

Aus dem
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Klinik für Pädiatrie m. S. Gastroenterologie, Nephrologie und Stoffwechselmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Philip Bufler

Habilitationsschrift

Genetische, lipidomische und radiologische Merkmale der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung im Kindes- und Jugendalter

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Christian Hudert

Eingereicht: April 2021

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Baumann, Hannover

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Wirth, Wuppertal

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
1.1 Epidemiologie	4
1.2 Definition und Pathogenese	6
1.3 Natürlicher Verlauf	9
1.4 Genetische Prädisposition	9
1.5 Histologie	11
1.6 Klinisches Monitoring	12
1.7 Zielsetzung	13
2. Eigene Arbeiten	14
2.1 Genetische Determinanten von Steatose und Fibrose	14
<i>Hudert CA, Selinski S, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Thielhorn R, Berndt N, Golka K, Cadenas C, Reinders J, Henning S, Bufler P, Jansen PLM, Holzhütter HG, Meierhofer D, Hengstler JG, Wiegand S: Genetic determinants of steatosis and fibrosis progression in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. Liver International 2019 Mar;39(3):540-556.</i>	
2.2 Lipidomische Analyse bioaktiver Epoxyeicosanoide	33
<i>Kalveram L, Schunck WH, Rothe M, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Henning S, Bufler P, Meierhofer D, Zhang I, Weylandt KH, Wiegand S, Hudert CA: Regulation of the cytochrome P450 epoxyeicosanoid pathway is associated with distinct histologic features in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids 2021 Jan;164:102229.</i>	
2.3 Ultraschall-basierte Zeitharmonische Elastographie	43
<i>Hudert CA, Tzschätzsch H, Guo J, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Luck W, Müller HP, Baumgart DC, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I: US Time-harmonic Elastography: Detection of Liver Fibrosis in Adolescents with Extreme Obesity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Radiology 2018 Jul;288(1):99-106.</i>	
2.4 Multifrequenz Magnetresonanzelastographie	52
<i>Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Müller HP, Henning S, Bufler P, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I, Guo J: Tomoelastography for the Evaluation of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Investigative Radiology 2019 Apr; 54(4):198-203.</i>	
2.5 Elastographie-basiertes histopathologisches Scoring	59
<i>Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Kalveram L, Wiegand S, Braun J, Sack I, Guo J: How histopathologic changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease Influence in vivo liver stiffness. Acta Biomaterialia 2021 Mar 15;123:178-186.</i>	
3. Diskussion	69
4. Zusammenfassung	78
5. Literaturangaben	79
Danksagung	92
Erklärung	93

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALT	Alanin Aminotransferase
AUC	Fläche unter der ROC-Kurve Analyse
BMI	Körpermaßindex
CES	Zusammengesetzter Elastographie Score
CDC	Zentrum für Krankheitskontrolle
CYP	Cytochrom P450
DHA	Docosahexaensäure
DNL	<i>de novo</i> Lipogenese
EPA	Eicosapentaensäure
FA	Fettsäure
FDR	Falscherkennungsrate
GCKR	Glukokinase regulierendes Protein
HSD17B13	17-beta Hydroxysteroid Dehydrogenase
LD	Lipidtröpfchen
LS	Lebersteifigkeit
MAF	Häufigkeit des selteneren Allels
MBOAT7	membrangebundene O-Acyltransferase-Domäne 7
MRE	Multifrequenz Magnetresonanz Elastographie
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NASH-CRN	NASH Klinisches Forschungsnetzwerk
OR	Odds Ratio
PNPLA3	Patatin-ähnliches Phospholipase-Domänen-haltige Protein 3
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus
SWE	Scherwellenelastographie
T2D	Typ-2 Diabetes mellitus
THE	Ultraschall-basierte Zeitharmonische Elastographie
TM6SF2	Transmembran 6-Superfamilienmitglied 2
UCP2	mitochondriales Entkopplungsprotein 2
WD	Western Diet

„Phew, for a minute there I lost myself“

Radiohead 1997

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) im Kindes- und Jugendalter hat sich seit den 1980er Jahren mehr als verdoppelt [1]. Eine große epidemiologische Studie in Südkalifornien zeigte unter der Analyse von 7.884.844 Patientenjahren eine signifikant steigende Inzidenz bei Kindern und Jugendlichen von 36/100.000 im Jahr 2009 auf 58/100.000 im Jahr 2018 [2]. Die NAFLD ist heute in den Industrienationen bei Kindern und Jugendlichen wie bei Erwachsenen die häufigste chronische Lebererkrankung und betrifft ca. 1 Milliarde Menschen weltweit [3, 4]. Diese Entwicklung zeigt sich parallel zur dramatischen Zunahme der Adipositas [5, 6]. Die letzte große Datenerhebung innerhalb der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KIGGS) des Robert Koch Institutes ergab eine Prävalenz von 15,4% für das Vorliegen von Übergewicht und 5,9% für das Vorliegen einer Adipositas [7]. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist die Lage nochmals prekärer. So berichtet das Zentrum für Krankheitskontrolle (CDC) bei US-Amerikanern zwischen 2 und 19 Jahren eine Prävalenz der Adipositas von 18,5%. Somit sind in den Vereinigten Staaten in dieser Altersspanne absolut 13,7 Millionen Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene betroffen [8].

Der Goldstandard in der Evaluation der NAFLD, insbesondere in der Diagnose der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) liegt in der histologischen Untersuchung mittels einer Leberbiopsie [9]. Die bevölkerungsweite Bestimmung der Prävalenz der NAFLD ist indes mangels eines breit verfügbaren und diagnostisch sicheren nicht-invasiven Tests limitiert. In einer Autopsiestudie, welche bei 742 verstorbenen Kindern und Jugendlichen in Kalifornien zwischen 1993 und 2003 durchgeführt wurde, ergab sich eine Gesamtprävalenz der NAFLD von 9,6%, wobei 16% aller Kinder mit Übergewicht und 38% aller Kinder mit Adipositas betroffen waren [10]. In der gleichen Studie zeigte sich auch ein deutlicher Einfluss von Alter und Geschlecht auf das Entstehen einer NAFLD.

So stieg die Häufigkeit für das Vorliegen einer NAFLD relevant ab dem 10. Lebensjahr an, Jungen waren häufiger betroffen als Mädchen (11,1% vs 7,9%). Diese Verteilungsmuster konnten zwischenzeitlich auch in klinischen Querschnittsstudien reproduziert werden [11]. In einer Analyse von 408 Kindern und Jugendlichen mit Adipositas wiesen ca. ein Drittel aller Jungen und lediglich ca. ein Viertel aller Mädchen eine NAFLD auf [12].

Populationsweit werden zum Screening der NAFLD und Schätzung der Prävalenz die laborchemische Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT) [1, 13-17] sowie die Detektion der Leberverfettung mittels Sonographie [18-21] angewendet. Die diagnostische Genauigkeit der ALT als Biomarker für die NAFLD wurde in mehreren großen pädiatrischen Kohorten untersucht [22-24]. Hierbei zeigte sich, dass der obere Wert des Normalbereichs für die ALT im Kindes- und Jugendalter lange Zeit aufgrund der Unkenntnis bzw. Nichtbeachtung der NAFLD zu hoch festgesetzt wurde [23] und alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist [22]. In einer repräsentativen Populationsstudie mit 5586 Kindern und Jugendlichen ergab sich unter Anwendung eines cut-off von 30 U/l eine Prävalenz erhöhter ALT von 8% in der Gesamtpopulation, sowie eine signifikante Assoziation der ALT zu Insulinresistenz und Bauchumfang [15]. In der klinischen Praxis ist der Ultraschall des Abdomens die übliche radiologische Modalität zur Feststellung einer Leberverfettung, welche sich sonomorphologisch in einer Echogenitätserhöhung des Leberparenchyms im Vergleich zur Nierenrinde zeigt [25]. Während die Methode breit verfügbar und kostengünstig ist, fällt die diagnostische Genauigkeit bei niedriggradiger Verfettung deutlich ab und kann somit zu falsch negativen Ergebnissen bzw. einer Unterschätzung der tatsächlichen Prävalenz führen [26, 27].

In einer Vergleichsstudie zum Screening der NAFLD mittels ALT oder Ultraschall bei 99 Kindern und Jugendlichen mit Adipositas ergab sich für beide Modalitäten eine vergleichbare, lediglich mäßiggradige diagnostische Genauigkeit (AUC 0,74 bzw. 0,70), wobei die Kombination beider Parameter keinen weiteren Vorteil brachte [28]. In einer weiteren Arbeit wurden die aktuellen Empfehlungen zum Screening der European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN, ALT >45 U/l und/oder Steatosis in der Ultraschalluntersuchung) [29] und der North American Society For Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition (NASPGHAN, ALT > 2x der oberen geschlechts-spezifischen Norm) [30] in 344 Kindern und Jugendlichen mit Übergewicht oder Adipositas untersucht.

Hierbei war die Strategie der Kombination von ALT und Ultraschall der alleinigen Anwendung der ALT überlegen [31]. Je nach angewandter Methode ergibt sich heute in den pädiatrischen Gesamtpopulationen der Industrienationen eine Prävalenz der NAFLD von 3-10%, wobei die aggregierte mittlere Prävalenz 7,6% beträgt [11].

1.2 Definition und Pathogenese

Die NAFLD ist definiert durch das Vorliegen von makrovesikulären Lipideinlagerungen in mehr als 5% der Hepatozyten bei gleichzeitiger Abwesenheit konkurrierender Lebererkrankungen mit Steatosebildung (z.B. M. Wilson, Lysosomale saure Lipase Defizienz, Stauungsfettleber bei Rechtsherzinsuffizienz, Medikamenten-induzierte Toxizität) [32]. Hierbei ist kritisch anzumerken, dass aufgrund der hohen Prävalenz der Adipositas auch das gleichzeitige Bestehen einer NAFLD und einer konkurrierenden Lebererkrankung nicht auszuschließen ist und eine skrupulöse differentialdiagnostische Abklärung somit zwingend erforderlich ist [33, 34]. Vielmehr drückt sich in dieser frühen Definition das unzureichende Verständnis über die pathophysiologischen Mechanismen in der Entwicklung der NAFLD aus. Tatsächlich vollzieht sich zum aktuellen Zeitpunkt ein Paradigmenwechsel, welcher von der beschriebenen Definition über Ausschluss anderer Ätiologien zu einer pathophysiologisch begründeten positiven Definition führt. So wurde in Konsensarbeiten durch Expertengremien zunächst in der Erwachsenenmedizin [35], zuletzt jedoch auch für die pädiatrische Population [36] die Nomenklatur „Metabolic Associated Fatty Liver Disease“ (MAFLD) vorgeschlagen. Die Diagnose MAFLD kann gemäß der definierten Positivkriterien bei radiologischem, laborchemischem oder histologischem Nachweis einer Steatosis hepatis und gleichzeitigem Vorliegen von Übergewicht oder Adipositas bzw. einer diabetischen Stoffwechsellage direkt gestellt werden. Bei normalgewichtigen Kindern kann die MAFLD bei gleichzeitigem Vorliegen einer Steatosis hepatis und mindestens zwei metabolischen Risikofaktoren (Hypertonus, Hypertriglyceridämie, erniedrigtes HDL-Cholesterin) über alters- und geschlechtsspezifische klinische Variablen diagnostiziert werden.

Man geht heute davon aus, dass die NAFLD eine multifaktorielle Erkrankung darstellt, die eng mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist und vorrangig durch Lifestyle

und genetische Prädisposition beeinflusst wird [37]. Schon in der Erstbeschreibung der NASH wiesen fast alle der berichteten Patienten eine oder mehrere Komponenten des metabolischen Syndroms auf [38]. Seitdem ist die enge pathophysiologische Assoziation der NAFLD insbesondere zur Insulinresistenz gut dokumentiert [39]. Die Acanthosis nigricans als Folge der Hyperinsulinämie wird bei ca. 30-50% der Jugendlichen mit NAFLD beobachtet [40]. Eine Besonderheit im Kindes- und Jugendalter ist hierbei die physiologische Insulinresistenz während der Pubertät, welche unabhängig von BMI und Körperfettmasse während der Tannerstadien 2-4 ansteigt und bis zum Ende der Pubertät rückläufig ist [41]. Das Vorliegen weiterer metabolischer Risikofaktoren erhöht nicht nur das Risiko für die Entwicklung einer NAFLD auf 60-70% [42], sondern auch für die Entwicklung einer NASH. So wiesen in einer multizentrischen Studie fast 30% der 675 untersuchten Kinder- und Jugendlichen mit NAFLD einen prädiabetischen Glukosestoffwechsel oder bereits manifesten Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) auf. Die Prävalenz einer NASH war bei Kindern mit T2DM im Vergleich zu Kindern mit normalem Glukosestoffwechsel fast verdoppelt (43,2% vs. 22%) [43].

Pathophysiologisch fördert die Insulinresistenz den hepatischen Influx von freien Fettsäuren, die in Triglyzeride umgewandelt werden. Wird die Kapazität der Leber zum Export von Triglyzeriden über Very Low Density Lipoprotein (VLDL) oder die mitochondriale und peroxisomale β -Oxidation von Fettsäuren überschritten kommt es zur hepatozellulären Speicherung der Triglyzeride in Form von Lipidtröpfchen und damit letztlich zur Steatosis hepatis, dem Hauptmerkmal der NAFLD. Die hepatozelluläre Speicherung der Triglyzeride ist an sich nicht hepatotoxisch, bildet jedoch die Grundlage für die Entwicklung der NASH [44]. Ein weiterer wichtiger pathophysiologischer Mechanismus für die Entwicklung der NAFLD ist die *de-novo* Lipogenese (DNL), welche ebenfalls durch die Insulinresistenz stimuliert und insbesondere über die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und ChREBP vermittelt wird [45]. Hierbei kommt als Substrat vor allem der Fruktose eine herausragende Bedeutung zu, welche sowohl die beteiligten Enzyme der DNL, als auch SREBP-1c hochreguliert [46]. In einer populationsweiten Studie untersuchten Vos et al. den Fruktosekonsum in den Vereinigten Staaten zwischen 1988 und 1994. Der höchste Fruktosekonsum wurde mit einem Anteil von 22,4% an den Gesamtkohlenhydraten bei Jugendlichen festgestellt und war maßgeblich durch stark fruktosehaltige Getränke

bedingt [47]. Der Fruktosekonsum ist bei Kindern und Jugendlichen mit NAFLD ein unabhängiger Risikofaktor für das Vorliegen einer NASH [48].

Die Adipositas geht mit einer niedriggradigen systemischen entzündlichen Aktivität einher, welche maßgeblich durch Adipokine vermittelt wird. Adipokine (u.a. Adiponectin, Leptin und Resistin) sind pro- oder antiinflammatorische Peptidmediatoren bzw. Zytokine, die vom viszeralen Fettgewebe synthetisiert und sezerniert werden und eine bedeutsame endokrine Funktion im Leberstoffwechsel haben. Ihre Rolle in der Initiierung und Unterhaltung entzündlicher Aktivität in der NASH über die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege (z.B. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) ist gut dokumentiert [49, 50]. In einer klinischen Studie von 20 Jugendlichen mit NASH und erfolgter bariatrischer Chirurgie konnten in sequentiellen Biopsien von Leber- und viszeralen Fettgewebe ein Jahr nach der Operation und einem mittleren Gewichtsverlust von 21,5% des Körpergewichts, veränderte Expressionsprofile von Adiponectin und Resistin direkt mit einer verbesserten Leberhistologie der NASH assoziiert werden [51].

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Genese der NASH wird durch die Darm-Leber-Achse beschrieben. Hierbei können sowohl die veränderte Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms als auch eine erhöhte Darmpermeabilität [52] zu einer vermehrten Exposition durch Endotoxine und andere bakterielle Erkennungsstrukturen in der Leber mit konsekutiver inflammatorischer Antwort führen [53]. Bei Jugendlichen mit NASH ist die Diversität des fäkalen Mikrobioms im Vergleich zu gesunden Kontrollen eingeschränkt und die genomische Signatur für bakterielle Geißelantigene signifikant mit dem Fibrorestadium assoziiert [54].

Entscheidend für die hepatozelluläre Schädigung im Rahmen der NASH ist die Lipotoxizität. Eine besonders schädliche Rolle wird für Palmitinsäure, Lysophosphatidylcholine und Ceramide diskutiert [55]. Mechanismen der Lipotoxizitäts-vermittelten Zellschädigung sind oxidativer und endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress, mitochondriale Dysfunktion sowie die Aktivierung von proapoptotischen Signalkaskaden (c-Jun N-terminale Kinase, JNK) und Todesrezeptoren [56]. Sowohl über den Zelltod durch Apoptose, als auch über subletale, ballonierte Hepatozyten (Nekroinflammation) können gewebeständige Makrophagen, und in der Folge hepatische Sternzellen zu Myofibroblasten aktiviert werden. Aktivierte Myofibroblasten sind die Haupteffektorzellen für die Freisetzung extrazellulärer Matrixproteine in der NASH-assoziierten Leberfibrogenese [57].

1.3 Natürlicher Verlauf

Die NAFLD umfasst ein weitreichendes Spektrum an Erkrankungsphänotypen einschließlich der benignen Nicht-alkoholischen Fettleber (NAFL), der chronisch-entzündlich aktiven NASH, der NASH-assoziierten Zirrhose und dem NASH-assoziierten hepatozellulären Karzinom (NASH-HCC) [44, 58]. Eine frühe Manifestation der NAFLD im Kindes- und Jugendalter bedingt durch die Länge der Krankheitsdauer ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung schwerer Komplikationen, gegebenenfalls schon im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter [59].

In einer prospektiven dänischen Studie, welche die anthropometrischen Daten von 244.464 Schulkindern in Kopenhagen auswertete, führte eine frühe Gewichtszunahme im Alter zwischen 7- und 13 Jahren nicht nur zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer NAFLD im Erwachsenenalter, sondern auch für das spätere Auftreten einer Leberzirrhose [60].

Die genaue Rate der Progression der NAFLD bei Kindern und Jugendlichen ist aufgrund nur vereinzelter longitudinaler Fallstudien bisher schwer einzuschätzen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gerade bei präpubertären oder pubertären Jungen ein erhöhtes Risiko für einen raschen Verlauf mit Entwicklung einer fortgeschrittenen Fibrose besteht [61, 62]. Dies ist insbesondere bedeutsam, da die Fibrose der entscheidende Parameter für das klinische Outcome und die Mortalität im Rahmen der NAFLD darstellt [63, 64]. Weiterhin sind Fälle von NASH-assoziiierter Zirrhose bereits bei Kindern beschrieben [65]. Im Erwachsenenalter ist die NASH-assoziierte Zirrhose heute die zweithäufigste Indikation zur Lebertransplantation in den Vereinigten Staaten von Amerika [66]. Von 2003 bis 2014 hat sich die Häufigkeit der Lebertransplantation aufgrund einer NASH-Zirrhose zudem um 162% dramatisch erhöht [67], während die bisher führende Indikation der HCV-assoziierten Zirrhose seit der Einführung der hoch effektiven, antiviral wirksamen Therapien rückläufig ist [68].

1.4 Genetische Prädisposition

Die unterschiedliche Prävalenz der NAFLD in verschiedenen Populationen mit ähnlich verteilten Umweltfaktoren sowie die stark divergierenden interindividuellen Krankheitsverläufe bei vergleichbarem Lifestyle und anthropometrischen Daten legen

einen relevanten genetischen Einfluss auf den Phänotyp der Erkrankung nahe [69]. So kommt es nur in ca. 25% der Patienten mit NAFLD zur Entwicklung einer NASH [58]. Anhand von Familien- und Zwillingsstudien wurde ein erhöhtes familiäres Risiko für die NAFLD bei erstgradig Verwandten sowie eineiigen Zwillingen nachgewiesen [70]. Genomweite Assoziationsstudien konnten in Erwachsenenpopulationen inzwischen mehrere Varianten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer NAFLD identifizieren [71-73].

Die Risikovariante I148M für das Patatin-ähnliche Phospholipase-Domänen-haltige Protein 3 kodierende Gen (*PNPLA3*) ist zum jetzigen Zeitpunkt der am besten charakterisierte Einflussfaktor nicht nur auf das Risiko der Entstehung einer NAFLD, sondern auch für einen progredienten Verlauf mit Ausbildung einer NASH und den NASH-assoziierten Komplikationen [74]. Weitere Varianten mit gesichertem Einfluss auf die NAFLD beim Erwachsenen sind beschrieben für das Transmembran-6 Superfamilienmitglied 2 (*TM6SF2*) [75], die membrangebundene O-Acyltransferase-Domäne 7 (*MBOAT7*) [76] sowie die 17-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 13 (*HSD17B13*) [77].

Für Kinder- und Jugendliche ist die Studienlage zur Untersuchung von Risikovarianten basierend auf einer histologisch gesicherten NAFLD begrenzt [78]. In der bereits zitierten Autopsiestudie von Schwimmer et al. [10] war nach Korrektur für den Körpermaßindex (BMI) das Risiko für das Vorliegen einer NAFLD bei Kindern mit hispanischem Hintergrund im Vergleich zu Kindern mit afroamerikanischem Hintergrund um das 5-fache erhöht.

Diese Beobachtung konnte auch populationsweit sowohl bei Erwachsenen [79] als auch bei Kindern [1] bestätigt werden. In einer umfassenden Meta-Analyse war die Frequenz der Trägerschaft des seltenen Allels (MAF) für *PNPLA3* bei Erwachsenen mit hispanisch-amerikanischem Hintergrund (0,40) im Vergleich zu einem europäisch-kaukasischem Hintergrund (0,23) und afroamerikanischem Hintergrund (0,15) erhöht [80]. In einer Studie mit 327 Kindern und Jugendlichen mit hispanischem Hintergrund lag die MAF für *PNPLA3* bei 0,51 wobei bei 38% eine NAFLD festgestellt wurde und der Einfluss der Risikovariante auf den Leberfettgehalt bereits bei Kindern zwischen 8 und 10 Jahren signifikant war [81].

1.5 Histologie

Historisch ist die Benennung der NAFLD auf histopathologische Untersuchungen zurückzuführen. In seiner im Juli 1980 veröffentlichten Arbeit „Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease“ berichtet der emigrierte deutsche Pathologe Jürgen Ludwig von 20 Patienten mit histologischem Bild einer Alkoholischen Lebererkrankung, welche jedoch anamnestisch keinerlei Alkoholkonsum aufwies [38].

Während die überwiegend makrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten das grundlegende histologische Bild der NAFLD prägt, ist die NASH durch granulozytäre Entzündungsinfiltrate, die Steatohepatitis gekennzeichnet [82]. Diese inflammatorischen Foci können mit dem Auftreten ballonierter Hepatozyten (deutlich vergrößerte Zellen mit aufgelöster Keratinskelettstruktur und hellem, flockigem Zytoplasma, teils mit Mallory-Denk Körperchen) vergesellschaftet sein und kennzeichnen letztlich den Zelluntergang und die entsprechende Abräumreaktion im Rahmen der Leberschädigung [83, 84]. Die gemeinsame Endstrecke vieler hepatischer Schädigungsmuster liegt in der Bildung von Fibrose als Ausdruck überschießender Wundheilungsmechanismen [85].

Während die Steatose sowie inflammatorische Aktivität und Fibrosebildung bei Erwachsenen typischerweise zentrolobulär lokalisiert ist, können Kinder und Jugendliche ein besonderes Zonierungsmuster der NAFLD aufweisen. So konnten Schwimmer et al. 2005 zeigen, dass vor allem bei jüngeren Kindern eine portale Lokalisation der NAFLD überwiegt [86].

Für die Quantifizierung und Bewertung der histologischen Charakteristika wird der von Kleiner und Brunt entwickelte NASH-CRN (NASH Clinical research network) Score als Referenzstandard verwandt [87, 88]. Der NASH-CRN Score basiert auf dem „Grading“ der Steatose, lobulären Inflammation und hepatozellulären Ballonierung sowie dem „Staging“ der Fibrose. Weitere Gruppen haben die histologische Beschreibung und Quantifizierung der portalen Inflammation bei der pädiatrischen NAFLD etabliert [89-91].

1.6 Klinisches Monitoring

Das klinische Management der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung bedingt eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit von pädiatrischer Endokrinologie mit Schwerpunkt Adipositas und pädiatrischer Hepatologie [92]. Hierbei ist aufgrund der interindividuell deutlich divergierenden Krankheitsaktivität insbesondere die Risikostratifizierung und Erkennung progredienter Verläufe von entscheidender Bedeutung. Dementsprechend ist das Monitoring ein wichtiger Baustein in der klinischen Beobachtung und Bewertung der therapeutischen Maßnahmen. Diese bestehen zum Zeitpunkt vor allem in der Lifestyle-Therapie der Adipositas [93-97]. Die Verlaufsdokumentation der anthropometrischen Daten können wichtige Rückschlüsse auf den Erfolg der Behandlung der NAFLD geben. So zeigte eine interventionelle Erwachsenenstudie mit sequentieller Biopsie bei 261 Patienten mit NAFLD, dass eine Gewichtsreduktion von mindestens 5% des Körpergewichts zu einem Rückgang der Steatose führt, während eine Gewichtsreduktion von mindestens 10% die entzündliche Aktivität der NASH reduziert sowie mit einem Rückgang der Fibrose assoziiert ist [98]. Die Bestimmung der Transaminasen ist in der klinischen Praxis der am häufigsten genutzte laborchemische Indikator für den Verlauf der NAFLD, obwohl die Sensitivität für die Beurteilung der Progredienz der NAFLD unzureichend ist [99]. So kann eine NAFLD mit bereits relevanter fibrotischer Beteiligung auch bei normwertigen Transaminasen vorliegen [100].

Für die nicht-invasive Quantifizierung der Fibrose wurden verschiedene klinische Fibrosescores entwickelt, welche sich durch die Kombination aus laborchemischen Routineparametern und klinischen Variablen auszeichnen [101-104]. Die Evaluation in pädiatrischen Kohorten mit histologisch gesicherter NAFLD ergab jedoch bisher für keinen der Scores einen reproduzierbaren relevanten diagnostischen Vorteil im Vergleich zur alleinigen Bestimmung der Transaminasen [105].

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Fibrose besteht in der Bestimmung der Lebersteifigkeit (LS) mittels der Elastographie [106, 107]. Hierbei stehen inzwischen unterschiedliche Techniken zur Verfügung. Die transiente Elastographie (Fibroscan®) und die Scherwellenelastographie (SWE) sind hierbei die am meisten genutzten Ultraschall-gestützten Elastographieverfahren [108]. Weiter wurde die Magnetresonanzelastographie (MRE) bereits bei Erwachsenen und Jugendlichen mit NAFLD evaluiert [109-113].

1.7 Zielsetzung der Habilitationsschrift

Die pädiatrische NAFLD stellt eine immense Herausforderung an die medizinische Versorgung dar:

- a) durch die hohe Prävalenz und die lange Zeitspanne der Erkrankungsdauer bei einer kindlichen Manifestation erhöht sich entsprechend das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung von spezifischen Komplikationen
- b) das Verständnis für die Pathogenese und den natürlichen Verlauf der Erkrankung ist noch immer in hohem Maße unvollständig, was sich auch in dem Fehlen einer spezifischen Therapie (oder mechanistischer Targets) ausdrückt
- c) es stehen keine adäquaten nicht-invasiven Methoden zur Diagnose und Langzeit-Monitoring zur Verfügung

Die nachfolgend in dieser Schrift zusammengefassten Arbeiten setzen sich nunmehr alle mit diesen Herausforderungen auseinander und können in zwei übergeordnete Themen eingeteilt werden:

- 1) Zum einen sollen pathogenetische Aspekte der kindlichen NAFLD genauer charakterisiert werden. Hierfür wurden genetische Einflussfaktoren auf den Phänotyp sowie die Bedeutung von Fettsäureprofilen und bioaktiver Lipidmediatoren für die Schwere der Erkrankung in einer pädiatrischen Kohorte mit bioptisch gesicherter NAFLD untersucht.
- 2) Des Weiteren sollen nicht-invasive Methoden zur Risikostratifizierung und klinischen Verlaufsbeobachtung der NAFLD evaluiert werden. Hierfür wurden in einer Kohorte von Kindern und Jugendlichen mit NAFLD parallel zwei neue radiologische Verfahren zur Steifigkeitsmessung des Leberparenchyms basierend auf dem Prinzip der Elastographie angewandt und ein neues histopathologisches Scoring System zur genaueren Quantifizierung mechanoelastischer Veränderungen der Leber entwickelt.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Genetische Determinanten von Steatose und Fibrose

Hudert CA, Selinski S, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Thielhorn R, Berndt N, Golka K, Cadenas C, Reinders J, Henning S, Bufler P, Jansen PLM, Holzhütter HG, Meierhofer D, Hengstler JG, Wiegand S: Genetic determinants of steatosis and fibrosis progression in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. Liver International 2019 Mar;39(3):540-556.

In dieser Arbeit wurden in einer Kohorte von 70 Kindern und Jugendlichen mit NAFLD 14 aus Erwachsenenpopulationen bekannte genetische Risikovarianten untersucht. Hierfür wurde zum einen eine Fall-Kontroll Studie im Vergleich zu 200 gesunden Erwachsenen durchgeführt, um das Risiko für die Entwicklung einer NAFLD zu bestimmen. Zum anderen wurden innerhalb der Kinderkohorte Assoziationen der Varianten zu histologischen Eigenschaften analysiert. Proteomische Profile aus dem Lebergewebe und Serum aller Kinder und Jugendlichen wurden in Bezug auf die homozygote Trägerschaft des Wild-Typ oder der Risikovariante untersucht. Zuletzt wurde ein mathematisches Modell zur Simulation grundlegender Stoffwechselfunktionen des Hepatozyten (HEPATOKIN1) angewandt, um die Auswirkung der Risikovarianten auf die hepatische metabolische Funktion zu bestimmen.

Hintergrund und Ziele: Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste chronische Lebererkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Im Vergleich zum Erwachsenen kann bei der pädiatrischen NAFLD im Besonderen eine periportale Lokalisierung der Erkrankung vorliegen, welche mit dem Auftreten einer fortgeschrittenen Fibrose assoziiert ist. Diese Studie zielte nun auf die Untersuchung der Bedeutsamkeit von genetischen Risikofaktoren auf histologische Erkrankungsmuster und den Schweregrad der NAFLD im Kindes- und Jugendalter.

Methoden: Wir untersuchten 14 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in einer Kohorte von 70 Adoleszenten mit bioptisch gesicherter NAFLD. Der Genotyp wurde in Vergleich zu einer gesunden Erwachsenenkohorte (n= 200) gesetzt und in Bezug auf den histologische Schweregrad der Erkrankung und proteomische Profile aus dem Lebergewebe analysiert.

Ergebnisse: Drei der 14 SNPs waren nach Korrektur für multiples Testen (FDR) signifikant mit der pädiatrischen NAFLD assoziiert, rs738409 (PNPLA3, $P= 2,8 \times 10^{-6}$), rs1044498 (ENPP1, $P= 0,0091$) sowie rs780094 (GCKR, $P= 0,0281$). Der Schweregrad der Steatose war entscheidend beeinflusst durch die Variante rs738409 (OR=3.25; 95% CI: 1.72-6.52, FDR-adjustiert $P= 0.0070$). Die stärksten Determinanten für den Schweregrad der Fibrose waren

rs1260326, rs780094 (beide GCKR) und rs659366 (UCP2). Die PNPLA3 I148M Variante zeigte eine Assoziation mit einem portalen Verteilungsmuster der Steatose, Inflammation und Fibrose. Die Untersuchung der proteomischen Profile aus dem Lebergewebe zeigte abnehmende Mengen an GCKR Protein mit steigender Trägerschaft des rs1260326/rs780094 Minor-Allel und eine Herunterregulierung des Retinol-Signalweges bei homozygoten Trägern von rs738409 G/G. Die mathematische Modellierung des hepatozytären Metabolismus stellte die funktionelle Relevanz von PNPLA3, GCKR und UCP2 für die Entwicklung einer NAFLD heraus.

Schlussfolgerungen: Diese Arbeit erbrachte Evidenz für die Bedeutung von *PNPLA3* sowohl als Determinante eines portalen Verteilungsmusters, als auch des Schweregrades portaler Fibrose und eines beeinträchtigten hepatischen Retinolmetabolismus bei Kindern und Jugendlichen mit NAFLD.

(Dieser Text entspricht inhaltlich dem Abstract der oben genannten Publikation [114],
Übersetzung durch den Autor.)

Liver International 2019 Mar;39(3):540-556.

<https://doi.org/10.1111/liv.14006>

Genetic determinants of steatosis and fibrosis progression in paediatric non-alcoholic fatty liver disease.

Hudert CA, Selinski S, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Thielhorn R, Berndt N, Golka K, Cadenas C, Reinders J, Henning S, Bufler P, Jansen PLM, Holzhütter HG, Meierhofer D, Hengstler JG, Wiegand S.

2.2 Lipidomische Analyse bioaktiver Epoxyeicosanoide

*Kalveram L, Schunck WH, Rothe M, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Henning S, Bufler P, Meierhofer D, Zhang I, Weylandt KH, Wiegand S, **Hudert CA**: Regulation of the cytochrome P450 epoxyeicosanoid pathway is associated with distinct histologic features in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 2021 Jan;164:102229.*

Neben der genetischen Prädisposition spielen Umweltfaktoren wie der Ernährungsstil eine entscheidende Rolle in der Genese der NAFLD. In der folgenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss von essentiellen omega-3 und omega-6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren und den aus ihnen gebildeten Lipidmediatoren auf den Schweregrad der pädiatrischen NAFLD.

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) stellt ein bedeutsames Gesundheitsrisiko für Kinder mit Adipositas dar, für welches zum Zeitpunkt keine spezifische Therapie verfügbar ist. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Epoxyeicosanoide, eine Klasse bioaktiver Lipidmediatoren, welche durch die Cytochrom P450 (CYP) Epoxygenasen aus essentiellen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA) generiert und über die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) inaktiviert werden, eine protektive Wirkung auf die NAFLD aufweisen. Wir führten eine umfangreiche lipidomische Analyse aus Lebergewebe und Blutproben bei 40 Kindern mit NAFLD durch. Proteomanalysen aus dem Lebergewebe wurden angewandt, um die Expression der CYP Epoxygenasen und sEH zu bestimmen.

Hepatische Epoxyeicosanoide waren mit steigendem Grad der Steatose signifikant höher detektiert, während ihre entsprechenden Stamm-PUFA unverändert blieben. Gleichzeitig zeigte sich eine erhöhte Aktivität der CYP Epoxygenasen während die Proteinexpression und die Aktivität der sEH verringert war.

Im Unterschied hierzu zeigte sich mit steigendem Grad der Fibrose ein Trend zu einer niedrigeren Detektion der Epoxyeicosanoide, begleitet durch eine geringere Proteinexpression und Aktivität der hepatischen CYP Epoxygenasen.

Zusammenfassend geben diese Ergebnisse Hinweise auf die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung des CYP Epoxygenase/sEH Signalweges zur Behandlung der NAFLD.

(Dieser Text entspricht inhaltlich dem Abstract der oben genannten Publikation [115], Übersetzung durch den Autor.)

Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids 2021 Jan;164:102229.

<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102229>

Regulation of the cytochrome P450 epoxyeicosanoid pathway is associated with distinct histologic features in pediatric non-alcoholic fatty liver disease.

Kalveram L, Schunck WH, Rothe M, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Henning S, Bufler P, Meierhofer D, Zhang I, Weylandt KH, Wiegand S, Hudert CA.

2.3 Ultraschall-basierte Zeitharmonische Elastographie

Hudert CA, Tzschaetzsch H, Guo J, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Luck W, Müller HP, Baumgart DC, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I: US Time-harmonic Elastography: Detection of Liver Fibrosis in Adolescents with Extreme Obesity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Radiology 2018 Jul;288(1):99-106.

In der folgenden Arbeit wurde eine Ultraschall-basierte Elastographiemodalität zur nicht-invasiven Quantifizierung der Lebersteifigkeit als Maß für den Grad der Leberfibrose bei der pädiatrischen NAFLD angewandt.

Zielstellung: Bestimmung der *in-vivo* Lebersteifigkeit (LS) durch die Ultraschall-basierte Zeitharmonische Elastographie (THE) in einer Kohorte von pädiatrischen Patienten mit Übergewicht bis hin zur extremen Adipositas und gesicherter Nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung, und Evaluation der diagnostischen Genauigkeit der THE zur Differenzierung von Fibrosestadien im Rahmen einer fortgeschrittenen Erkrankung.

Materialien und Methoden: In dieser prospektiven Studie wurden 67 Adoleszente (Alter 10 – 17 Jahre, mittlerer Körpermaßindex 34,7 kg/m², Spannweite 21,4 – 50,4 kg/m²) mit bioptisch gesicherter NAFLD eingeschlossen. Die LS wurde mittels THE basierend auf einer externen Stimulation mit kontinuierlichen Vibrationen im Frequenzbereich von 30 Hertz bis 60 Hertz und einer Ultraschall-geführten B-Modus Echtzeitmessung von Scherwellenprofilen mit einer Gewebepenetration bis zu 14cm gemessen. Die diagnostische Genauigkeit der THE zur Klassifizierung der Leberfibrose wurde durch eine Analyse der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) bestimmt. Die Trennwerte der LS zur Differenzierung der einzelnen Fibrosestadien wurden mittels des höchsten Youden-Index bestimmt.

Ergebnisse: Die THE konnte bei allen Patienten durchgeführt werden (Fehlerrate 0%), einschließlich bei 47 Adoleszenten (70%) mit extremer Adipositas (BMI > 99,5. Perzentile). Die AUC Analyse ergab 0,88 (95% Konfidenzintervall [CI]: 0,80; 0,96) für die Detektion jeglicher Fibrose (\geq F1), 0,99 (95% CI: 0,98; 1,00) für die Detektion moderater Fibrose (\geq F2) und 0,88 (95% CI: 0,80; 0,96) für die Detektion fortgeschrittener Fibrose (\geq F3). Die genauesten Grenzwerte zur Abgrenzung von mindestens F1 lag bei einer Scherwellengeschwindigkeit von 1,52 m/s, zur Abgrenzung von mindestens F2 bei 1,62 m/s und zur Abgrenzung von mindestens F3 bei 1,64 m/s.

Schlussfolgerung: Die THE erlaubt die akkurate Detektion von bereits moderater Fibrose, insbesondere auch bei pädiatrischen Patienten mit extremer Adipositas. Größere klinische Studien sind notwendig, um die Genauigkeit der THE zu bestätigen.

(Dieser Text entspricht inhaltlich dem Abstract der oben genannten Publikation [116], Übersetzung durch den Autor.)

Radiology 2018 Jul;288(1):99-106.

<https://doi.org/10.1148/radiol.2018172928>

US Time-harmonic Elastography: Detection of Liver Fibrosis in Adolescents with Extreme Obesity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

Hudert CA, Tzschätzsch H, Guo J, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Luck W, Müller HP, Baumgart DC, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I.

2.4 Multifrequenz Magnetresonanzelastographie

Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Müller HP, Henning S, Bufler P, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I, Guo J: Tomoelastography for the Evaluation of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Investigative Radiology 2019 Apr; 54(4):198-203.

In der folgenden Arbeit wurde nun analog zur vorangegangenen Arbeit eine weitere Elastographiemodalität, hier basierend auf der Magnetresonanztomographie, zur Quantifizierung von Steatose und Fibrose bei der pädiatrischen NAFLD angewandt.

Ziele: Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist heute die häufigste chronische Lebererkrankung sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Die nicht-invasive Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung ist zum Zeitpunkt jedoch eine diagnostische Herausforderung. In dieser Studie wenden wir die Multifrequenz Magnetresonanzelastographie (MRE) zur Quantifizierung von Steatose und Fibrose bei Adoleszenten mit NAFLD an.

Methoden: Fünfzig Adoleszente (Alter 10 – 17 Jahre, mittlerer Körpermaßindex 33,9 kg/m², Spannweite 21,4 – 42,1 kg/m²) mit bioptisch gesicherter NAFLD wurden in diese prospektive Studie eingeschlossen. Die MRE wurde unter kontinuierlicher externer Stimulation mittels Vibrationen im Frequenzbereich von 30 Hertz bis 60 Hertz durchgeführt und es wurden mittels rechnerischer Nachbearbeitung die beiden Messgrößen Penetrationsrate a und Scherwellengeschwindigkeit c ermittelt. Die hepatische Fettfraktion (HFF) wurde mittels der Dixon Methode bestimmt. Die diagnostische Genauigkeit der MRE zur Klassifizierung der Steatose und Fibrose der Leber wurde durch die Analyse der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) untersucht.

Ergebnisse: Der MRE Parameter c ist assoziiert mit dem Grad der Fibrose während a mit dem Grad der Steatose korreliert. Die AUC Analyse ergab 0,79 (95% Konfidenzintervall [CI]: 0,66; 0,92) für die Detektion jeglicher Fibrose ($\geq F1$), 0,91 (95% CI: 0,83; 0,99) für die Detektion moderater Fibrose ($\geq F2$) und 0,90 (95% CI: 0,80; 0,99) für die Detektion fortgeschrittener Fibrose ($\geq F3$). Zur Quantifizierung der Steatose ergaben sich für die Detektion moderater ($S \geq 2$) und schwerer ($S = 3$) Steatose AUC Werte von jeweils 0,87 (95% CI: 0,76-0,97 für $S \geq 2$ und 0,77-0,96 für $S = 3$).

Schlussfolgerung: Die MRE der Leber erlaubt innerhalb einer Einzeluntersuchung die gleichzeitige Bestimmung von zwei unabhängigen Parametern mit hoher diagnostischer Genauigkeit für die Detektion moderater und fortgeschrittener Fibrose als auch moderater und schwerer Steatose im Rahmen der pädiatrischen NAFLD.

(Dieser Text entspricht inhaltlich dem Abstract und der oben genannten Publikation [117], Übersetzung durch den Autor.)

Investigative Radiology 2019 Apr; 54(4):198-203.

<https://doi.org/10.1097/rli.0000000000000529>

Tomoelastography for the Evaluation of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Bläker H, Loddenkemper C, Müller HP, Henning S, Bufler P, Hamm B, Braun J, Holzhütter HG, Wiegand S, Sack I, Guo J.

2.5 Elastographie-basiertes histopathologisches Scoring

Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Kalveram L, Wiegand S, Braun J, Sack I, Guo J: How histopathologic changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease influence in vivo liver stiffness. Acta Biomaterialia 2021 Mar 15;123:178-186.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss dezidierter histopathologischer Charakteristika auf die Gewebesteifigkeit der Leber in zwei vorbeschriebenen Subkohorten von Kindern und Jugendlichen mit histologisch gesicherter NAFLD untersucht und ein Score zur Quantifizierung der biomechanischen Eigenschaften der Leber entwickelt.

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste chronische Lebererkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Bei ca. 30% der Patienten kommt es zu einem Progress der NAFLD zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), welche durch eine Leberbiopsie diagnostiziert wird. Die Lebersteifigkeit (LS), welche durch elastographische Modalitäten quantifiziert werden kann, ist ein vielversprechender Parameter für die nicht-invasive Evaluation der NAFLD und NASH bei pädiatrischen Patienten. Die Verknüpfung der LS und spezifischer histopathologischer Merkmale, welche zur klinischen Klassifikation der pädiatrischen NAFLD angewandt werden, ist bisher jedoch nicht hinreichend definiert. In der Literatur berichtete Daten zur LS können aufgrund unterschiedlicher Messverfahren stark variieren. Die Ultraschall-basierte Zeitharmonische Elastographie (THE) und die Magnetresonanzelastographie (MRE) nutzen die gleiche mechanische Stimulation. Dies erlaubt uns den direkten Vergleich der LS bei bioptisch-gesicherter NAFLD, welche zuvor mittels THE bei 67 und MRE bei 50 Adoleszenten erhoben wurde. In der vorliegenden Arbeit haben wir den Einfluss von sieben eigenständigen histopathologischen Merkmalen auf die LS untersucht, einschließlich der septalen Infiltration, fibrösen Brückenbildung, perizellulären Fibrose, hepatozellulären Ballonierung, portale Entzündung, lobulären Entzündung und Steatose.

Die LS korrelierte hoch mit der Ausbildung von portaler und lobulärer Fibrose, sowie dem Ausmaß an hepatozellulärer Ballonierung, während keine unabhängige Assoziation zu Entzündung (portal oder lobulär) oder Steatose gefunden wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Composite Elastographie Score (CES) entwickelt, welcher die vier als mechanisch relevant identifizierten Merkmale beinhaltet. Die CES-relevanten histopathologischen Merkmale waren mit einem zonalen Verteilungsmuster der pädiatrischen NAFLD assoziiert. Mechanostrukturelle Veränderungen der Leber im Rahmen einer Progression der NAFLD können histopathologisch mittels des CES klassifiziert werden, und dieser basierend auf der Messung der LS durch die THE nicht-invasiv bestimmt werden.

(Dieser Text entspricht inhaltlich dem Abstract der oben genannten Publikation [118],
Übersetzung durch den Autor.)

Acta Biomaterialia 2021 Mar 15;123:178-186.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.019>

How histopathologic changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease Influence in vivo liver stiffness.

Hudert CA, Tzschätzsch H, Rudolph B, Loddenkemper C, Holzhütter HG, Kalveram L, Wiegand S, Braun J, Sack I, Guo J.

3. Diskussion

Die wissenschaftliche Erarbeitung der NAFLD hat in den letzten zwei Jahrzehnten im Rahmen der wachsenden klinischen Bedeutsamkeit einen exponentiellen Zuwachs erfahren. Ergibt die Literaturrecherche nach dem Begriff „NAFLD“ im gesamten letzten Jahrhundert noch lediglich 62 Treffer, finden sich von 2000 bis 2009 bereits 1919 und von 2010 bis 2019 17531 Einträge. Allein im Jahr 2020 wurden 3548 Arbeiten zum Thema veröffentlicht (Resultate nach eigener Recherche über Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) zum Zeitpunkt der Niederschrift im Januar 2021 mittels folgender Suchbegriffe:

(NAFLD) AND (("1900/01/01"[Date - Entry] : "1999/12/31"[Date - Entry]));

(NAFLD) AND (("2000/01/01"[Date - Entry] : "2009/12/31"[Date - Entry]));

(NAFLD) AND (("2010/01/01"[Date - Entry] : "2019/12/31"[Date - Entry]));

(NAFLD) AND (("2020/01/01"[Date - Entry] : "2020/12/31"[Date - Entry])).

Die Untersuchung der NAFLD im Kindes- und Jugendalter nimmt hierbei in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein. Zum einen finden sich bei Kindern und Jugendlichen wesentlich weniger Störfaktoren wie Alkoholkonsum, Multimorbidität und die regelhafte Einnahme von hepatotoxischen Medikamenten als bei Erwachsenen. Somit ist die pädiatrische NAFLD als Modell zur Identifizierung wesentlicher Pathomechanismen der Erkrankung prädestiniert [119]. Dahingegen haben hormonelle und metabolische Veränderungen bei Kindern und Adoleszenten nicht zuletzt während der Pubertät entscheidenden Einfluss auf die Genese der NAFLD [120]. Darüber hinaus ist die Regenerationsfähigkeit der Leber, insbesondere die Rückbildung von fibrotischen Veränderungen, vordringlicher Gegenstand der Forschung [121, 122] und in Bezug auf die Krankheits- und Lebenszeit bei Kindern und Jugendlichen mit NAFLD von herausragender Bedeutung für die Entwicklung hepatischer Komplikationen. Nicht zuletzt die gut dokumentierten besonderen histologischen Zonierungsmuster der pädiatrischen NAFLD lassen die Frage nach zusätzlichen, bzw. divergierenden Mechanismen der Krankheitsentstehung aufkommen, welche zum Zeitpunkt noch nicht hinreichend beantwortet ist. Hierfür ist die Etablierung klinisch und histologischer gut charakterisierter Kohorten essentiell. Seit 2014 konnte durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Adipositasprechstunde des Sozialpädiatrischen Zentrums sowie der kinderhepatologischen Sprechstunde der Charité Universitätsmedizin Berlin die deutschlandweit größte Kohorte für die pädiatrische NAFLD etabliert werden.

Genetik

Eine wichtige offene Fragestellung ist, inwieweit bei Erwachsenen mit NAFLD klar dokumentierte genetische Risikofaktoren für die kindliche NAFLD bedeutsam sind [123]. Die hier vorgestellte eigene Arbeit [114] untersuchte hierfür 14 bekannte Risikovarianten in einer histologisch charakterisierten Kohorte mit einem breiten Spektrum der Erkrankung von einer reinen NAFL bis hin zur NASH mit fortgeschrittener Fibrose. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die bei Erwachsenen bedeutsamste Risikovariante PNPLA3 I148M auch für die Entstehung der kindlichen NAFLD den wichtigsten bekannten Einflussfaktor darstellt. Dieses Ergebnis konnte mittlerweile in zwei Meta-Analysen, beide unter Einschluss der eigenen Daten, bekräftigt werden [124, 125]. Tang et al. [124] zeigten nach Auswertung von 9 pädiatrischen Fall-Kontroll Studien eine signifikante Assoziation des PNPLA3 Genotyp und der Entwicklung einer NAFLD mit einem Odds Ratio (OR) im allelischen Modell von 3,34 (im Vergleich OR: 3,05 in der eigenen Arbeit). Li et al. [125] untersuchten die Daten von 27 pädiatrischen Studien mit insgesamt 10.070 Patienten. Hier zeigte sich ein OR von 3,5 im dominanten Modell für die Entwicklung einer NAFLD, sowie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer NASH bei Trägern des Risiko-Allels. Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Assoziation von PNPLA3 Genotyp zum Leberfettgehalt und laborchemischen Zeichen der Leberschädigung, während kein Zusammenhang mit metabolischen Charakteristika (BMI, periphere Insulinresistenz und Lipidstoffwechsel) nachgewiesen werden konnte.

In der eigenen Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass die Trägerschaft von multiplen Varianten das Risiko für eine NAFLD auf das über 10fache steigern kann. Die Implementierung von genetischen Risikoscores kann die Vorhersagestärke klinischer Tests zur Detektion und Stratifizierung der NAFLD erhöhen [126, 127], es sind jedoch weitere Validierungen in großen multizentrischen Studien notwendig um die Eignung dezidierter SNP Algorithmen in unterschiedlichen Populationen zu testen und anzupassen [128]. In den aktuellen Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der NAFLD sowohl bei Kindern und Jugendlichen als auch bei Erwachsenen wird die genetische Testung in der Routineversorgung bisher nicht empfohlen [9, 29, 30, 129]. Neben der Fall-Kontroll Studie wurden in der eigenen Arbeit auch Assoziationen der SNPs zu histopathologischen Merkmalen der NAFLD untersucht. Herauszuheben ist hier die im Vergleich zu anderen publizierten pädiatrischen Studien mit histologischer Charakterisierung [130, 131] höhere Prävalenz fortgeschrittener Fibrose.

Ein neuer Aspekt der Arbeit war die erstmalige Beschreibung einer signifikanten Assoziation der Trägerschaft der I148M Variante mit dem portalen Zonierungsmuster der pädiatrischen NAFLD. Mann et al. konnte bereits die Bedeutung der portalen Inflammation als unabhängigen Risikofaktor für das Vorliegen von Fibrose bei der pädiatrischen NAFLD nachweisen [132]. Interessanterweise konnte auch in einer rezenten Erwachsenenstudie die Assoziation von PNPLA3 I148M mit einer portalen Zonierung im Rahmen der NASH gezeigt werden [133].

Zur Untersuchung humaner hepatischer Proteomprofile der NAFLD liegen nur sehr begrenzt Daten vor [134]. Die Signalweganalyse der Proteinexpressionsprofile im Lebergewebe konnte für homozygote Träger der PNPLA3 I148M Variante eine signifikante Herunterregulierung des hepatischen Retinolmetabolismus nachweisen. Die Modulierung des Retinolmetabolismus im Rahmen der NAFLD und NASH-assoziierten Fibrogenese ist gut dokumentiert, wobei die spezifischen Signalwege des Wirkmechanismus und letztlich die Frage der Kausalität nicht abschließend beantwortet sind [135]. Physiologisch wird Retinol zu 50 bis 80% als Retinylester in Lipidtröpfchen (LD) ruhender hepatischer Sternzellen (HSC) gespeichert [136] und eine Reduktion der Retinoidkonzentration innerhalb der LD ist mit der Transdifferenzierung in aktivierte Myofibroblasten assoziiert [137]. Interessanterweise ist für PNPLA3 eine Retinyl-Palmitat Lipase Aktivität in humanen HSCs beschrieben, welche in der I148M Variante reduziert ist [138]. Die Expression von PNPLA3 ist im Rahmen der Aktivierung von HSC erhöht, wobei humane I148M HSCs ein erhöhtes fibrogenes Potential und eine geringere zelluläre Retinoidkonzentration aufweisen [139]. In einer weiteren in vitro Studie resultierte die Überexprimierung des I148M Risikoallels in einer verminderten Retinolabgabe, sowie der Veränderung einer für den Umbau der Extrazellulärmatrix verantwortlichen Proteinsignatur und letztlich mit einer gesteigerten Fibrogenese [140].

Weiter konnte erstmalig die schrittweise Erniedrigung des Lebergehaltes an GCKR Protein mit zunehmender Trägerschaft des Risikoallels gezeigt werden. GCKR beeinflusst sowohl die Homöostase des hepatischen Glukosestoffwechsel als auch des Lipidstoffwechsels [141]. Mittels mathematischer Modellierung des hepatozytären Stoffwechsels [142] konnte dieser Einfluss in der eigenen Arbeit nachvollzogen werden. In Bestätigung zu Studien bei Erwachsenen [71, 143] konnte weiterhin erstmalig bei Kindern und Jugendlichen der risikosteigernde Einfluss der GCKR Variante auf die Entstehung von Fibrose dokumentiert werden.

Eine wichtige Limitation der Arbeit war die für genetische Studien relativ geringe Fallzahl. Für mehrere in der adulten NAFLD bedeutsame Varianten, so insbesondere für *TM6SF2* als auch *MBOAT7* konnte nach Adjustierung für multiples Testen kein signifikanter Effekt gefunden werden.

Die Daten der eigenen Arbeit wurden zuletzt in einer Meta-Analyse zu *MBOAT7* inkludiert, welche im Gegensatz zu den Erwachsenenendaten keinen signifikanten Effekt auf die Entwicklung einer NAFLD oder NASH im Kindes- und Jugendalter nachweisen konnte [76]. Für *TM6SF2* bleibt die Frage zum Zeitpunkt unbeantwortet, inwieweit sich der Einfluss dieser Varianten tatsächlich im Kindesalter unterscheidet, oder ob lediglich die statistische Teststärke der eigenen Arbeit nicht ausreichend war um einen tatsächlich vorhandenen Effekt nachzuweisen. Hierfür sind multizentrische Studien mit einer relevanten Fallzahlerhöhung und formal berechneter Teststärkenanalyse in Zukunft erforderlich [144].

Lipidomische Analyse

Die Fettsäureanalyse im Vollblut der in der eigenen Arbeit [115] untersuchten pädiatrischen Kohorte mit NAFLD ergab das typische Muster einer westlichen Ernährungsweise („Western Diet“, WD) mit einem hohen Anteil an einfachgesättigten Fettsäuren (MUFA) und gesättigten Fettsäuren (SFA), einer hohen n-6/n-3 PUFA Ratio und einem relativen Mangel an den essentiellen n-3 PUFA Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Diese Ergebnisse aus dem Vollblut bestätigen lipidomische Daten aus dem Blutplasma und Erythrozytenmembranen bei Kindern und Erwachsenen mit NAFLD [145-148]. Die WD, welche hochgradig prozessierte Nahrungsmittel mit hohem Fett- und Kohlenhydratanteil, und insbesondere einem hohen Fruktoseanteil beschreibt [149] ist eine entscheidende Umweltdeterminante für die Entwicklung der NAFLD und NASH [150, 151]. So hatten in einer prospektiven australischen Kohortenstudie Jugendliche mit einem WD Ernährungsmuster ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer NAFLD im Verlauf, während Jugendliche mit Adipositas und einem gesunden Ernährungsprofil vor einer NAFLD geschützt waren [152]. Bei Kindern und Jugendlichen mit homozygoter Trägerschaft für die PNPLA3 I148M Variante konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer höheren n-6/n3 PUFA Ratio und höherer ALT sowie vermehrter Leberfettmasse im MRT nachgewiesen werden [153]. In mehreren randomisierten, Placebo-kontrollierten klinischen Studien führte eine DHA-basierte Therapie bei Kindern und

Jugendlichen mit NAFLD zu einer Reduktion der Leberverfettung [154-157], wobei in einer lipidomischen Analyse die Ratio von DHA und Arachidonsäure (AA, n-6) als entscheidender Einflussfaktor auf den Therapieerfolg identifiziert werden konnte [158].

Die Untersuchung der Fettsäureprofile aus dem Lebergewebe zeigte in der eigenen Arbeit einen Anstieg der Gesamtfettsäuren mit höhergradiger Steatose, vornehmlich geprägt durch einen signifikanten Anstieg der MUFA und SFA, während die PUFA nicht verändert waren. Dies bestätigt lipidomische Studien bei Erwachsenen mit NAFLD [159-161] und verweist letztlich auf eine parallel erhöhte Aktivität der hepatischen *de novo* Lipogenese (DNL) und Stearoyl-CoA Desaturase [162]. Tatsächlich ist die Rate der DNL ein prägendes Merkmal der NAFLD [163] und im Vergleich zum Gesunden bis zu 3-fach erhöht [164].

Epoxyeicosanoide sind bioaktive Lipidmediatoren, welche über die hepatischen CYP Epoxygenasen durch Oxidationsreaktionen aus n-3 und n-6 PUFA gebildet werden [165, 166] und im Tiermodell eine protektive Wirkung auf die Entwicklung der NAFLD aufweisen [167, 168]. Bei Erwachsenen mit NAFLD konnte eine Erhöhung der AA-stämmigen Epoxyeicosatriensäuren (EET) im Plasma im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden [169]. Analog zu dieser Beobachtung konnte in der eigenen Arbeit in der Untersuchung des Lebergewebes nicht nur eine signifikante Erhöhung der EET, sondern auch der DHA-stämmigen Epoxyeicosapentaensäuren (EDP) sowie der EPA-stämmigen Epoxyeicosatetraensäuren (EEQ) mit steigendem Grad der Steatose nachgewiesen werden. Dies war begleitet durch eine erhöhte Aktivität der CYP Epoxygenaseaktivität als auch durch eine Verminderung der Aktivität der sEH. Die medikamentöse Blockade der sEH führt in unterschiedlichen Tiermodellen der NAFLD zu einer Verringerung von endothelalem Stress, Steatose und Fibrose [170-174]. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit sind daher suggestiv für eine kompensatorische Regulation der Epoxyeicosanoide als schützende Reaktion auf die metabolische Belastung der Leber im Rahmen der Steatose. Mit zunehmender Fibrose zeigt sich ein Trend zu einer niedrigeren hepatischen Proteinexpression der CYP Epoxygenasen (signifikant für CYP3A4) und einhergehend ein Trend zu einem niedrigeren hepatischen Gehalt an Epoxyeicosanoiden. In der weiteren Subgruppenanalyse von Patienten mit hochgradiger Steatose ($S \geq 2$) zeigte sich ein signifikant erniedrigter Gehalt an EEQ bei moderater oder fortgeschrittener Fibrose ($F \geq 2$) im Vergleich zu keiner oder geringer Fibrose ($F \leq 1$).

Die Einschränkung der CYP Aktivität ist ein bekanntes Merkmal der fortgeschrittenen NASH bei Erwachsenen [175] und wird vornehmlich über nukleäre Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren reguliert [176].

Die in der eigenen Arbeit gezeigte Regulation des CYP/sEH Signalweges mit einhergehender Modulation des hepatischen Gehaltes an Epoxyeicosanoiden fügt somit klinische Evidenz für ein therapeutisches Potential der Epoxyeicosanoide in der Behandlung der NAFLD hinzu. Denkbare Interventionen wären hierfür die Supplementation der essentiellen Vorläuferfettsäuren, die medikamentöse Inhibition der sEH sowie die direkte orale Gabe von synthetisch hergestellten biostabilen Epoxyeicosanoiden [177].

Nicht-invasives Monitoring

Das zugrundeliegende physikalische Prinzip der Elastographie kann bereits bei der in ägyptischen Hieroglyphen des Papyrus Ebers beschriebenen [178], diagnostischen Methode der Palpation beobachtet werden und besteht in der Messung mechanoelastischer Eigenschaften von biologischen Geweben unter Anwendung eines äußeren Stimulus [179]. Während dieser äußere Stimulus bei der Palpation durch die tastende Hand aufgebracht wird, bedienen sich elastographische Modalitäten über einen Aktuator erzeugter, reproduzierbarer Scherwellen. Eine bekannte Limitation Ultraschall-basierter Elastographiemodalitäten besteht in der begrenzten Eindringtiefe des Stimulus, welche gerade bei Patienten mit extremer Adipositas zu einer erhöhten Fehlerrate in der Messung der LS führen kann [180]. Die in der eigenen Arbeit [116] angewandte Zeitharmonische Ultraschall-Elastographie (THE) basiert auf dem Prinzip der kontinuierlichen multifrequenten externen Stimulation (30Hz – 60Hz) über eine Vibrationstrage [181]. Richard Barr beschreibt dieses Prinzip im Editorial zur eigenen Arbeit mit einer Schüssel voller Wasser, die während eines Erdbebens untersucht wird und sich durch eine anhaltende und weitläufige Wellenbildung auszeichnet [182].

Die Methode erlaubt die B-Mode geführte Messung der LS in einem Gewebefenster mit bis zu 14 cm Eindringtiefe und ermöglicht somit die Erfassung des Leberparenchyms auch bei deutlich verbreiterem subkutanem Fettgewebe.

Die THE konnte in der untersuchten Kohorte bei allen Patienten durchgeführt werden und zeigte in der Detektion der klinisch relevanten moderaten Fibrose ($F \geq 2$) eine hohe diagnostische Genauigkeit mit einem AUROC Wert von 0,99.

Bereits publizierte Daten zur Anwendung der transienten Elastographie (Fibroscan®) [183] durch Nobili et al., wie auch zur Scherwellenelastographie (SWE) [184] durch Garcovich et al. bestätigen die hohe Testgüte der Elastographie zur Quantifizierung der Fibrose, wobei die Kohorten in beiden Studien sich durch einen deutlich niedrigeren BMI der Kinder und Jugendlichen auszeichneten, und somit die direkte Vergleichbarkeit der Modalitäten limitiert ist.

Die technische Herausforderung in der Anwendung des elastographischen Prinzips bei Patienten mit extremer Adipositas wurde in einer Erwachsenenstudie zum Vergleich der Ultraschall-basierten transienten Elastographie und der MRE adressiert. Hier zeigte die MRE im Vergleich zur transienten Elastographie sowohl eine höhere Erfolgsrate (95,8% vs. 81,3%), als auch eine höhere diagnostische Genauigkeit in der Detektion moderater Fibrose [185]. In einer pädiatrischen Vergleichsstudie von SWE mit der MRE korrelierten die Messergebnisse der LS beider Modalitäten bis zu einem BMI von 30/kg/m², während bei Patienten mit höherem BMI keine Korrelation mehr gegeben war [186].

In einer weiteren eigenen Arbeit [117] wurde nun die Multifrequenz MRE zur Evaluation der NAFLD angewandt. Über die Erstellung von Wellenkarten bzw. Elastogrammen in den jeweiligen Schnittbildern können hier mechanischen Gewebeeigenschaften prinzipiell über die gesamte Leber dreidimensional quantitativ erfasst werden [187, 188]. Hingegen liegt eine bekannte Limitation der Leberbiopsie, dem Gold-Standard in der Quantifizierung der Fibrose im „sampling error“, also der lediglich punktuellen Erfassung von Gewebe der Leberstanze [189, 190]. Die Leberfibrose kann jedoch im Rahmen der NAFLD ein inhomogenes Muster und somit gegebenenfalls erhebliche lokale Schwankungen des Schweregrades aufweisen [190, 191]. Es bleibt somit Gegenstand der Diskussion, inwieweit die MRE aufgrund der deutlich größeren Abdeckung des Organs in der Quantifizierung der Leberfibrose perspektivisch als Referenzmethode dienen könnte [192].

In der untersuchten Kohorte wurde für die Detektion von moderater Fibrose ein AUC Wert von 0,907 und für die Detektion von fortgeschrittener Fibrose eine AUC Wert von 0,895 erreicht. In einer weiteren pädiatrischen Studie zur MRE bei 90 Kindern mit NAFLD konnten Schwimmer et al. eine ähnliche diagnostische Genauigkeit nachweisen (AUROC für fortgeschrittene Fibrose 0,879 – 0,925 aus drei individuell ausgewerteten Zentren) [109]. Die MRE konnte in der eigenen Studie bei 6 von 56 Patienten aufgrund von Klaustrophobie oder dem Missverhältnis von Bauchumfang

und Größe des Scanners (Diameter der Gantry-Öffnung 60cm, Siemens Magnetom Sonata) nicht durchgeführt werden. Definiert man nun diese Ausschlusskriterien als Limitation der Methode, so ergibt sich eine Erfolgsrate von 89%. Durch die Implementierung neuerer Geräte mit größerer Öffnung („wide-bore scanner“ mit Gantry-Öffnung von 70cm) ist hier eine Verbesserung der Erfolgsrate bei Patienten mit extremer Adipositas zu erwarten [193].

In einer kürzlich publizierten Studie zur Multifrequenz MRE bei Erwachsenen mit chronischen Lebererkrankungen zeigte sich, dass die Auswertung lediglich einer Frequenz (45Hz, 55Hz oder 60Hz) eine vergleichbar gute diagnostische Genauigkeit im Staging der Fibrose aufweist [194]. Somit könnte zukünftig die Untersuchungszeit der MRE in der klinischen Anwendung weiter reduziert werden, was gerade bei Kindern erheblich zur Reduktion von Bewegungsartefakten und Erhöhung der Akzeptanz der Methode beitragen kann. Entscheidend für die klinische Anwendung der Elastographie ist auch die Bestimmung und Interpretation der Fluktuation der gemessenen Parameter über die Zeit. In einer longitudinalen Studie über 3 Monate konnte gezeigt werden, dass die LS bei Adoleszenten in der intraindividuell wiederholten Messung mittels MRE unter einer klinischen Standardversorgung und ohne eine spezifische Intervention einen stabilen Verlaufparameter darstellt [195].

Die LS wird elastographisch über die Messung der Scherwellengeschwindigkeit c (m/s) ermittelt und ist durch die biomechanischen Eigenschaften von Geweben determiniert. Für die THE als auch die SWE ist die ermittelte Scherwellengeschwindigkeit der direkte Ausgabeparameter der Untersuchung. In der transienten Elastographie und MRE hingegen wird dieser primär erfasste Parameter über eine mathematische Umrechnung in das Elastizitätsmodul E (kPa) überführt. Inwieweit diskrete histopathologische Merkmale der Leberparenchymveränderungen im Rahmen der NAFLD und NASH die LS individuell beeinflussen bleibt eine wichtige Fragestellung in der Interpretation elastographischer Messergebnisse. Des Weiteren ist die genaue Kenntnis und kritische Analyse der Limitationen der histopathologischen Systematik der NAFLD unabdingbar. In der eigenen Arbeit wurden diese Einflüsse nun systematisch untersucht und die Entwicklung eines neuen Elastographie-basierten histologischen Scoring Systems vorgestellt [118].

Hierbei zeigte sich, dass dezidierte Ausprägungen der Fibrose wie die von den Portalfeldern ausgehende, parenchymal einziehende Septenbildung, die Ausbildung

kompletter porto-portaler Brücken sowie die vorwiegend zentrolobulär lokalisierte perisinusoidale bzw. perizelluläre Maschendrahtfibrose jeweils eigenständig und unabhängig die LS beeinflussen. Auch die Ballonierung von Hepatozyten konnte als Einflussfaktor bestimmt werden, wohingegen das Ausmaß der Steatose und der entzündlichen Aktivität keinen signifikanten Effekt auf die LS hatte.

Während die inflammatorische Aktivität im Rahmen der Virushepatitis die LS erhöhen kann [196] und die direkt antiviral wirksame Therapie bei Jugendlichen mit chronischer Hepatitis C mit einer Verminderung der LS einhergeht [197], sind in Übereinstimmung mit den eigenen Daten sowohl bei Kindern und Jugendlichen wie auch bei Erwachsenen mit NAFLD keine Interaktion von Inflammation und LS beschrieben [184, 198]. Hingegen ist die Datenlage zur Assoziation von Steatose und LS kontrovers. So wurden mit zunehmender Steatose eine Erhöhung [199], eine Erniedrigung [200] oder kein Einfluss [184, 198, 201] auf die LS dokumentiert.

Während die fibrotische Verdichtung des Lebergewebes durch Anhäufung von Kollagen zweifellos den größten Einflussfaktor auf die LS darstellt, wurden die zonal unterschiedlichen Fibrosemuster in der eigenen Arbeit erstmalig als unabhängige Determinanten der LS analysiert. So werden zonal unterschiedliche Fibroseanteile im histopathologischen Staging System der NASH-CRN nicht individuell quantitativ erfasst, was die Genauigkeit der LS als kontinuierlichen Parameter mechanoelastischer Veränderungen der Leber limitiert. Tatsächlich erreicht der in der eigenen Arbeit vorgeschlagene Composite Elastography Score (CES) eine genauere Abbildung der LS, unabhängig von der angewandten Modalität (THE oder MRE) und erlaubt basierend auf biomechanisch wirksamen Gewebeeigenschaften die Stratifizierung der NAFLD in keine oder milde Erkrankung, moderate Erkrankung oder schwere Erkrankung.

4. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten in den dargestellten eigenen Arbeiten neue Aspekte sowohl zur Pathogenese und spezifischen therapeutischen Intervention als auch zur nicht-invasiven Überwachung des Krankheitsverlaufs zum Korpus der Evidenz für die kindliche NAFLD hinzugefügt werden. Allen Arbeiten gemein ist der translationale Charakter, welcher mit einem direkten potentiellen Einfluss auf das zukünftige klinische Management der Erkrankung einhergeht.

Schon heute zeigt sich die Entwicklung einer breiteren Verfügbarkeit moderner genetischer Diagnostik im klinischen Alltag. Es ist daher denkbar, dass die Erfassung multipler SNPs über „whole-exome“ oder „whole-genome“ Analysen unter der Anwendung von Risikoscores bzw. -profilen eine wichtige Rolle in der Stratifizierung der genetischen Prädisposition und weiteren individualisierten Behandlung der NAFLD einnehmen wird. Die eigene Arbeit konnte hierbei relevante Risikovarianten mit hoher Effektstärke bei Kindern und Jugendlichen validieren.

Umweltfaktoren beeinflussen neben der genetischen Prädisposition entscheidend die Entwicklung der NAFLD. Ein Merkmal in der systematischen Untersuchung von Umweltfaktoren bei Patienten mit NAFLD ist die geringe Aufnahme von essentiellen PUFA im Rahmen eines westlichen Ernährungsstils. Diese sind Vorläufer bioaktiver Lipidmediatoren mit protektiver Wirkung auf alle histologischen Aspekte der NAFLD. Die in der eigenen Arbeit untersuchten n-3 und n-6 stämmigen Epoxyeicosanoide und ihre Metabolisierungssignalwege konnten hier als ein mögliches Ziel therapeutischer Intervention bei Kindern und Jugendlichen mit NAFLD identifiziert werden.

Die Entwicklung von Fibrose ist der entscheidende Verlaufsparemeter zur prognostischen Einschätzung der NAFLD. Die Messung der LS durch die Elastographie hat sich hier als gut validierter nicht-invasiver Biomarker mit hoher Testgüte etabliert. In den eigenen Arbeiten konnte nun dieses Prinzip mittels Ultraschall- sowie MR-basierter Elastographietechniken auf der Grundlage zeitharmonischer mechanischer Vibrationen in einer Kohorte von Kindern und Jugendlichen mit NAFLD weiter validiert werden. In der eigenen Arbeit wurden weiterhin die ursächlichen biomechanischen Einflussfaktoren auf die gemessene LS analysiert und eine neue histopathologische Bewertungsskala zur Interpretation der LS vorgeschlagen.

5. Literaturangaben

1. Welsh, J.A., S. Karpen, and M.B. Vos, *Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010*. J Pediatr, 2013. **162**(3): p. 496-500 e1.
2. Sahota, A.K., et al., *Incidence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: 2009-2018*. Pediatrics, 2020. **146**(6).
3. Nobili, V., et al., *Comparison of the Phenotype and Approach to Pediatric vs Adult Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2016. **150**(8): p. 1798-810.
4. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease- Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology, 2016. **64**(1): p. 73-84.
5. Collaboration, N.C.D.R.F., *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10026): p. 1377-1396.
6. Ogden, C.L., et al., *Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014*. JAMA, 2016. **315**(21): p. 2292-9.
7. Meixner, L., et al., *Health-related quality of life in children and adolescents with overweight and obesity: results from the German KIGGS survey*. BMC Public Health, 2020. **20**(1): p. 1722.
8. Hales, C.M., et al., *Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-2016*. NCHS Data Brief, 2017(288): p. 1-8.
9. Chalasani, N., 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): p. 328-357.
10. Schwimmer, J.B., et al., *Prevalence of fatty liver in children and adolescents*. Pediatrics, 2006. **118**(4): p. 1388-93.
11. Anderson, E.L., et al., *The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140908.
12. Yu, E.L., et al., *Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children with Obesity*. J Pediatr, 2019. **207**: p. 64-70.
13. Arancibia, G., et al., *[Association of metabolic syndrome markers with abnormal alanine aminotransferase levels in healthy children]*. Rev Med Chil, 2012. **140**(7): p. 896-901.
14. Booth, M.L., et al., *The population prevalence of adverse concentrations and associations with adiposity of liver tests among Australian adolescents*. J Paediatr Child Health, 2008. **44**(12): p. 686-91.
15. Fraser, A., M.P. Longnecker, and D.A. Lawlor, *Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999-2004*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1814-20.

16. Park, H.S., et al., *Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(5): p. 1046-51.
17. Kelishadi, R., et al., *Association of the components of the metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease among normal-weight, overweight and obese children and adolescents*. Diabetol Metab Syndr, 2009. **1**: p. 29.
18. Lawlor, D.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease, liver fibrosis, and cardiometabolic risk factors in adolescence: a cross-sectional study of 1874 general population adolescents*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(3): p. E410-7.
19. Ayonrinde, O.T., et al., *Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 800-9.
20. Wan, Y.P., et al., *[The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its related risk factors in 1180 school children in Shanghai]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2007. **15**(9): p. 644-8.
21. Caserta, C.A., et al., *Cardiovascular risk factors, nonalcoholic fatty liver disease, and carotid artery intima-media thickness in an adolescent population in southern Italy*. Am J Epidemiol, 2010. **171**(11): p. 1195-202.
22. Bussler, S., et al., *New pediatric percentiles of liver enzyme serum levels (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyltransferase): Effects of age, sex, body mass index, and pubertal stage*. Hepatology, 2018. **68**(4): p. 1319-1330.
23. Schwimmer, J.B., et al., *SAFETY study: alanine aminotransferase cutoff values are set too high for reliable detection of pediatric chronic liver disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1357-64, 1364 e1-2.
24. Johansen, M.J., et al., *The Effect of Overweight and Obesity on Liver Biochemical Markers in Children and Adolescents*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(2).
25. Di Martino, M., et al., *Imaging Features of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents*. Children (Basel), 2017. **4**(8).
26. Hernaez, R., et al., *Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis*. Hepatology, 2011. **54**(3): p. 1082-1090.
27. Williams, C.D., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 124-31.
28. Draijer, L.G., et al., *Comparison of diagnostic accuracy of screening tests ALT and ultrasound for pediatric non-alcoholic fatty liver disease*. Eur J Pediatr, 2019. **178**(6): p. 863-870.
29. Vajro, P., et al., *Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(5): p. 700-13.

30. Vos, M.B., et al., *NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2017. **64**(2): p. 319-334.
31. Ezaizi, Y., et al., *Comparison between non-alcoholic fatty liver disease screening guidelines in children and adolescents*. JHEP Rep, 2019. **1**(4): p. 259-264.
32. Puri, P. and A.J. Sanyal, *Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup*. Clin Liver Dis (Hoboken), 2012. **1**(4): p. 99-103.
33. Alfani, R., et al., *Pediatric Fatty Liver and Obesity: Not Always Just a Matter of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Children (Basel), 2018. **5**(12).
34. Hegarty, R., et al., *Paediatric fatty liver disease (PeFLD): All is not NAFLD - Pathophysiological insights and approach to management*. J Hepatol, 2018. **68**(6): p. 1286-1299.
35. Eslam, M., et al., *MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2020. **158**(7): p. 1999-2014 e1.
36. Eslam, M., et al., *Defining paediatric metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2021. **6**(10): p. 864-873.
37. D'Adamo, E., V. Castorani, and V. Nobili, *The Liver in Children With Metabolic Syndrome*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 514.
38. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
39. Watt, M.J., et al., *The Liver as an Endocrine Organ-Linking NAFLD and Insulin Resistance*. Endocr Rev, 2019. **40**(5): p. 1367-1393.
40. Nobili, V., et al., *NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019. **16**(9): p. 517-530.
41. Moran, A., et al., *Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children*. Diabetes, 1999. **48**(10): p. 2039-44.
42. Mencin, A.A. and J.E. Lavine, *Nonalcoholic fatty liver disease in children*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(2): p. 151-7.
43. Nobili, V., et al., *Prevalence of prediabetes and diabetes in children and adolescents with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2019. **71**(4): p. 802-810.
44. Machado, M.V. and A.M. Diehl, *Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis*. Gastroenterology, 2016. **150**(8): p. 1769-77.
45. Geisler, C.E. and B.J. Renquist, *Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones*. J Endocrinol, 2017. **234**(1): p. R1-R21.
46. Softic, S., D.E. Cohen, and C.R. Kahn, *Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(5): p. 1282-93.

47. Vos, M.B., et al., *Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. *Medscape J Med*, 2008. **10**(7): p. 160.
48. Mosca, A., et al., *Serum uric acid concentrations and fructose consumption are independently associated with NASH in children and adolescents*. *J Hepatol*, 2017. **66**(5): p. 1031-1036.
49. Claria, J., et al., *New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators*. *Front Immunol*, 2011. **2**: p. 49.
50. Panera, N., et al., *Recent advances in understanding the role of adipocytokines during non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis and their link with hepatokines*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **10**(3): p. 393-403.
51. Franchitto, A., et al., *The Contribution of the Adipose Tissue-Liver Axis in Pediatric Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy*. *J Pediatr*, 2020. **216**: p. 117-127 e2.
52. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
53. Marra, F. and G. Svegliati-Baroni, *Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis*. *J Hepatol*, 2018. **68**(2): p. 280-295.
54. Schwimmer, J.B., et al., *Microbiome Signatures Associated With Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Gastroenterology*, 2019. **157**(4): p. 1109-1122.
55. Anjani, K., et al., *Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity*. *J Hepatol*, 2015. **62**(4): p. 905-12.
56. Hirsova, P. and G.J. Gores, *Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015. **1**(1): p. 17-27.
57. Schwabe, R.F., I. Tabas, and U.B. Pajvani, *Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2020. **158**(7): p. 1913-1928.
58. Diehl, A.M. and C. Day, *Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(21): p. 2063-2072.
59. Nogrady, B., *Childhood obesity: A growing concern*. *Nature*, 2017. **551**(7681).
60. Zimmermann, E., et al., *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): p. e006998.
61. Feldstein, A.E., et al., *The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years*. *Gut*, 2009. **58**(11): p. 1538-44.
62. Kohli, R., et al., *Rapid progression of NASH in childhood*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010. **50**(4): p. 453-6.
63. Dulai, P.S., et al., *Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis*. *Hepatology*, 2017. **65**(5): p. 1557-1565.

64. Ekstedt, M., 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**(5): p. 1547-54.
65. Molleston, J.P., et al., *Obese children with steatohepatitis can develop cirrhosis in childhood*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(9): p. 2460-2.
66. Wong, R.J., 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): p. 547-55.
67. Cholankeril, G., et al., *Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the US: Temporal Trends and Outcomes*. *Dig Dis Sci*, 2017. **62**(10): p. 2915-2922.
68. Parrish, N.F., et al., *The Changing Face of Liver Transplantation in the United States: The Effect of HCV Antiviral Eras on Transplantation Trends and Outcomes*. *Transplant Direct*, 2019. **5**(3): p. e427.
69. Anstee, Q.M. and C.P. Day, *The genetics of NAFLD*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(11): p. 645-55.
70. Loomba, R., et al., *Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(7): p. 1784-93.
71. Anstee, Q.M., et al., *Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort()*. *J Hepatol*, 2020. **73**(3): p. 505-515.
72. Speliotes, E.K., et al., *Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(3): p. e1001324.
73. Kozlitina, J., et al., *Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. *Nat Genet*, 2014. **46**(4): p. 352-6.
74. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2011. **53**(6): p. 1883-94.
75. Liu, Y.L., et al., *TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4309.
76. Teo, K., et al., *rs641738C>T near MBOAT7 is associated with liver fat, ALT and fibrosis in NAFLD: A meta-analysis*. *J Hepatol*, 2021. **74**(1): p. 20-30.
77. Abul-Husn, N.S., et al., *A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(12): p. 1096-1106.
78. Goyal, N.P. and J.B. Schwimmer, *The Genetics of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Clin Liver Dis*, 2018. **22**(1): p. 59-71.
79. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. *Hepatology*, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
80. Palmer, N.D., et al., *Characterization of European ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of African and Hispanic descent*. *Hepatology*, 2013. **58**(3): p. 966-75.

81. Goran, M.I., et al., *Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents*. *Diabetes*, 2010. **59**(12): p. 3127-30.
82. Brown, G.T. and D.E. Kleiner, *Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis*. *Metabolism*, 2016. **65**(8): p. 1080-6.
83. Caldwell, S., et al., *Hepatocellular ballooning in NASH*. *J Hepatol*, 2010. **53**(4): p. 719-23.
84. Caldwell, S. and C. Lackner, *Perspectives on NASH Histology: Cellular Ballooning*. *Ann Hepatol*, 2017. **16**(2): p. 182-184.
85. Angulo, P., M.V. Machado, and A.M. Diehl, *Fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease: mechanisms and clinical implications*. *Semin Liver Dis*, 2015. **35**(2): p. 132-45.
86. Schwimmer, J.B., et al., *Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2005. **42**(3): p. 641-9.
87. Kleiner, D.E. and E.M. Brunt, *Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research*. *Semin Liver Dis*, 2012. **32**(1): p. 3-13.
88. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
89. Carter-Kent, C., et al., *Relations of steatosis type, grade, and zonality to histological features in pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011. **52**(2): p. 190-7.
90. Carter-Kent, C., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis in children: a multicenter clinicopathological study*. *Hepatology*, 2009. **50**(4): p. 1113-20.
91. Alkhoury, N., et al., *Development and validation of a new histological score for pediatric non-alcoholic fatty liver disease*. *J Hepatol*, 2012. **57**(6): p. 1312-8.
92. DeVore, S., et al., *A multidisciplinary clinical program is effective in stabilizing BMI and reducing transaminase levels in pediatric patients with NAFLD*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013. **57**(1): p. 119-23.
93. Africa, J.A., K.P. Newton, and J.B. Schwimmer, *Lifestyle Interventions Including Nutrition, Exercise, and Supplements for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children*. *Dig Dis Sci*, 2016. **61**(5): p. 1375-86.
94. Golabi, P., et al., *Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(27): p. 6318-27.
95. Katsagoni, C.N., et al., *Effects of Dietary and Lifestyle Interventions on Liver, Clinical and Metabolic Parameters in Children and Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review*. *Nutrients*, 2020. **12**(9).
96. Marchesini, G., S. Petta, and R. Dalle Grave, *Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice*. *Hepatology*, 2016. **63**(6): p. 2032-43.
97. van der Heijden, L.B., E.J.M. Feskens, and A.J. Janse, *Maintenance interventions for overweight or obesity in children: a systematic review and meta-analysis*. *Obes Rev*, 2018. **19**(6): p. 798-809.

98. Vilar-Gomez, E., et al., *Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(2): p. 367-78 e5; quiz e14-5.
99. Verma, S., et al., *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): p. 1398-405.
100. Molleston, J.P., et al., *Histological abnormalities in children with nonalcoholic fatty liver disease and normal or mildly elevated alanine aminotransferase levels*. *J Pediatr*, 2014. **164**(4): p. 707-713 e3.
101. Yang, H.R., et al., *Noninvasive parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(13): p. 1525-30.
102. Alkhouri, N., et al., *The development of the pediatric NAFLD fibrosis score (PNFS) to predict the presence of advanced fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104558.
103. Mansoor, S., et al., *The evaluation of hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Dis Sci*, 2015. **60**(5): p. 1440-7.
104. Nobili, V., et al., *The pediatric NAFLD fibrosis index: a predictor of liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease*. *BMC Med*, 2009. **7**: p. 21.
105. Jackson, J.A., et al., *Performance of fibrosis prediction scores in paediatric non-alcoholic fatty liver disease*. *J Paediatr Child Health*, 2018. **54**(2): p. 172-176.
106. Dietrich, C.F., et al., *EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version)*. *Ultraschall in Med*, (EFirst).
107. Friedrich-Rust, M., T. Poynard, and L. Castera, *Critical comparison of elastography methods to assess chronic liver disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(7): p. 402-11.
108. Bamber, J., et al., *EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology*. *Ultraschall Med*, 2013. **34**(2): p. 169-84.
109. Schwimmer, J.B., et al., *Magnetic resonance elastography measured shear stiffness as a biomarker of fibrosis in pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2017. **66**(5): p. 1474-1485.
110. Kim, D., et al., *Advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: noninvasive assessment with MR elastography*. *Radiology*, 2013. **268**(2): p. 411-9.
111. Asbach, P., et al., *Viscoelasticity-based staging of hepatic fibrosis with multifrequency MR elastography*. *Radiology*, 2010. **257**(1): p. 80-6.
112. Xanthakos, S.A., et al., *Use of magnetic resonance elastography to assess hepatic fibrosis in children with chronic liver disease*. *J Pediatr*, 2014. **164**(1): p. 186-8.
113. Dillman, J.R., et al., *Quantitative Liver MRI-Biopsy Correlation in Pediatric and Young Adult Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Can One Be Used to Predict the Other?* *AJR Am J Roentgenol*, 2018. **210**(1): p. 166-174.

114. Hudert, C.A., et al., *Genetic determinants of steatosis and fibrosis progression in paediatric non-alcoholic fatty liver disease*. Liver Int, 2019. **39**(3): p. 540-556.
115. Kalveram, L., et al., *Regulation of the cytochrome P450 epoxyeicosanoid pathway is associated with distinct histologic features in pediatric non-alcoholic fatty liver disease*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2020. **164**: p. 102229.
116. Hudert, C.A., et al., *US Time-Harmonic Elastography: Detection of Liver Fibrosis in Adolescents with Extreme Obesity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Radiology, 2018. **288**(1): p. 99-106.
117. Hudert, C.A., et al., *Tomoelastography for the Evaluation of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Invest Radiol, 2018.
118. Hudert, C.A., et al., *nHow histopathologic changes in pediatric nonalcoholic fatty liver diseases influence in vivo liver stiffness*. Acta Biomater, 2021.
119. Alisi, A., G. Carpino, and V. Nobili, *Paediatric nonalcoholic fatty liver disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(3): p. 279-84.
120. Suzuki, A., et al., *Association between puberty and features of nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(7): p. 786-94.
121. Friedman, S.L., *Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9230-1.
122. Kisseleva, T. and D. Brenner, *Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020.
123. Dong, J., Y.R. Im, and J.P. Mann, *Insights into paediatric non-alcoholic fatty liver disease from genetic variants*. Liver Int, 2019. **39**(3): p. 440-445.
124. Tang, S., et al., *Association of PNPLA3 rs738409 G/C gene polymorphism with nonalcoholic fatty liver disease in children: a meta-analysis*. BMC Med Genet, 2020. **21**(1): p. 163.
125. Li, J., et al., *Effect of the patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) I148M polymorphism on the risk and severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndromes: A meta-analysis of paediatric and adolescent individuals*. Pediatr Obes, 2020. **15**(6): p. e12615.
126. Zusi, C., et al., *Contribution of a genetic risk score to clinical prediction of hepatic steatosis in obese children and adolescents*. Dig Liver Dis, 2019. **51**(11): p. 1586-1592.
127. Nobili, V., et al., *A 4-polymorphism risk score predicts steatohepatitis in children with nonalcoholic fatty liver disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014. **58**(5): p. 632-6.
128. Lin, Y.C., C.C. Wu, and Y.H. Ni, *New Perspectives on Genetic Prediction for Pediatric Metabolic Associated Fatty Liver Disease*. Front Pediatr, 2020. **8**: p. 603654.
129. European Association for the Study of the, L., D. European Association for the Study of, and O. European Association for the Study of, *EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1388-402.

130. Valenti, L., et al., *I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2010. **52**(4): p. 1274-80.
131. Rotman, Y., et al., *The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2010. **52**(3): p. 894-903.
132. Mann, J.P., et al., *Portal inflammation is independently associated with fibrosis and metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2016. **63**(3): p. 745-53.
133. Carpino, G., et al., *PNPLA3 variant and portal/periportal histological pattern in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a possible role for oxidative stress*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15756.
134. Perakakis, N., K. Stefanakis, and C.S. Mantzoros, *The role of omics in the pathophysiology, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. Metabolism, 2020. **111S**: p. 154320.
135. Saeed, A., et al., *Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)*. Nutrients, 2017. **10**(1).
136. Blaner, W.S., et al., *Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 467-73.
137. Jophlin, L.L., et al., *Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018. **315**(5): p. G713-G721.
138. Pirazzi, C., et al., *PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(15): p. 4077-85.
139. Bruschi, F.V., et al., *The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells*. Hepatology, 2017. **65**(6): p. 1875-1890.
140. Pingitore, P., et al., *PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(23): p. 5212-5222.
141. Raimondo, A., M.G. Rees, and A.L. Gloyn, *Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2015. **26**(2): p. 88-95.
142. Berndt, N., et al., *HEPATOKIN1 is a biochemistry-based model of liver metabolism for applications in medicine and pharmacology*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2386.
143. Petta, S., et al., *Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87523.
144. Mann, J.P., et al., *European paediatric non-alcoholic fatty liver disease registry (EU-PNAFLD): Design and rationale*. Contemp Clin Trials, 2018. **75**: p. 67-71.
145. Puri, P., et al., *A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2007. **46**(4): p. 1081-90.
146. Puri, P., et al., *The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2009. **50**(6): p. 1827-38.

147. Aristizabal, J.C., et al., *Concentrations of Plasma Free Palmitoleic and Dihomo-Gamma Linoleic Fatty Acids Are Higher in Children with Abdominal Obesity*. *Nutrients*, 2018. **10**(1).
148. Bonafini, S., et al., *Possible Role of CYP450 Generated Omega-3/Omega-6 PUFA Metabolites in the Modulation of Blood Pressure and Vascular Function in Obese Children*. *Nutrients*, 2018. **10**(11).
149. Hosseini, Z., S.J. Whiting, and H. Vatanparast, *Current evidence on the association of the metabolic syndrome and dietary patterns in a global perspective*. *Nutr Res Rev*, 2016. **29**(2): p. 152-162.
150. Assy, N., et al., *Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors*. *Can J Gastroenterol*, 2008. **22**(10): p. 811-6.
151. Berna, G. and M. Romero-Gomez, *The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management*. *Liver Int*, 2020. **40 Suppl 1**: p. 102-108.
152. Oddy, W.H., et al., *The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence*. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(5): p. 778-85.
153. Santoro, N., et al., *Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37827.
154. Nobili, V., et al., *Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial*. *Arch Dis Child*, 2011. **96**(4): p. 350-3.
155. Nobili, V., et al., *Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: randomised controlled trial in children*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013. **23**(11): p. 1066-70.
156. Della Corte, C., et al., *Docosahexanoic Acid Plus Vitamin D Treatment Improves Features of NAFLD in Children with Serum Vitamin D Deficiency: Results from a Single Centre Trial*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0168216.
157. Zohrer, E., et al., *Efficacy of docosahexaenoic acid-choline-vitamin E in paediatric NASH: a randomized controlled clinical trial*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017. **42**(9): p. 948-954.
158. Torquato, P., et al., *Nutritional and lipidomics biomarkers of docosahexaenoic acid-based multivitamin therapy in pediatric NASH*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 2045.
159. Allard, J.P., et al., *Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study*. *J Hepatol*, 2008. **48**(2): p. 300-7.
160. Yamada, K., et al., *Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. *Liver Int*, 2015. **35**(2): p. 582-90.
161. Chiappini, F., et al., *Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46658.

162. Chong, M.F., et al., *Parallel activation of de novo lipogenesis and stearyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 817-23.
163. Kartsoli, S., et al., *Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease*. World J Hepatol, 2020. **12**(8): p. 436-450.
164. Lambert, J.E., et al., *Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2014. **146**(3): p. 726-35.
165. Spector, A.A. and H.Y. Kim, *Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(4): p. 356-65.
166. Konkel, A. and W.H. Schunck, *Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(1): p. 210-22.
167. Wang, C., et al., *Hydroxyeicosapentaenoic acids and epoxyeicosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(14): p. 2358-2372.
168. Wang, X., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids alleviate methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice*. Scand J Immunol, 2019. **90**(3): p. e12791.
169. Wells, M.A., et al., *Characterization of the Cytochrome P450 epoxyeicosanoid pathway in non-alcoholic steatohepatitis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2016. **125**: p. 19-29.
170. Bettaieb, A., et al., *Soluble epoxide hydrolase deficiency or inhibition attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress in liver and adipose tissue*. J Biol Chem, 2013. **288**(20): p. 14189-99.
171. Lopez-Vicario, C., et al., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(2): p. 536-41.
172. Yao, L., et al., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase ameliorates hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis by enhancing beta-oxidation of fatty acid in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019. **316**(4): p. G527-G538.
173. Liu, Y., et al., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates high-fat-diet-induced hepatic steatosis by reduced systemic inflammatory status in mice*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39165.
174. Deng, W., et al., *Inhibition of soluble epoxide hydrolase lowers portal hypertension in cirrhotic rats by ameliorating endothelial dysfunction and liver fibrosis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. **131**: p. 67-74.
175. Fisher, C.D., et al., *Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(10): p. 2087-94.
176. Shahabi, P., et al., *Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders*. Pharmacol Ther, 2014. **144**(2): p. 134-61.

177. Schunck, W.H., et al., *Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases*. *Pharmacol Ther*, 2018. **183**: p. 177-204.
178. Westendorf, W., *Handbuch der altägyptischen Medizin*. Handbuch der Orientalistik Abt 1, Der Nahe und Mittlere Osten. 1999, Leiden etc.: Brill. 2 Bände (853 S.).
179. Hirsch, S., J. Braun, and I. Sack, *Magnetic Resonance Elastography: Physical Background And Medical Applications*. 2017: Wiley-VCH.
180. Castera, L., et al., *Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations*. *Hepatology*, 2010. **51**(3): p. 828-35.
181. Tzschatzsch, H., et al., *In vivo time-harmonic multifrequency elastography of the human liver*. *Phys Med Biol*, 2014. **59**(7): p. 1641-54.
182. Barr, R.G., *Liver Elastography Still in Its Infancy*. *Radiology*, 2018. **288**(1): p. 107-108.
183. Nobili, V., et al., *Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2008. **48**(2): p. 442-8.
184. Garcovich, M., et al., *Liver Stiffness in Pediatric Patients with Fatty Liver Disease: Diagnostic Accuracy and Reproducibility of Shear-Wave Elastography*. *Radiology*, 2017. **283**(3): p. 820-827.
185. Chen, J., 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): p. 418-428.
186. Trout, A.T., et al., *Prospective Assessment of Correlation between US Acoustic Radiation Force Impulse and MR Elastography in a Pediatric Population: Dispersion of US Shear-Wave Speed Measurement Matters*. *Radiology*, 2016. **281**(2): p. 544-552.
187. Manduca, A., et al., *MR elastography: Principles, guidelines, and terminology*. *Magn Reson Med*, 2020.
188. Hirsch, S., et al., *MR elastography of the liver and the spleen using a piezoelectric driver, single-shot wave-field acquisition, and multifrequency dual parameter reconstruction*. *Magn Reson Med*, 2014. **71**(1): p. 267-77.
189. Sumida, Y., A. Nakajima, and Y. Itoh, *Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(2): p. 475-85.
190. Vuppalanchi, R., et al., *Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009. **7**(4): p. 481-6.
191. Ratziu, V., et al., *Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1898-906.
192. Mumtaz, S., N. Schomaker, and N. Von Roenn, *Pro: Noninvasive Imaging Has Replaced Biopsy as the Gold Standard in the Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 2019. **13**(4): p. 111-113.

193. Uppot, R.N., *Technical challenges of imaging & image-guided interventions in obese patients*. Br J Radiol, 2018. **91**(1089): p. 20170931.
194. Reiter, R., et al., *Diagnostic performance of tomoelastography of the liver and spleen for staging hepatic fibrosis*. Eur Radiol, 2020. **30**(3): p. 1719-1729.
195. Goyal, N.P., et al., *Evaluation of Quantitative Imaging Biomarkers for Early-phase Clinical Trials of Steatohepatitis in Adolescents*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2020. **70**(1): p. 99-105.
196. Fraquelli, M., et al., *Etiology-related determinants of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B or C*. J Hepatol, 2011. **54**(4): p. 621-8.
197. Fahmy, D.M., et al., *Changes in Liver Stiffness and Non-Invasive Fibrosis Scores in Egyptian Adolescents Successfully Treated with Ledipasvir-Sofosbuvir for Chronic HCV Infection*. J Pediatr, 2020.
198. Yoneda, M., et al., *Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Dig Liver Dis, 2008. **40**(5): p. 371-8.
199. Petta, S., et al., *Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values*. Hepatology, 2017. **65**(4): p. 1145-1155.
200. Gaia, S., et al., *Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis*. J Hepatol, 2011. **54**(1): p. 64-71.
201. Eddowes, P.J., et al., *Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Gastroenterology, 2019. **156**(6): p. 1717-1730.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau PD Dr. Susanna Wiegand für die langjährige klinische und wissenschaftliche Begleitung des Themas sowie Prof. Dr. Ingolf Sack und Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter für die exzellente wissenschaftliche Zusammenarbeit innerhalb des Konsortiums. Mein besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Philip Bufler für die herausragende klinische und wissenschaftliche Förderung.

Für die langjährige Begleitung und Förderung in der Kindergastroenterologie bedanke ich mich besonders bei Dr. Stephan Henning und Dr. Werner Luck.

Für die frühzeitige wissenschaftliche Unterstützung und Freundschaft bedanke ich mich bei Prof. Dr. Charles Christoph Röhr und PD Dr. Malte Cremer. Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Karsten Weylandt und Prof. Dr. Heiko Krude für die wissenschaftliche Förderung. Für die enge Zusammenarbeit und Hinführung an die Pathologie bin ich Dr. Birgit Rudolph und Prof. Dr. Christoph Loddenkemper zu Dank verpflichtet. Ich danke Dr. Laura Kalveram für die schnelle und außerordentliche Unterstützung in der Arbeitsgruppe. Ich danke Dr. Hans-Peter Müller für seine Unterstützung und Expertise in der klinischen Sonographie. Weiterhin danke ich allen wissenschaftlichen Partnern, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: PD Dr. Nikolaus Berndt (Institut für Biochemie), PD Dr. Jürgen Braun, Dr. Heiko Tzschätzsch, Dr. Jing Guo (Experimentelle Radiologie), Dr. David Meierhofer (Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin), Dr. Wolf-Hagen Schunck und Dr. Michael Rothe (Max Delbrück Zentrum Berlin), Prof. Dr. Jan Hengstler und Dr. Nashitek Vartak (Leibniz Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund).

Mein Dank gilt meinen Eltern Renate und Klaus Hudert und meinem Bruder Markus Hudert.

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Dr. med. Christian Hudert