

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und
Rheumatologie (einschließlich Ernährungsmedizin)

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung des Retinol-bindenden Proteins 4 (RBP4)
in der Pathogenese der nichtalkoholischen
Fettlebererkrankung (NAFLD)**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maher Madi

aus Lattakia-Syrien

Datum der Promotion : 25.10.2013

Inhaltverzeichnis

1. Abstrakt	1
2. Einleitung	4
2.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD)	4
2.2 Nichtalkoholische Steatohepatitis bei Erwachsenen (NASH).....	6
2.2.1 Diagnostik.....	6
2.2.2 Epidemiologie	7
2.3 Insulinresistenz	8
2.3.1 Definition und Messung der Insulinresistenz	8
2.3.2 Epidemiologie der Insulinresistenz	11
2.4 Retinol-bindendes Protein 4	11
3. Fragestellung und Ziel der Studie	14
4. Methoden	15
4.1 Untersuchungsdesign	15
4.2 Rekrutierung des Patienten- und Kontrollkollektivs	17
4.2.1 Rekrutierung der Patienten.....	17
4.2.2 Rekrutierung der Kontrollen.....	18
4.3 Untersuchungsablauf	18
4.3.1 Anamnese und klinische Untersuchung	18
4.3.2 Abdomensonographie	19
4.3.3 Ausschluß der Differentialdiagnosen	19
4.3.4 Leberbiopsie	21
4.3.5 Diagnostik des metabolischen Syndroms.....	22
4.3.5.1 Diagnostik von Störungen des Glucosestoffwechsels.....	23
4.3.5.2 Diagnostik und Berechnung der Insulin-Resistenz.....	24
4.3.5.3 Diagnostik von Dyslipidämien	25
4.3.5.4 Diagnostik des Adipositas-Ausmaßes.....	25
4.3.6 Messung des Energieumsatzes	25
4.3.7 Messung der Körperzusammensetzung	26
4.3.7.1 Messung des Waist- to- Hip-ratio(WHR):	26
4.3.7.2 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA):	26
4.3.8 Messung des Retinol-bindenden Protein 4 (RBP4) :	28
4.4 Methoden der Datenanalyse	28
5. Ergebnisse	29
5.1 Ergebnisse der Patienten mit erhöhten Transaminasen (Teil A).....	29
5.2 Ergebnisse der Gesamtgruppe mit NAFLD (Teil B)	29
5.2.1 Allgemeine Charakterisierung	29
5.2.2 Vorkommen des metabolischen Syndroms	29

5.3 Vergleich der Untergruppen NASH und NAFL mit der Kontroll-Gruppe (Teil C und D)	30
5.3.1 Allgemeine Charakterisierung	31
5.3.1.1 Geschlechtsverteilung.....	31
5.3.1.2 Altersverteilung	32
5.3.2 Vorkommen des metabolischen Syndroms und seiner Einzelkriterien	32
5.3.2.1 Gestörter Glucosestoffwechsel	32
5.3.2.2 Body Mass Index (BMI).....	32
5.3.2.3 HOMA-Index	33
5.3.2.4 Arterieller Hypertonus	34
5.3.2.5 Waist-to Hip-ratio (WHR)	35
5.3.2.6 Taillenumfang	36
5.3.2.7 Vorhandensein einer Dyslipidämie.....	37
5.3.3 Vergleich der Körperzusammensetzung.....	39
5.3.3.1 Fettmasse in Prozent vom Körpergewicht	39
5.3.3.2 Fettfreie Masse in kg (FFM).....	40
5.3.4 Ergebnisse der Indirekten Kalorimetrie.....	41
5.3.4.1 Vergleich der Kohlenstoffdioxid-Produktion (VCO ₂) und Sauerstoffverbrauch (VO ₂)	41
5.3.4.2 Vergleich des respiratorischen Quotienten (RQ).....	41
5.3.4.3 Vergleich des Grundumsatzes (GU)	42
5.3.5 Retinol-bindendes Protein 4 (RBP4).....	43
5.3.5.1 RBP4 im Gruppenvergleich.....	43
5.3.5.2 Beziehung zwischen RBP4 und BMI.....	44
5.3.5.2.1 Zusammenhang zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe	44
5.3.5.2.2 Zusammenhang zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe und Geschlecht	47
5.3.5.3 Beziehung zwischen RBP4 und WHR	49
5.3.5.3.1 Korrelation zwischen RBP4 und WHR pro Gruppe	49
5.3.5.3.2 Korrelation zwischen RBP4 und WHR pro Gruppe und Geschlecht.....	50
5.3.5.4 Beziehung zwischen RBP4 und Taillenumfang.....	51
5.3.5.5 Beziehung zwischen RBP4 und HOMA	51
5.3.5.5.1 Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe	52
5.3.5.5.2 Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe und Geschlecht	53
5.3.5.6 Beziehung zwischen RBP4 und dem Vorhandensein eines metabolischen Syndroms.....	54
5.3.5.7 Beziehung zwischen RBP4 und Fettmasse (FM).....	55
5.3.5.8 Beziehung zwischen RBP4 und Fettfreier Masse (FFM)	56
5.3.5.9 Beziehung zwischen RBP4 und Grundumsatz (GU).....	56
6. Diskussion	59

6.1 Auswahl des Patientenkollektives	59
6.2 Bedeutung des Ernährungszustandes, der Körperzusammensetzung und des Energiestoffwechsels für die NASH	61
6.3 Bedeutung des Glukosestoffwechsels, der Insulinresistenz und des Metabolischen Syndroms für die NASH.....	64
6.4 Bedeutung des Retinol-bindenden-Proteins (RBP4) für die NAFL und NASH.....	67
6.5 Zusammenhang zwischen RBP4 und Insulinresistenz und Metabolischem Syndrom.....	70
7. Literatur	72
8. Eidesstattliche Versicherung	80
9. Lebenslauf.....	81
10. Danksagung	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für eine NASH	8
Tabelle 2: Auflistung der durchgeführten differentialdiagnostischen Maßnahmen.	19
Tabelle 3: Stadien der NASH nach den Brunt-Kriterien 1999	22
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der WHO-Definition des metabolischen Syndroms.....	22
Tabelle 5: Interpretation des Befunds eines oralen Glukosetoleranztestes (OGTT).	24
Tabelle 6: Unterteilung der Patientengruppen nach Alter, Geschlecht, ALT und AST	31
Tabelle 7: Absolute Fettmasse im Gruppenvergleich	40
Tabelle 8: VO₂ und VCO₂ im Gruppenvergleich.....	41
Tabelle 9 : RBP4-Werte im Gruppenvergleich.....	43
Tabelle10: Korrelationen zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe.....	45
Tabelle11: Korrelation zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe und Geschlecht	47
Tabelle 12: Korrelation zwischen RBP4 und Waist-to-Hip-ratio im Gruppenvergleich.....	50
Tabelle 13: Korrelation zwischen RBP4 und Waist-to-Hip-ratio pro Gruppe und Geschlecht.....	50
Tabelle14: Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe.....	52
Tabelle 15: Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe und Geschlecht.	53
Tabelle 16: RBP4 mit Vorhandensein eines metabolischen Syndroms im Gruppenvergleich.....	54
Tabelle 17: Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die molekulare Struktur des retinol-bindenden Proteins 4 (RBP4) ..	12
Abbildung 2: Flussdiagramm zum Untersuchungsdesign.	16
Abbildung 3: BMI in kg/m ² im Gruppenvergleich.....	33
Abbildung 4: HOMA- Wert im Gruppenvergleich.....	34
Abbildung 5: Existenz eines arteriellen Hypertonus im Gruppenvergleich	35
Abbildung 6: Waist- to-Hip-ratio (WHR) im Gruppenvergleich	36
Abbildung 7: Taillenumfang (cm) im Gruppenvergleich	37
Abbildung 8: Vorhandensein einer Dyslipidämie im Gruppenvergleich.....	38
Abbildung 9: Vorhandensein eines metabolischen Syndroms im Gruppenvergleich.....	39
Abbildung 10: Fettfreie Masse in kg im Gruppenvergleich.....	40
Abbildung 11: Respiratorischer Quotient (RQ) im Gruppenvergleich	42
Abbildung 12: Grundumsatz (GU) in kcal/24h im Gruppenvergleich.....	43
Abbildung 13 : RBP4 im Gruppenvergleich	44
Abbildung 14 die Korrelation zwischen RBP4 und BMI in der NASH-Gruppe	46
Abbildung 15 die Korrelation zwischen RBP4 (µg/ml) und BMI (kg/m ²) in der Kontroll-Gruppe.....	47
Abbildung 16: Korrelation zwischen RBP4 und BMI bei Frauen der NASH-Gruppe (r=0,39, p=0,021)	49
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen RBP4 und HOMA allgemein.....	52
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen RBP4 und FM allgemein.....	55
Abbildung 19: Zusammenhang zwischen RBP4 und Grundumsatz	56

Abkürzungen

Kürzel	Begriff
α	Phasenwinkel
ALT	Alanin-Transaminase
AST	Aspartat-Transaminase
ATP-III	Adult-Treatment-Panel III
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	Body Mass Index
BZ	Blutzucker
CDT	Carbohydrat-defizientes Transferrin
CMV-AK	Cytomegalievirus-Antikörper
DM	Diabetes Mellitus
EBV-AK	Epstein Barr Virus-Antikörper
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FFM	Fettfreie Masse
FFS	Freie Fettsäuren
FM	Fettmasse
FM-kg	Fettmasse in kilogramm
FM-pro	Fettmasse als Prozent vom Körpergewicht
FSIGT	Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test
GU=REE	Grundumsatz= Rest Energy Expenditure
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HDL-Cholesterin	High-Density- Lipoprotein-Cholesterin
HOMA	Homeostatic Model Assessment
HSV-AK	Herpes Simplex Virus-Antikörper
IGT	Impaired glucose tolerance
IL6	Interleukin 6
IR	Insulinresistenz
KG	Kontrolle-Gruppe
KH	Kohlenhydrate
KHK	Koronare Herzerkrankung

LDL	Low Density Lipoprotein-Cholesterin
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease, nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NAFL	Nicht alkoholische Fettleber
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NHANES-III	National Health and Nutrition <i>Survey III</i>
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
R	Resistenz
RBP4	Retinol binding protein 4
RQ	Respiratorischer Quotient
SD	Standard deviation
SE	Standard Error
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Produktion
VLDL	Very Low Density Lipoprotein- Cholesterin
WHO	World health organisation
WHR	Waist-to-hip-ratio
X _c	Reaktanz
Z	Impedanz

1. Abstrakt

Einleitung und Ziele der Studie:

Die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) wurde bereits im Jahre 1980 von dem Pathologen Ludwig definiert. Die NASH ist häufig mit Insulinresistenz, zentraler Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus assoziiert. Die Progression von der reinen nichtalkoholischen Fettleber (NAFL) zur nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) ist aber pathogenetisch immer noch ungeklärt. In den letzten Jahren wurde das Retinol-bindende Protein 4 (RBP 4) mit Insulinresistenz in Verbindung gebracht. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob erhöhte Spiegel an RBP 4 zur Differenzierung von NAFL und NASH verwendet werden können und mit der Insulinresistenz dieser Patienten assoziiert sind.

Methodik: Bei 121 Patienten mit erhöhten Transaminasen unklarer Genese wurde eine Abdomensonografie als Screening auf Fettleber durchgeführt. Nach Ausschluss der Differentialdiagnosen wurde sonografisch eine Leberparenchymverfettung bei 67 Patienten festgestellt. Zur weiteren Differenzierung der NAFLD-Gesamtgruppe erfolgte eine Leberbiopsie, wodurch nach den Brunt-Kriterien 2 Untergruppen (NASH-Gruppe n= 53, und NAFL-Gruppe: n=14 Patienten) generiert wurden. Als Kontroll-Gruppe wurden 23 gesunde übergewichtige Probanden mit unauffälligen Leberwerten ausgewählt. Patienten und Kontrollen unterschieden sich nicht in Alter, Geschlechtsverteilung und BMI. Bei allen Patienten und Kontrollen wurde die Fettverteilung anthropometrisch und die Körperzusammensetzung mittels Bioelektrischer Impedanzanalyse (BIA) ermittelt. Der Ruhe-Energieumsatz wurde mit der indirekten Kalorimetrie ermittelt. Auch die Leberwerte, Blutfette, Nüchterninsulin und -glucose, HOMA-Index, OGTT und das Serum-Retinol-bindende Protein 4 wurden bei Patienten und Kontrollen bestimmt.

Ergebnisse: Die HOMA-Werte lagen in unserer Studie bei den NASH-Patienten ($5,73 \pm 5,79$) signifikant höher ($p < 0,001$) als bei der NAFL- ($3,51 \pm 2,63$) und der Kontroll-Gruppe ($2,23 \pm 1,67$).

Störungen des Glukosestoffwechsels ($p < 0,001$), arterieller Hypertonus ($p = 0,005$) sowie metabolisches Syndrom ($\chi^2 = 26,1$, $p < 0,001$) traten signifikant häufiger in der NASH-Gruppe als in der NAFL- und der Kontroll-Gruppe auf.

Die RBP4-Werte waren bei den Patienten mit NAFLD (NASH-Gruppe $10,9 \mu\text{g/ml} \pm 0,60$, NAFL-Gruppe: $9,8 \mu\text{g/ml} \pm 1$) nicht nur nicht höher, sondern sogar signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe (RBP4 $17,4 \mu\text{g/ml} \pm 1,8$) (Post-Hoc $p = 0,0001 - 0,001$).

Es zeigte sich weiterhin eine signifikante positive Korrelation zwischen dem RBP4-Wert und dem BMI bei den weiblichen NASH-Patienten ($r = 0,39$, $p = 0,021$), nicht jedoch bei den männlichen Patienten ($p = 0,6$).

Die eigenen Daten zeigten allerdings keinerlei Zusammenhang zwischen dem RBP4-Spiegel und der WHR ($r = 0,89$, $p = 0,44$), dem HOMA-Wert ($\tau\text{-}b = -0,101$, $p = 0,162$), oder dem Auftreten des metabolischen Syndroms ($p > 0,1$).

Schlussfolgerung: Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung ist ein Ausdruck einer Insulinresistenz und eines metabolischen Syndroms. Die Hoffnung, im RBP4 einen pathogenetisch plausiblen und diagnostisch sensitiven Biomarker für Insulinresistenz und NASH zu finden, hat sich jedoch in dieser Studie nicht bestätigt.

Abstract:

Background and aim of the study: The non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was already defined in 1980 by the pathologist Ludwig. The NASH is often associated with insulin resistance, central obesity and type 2 diabetes. The progression from simple steatosis (NAFL) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is still unclear.

In recent years, the retinol-binding protein 4 (RBP 4) has been shown to be associated with insulin resistance. The aim of this study was to investigate whether increased levels of RBP4 can be used to differentiate NAFL from NASH and whether they are associated with the insulin resistance in these patients.

Methods: An abdominal sonography as a screening for fatty liver was performed on 121 patients with elevated transaminases of unknown origin. After exclusion of differential diagnoses, a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been detected in 67 patients. For further differentiation of the whole NAFLD group a liver biopsy

was performed, which generated two subgroups (NASH group: n=53, and NAFL group: n =14) according to the Brunt criteria. As a control group, 23 healthy obese subjects were selected with normal liver enzyme levels. Patients and controls did not differ in age, gender ratio and BMI. In all patients and controls we have done anthropometric measurements to estimate body fat and distribution, and a bioelectrical impedance analysis (BIA) for estimating body composition. The resting energy expenditure was measured in all patients and controls using indirect calorimetry. The liver function tests, liver enzymes levels, blood lipids, fasting insulin and glucose, HOMA index, OGTT and serum retinol-binding protein 4 were determined in all patients and controls.

Results: In our study HOMA values were found significantly higher in the NASH group (5.73 ± 5.79) than in the NAFL group (3.51 ± 2.63) and the control group (2.23 ± 1.67) [$p < 0.001$].

Impaired glucose metabolism ($p < 0.001$), hypertension ($p = 0.005$) and metabolic syndrome ($\chi^2 = 26.1$, $p < 0.001$) were found significantly more often in the NASH group than in the NAFL group and the control group.

The RBP4 level in NAFLD patients (NASH group: $10.9 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.60$, NAFL group: $9.8 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.0$) were not only not higher, but even significantly lower than in the control group (RBP4 = $17.4 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.8$) (post hoc $p = 0.0001 - 0.001$).

Furthermore our study found a significant positive correlation between RBP4 level and BMI in female patients of the NASH group ($r = 0.39$, $p = 0.021$) but not in the male patients ($p = 0.6$).

However, our own data showed no correlation between RBP4 levels and WHR ($r = 0.89$, $p = 0.44$), HOMA-value ($\tau\text{-}b = -0.101$, $p = 0.162$), or the occurrence of the metabolic syndrome ($p > 0.1$).

Conclusion: The non-alcoholic fatty liver disease is an expression of insulin resistance and metabolic syndrome. The expectation that the RBP4 could be a pathogenic and diagnostically sensitive biomarker for insulin resistance and for NASH has not been confirmed in this study.

2. Einleitung

2.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD)

Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (Non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) sind die häufigsten Lebererkrankungen in westlichen Ländern und die häufigste Ursache für Aminotransferasenerhöhungen unklarer Genese. Der Begriff NAFLD umfasst die reine Fettleber (Steatose), die Fettleber mit Entzündung (nichtalkoholische Steatohepatitis, NASH), die NASH mit Steatofibrose oder Zirrhose und in manchen Fällen das hepatozelluläre Karzinom [38]. Die NAFLD ist in vielen Fällen eine hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms.

Pathogenese

Insulinresistenz spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der NAFLD [1]. Insulinresistenz ist mit erhöhten Spiegeln von freien Fettsäuren (FFS) im Blut und einer vermehrten Aufnahme der FFS in die Leber verbunden. Wegen metabolischer Überforderung werden die nicht als VLDL (very low density lipoprotein) abtransportierten freien Fettsäuren in den Hepatozyten abgelagert und zu Triglyzeriden reesterter. Das Resultat dieser Vorgänge ist eine Lebersteatose. Dabei handelt es sich hierbei zunächst um eine prinzipiell reversible Verfettung. In den meisten, aber nicht in allen Fällen [2, 3] tritt eine Insulinresistenz im Rahmen einer Adipositas und eines Diabetes mellitus Typ 2 auf [4]. Unter welchen Bedingungen es bei einigen Patienten bei der benignen Lebersteatose bleibt und bei anderen zum Auftreten einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) mit Progression in eine Leberfibrose und Zirrhose kommt, ist nicht abschließend geklärt.

Ein inzwischen weit akzeptiertes Erklärungsmodell basiert auf der so genannten „second hit“-Hypothese [5]. Hier wird als wichtiger Faktor, der die entzündlichen Reaktionen bei NASH zumindest mitbedingen könnte, das Auftreten von oxidativem Stress diskutiert, der mit der Bildung verschiedener toxischer freier Sauerstoffradikale

einhergeht. Aufgrund einer Reaktion der freien Sauerstoffradikale mit den Lipidmembranen kommt es zu deren Schädigung (Lipidperoxidation). Auf diese Weise werden zum einen Zellnekrosen verursacht und andererseits Botenstoffe, wie z. B. Zytokine, Interleukine und Adhäsionsmoleküle freigesetzt. Diese rufen dann eine Entzündungsreaktion hervor (Leukozyteninfiltration). Im Rahmen der NASH gibt es verschiedene Auslöser oxidativen Stresses. Hierzu gehören die vermehrte Fettoxidation, die Hyperglykämie und vor allem auch das Zytochrom P4502E1 (CYP2E1), das bei NASH-Patienten ähnlich wie bei chronischem Alkoholkonsum induziert ist [6]. Letzteres ist verantwortlich für die mikrosomale 1- und 2-Oxidation der freien Fettsäuren, was zur Bildung zytotoxischer Decarboxylsäuren und vor allem auch zu freien Radikalen führt. Die Regulation der CYP2E1-Expression ist sehr komplex und teilweise durch das Insulin kontrolliert. Bei NASH-Patienten resultiert diese Induktion sehr wahrscheinlich aus einer herabgesetzten Empfindlichkeit der Hepatozyten für Insulin infolge der Insulinresistenz [7]. Andere Quellen für freie Radikale sind ein häufig vorhandener Eisenüberschuss in der Leber sowie die Aktivierung der Kupffer-Zellen. Auch verminderte antioxidative Abwehrmechanismen tragen zu einer Entwicklung der NASH bei.

Als zweiter wichtiger Faktor zur Entstehung einer NASH wird die Aktivierung residenter Makrophagen der Leber und der Kupffer-Zellen durch so genannte Endotoxine diskutiert, welche die Leber über die Pfortader vom bakteriell überbesiedelten Darm, ein Zustand, der bei NASH gehäuft gefunden wird [8], erreichen.

Diese Endotoxine werden dabei über Rezeptoren von den Kupffer-Zellen abgefangen. Dadurch werden die Kupffer-Zellen aktiviert und produzieren wichtige Zytokine und Interleukine (TNF α , IL-6). Dies führt ebenfalls zu zytotoxischen Effekten, entzündlichen Reaktionen und einer Aktivierung der Lebersternzellen, die für die Produktion extrazellulärer Matrix inklusive des Kollagens verantwortlich sind. Die Lebersternzellen können auch direkt durch Produkte des oxidativen Stresses angeregt werden. Auf diese Weise führt die Aktivierung der Lebersternzellen zur Fibrosierung und bei anhaltendem Stimulus zur Leberzirrhose [1].

2.2 Nichtalkoholische Steatohepatitis bei Erwachsenen (NASH)

2.2.1 Diagnostik

Der Bezeichnung NASH wurde erstmals in Abgrenzung von der alkoholischen Steatohepatitis im Jahr 1980 durch den Pathologen Ludwig et al. eingeführt, der bei einer Gruppe von nachweislich alkoholabstinenten Patienten ein histologisches Bild vorfand, das dem der alkoholischen Steatohepatitis sehr ähnlich war [47].

Entsprechend basiert die Diagnose einer nichtalkoholischen Steatohepatitis nach Ausschluss anderer Lebererkrankungen primär auf der histologischen Evaluierung einer Leberbiopsie [9 –12].

Eine nichtalkoholische Hepatitis ist charakterisiert durch Verfettung, Zeichen eines Leberzellschadens wie Ballonierung und Nekrose, entzündliche Infiltrate, die von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen dominiert werden und durch den Nachweis von Fibrose (von minimal perivaskulären Herden bis zu ausgedehnter Fibrose und fibrösen Septen reichend). Auch können sich wie bei der alkoholischen Steatohepatitis Mallory Körperchen finden, die aber häufig kleiner als bei der ASH sind. NASH beginnt üblicherweise perivaskulär/perivenös, breitet sich mit zunehmender Schwere der Erkrankung Richtung Portalfelder aus und führt letztlich über Nekrose und Bindegewebsbrücken zur Zirrhose.

Powell und Mitarbeiter [7] schlagen folgende Kriterien zur Definition einer NASH vor:

- 1) Histologische Veränderungen, bestehend aus stärkerer makrovesikulärer fettiger Degeneration mit Entzündung (lobulär oder portal) ohne oder mit Mallory-Körperchen, Fibrose und/oder Zirrhose.
- 2) Geringer Alkoholkonsum (< 30 g/d Alkohol bei Männer, <20g/d Alkohol bei Frauen) basierend auf exakter (Fremd-)anamnese. Idealerweise sollten wiederholte Negativresultate für Carbohydrat-defizientes Transferrin vorliegen.
- 3) Ausschluß einer chronisch-viralen Hepatitis (B, C), beziehungsweise anderer chronischer Lebererkrankungen.

Für das Staging und Grading der NASH hat sich die Einteilung nach Brunt [10] durchgesetzt, die auch in dieser Arbeit Anwendung fand.

2.2.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der NASH in Deutschland ist nicht exakt geklärt. Studien an großen Serien von Leberbiopsien zeigen, dass sich die Prävalenz bei ca. 10 % bewegen könnte [9-15]. Da die meisten dieser Daten aus den USA stammen, lassen sie nur begrenzt Rückschlüsse auf das Vorkommen in Deutschland zu. Die NASH wird am häufigsten in der 5. und 6. Lebensdekade beobachtet [9, 16]. Die Erkrankung scheint bei Frauen etwas häufiger vorzukommen. Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer NASH sind Adipositas und Diabetes mellitus. In den meisten Studien waren 69–100% der Patienten mit NASH adipös [9, 14]. Lediglich eine Studie von Bacon und Mitarbeitern zeigte eine geringere Prävalenz [16]. NASH wurde auch bei Patienten beobachtet, die sich auf Grund der Adipositas einer chirurgischen Therapie unterzogen bzw. die eine rasche Gewichtsabnahme verzeichneten [17]. Eine schnelle Gewichtsabnahme scheint sogar einen beträchtlichen Risikofaktor für das mögliche Auftreten eines Leberversagens oder rascher Progredienz Richtung Zirrhose darzustellen [18]. Diabetes mellitus stellt neben der Adipositas einen zweiten wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung eines NASH dar [9, 14]. Diabetes mellitus oder eine pathologische Glukosetoleranz liegen bei 34–75% aller Patienten mit NASH vor. Eine etwas niedrigere Inzidenz wurde wiederum zuletzt von Bacon beschrieben [16]. Insgesamt scheint das Vorliegen einer Insulinresistenz (IR) in praktisch allen Fällen einer NASH vorhanden zu sein und damit stellt die IR einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese dieser Erkrankung dar. Die Rolle der Hypercholesterinämie bzw. Hyperlipidämie bei NASH ist weniger klar. Zahlreiche andere Erkrankungen bzw. auch Medikamente werden mit NASH in Zusammenhang gebracht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Risikofaktoren für eine NASH

Metabolische Aspekte
Insulinresistenz
Adipositas
Diabetes mellitus,
pathologische Glukosetoleranz
Hyperlipoproteinämie
Rasche Gewichtsabnahme
Total parenterale Ernährung Malabsorption bei z.B. Sprue
Chirurgische Maßnahmen
Kurzdarmsyndrom Jejunaler Bypass
Extensive Dünndarmresektion
„Gastric Banding“
Medikamente
Amiodaron
Statine
Glukokortikoide Diltiazem
Tamoxifen Isoniazid

2.3 Insulinresistenz

2.3.1 Definition und Messung der Insulinresistenz

Insulinresistenz ist ein pathophysiologischer Zustand, in dem eine Insulindosis, die zu normalen oder hochnormalen Seruminsulinwerten führt, eine subnormale Wirkung

erzeugt [19]. Methode der Wahl zur Messung der Insulinwirkung ist der hyperinsulinämische, euglykämische Glucose-Clamp-Versuch. Während einer konstanten intravenösen Infusion von Insulin ($40 \text{ mE/m}^2 \text{ Körperoberfläche/min}$) wird eine 20%ige Glukoselösung in Raten infundiert, die einen Abfall des Blutzuckers verhindern und ihn im euglykämischen Bereich halten soll [20]. Dies setzt eine Messung des Blutzuckers in 2- bis 5-minütigen Abständen voraus. Aufgrund dessen ist die Methode bei einer Gesamtdauer von 2–3 Stunden sehr aufwendig. Die infundierten Glukosemengen sind ein Maß für die Insulinsensitivität: Wird viel Glukose benötigt, ist der Organismus insulinempfindlich; d. h. die Insulinresistenz ist niedrig. Die Insulinresistenz ist hoch, wenn wenig Glukose benötigt wird. Für eine Insulinresistenz gibt es bisher noch keinen eindeutigen Schwellenwert. In Studien werden Patienten im niedrigsten Quintil der Glukoseinfusionsraten von gesunden Probanden als resistent eingestuft.

Die mit dem Glucose-Clamp gemessene Glukoseaufnahme ist vorwiegend ein Maß für die Insulinresistenz der Skelettmuskulatur. Der Begriff „Insulinresistenz“ kann sich natürlich auch auf andere Insulinwirkungen beziehen: die Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion, die Hemmung der Lipolyse des Fettgewebes, die Wirkungen auf Ionentransport, Proteinsynthese und Genexpression sowie die vasodilatierende Wirkung. Die Insulinresistenz muss an den verschiedenen Organen nicht zwangsläufig gleich stark ausgeprägt sein.

Andere, nicht ganz so aufwendige Methoden wie der Glucose-Clamp-Versuch sind die intravenöse und die orale Glukosebelastung. Bei der intravenösen Glukosebelastung sind 22 Blutentnahmen über 3 Stunden mit der Messung von Glukose und Insulin erforderlich (FSIGT; Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test). Die Parameter der Insulinresistenz werden mit Hilfe des sogenannten „Minimal Models“ berechnet [21]. Bei der oralen Glukosebelastung wird ein Insulinsensitivitätsindex aus den halbstündlich gemessenen Glukose- und Insulinwerten berechnet [22]. Da auch diese Methoden recht aufwendig sind, sind sie für die klinische Praxis und für epidemiologische Untersuchungen nicht geeignet.

Ein einfacher und kostengünstiger Ansatz ist die HOMA-Methode (Homeostatic Model Assessment). Dabei wird ein Resistenzindex (HOMA-IR) aus den Nüchternwerten von Glukose und Insulin berechnet [23]. Das Ausmaß der Insulinresistenz steigt mit der

Höhe des HOMA-Wertes an. Indirekte Hinweise auf das Ausmaß der Insulinresistenz geben auch hohe Nüchternwerte von Insulin, C-Peptid und Triglyzeriden sowie niedrige Nüchternwerte von HDL-Cholesterin.

Die Insulinresistenz ist häufig mit dem **metabolischen Syndrom** (auch „Syndrom X“ genannt) assoziiert. Nach Adult Treatment Panel III (ATP-III)-Definition [24] müssen für die Diagnose des metabolischen Syndroms mindestens 3 der folgenden Bedingungen erfüllt sein:

Abdominelle Adipositas (Bauchumfang > 102 cm bei Männern;> 88 cm bei Frauen)

Hypertriglyzeridämie > 150 mg/dl (1,7 mMol/l)

Erniedrigtes HDL-Cholesterin < 40 mg/dl (1,0 mMol/l) bei Männern, < 50 mg/dl (1,3 mMol/l) bei Frauen

Erhöhter Blutdruck > 130/85 mmHg

Erhöhter Nüchtern-Blutzucker > 110 mg/dl (6,1 mMol/l)

Andere Kriterien für die Diagnose des metabolischen Syndroms wurden von der WHO herausgegeben. Nach diesen Kriterien [25] liegt das Syndrom vor, wenn ein Diabetes, eine gestörte Glukosetoleranz oder eine abnorme Nüchternglukose besteht und zusätzlich mindestens zwei der folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1) Erhöhter Blutdruck ($\geq 140/90$ mmHg)

2) Hyperlipidämie: Triglyzeride > 150 mg/dl (1,7 mMol/l) und/oder HDL-Cholesterin ≤ 35 mg/dl (0,9 mMol/l) bei Männern und ≤ 40 mg/dl (1,0 mMol/l) bei Frauen

3) Abdominelle Adipositas: WHR > 0,90 bei Männern und > 0,85 bei Frauen und/oder BMI > 30 kg/m²

Wenn die Glukosetoleranz nicht gestört ist, muss zur Diagnose des metabolischen Syndroms nach WHO-Kriterien zusätzlich zu mindestens zwei der oben genannten Bedingungen eine Insulinresistenz vorliegen (höchstes Quartil des HOMA-Index einer Normalpopulation).

-Interpretation des HOMA-IR-Werts :

≤ 1 = normal

>2 =Hinweis auf Insulinresistenz (IR)

>2,5 =Insulinresistenz wahrscheinlich

>5,0 = Durchschnittswert bei Typ2-Diabetikern

2.3.2 Epidemiologie der Insulinresistenz

In einer epidemiologischen Untersuchung an 888 zufällig ausgewählten Bewohnern der norditalienischen Stadt Bruneck wurde die Prävalenz der Insulinresistenz ermittelt [26]. Dabei wurde die HOMA-Methode zur Quantifizierung der Insulinresistenz angewendet. Eine Insulinresistenz trat bei Patienten mit IGT (Impaired glucose tolerance) zu 65,9 %, mit Typ-2-Diabetes zu 83,9 %, mit Hypercholesterinämie zu 53,5 %, mit Hypertriglyzeridämie zu 84,2 %, mit erniedrigtem HDL-Cholesterin zu 88,1 %, mit Hyperurikämie zu 62,8 % und mit Hochdruck zu 58,0 % auf. Bei Patienten mit einer Kombination von Glukosetoleranzstörung, Dyslipidämie, Hyperurikämie und Hochdruck zeigte sich bei 95,2 % eine Insulinresistenz. Auffallend war, dass bei 9,6 % der Probanden eine Insulinresistenz bestand, obwohl sie weder Hypertonie, Dyslipidämie, Glukosetoleranzstörung oder Hyperurikämie hatten; 42,1 % dieser Probanden waren jedoch übergewichtig.

2003 wurde die Prävalenz des metabolischen Syndroms im nordamerikanischen NHANES-III-Survey gemessen [27]. Definiert nach ATP-III-Kriterien betrug sie 23,9 %, nach WHO-Kriterien 25,1 % (altersadjustierte Prävalenz) der untersuchten Population. Insulinresistenz steht auch mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse in Zusammenhang, wie in zahlreichen epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte [28-30].

2.4 Retinol-bindendes Protein 4

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Faktoren beschrieben bzw. diskutiert, die einen Zusammenhang zur Insulinresistenz aufweisen und daher auch an der Entstehung der NASH beteiligt sein könnten, u.a. auch das Retinol-bindende Protein 4.

Vitamin A bzw. Retinol gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Es ist wesentlich an Prozessen der Zelldifferenzierung beteiligt und kann daher bestimmte Entwicklungsprozesse wie die Bildung des Fettgewebes beeinflussen. Retinol muss

extrazellulär (im Blut) sowie intrazellulär an Transport-Moleküle, die Retinol-bindenden Proteine (RBPs), gebunden werden, da es fettlöslich ist. Die zwei bekanntesten Vertreter der RBPs sind das Retinol-bindende Protein 4 (RBP4) und das intrazelluläre Retinol-bindende Protein Typ I (CRBP-I). RBP4 ist für den Transport von Vitamin A im Blut von der Leber zur Zielzelle und zum Abbauorgan für Vitamin A (der Niere) verantwortlich. CRBP-I ist in der Leber für die Speicherung von Vitamin A zuständig. In einigen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten RBP4-Werten im Blut und Typ-2-Diabetes besteht. [39 , 40]

RBP4 wird hauptsächlich in der Leber produziert [65]. Fettgewebe hat die zweithöchste Expressionrate und die Niere etwa 10% der Expressionrate der Leber [64, 66]

Die RBP4-Expression in der Leber wird durch die Verfügbarkeit von Vitamin-A und dem Ernährungszustand reguliert [79].

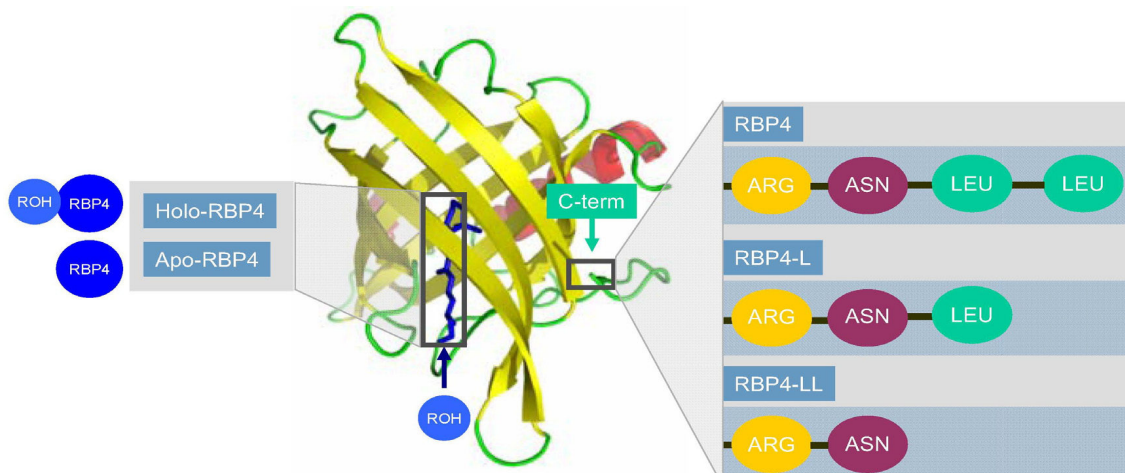


Abbildung 1: Die molekulare Struktur des retinol-bindenden Proteins 4 (RBP4). (Nach S. Frey : 2009)[41].

In Abbildung 1 ist die molekulare Struktur von RBP4 dargestellt. RBP4 bindet Retinol (ROH) und wird daraufhin holo-RBP4 genannt. Nach der Abgabe von ROH in die Zielzellen verbleibt das so genannte apo-RBP4. Das C-Terminal des Proteins ist durch

die Aminosäure Asparagin (ASN) und durch zwei Leucinmoleküle (LEU) charakterisiert. RBP4-L und RBP4-LL sind um ein bzw. zwei Leucinmoleküle gekürzt.

Das RBP4 scheint ein beeinflussender Faktor auf die Insulinresistenz der Leber und der Skelettmuskeln von Nagetieren zu sein, wobei aber der genaue Wirkmechanismus noch unklar ist [64]. Beim Menschen wird der Zusammenhang zwischen erhöhten RBP4-Werten und Übergewicht uneinheitlich berichtet:

Janke et al. [67] konnten zeigen, dass RBP4 auch in reifen humanen Adipozyten hoch exprimiert und durch differenzierende menschliche Adipozyten sezerniert wird, daher wird es auch als Adipokin aufgefasst. In der Studie von Graham et al. [63] wurde nachgewiesen, dass adipöse Patienten mit oder ohne Typ 2 Diabetes Mellitus eine höhere Serum-RBP4-Konzentration haben als schlanke Kontrollpersonen. Cho et al. [68] fanden einen signifikanten Unterschied in den RBP4-Plasmakonzentrationen von Personen mit normaler Glukosetoleranz und Personen mit Typ 2 Diabetes Mellitus.

Im Gegensatz dazu konnten Janke et al. [67] jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Serum-RBP4-Werten zwischen normalgewichtigen, übergewichtigen und adipösen Frauen feststellen.

Auch in der Studie mit normalgewichtigen, übergewichtigen und adipösen Männern durch Shea et al. [70] wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

In der Studie von Stefan et al. [69] wurde eine positive Korrelation zwischen dem Serum-RBP4 und dem Leberfett erkannt; hingegen aber nicht zwischen dem Serum-RBP4 und dem Ganzkörperfett, dem Viszeral- und dem subkutanen Fett.

In einer weiteren Studie von Tajtakova et al. [71] wurde zwar gezeigt, dass die Serum RBP4-Werte bei adipösen Menschen tendenziell höher als bei Normalgewichtigen sind, allerdings erreichten die Unterschiede auch hier keine statistische Signifikanz.

2007 zeigte die Studie von Yao-Borengasser et al. [72], dass die RBP4-mRNA-Expression in Fettgeweben mit Inflammation, aber nicht mit Insulinresistenz, korreliert.

Al Daghri und seine Kollegen stellten fest, dass die Serum-RBP4-Werte mit den TNF-alpha-Werten korrelieren, jedoch nicht mit der Insulinresistenz bei Patienten mit Typ 2 DM und Koronarherzerkrankung [73]. Hingegen zeigten Reinehr et al. [89]

Bei übergewichtigen Kindern einen signifikanten Zusammenhang zwischen RBP4-Spiegeln und dem Gewichtsstatus sowie der Insulinresistenz.

Insgesamt gibt es bei uneinheitlicher Datenlage einige Hinweise, dass RBP4 eine Rolle in der Pathogenese der Insulinresistenz spielen könnte (Kotnik P et al [95]). Daher war ein wesentliches Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob Serum-RBP4-Spiegel bei Patienten mit bioptisch nachgewiesener NAFLD erhöht sind und in Beziehung zu metabolischen Komponenten der Erkrankung stehen.

3. Fragestellung und Ziel der Studie

Diese Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFL- und NASH-Patienten) mit der spezifischen Hypothese, dass erhöhte RBP4-Spiegel als möglicher Trigger einer Insulinresistenz in der Transition von der reinen Fettleber zur NASH eine Rolle spielen könnten.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen untersucht werden:

- A)** Wie unterscheiden sich NASH-Patienten von NAFL-Patienten und gesunder Kontroll-Gruppe bezogen auf Grundcharakteristika des Substratmetabolismus:
- die Körperzusammensetzung (Fettmasse und fettfreie Masse, Körperfettverteilung)
 - den Ruheenergieumsatz und respiratorischen Quotienten
 - und die Insulinresistenz (Homa-Index)?
- B)** Haben Patienten mit NASH höhere RBP-4 Spiegel als Patienten mit NAFL oder gesunde Kontrollen und könnte RBP-4 zur serologischen Differenzierung zwischen NASH und NAFL dienen?
- C)** Welche Beziehung gibt es zwischen RBP4 mit Insulinresistenz und
- der Körperzusammensetzung
 - dem Ruheenergieumsatz
 - der Höhe des HOMA-Index
 - dem Vorhandensein eines metabolischen Syndroms ?

4. Methoden

4.1 Untersuchungsdesign

Die Untersuchung wurde als Fall-Kontroll-Studie an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie des Charité Campus Mitte in Berlin durchgeführt.

Das Studienprotokoll vom 11.07.2001 wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt und nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Es wurden die Daten der Patienten verwendet, die von Januar 2002 bis August 2008 auf den Stationen 141 und 142 stationär waren und bei denen laborchemisch erhöhte Transaminasen nachgewiesen wurden und bei denen kein Anhalt für einen Alkoholabusus oder andere toxische Lebererkrankungen vorlag (siehe Ein- und Ausschlusskriterien),.

Aus dieser Gesamtgruppe wurden wiederum Patienten ausgewählt, die sonographisch Zeichen einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) aufwiesen (Untersuchung Teil B).

Zur Differenzierung der NAFLD-Patienten aus Teil B erfolgte eine histologische Diagnostik nach einer Leberbiopsie. Dadurch ergaben sich 2 Untergruppen (Teil C):

- Eine Gruppe von Patienten mit Steatohepatitis ohne Alkoholabusus (NASH-Gruppe) von 53 Patienten sowie
- Eine Gruppe von Patienten, die histologisch eine Leberverfettung ohne Zeichen einer Hepatitis hatten (NAFL-Gruppe, 14 Patienten).

Für eine Kontroll-Gruppe wurden 23 Erwachsene ausgesucht, die normale Transaminasen und einen normalen sonographischen Leberbefund aufwiesen. (Teil D)
Eine schematische Darstellung des Untersuchungsablaufes ist in Abbildung 2 dargestellt.

Teil A

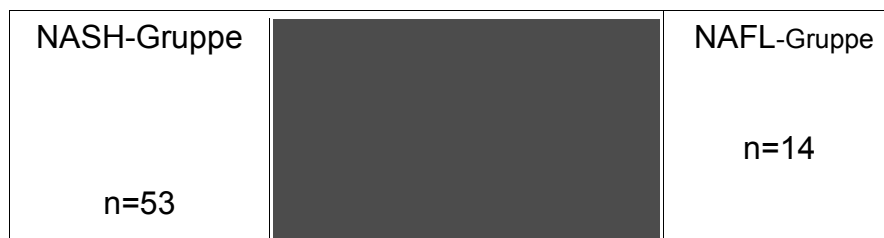
Gesamtpatienten mit erhöhten TA = 121
Stationäre Patienten im Zeitraum vom Januar 2002 bis August 2008 mit erhöhten Transaminasen nach anamnestischem Ausschluß eines Alkoholabusus und der Einnahme lebertoxischer Medikamente.

Teil B

Sonographische Zeichen einer Leberverfettung nach Ausschluß der Differentialdiagnosen der NAFLD. n=67

Teil C

Leberbiopsie: Histologische Differenzierung



Teil D

Kontroll-Gruppe
Erwachsene mit normalen Transaminasen und abdomensonographisch keinen Zeichen einer Leberverfettung

n=23

Abbildung 2: Flussdiagramm zum Untersuchungsdesign.

4.2 Rekrutierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

4.2.1 Rekrutierung der Patienten

121 Patienten mit erhöhten Transaminasen wurden zwischen Januar 2002 und August 2008 auf den Stationen 141 und 142 der Medizinischen Klinik mit dem Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie des Charite Campus Mitte in Berlin rekrutiert und einem Screening unterzogen, das folgende Ein- und Ausschlusskriterien berücksichtigte:

Einschlusskriterien:

Alter >18 Jahre

Vorliegendes Einverständnis des Patienten

Transaminasenerhöhung >1,5 Fach des Normwerts

Alkoholkonsum < 20 g/d

Sonographie: Nachweis einer Leberparenchymverfettung (NAFLD)

Histologie: Nachweis einer Steatohepatitis oder Steatosis hepatis ohne Hepatitis

Ausschlusskriterien:

Alter <18 Jahre

Fehlendes Einverständnis

Vorliegen einer anderen Lebererkrankung: chronische virale, autoimmune, genetische, toxische medikamentöse Lebererkrankung, alkoholische Lebererkrankung.

Sonographie: Keine Zeichen einer Leberverfettung

Histologie: Ausschluss einer nicht alkoholischen Leberverfettung und/oder NASH.

Entsprechend diesen Ein- und Ausschlusskriterien wurden 54 Patienten von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen und 67 Patienten mit NAFLD identifiziert.

Diese wurde dann auf der Basis einer Leberbiopsie in 2 weitere Gruppen aufgeteilt: In die erste Gruppe kamen Patienten, die histologisch Zeichen einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH-Gruppe) aufwiesen (53 Patienten). In die 2. Gruppe kamen Patienten, die histologisch Zeichen einer Leberverfettung zeigten, bei denen aber keine Hinweise auf eine Hepatitis vorlagen (NAFL-Gruppe, 14 Patienten).

4.2.2 Rekrutierung der Kontrollen

Als Kontrollen wurden über einen Aushang auf dem Gelände der Charité im Campus Mitte 23 gesunde übergewichtige Probanden mit einem Body-Mass-Index (BMI) von 25 – 40 kg/m² und mit unauffälligen Leberwerten rekrutiert. Zusätzlich wurde sonographisch eine Leberparenchymverfettung ausgeschlossen. Aus ethischen Gründen wurde auf eine Leberbiopsie bei den Probanden verzichtet. Alle nichtinvasiven Verfahren (HOMA-Index, Analyse der Körperzusammensetzung, Indirekte Kalorimetrie) erfolgten aber in gleicher Weise wie bei den Patienten.

4.3 Untersuchungsablauf

Bei allen Patienten mit erhöhten Transaminasen und sonographischem Nachweis einer Leberparenchymverfettung wurde nach Ausschluß der Differentialdiagnosen eine Leberbiopsie durchgeführt.

Weiterhin wurden der Grundumsatzes mittel indirekter Kalorimetrie, die Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse (BIA), der Bauchumfang, Hüftumfang und das Retinol-bindende Protein 4 (RBP4) bestimmt. Bei allen Patienten wurde der HOMA-Index und bei den Nicht-Diabetikern ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) durchgeführt.

4.3.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Bei allen Patienten wurde im Rahmen der stationären Aufnahme eine ausführliche Eigen- und Familienanamnese durchgeführt. Diese wurde durch detaillierte Fragen zu gastroenterologischen Beschwerden und zur Lebererkrankung bei Patienten selbst und in der Familie ergänzt. Außerdem wurde ein möglicher Medikamenten- und Alkoholkonsum erfragt. Als Grenzwert für einen erhöhten Alkoholkonsum wurden 20g/d angenommen. Zusätzlich wurden Laborkriterien eines chronischen Alkoholabusus berücksichtigt (DeRitis-Quotient, MCV, CDT).

Bei allen Patienten wurde eine allgemeine internistische Statuserhebung durchgeführt. Das Körpergewicht wurde auf 100 g Genauigkeit mit einer elektrischen Waage (Firma Seca, Hamburg) ermittelt, die Körpergröße auf 0.5 cm Genauigkeit mittels eines

Stadiometers (Seca, Hamburg). Der Blutdruck wurde manuell am rechten Ellenbogen des sitzenden Patienten bestimmt.

Eine arterielle Hypertonie wurde mit Blutdruckwerten >139/89 mmHg definiert [31].

Bei der körperlichen Untersuchung wurde besonders auf klinische Zeichen eines chronischen Leberparenchymschadens (Spider naevi, Palmarerythem, Ikterus, Aszites, Hepatosplenomegalie) geachtet.

4.3.2 Abdomensonographie

Bei allen Patienten wurde eine sonographische Untersuchung des Oberbauchs von einem erfahrenen Untersucher durchgeführt. Zur Beurteilung der Leberparenchymverfettung wurde im Wesentlichen die Einteilung in Schweregrade von Saverymattu [32] verwendet, die auf dem Vergleich zum Nierenparenchym, dem Ausmaß der Steatosis-bedingten Schallabschwächung und dem Erhalt/Verlust der Wandechogenität der Pfortaderäste basiert.

4.3.3 Ausschluß der Differentialdiagnosen

Bei allen Patienten, bei denen sonographisch eine Leberparenchymverfettung nachgewiesen wurde, wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Differentialdiagnosen ausgeschlossen:

Tabelle 2: Auflistung der durchgeführten differentialdiagnostischen Maßnahmen.

Mögliche Differentialdiagnose	Zubestimmen der Parameter	Labormethode
Abetalipoproteinämie	LDL VLDL	Zonenelektrophorese mit Auswertung am Hydrasys
Alkoholkonsum	CDT	Partikelverstärkter kompetitiver Immunoassay
Alpha1-Antitrypsin-Mangel	Alpha1-Antitrypsin	Immunturbidimetrie
Autoimmunlebererkrankungen	ANA, AMA, SMA, SLA, LKM, pANCA.	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

(autoimmune Hepatitis, primäre biliäre Leberzirrhose, primär- sklerosierende Cholangitis)		
Hereditäre Hämochromatose	HFE-Genmutation (C282Y, H63D)	Polymerase chain reaction (PCR). Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
	Eisen	Photometrie (Ferrozin)
	Ferritin	Partikelverstärkte Immunturbidimetrie
	Tranferrin	Immunturbidimetrie
Hypothyreose	TSH, fT3, fT4	Elektrochemilumineszenzim- munoassay (ECLIA)
Morbus Wilson	Coeruloplasmin	Immunturbidimetrie
Porphyrie	Bei anamnestisch angegebenen rezidivierenden Bauchschmerzenkrisen. Delta-Aminolavulinsäure, Porphyrin im Urin	Spektralphotometrie
Toxische Schäden	Anemnestischer Ausschluß Einnahme von: <ul style="list-style-type: none"> • Amiodaron • Methotrexat • Prednisolon • L-Asparaginase 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin A • Valproat • Tamoxifen • Zidovudin • HAART-Medikamente • Ecstasy 	
Virushepatitiden/Infektionen	CMV-AK EBV-AK HSV-AK	Enzymimmunoassay
	Hepatitis A-AK Hepatitis C-AK Hepatitis B (HBS-Ag, anti HBC)	Enzymimmunoassay

4.3.4 Leberbiopsie

Bei allen Patienten mit sonographisch festgestellter Leberparenchymverfettung wurde eine Menghini-Leberpunktion durchgeführt.

Die Menghini-Leberpunktion wurde bei nüchternen Patienten unter Ultraschallkontrolle und nach Hautdesinfektion und Lokalanästhesie durchgeführt. Nach Stichinzision der Haut mit einem Skalpell wurde mit einem Einmalbesteck Hepafix® der Firma B. Braun Melsungen AG eine Leberbiopsie entnommen und der Gewebszylinder in einen formalingefüllten Behälter gefüllt. Anschließend wurde die Einstichstelle steril verbunden, und alle Patienten wurden 3-4 Stunden nach der Leberpunktion auf einen Sandsack rechtsseitig gelegt und für mindestens 24 Stunden stationär überwacht. Zum Ausschluss von Blutungskomplikationen erfolgten eine Hämoglobinkontrolle nach sechs Stunden sowie eine Oberbauchsonografie nach 24 Stunden.

Die Leberbiopsien wurden im Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin vom selben Untersucher beurteilt und hier nach dem in Tabelle 3 gestellten NASH-Scoring System nach Brunt [10] eingeteilt.

Tabelle 3: Stadien der NASH nach den Brunt-Kriterien 1999

Stadium	Histologische Kriterien
1	perivenuläre, perisinusoidale und perizelluläre Fibrose (fokal oder ausgedehnt) in der Läppchenzone 3
2	wie Stadium 1 plus fokale oder ausgedehnte periportale Fibrose
3	Brückenbildende Fibrose, fokal oder ausgedehnt
4	Zirrhose

Bei 53 Patienten wurde eine NASH und bei 14 Patienten eine Leberverfettung ohne Entzündungszeichen (NAFL) diagnostiziert.

4.3.5 Diagnostik des metabolischen Syndroms

Bei allen Patienten und Probanden wurden die Kriterien des metabolischen Syndroms nach der WHO-Definition [27] erfasst (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der WHO-Definition des metabolischen Syndroms.

Folgende Bedingungen müssen vorliegen:	<p>Gestörter Glucosestoffwechsel:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes Mellitus Typ II • Gestörte Glucosetoleranz • Gestörter Nüchtern-Blutzucker <p>oder</p> <p>Insulin-Resistenz (Berechnung durch HOMA-IR-Index)</p>
sowie 2 der folgenden Kriterien:	

Abdominelle Adipositas	Waist-to.Hip-ratio <ul style="list-style-type: none"> • > 0,90 bei Männern • > 0,85 bei Frauen oder <ul style="list-style-type: none"> • BMI > 30 kg/m²
Dyslipidämie	TG > 150 mg/dl , HDL ≤35 mg/dl bei Männern, ≤40 mg/dl bei Frauen
Arterielle Hypertension	> 139/89 mmHg, oder Durchführung einer antihypertensiven Therapie

4.3.5.1 Diagnostik von Störungen des Glucosestoffwechsels

Bei der Diagnostik von Störungen des Glucosestoffwechsels handelt es sich in dieser Untersuchung um ein standardisiertes Testverfahren zu Erkennung und Differenzierung des gestörten Glukosetoleranz und des Diabetes Mellitus. Die Durchführung des OGT-Tests entsprach den WHO-Kriterien [33].

Vor dem Test wurden die Patienten dazu angehalten, über 3 Tage eine kohlenhydratreiche Nahrung (über 150 g KH/d) einzunehmen.

Am Untersuchungstag und nach einer Fastzeit von 12 Stunden stellten sich die Patienten nüchtern zur Blutentnahme vor.

Es erfolgte initial eine venöse Nüchternblutentnahme zur Bestimmung des Nüchtern-Blutzuckers und -Insulins.

Nach oraler Gabe von 75 g Glukose folgten 2 weitere venöse Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 60, 120 Minuten zur Bestimmung des Blutzuckers.

Während des Tests wurden die Patienten zu körperlicher Ruhe angehalten.

Da die im Plasma gemessenen Blutzucker-Werte 15% höher als die im Vollblut gemessenen Blutzucker-Werte sind, veränderten sich dadurch die Grenzwerte entsprechend der folgenden Tabelle 5.

Tabelle 5: Interpretation des Befunds eines oralen Glukosetoleranztestes (OGTT).

Ergebnis	Zeitpunkt	Plasma * mg/dl	Vollblut (venös*) mg/dl
Normal	Nüchtern	<110	<100
	Nach 120 Minuten- OGTT	<140	<120
Gestörte Glucosetoleranz	Nüchtern	<126	<110
	Nach 120 Minuten- OGTT	140-199	120-179
Gestörte Nüchtern- Glucose	Nüchtern	110-125	100-109
Typ2-Diabetes Mellitus	Nüchtern	≥ 126	≥ 110
	Nach 120 Minuten- OGTT	≥ 200	≥ 180

* Zur Umrechnung in mmol/l Multiplikation mit 0.0551.

Das Labor der Universitätsmedizin Berlin hat die Bestimmung des Insulins mittels Radioimmunassay (RIA) durchgeführt.

4.3.5.2 Diagnostik und Berechnung der Insulin-Resistenz

Verschiedene Indizes, die auf Nüchtern-Glucose- und Nüchtern-Insulinwerte basieren, eignen sich für die Abschätzung der Insulin-Resistenz.

Das Homoöstase-Modell-Assessment der Insulin-Resistenz (HOMA-IR) ermöglicht es, mit Hilfe sowohl des Glucose- als auch des Nüchtern-Insulin-Wertes das Ausmaß der Insulin-Resistenz abzuschätzen [23].

HOMA-IR = Nüchtern-Insulin (µu/ml) x Nüchtern-BZ (mg/dl) /405

[34] [36][37]

4.3.5.3 Diagnostik von Dyslipidämien

Um das Vorliegen einer Dyslipidämie diagnostizieren zu können, werden Triglyzeride, Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin nach Standardmethoden bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wird von einer Dyslipidämie ausgegangen, wenn folgende Nüchternwerte vorlagen:

der Triglyzeridwert >150 mg/dl

der Gesamt-Cholesterinwert >200 mg/dl,

der LDL-Cholesterinwert >150 mg/dl oder

der HDL-Cholesterinwert ≤ 35 mg/dl bei Männern und ≤ 40 mg/dl bei Frauen.

4.3.5.4 Diagnostik des Adipositas-Ausmaßes

Ein Kriterium zur Diagnose des metabolischen Syndroms ist eine abdominelle bzw. zentrale Fettverteilung. Dafür wurde ein Body-Mass-Index (BMI) durch Bildung des Quotienten aus Körpergewicht (kg) zur Körpergröße (cm) zum Quadrat (kg/m^2) berechnet. Zudem wurde der Bauchumfang (Taillenumfang) und Hüftumfang in cm gemessen. Aus diesen beiden Werten wurde dann die Waist-to-Hip-ratio (WHR) gebildet.

4.3.6 Messung des Energieumsatzes

Zur Ermittlung des Energieumsatzes wurde die CO_2 -Abgabe und O_2 -Aufnahme gemessen. Dies erfolgte unter standardisierten Bedingungen mittels **indirekter Kalorimetrie**. Die Patienten wurden unter Angabe einer genauen Ernährungsempfehlung angewiesen, sich 3 Tage vor der Untersuchung kohlenhydratreich zu ernähren (>150 g KH/d) und eine Nüchternphase von 12 Stunden einzuhalten.

Die Messung erfolgte für 30 Minuten in einem abgedunkelten Raum unter Ruhebedingungen. Über eine transparente Plastikhaube, die den Kopf des Patienten luftdicht abdeckt, wurde ein konstanter werkseitig vorgegebener Luftflow erzeugt.

Aus diesem konstanten Luftflow und dessen Gaskonzentrationen nach der Ausatmung konnten der O₂-Verbrauch, die CO₂-Abgabe und daraus der respiratorische Quotient ($RQ=VCO_2/VO_2$) berechnet werden.

4.3.7 Messung der Körperzusammensetzung

Aus klinischer Sicht ist die Bestimmung der Körperzusammensetzung sinnvoll, weil nicht nur das Körpergewicht allein, sondern auch das Verhältnis von Fett- und Fettfreier Masse am Gesamtgewicht bzw. die Fettverteilung bedeutsam für die Beurteilung des Komorbiditäts-Risiko sind.

4.3.7.1 Messung des Waist- to- Hip-ratio(WHR):

Die Unterteilung in abdominell-zentrale und periphere Adipositas lässt sich am einfachsten durch Messung der Waist- to-Hip-ratio (WHR) ermitteln.

Der Hüftumfang wird auf Höhe der Trochanteren und der Taillenumfang in der Mitte zwischen den untersten Rippenbogen und den Darmbeinkämmen gemessen.

4.3.7.2 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA):

Mit der Bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) lässt sich schnell und verlässlich die Körperzusammensetzung ermitteln. Dabei ist diese nicht-invasive Methode auch relativ preiswert und gesundheitlich unbedenklich, insofern die betroffenen Patienten keinen Herzschrittmacher tragen [76].

Dabei wird ein homogenes elektrisches Feld im Körper des Patienten aufgebaut, mit dessen Hilfe der elektrische Widerstand gemessen wird. Hierzu werden an Hand und Fuß der dominanten Körperhälfte zwei Elektrodenpaare angelegt, die einen hochfrequenten Wechselstrom von 800 μ A und 50 kHz erzeugen.

Mittels phasensensitiver Elektronik wird in modernen BIA-Geräten die Resistanz R (Ohmscher Widerstand des Gesamtkörperwassers) und die Reaktanz X_c (kapazitiver Widerstand durch die Kondensatoreigenschaften der Zellmembranen) differenziert. Aus ihnen setzt sich die Impedanz Z (Ohmscher Gesamtwiderstand in einem elektrischen Wechselstromfeld mit konstanter Stromstärke) zusammen. Die Resistanz und die Reaktanz werden mittels Messung des Phasenwinkels α ermittelt, der die Zeitverschiebung zwischen Strommaximum und Spannungsmaximum beschreibt. Der

Phasenwinkel ist abhängig von der Zellgröße, Zellmembranpermeabilität und der Körperflüssigkeitsverteilung. Resistanz und Reaktanz stehen in folgendem mathematischen Verhältnis zueinander:

$$Z^2 = R^2 + Xc^2$$

Mit Hilfe der Resistanz, der Reaktanz und zusätzlicher personenspezifischer Daten können das Gesamtkörperwasser (TBW), die fettfreie Masse (FFM), die Fettmasse (TBF), die Körperzellmasse (BCM), die extrazelluläre Masse (ECM) und der prozentuale Zellanteil errechnet werden.

Zur Ermittlung der einzelnen Körperkompartimente kam in der vorliegenden Arbeit das Multifrequenzgerät BIA 2000-M der Firma Data Input aus Darmstadt zum Einsatz. Dabei herrschten standardisierte Bedingungen, um reproduzierbare Daten zu erhalten und Fehlerquellen bestmöglich auszuschließen [74].

Vor Beginn der Impedanzanalyse legte sich der Patient 10 bis 15 Minuten flach und ausgestreckt auf den Rücken. Starke körperliche Belastung, Nahrungszufuhr und Rauchen waren 2 bis 4 Stunden vor der Analyse verboten. Die Arme und Beine wurden leicht abgespreizt. Eventuell wurde dem Patienten auch isolierendes Material (Handtuch) zwischen die Beine gelegt, um elektrischen Kurzschlüssen vorzubeugen. Anschließend wurden die Haut an definierten Stellen von Hand und Fuß gereinigt und entfettet, um dort jeweils zwei Spezialelektroden (Bianostic®) anzulegen.

Folgende Formeln wurden in der vorliegenden Arbeit angewendet:

•TBW: Das Gesamtkörperwasser ließ sich aus der gemessenen Resistanz (R) mittels der Formel von Kushner et al. errechnen [75]:

$$\text{TBW: Männer: } 0,396 * (H^2 / R) + 1,143 * \text{KG} + 8,399$$

$$\text{Frauen: } 0,382 * (H^2 / R) + 0,105 * \text{KG} + 8,315$$

((H = Körpergröße in cm, KG Körpergewicht in kg)

•FFM: Die Magermasse konnte - bei vorausgesetzter Hydratisierung von 73,2 % - aus dem Körperwasser abgeleitet werden: $\text{FFM} = \text{TBW} / 0,732$

•FM: Die Fettmasse errechnete sich indirekt als Differenzbetrag aus Körpergewicht und Magermasse: $\text{FM} = \text{Körpergewicht} - \text{FFM}$

•BCM: Die Körperzellmasse ließ sich aus der Magermasse nach Shizgal [59] errechnen: $\text{BCM} = \text{FFM} * \text{Phasenwinkel } \alpha * 0,29$

4.3.8 Messung des Retinol-bindenden Protein 4 (RBP4) :

Die bei -80°C gefrorenen Serumproben wurden auf trockenem Eis als Eil-Paket an das Labor des University Medical Center in Groningen (Niederlande) gesendet.

Das Retinol-bindende Protein RBP4 wurde mittels ELISA (Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) mit Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten von 5 % und 9,8 % gemessen [87]

In diesem ELISA wird RBP4 aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen Anti-RBP/RBP4) gebunden. Gebundenes RBP/RBP4 wird dann mit Hilfe von Peroxidase-markierten Anti-RBP/RBP4-Antikörpern detektiert. Die Menge der gebundenen Peroxidase-markierten Anti-RBP/RBP4-Antikörper ist dabei direkt proportional zum RBP/RBP4-Gehalt.

Als Peroxidase-Substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen.

Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zum RBP/RBP4-Gehalt. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

4.4 Methoden der Datenanalyse

Die Daten wurden mit SPSS Version 15,0 ausgewertet.

Für die deskriptive Statistik wurden Häufigkeiten, Mittelwerte, Standardabweichung, Minima und Maxima ermittelt.

Inferenzstatistisch wurde bei Erfüllung der Voraussetzungen (Normalverteilung, Varianzhomogenität) ANOVA berechnet. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, die Varianzhomogenität mit Levene's-Statistik. Waren diese Voraussetzungen nicht gegeben, wurde auf die nonparametrische Variante, den Kruskal-Wallis-Test, zurückgegriffen. Bei signifikanten Ergebnissen wurden für Einzelvergleiche post-hoc Hochberg's GT2 berechnet, da die Gruppen unterschiedlich groß waren. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse, die einen zweiseitigen p-Wert von kleiner 0,05 aufwiesen.

5. Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich thematisch in die Ergebnisdarstellung der verschiedenen Patientengruppen. Im Teil A sind die Ergebnisse der Patienten mit erhöhten Transaminasen, und im Teil B die Ergebnisse der Patienten mit sonografisch nachgewiesener NAFLD dargestellt. Im Teil C und D folgten die Darstellung der beiden Patientenuntergruppen (NASH-, und NAFL-Gruppe) und eine Gegenüberstellung zur Kontroll-Gruppe. Im Anschluss sind die wichtigsten Ergebnisse des gesamten Kapitels tabellarisch zusammengefasst.

5.1 Ergebnisse der Patienten mit erhöhten Transaminasen (Teil A)

Es stellte sich heraus, dass bei 67 der insgesamt 121 untersuchten Patienten mit erhöhten Transaminasen eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) vorlag, was einem Anteil von 55,3 % der untersuchten Patienten entspricht. Bei den übrigen 54 Patienten ließen sich andere Ursachen für Leberwerterhöhung wie erhöhter Alkoholkonsum, Autoimmunhepatitis, Medikamententoxizität und Virushepatitis identifizieren.

5.2 Ergebnisse der Gesamtgruppe mit NAFLD (Teil B)

5.2.1 Allgemeine Charakterisierung

Von den 67 NAFLD-Patienten waren 45 weiblich, was einem Anteil von 67,2 % entspricht. Der männliche Anteil lag mit 22 Patienten bei 32,8 %.

Im Mittel waren die Patienten 49,2 Jahre alt (SD \pm 13,1). Davon waren der jüngste Patient 18 Jahre und der älteste Patient 73 Jahre alt.

5.2.2 Vorkommen des metabolischen Syndroms

Nachfolgend wird das Vorkommen der Kriterien für das metabolische Syndrom nach WHO aufgeführt:

Es zeigte sich, dass 29 Patienten (43,1 %) an einem Diabetes Mellitus Typ II litten und 19 Patienten (28,3 %) eine gestörte Glucosetoleranz und/oder gestörte Nüchternblutzuckerwerte aufwiesen (siehe Tabelle 5).

Insgesamt hatten also 48 Patienten (71,5 %) einen gestörten Glucosestoffwechsel.

Der HOMA-Index als Maß für eine Insulinresistenz lag zwischen 0,5 und 39,5. Dabei lag der Median bei 5,3 (SD \pm 5,4). Bei 54 Patienten (80,6 %) lag der HOMA-Index über 2,0.

Der BMI lag bei 25 Patienten (37,3 %) oberhalb 30,0 kg/m², wobei der Median 28,99 kg/m² (SD \pm 4,) betrug.

Bei 32 Patienten (47,7 %) lagen die Triglyzeride über 150 mg/dl. Der Median lag bei 167,4 mg/dl (SD \pm 88,8). Der Gesamt-Cholesterin -Wert lag zwischen 46 mg/dl und 338 mg/dl. Bei 36 Patienten (54,5 %) lag das Gesamt-Cholesterin oberhalb 200 mg/dl. Das HDL-Cholesterin lag im Median bei 56,9 mg/dl (SD 26,0). Der kleinste Wert betrug 34 mg/dl und der größte Wert 122 mg/dl. Bei insgesamt 5 Patienten (10 %) lag das HDL-Cholesterin unter 40 mg/dl (bei Frauen) bzw. unter 35 mg/dl (bei Männern). Das LDL-Cholesterin wurde lag im Median bei 125,3 mg/dl (SD \pm 40,97), wobei der kleinste Wert 52 mg/dl und der größte Wert 208 mg/dl betrug. Bei 13 Patienten (32,5 %) lag das LDL-Cholesterin über 150 mg/dl.

Es litten insgesamt 49 Patienten (73,1%) an einer bekannten oder neu festgestellten Dyslipidämie.

Von der NAFLD-Patientengruppe wiesen 31 Patienten (46,3%) einen arteriellen Hypertonus auf.

Entsprechend den Kriterien der WHO wurde ein metabolisches Syndrom bei 46 Patienten (68,7 %) der NAFLD-Patientengruppe (Gesamtgruppe) festgestellt.

5.3 Vergleich der Untergruppen NASH und NAFL mit der Kontroll-Gruppe (Teil C und D)

Bei der histologischen Untersuchung der Leberbiopsien der sonografisch ermittelten NAFLD-Patientengruppe wurden zwischen der NASH-Gruppe und der NAFL-Gruppe unterschieden.

Nach Brunt [10] wurde histologisch ein NASH-Stadium I bei 36 Patienten (68%) und ein Stadium II bei 17 Patienten (32%) der NASH-Gruppe diagnostiziert. Ein Stadium III wurde nicht beobachtet.

In der NAFL-Gruppe wurde eine Steatosis Grad I (Verfettung von 5-33% der Hepatozyten) bei 9 Patienten (64,3%) und eine Steatosis Grad II (Verfettung von 34 bis 66% der Hepatozyten) bei 5 Patienten (35,8%) festgestellt.

Beide Gruppen wurden mit einer Kontroll-Gruppe verglichen.

Die Kontroll-Gruppe bestand aus 23 gesunden Probanden, die sowohl älter als 18 Jahre waren als auch unauffällige Transaminasen und eine sonografisch nicht verfettete Leber hatten.

5.3.1 Allgemeine Charakterisierung

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Unterteilung der Patientengruppen nach Alter, Geschlecht, ALT und AST

Gruppe		NASH	NAFL	Kontroll-Gruppe
Parameter		n= 53	n= 14	n= 23
Geschlecht	weiblich	n= 35	n=10	n=16
	männlich	n=18	n= 4	n= 7
Alter: Mittelwert in Jahren, (SD)		53,1 (12,1)	48,3 (15,9)	48,5 (8,2)
ALT : Mittelwert in U/l (SD)		78,3 (50,7)	80,8 (51,9)	27,3 (11,0)
AST : Mittelwert in U/l (SD)		50,21 (31,1)	45,29 (34,3)	31,74 (5,6)

5.3.1.1 Geschlechtsverteilung

Der NASH-Patiengruppe bestand aus 35 weiblichen Patienten (66,0 %) und 18 männlichen Patienten (34,0 %).

Die NAFL-Gruppe setzte sich aus 10 weiblichen (71,4 %) und 4 männlichen Patienten (28,6 %) zusammen.

In der Kontroll-Gruppe befanden sich 16 weibliche (69,6 %) und 7 männliche Patienten (30,4 %). Es bestand kein signifikanter Unterschied dieser Gruppen in der Geschlechtsverteilung (Chi²= 3,7, p = 0,98).

5.3.1.2 Altersverteilung

Auch in der Altersverteilung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Chi²= 3,7, p = 0,156).

In der NASH-Gruppe lag der Altersdurchschnitt bei 53,1 Jahren (SD ± 12,1).

Der jüngste Patient war 25 Jahre und der älteste Patient 73 Jahre alt.

Die NAFL-Gruppe war im Mittel 48,3 Jahre (SD ± 15,99) alt. Der jüngste Patient war 18 Jahre und der älteste Patient 73 Jahre alt.

Das Alter der Kontroll-Gruppe lag zwischen 38 und 67 Jahren (Mean 48,5, SD ± 8,2).

5.3.2 Vorkommen des metabolischen Syndroms und seiner Einzelkriterien

5.3.2.1 Gestörter Glucosestoffwechsel

Ein gestörter Glucosestoffwechsel wurde bei 41 Patienten (77 %) der NASH-Gruppe, bei 7 Patienten (50 %) der NAFL-Gruppe und bei 2 Patienten (8,6 %) der Kontroll-Gruppe (8,6 %) festgestellt.

Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p< 0.001)

5.3.2.2 Body Mass Index (BMI)

Es zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen bezüglich des BMI (ANOVA-F (2,87)= 0,03, p=0,053).

Der BMI der NASH-Gruppe lag zwischen 22,04 und 38,87 kg/m², der Median bei 29,4 kg/m² (SD ± 4,15). Einen BMI-Wert > 30 kg/m² hatten 20 Patienten (38%) der NASH-Gruppe.

Etwas niedriger lag der BMI der NAFL-Gruppe. Hier wurden Werte zwischen 18,36 und 38,27 kg/m² gemessen, wobei der Median 27,6 kg/m² (SD ± 5,25) betrug. Bei 5 Patienten der NAFL-Gruppe (36%) lag der BMI-Wert >30 kg/m².

Die Kontroll-Gruppe wies einen durchschnittlichen BMI von 31,3 kg/m² (SD± 5,0) auf. 12 Probanden der Kontroll-Gruppe (52%) hatten einen BMI-Wert >30 kg/m².

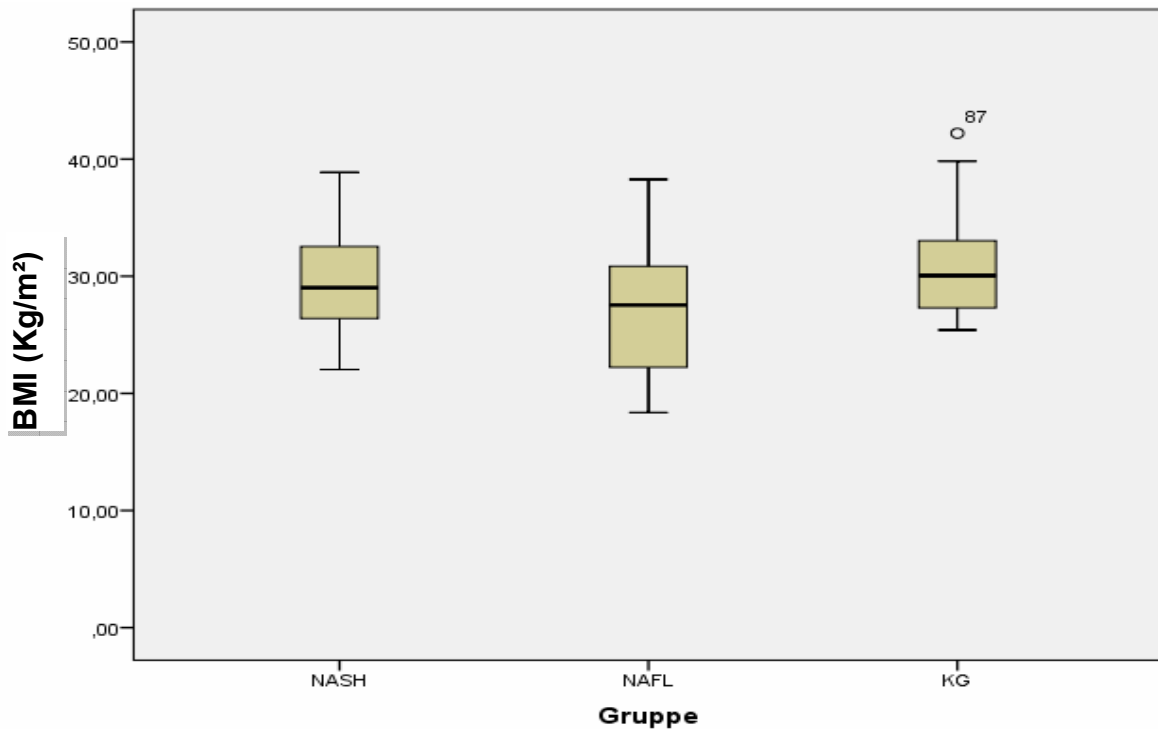


Abbildung 3: BMI in kg/m² im Gruppenvergleich

5.3.2.3 HOMA-Index

In der NASH-Gruppe lag der HOMA-Index im Median bei 5,73 (SD±5,79) und in der NAFL-Gruppe lag dieser bei 3,51 (SD±2,63). Die Kontroll-Gruppe wies einen Wert von 2,23 (SD±1,67) auf.

An dieser Stelle zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Chi2-Test=23,61, $p < 0,001$).

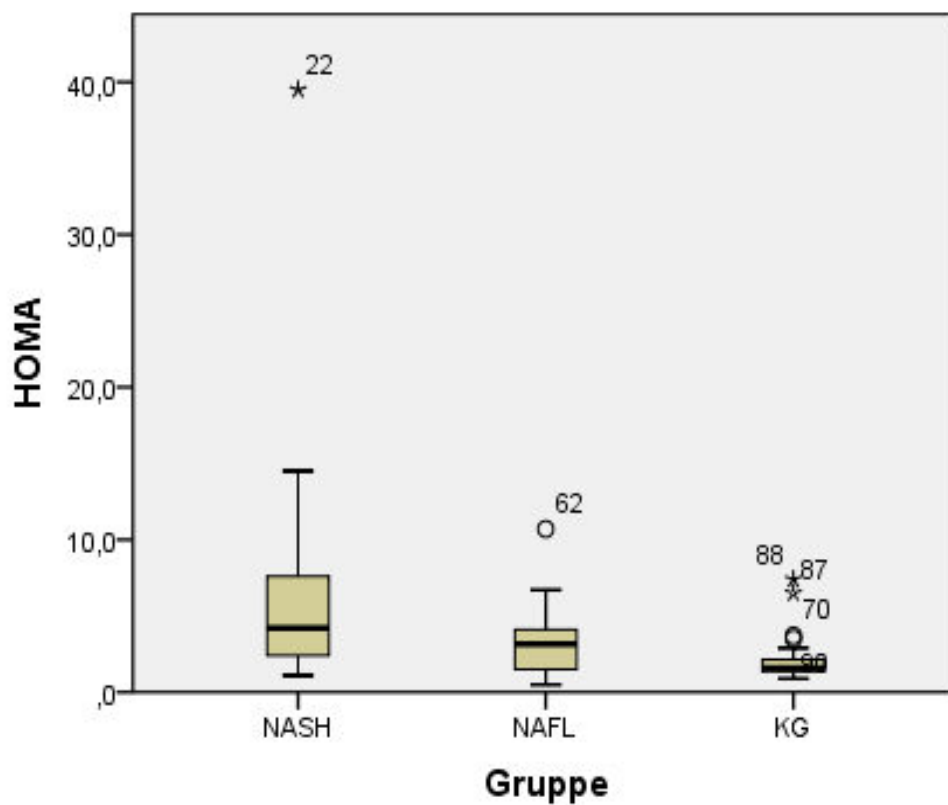


Abbildung 4: HOMA- Wert im Gruppenvergleich

5.3.2.4 Arterieller Hypertonus

Im Gruppenvergleich fand sich ein arterieller Hypertonus bei 47,1 % der NASH-Gruppe. In der NAFL-Gruppe zeigten 42 % der Patienten diese Erkrankung, jedoch lag der Wert in der Kontroll-Gruppe bei nur 8,6 %.

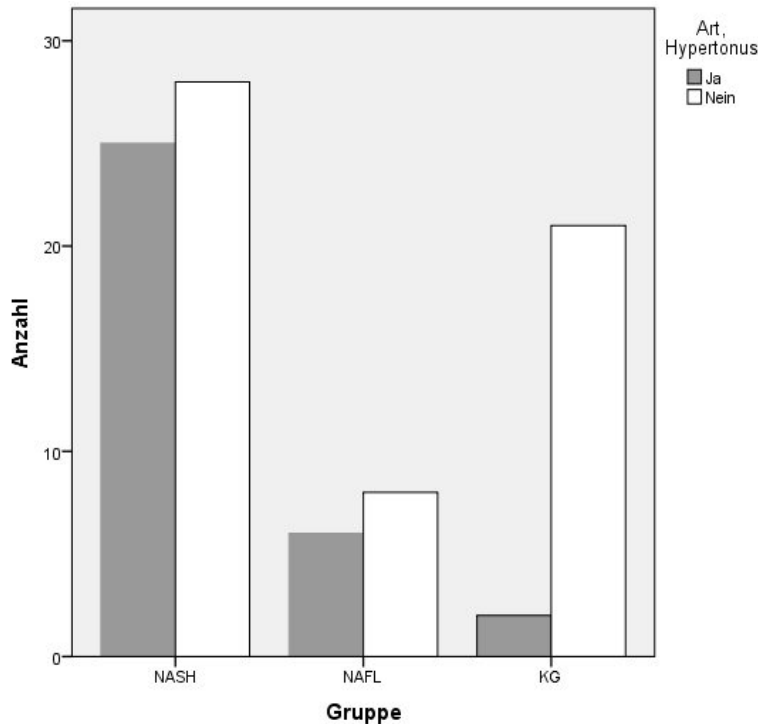


Abbildung 5: Existenz eines arteriellen Hypertonus im Gruppenvergleich

Bezüglich des Vorhandensein eines arteriellen Hypertonus bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Chi2-Test: $p = 0,005$).

5.3.2.5 Waist-to Hip-ratio (WHR)

Die Werte der Waist-to-Hip-ratio der untersuchten Patienten sowie der Vergleichsprobanden sind in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

In der NASH-Gruppe lagen die Werte der Waist-to-Hip-ratio zwischen 0,81 und 1,72 und im Median bei 0,97 ($SD \pm 0,14$).

In der NAFL-Gruppe lagen diese Werte unter denen der NASH-Gruppe zwischen 0,77 und 0,96 und im Median bei 0,88 ($SD \pm 0,06$).

Die Werte der Probanden der Kontroll-Gruppe lagen minimal bei 0,80 und maximal bei 1,06. Der Median ergab einen Wert von 0,93 ($SD \pm 0,07$).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren aber nicht signifikant (ANOVA-F[2,72]= 2,39, $p = 0,07$).

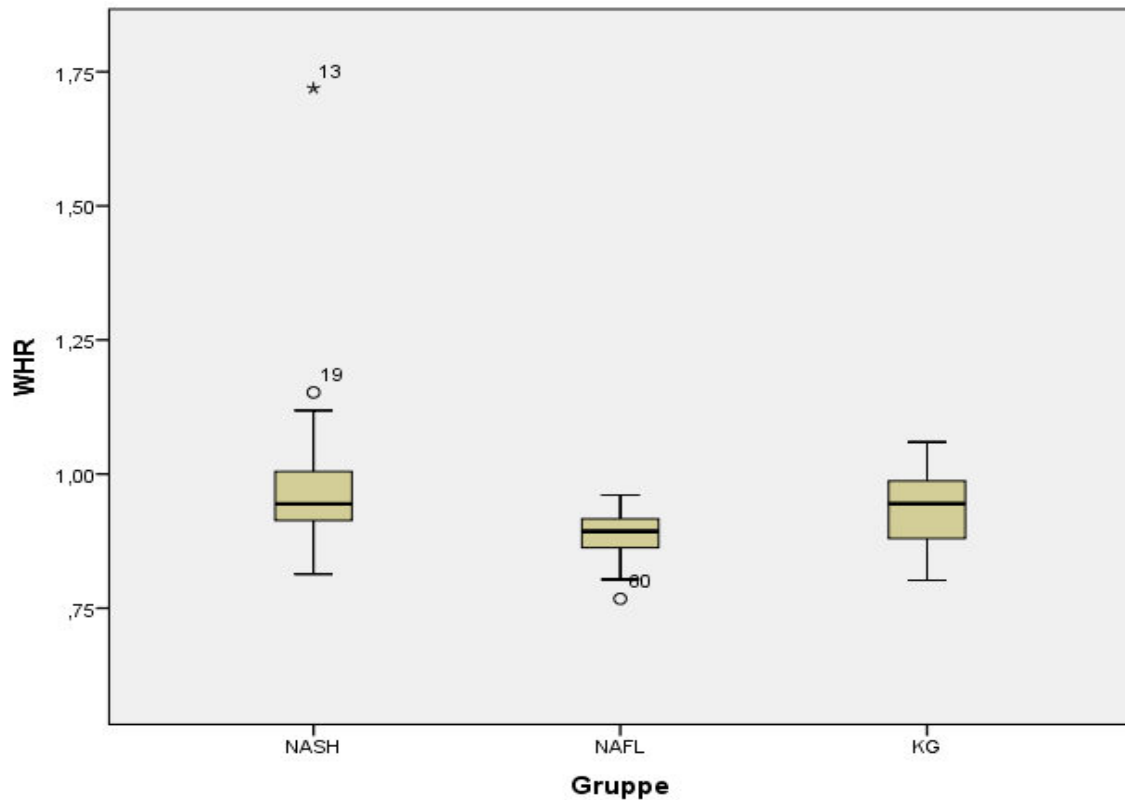


Abbildung 6: Waist- to-Hip-ratio (WHR) im Gruppenvergleich

5.3.2.6 Taillenumfang

In Abbildung 7 werden die Zusammenhänge zwischen Patienten und Probanden sowie deren Taillenumfang grafisch verdeutlicht.

Daraus ist folgendes abzulesen. Die Patienten der NASH-Gruppe hatten einen Taillenumfang zwischen 77 und 132 cm. Diese ergaben im Median einen Wert von 101,3 cm (SD ± 10,4). Die Patienten der NAFL-Gruppe besaßen einen Taillenumfang zwischen 66 und 111,5 cm. Der Medianwert lag bei 94,1 (SD ± 13,5). Die Probanden der Kontroll-Gruppe wiesen Werte zwischen 79 und 137 cm auf, so dass sich im Median 102,7 cm (SD ± 13,9) ergab.

Werden alle Ergebnisse miteinander verglichen, ist festzustellen, dass sich statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Taillenumfang der Patienten und Gruppenzugehörigkeit (ANOVA -(F(2, 72) = 1,72, p = 0,187) ergab.

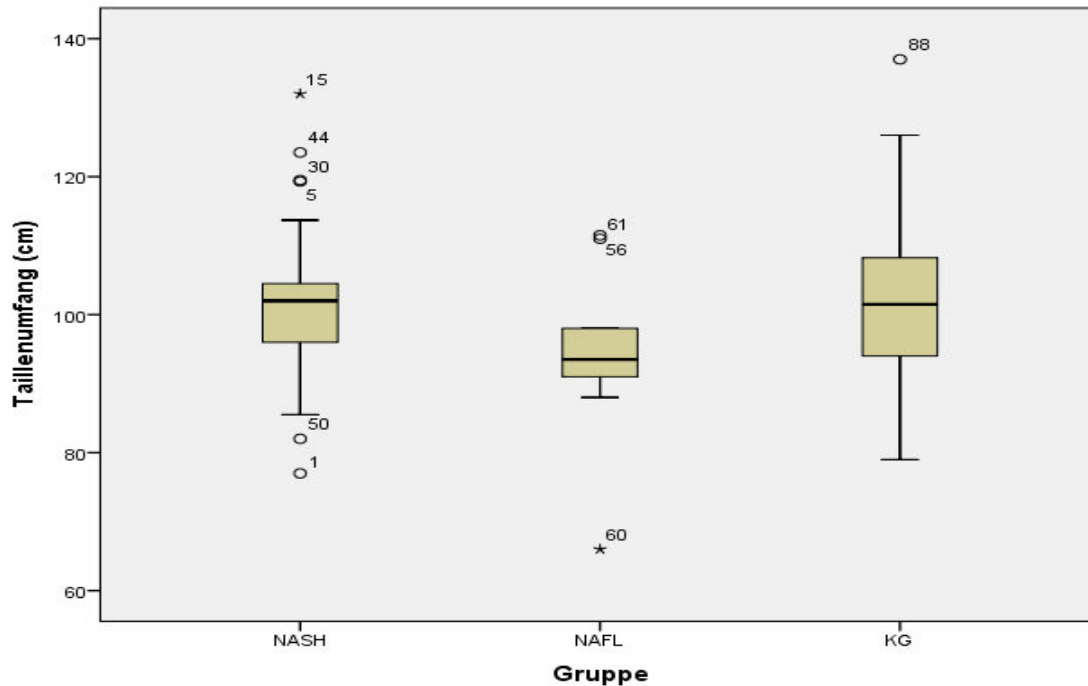


Abbildung 7: Taillenumfang (cm) im Gruppenvergleich

5.3.2.7 Vorhandensein einer Dyslipidämie

Die Häufigkeit einer Dyslipidämie bei den untersuchten Patienten sowie Probanden wird in Abbildung 8 dargestellt.

Bei der Untersuchung der Patienten der NASH-Gruppe ergab sich ein Befund der Dyslipidämie bei 71,7 % der Untersuchten (dies entspricht 38 Patienten). In der NAFL-Gruppe waren 78,6 % (dies entspricht 11 Patienten) der Patienten davon betroffen, während in der Kontroll-Gruppe lediglich 60,9 % der Probanden (dies entspricht 14 Probanden) von einer Dyslipidämie betroffen waren.

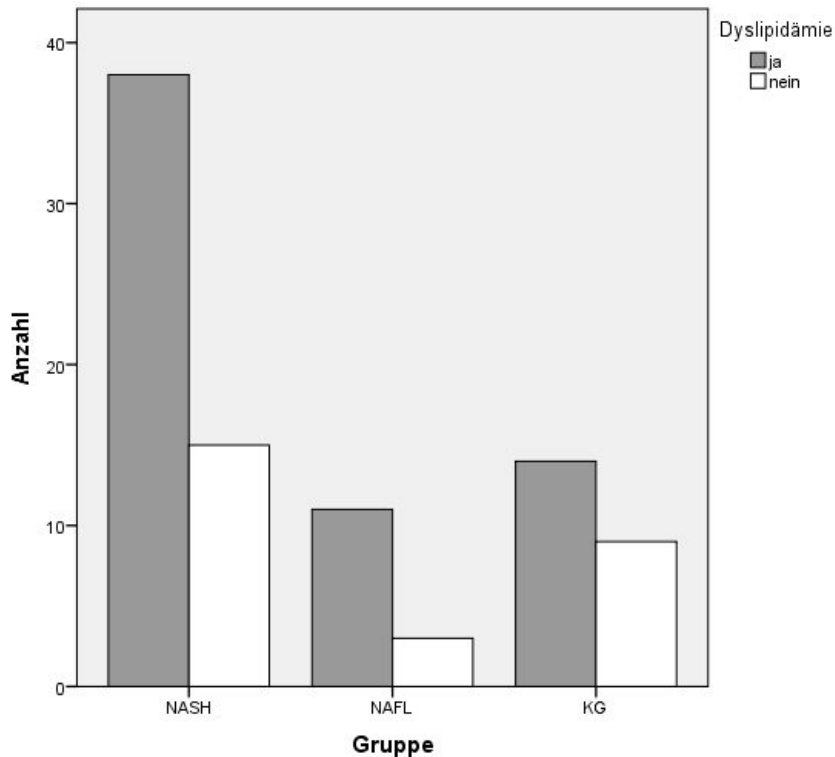


Abbildung 8: Vorhandensein einer Dyslipidämie im Gruppenvergleich

Werden die Werte aller Gruppen verglichen, wird deutlich, dass sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gruppenzugehörigkeit und dem Vorhandensein einer Dyslipidämie (Chi2-Test, $p = 0,478$) ergibt.

Abbildung 9 zeigt, dass ein **metabolisches Syndrom** bei 75,4 % der Patienten in der NASH-Gruppe (dies entspricht 40 Patienten), bei 42 % der Untersuchten in der NAFL-Gruppe (dies entspricht 6 Patienten) sowie bei 13,04 % der gesunden Probanden (dies entspricht 3 Probanden) zu beobachten war.

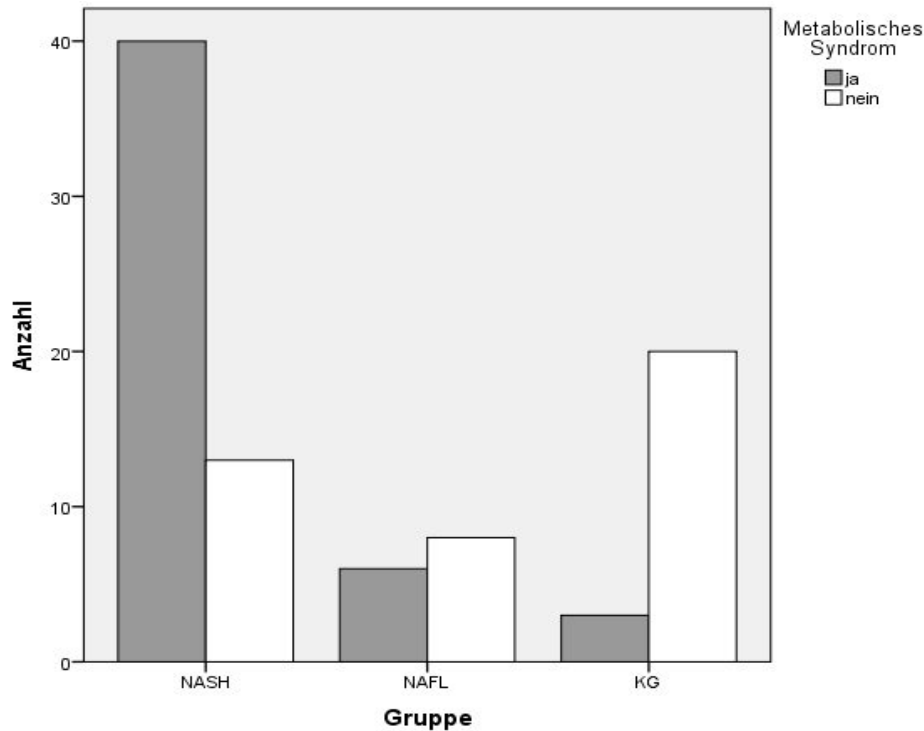


Abbildung 9: Vorhandensein eines metabolischen Syndroms im Gruppenvergleich

Diese Gruppenunterschiede waren statistisch signifikant ($\chi^2 = 26,1, p < 0,001$).

Es zeigt sich aber, dass die statistischen Unterschiede hauptsächlich auf abweichenden Häufigkeiten zwischen der NASH und KG beruhen.

5.3 3 Vergleich der Körperzusammensetzung

Die statistische Bewertung, der in der Bioimpedanzanalyse (BIA) ermittelten Werte für die Körperzusammensetzung zeigte Folgendes:

5.3.3.1 Fettmasse in Prozent vom Körpergewicht

Die prozentuale Fettmasse aller Gruppen lag zwischen 16,1 und 52,2 %. Dabei lag der Median der NASH-Gruppe bei 36,2 % (SD \pm 10,2), der Median der NAFL-Gruppe bei 35,3 % (SD \pm 10,44) und der Median der Kontroll-Gruppe bei 33,26 % (SD \pm 9,76).

Es war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gruppenzugehörigkeit und prozentualen Fettmasse erkennbar (ANOVA-Test $-F[2,74] = 0,63; p = 0,53$). Auch die Mittelwerte der absoluten Fettmasse in kg lagen nahe beieinander, was in der folgenden Tabelle dargestellt ist (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test, $p=0,84$):

Tabelle 7: Absolute Fettmasse im Gruppenvergleich

Gruppe \ FM	Mittelwert in kg	Standard-Deviation	Minimum in kg	Maximum in kg
NASH	29,8	9,76	12,5	54,1
NAFL	28,9	12,97	12,8	52,3
Kontroll-Gruppe	29,4	10,45	12,9	48,4

5.3.3.2 Fettfreie Masse in kg (FFM)

Bei der NASH-Gruppe lag die FFM zwischen 33,3 und 79,9 kg, im Mittel bei 52,5 kg (SD \pm 11,38). In der NAFL-Gruppe schwankte die FFM zwischen 35,7 und 60,8 kg. Der Median lag bei 50,5 kg (SD \pm 8,65). In der Kontroll-Gruppe wurden FFM-Werte zwischen 40,2 und 77,9 kg gemessen, wobei der Median bei 58,8 kg lag (SD \pm 12,63). Auch zwischen der Gruppenzugehörigkeit und der FFM zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (ANOVA-Test $F=2,88$, $p=0,062$).

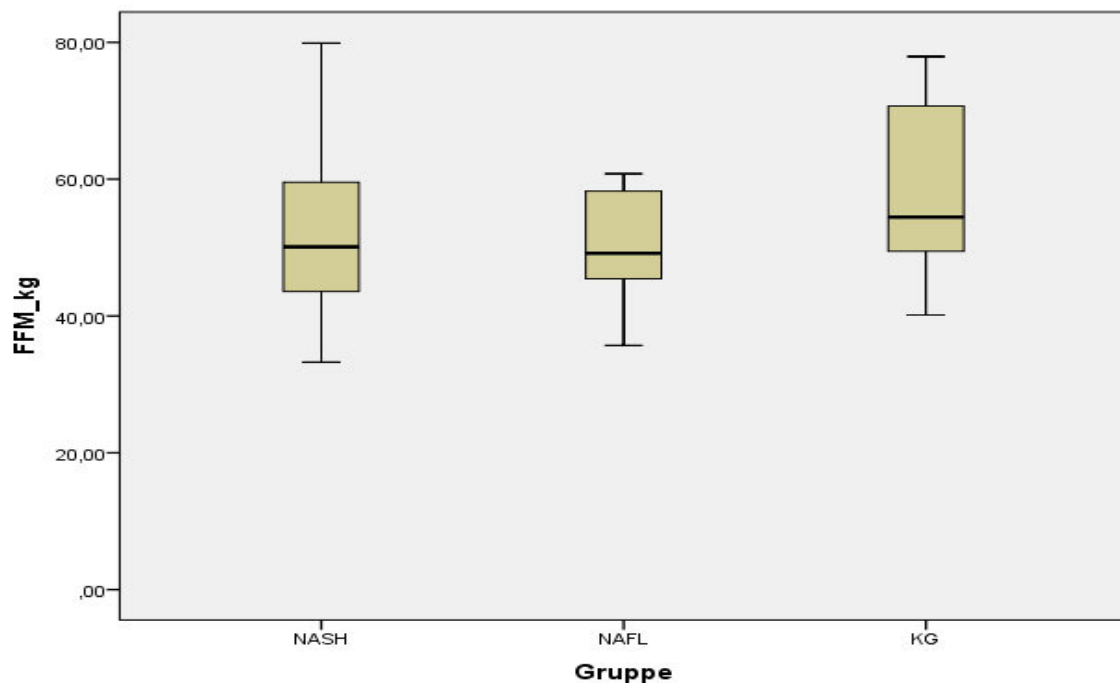


Abbildung 10: Fettfreie Masse in kg im Gruppenvergleich

5.3.4 Ergebnisse der Indirekten Kalorimetrie

5.3.4.1 Vergleich der Kohlenstoffdioxid-Produktion (VCO₂) und Sauerstoffverbrauch (VO₂)

Die folgende Tabelle zeigt die Median-Werte der VO₂ und VCO₂ in allen Gruppen.

Tabelle 8: VO₂ und VCO₂ im Gruppenvergleich

Gruppe	VO ₂ - Verbrauch in ml/min. . Median (± SD)	VCO ₂ -Produktion in ml/min. Median (± SD)
NASH	204,5 (31,63)	205,5 (40,53).
NAFL	195,3 (30,94)	200,9 (41,75)
Kontroll-Gruppe	213,8 (32,74)	180,7 (20,49)

Die statistische Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Gruppenzugehörigkeit auf VCO₂ (ANOVA-Test $F[2,77] = 3,38$, $p = 0,039$). Post-Hoc-Tests zeigten, dass dieser Effekt auf einem Unterschied zwischen der NASH- und der Kontroll-Gruppe bezüglich VCO₂ beruht .

Es zeigte sich aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen Gruppenzugehörigkeit und VO₂ ($\chi^2 = 2,21$, $p = 0,33$).

5.3.4.2 Vergleich des respiratorischen Quotienten (RQ)

In der NASH-Gruppe wurde als RQ ein Median - Wert von 0,82 (SD ± 0,04) ermittelt. Nahezu identisch war der gemessene Median der NAFL-Gruppe mit 0,82 (SD ± 0,05). In der Kontroll-Gruppe (KG) betrug der Median 0,85 (SD± 0,07).

Es wurde kein signifikanter Einfluss der Gruppenzugehörigkeit auf den RQ nachgewiesen, entsprechend ist von vergleichbaren Substratoxidationsraten auszugehen (ANOVA-Test $F[2,77] = 1,99$, $p = 0,142$).

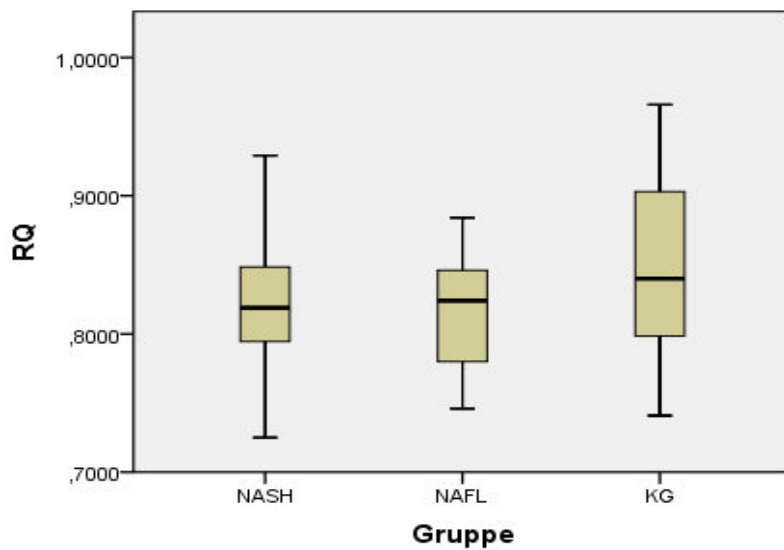


Abbildung 11: Respiratorischer Quotient (RQ) im Gruppenvergleich

5.3.4.3 Vergleich des Grundumsatzes (GU)

Der Grundumsatz der NASH-Gruppe betrug zwischen 1073,6 und 2014,8 kcal/24h, bei einem Median von 1482,9 kcal/24h (SD \pm 206,51). In der NAFL-Gruppe lag der GU zwischen 1050,1 und 1805,16 kcal/24h, bei einem Median von 1415,3 kcal/24h (SD \pm 217,96). In der Kontroll-Gruppe wurden GU zwischen 1111,8 und 2113,3 kcal/24h gemessen, bei einem Median von 1523,6 kcal/24h (SD \pm 282,15).

Es ergab sich keine statistische Signifikanz der Gruppenzugehörigkeit bezüglich des Grundumsatzes (ANOVA-Test, $F = 0,67$, $p = 0,512$).

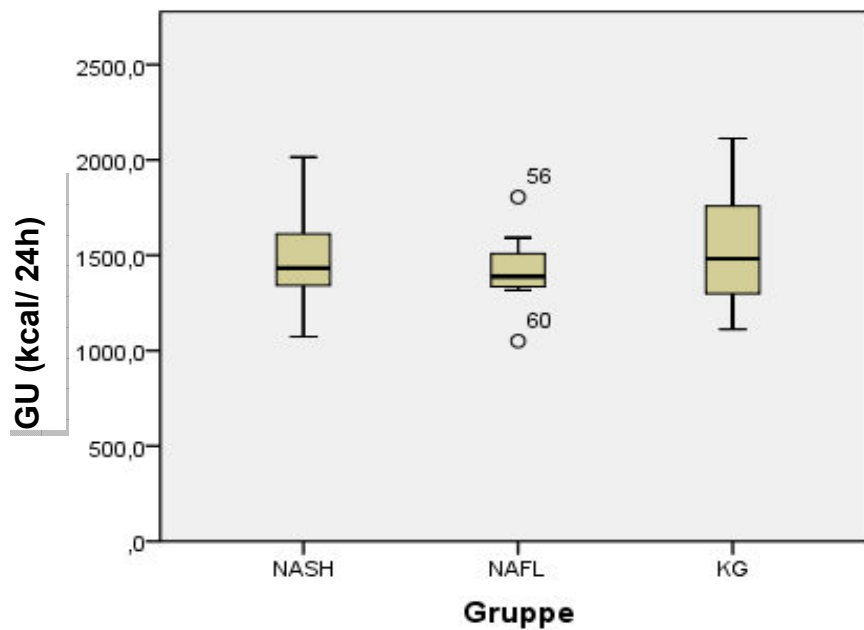


Abbildung 12: Grundumsatz (GU) in kcal/24h im Gruppenvergleich

5.3.5 Retinol-bindendes Protein 4 (RBP4)

5.3.5.1 RBP4 im Gruppenvergleich

Die für das RBP4 gemessenen Werte sind in der folgenden Tabelle niedergeschrieben.

Tabelle 9 : RBP4-Werte im Gruppenvergleich

	RBP4 µg/ml					
	Valid N	Mean	Standard Error of Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
Gru NASH	53	10,9	0,6	4,4	5,0	27,5
ppe NAFL	14	9,8	1,0	3,7	4,4	17,6
KG	23	17,5	1,9	8,9	7,5	41,9

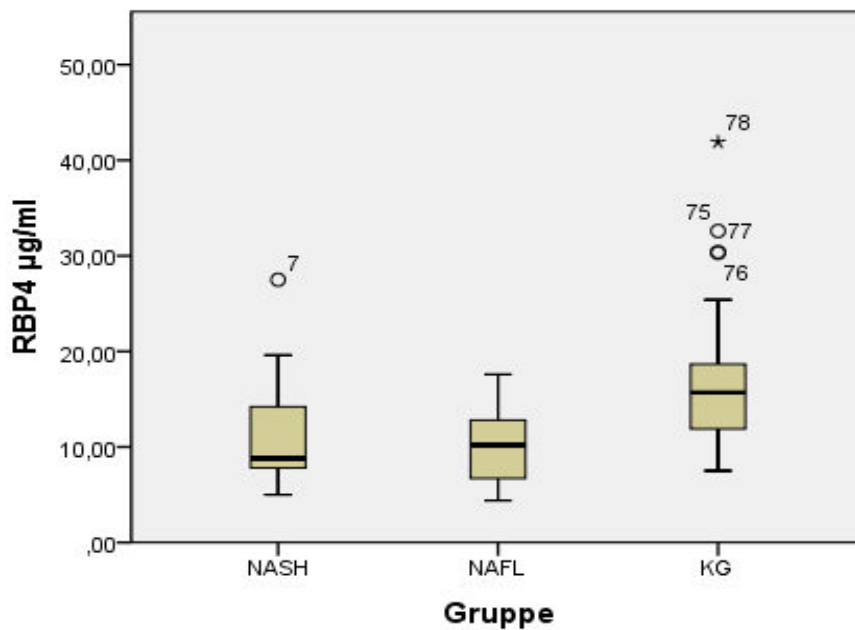


Abbildung 13 : RBP4 im Gruppenvergleich

Statistisch hat die Kontrollgruppe einen signifikant größeren RBP4-Wert als die NASH-Gruppe (Post-Hoc $p = 0,0001$) und die Gruppe NAFL (Post-Hoc $p = 0,001$).

5.3.5.2 Beziehung zwischen RBP4 und BMI

Es zeigte sich allgemein keine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und BMI ($r = 0,08$, $p = 0,41$).

5.3.5.2.1 Zusammenhang zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe

Der Kolmogorov-Smirnov-Test der Variablen BMI und RBP4 verdeutlichte, dass beim RBP4 in der NASH-Gruppe keine Normalverteilung angenommen werden kann ($Z = 1,43$; $p = 0,033$). Daher wurde für alle Korrelationen die Rangkorrelation nach Spearman (ρ) errechnet.

Die Tabelle 10 zeigte folgende Ergebnisse:

Tabelle10: Korrelationen zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe

Gruppe		BMI * RBP4
NASH (n=53)	Korrelationskoeffizient 95% nach Spearman (rho)	0,27
	Signifikanz	0,04
NAFL (n= 14)	Korrelationskoeffizient 95% (rho)	0,25
	Signifikanz	0,39
KG (n= 23)	Korrelationskoeffizient 95% (rho)	-0,4
	Signifikanz	0,06

Für die NASH-Gruppe wurde ein signifikanter positiver Zusammenhang festgestellt ($r = 0,274$; $p = 0,047$). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine Tendenz. In diesem Fall ist der Zusammenhang interessanterweise negativ, denn der RBP4-Wert sinkt mit zunehmendem BMI ($r = -0,399$; $p = 0,059$).

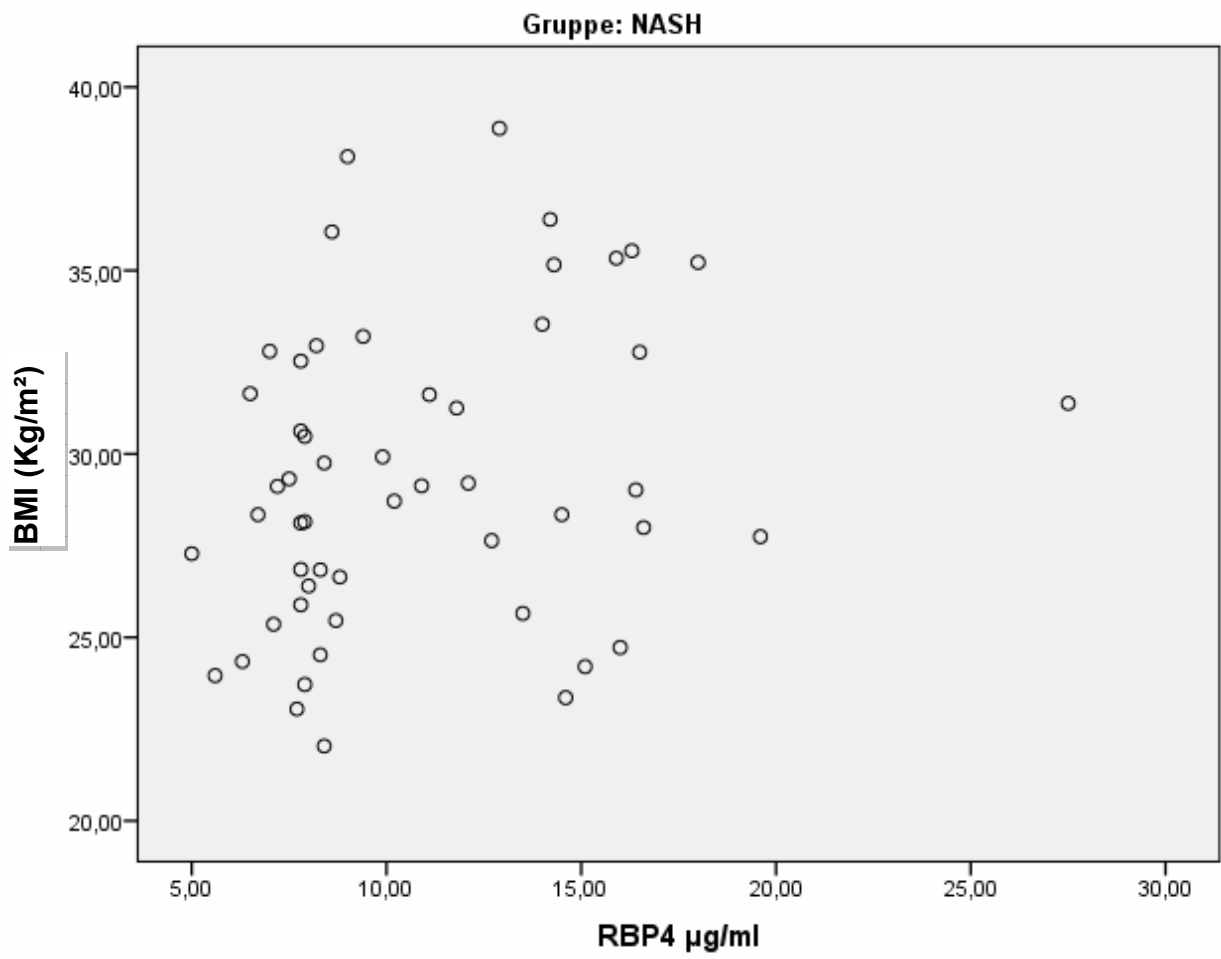


Abbildung 14 die Korrelation zwischen RBP4 und BMI in der NASH-Gruppe

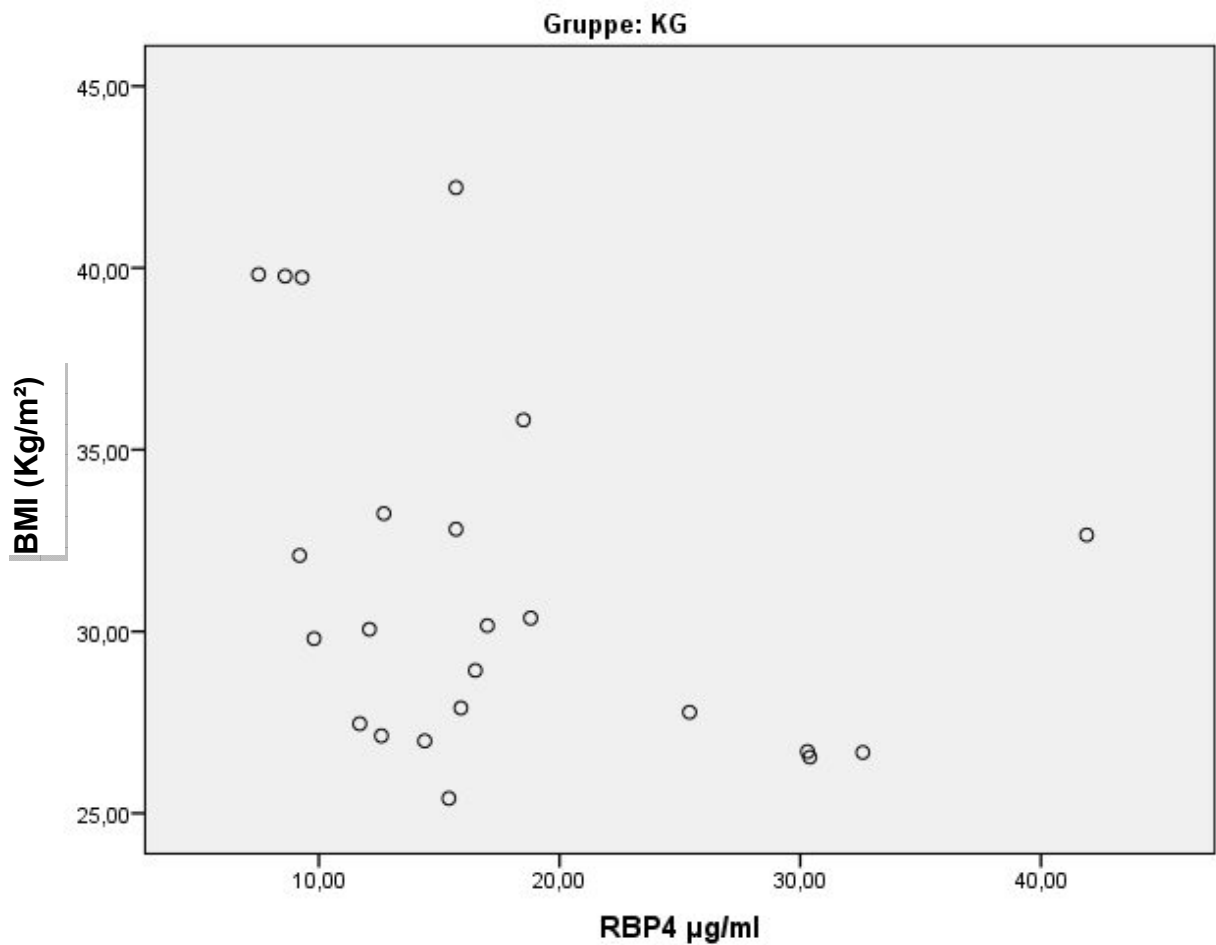


Abbildung 15 die Korrelation zwischen RBP4 ($\mu\text{g/ml}$) und BMI (kg/m^2) in der Kontroll-Gruppe

5.3.5.2.2 Zusammenhang zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe und Geschlecht

Die Tabelle 11 zeigt die Korrelation zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe und Geschlecht

Tabelle 11: Korrelation zwischen RBP4 und BMI pro Gruppe und Geschlecht

Gruppe	Geschlecht		BMI * RBP4
NASH	weiblich	Korrelationskoeffizient	0,39
		95%, rho	
		Signifikanz	0,02

		n	35
	männlich	Korrelationskoeffizient	0,12
	h	95%, (rho)	
		Signifikanz	0,64
		n	18
NAFL	weiblich	Korrelationskoeffizient	0,16
		95%, (rho)	
		Signifikanz	0,66
		n	10
	männlich	Korrelationskoeffizient	0,4
	h	(rho)	
		Signifikanz	0,6
		n	4
KG	weiblich	Korrelationskoeffizient	-0,26
		95%, (rho)	
		Signifikanz	0,34
		n	16
	männlich	Korrelationskoeffizient	-0,43
	h	(rho)	
		Signifikanz	0,34
		n	7

Der Zusammenhang zwischen BMI und RBP4 verdeutlicht, dass nur der Korrelationskoeffizient bei den Frauen der NASH-Gruppe signifikant wird ($\rho = 0,39$, $p = 0,021$).

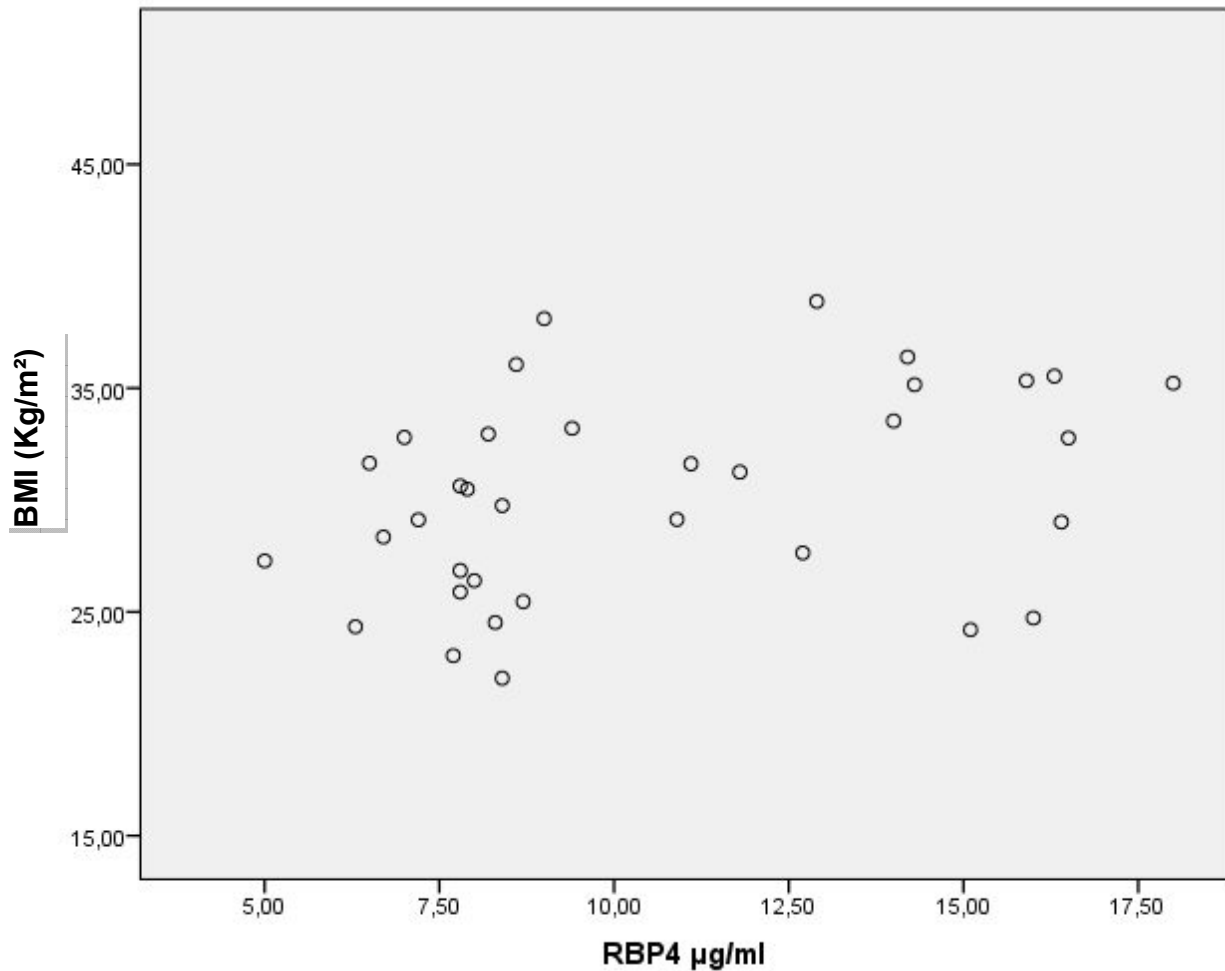


Abbildung 16: Korrelation zwischen RBP4 und BMI bei Frauen der NASH-Gruppe ($r=0,39$, $p=0,021$)

5.3.5.3 Beziehung zwischen RBP4 und WHR

Das RBP4 und WHR korrelieren nicht signifikant miteinander ($r= 0,89$, $p= 0,44$).

5.3.5.3.1 Korrelation zwischen RBP4 und WHR pro Gruppe

In allen drei Gruppen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen RBP4 und WHR wie Folgendes.

Tabelle 12: Korrelation zwischen RBP4 und Waist-to-Hip-ratio im Gruppenvergleich

Gruppe		WHR * RBP4
NASH (n=53)	Korrelationskoeffizient 95% nach Spearmann (rho)	0,16
	Signifikanz	0,3
NAFL (n= 14)	Korrelationskoeffizient 95% (rho)	- 0,18
	Signifikanz	0,65
KG (n= 23)	Korrelationskoeffizient 95% (rho)	0,07
	Signifikanz	0,75

5.3.5.3.2 Korrelation zwischen RBP4 und WHR pro Gruppe und Geschlecht

Die statistische Untersuchung zeigte keine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und Waist-to-Hip-ratio (WHR) bezüglich der Geschlechtsverteilung der Gruppen.

Tabelle 13: Korrelation zwischen RBP4 und Waist-to-Hip-ratio pro Gruppe und Geschlecht

Gruppe	Geschlecht		WHR * RBP4
NASH	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	0,3
		Signifikanz	0,12
	n	35	
	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	- 0,15
		Signifikanz	0,58

		n	18
NAFL	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	- 0,14
		Signifikanz	0,79
		n	10
	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	- 0,5
		Signifikanz	0,67
		n	4
KG	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	-0,27
		Signifikanz	0,31
		n	16
	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	-0,43
		Signifikanz	0,34
		n	7

5.3.5.4 Beziehung zwischen RBP4 und Taillenumfang

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen RBP4 und dem Taillenumfang (($r = 0,003$; $p = 0,977$)).

5.3.5.5 Beziehung zwischen RBP4 und HOMA

Es ergab sich allgemein kein signifikanter Zusammenhang zwischen RBP4 und HOMA (Tau-b= - 0,101, $p = 0,162$).

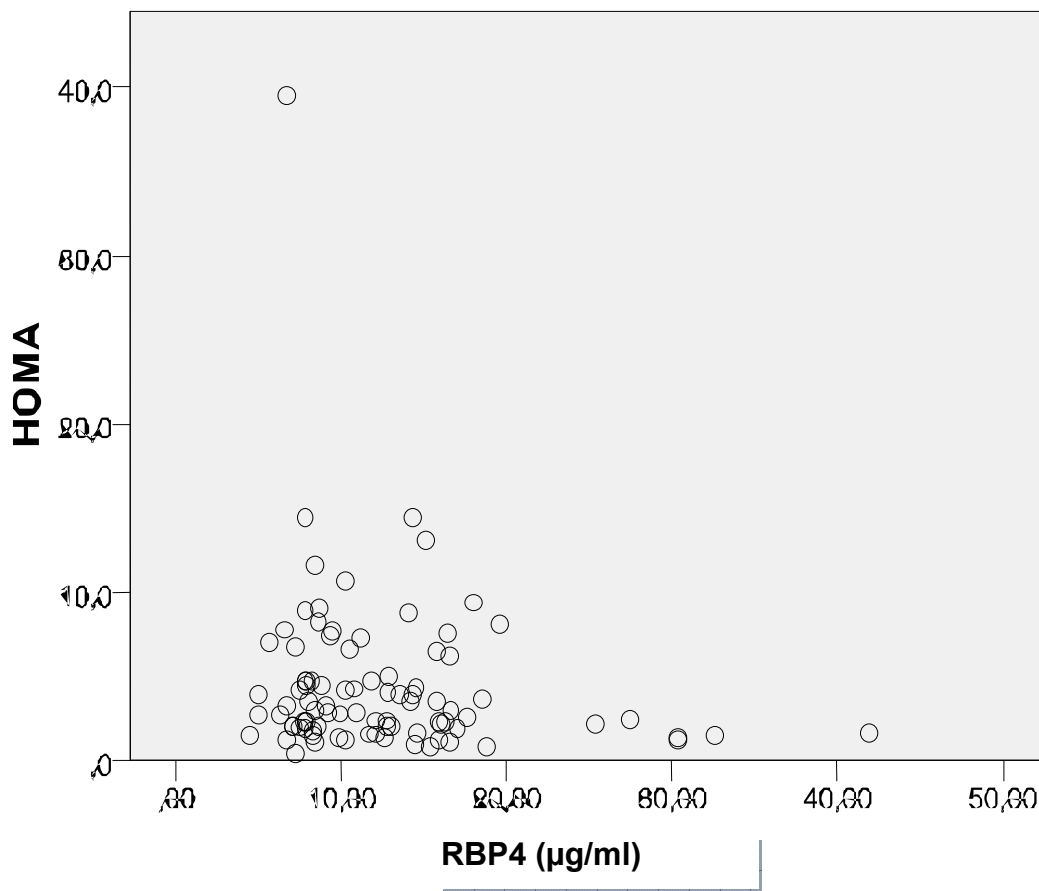


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen RBP4 und HOMA allgemein

5.3.5.5.1 Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe

Anhand von Korrelationsberechnungen wurde der Zusammenhang zwischen HOMA und RBP4 analysiert. Die gruppenweise Auswertung zeigte aber keinerlei signifikante Zusammenhänge.

Tabelle14: Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe

Gruppe			HOMA * RPB4
NASH	Spearman's rho	Korrelationskoeffizient	0,063
		Signifikanz	0,656

		n	53
NAFL	Spearman's rho	Korrelationskoeffizient rho	0,269
		Signifikanz	0,353
		n	14
KG	Spearman's rho	Korrelationskoeffizient rho	-0,258
		Signifikanz	0,235
		n	23

5.3.5.5.2 Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe und Geschlecht

Es zeigten sich keine statistischen Signifikanzen bezüglich der Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe und Geschlecht

Tabelle 15: Korrelation zwischen RBP4 und HOMA pro Gruppe und Geschlecht

Gruppe	Geschlecht		HOMA * RBP4
NASH	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	0,06
		Signifikanz	0,73
		n	35
	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	0,09
		Signifikanz	0,72
		n	18
NAFL	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	0,43
		Signifikanz	0,21
		n	10

	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	0,4
		Signifikanz	0,6
		n	4
KG	weiblich	Korrelationskoeffizient (rho)	-0,24
		Signifikanz	0,37
		n	16
	männlich	Korrelationskoeffizient (rho)	-0,47
		Signifikanz	0,29
		n	7

5.3.5.6 Beziehung zwischen RBP4 und dem Vorhandensein eines metabolischen Syndroms

Die statistische Untersuchung ergab leicht erhöhte RBP4-Werte bei den NAFLD-Patienten und gesunden Probanden, die nicht vom metabolischen Syndrom betroffenen waren.

Die vom metabolischen Syndrom betroffenen Personen zeigten einen RBP4-Median-Wert von 11,6 mg/l (SD \pm 4,4) auf, während die nicht vom metabolischen Syndrom betroffenen Personen einen RBP4-Median-Wert von 13,4 mg/l (SD \pm 8,2) aufzeigten. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant ($t = -1,12$, $p = 0,23$).

Im Gruppenvergleich zeigte sich Folgendes:

Tabelle 16: RBP4 mit Vorhandensein eines metabolischen Syndroms im Gruppenvergleich

Gruppe	Metabol Syndrom	N	Mean	Std. Deviation	P
NASH	RBP4 μ g/ml ja	40	11,4	4,5	0,13
	nein	13	9,3	3,7	

Gruppe	Metabol Syndrom	N	Mean	Std. Deviation	P
NAFL	RBP4 µg/ml ja	6	11,7	3,8	0,11
	nein	8	8,5	3,3	
KG	RBP4 µg/ml ja	3	14,5	4,8	0,54
	nein	20	17,9	9,3	

In dieser tabellarischen Darstellung sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

5.3.5.7 Beziehung zwischen RBP4 und Fettmasse (FM)

Es wurde kein Zusammenhang zwischen FM und RBP4 nachgewiesen.

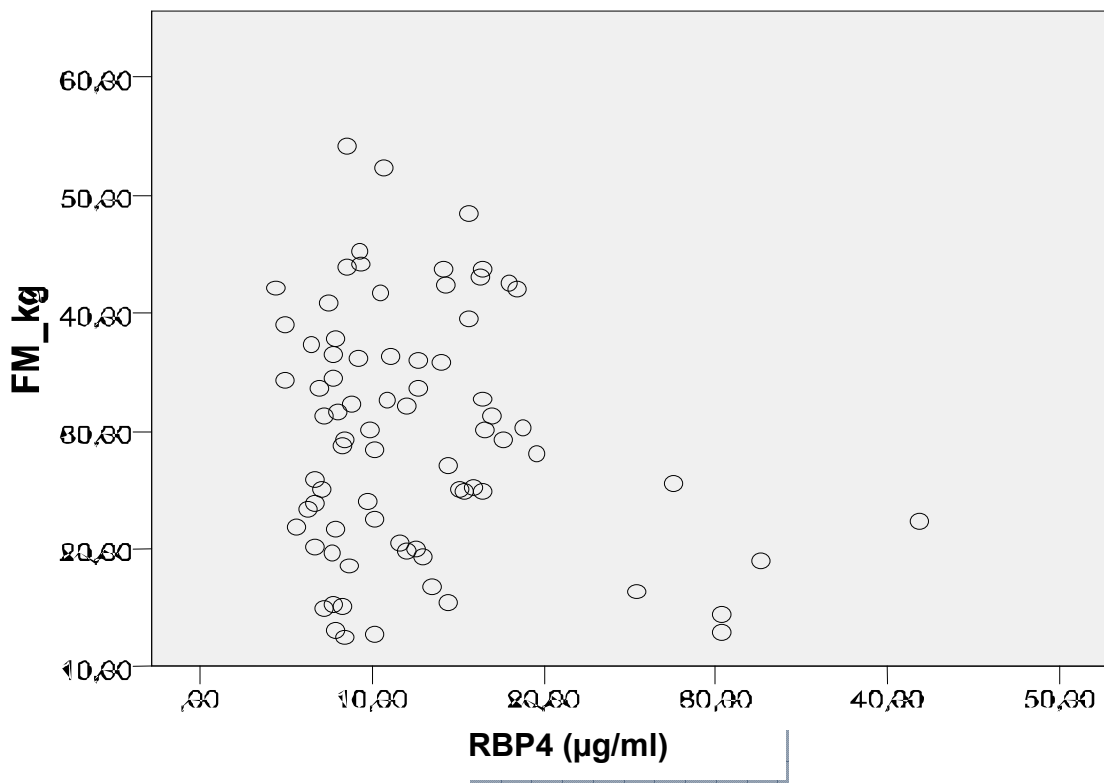


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen RBP4 und FM allgemein.

Eine statistischen Bewertung des Zusammenhangs zwischen den FM- und RBP4-Werten ergab ausschließlich in der Kontroll-Gruppe einen signifikanten negativen Zusammenhang ($r = -0.36$, $p = 0,015$). Hier sank der RBP4-Wert bei steigendem

FM(kg)-Wert. Bei der NASH- und der NAFL-Gruppe konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (NASH-Gruppe: $r = 0,123$, $p = 0,24$; NAFL-Gruppe: $r = -0,093$, $p = 0,69$).

5.3.5.8 Beziehung zwischen RBP4 und Fettfreier Masse (FFM)

Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem FFM- und RBP4-Werten (NASH-Gruppe: $r = 0,148$, $p = 0,164$; NAFL-Gruppe: $r = 0,315$, $p = 0,183$; Kontroll-Gruppe: $r = 0,075$, $p = 0,616$).

5.3.5.9 Beziehung zwischen RBP4 und Grundumsatz (GU)

Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Grundumsatz (GU) und RBP4-Werten (NASH-Gruppe: $r = 0,063$, $p = 0,52$; NAFL-Gruppe: $r = 0,109$, $p = 0,70$; Kontroll-Gruppe: $r = 0,206$, $p = 0,16$).

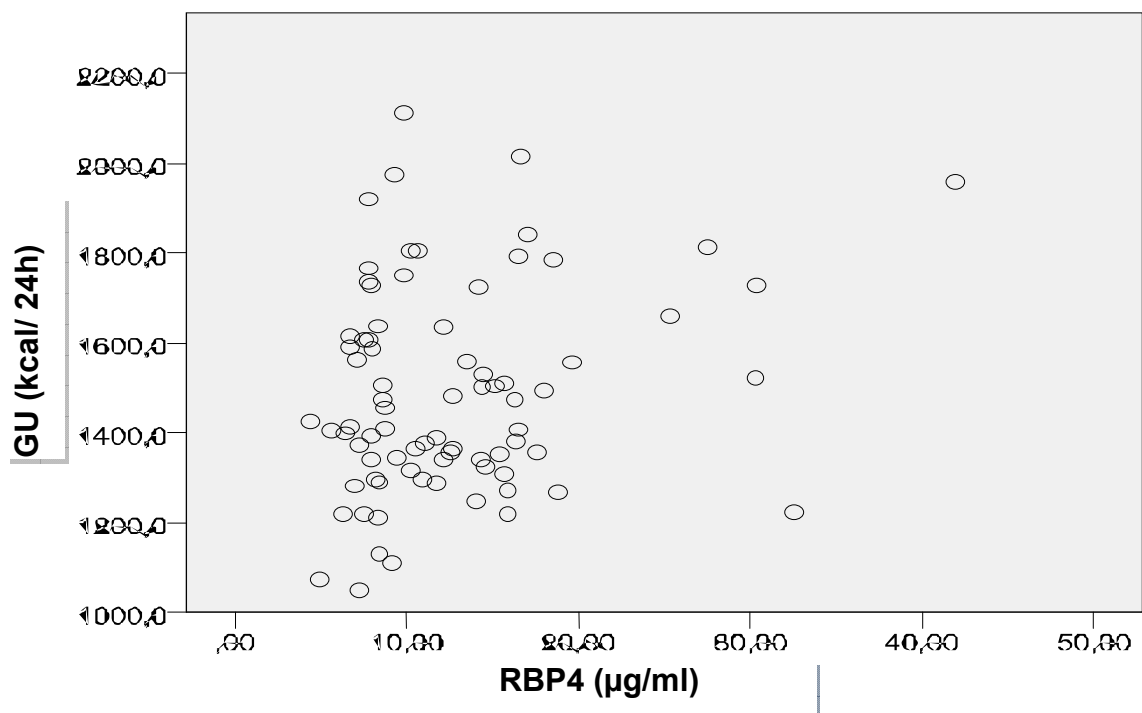


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen RBP4 und Grundumsatz

Tabelle 17: Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Gruppe Parameter	NASH-Gruppe n= 53	NAFL-Gruppe n= 14	Kontroll-Gruppe n= 23	p-Wert
Alter (Jahre): Mean ± SD	53,1 ± 12,10	48,3 ± 15,99	48,5 ± 8,23	n.s.
Geschlecht :				n.s.
-weiblich	n=35 (66,0 %)	n=10 (71,4 %)	n=16 (69,6 %)	
-männlich	n=18 (34,0 %)	n=4 (28,6 %)	n=7 (32,2 %)	
ALT U/I (Mean ± SD)	78,3 ± 50,7	80,8 ± 51,9	27,3 ± 11,0	n.s.
AST U/I (Mean ± SD)	50,2 ± 31,05	45,3 ± 34,27	31,7 ± 5,59	n.s.
Existenz einer Art. Hypertension	47,2 %	42,8 %	8,7 %	0,005
BMI kg/m ² : (Mean ± SD)	29,3 ± 4,15	27,6 ± 5,52	31,3 ± 5,00	n.s.
Taillenumfang cm (Mean ± SD)	101,3 ± 10,64	94,1 ± 13,46	102,7 ± 13,88	n.s.
Waist-to-Hip-ratio (Mean ± SD)	0,97 ± 0,14	0,88 ± 0,06	0,93 ± 0,07	n.s.
Triglyzeride mg/dl (Mean ± SD)	177,4 ± 92,78	127,2 ± 56,39	140,7 ± 66,55	n.s.
Cholesterin mg/dl(Mean ± SD)	201,5 ± 48,98	224,9 ± 50,24	212,9 ± 30,18	n.s.

Existenz eines gestörten Glucosestoffwechsels	77,4 %	50,0 %	8,7 %	<0,001
Existenz eines metabolischen Syndroms	75,5 %	42,9 %	13,0 %	<0,001
HOMA (Mean \pm SD)	5,73 \pm 5,79	3,51 \pm 2,63	2,23 \pm 1,67	<0,001
FM in kg (Mean \pm SD)	29,83 \pm 9,76	28,90 \pm 12,97	29,42 \pm 10,45	n.s.
FFM in kg (Mean \pm SD)	52,50 \pm 11,38	50,52 \pm 8,65	58,79 \pm 2,63	n.s.
RBP4 mg/l (Mean \pm SD)	10,91 \pm 4,37	9,84 \pm 3,74	17,48 \pm 8,86	\leq 0,001
GU kcal (Mean \pm SD)	1482,85 kcal \pm 206,51	1415,27 kcal \pm 217,96	1523,61 kcal \pm 282,15	n.s.
VO2 ml/min. (Mean \pm SD)	204,48 \pm 31,63	195,26 \pm 30,94	213,77 \pm 32,74	n.s.
VCO2 ml/min. (Mean \pm SD)	205,52 \pm 40,53	200,90 \pm 41,75	180,67 \pm 20,49	0,03
RQ (Mean \pm SD)	0,82 \pm 0,04	0,82 \pm 0,05	0,85 \pm 0,07	n.s.

n.s = nicht signifikant

6. Diskussion

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung eines signifikanten Zusammenhanges zwischen dem metabolischen Syndrom und dem Auftreten einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NASH und NAFL).

Die Hypothese, dass Patienten mit einer NASH oder NAFL im Vergleich zu gesunden Kontrollen höhere RBP4-Werte aufweisen, konnte in dieser Studie jedoch nicht bestätigt werden. Auch wurde die in der Literatur postulierte Assoziation zwischen erhöhten RBP4-Werten und dem Auftreten einer Insulinresistenz in dieser Kohorte nicht beobachtet.

Hingegen ergab die Studie überraschenderweise, dass die RBP4-Werte der Kontrollgruppe sogar höher als bei den NASH- und NAFL-Patienten waren.

Es zeigte sich lediglich in der Untergruppe der weiblichen NASH-Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen RBP4 und Body Mass Index.

Im folgenden Kapitel werden diese Ergebnisse und die angewandten Methoden ausführlich diskutiert.

6.1 Auswahl des Patientenkollektives

Alle 121 untersuchten Patienten hatten eine Transaminasenerhöhung unklarer Genese und wurden aus der hepatologischen Ambulanz der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährungsmedizin an der Charite Campus Mitte unter dem Verdacht auf eine NASH zur weiteren Abklärung eingewiesen.

Nach einem anamnestischen, laborchemischen und genetischen Ausschluss einer möglichen anderen Ursache einer Transaminasenerhöhung wurde bei 67 Patienten (55,3 %) sonografisch eine Fettleber (NAFLD) festgestellt, wobei die Mehrzahl der Patienten weiblich war (67 %).

Um der klinischen Praxis so nah wie möglich zu kommen, wurde als Screening auf Fettleber ausschließlich die Sonographie verwendet und eine geringere Sensitivität (< 30 %) für leichtgradige Leberparenchymverfettungen in Kauf genommen [32, 42, 43].

Alternative Methoden, die eine feinere Quantifizierung des Leberfettgehaltes ermöglichen (CT und MRT) sind aufwändig, teuer bzw. strahlenbelastend. Zudem ist der klinische Zusatznutzen fraglich bzw. die Relevanz einer leichtgradigen Leberparenchymverfettung gering.

Im zweiten Schritt der Diagnostik erhielten alle 67 Patienten mit sonografisch nachgewiesener Leberparenchymverfettung eine Leberbiopsie. Die Leberbiopsie ist die einzige Diagnostik-Methode, die zwischen einer einfachen NAFL ohne Entzündungsanzeichen und einer NASH unterscheiden kann [43]. Um eine möglichst hohe Standardisierung der pathologischen Beurteilung der NASH zu erlangen, existieren mehrere Klassifizierungssysteme, von denen das bekannteste der NASH-Score von Brunt ist [10, 35], der auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Um eine mögliche Variabilität zwischen verschiedenen Untersuchern (interobserver variance) auszuschließen, wurden alle Präparate durch den gleichen erfahrenen Pathologen beurteilt.

Auf diese Weise wurde bei 44% der ursprünglich 121 Patienten mit unklarer Transaminasenerhöhung eine NASH diagnostiziert, während bei 12 % eine Fettleber ohne Zeichen der Entzündung oder Fibrose vorlag. Unklar bleibt, ob möglicherweise auch unter den 54 Patienten, bei denen sonografisch keine Parenchymverfettung diagnostiziert wurde, einzelne Fälle waren, bei denen histologisch eine geringgradige Verfettung und ggf. sogar eine NASH vorlag. Diese Frage bleibt ungeklärt, weil das Protokoll bei diesen Patienten keine Leberbiopsie vorsah.

Vergleicht man diese Zahlen mit den Angaben in der Literatur, so wird deutlich, dass es sich um ein hochselektiertes Patientenkollektiv handelt. Die Häufigkeit der reinen Fettleber in der allgemeinen Bevölkerung in westlichen Industrienationen beträgt ca. 20-30 %, von denen ungefähr 10 % eine NASH entwickeln [91].

Leberbiopsien werden üblicherweise nur bei länger anhaltender Transaminasenerhöhung, Komorbiditäten oder schwereren Verläufen durchgeführt,

meist nachdem die Patienten in einer hepatologischen Facharztpraxis oder – ambulanzen vorgestellt wurden [80,81]

Die Absicht dieser Arbeit war es nicht, verlässliche Daten zur Prävalenz der NASH oder NAFL in der allgemeinen Bevölkerung oder auch bei Patienten mit unklarer Transaminasenerhöhung zu gewinnen, sondern die mögliche Bedeutung des RBP4 in der Pathogenese zu untersuchen. Unter diesem Gesichtspunkt wäre es wünschenswert gewesen, eine größere Untergruppe mit einer reinen NAFL zum Vergleich heranzuziehen.

Dazu hätten z.B. auch Patienten ohne Leberbiopsie, bei denen keine Transaminasenerhöhung, jedoch sonografisch eine Fettleber vorlag, eingeschlossen werden können. Dies hätte aber zu einer weiteren Unschärfe geführt, weil nicht ausgeschlossen ist, dass auch bei normalen Transaminasen bereits zonal eine NASH vorliegt [85].

Eine Leberbiopsie ist jedoch bei normalen Transaminasen im Allgemeinen ethisch nicht zu rechtfertigen. Umgekehrt muss allerdings auch festgehalten werden, dass es derzeit keinen einzelnen Biomarker gibt, der zwischen Fettleber(NAFL), NASH und Zirrhose verlässlich differenzieren kann.

6.2 Bedeutung des Ernährungszustandes, der Körperzusammensetzung und des Energiestoffwechsels für die NASH

Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen zeigen eine zunehmende Prävalenz vor allem in der westlichen Welt und sind mit Überernährung assoziiert. Daher kommt der Erfassung des Ernährungszustandes eine besondere Bedeutung zu.

Der einfachste Parameter zur Erfassung einer Überernährung ist die Bestimmung des Body Mass Index (BMI), der auch von der WHO für die Klassifikation von Übergewicht bei Erwachsenen verwendet wird. Die prognostische Wertigkeit eines deutlich erhöhten BMI (BMI > 30 kg/m²) für die Entstehung einer Insulinresistenz, eines Diabetes mellitus, für kardiovaskuläre Erkrankungen und auch für Tumorerkrankungen wurde in

zahlreichen großen epidemiologischen Studien belegt, allerdings scheint ein leicht erhöhter BMI von 25-29.9 kg/m², entsprechend Übergewicht Grad I nach der Klassifikation der WHO [44], nicht mit einer generell erhöhten Sterblichkeit verbunden zu sein [86].

Bezogen auf die NASH zeigten mehrere internationale Studien, dass betroffene Patienten höhere BMI-Werte aufweisen bzw. die Progression von der NAFL zur NASH mit erhöhten BMI-Werten verbunden ist [48, 54, 55, 56, 57, 58].

Ein Nachteil des BMI ist jedoch, dass sich auf diese Weise nur ein erhöhtes Körpergewicht in Bezug auf die Körpergröße feststellen lässt, jedoch keine Aussage über die Zusammensetzung der vermehrten Körpermasse möglich ist.

Das erhöhte Körpergewicht kann sowohl auf einen Exzess an Fettmasse, als auch auf Muskelmasse oder Körperwasser zurückgeführt werden.

Ein weiterer Nachteil des BMI ist, dass er auch nichts über die Fettverteilung aussagt, deren metabolische Bedeutung in den letzten Jahren intensiv beforscht wurde. Daher wurden ergänzend zum BMI auch die Fettverteilung anhand der Waist-to-Hip-ratio bzw. des Taillenumfangs und auch das Verhältnis von Fettfreier zur Fettmasse anhand der Bioelektrischen Impedanzanalyse bestimmt.

Der Taillenumfang bzw. die WHR ist ein indirektes Mass des viszeralen Fettgewebes. Ein hoher Taillenumfang ist mit einem hohen Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz und eines Metabolischen Syndroms verbunden. Entsprechend ist auch die Beobachtung von Rocha R et al. [83] plausibel, die an 81 ambulanten Patienten mit histologisch gesicherter NAFLD einen signifikanten Zusammenhang zwischen hohem BMI und hohem Taillenumfang einerseits und Insulinresistenz, Metabolischem Syndrom und histologischen Merkmalen der NASH andererseits beschrieben.

In der eigenen Studie wurde zwar diese Beobachtung auch im Grundsatz bestätigt: Patienten mit NASH hatten im Durchschnitt einen erhöhten BMI, einen erhöhten Taillenumfang und eine erhöhte WHR, jedoch zeigte der Gruppenvergleich mit den NAFL-Patienten und den gesunden Kontrollen in diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede.

Auch der prozentuale Anteil der Adipösen war in der NASH-Gruppe mit 38 % nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe (58 %).

Die genauere Betrachtung der Körperzusammensetzung mittels BIA zeigte zwar eine etwas höhere fettfreie Masse in der Kontrollgruppe – was Ausdruck einer etwas höheren Muskelmasse sein könnte, die wiederum mit erhöhter Insulinempfindlichkeit einhergehen kann - jedoch waren die Unterschiede zur NASH- und NAFL-Gruppe letztlich statistisch nicht signifikant.

Diese Daten decken sich nicht exakt mit einer Arbeit von Capristo et al. [90], die bei 20 männlichen NASH-Patienten im Vergleich zu 14 Patienten mit Hepatitis C bzw. 20 gesunden Kontrollen eine niedrigere fettfreie Masse (gemessen mittels DEXA), einen höheren Taillenumfang bzw. einen niedrigeren Grundumsatz (gemessen mittels Anthropometrie) beobachteten. In der Studie von Capristo et al. waren die NASH-Patienten allerdings schlanker ($\text{BMI } 26.2 \pm 2.1 \text{ kg/m}^2$) als in der eigenen Kohorte und auch schlanker als die beiden Vergleichsgruppen, was eine direkte Vergleichbarkeit einschränkt.

Der niedrigere Grundumsatz als möglicher Trigger für eine NAFLD erscheint allerdings vordergründig plausibel, weshalb wir in der eigenen Studie auch entsprechende Messungen mittels indirekter Kalorimetrie vornahmen. Wir fanden jedoch keine Unterschiede im Energiestoffwechsel zwischen den Gruppen.

Da unsere Patienten mit NASH, NAFL und die gesunden Kontrollen einen ähnlichen BMI und eine ähnliche Körperzusammensetzung aufwiesen, ist ein von der Körperkonstitution unabhängiger Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Entwicklung einer NASH unwahrscheinlich. Da auch der respiratorische Quotient als direktes Maß der Substratoxidation in der eigenen Arbeit keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies, scheint die Indirekte Kalorimetrie Parameter zu sein, der zur Differenzierung zwischen NASH-Patienten und Gesunden beiträgt.

Somit ließ sich die Annahme, dass Ernährungszustand, Körperzusammensetzung und Energiestoffwechsel Prädiktoren einer NASH sein könnten, in dieser Arbeit nicht bestätigen.

Offensichtlich sind mäßige Überernährung und erhöhte Fettmasse allein keine spezifischen Risikofaktoren für eine NASH.

6.3 Bedeutung des Glukosestoffwechsels, der Insulinresistenz und des Metabolischen Syndroms für die NASH

Patienten mit NAFLD haben häufig eine Störung des Glukosestoffwechsels. Nach Angaben der Literatur zeigen zwischen 18 und 33 % aller Patienten mit NAFLD einen Typ 2 Diabetes mellitus oder eine pathologische Nüchternglukose [85].

Umgekehrt beschrieben Wanless et al in einer großen Autopsiestudie [15] bei 12.2 % aller Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus eine NASH, während diese nur bei 4,7 % der Patienten ohne Typ 2 DM auftrat. Hier muss aber einschränkend festgestellt werden, dass in den retrospektiven Autopsiestudien eine Störung des Glukosestoffwechsels bei den NASH-Patienten ohne Typ 2 Diabetes wahrscheinlich häufig unerkannt blieb, weil nicht gezielt danach gesucht worden war bzw. werden konnte.

In der eigenen Arbeit wurden zwar auch anamnestische Daten zum Diabetes mellitus und anderen Faktoren des Metabolischen Syndroms erhoben, im Mittelpunkt stand jedoch eine genaue Erfassung der Glukosestoffwechsellage und der Insulinresistenz.

Goldstandard der Insulinresistenz-Bestimmung ist der euglykämische-hyperinsulinämische Clamp-Test. Dabei handelt es sich um eine invasive, teure und zeitintensive Methode [20], deren Aufwand in der Regel die Zweckmäßigkeit für klinische Fragestellungen übersteigt.

In dieser Arbeit wurde zur Berechnung der Insulin-Resistenz das Homöostase-Modell-Assesment (IR-HOMA) verwendet, da dieses weitaus einfacher und kostengünstig ist [23]. Für die Berechnung des IR-HOMA-Index werden lediglich Nüchtern-Blutzucker- und Insulinwerte verwendet.

Die Werte, die mittels dem IR-HOMA-Index berechnet werden, korrelieren deutlich mit den Ergebnissen von Clamp-Studien [45] und stellen Werte zur Verfügung, die sich gut zur Anwendung in epidemiologischen bzw. klinischen Studien eignen [46].

In der eigenen Kohorte lag der HOMA-Wert bei 80.6 % aller NAFLD-Patienten > 2 , was als Indikator einer Insulinresistenz gilt. Die differenzierte Betrachtung der Subgruppen zeigte, dass die HOMA-Werte bei den NASH-Patienten ($5,73 \pm 5,79$) signifikant ($p < 0,001$) höher als bei der NAFL- ($3,51 \pm 2,63$) und Kontroll-Gruppe ($2,23 \pm 1,67$) lagen. Diese klaren Ergebnisse bestätigen eine frühere Studie von Sargin et al., die bei NAFLD-Patienten ebenfalls höhere HOMA-Werte ($3.3 \pm 1,5$) als in einer Kontroll-Gruppe ($2,1 \pm 1,1$) beobachteten [52].

Die von uns beobachteten Unterschiede zwischen NASH und NAFL wurden jedoch in einer größeren Kohorte von NAFLD-Patienten (mit behandelter Hypothyreose) nicht gefunden. Hier hatten beide Subgruppen vergleichbar hohe HOMA-Indizes mit einer Tendenz zu sogar höheren Werten bei den NAFL-Patienten (NAFL vs. NASH-Patienten: $6,5 \pm 10,0$ vs. $6,1 \pm 5,9$, $p=0.089$) [54].

In einer erst kürzlich publizierten Studie mit 144 NAFLD-Patienten, die eine Leberbiopsie erhalten hatten, beschrieben Petta et al [53], dass ein erhöhter HOMA-Index $> 3,4$ mit einer signifikanten Progression zur Leberfibrose einherging. In dieser Studie wurde als weiterer signifikanter Risikofaktor für eine fibrosierende Fettlebererkrankung ein hoher „Visceral adiposity index“ identifiziert (der Taillenumfang, BMI, Triglyzeride und HDL-Cholesterin berücksichtigt), welcher wiederum signifikant mit dem HOMA-Index korreliert war.

Insgesamt stützen die eigenen Daten und bereits publizierte Beobachtungen die Annahme, dass eine Insulinresistenz in der Pathogenese der Fettleber, aber auch in der Progression der Erkrankung zur Steatohepatitis und Fibrose eine zentrale Rolle spielt.

Ergänzend zum HOMA-Index wurde bei allen Patienten, bei denen kein Typ 2 DM bekannt war, ein oraler Glukosetoleranztest nach den Richtlinien der WHO durchgeführt [33]. Hier bestätigte sich der Befund, der aus dem HOMA-Index resultierte: Die Mehrzahl der Patienten mit NASH wies eine gestörte Glukosetoleranz / einen Typ 2 DM auf (77 %), während nur 50 % der NAFL Patienten und 8,6 % der gesunden Kontrollen betroffen waren ($p < 0,001$). Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur:

Zwei internationale Studien zeigen eine Prävalenz eines gestörten Glukosestoffwechsels bei 34 % bzw. 75 % der NASH-Patienten [9, 14]. Viele Studien

stellten zudem fest, dass die Prävalenz von Glukosestoffwechselstörungen bei NASH-Patienten höher ist als bei NAFL-Patienten [55, 56, 57, 58].

Hinsichtlich der weiteren Einzelkriterien des metabolischen Syndroms ergab sich in der eigenen Kohorte ein uneinheitliches Bild. Auffällig war, dass sowohl NASH- als auch NAFL-Patienten mit 47 bzw. 42 % signifikant häufiger eine arterielle Hypertonie aufwiesen als die gesunden Kontrollen (8,6 %, $p=0.005$), was sich weder aus der Körperkonstitution, noch aus dem Alter oder anderen biologischen Faktoren erklärt.

Zur Häufigkeit einer arteriellen Hypertonie bei NASH liegen vergleichsweise wenige Daten vor. Eine Studie aus Österreich zeigte eine etwas niedrigere Prävalenz einer arteriellen Hypertension bei NASH-Patienten von 31,8 %, bei NAFL-Patienten von 21,2 % und bei der Kontroll-Gruppe von 9,1 % [62], letztlich aber ein vergleichbares Bild wie in der eigenen Studie.

Die gemeinsame Ursache für die Insulinresistenz und den arteriellen Hypertonus ist am ehesten in einer Aktivierung des viszeralen Fettgewebes unter Beteiligung des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems zu vermuten, wie dies auch für den Typ 2-Diabetes beschrieben wurde [88].

Im Gegensatz dazu zeigten sich bezüglich der Blutfette keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Definition eines normalen Serumspiegels der Blutfette ist allerdings relativ schwierig, da die durchschnittlichen Werte in verschiedenen Populationen weltweit schwanken. Zudem können auch Blutfettwerte, die allgemein als „normale Blutfettwerte“ verstanden werden, bei bestimmten Populationen krankheitsfördernd sein [49].

Für die Beurteilung eines Lipid-Status steht eine Reihe von Referenzsystemen zur Verfügung, die jedoch nur teilweise alters- und geschlechtsabhängig dargestellt werden [50, 51].

Entsprechend der WHO-Definition des metabolischen Syndroms, wurde in der vorliegenden Studie ab TG-Werten > 150 mg/dl, LDL-Cholesterinwerten > 150 mg/dl und HDL-Cholesterinwerten ≤ 35 mg/dl bei Männern bzw. ≤ 40 mg/dl bei Frauen von einer Dyslipidämie ausgegangen.

Nach diesen Kriterien hatte die Mehrzahl der Patienten (NASH: 72 %, NAFL: 78 %), ebenso wie die Mehrzahl der gesunden Kontrollen (61 %) eine Dyslipidämie. Auch in der Literatur wird eine Dyslipidämie bei Patienten mit NASH häufig (38 bis 85 %)-beschrieben [48, 77].

Bei gemeinsamer Betrachtung aller Einzelkriterien des metabolischen Syndroms zeigt sich, dass ein signifikanter Zusammenhang zu Fettlebererkrankungen besteht: Mindestens drei der geforderten Kriterien zur Diagnostik eines metabolischen Syndroms wiesen 75 % der NASH-Patienten und 42 % der NAFL-Gruppe auf, während nur 13 % bei der Kontroll-Gruppe die Kriterien erfüllten. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($P < 0,001$). Marchesini et al. [78] beschrieben 1999, dass 88 % der NASH-Patienten das metabolische Syndrom aufwiesen, während das nur bei 53 % der Patienten mit reiner Fettleber zutraf. Bei diesen Daten liegt die Schlussfolgerung nahe, dass nichtalkoholische Fettlebererkrankungen in der Mehrzahl der Fälle als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms aufgefasst werden können.

Für die klinische Praxis bedeutet dies, dass die Abklärung unklarer Transaminasenerhöhungen bei Patienten mit sonographisch nachweisbarer Leberparenchymverfettung immer auch die Diagnostik des Metabolischen Syndroms umfassen sollte.

6.4 Bedeutung des Retinol-bindenden-Proteins (RBP4) für die NAFL und NASH

Seit der wegweisenden Nature-Arbeit von Yang Q et al. [64], in der sowohl im Tiermodell (Glut4-Knockout-Mäuse) als auch am Menschen gezeigt wurde, dass bei Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus erhöhte Serumspiegel an RBP4 auftreten können, wird dieses Adipokin als Biomarker der Insulinresistenz diskutiert.

Der Zusammenhang mit Insulinresistenz wurde auch durch Daten gestützt, die eine Normalisierung von RBP4 durch Glitazone zeigten [64], bzw durch Befunde, die eine klare Korrelation zwischen der Höhe der RBP4-Spiegel und der Ausprägung einer Insulinresistenz auch bei Nicht-Diabetikern belegten [63]. In letzterer Studie wurde zudem gezeigt, dass bei Patienten mit Insulinresistenz, die sich einem körperlichen

Training unterzogen, die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit mit einer Reduktion des Serum-RBP4 einherging.

Es war daher naheliegend, auch bei Patienten mit NASH von erhöhten RBP4-Spiegeln auszugehen, zudem bestand die Hoffnung, dass RBP4 eventuell ein Biomarker sein könnte, der den Übergang von der NAFL zur NASH anzeigt. In der eigenen Arbeit konnte jedoch diese Hypothese nicht bestätigt werden. Wir beobachteten, dass die RBP4-Werte bei den Patienten mit NAFLD nicht nur nicht höher, sondern sogar signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe waren (Post-Hoc $P = 0,0001$).

Im Gegensatz zu den eigenen Daten fanden Seo JA et al. [93] bei 73 Patienten mit sonographisch nachgewiesener Leberverfettung im Vergleich zu Kontrollen ohne Leberverfettung signifikant höhere RBP4 Spiegel, auch wurde eine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und Leberenzymen beobachtet. In dieser Studie waren allerdings Patienten mit Diabetes mellitus explizit ausgeschlossen, auch hatten die gesunden Kontrollen einen signifikant niedrigeren (und im Mittel normalen) Body Mass Index. Zudem gab es keine histologischen Daten, so dass letztlich keine Differenzierung zwischen NAFL und NASH erfolgte und insgesamt die Vergleichbarkeit zur eigenen Studie nur sehr eingeschränkt möglich ist.

Interessanterweise zeigten Petta et al. [94] an Patienten mit chronischer Hepatitis C und histologisch nachgewiesener Steatose einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der RBP4-Spiegel und der Schwere der Leberparenchymverfettung. konnten aber bei Patienten mit NAFLD keinen vergleichbar klaren Zusammenhang nachweisen. Sie fanden bei NAFLD-Patienten nicht signifikant niedrigere RBP4-Spiegel als bei Patienten mit Hepatitis C. Das Ausmaß der Parenchymverfettung bei NAFLD war in der logistischen Regressionsanalyse zudem nur mit dem Tailenumfang assoziiert. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass RBP4 offenbar nicht bei allen Krankheiten, die mit einer Leberverfettung einhergehen können, eine pathogenetische Rolle spielt.

Aus diesen teilweise widersprüchlichen Daten lässt sich die Frage ableiten, ob RBP4 möglicherweise weniger mit den morphologischen oder inflammatorischen

Veränderungen im Leberparenchym als vielmehr mit dem Ernährungszustand, der Körperfettverteilung oder der Körperzusammensetzung zusammenhängt.

In der vorliegenden Studie fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem RBP4-Wert und dem BMI in der Gesamtheit der NAFLD- und der Kontrollgruppe. Auch andere Studien [67,92, 60, 82] zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem RBP4-Wert und dem BMI.

Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung von Untergruppen zeigte sich jedoch eine schwache, jedoch signifikante positive Korrelation zwischen den RBP4-Werten und dem BMI bei unseren weiblichen NASH-Patienten ($r = 0,39$, $P = 0,021$). Diese Korrelation wurde bei männlichen NASH-Patienten nicht festgestellt. Interessant ist, dass auch Seo et al. bei allerdings nur sonografisch diagnostizierter NAFLD zu einem vergleichbaren Befund kamen: Sie fanden ebenfalls nur bei weiblichen Patienten eine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und BMI, während dies bei den männlichen Patienten nicht der Fall war. Somit ist ein geschlechtsspezifischer Einfluss des BMI auf den RBP4-Serumspiegel nicht ausgeschlossen. Hier kann nur spekulativ angenommen werden, dass die veränderte Körperzusammensetzung mit einer vor allem durch Testosteron bedingten höheren Muskel- und niedrigeren Fettmasse bei Männern die entscheidende Einflussgröße sein könnte.

Die eigenen Daten zeigten allerdings keinerlei Zusammenhang zwischen der mittels Bioelektrischer Impedanzanalyse bestimmten absoluten Fettmasse bzw. fettfreien Masse und dem RBP4-Spiegel in den entsprechenden Untergruppen, was sich mit Befunden von Stefan et al. [69] und Shea et al. [70] deckt. Möglicherweise ist aber hier die Methode der Analyse der Körperzusammensetzung nicht ausreichend, weil die fettfreie Masse nur zum Teil durch die Muskelmasse bestimmt wird. Die Muskelmasse selbst wurde in der eigenen Arbeit nicht direkt bestimmt.

Da RBP4 in den initialen Studien als Adipokin aufgefasst wurde [63, 64] war auch die Körperfettverteilung von Interesse. Seo et al. [93] und Yang et al. [61] beschrieben eine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und der Waist-Hip-Ratio, die wir mit den eigenen Daten auch in geschlechtsspezifischen Untergruppen jedoch nicht reproduzieren konnten. Auch die isolierte Betrachtung des Taillenumfanges zeigten keinen

statistischen Zusammenhang mit RBP4. Auch El Said et al. [82] konnten keine signifikante Korrelation zwischen dem RBP4 und der WHR bei Typ 2 Diabetikern feststellen. Somit ist die Datenlage nicht eindeutig und ein klarer pathogenetischer Zusammenhang zwischen Körperzusammensetzung oder zentraler Adipositas und RBP4 bei Patienten mit NASH nicht zu konstatieren.

Auch die Kenngrößen des mittels indirekter Kalorimetrie bestimmten Energiestoffwechsels (Grundumsatz, respiratorischer Quotient) waren weder bei den gesunden Kontrollen noch bei den NASH- und NAFL-Patienten mit den RBP4-Spiegeln korreliert. Vergleichbare Daten aus der Literatur sind uns nicht bekannt.

6.5 Zusammenhang zwischen RBP4 und Insulinresistenz und Metabolischem Syndrom

Die durch Yang [64] und Graham [63] bereits 2005 bzw. 2006 postulierte und auch bei NAFLD-Patienten von Seo et al. [93] beobachtete signifikante Korrelation zwischen dem RBP4 und dem HOMA-IR wurde in der vorliegenden Studie weder in der Gesamtheit der Patienten und gesunden Probanden noch in den Untergruppen bestätigt.

Der Blick in die Literatur der letzten Jahre zeigt allerdings, dass der Zusammenhang zwischen RBP4 und Insulinresistenz offenbar nicht so klar ist, wie anfänglich angenommen. Auch in anderen Studien wurde keine signifikante Korrelation zwischen RBP4 und Insulinresistenz beschrieben [70, 72, 73, 92, 60].

Auch bezüglich des Zusammenhangs zwischen erhöhten RBP4-Werten und dem Auftreten eines metabolischen Syndroms ist die Literatur widersprüchlich. So zeigten Lui et al. [84], Graham et al. [63] und El Said [82] in ihren Studien eine Assoziation zwischen dem erhöhtem RBP4-Wert und dem Vorhandensein eines metabolischen Syndroms. Alkhouri et al. [92] fanden hingegen, dass der RBP4-Wert von NAFLD-Patienten nicht mit dem metabolischen Syndrom korreliert. In ähnlicher Weise zeigen die eigenen Daten, dass die vom metabolischen Syndrom betroffenen Personen einen leicht niedrigeren RBP4-Wert als die nicht vom metabolischen Syndrom betroffenen Patienten aufwiesen. Jedoch war dieser Zusammenhang statistisch nicht signifikant.

Fasst man die eigenen und die in der Literatur erhobenen Daten zusammen, so ist bei vielen Patienten die nichtalkoholische Fettlebererkrankung Ausdruck einer Insulinresistenz und eines metabolischen Syndroms, meistens hervorgerufen durch Überernährung und Bewegungsmangel. Die Hoffnung, im RBP4 einen pathogenetisch plausiblen und diagnostisch sensitiven Biomarker für Insulinresistenz und NASH zu finden, hat sich jedoch nicht bestätigt.

7. Literatur

1. Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Medical Weekly* 2002;132 : 493–505.
2. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulinresistance, and metabolic syndrome:Further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35 : 367–72.
3. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al. NASH and insulinresistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35 : 373–9.
4. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G,et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50 :1844–50.
5. Day CP, James OFW. Steatohepatitis:a tale of two “hits”? . *Gastroenterology* 1998;114:842–45.
6. Weltman MD, Farrell GC, Hall P,et al. Hepatic cytochrome P4502E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998 ;27:128–33.
7. Woodcroft KJ, Hafner MS, Novak RF. Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression.*Hepatology* 2002 ; 35 : 263–73.
8. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC,Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia,and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48:206–11.
9. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126 : 137–45.
10. Brunt EM, Janney CG, DiBisceglie AM,et al, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94 : 2467–74.
11. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis:Summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37:1202–19.
12. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R,et al.The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74–80

13. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology* 2000 ;32: 689–92.
14. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, et al. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29 :664–9.
15. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990 ; 12: 1106–10.
16. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103–9.
17. McFarland RJ, Gazet JC, Pilkington TR. A 13-year review of jejunoileal bypass. *Br J Surg* 1985; 72: 81–7.
18. Cello JP, Grendell JH. The liver in systemic conditions. In: Zakim D, Boyer TD (eds). *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1990; 1428–9.
19. Kahn CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 1978; 27:1893–902.
20. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose -clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: 214–23.
21. Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, et al. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979; 236:667.
22. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, et al. Assessment of insulin secretion from the oral glucose tolerance test in white patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:1440–1.
23. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–9.
24. National Institutes of Health. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Final Report. National Heart, Lung and Blood Institute and National Institutes of Health. NIH Publication No. 02-5215. 2002.
25. Alberti KG, Zimmet PZ, for the WHO Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and

classification of diabetes mellitus. provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–53.

26. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, et al. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes* 1998; 47:1643–9.
27. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 2003; 26:575–81.
28. Howard G, O’Leary DH, Zaccaro D, et al. Insulin sensitivity and atherosclerosis. *Circulation* 1996; 93:1809–17.
29. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, et al. Carotid atherosclerosis and coronary heart disease in the metabolic syndrome:prospective data from the Bruneck study. *Diabetes Care* 2003; 26:1251–7.
30. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, et al. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1135–41.
31. WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee: 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. In: *Journal Hypertens.* 17.1999: 151-183.
32. Saverymuttu, S.H., Joseph AE, and Maxwell JD, Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed.)*1986 ; 292(6512) : 13-5.
33. Diabetes Mellitus ;Report of a WHO Study Group. 1985, WHO
34. A. S. Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, et al. Understanding insulin resistance: Both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. In: *Metabolism.* 40, September 1991:908–917.
35. Brunt, EM., Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004 ;24(1) :3-20.
36. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct Homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998; 21L: 2191-2192.
37. Matsumoto K, Yano M, Ueki Y et al. Response to van Haeften: The formula for insulin resistance in index in homeostasis model assesment. *Diabetes Care* 1998; 21:673-674

38. American Gastroenterological Association Medical Position Statement : Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Gastroenterology* 2002;123:1702–1704
39. van Hoek M, Dehghan A, Zillikens MC, et al. An *RBP4* promoter polymorphism increases risk of type 2 diabetes, *Diabetologia* 2008 ; 51:1423-1428
40. Yang Q, Graham TE, Mody N ,et al . Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005 ; 436 : 356–362
41. S. Frey : Investigations on extra- and intracellular retinol-bindingproteins, *Abt. Naturwissenschaft of University Potsdam* 2009:p 15
42. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV,et al. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004;14:635-7
43. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM,et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease . *Gastroenterology* 2002; 123: 745-750
44. Obesity:preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Oran Tech Rep Ser* 2000; 894:p. i-xii,1-253
45. Bonora E , Targher G, Alberiche M,et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of the insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23(1): 57-63
46. Bugianesi E, McCullough A.J, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;42(5): 987-1000
47. Ludwig J, Viggiano TR, Mc Gill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.*1980 Jul; 55(7):434-8.
48. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis(NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998;29: 495–501.
49. Conference on the Health Effects of Blood Lipids: Optimal Distributions for Populations. Workshop report: Epidemiological Section. American Health Foundation, April 11 and 12, 1979. *Prev Med* 1979; 8(6): 312-78
50. Plasma lipid distributions in selected North American populations: the Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee. *Circulation* 1979; 60(2): 427-39

51. Durrington, P. Dyslipidaemia , Lancet 2003; 362 (9385): 717-31
52. Sargin H, Sargin M, Gozu H, et al. Is adiponectin level a predictor of nonalcoholic fatty liver disease in non diabetic male patients: a case- controll study. World J Gastroenterol. 2005; 11(37): 5874-5877
53. Petta S, Armato MC, Di Marco V ,et al. Visceral adiposity index is associated with signifikant fibrosis in patients with non- alcoholic fatty liver disease, Aliment pharmacol Ther 2012; 35: 238-247
54. Mazo DF, Lima VM, Stefano JT,et al. Gluco-lipidic indices in treated hypothyroidism associated with nonalcoholic fatty liver disease. Arg. Gastroenterol 2011;48(3):186-189
55. Adams LA , Lymp JF,St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population- based cohort study. Gastroenterology 2005;129(1):113-21
56. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, et al.Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsy. Hepatology 2004 Oct;40(4): 820-6
57. Hamaguchi M , Kojima T, Takeda N, et al. The metabolic Syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med 2005 Nov ;143 (10): 722-8
58. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, et al. Survival, liver failure , and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. Hepatology 2002; 35: 1485-93
59. Lizardi-Cervera J , Laparra DI, Chavez-Tapia NC, et al. Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects. Rev Gastroenterolo Mex 2006;71(4): 453-9
60. Chavez AO , Coletta DK, Kamath S,et al. Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans. Am J Physiol Endocrinol Metab2009; 296: E758–E764
61. Yang Q, Eskurza I, Kiernan UA, et al. Quantitative measurement of full-length and C- terminal proteolyzed RBP4 in serum of normal and insulin-resistant humans using a novel mass spectrometry immunoassay. Endocrinology 2012 Mar; 153(3): 1519-27

62. Schramm C, Dinter J, Demir M, et al. Hypertonie-Prävalenz und antihypertensive Behandlungsmodalitäten bei Patienten mit bioptisch gesicherter nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung. *Journal of Hypertension* 2010;14(4) : 21-25
63. Graham TE, Yang Q, Blüher M, et al. Retinol-Binding-Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese and Diabetic Subjects. *N Eng J Med* 2006; 354: 2552-63
64. Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol-binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436:447-55
65. Bray GA. Contemporary diagnosis and management of obesity and the metabolic syndrome. 3rd ed. Newtown, PA : Handbooks in Health Care 2003
66. Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, et al. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol. Chem* 1992;267:1805-10
67. Janke J, Engeli S, Boschmann M, et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 2805-10
68. Cho YM, Youn B-S, Lee H, et al. Plasma retinol-binding protein 4-concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 2457-61
69. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, et al. High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver-fat but not with total, subcutaneous visceral or intramyocellular fat in humans. *Diabetes Care* 2007; 30:1173-8
70. Shea J, Randell E, Vasdev S, et al. Serum retinol-binding protein 4 concentrations in response to short-term overfeeding in normal-weight, overweight and obese Men. *Am. Clin Nut* 2007; 86: 1310-5
71. Tajtakova M, Petrasova D, Pidanicova A, et al. Serum levels of leptin, adiponectin, retinol binding protein 4 and leptin/adiponectin molar ratio as another possible marker of insulin resistance in obese. *Bratisl Lek Listy* 2010;111(4): 212-215
72. Yao-Borengasser A, Varma V, Bodles AM, et al. Retinol binding protein 4 expression in humans:relationship to insulin resistance,inflammation, and response to pioglitazone.*J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2590–2597.
73. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail M, et al. Retinol binding protein-4 ist associated with TNF- α and not ,it insulin resistance in subjycts with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Dis Marker* 2009 ; 26(3):135-140.

74. Pirlich M, Plauth M, Lochs H. Bioelektrische Impedanzanalyse: Fehlerquellen und methodische Grenzen bei der klinischen Anwendung zur Analyse der Körperzusammensetzung. *Aktuelle Ernährungsmed* 1999; 24: 81-90.
75. Kushner RF, Schoeller DA. Estimation of total body water by bioelectrical impedance analysis. *Am J Clin Nutr* 1986; 44(3): 417-424.
76. Pirlich M, Schuetz T, Spachos T, et al. Bioelectrical impedance analysis is a useful bedside technique to assess malnutrition in cirrhotic patients with and without ascites. *Hepatology* 2000; 32(6):1208-1215.
77. Kumar VV, Rohatgi A, Sharma S.K. NASH in High Risk Group of Patients with Type 2 DM, Obesity & Dyslipidemia. *JK Science* 2010; 12 (1): 52-53
78. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-455
79. Lewis JG, Shand BI, Frampton CM, et al. An ELISA for plasma retinol-binding protein using monoclonal and polyclonal antibodies: plasma variation in normal and insulin resistant subjects. *Clin Biochem.* 2007;40:828–834
80. Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: Further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 293-303.
81. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4): 917-923.
82. El-Said NH, Abd El Salam RF, Abd El-Ghaffar Mohammad N. Retinol Binding Protein 4 And Insulin Resistance In Egyptian Type 2 Diabetics. *Aust. J. Basic & Appl. Sci* 2011; 5(10): 265-271
83. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, et al. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet* 2005; 18 (5): 365-370.
84. Liu XH., Wei L, Wang LY, et al. Expression and regulation of retinol binding protein 4 mRNA in human adipose tissue in obese and type 2 diabetics. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; 90(18): 1251-1254.
85. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 145754

86. Lenz M, Richter T, Mühlhauser I. Morbidität und Mortalität bei Übergewicht und Adipositas im Erwachsenenalter. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106(40): 641–8
87. Bahr MJ., Boeker KH, Manns, MP, et al. Decreased hepatic RBP4 secretion is correlated with reduced hepatic glucose production but is not associated with insulin resistance in patients with liver cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009 Jan; 70(1): 60–65
88. Underwood PC , Adler GK. The Renin Angiotensin Aldosterone System and Insulin Resistance in Humans. *Curr Hypertens Rep*(2013);15(1): 59-70
89. Reinehr T, Stoffel-Wagner B , Roth CL. Retinol-Binding Protein 4 and Its Relation to Insulin Resistance in Obese Children before and after Weight Loss. *J Clin Endocrinol Metab.* June 2008; 93(6): 2287-2293
- 90 Capristo E, Miele L, Forgione A, et al. Nutritional aspects in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9(5): 265-268.
91. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 503-522.
92. Alkhouri N, Lopez R, Berk M, et al.. Serum Retinol -Binding Protein 4 (RBP4) Levels in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2009 Nov-Dec; 43(10): 985-989
93. Seo JA, Kim NH, Park SY, et al. Serum retinol-binding protein 4 levels are elevated in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical endocrinology.* 2008;68:555–560
94. Petta S, Camma C, Di Marco V, et al. Retinol-binding protein 4: a new marker of virus-induced steatosis in patients infected with hepatitis c virus genotype 1. *Hepatology (Baltimore), Md.* 2008;48:28–37.
95. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol.* 2011 Nov; 165(5): 703-11.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maher Madi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Bedeutung des Retinol-bindenden Proteins 4 (RBP4) in der Pathogenese der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

Folgenden Personen möchte ich vom ganzen Herzen dafür danken, dass sie mich bei der Erstellung dieser Arbeit unentwegt unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Pirlich für die Vergabe des interessanten Themas und seiner hervorragende Betreuung; der mich immer konstruktiv gefordert und gefördert hat, und mir in allen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Frau Dr. rer. nat. Tatjana Schütz für ihre permanente Unterstützung, und ihre präzisen wissenschaftlichen Denkweise, die mir bei der Erstellung der Arbeit sehr hilfreich war.

Herrn Prof. Dr. med. Herbert Lochs, dem ehemaligen Direktor der Medizinischen Klinik im Charité Campus Mitte, für die Protektion der Abläufe.

Herrn Dr. med. Koch sowie seinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte für die Befundung und Beurteilung der Lebergewebebeobachten.

Herrn Prof. Dr. med. Uwe Tietge und dem Labor im Zentrum für Leber- und Verdauungskrankheiten in dem medizinischen Universitätszentrum in Groningen-Holland für die Bestimmung des Serum-RBP4.

Frau Dr. rer. nat. Monika Wolff für ihre nette und qualifizierte Hilfe bei der statistischen Auswertung und Interpretation der Daten

Meiner Kollegin, Frau Patrizia Dippe, die diese Arbeit mit ihren wertvollen Daten erst ermöglicht hat, ohne deren Einverständnis ich diese Dissertation nicht hätte komplettieren können.

Allen Ärztinnen, Ärzten, Schwestern und Pflegern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité Campus Mitte für ihre Kooperation und organisatorische Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Schirin Rawan, die mich während der gesamten Jahre unentwegt liebevoll unterstützte und somit in allen Lebenslagen die notwendige Ruhe und Kraft zur Fertigstellung dieser Arbeit schenkte.

Der Dank gilt auch meiner gesamten Familie in Syrien für ihre dauerhafte Unterstützung.