleich zu glutenhaltigen Produkten weniger Folsäure, Eisen, Vitamin D, Vitamin B12 und Ballaststoffe (143). Durch die Auswahl natürlich

glutenfreier Produkte sollten die Studienteilnehmer diese möglichen negativen Effekte der GFD vermeiden.

6 Zusammenfassung

Die NASH-ATI-Studie untersuchte als explorative Pilotstudie den Einfluss einer weizenreduzierten Ernährung auf die NALFD. Durch die Meidung glutenhaltiger Lebensmittel sollte der Anteil an Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf $< 5\%$ gesenkt werden, was einer ATI-freien Ernährung entspricht. Neben den Effekten auf Standardlaborparameter, anthropometrische Werte und Lebensqualität, wurde vor allem der Einfluss der Ernährungsumstellung auf die hepatische Steatose, Inflammation und Fibrose untersucht. Als primärer Endpunkt der Studie galt die Reduktion der ALT unter sechswöchiger ATI-freier Diät. Veränderungen der Steatose und Fibrose wurden mithilfe der transienten Elastographie erfasst.

Zu Beginn der Studie erfolgte die Randomisierung der Teilnehmer in zwei Gruppen, eine ATI-freie und eine weizenhaltig startende Gruppe. Durch das Cross-over Studiendesign sollte jeder Proband sowohl die ATI-freie Diät als auch die weizenhaltige Diät für jeweils sechs Wochen durchlaufen. Anschließend folgte eine 12-wöchige Follow-up Phase. Die Studie beinhaltete vier Beobachtungsvisiten sowie zwei telefonische Recalls.

Im Rahmen der Studie wurden von Februar 2019 bis September 2020 47 Probanden mit einer bekannten NAFLD in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz rekrutiert, 45 von ihnen mit histologisch gesichertem Befund. Sieben Probanden brachen die Studie ab, sodass 40 Probanden die 12-wöchige Interventionsphase vollständig durchliefen und im Rahmen der per-Protocol-Analyse in die Auswertung eingeschlossen wurden.

Die Lebersteifigkeit, die per TE bestimmt wurde, betrug in der ATI-frei gestarteten Gruppe zum Zeitpunkt Baseline 6,15 kPa im Median, in der weizenhaltig gestarteten Gruppe waren es 5,4 kPa. Unter ATI-freier Diät kam es im Vergleich zur weizenhaltigen Ernährung zu einem signifikanten Unterschied für die Veränderung von E. Da in dem Patientenkollektiv jedoch überwiegend milde oder mäßige Fibrosen vorlagen und die Werte der Elastizität bereits zu Studienbeginn in beiden Gruppen im Median normwertig waren, war eine weitere Reduktion der Lebersteifigkeit in dieser Studie ohne klinische Relevanz.

Der CAP betrug zu Beginn im Median 314 dB/m in der ATI-freien Gruppe, in der Weizen-Gruppe waren es 330 dB/m. Sowohl unter ATI-freier, als auch unter weizenhaltiger Ernährung kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion von CAP, sodass der Effekt nicht allein der ATI-Meidung zugeschrieben werden kann. Ein Zusammenhang mit der körperlichen Aktivität, gemessen per IPAQ, konnte nicht festgestellt werden, sodass die Ernährungsumstellung wahrscheinlich dennoch ausschlaggebend war.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des CAP sowie Alter und Geschlecht der Probanden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Veränderung von CAP und der Veränderung anthropometrischer Werte oder Parameter des Glukose- und Lipidmetabolismus.

Insgesamt können die beschriebenen Effekte in unserer Studie nicht zweifelsfrei der ATI-freien Diät zugeschrieben werden. Da die Prävalenz der Weizensensitivität auf bis zu 6% geschätzt wird, die Dunkelziffer wahrscheinlich weitaus höher liegt und die NAFLD eine der führenden Lebererkrankungen weltweit darstellt, ist auf dem Gebiet weitere Forschung notwendig. In Zukunft sind Studien mit größeren Fallzahlen nötig, um die statistische Power zu erhöhen und signifikante Ergebnisse zu ermöglichen. Das Patientenkollektiv kann dabei durch Anpassung der Ein- und Ausschlusskriterien exakter an spezifische Fragestellungen abgestimmt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Journal of Health Monitoring*. 2017(2):21-28. DOI:10.17886/RKI-GBE-2017-025
2. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.
3. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, *et al*. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
4. Lazarus JV, Colombo M, Cortez-Pinto H, Huang TT, Miller V, Ninburg M, *et al*. NAFLD - sounding the alarm on a silent epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(7):377-379.
5. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
6. EASL-EASD-EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*. 2016;59(6):1121-1140.
7. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, *et al*. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357.
8. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*. 2019;103(1):e1-e13.
9. Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, Coward A, Somers VK, Kamath PS. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. *Hepatology*. 2018;67(5):1726-1736.
10. Labenz C, Huber Y, Michel M, Nagel M, Galle PR, Kostev K, *et al*. Impact of NAFLD on the Incidence of Cardiovascular Diseases in a Primary Care Population in Germany. *Dig Dis Sci*. 2020;65(7):2112-2119.
11. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S47-64.
12. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016;65(3):589-600.
13. Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, *et al*. S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease. *Z Gastroenterol*. 2015;53(7):668-723.
14. Roeb E, Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol*. 2019;57(4):508-517.
15. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, *et al*. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2012;209(13):2395-2408.
16. Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1195-1204.
17. Schuppan D, Pickert G, Ashfaq-Khan M, Zevallos V. Non-celiac wheat sensitivity: differential diagnosis, triggers and implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):469-476.
18. Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, *et al*. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1100-1113.e1112.
19. Ashfaq-Khan M, Aslam M, Qureshi MA, Senkowski MS, Yen-Weng S, Strand S, *et al*. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors promote features of murine non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):17463.
20. World Gastroenterology Organisation. Global Guidelines: Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis [Internet]. 2012 [05.12.2021]. Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/naflid-nash-english-2012.pdf>.
21. Herold G. *Innere Medizin* 2021. Berlin: De Gruyter; 2021.

22. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):231-237.
23. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(4):637-653.
24. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020;73(1):202-209.
25. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol.* 2018;69(4):896-904.
26. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, *et al.* Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. *Hepatology.* 2007;46(5):1387-1391.
27. Williamson RM, Price JF, Glancy S, Perry E, Nee LD, Hayes PC, *et al.* Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes Care.* 2011;34(5):1139-1144.
28. Soresi M, Noto D, Cefalù AB, Martini S, Vigna GB, Fonda M, *et al.* Nonalcoholic fatty liver and metabolic syndrome in Italy: results from a multicentric study of the Italian Arteriosclerosis society. *Acta Diabetol.* 2013;50(2):241-249.
29. Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A, Goussia A, Karayiannis P, Doukas M, *et al.* Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol.* 2010;16(31):3944-3949.
30. García-Monzón C, Vargas-Castrillón J, Porrero JL, Alonso MT, Bonachía O, Castillo MJ, *et al.* Prevalence and risk factors for biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort of adult patients with gallstones. *Liver Int.* 2015;35(8):1983-1991.
31. Koehler EM, Plompen EP, Schouten JN, Hansen BE, Darwish Murad S, Taimr P, *et al.* Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology.* 2016;63(1):138-147.
32. Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, Finch J, Chang Z, Kochunov VG, *et al.* Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetes Care.* 2012;35(4):873-878.
33. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148(3):547-555.
34. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1249-1253.
35. Nayak NC, Jain D, Vasdev N, Gulwani H, Saigal S, Soin A. Etiologic types of end-stage chronic liver disease in adults: analysis of prevalence and their temporal changes from a study on native liver explants. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24(10):1199-1208.
36. Marmur J, Bergquist A, Stål P. Liver transplantation of patients with cryptogenic cirrhosis: clinical characteristics and outcome. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(1):60-69.
37. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology.* 2014;59(6):2188-2195.
38. Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128(10):2436-2443.
39. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, Lochan R, Graham J, Das D, *et al.* Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol.* 2014;60(1):110-117.
40. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, *et al.* Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology.* 2016;63(3):827-838.

41. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA*. 2012;307(5):483-490.
42. Zimmermann E, Gamborg M, Holst C, Baker JL, Sørensen TI, Berentzen TL. Body mass index in school-aged children and the risk of routinely diagnosed non-alcoholic fatty liver disease in adulthood: a prospective study based on the Copenhagen School Health Records Register. *BMJ Open*. 2015;5(4):e006998.
43. Berentzen TL, Gamborg M, Holst C, Sørensen TI, Baker JL. Body mass index in childhood and adult risk of primary liver cancer. *J Hepatol*. 2014;60(2):325-330.
44. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, *et al*. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-1565.
45. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, *et al*. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61.
46. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8591-8638.
47. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-1846.
48. Jacome-Sosa MM, Parks EJ. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3):213-220.
49. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):175-191.
50. Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1746-1755.
51. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726-735.
52. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-229.
53. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1941-1951.
54. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, *et al*. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(5):1389-1397.
55. Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, Leivonen M, Arola J, Orešič M, *et al*. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(5):1167-1175.
56. Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(2):84-95.
57. Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):545-563.
58. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. 2006;6(1):1-28.
59. Han J, Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2016;57(8):1329-1338.
60. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, *et al*. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):568-576.
61. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(7):387-400.
62. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):367-377.
63. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-922.

64. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048.
65. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1913-1928.
66. Knittel T, Saile B, Ramadori G. Fibrogenese: Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. *Der Internist*. 1998;39(3):238-246.
67. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
68. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(11):2629-2640.
69. Filliol A, Schwabe RF. Contributions of Fibroblasts, Extracellular Matrix, Stiffness, and Mechanosensing to Hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 2019;39(3):315-333.
70. Friedman SL. Extracellular matrix. In: Dufour JF, Clavien PA, Hrsg. *Signaling Pathways in Liver Diseases*. 3. Auflage. Chichester: John Wiley & Sons; 2015: 85-96.
71. Anstee QM, Darlay R, Cockell S, Meroni M, Govaere O, Tiniakos D, *et al*. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *J Hepatol*. 2020;73(3):505-515.
72. Armandi A, Schattenberg JM. NAFLD between genes and environment: what drives fibrogenesis? *Gut*. 2020.
73. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):686-690.
74. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(6):319-327.
75. Bhat G, Baba CS, Pandey A, Kumari N, Choudhuri G. Insulin resistance and metabolic syndrome in nonobese Indian patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Trop Gastroenterol*. 2013;34(1):18-24.
76. Vos B, Moreno C, Nagy N, Féry F, Cnop M, Vereerstraeten P, *et al*. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD): a major cause of cryptogenic liver disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 2011;74(3):389-394.
77. Conus F, Rabasa-Lhoret R, Péronnet F. Characteristics of metabolically obese normal-weight (MONW) subjects. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(1):4-12.
78. Schneider KM, Trautwein C. Die Darm-Leber-Achse bei nichtalkoholischer Fettlebererkrankung: molekulare Mechanismen und neue Targets. *Wiener klinisches Magazin*. 2020;23(4):198-205.
79. Winer DA, Luck H, Tsai S, Winer S. The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2016;23(3):413-426.
80. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, *et al*. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-1887.
81. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol*. 2004;12(12):562-568.
82. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2007;47(4):571-579.
83. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, *et al*. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*. 2012;21(4):504-516.
84. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):979-984.
85. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-1031.
86. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, *et al*. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013;62(12):1787-1794.
87. Michel M, Schattenberg JM. [Liver-specific diagnostic for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - time to replace liver biopsy?]. *Z Gastroenterol*. 2020;58(12):1233-1240.

88. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver Int.* 2013;33(9):1398-1405.
89. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019;156(5):1264-1281.e1264.
90. Lăpădat AM, Jianu IR, Ungureanu BS, Florescu LM, Gheonea DI, Sovaila S, *et al.* Non-invasive imaging techniques in assessing non-alcoholic fatty liver disease: a current status of available methods. *J Med Life.* 2017;10(1):19-26.
91. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, *et al.* Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology.* 2011;54(3):1082-1090.
92. Bril F, Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, Freckleton M, Chintapalli K, *et al.* Clinical value of liver ultrasound for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in overweight and obese patients. *Liver Int.* 2015;35(9):2139-2146.
93. Dulai PS, Sirlin CB, Loomba R. MRI and MRE for non-invasive quantitative assessment of hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD and NASH: clinical trials to clinical practice. *J Hepatol.* 2016;65.
94. Loomba R. Role of imaging-based biomarkers in NAFLD: Recent advances in clinical application and future research directions. *J Hepatol.* 2018;68(2):296-304.
95. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol.* 2011;21(1):87-97.
96. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, *et al.* Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology.* 2018;68.
97. Castera L, Fornis X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48(5):835-847.
98. Stauber R. Nichtinvasive Diagnostik bei nichtalkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD). *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen.* 2019;17(3):75-81.
99. Tapper EB, Challies T, Nasser I, Afdhal NH, Lai M. The Performance of Vibration Controlled Transient Elastography in a US Cohort of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(5):677-684.
100. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Bail B, *et al.* Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;51.
101. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Di Marco V, Cammà C, Cabibi D, *et al.* The severity of steatosis influences liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2015;62(4):1101-1110.
102. Chen J, Yin M, Talwalkar JA, Oudry J, Glaser KJ, Smyrk TC, *et al.* Diagnostic Performance of MR Elastography and Vibration-controlled Transient Elastography in the Detection of Hepatic Fibrosis in Patients with Severe to Morbid Obesity. *Radiology.* 2017;283(2):418-428.
103. Riemann JF. Leberbiopsie. 2008. In: *Gastroenterologie in Klinik und Praxis* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Available from: <https://www.thieme-connect.de/products/ebooks/lookinside/10.1055/b-0034-79927>.
104. Kleiner DE, Brunt EM, Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41.
105. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012;56(5):1751-1759.
106. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology.* 2011;53(3):810-820.
107. Schattenberg JM, Straub BK. On the value and limitations of liver histology in assessing non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2020;73(6):1592-1593.

108. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, *et al.* Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1898-1906.
109. Davison BA, Harrison SA, Cotter G, Alkhoury N, Sanyal A, Edwards C, *et al.* Suboptimal reliability of liver biopsy evaluation has implications for randomized clinical trials. *J Hepatol*. 2020;73(6):1322-1332.
110. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol*. 2012;56(1):255-266.
111. Vilar-Gomez E, Yasells-Garcia A, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, *et al.* Development and validation of a noninvasive prediction model for nonalcoholic steatohepatitis resolution after lifestyle intervention. *Hepatology*. 2016;63(6):1875-1887.
112. Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martínez-González MA, Castañer O, *et al.* Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *Cmaj*. 2014;186(17):E649-657.
113. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, *et al.* The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013;59(1):138-143.
114. Kistler KD, Brunt EM, Clark JM, Diehl AM, Sallis JF, Schwimmer JB. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(3):460-468; quiz 469.
115. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387(10019):679-690.
116. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, *et al.* Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-1685.
117. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, *et al.* Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology*. 2020;159(4):1290-1301.e1295.
118. Dunn W, Sanyal AJ, Brunt EM, Unalp-Arida A, Donohue M, McCullough AJ, *et al.* Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol*. 2012;57(2):384-391.
119. Biesiekierski JR. What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32 Suppl 1:78-81.
120. Oda Y, Matsunaga T, Fukuyama K, Miyazaki T, Morimoto T. Tertiary and quaternary structures of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry*. 1997;36(44):13503-13511.
121. Dupont FM, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Altenbach SB. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Sci*. 2011;9:10.
122. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:13.
123. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, *et al.* Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*. 2013;5(10):3839-3853.
124. Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, *et al.* Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 2015;7(6):4966-4977.
125. Schuppan D. [Celiac disease : Pathogenesis, clinics, epidemiology, diagnostics, therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2016;59(7):827-835.
126. von Arnim U, Canbay A. Zöliakie. *Der Gastroenterologe*. 2018;13(2):143-153.
127. Felber J, Aust D, Baas S, Bischoff SC, Bläker H, Daum S, *et al.* S2k-Leitlinie Zöliakie. AWMF 2014.
128. DiGiacomo DV, Tennyson CA, Green PH, Demmer RT. Prevalence of gluten-free diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48(8):921-925.
129. Casella G, Villanacci V, Di Bella C, Bassotti G, Bold J, Rostami K. Non celiac gluten sensitivity and diagnostic challenges. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2018;11(3):197-202.

130. Pickert G, Wirtz S, Matzner J, Ashfaq-Khan M, Heck R, Rosigkeit S, *et al.* Wheat Consumption Aggravates Colitis in Mice via Amylase Trypsin Inhibitor-mediated Dysbiosis. *Gastroenterology*. 2020;159(1):257-272 e217.
131. Passali M, Josefsen K, Frederiksen JL, Antvorskov JC. Current Evidence on the Efficacy of Gluten-Free Diets in Multiple Sclerosis, Psoriasis, Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroid Diseases. *Nutrients*. 2020;12(8).
132. Bruzzese V, Scolieri P, Pepe J. Efficacy of gluten-free diet in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatismo*. 2021;72(4):213-217.
133. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 10 Regeln der DGE [Internet]. 2017 [22.03.2022]. Available from: <https://www.dge.de/fileadmin/public/doc/fm/10-Regeln-der-DGE.pdf>.
134. Schulgen Kristiansen G, Schumacher M. Cross-Over Studien. *Methodik klinischer Studien: Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2002: 305-317.
135. Biolato M, Manca F, Marrone G, Cefalo C, Racco S, Miggiano GA, *et al.* Intestinal permeability after Mediterranean diet and low-fat diet in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2019;25(4):509-520.
136. Muhammad H, Reeves S, Jeanes YM. Identifying and improving adherence to the gluten-free diet in people with coeliac disease. *Proc Nutr Soc*. 2019;78(3):418-425.
137. Hall NJ, Rubin GP, Charnock A. Intentional and inadvertent non-adherence in adult coeliac disease. A cross-sectional survey. *Appetite*. 2013;68:56-62.
138. Valvano M, Longo S, Stefanelli G, Frieri G, Viscido A, Latella G. Celiac Disease, Gluten-Free Diet, and Metabolic and Liver Disorders. *Nutrients*. 2020;12(4).
139. Monachesi C, Verma AK, Catassi GN, Franceschini E, Gatti S, Gesuita R, *et al.* Determination of Urinary Gluten Immunogenic Peptides to Assess Adherence to the Gluten-Free Diet: A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2021;12(10):e00411.
140. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, *et al.* Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut*. 2011;60(9):1278-1283.
141. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017;67(4):829-846.
142. Ma X, Liu S, Zhang J, Dong M, Wang Y, Wang M, *et al.* Proportion of NAFLD patients with normal ALT value in overall NAFLD patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2020;20(1):10.
143. Di Liberto D, Carlisi D, D'Anneo A, Emanuele S, Giuliano M, De Blasio A, *et al.* Gluten Free Diet for the Management of Non Celiac Diseases: The Two Sides of the Coin. *Healthcare (Basel)*. 2020;8(4).
144. Larussa T, Abenavoli L, Procopio AC, Iannelli C, Polimeni N, Spagnuolo R, *et al.* The role of gluten-free diet in nonalcoholic fatty liver disease development. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(21):6613-6618.
145. Rubio-Tapia A, Murray JA. The Liver and Celiac Disease. *Clin Liver Dis*. 2019;23(2):167-176.
146. Reilly NR, Lebwohl B, Hultcrantz R, Green PH, Ludvigsson JF. Increased risk of non-alcoholic fatty liver disease after diagnosis of celiac disease. *J Hepatol*. 2015;62(6):1405-1411.
147. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Baumann AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Aug;35(8):1381-95.

8 Anhang

8.1 International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)

INTERNATIONAL PHYSICAL ACTIVITY QUESTIONNAIRE (IPAQ)

Wir sind daran interessiert herauszufinden welche Arten von körperlichen Aktivitäten Menschen in ihrem alltäglichen Leben vollziehen. Die Befragung bezieht sich auf die Zeit die Sie während der **letzten 7** Tage in körperlicher Aktivität verbracht haben. Bitte beantworten Sie alle Fragen (auch wenn Sie sich selbst nicht als aktive Person ansehen). Bitte berücksichtigen Sie die Aktivitäten im Rahmen Ihrer Arbeit, in Haus und Garten, um von einem Ort zum anderen zu kommen und in Ihrer Freizeit für Erholung, Leibesübungen und Sport.

Denken Sie an all Ihre **anstrengenden** und **moderaten** Aktivitäten in **den vergangenen 7 Tagen**. **Anstrengende** Aktivitäten bezeichnen Aktivitäten die starke körperliche Anstrengungen erfordern und bei denen Sie deutlich stärker atmen als normal. **Moderate** Aktivitäten bezeichnen Aktivitäten mit moderater körperlicher Anstrengung bei denen Sie ein wenig stärker atmen als normal.

1. Körperliche Aktivität am Arbeitsplatz

Im ersten Abschnitt geht es um Ihre Arbeit. Das beinhaltet bezahlte Arbeit, Landwirtschaft, freiwillige Tätigkeiten, Seminare und alle anderen unbezahlten Tätigkeiten die Sie außerhalb von zuhause verrichtet haben. Geben Sie hier keine unbezahlten Tätigkeiten an die Sie zuhause verrichtet haben, wie Arbeiten in Haus und Garten, anfallende Instandhaltungsarbeiten und Sorgen für die Familie. Dies wird in Abschnitt 3 befragt.

1. Haben Sie momentan einen Job oder verrichten Sie irgendwelche unbezahlte Arbeiten außerhalb von zuhause?

Ja

Nein → **Springen Sie weiter zu Teil 2: Körperliche Aktivität zur Beförderung**

Die folgenden Fragen sind über die körperliche Aktivität in den **vergangenen 7** Tagen im Rahmen Ihrer bezahlten und unbezahlten Arbeit. Dies beinhaltet keine Wegstrecken zur oder von der Arbeit.

2. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie anstrengende körperliche Aktivitäten wie schweres Heben, Graben, schwere Bauarbeit oder Stiegensteigen **im Rahmen Ihrer Arbeit** verrichtet? Denken Sie dabei nur an körperliche Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben.

_____ **Tage pro Woche**

Keine anstrengenden körperlichen Aktivitäten im Rahmen der Arbeit

→ **Springen Sie weiter zu Frage 4**

3. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **anstrengender** körperlicher Aktivität im Rahmen ihrer Arbeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

- _____ **Minuten pro Tag**
4. Denken Sie erneut nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie moderate körperliche Aktivitäten wie Tragen leichter Lasten **im Rahmen Ihrer Arbeit** verrichtet? Fußwegstrecken bitte nicht mit einbeziehen.

_____ **Tage pro Woche**

- Keine moderaten körperlichen Aktivitäten im Rahmen der Arbeit

→ **Springen Sie weiter zu Frage 6**

5. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit moderater körperlicher Aktivität im Rahmen Ihrer Arbeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

6. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie **Fußwegstrecken** von mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung im Rahmen Ihrer Arbeit zurückgelegt? Bitte keine Wegstrecken zur oder von der Arbeit mit einbeziehen.

_____ **Tage pro Woche**

- Keine Fußwegstrecken im Rahmen der Arbeit

→ **Springen Sie weiter zu Teil 2: Körperliche Aktivität zur Beförderung**

7. Wie viel Zeit haben Sie an einem dieser Tage für gewöhnlich mit **Wegstrecken** im Rahmen Ihrer Arbeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

2. Körperliche Aktivität zur Beförderung

In diesen Fragen geht es um die Fortbewegungen von einem Ort zum anderen, wie die Wege zu Arbeit, Geschäften, Kino, usw.

8. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** sind Sie mit einem **motorisierten Verkehrsmittel** wie Zug, Bus, Auto oder Straßenbahn **gefahren**?

_____ **Tage pro Woche**

- Keine Fahrten in motorisierten Verkehrsmitteln

→ Springen Sie weiter zu Frage 10

9. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **Fahrten** in Zug, Bus, Auto, Straßenbahn oder irgendeinem motorisiertem Verkehrsmittel verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

Denken Sie jetzt nur an das **Fahrradfahren** und **zu Fuß Gehen**, bei dem Sie für Wege zur und von der Arbeit, für Botenwege, sowie für Wegstrecken um von einem Ort zum anderen zurückgelegt haben.

10. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** sind Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung **fahrrad gefahren** um **von einem Ort zum anderen** zu gelangen?

_____ **Tage pro Woche**

Kein Fahrradfahren von einem Ort zum anderen

→ Springen Sie weiter zu Frage 12

11. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage für das **Fahrradfahren** von einem Ort zum anderen verwendet?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

12. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** sind Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung **zu Fuß gegangen** um **von einem Ort zum anderen** zu gelangen?

_____ **Tage pro Woche**

Kein zu Fuß Gehen von einem Ort zum anderen

→ Springen Sie weiter zu Teil 3: *Hausarbeit, Hausinstandhaltung und Sorgen für die Familie*

13. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage für das **zu Fuß Gehen** von einem Ort zum anderen verwendet?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

3. Hausarbeit, Hausinstandhaltung und Sorgen für die Familie

In diesem Abschnitt geht es um körperliche Aktivitäten die Sie in den **vergangenen 7 Tagen** in und um ihr Haus verrichtet haben, wie Hausarbeit, Arbeiten in Hof und Garten, Instandhaltungsarbeiten und Sorgen für die Familie.

14. Denken Sie nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie anstrengende körperliche Aktivitäten wie Tragen schwerer Lasten, Holzhaken, Schneeschaufeln oder Graben **im Hof oder im Garten** verrichtet?

_____ **Tage pro Woche**

- Keine anstrengenden körperlichen Aktivitäten im Hof oder im Garten

→ **Springen Sie weiter zu Frage 16**

15. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **anstrengender** Aktivität in Garten und Hof verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

16. Denken Sie erneut nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie moderate Aktivitäten wie Tragen leichter Lasten, Fegen, Fensterputzen und Rechen **im Hof oder im Garten** verrichtet?

_____ **Tage pro Woche**

- Keine moderate Aktivität im Garten oder im Hof

→ **Springen Sie weiter zu Frage 18**

17. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **moderater** körperlicher Aktivität im Garten oder im Hof verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

18. Denken Sie erneut nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie moderate Aktivitäten wie Tragen leichter Lasten, Fensterputzen, Bodenaufwaschen und Fegen **zu Hause** verrichtet?

_____ **Tage pro Woche**

- Keine moderaten Aktivitäten zu Hause

→ **Springen Sie weiter zu Teil 4: Körperliche Aktivitäten in Erholung, Sport und Freizeit**

19. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **moderaten** körperlichen Aktivitäten zuhause verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

4. Körperliche Aktivitäten in Erholung; Sport und Freizeit

In diesem Abschnitt geht es um alle körperlichen Aktivitäten die Sie in den **vergangenen 7 Tagen** ausschließlich in Erholung, Sport, Leibesübungen und Freizeit verrichtet haben. Bitte keine Aktivitäten mit einbeziehen die Sie bereits angegeben haben.

20. Ohne die Fußwege die Sie bereits genannt haben, an wie vielen der **vergangenen 7 Tage** sind Sie in ihrer **Freizeit** für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung **zu Fuß** gegangen?

_____ **Tage pro Woche**

Kein zu Fuß gehen in der Freizeit

→ **Springen Sie weiter zu Frage 22**

21. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **zu Fuß Gehen** in ihrer Freizeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

22. Denken sie nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben Sie **anstrengende** körperliche Aktivitäten wie Aerobic, Laufen, schnelles Fahrradfahren oder schnelles Schwimmen in ihrer **Freizeit** verrichtet?

_____ **Tage pro Woche**

Keine anstrengenden Aktivitäten in der Freizeit

→ **Springen Sie weiter zu Frage 24**

23. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **anstrengender** körperlicher Aktivität in ihrer Freizeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

24. Denken Sie erneut nur an die körperlichen Aktivitäten die Sie für mindestens 10 Minuten ohne Unterbrechung verrichtet haben. An wie vielen der **vergangenen 7 Tage** haben sie **moderate** körperliche Aktivitäten wie Fahrradfahren bei gewöhnlicher Geschwindigkeit, Schwimmen bei gewöhnlicher Geschwindigkeit und Doppel-Tennis in ihrer **Freizeit** verrichtet?

_____ **Tage pro Woche**

Keine moderaten Aktivitäten in der Freizeit

→ **Springen Sie weiter zu Teil 5: Im Sitzen verbrachte Zeit**

25. Wie viel Zeit haben Sie für gewöhnlich an einem dieser Tage mit **moderater** körperlicher Aktivität in ihrer Freizeit verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

5. Im Sitzen verbrachte Zeit

Bei den letzten Fragen geht es um die Zeit die Sie bei der Arbeit, zuhause, bei Seminaren und in der Freizeit in Sitzen verbracht haben. Dies kann Zeit beinhalten wie Sitzen am Schreibtisch, Besuchen von Freunden und vor dem Fernseher sitzen oder liegen. Keine Zeit für Sitzen in einem motorisierten Verkehrsmittel mit einbeziehen von der Sie mir bereits erzählt haben.

26. Wie viel Zeit haben Sie in den **vergangenen 7 Tagen** mit **Sitzen** an **Wochentagen** verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

27. Wie viel Zeit haben Sie an den **vergangenen 7 Tagen** mit **Sitzen** an **Wochenendtagen** verbracht?

_____ **Stunden pro Tag**

_____ **Minuten pro Tag**

9 Danksagung

Mein größter Dank gilt dem Studienleiter. Nur durch Ihre Initiative war die Planung und Umsetzung unserer Studie überhaupt möglich. Bei Schwierigkeiten oder Fragen konnten wir jeder Zeit auf Ihre Unterstützungen zählen. Momente des Zweifelns haben Sie mit Ihrer Überzeugung und Ihrem Elan schnell vorübergehen lassen. Vielen Dank für Ihre Geduld und Ihre stets herzliche Art.

Mein besonderer Dank gilt dem Zweitgutachter für die Unterstützung unserer Studie durch Ihre Expertise.

Vielen Dank für die Hilfe in labormedizinischen Fragen und bei der Verarbeitung von gewonnenen Proben.

Vielen Dank an das gesamte Team der Leberambulanz der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz für die tatkräftige Unterstützung in der praktischen Umsetzung.

Mein Dank gilt auch dem IMBEI der Universitätsmedizin Mainz für die sehr hilfreiche statistische Beratung.

Vielen Dank allen Patientinnen und Patienten, die an unserer Studie teilgenommen haben.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt stets an mich geglaubt und mich in den richtigen Momenten an das Ziel erinnert.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Helena Bepaljko
Geburtsdatum und –ort: 24.08.1996, Essen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 04/2022 Assistenzärztin in der Klinik für Onkologie,
Gastroenterologie, Hämatologie und Innere Medizin
Alfried-Krupp-Krankenhaus Essen

12/2021 Approbation als Ärztin

Ausbildung

10/2016-11/2021 Studium der Humanmedizin, JGU Mainz
11/2021: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2020: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2017: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2014- 10/2016 Studium der Zahnmedizin, Goethe-Universität Frankfurt a.M.
09/2015: Naturwissenschaftliche Vorprüfung

2006-2014: Allgemeine Hochschulreife, B.M.V.-Schule Essen

Promotion

03/2019- 12/2022 I. Medizinische Klinik und Poliklinik,
Universitätsmedizin Mainz

Praktisches Jahr

06/2021-10/2021 Pädiatrie, Helios Klinikum Niederberg, Velbert
03/2021-06/2021 Innere Medizin, GZF Spital Laufenburg (CH)
11/2020-03/2021 Chirurgie, GKM Kemperhof Koblenz

Famulaturen

02/2020- 03/2020 Kinder- und Jugendpsychiatrie,
Rheinhessen Fachklinik Mainz

09/2019- 10/2019 Klinik und Poliklinik für Diagnostische und
Interventionelle Radiologie, Universitätsmedizin Mainz

03/2019- 04/2019 Hausarztpraxis Oberstadt, Mainz

02/2018- 03/2018 I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Gastroenterologie
und Hepatologie, Universitätsmedizin Mainz

Nebentätigkeit

10/2017- 03/2020

Wissenschaftliche Hilfskraft,
Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH),
Universitätsmedizin Mainz

Sprachkenntnisse

Deutsch und Serbokroatisch
Englisch und Französisch
Spanisch

fließend
gut in Wort und Schrift
Grundkenntnisse

Engagement

10/2018

2012-2014

Seit 2012

Helferin bei der „Teddy Klinik“ Mainz
Freiwilliger Schulsanitätsdienst
Mitwirkende auf dem ehrenamtlichen Weihnachtsmarkt
Essen-Margarethenhöhe