

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

(Direktor: Prof. Dr. med. Th. Becker)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

**Differentielle Metabolomuntersuchungen
im Übergang von gesunder Lebermorphologie zur NASH**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Auste Gruodyte
aus Kaunas

Kiel 2017

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Schafmayer,
Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Jost Phillip Schäfer,
Klinik für Radiologie und Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung 18.12.2018

Zum Druck genehmigt Kiel Kiel, den 28.10.2018

gez. Prof. Dr. Johan Roider

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung	2
1.1.1 Definition und zugehörige Terminologie	2
1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.1.3 Pathogenese der Leberverfettung	6
1.1.4 Klinik und Diagnostik.....	9
1.1.5 Therapie	12
1.2 Metabolom und die Metabolomik (Metabolomics).....	14
1.2.1 Terminologie	14
1.2.2 Untersuchungsmethoden	15
1.3 Tierversuche, HFD-Mausmodell	17
1.3.1 Tiermodelle	17
1.3.2 Mausmodelle von high-fat-Diet-induzierten NAFLD/NASH	17
1.4 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Patientenkohorte und Gewebeproben	19
2.2 Ernährungsfragebogen	20
2.3 Vorbereitung der Metaboliten.....	20
2.4 Analytische Methode	21
2.5 Behandlung der Angaben	22
2.6 NAFLD Mausmodel	22
2.7 Leberhistologie	23
2.8 Statistik	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Metabolomische Signatur der nichtalkoholischen Leberkrankheit im Lebergewebe	25
3.2	Diätische Intervention im NAFLD-Mausmodell	30
3.3	Analyse der Ernährungsfragebögen	34
4	Diskussion	35
5	Zusammenfassung	39
6	Literaturverzeichnis	41
7	Anhang	50
	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Histologische Einteilung der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD)	4
Abbildung 2:	“Two-Hit” Hypothese der Pathogenese von NASH	7
Abbildung 3:	Modifizierte „zwei-Hit“ Hypothese	8
Abbildung 4:	Die 3-Hit Hypothese	9
Abbildung 5:	Die Indikation zur Leberbiopsie	11
Abbildung 6:	Übliche Studien von -omik in der Biologie	15
Abbildung 7:	Instrumentation für Metabolomik-NMR, Kernresonanz; FTIR, Fourier infrarote Transformation.....	16
Abbildung 8:	Studiendesign	27
Abbildung 9:	Ergebnisse von humanem Metaboliten-Screening	29
Abbildung 10:	Repräsentative Abschnitte der Leberhistologie im Mausmodell in 4-facher und 10-facher Vergrößerung bei Hämatoxilin–Eosin- und Öl-Rot-Färbung aus den Behandlungs- und Kontrollgruppen	32
Abbildung 11:	Statistische Analyse des Fettgehalts der Leber- und Transaminasenaktivität in Behandlungs- und Kontrollgruppen.	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tabellarische Darstellung der Patientenkohorte für die humanen Leberproben des zweistufigen Metaboliten-Screenings.....	26
Tabelle 2:	Ergebnisse der zweistufigen Screening-Analyse	28

Abkürzungsverzeichnis

ALAT (auch ALT)	Alanin-Aminotransferase
ARFI	Acoustic Radiation Force Impulse
ASAT (auch AST)	Aspartat-Aminotransferase
BMI	body mass Index,
CAP	Controlled attenuation Parameter
CI	Chemische Ionisation
CT	Computertomografie
CTGF	connective tissue growth factor, Wachstumsfaktor des Bindegewebes
Da	Daltons
ELF-Test	Enhanced Liver Fibrosis Test
EPA	Environmental Protection Agency
ER	endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin 1
FFA	Free Fatty Acids, freie Fettsäure
FFQ+	Food Frequency Questionnaire
FLI	Fatty liver Index
FT-IR	Fourier transform infrared
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GC	Gas-Chromatographie
GC/MS	Gaschromatografie/ Massenspektrometrie
GLP1	Glucagone-like-Peptide-1
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HE	Hämatoxilin-Eosin
HELLP-Syndrom	Hämolyse (H), Erhöhung der Leberenzyme (EL= Elevated liver enzymes), Thrombozytopenie (LP= low platelet count)
HFD	High Fat Diet
HPCs	hepatic Progenitor cells, hepatische Vorläuferzellen
HQ	Hydrochinon
HSCs	Hematopoietic stem cells (HSCs) oder Hämozytoblasten
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related
IGS	International Genetic Standardisation
IR	Insulin Resistenz

Kg	Kilogram
kJ	Kilojoule
LC/ SM	Liquide Chromatografie/ Massenspektrometrie
Log 10	dekadische Logarithmus
LTX	Lebertransplantation
Mg	Magnesium
MR	Magnetresonanz
MS	Massenspektrometrie
NA	Nikotinsäure oder Niacin
NAFL	Nicht-Alkoholische Fettleber
NAFLD	Non-Alcoholic fatty liver Disease, nicht-alkoholische Fettleber- erkrankung
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
NFS	NAFLD Fibrosis score
Ng	Nanogramm
NIAAA	National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
NMR	Nuklear Magnetik Resonanz
OCA	Obeticholsäure
ORO	Oil Red O, Öl-Rot-Färbung
P-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PDGF	Platelet-derived growth factor, Thrombozyten Wachstumsfaktor
PIIINR	Prokollagen III
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RNS	Ribonukleinsäure
SPME	solid phase microextraction
SWE	Shear-Wave Elastographie
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
tBHQ	tert-butylhydroquinon
TE	Transiente Elastographie
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1, transformierender Wachstumsfaktor Beta-1
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
VEGF	vaskuläres endotheliales Wachstumsfaktor
VOC	volatile organische Verbindungen
Zn	Zink

1 Einleitung

Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl.: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)) ist die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, die durch Steatose als typische gemeinsame pathologische Veränderung der Leber definiert wird (Chalasani et al. 2012). Die einfache Lebersteatose, auch nichtalkoholische Fettleber (NAFL) genannt, ist ein benigner Zustand, der aber progrediente nekroinflammatorische Veränderungen entwickeln kann, die als nichtalkoholische Steatohepatitis (engl.: Non-alkoholic Steatohepatitis (NASH)) definiert werden und weiter bis zu Leberzirrhose, Leberinsuffizienz und hepatozellulärem Karzinom voranschreiten kann. Bei global zunehmenden Risikofaktoren der o.g. Erkrankung im Sinne von Adipositas, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus Typ II, wurde die Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) die häufigste Ursache der erhöhten Serum-Transaminasen, sowie generell die am weitesten verbreitete Lebererkrankung in den Industrieländern (Fraser et al. 2007, Roeb et al. 2015). Die Pathogenese von NAFLD ist multifaktoriell und wird von Umweltfaktoren wie hyperkalorischer Ernährung und fehlender physischer Aktivität im Hintergrund einer genetischen Prädisposition beeinflusst (Romeo et al. 2008, Chalasani et al. 2010). Dennoch ist die genaue Pathophysiologie nur unvollständig geklärt. Insbesondere bleibt unklar, warum manche gefährdete Personen eine komplett normale Leberhistologie haben, während andere eine progressive Steatohepatitis entwickeln (Yilmaz 2012).

Die Analyse des Stoffwechselzustandes der Zellen oder Gewebe wurde in letzter Zeit durch die Entwicklung neuer Techniken erleichtert, die es gestatten, eine steigende Zahl von Komponenten aus biologischem Material zu bestimmen. Obwohl diese aufstrebenden Techniken immer noch beschränkt sind - sowohl in der Zahl der identifizierbaren Metaboliten, als auch in der Anwendbarkeit auf komplexe biologische Matrizen - leisten sie einen immer größeren Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie von Krankheiten und zur Entdeckung von Biomarkern (Sreekumar et al. 2009; Suhre et al. 2011; T. J. Wang et al. 2011; Z. Wang et al. 2011). Metabolitenscreens könnten neue Einsichten in Krankheitsmechanismen erbringen und neue Therapieziele identifizieren.

Die vorliegende Arbeit beginnt zunächst mit einem Blick auf die Entität der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung, sowie auf die aktuellen Möglichkeiten die pathophysiologischen Stoffwechselwege dieser Erkrankung mittels Metabolom-Untersuchungen zu erforschen. In dieser Arbeit wird eine GC/MS basierte Methode verwendet, um die metabolische Gewebesignatur der humanen nichtalkoholischen Fettlebererkrankung zu erforschen und Metaboliten, die mit einer NASH einhergehen, zu identifizieren. Durch Metabolomstudien wird eine hypothesefreie Zielsetzung der Grundforschung erlaubt. Somit sind zur Überprüfung der Ergebnisse weitere Experimente wie Tierversuche sinnvoll. Deswegen werden die replizierten Metaboliten, die Histologie-assoziierte Unterschiede aufweisen, in einem High-Fat-Diet Mausmodell zu nichtalkoholischer Leberverfettung reevaluiert um ihre mechanistischen Effekte in einem Mausmodell der NAFLD zu überprüfen.

1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

In diesem Kapitel wird zunächst die Entität der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung beschrieben, indem die bedeutendste Terminologie, Epidemiologie, aktuellen Pathophysiologie-Theorien, sowie klinische Erscheinungsmöglichkeiten beschrieben werden. Weiterhin wird dann ein Bezug zwischen begrenzt erforschten pathophysiologischen Mechanismen und somit eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten der NAFLD hergestellt, um schließlich die Bedeutung der in dieser Arbeit verwendeten Metabolom-Untersuchungen zu erläutern.

1.1.1 Definition und zugehörige Terminologie

Die Definition der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) setzt voraus, dass es erstens ein Anzeichen von hepatischer Steatose gibt, entweder durch bildgebende Verfahren oder durch Histologie, und zweitens, dass es keine Gründe für eine sekundäre hepatische Fettansammlung gibt, wie etwa erheblicher Alkoholkonsum, Einnahme steatogener Medikamente (z.B. Amiodaron, Methotrexat, Tamoxifen, Corticosteroide, Valproat, antiretrovirale Arzneimittel), oder andere bekannte Leberstörungen (wie Hepatitis C (Genotyp 3)), Morbus Wilson, HELLP-Syndrom oder Andere) (Chalasan et al. 2012). Per definitionem weist eine NAFLD auf den mangelnden Nachweis eines anhaltenden oder kürzlich erfolgten Konsums erheblicher Men-

gen von Alkohol hin. Eine präzise Definition eines erheblichen Alkoholkonsums bei Patienten mit Verdacht auf NAFLD ist jedoch ungewiss und wird in vielen Publikationen sehr unterschiedlich diskutiert. Das National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) in den USA definiert ein schweres oder risikobehaftetes Trinken mit mehr als 4 alkoholischen Getränken (Alkoholeinheiten) pro Tag oder mehr als 14 Getränken pro Woche bei Männern und mehr als 3 alkoholischen Getränken pro Tag oder 7 Getränken pro Woche bei Frauen (Chalasani et al. 2012). Eine Konsenssituation aus letzter Zeit kam zu dem Schluss, dass für die Teilnahmeberechtigung von Kandidaten an den klinischen NASH-Studien der erhebliche Alkoholkonsum mit mehr als 21 alkoholischen Getränken pro Woche für Männer und mehr als 14 alkoholischen Getränken pro Woche für Frauen über einen Zeitraum von 2 Jahren vor der Leberhistologie zu Behandlungsbeginn definiert werden kann (Sanyal et al. 2011). Als ein Getränk, oder eine Alkoholeinheit wird eine Menge von 9-13 Gramm reiner Alkohol definiert, dass etwa einer kleinen Flasche Bier (0.33l) mit einem 4,8-4,9 Volumenprozent Alkoholgehalt entspricht. In der deutschen S2k-Leitlinie zur NAFLD von 2015 wird als diagnostisches Kriterium ein täglicher Alkoholgrenzwert von 10 g bei der Frau und 20 g beim Mann. Bei höheren täglichen Alkoholmengen kann eine alkoholische Fettleber nicht sicher ausgeschlossen werden (Roeb et al. 2015).

Histologisch kann, wie in Abbildung 1 gezeigt, NAFLD in nichtalkoholische Fettleber (NAFL) und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) unterteilt werden.

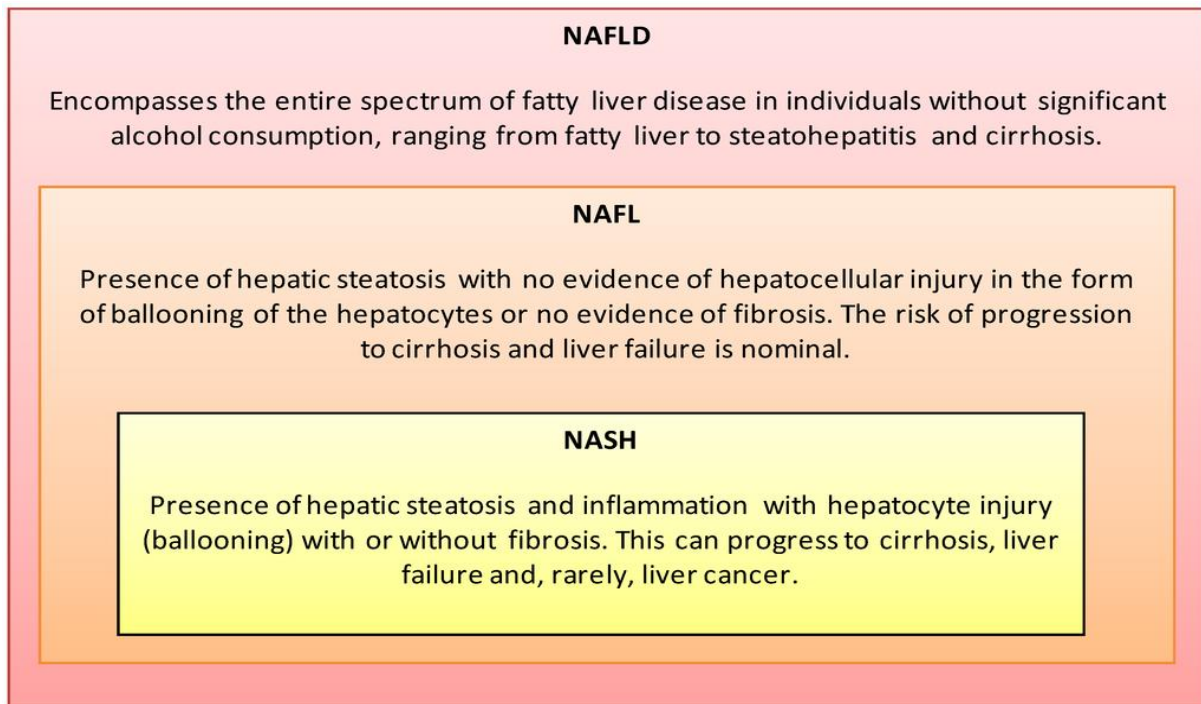


Abbildung 1: Histologische Einteilung der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) (Conlon et al. 2013)

Die NAFL wird definiert als das Vorliegen einer hepatischen Steatose ohne Hinweis auf hepatozelluläre Schädigung in Form von Ballonisierung der Hepatozyten oder entzündlichen Veränderungen. Die NASH wird definiert als das Vorliegen einer hepatischen Steatose und Entzündung neben hepatozellulärer Schädigung mit oder ohne Fibrose (Chalasani et al. 2012). Wie in Absatz 1.1.4. beschrieben, erfolgt die Diagnostik einer NAFLD jedoch auch teilweise aufgrund nicht-histologischer Parameter. Jedoch können diese laborchemischen und apparativen Untersuchungen keine zuverlässige Grundlage zur Bewertung von Steatohepatitis und Fibrose bei Patienten mit NAFLD bieten.

1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die Inzidenz der NAFLD wurde in einer sehr begrenzten Zahl von Studien untersucht. Zwei japanische Studien zeigen eine Inzidenz von 31 bzw. 86 Fällen mit Verdacht auf NAFLD je 1000 Personenjahre (Hamaguchi et al. 2005; Suzuki et al. 2005), wogegen eine andere Studie aus England eine viel geringere Inzidenz von 29 Fällen je 100.000 Personenjahre angibt (Whalley et al. 2007).

Es besteht ein dringender Bedarf an weiteren Studien, um die Inzidenz von NAFLD über verschiedene Alters-, ethnische und geografische Gruppen hinweg auswerten zu können.

Mit der Analyse von Epidemiologie-Studien der NAFLD haben sich die Autoren Chalasani et al. (2012) in „The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology“ auseinandergesetzt. Hier wird beschrieben, dass die Prävalenz der NAFLD weitgehend in Abhängigkeit von der untersuchten Population und der verwendeten Definition variiert. Die Prävalenz histologisch definierter NAFLD liegt bei 20% bzw. 51% in zwei unterschiedlichen Studien mit Leber-Lebendspendern (Lee et al. 2007; Marcos et al. 2000). Eine weitere Untersuchung zeigt, dass die Prävalenz der sonographisch diagnostizierten NAFLD zwischen 17% und 46% in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Population anzusiedeln ist (Vernon et al. 2011). In einer Studie mit fast 400 Personen mittleren Alters liegt die mittels Ultraschalluntersuchung definierte Häufigkeit der NAFLD bei 46% und die von histologisch bestätigter NASH bei 12,2% (Williams et al. 2011). In der Dallas Heart Study beträgt die Häufigkeit der NAFLD bei Bestimmung mittels MR-Spektroskopie in der Allgemeinbevölkerung 31% (Browning et al. 2004). Die Häufigkeit des Verdachts auf NAFLD, bei Einschätzung aufgrund der Aminotransferasen ohne Bildgebung oder Histologie, liegt zwischen 7% und 11%. Hier ist zu bemerken, dass die Aminotransferasen auch bei Personen mit NAFLD normal sein können (Vernon et al. 2011).

Zusammenfassend reichen die Einschätzungen der Häufigkeit der NAFLD weltweit von 6,3% bis 33% mit einem Mittelwert von 20% in der Allgemeinbevölkerung, beruhend auf einer Vielzahl von Bewertungsverfahren.

Die Prävalenz von NAFLD bei Risikopatienten ist wie erwartet viel höher. Fettleibigkeit ist ein allgemeiner und gut dokumentierter Risikofaktor für NAFLD. Sowohl ein übermäßiger BMI als auch viszerale Adipositas gelten als anerkannte Risikofaktoren für NAFLD. Bei Patientenkollektiven mit schwerer Fettleibigkeit, die sich einem bariatrisch chirurgischen Eingriff unterziehen, kann die Häufigkeit der NAFLD 90% übersteigen, und bei bis zu 5% der Patienten kann es zu einer unerwarteten Zirrhose

kommen (Beymer et al. 2003; Boza et al 2005; Colicchio et al. 2005; Haentjens et al. 2009; Machado et al. 2006; Vernon et al. 2011).

Es gibt eine bedeutende Häufigkeit von NAFLD bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) (Vernon et al., 2011). Eine Ultraschallstudie von Patienten mit T2DM zeigte eine 69%ige Häufigkeit von NAFLD (Leite et al. 2009) .

Die Prävalenz von NAFLD bei Patienten mit Dyslipidämie wurde auf 50% geschätzt (Assy et al. 2000).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Häufigkeit der NAFLD innerhalb der Bevölkerung mit zunehmendem Alter steigt (Amarapurkar et al. 2007; C. H. Chen et al. 2007; Frith et al. 2009; Li et al. 2009; S. H. Park et al. 2006), mit der höchsten Prävalenz bei über 60 Jährigen (Roeb et al. 2015).

Vielen Studien aus letzter Zeit ist zu entnehmen, dass das männliche Geschlecht ein Risikofaktor für die Fettlebererkrankung ist (Vernon et al. 2011). Bei einer Studie, bei der an 26.527 Probanden medizinische Untersuchungen vorgenommen worden sind, lag die Häufigkeit der NAFLD bei Männern bei 31% und bei Frauen bei 16% (Z. Chen et al. 2008).

Die geschätzte Häufigkeit der NASH ist deutlich geringer: zwischen 3% und 5% (Vernon et al. 2011). Eine histologisch Gesicherte NASH wurde in 2-15% potentieller Lebendleberspender vor Lebertransplantation beschrieben (Roeb et al. 2015). Die Prävalenz der NASH in Risikopopulationen wird von bis zu 50% geschätzt (Roeb et al. 2015).

Wie häufig die NASH-Zirrhose in der Allgemeinbevölkerung auftritt, ist immer noch unbekannt (Chalasani et al. 2012). Jedoch zeigen die NASH-induzierte Leberzirrhose und das HCC auf dem Boden einer NASH eine deutliche Zunahme als Indikation zur Lebertransplantation (Roeb et al. 2015).

1.1.3 Pathogenese der Leberverfettung

Der biologische Mechanismus, der dem Auftreten der Steatose und ihrem Fortschreiten zur NASH zugrunde liegt, wird noch nicht vollständig verstanden und ist wahrscheinlich auf mehrere Faktoren zurückzuführen, die im Zusammenhang mit genetischer Prädisposition zum Ausdruck kommen. In diesem komplexen Repertoire wurde

eine „Two-Hit“-Hypothese entwickelt. Diese wird mit der Abbildung 2 illustriert. In der traditionellen „Two-Hit“-Hypothese stellt die Steatose den "ersten Hit" dar. Diese sensibilisiert die Leber für den „zweiten Hit“, wie inflammatorische Zytokine, Adipokine, oxidativer Stress und Mitochondrien-Dysfunktion, was zu einer Steatohepatitis und Fibrose führt. Der oxidative Stress reduziert die Fähigkeit des reifen Hepatozyten zu proliferieren, was eine reduzierte endogene Leberreparaturfähigkeit zur Folge hat, was wiederum zu Steatohepatitis und/oder Fibrose führt (Day 2006; Dowman et al. 2010).

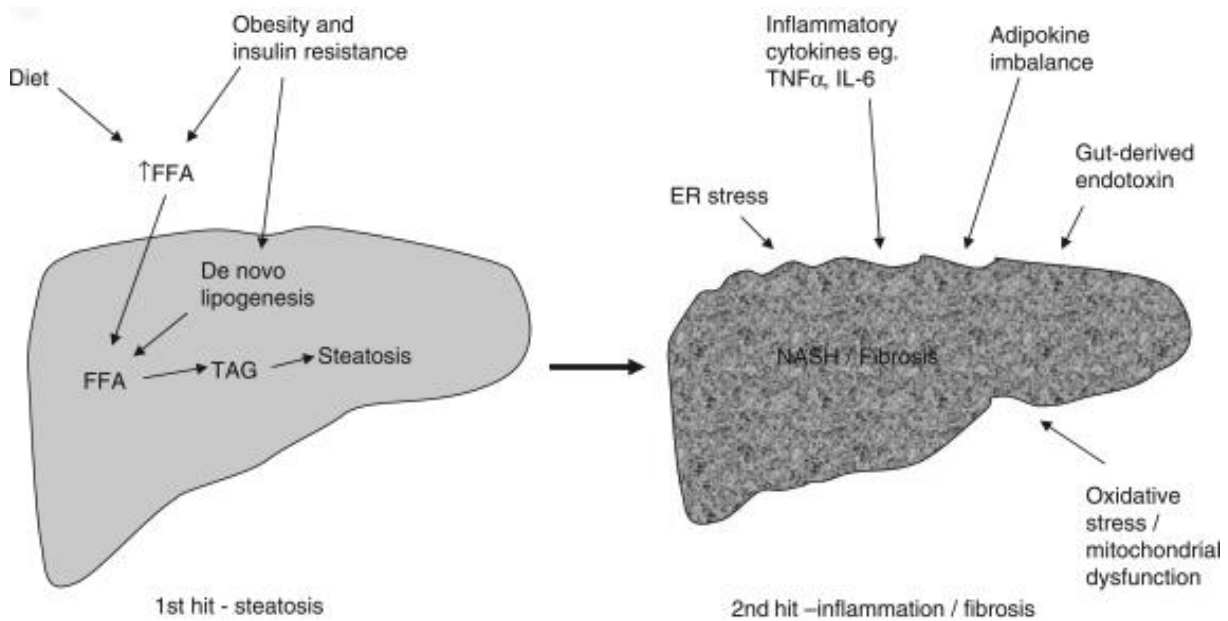


Abbildung 2: „Two-Hit“ Hypothese der Pathogenese von NASH: Der erste „Hit“ induziert die Fetteinlagerung in der Leber, und der zweite „Hit“ führt zum Fortschreiten der Steatose zur NASH (Dowman et al., 2010)

Es wird jedoch immer häufiger anerkannt, welche Rolle die freien Fettsäuren (FFA) bei der direkten Förderung von Leberschäden spielen, was zu einer Abwandlung dieser Theorie geführt hat (Abbildung 3). Bei Fettleibigkeit und Insulinresistenz gibt es einen erhöhten Zustrom von FFA zur Leber. Diese FFA durchlaufen entweder eine Beta-Oxidation oder werden mit Glycerin zu Triglyceriden verestert, was zur Einlagerung von hepatischem Fett führt. Mittlerweile deutet vieles darauf hin, dass FFA direkt, zum Beispiel durch Steigerung von oxidativem Stress und durch die Aktivierung von entzündlichen Signalwegen, Toxizität verursachen können (Feldstein et al. 2004). Deshalb ist die Einlagerung von hepatischem Triglycerid eventuell ein Schutzmechanismus, um den giftigen Auswirkungen FFA vorzubeugen (Yamaguchi et al. 2007).

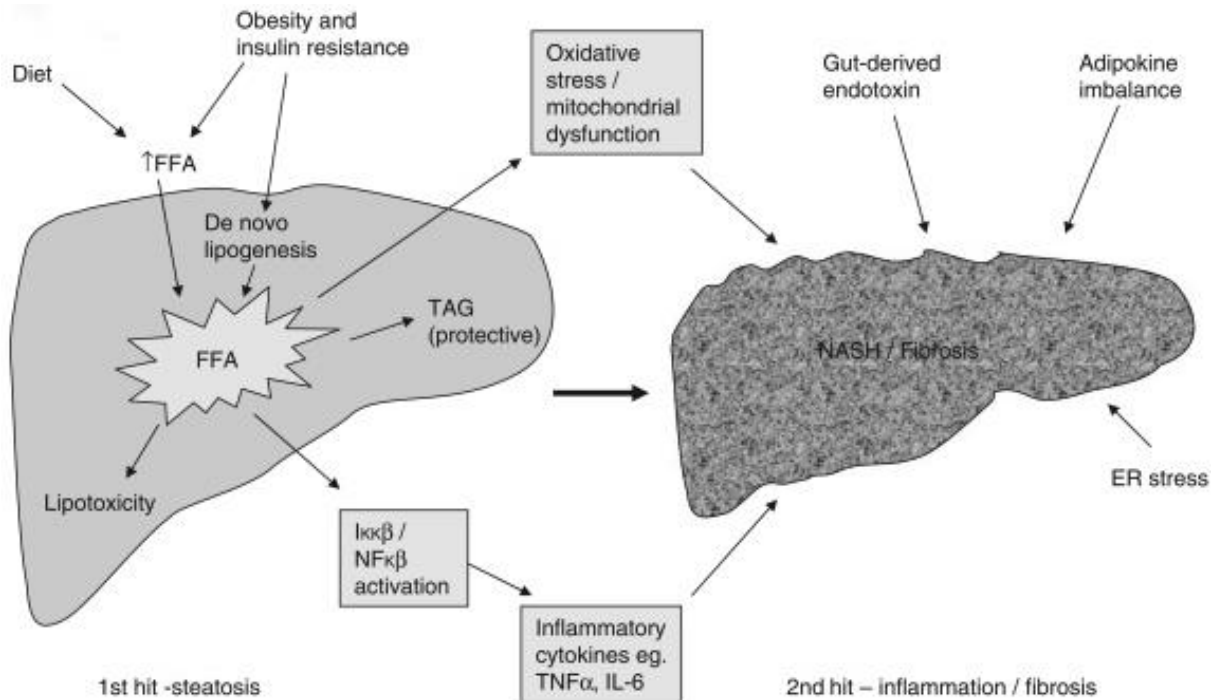


Abbildung 3: Modifizierte „zwei-Hit“ Hypothese: Es wird diskutiert, ob die isolierte Akkumulation von FFA alleine, ohne den „zweiten Hit“, für die Induktion einer Leberschädigung ausreichend ist. Jedoch kann eine Triglycerid-Akkumulation tatsächlich schützend gegen die FFA-induzierte Entzündung oder gegen den oxidativen Stress sein. (Dowman et al. 2010)

Zusätzlich wurde eine weitere Komponente bzw. ein dritter „Hit“ hinzugefügt, um das unzureichende Wachstum der Hepatozyten wiederzugeben (Abbildung 4) (Jou et al. 2008). In der gesunden Leber regt der Tod der hepatischen Zelle die Reproduktion reifer Hepatozyten an, welche die toten Zellen ersetzen und die Normalfunktion des Gewebes wiederherstellen (Jou et al. 2008). Oxidativer Stress, ein zentrales Merkmal der Pathogenese von NAFLD, hemmt jedoch die Reproduktion der reifen Hepatozyten, was zu einer Vergrößerung der Population der hepatischen Progenitorzelle (anders auch ovale Zelle genannt) führt (Roskams et al. 2003).

Normalerweise können sich diese Zellen sowohl in einen Cholangiozyten als auch in einen Hepatozyten differenzieren und stellen somit einen wichtigen Baustein der Leberreparatur dar. Eine Störung dieser Fähigkeit eine solch duale Differenzierung zu entwickeln, kann für die progressive Form der Leberschädigung verantwortlich sein.

Dies resultiert in alternativen Wegen der Leberregeneration, da diese HPCs (engl.: hepatic Progenitor cells) sich in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenzieren. Die Anzahl der ovalen und intermediären Hepatozyten-ähnlichen Zellen stehen in starker

Beziehung zum Stadium der Fibrose, was dafür spricht, dass ein kumulativer Verlust von reifen Hepatozyten sowohl die Akkumulation von Progenitorzellen und ihre Differenzierung in Hepatozyten fördert (Roskams et al. 2003). Die Aktivierung dieser Zellen spielt auch bei der hepatozellulären Karzinogenese eine Rolle (Roskams et al. 2003). Bei chronischer Leberschädigung ist die Entwicklung einer Fibrose bzw. Zirrhose abhängig von der Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten. Deshalb stellt der Zelltod mit beeinträchtigtem Wachstum der Leber-Vorläuferzelle den empfohlenen „dritten Hit“ in der NAFLD-Pathogenese dar (Jou et al. 2008).

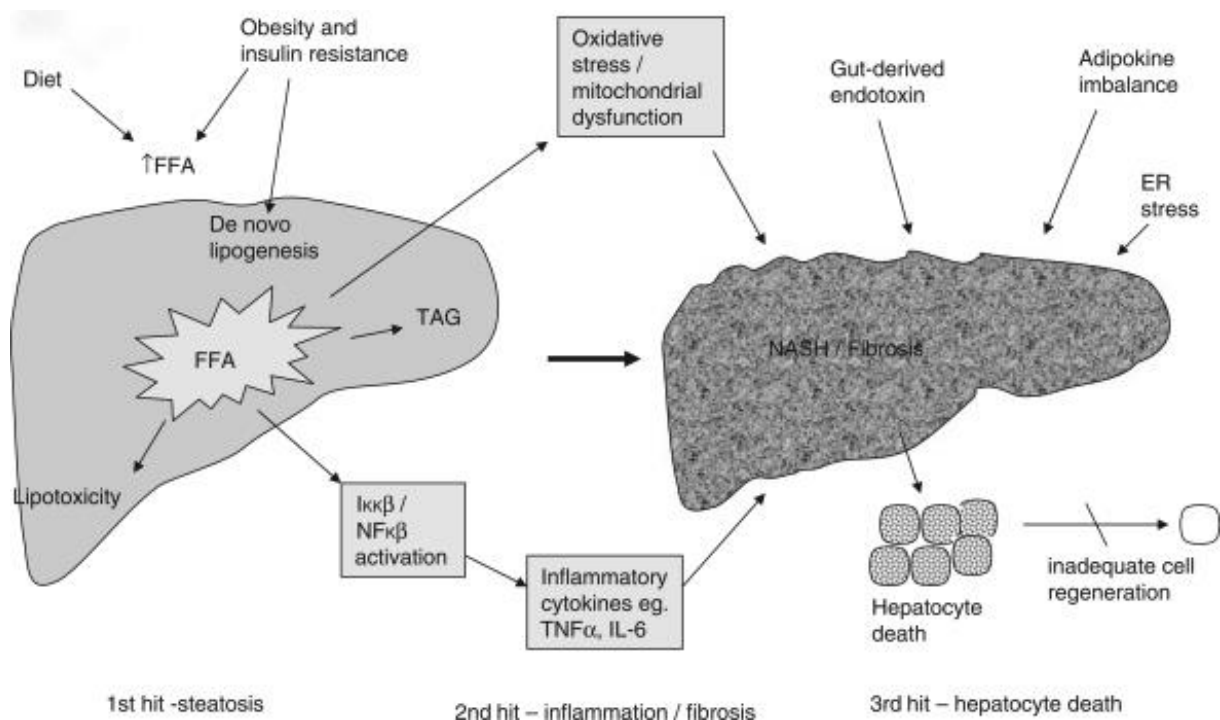


Abbildung 4: Die 3-Hit Hypothese: Der oxidative Stress reduziert die Fähigkeit der Proliferation von reifen Hepatozyten (Dowman et al. 2010).

Ein genaueres Verständnis des zu Grunde liegenden Metabolismus kann vielleicht weiteres Verständnis zur Pathogenese erbringen und pathophysiologisch basierte Behandlungen ermöglichen. Hierfür scheinen Metabolitenanalysen in besonderem Maße geeignet.

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Die Klinik der Fettlebererkrankung ist weitgehend unspezifisch. Es gibt keinerlei zuverlässige Frühsymptome. Die klinische Untersuchung eines Patienten mit einer Le-

berverfettung ist meistens komplett unauffällig. In seltenen Fällen kann es zu Hepatomegalie oder Beschwerden im rechten Oberbauch kommen.

Die laborchemischen Routineuntersuchungen können in manchen Fällen einen chronisch leicht erhöhten Spiegel der Leberaminotransferasen im Serum zeigen. Da sich die laborchemischen Leberwerte allerdings auch bei Patienten mit NAFLD oder sogar mit NASH im Normalbereich befinden können, sind sie unter Umständen nicht aussagekräftig genug, um als Screening-Tests zu dienen (Fracanzani et al. 2008).

Im Bereich der bildgebenden Verfahren ist die Ultraschaldiagnostik das Standardverfahren zum Nachweis einer Leberverfettung (Machado et al. 2013). Klassisches Zeichen der Fettleber bei der Sonographie ist vermehrte Echogenität des Leberparenchyms. Jedoch ist das Verfahren mit einer Sensitivität von 60% nicht als Screeningmethode geeignet (Lee et al. 2010).

Auch CT und MRT stellen aufgrund der hohen Strahlenbelastung der CT bzw. nur unzureichenden Verfügbarkeit der MRT keine sinnvolle Alternative dar. (Roeb et al. 2015).

Auch wenn mittlerweile nicht-invasive Tests, wie zum Beispiel die Elastographie, oder spezielle Leber-Scores eine Reduktion von Leberpunktionen ermöglichen können, stellt die Leberbiopsie weiterhin den Goldstandard zur Diagnose einer NAFLD dar (Roeb et al. 2015; Wong et al. 2010; Musso et al. 2011; Chalasani et al. 2012), da somit auch Differentialdiagnosen abgeklärt und gegebenenfalls ausgeschlossen werden können (Vuppalanchi und Chalasani 2009).

Zur histologischen Differenzierung und Aktivitätsbestimmung der NASH stehen Scoring-Systeme wie der NAFLD-Activity Score (NAS), der das Ausmaß der Steatose, der Entzündung sowie der Leberzellschwellung (Ballonisierung) beurteilt, zur Verfügung (Kleiner et al. 2005). Wegen der Risiken der Leberbiopsie, wie zum Beispiel Blutung oder Gallenwegsverletzung, sollte sie bei jenen ausgeführt werden, die von der Diagnostik, der therapeutischen Anleitung und der prognostischen Perspektive am meisten profitieren würden. Hierfür wurden mehrere Algorithmen für die nicht-invasive Diagnostik einer NASH und NASH-Fibrose publiziert (Musso et al. 2011; Roeb et al 2015) (Abbildung 5).

Es könnte argumentiert werden, dass es ein systematisches Screening für NAFLD geben sollte, zumindest unter Patienten mit höherem Risiko wie Diabetes und Adipositas. Gegenwärtig besteht jedoch keine ausreichende Wissensgrundlage hinsichtlich der Diagnose, Pathogenese und Behandlung der NAFLD. Also wird das NAFLD-Screening auch für Risikopatienten derzeit nicht empfohlen, da noch keine diagnostischen Algorithmen festgelegt werden können und die Behandlungsmöglichkeiten noch sehr beschränkt sind. Außerdem ist das langfristige Nutzen-Risiko-Verhältnis und die Kosteneffizienz des Screenings nicht ausreichend geklärt.

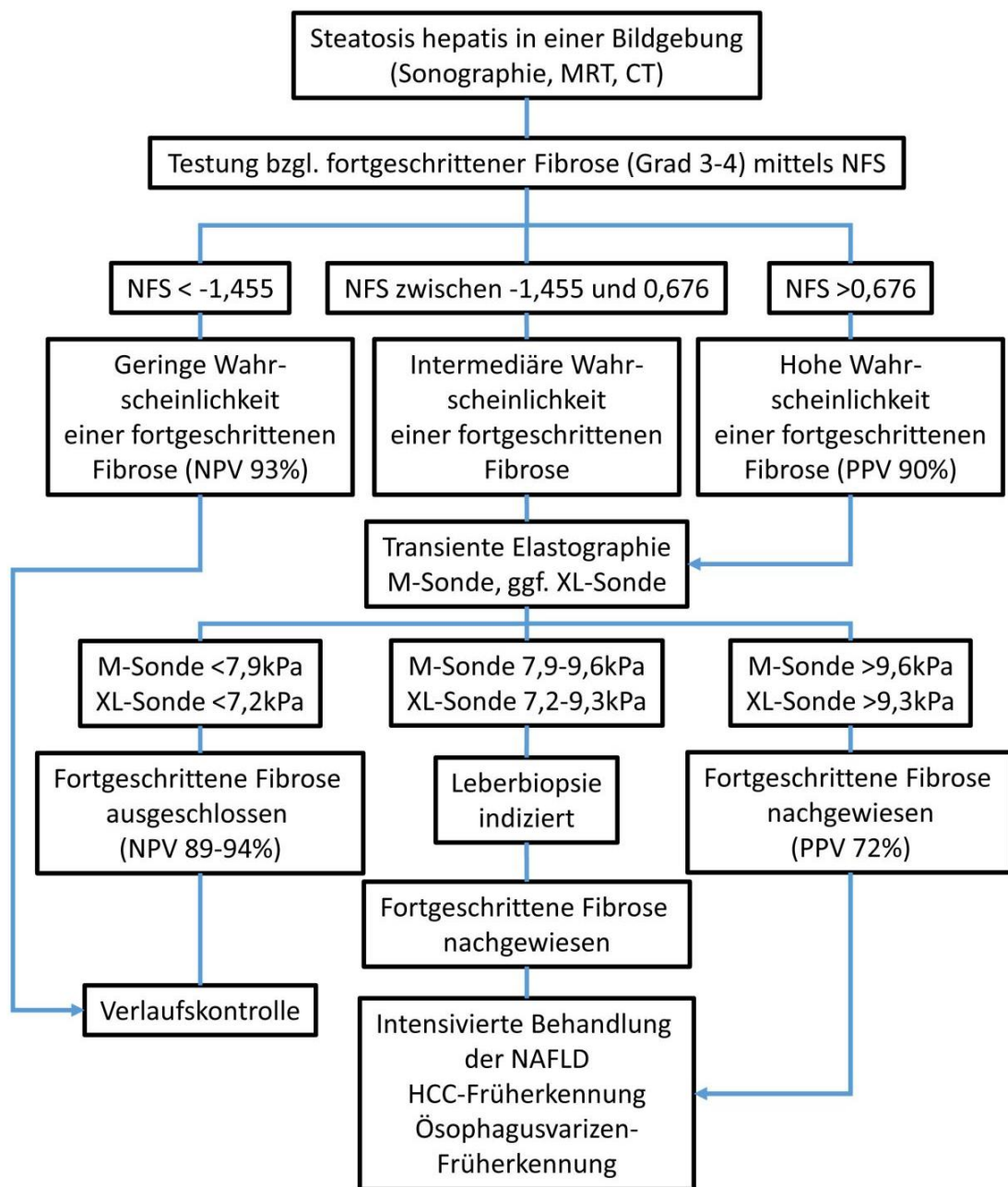


Abbildung 5: Die Indikation zur Leberbiopsie (Roeb et al. 2015 abgewandelt nach Castera et al. 2013).

1.1.5 Therapie

Da die NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms verstanden werden soll, besteht die Therapie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung nicht nur aus der Heilung der eigentlichen Lebererkrankung, sondern auch aus der damit einhergehenden metabolischen Erkrankungen wie Fettleibigkeit, Hyperlipidämie, Insulinresistenz und T2DM. Da NAFLD-Patienten ohne Steatohepatitis eine hervorragende Prognose haben, sollte die Therapie nur die NASH und auf die Progression der Lebererkrankungen zu NASH und/oder HCC abzielen (Chalasani et al. 2012).

Da bislang keine für die Indikation NAFLD zugelassene Medikamente verfügbar sind, bleibt Lebensstilmodifikationen derzeit die einzige therapeutische Option bei diesen Patienten. Viele Studien zeigen, dass die Intervention bei Ernährung und Lebensstil die Aminotransferasen reduzieren und die hepatische Steatose verbessern kann (Sreenivasa Baba et al. 2006; Suzuki et al. 2005 b; Kirk et al. 2009; Lazo et al. 2010). Gewichtsverlust reduziert gewöhnlich die hepatische Steatose, der sich entweder durch eine kalorienreduzierte Ernährung oder in Kombination mit mehr körperlicher Aktivität erreichen lässt. Der Verlust von mindestens 3% bis 5% des Körpergewichts erscheint notwendig, um die Steatose zu verbessern, doch es erfordert eventuell einen höheren Gewichtsverlust (bis zu 10%), um den nekroinflammatorischen Zustand zu verbessern (Vilar-Gomez et al. 2015). Allerdings wird eine solche Gewichtsabnahme nur von wenigen Patienten erreicht. Deshalb sind weitere Therapieoptionen für Patienten mit einem progressiven Krankheitsverlauf dringend erforderlich.

Bei Erwachsenen NAFLD-Patienten kann Sport allein die hepatische Steatose reduzieren, aber die Fähigkeit zur Verbesserung anderer Aspekte der Leberhistologie bleibt unbekannt (Chalasani et al. 2012).

Erfolgreiche Lebensstilmodifikationen stellen für NAFLD-Patienten den wichtigsten Therapieschritt dar und werden von allen Fachgesellschaften und internationalen Leitlinien als Mittel der ersten Wahl empfohlen (Roeb et al. 2015).

Ein langfristig wirksames Medikament, das den Fibroseverlauf günstig beeinflussen würde, gibt es jedoch bisher nicht (Weiß et al. 2014).

Dennoch gibt es mehrere Studien, die die Auswirkung von verschiedenen Medikamenten, wie zum Beispiel Metformin, Pioglitazon und Rosiglitazon, auf Aminotransferasen und Leberhistologie bei Erwachsenen mit NASH untersucht haben. In Zusammenschau aller Studien berichtet Chalasani et al. (2012), dass Metformin keine maßgebliche Wirkung auf die Leberhistologie hat und deswegen nicht als spezifische Behandlung für Lebererkrankungen bei Erwachsenen mit NASH empfohlen wird. Pioglitazon hingegen kann zur Behandlung von Steatohepatitis bei Patienten mit durch Biopsie nachgewiesener NASH eingesetzt werden (Belfort et al. 2006; Sanyal et al. 2010). Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Mehrheit der Patienten, die an klinischen Studien zur Erforschung von Pioglitazon für NASH teilgenommen haben, keine Diabetiker waren und dass die langfristige Sicherheit und Wirkung von Pioglitazon bei NASH-Patienten nicht bestätigt ist (Chalasani et al. 2012).

Oxidativer Stress gilt bei NASH als Schlüsselmechanismus für hepatozelluläre Schädigung und Fortschreiten der Krankheit. Deswegen wurde das Antioxidans Vitamin E zur Behandlung von NASH erforscht, wobei gezeigt werden konnte, dass eine Senkung des Aminotransferasespiegels und eine histologische Verbesserung erzielt werden konnte, ohne jedoch die Fibroseraten zu senken. Somit könnte es als primäre Arzneimitteltherapie für diese Patientengruppe in Betracht gezogen werden (Chalasani et al. 2012). In einer Cochrane Hepatobiliary Group Metaanalyse zur Antioxidantien-Supplementierung bei Lebererkrankungen, die 15 Studien zu Vitamin E beinhaltete, fand sich jedoch kein signifikanter Behandlungseffekt von Antioxidantien auf die Gesamtmortalität oder die Leberbezogene Mortalität (Miller et al. 2005).

Auch wenn es weitere zielgerichtete Therapieansätze gibt, die anscheinend Teilaspekte der Erkrankung verbessern könnten, kann zum jetzigen Zeitpunkt keine medikamentöse Therapie für die NAFLD empfohlen werden (Neuschwander-Tetri et al. 2015, Ratziu et al. 2016; Armstrong et al. 2016; Chalasani et al. 2012).

Wie oben erwähnt, stellt Adipositas einen der wichtigsten Risikofaktoren für eine NAFLD dar. Durch den drastischen Gewichtsverlust nach bariatrischer Chirurgie, könnte diese ebenfalls eine potentielle Behandlungsoption einer NAFLD darstellen. Zwei Meta-Analysen (Chavez-Tapia et al. 2010; Mummadi et al. 2008) evaluieren die Wirkung der bariatrischen Chirurgie auf die Leberhistologie bei NAFLD-Patienten. Die Meta-Analyse von Mummadi et al. (2008) zeigt, dass sich Steatose, Steatohepa-

titis und Fibrose nach dem bariatrischen chirurgischen Eingriff verbessern oder sogar komplett rückläufig sind. Die aktuellste Cochrane-Übersicht (Chavez-Tapia et al. 2010) kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass der Mangel an stichprobenartigen klinischen Studien oder quasi-stichprobenartigen klinischen Studien eine abschließende Beurteilung von Nutzen und Risiken der bariatrischen Chirurgie als therapeutischen Ansatz für NASH-Patienten verhindert. Bariatrische Chirurgie hat keine Kontraindikation bei fettleibigen Patienten ohne bestätigte Zirrhose mit NAFLD oder NASH, die ansonsten in Frage kommen könnten. Die Art der Operation sowie des Nutzen-Risiko-Verhältnis der bariatrischen Chirurgie bei ansonsten in Frage kommenden Adipositaspatienten mit Zirrhose durch NAFLD ist noch nicht erforscht. Es ist noch zu früh, die bariatrische Chirurgie als bestätigte Option zur spezifischen Behandlung von NASH in Betracht zu ziehen (Chalasanani et al. 2012). Jedoch sollte bei Versagen der gewichtsreduzierenden Diäten und/oder der Lebensstilmodifikation bei schwerer Adipositas eine bariatrische Operation in Erwägung gezogen werden (Roeb et al. 2015).

Als Therapiemöglichkeit der NASH-assoziierten Leberzirrhose ist auch die Lebertransplantation (LTX) zu erwähnen. Mittlerweile ist die NASH-assoziierte Leberzirrhose die dritthäufigste Indikation zur LTX (Roeb et al. 2015).

Wie in den therapeutischen Möglichkeiten ersichtlich ist, stellen nahezu alle Ansätze eine Korrektur des gestörten Metabolismus dar, ohne jedoch pathophysiologisch endgültig erklärbar zu sein. Metabolitenanalysen könnten diese Erklärung liefern.

1.2 Metabolom und die Metabolomik (Metabolomics)

1.2.1 Terminologie

Metaboliten sind typische Biomoleküle mit niedrigem molekularem Gewicht (< 1,500 Da). Die gesamte Zusammensetzung dieser Chemikalien aus kleinen Molekülen in einer biologischen Probe/einem biologischen System wird Metabolom genannt (Kim et al. 2016). Der Begriff „Metabolom“ wurde zum ersten Mal im Jahr 1998 verwendet und wahrscheinlich so geprägt, um ihn an gegenwärtige biologische Begriffe anzupassen, die auf den gesamten Satz der Gene (Genom), den gesamten Satz der Proteine (Proteinom) und den gesamten Satz der Transkripte (Transkriptom) verweisen.

Das Suffix „-omik“ bezeichnet einen Typ eines spezifischen Studiums, das gesammelte Information über ein biologisches System erteilt. Jede Technik von „-omik“ ist wesentlich, um verschiedene biologische Systeme zu verstehen und ergänzt die mittels anderer Methoden erteilte Information (Kim et al. 2016).

Die Metabolomik ist eine nicht-einseitige Identifizierung und Charakterisierung „aller“ Verbindungen aus kleinen Molekülen (Metaboliten) in einem biologischen System mittels Verwendung hochempfindlicher, analytischer Techniken in Interaktion mit Bioinformatik (Dunn et al. 2005 a).

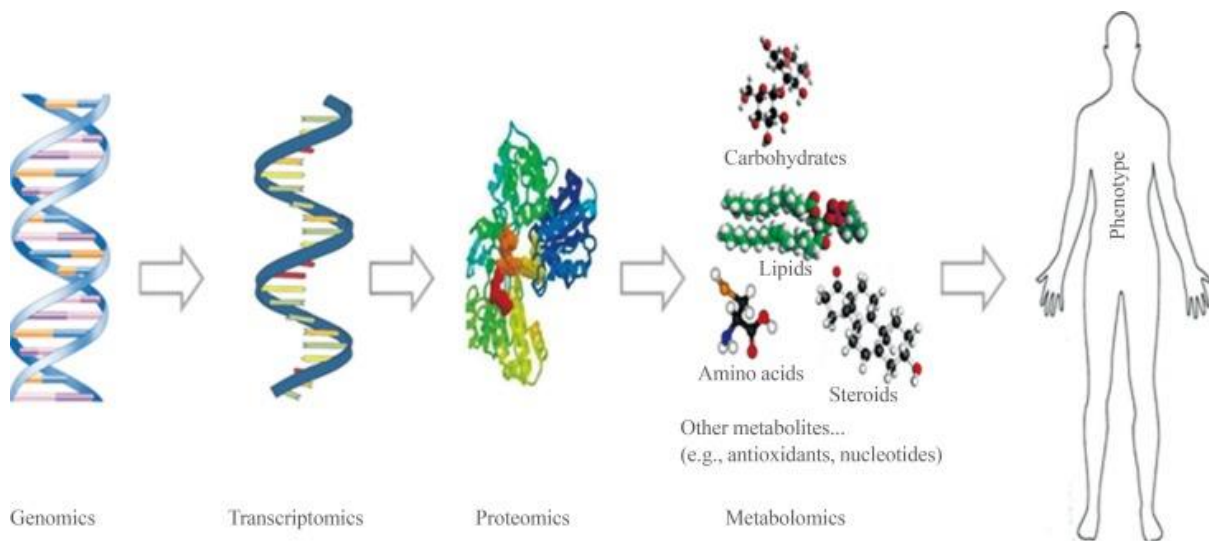


Abbildung 6: Übliche Studien von -omik in der Biologie (Kim et al. 2016).

Aus der Entschlüsselung des Genoms, der Genomic, sind weitere hypothesenfreie Untersuchungen entstanden, die die verschiedenen Schritte vom Genom bis hin zum Phänotyp darstellen. Abbildung 6 zeigt, dass die Metabolomik den letzten Schritt aller „-omiken“ vor dem Phänotyp darstellt. Damit scheint sie die direkte Wechselwirkung zum zu untersuchenden Phänotypen erklären zu können.

1.2.2 Untersuchungsmethoden

Die Metabolomik hat sich zusammen mit innovativer, analytischer Instrumentation entwickelt. Verschiedene analytische Techniken, einschließlich Massenspektrometrie (MS), Kernresonanz (NMR), Fourier infraroter Transformationsspektroskopie (FT-IR) und Raman Spektroskopie (Abbildung 7), wurden zur Analyse der Metaboliten angewandt (Boskey und Mendelsohn 2005; Brown et al. 2005; Deleris und Petibois 2003;

Defernez und Colquhoun 2003; Dunn und Ellis 2005; Villas-Bôas et al. 2005; Want et al. 2005). Die Sensitivität und Selektivität von FT-IR Spektroskopie und Raman Spektroskopie sind im Vergleich deutlich niedriger. Die am meisten angewandten analytischen Methoden zur Metabolomdatenerfassung schließen die Verwendung verschiedener chromatographischer Techniken ein, das sind am häufigsten Gaschromatographie (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (engl.: liquid chromatography (LC)) zusammen mit vielen unterschiedlichen Varianten der Detektoren von Massenspektrometrie (MS) und NMR. (Kim et al. 2016)

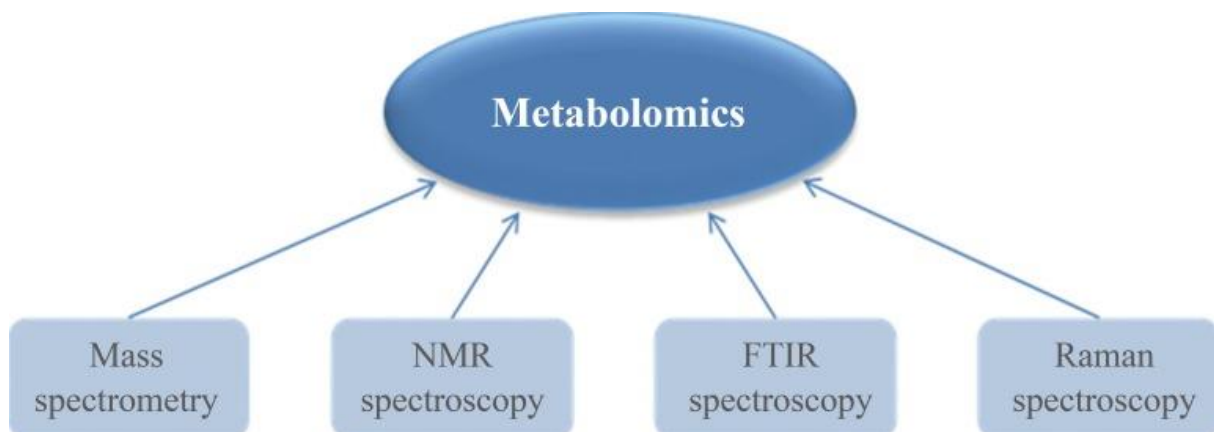


Abbildung 7: Instrumentation für Metabolomik-NMR, Kernresonanz; FTIR, Fourier infrarote Transformation (Kim et al. 2016).

Wegen ihres breiten dynamischen Bereichs und guter Sensitivität ist die MS die günstigste Technologie für Metabolomik. Außerdem ist die MS fähig, vielfältige molekulare Arten im Vergleich mit anderen Strategien zu finden. Kürzlich etablierte sich die MS-basierte Metabolomik als die populärste Strategie (Kim et al. 2016). Die Massenspektrometrie ist eine analytische, sehr empfindliche Methode, die nur eine sehr kleine Probe (<1 ng des Materials oder <10 µL der Bioflüssigkeit) braucht und Signale für 1000s der Metaboliten aus einer Probe generieren kann. Zur eindeutigen Identifizierung der Moleküle wird die Massenspektrometrie immer in Kombination mit einem chromatographischen Verfahren zur Auftrennung der Moleküle verwendet.

Um metabolische Plattformen zu errichten, werden Trennungsmodule oft an das MS-System angeschlossen. Flüssigkeitschromatographie/MS (LC-MS) und Gaschromatographie/MS (GC-MS) haben einige Vorteile im Vergleich zur alleinigen MS.

LC-MS eignet sich besonders gut zur Entdeckung hydrophober Moleküle (Lipide, Fettsäuren) und Peptide. GC-MS ist das beste Mittel, um kleine Moleküle (< 500 Da) und hochvolatile Verbindungen (Ester, Amine, Ketone, Alkane, Thiole) aufzuspüren.

Ohne vorherige Auftrennung oder Derivatisierung der Probenextrakte ist LC-MS ein Verfahren mit dem Potential, die höchste Vielzahl der Metaboliten in einer bestimmten Probe zu entdecken.

Ohne vorherige Derivatisierung scheint LC-MS die meisten verschiedenen Metaboliten identifizieren zu können. Jedoch kann GC-MS nach vorheriger Derivatisierung eine mindestens gleich gute Auflösung erzielen und ist weniger kostenintensiv.

Außerdem werden für die GC-MS Analyse kleinere Probenmengen als für LC-MS und NMR benötigt.

1.3 Tierversuche, HFD-Mausmodell

1.3.1 Tiermodelle

Während die Metabolomstudien eine hypothesefreie Zielsetzung der Grundforschung erlauben, sind für weitere Experimente, sowie die Überprüfung der Ergebnisse Tierversuche nötig. In der biomedizinischen Forschung spricht man von Tiermodellen. Diese werden nach ihrer Entstehungsweise unterschieden. Es gibt spontane Modelle: dabei handelt es sich um Zuchtlinien, bei denen es spontan zur Ausbildung bestimmter Erkrankungen kommt. Man spricht hier auch von "Inzuchtlinien", die durch wiederholte Bruder-Schwester-Paarungen erzeugt werden, um möglichst viele homozygote Chromosomenpaare zu besitzen. Des Weiteren wird mit experimentellen Modellen gearbeitet, bei denen durch bestimmte Versuchsbedingungen Erkrankungen verursacht werden, wie zum Beispiel diätetische Interventionsmodelle (Joppien et al. 2011).

1.3.2 Mausmodelle von high-fat-Diet-induzierten NAFLD/NASH

Tiermodelle von NAFLD/NASH erteilen wichtige Information nicht nur zur Erklärung der Pathogenese von NAFLD/NASH, sondern auch zur Untersuchung der therapeutischen Effekte verschiedener Wirkstoffe. Diese Tiermodelle sollen die Histopatholo-

gie und Pathophysiologie von NAFLD/NASH beim Menschen richtig widerspiegeln (Nakamura und Terauchi 2013).

Tiermodelle von NAFLD/NASH werden in genetisch gebaute Modelle und Nährmodelle eingestuft (Nakamura und Terauchi 2013). Unter Rücksichtnahme auf die polygenische Natur des metabolischen Syndroms beim Menschen und seine Bestandteile scheint es, dass Studien, die monogenische (zum Beispiel *ob/ob* Mäuse oder Zucker-(*fa/fa*) fette Ratten) oder pharmakologisch-induzierte (zum Beispiel Gold-Thioglukose-Mausmodelle) Verfettungsmodelle untersuchen, vorsichtig interpretiert werden sollen. Es ist schwer, vollumfänglich auf die Frage zu antworten, ob die erworbenen Ergebnisse aus dem verfetteten Phänotyp oder aus dem genetischen/pharmakologischen Hintergrund des Modells stammen (Buettner et al. 2007).

Aus diesem Grund verwenden Wissenschaftler fettangereicherte, sogenannte hochfettige (HF) Diäten, um verfettete Nagetiermodelle zu generieren, die dem metabolischen Syndrom beim Menschen ähnlich sind, um hepatische Steatose und NASH in Versuchstieren auszulösen (Buettner et al. 2007).

Aufgrund dieser Erfahrung wird es normalerweise akzeptiert, dass HF-Diäten verwendet werden, um ein gültiges Nagetiermodell zum metabolischen Syndrom mit Insulinresistenz und damit verbundene Organveränderungen zu generieren (Ahrén et al. 1999; Lingohr et al. 2002; Oakes et al. 1997) .

1.4 Fragestellung

Da die Ursachenforschung der, wie oben erwähnt, sehr relevanten Erkrankung noch unzureichend erklärbar ist, und eventuell noch medikamentöse Therapien entwickelt werden könnten, soll die vorliegende Arbeit weitere Erklärungsansätze liefern. Hierfür scheinen Metabolomanalysen in besonderem Maße geeignet eine komplexe Stoffwechselerkrankung besser verstehen zu können. Zuerst sollten Metaboliten identifiziert werden, welche gegebenenfalls einen protektiven oder schädlichen Einfluss auf die Erkrankung haben könnten. Solche Zusammenhänge sollen in einem zweiten Schritt, in einem Tiermodell überprüft werden. So identifizierte Metaboliten könnten ein potentiell therapeutisches Target darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte und Gewebeproben

Bei mehreren Patienten, bei denen von chirurgischer Seite die Indikation bestand eine Leberresektion durchzuführen, wurde nach ausführlicher Aufklärung und abgegebener schriftlicher Einverständniserklärung eine Leberprobe entnommen. Diese wurde unter anderem für wissenschaftliche Zwecke auch im Rahmen eines größeren Biobankprojektes verwendet.

Initial handelte es sich um onkologische Operationen mit geplanter Leberresektion, Operationen mit histologischer Abklärung eines unklaren Leberdefektes oder Leberresektionen im Rahmen bariatrischer Operationen zur Einschätzung der Leberverfettung. In jedem Fall wurde eine scharfe Resektion mit anschließender Blutstillung durchgeführt. Somit konnten etwa 50 mg Lebergewebe gewonnen werden. Es wurde jedes Mal zusätzliches Gewebe zur histopathologischen Begutachtung durch einen Referenzpathologen eingeschickt und nach dem aktuellen Standard mit dem NASH-activity score (NAS) nach Kleiner (Kleiner et al. 2005) bewertet. Das Gewebe wurde je in ca. 10 mg Stückchen verteilt und aliquotiert. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff noch im Operationssaal vereist und somit die Zeit *ex-vivo* von weniger als 40 Sekunden in allen Fällen gesichert. Bei anderen Patienten, bei denen wegen unklarer Leberverfettung die Indikation zur perkutanen Leberbiopsie bestand, wurde eine extra Stanze sonographisch gesteuert entnommen.

Diese entnommenen Proben wurden auch nach möglicher NASH histopathologisch untersucht und bewertet. Das zusätzliche Gewebe, das nicht zur histologischen Analyse verwendet wurde, wurde in flüssigem Stickstoff für die Analysen der Metaboliten schockgefroren. Als erste Untersuchungskohorte wurde eine Gruppe von Proben ausgewählt, die bei Patienten ohne relevante Nebenerkrankungen (Z.n. Chemotherapie, M. Wilson, metastasiertes Malignomleiden) gewonnen wurde. Für diese Gruppe konnten 33 Proben identifiziert werden, die eine nach Alter und Geschlecht gematchte Analyse von Patienten mit $NAS < 2$ und $NAS > 2$ ermöglichten. Zur Replikation der Ergebnisse der ersten Messungen wurde eine zweite Kohorte aus 66 Patienten (Replikationskohorte) mit den gleichen Kriterien erstellt.

Das Studienprotokoll wurde von der institutionellen Prüfungsverwaltung vor Beginn der hier beschriebenen Studie bestätigt („Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Kiel“, Az: D 425/07 and A 111/99). Die Patienten wurden in eine Screeninggruppe und in eine Replikationsgruppe unterteilt.

2.2 Ernährungsfragebogen

Um die orale Zufuhr der gemessenen Metaboliten (siehe Ergebnisse) zu erheben wurde ein am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE) für NASH-Studien entwickelter standardisierter Ernährungsfragebogen (FFQ+) benutzt (siehe Anhang 1). Dieser standardisierter Fragebogen dokumentiert die Verzehrhäufigkeit bestimmter Lebensmittel und Aufnahme definierter Nährstoffe. Somit können Faktoren identifiziert werden, die wesentlich zum Auftreten bestimmter Erkrankungen wie beispielsweise NASH beitragen. Auf dieser Grundlage können Hinweise für eine sinnvolle Prävention gegeben werden. Der Fragebogen wurde allen Patienten aus beiden Gruppen - der Entdeckungs- und Replikationsgruppen - verteilt, die sich in einer zweiten Kontaktaufnahme zur Teilnahme bereit erklärten.

2.3 Vorbereitung der Metaboliten

Zur Vorbereitung der Proben wurden fünf Milligramm des vereisten Gewebes mit 3 mm Edelstahlkugeln unter Stickstoffkühlung (MM301 Mixer Mill, Retsch®, Haan, Germany) innerhalb von 3 Minuten in feines Pulver zerkleinert. Für Leerproben wurde die Zerkleinerung und die genannten Schritte identisch parallel durchgeführt. Das zerkleinerte Pulver wurde durch Hinzufügen von 200 µl Methanol (Merck, Darmstadt, Germany) bei -20°C suspendiert und in Reagenzgläser übertragen, wo sie bis zu 10 Minuten auf einem bis -20°C mit Trockeneis gekühlten Block unter kontinuierlichem leichtem Schütteln kühl gehalten wurden. Um die Gaschromatographie durchzuführen, wurde der suspendierte Inhalt des Fläschchens dann in ein konisches 1,1 ml GC-Fläschchen mit einer Verschlusskappe (1.1-STVG, 8-ST15, Thermo Fisher Inc., Waltham, MA, USA) übertragen und die Lösung sofort um 40 µl 25 % TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid- dient als Methylierungsreagenz und zählt daher zu den Alkylantien) in Methanol (Jenachem™, Jena, Germany), als einen denaturierenden Wirkstoff ergänzt. Danach wurde das Fläschchen 15 Minuten in einem

Inkubator mit 100°C aufbewahrt (Butte 1983). Um den Druck auf die Glasfläschchen und die Verdampfung zu vermindern, wurde jedes Fläschchen in einem 50 ml Plastikreagenzglas (Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) mit 100 µl Methanol als ein äußerliches Fläschchen geheizt. Nach der Ableitung wurden 80 µl des klaren Überstand in neue GC-Fläschchen übertragen. Dann wurden die GC-Fläschchen geöffnet und die ganze Flüssigkeit konnte in der Raumtemperatur verdampfen. Als Kontrollprobe mit allen zu messenden Metaboliten wurden 50 µl aus dem Fläschchen jedes Patienten zusammengesammelt je 80 µl in neue GC-Fläschchen aliquotiert.

2.4 Analytische Methode

Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse der Proben die Voelcent-CIMS Methode unter Verwendung der inneren, chemischen Ionisation (CI) mit Wasser als Reagenzgas angewandt (Landrock und Richter 2011). Sie vereinigt die Mikroextraktion volatiler, organischer Verbindungen (VOC) in der soliden Phase (SPME auf DVB/Car/PDMS, 57329-U-Fiber, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) und die Technik voller Verdampfung (Markelov und Guzowski 1993) mit der Gaschromatographie-Trennung (GC) auf einer Polarsäule (Rtx Wax, 15 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm Filmdichte, Restek, Bad Homburg, Germany) und Ion Trap MS Entdeckung (Varian GC 431 und Ion Abscheider 220 und MS Workstation V 6.9.3, Varian, Darmstadt, Germany). Es wurden geöffnete 1,1 ml Probenfläschchen, mit den wie oben beschrieben vorbereiteten Proben, in 40 ml EPA-Fläschchen mit Verschlusskappen und einer Scheidewand (Restek) eingesetzt, mit Kappen bedeckt und mindestens eine Stunde bei 100°C geheizt. Die Analyten wurden für 18 Minuten auf einer SPME-Faser gesammelt und dann für 1 Minute bei 260°C in eine 40°C warme GC-Säule, die mit 15°C pro Minute auf 240°C erwärmt wurde verbracht. Als Katalysatorgas wurde Helium mit einem konstanten Druck von 8 psi verwendet Ein GC-Zyklus dauerte demnach 20 Minuten. Für alle Proben wurden zwei aufeinanderfolgende SPME aus demselben GC-Fläschchen ausgeführt. Die Messungen der Partien wurden automatisch in einem Zeitfenster von 8-20 Stunden ausgeführt. Jede von ihnen enthielt drei bis zwölf Proben der Patienten, zwei bis vier leere Kontrollfläschchen und zwei bis vier gemischte Proben, zum Zweck der Standardisierung.

2.5 Behandlung der Angaben

Die erworbenen Angaben der Massenspektrometrie (MS) (Scanintervall 33-400 m/z) wurden mittels MS Workstation Software (Varian V6.9.3) bearbeitet. Der Verhaltensindex und die Massenspektren der Analyten wurden mit der innerlichen Datenbasis von 1800 bekannten Verbindungen verglichen. Die Spitzenfläche jeder Verbindung wurde mittels der spezifischen Massen berechnet und ist in "Counts" oder „Zahlen“ angegeben. Zuerst wurden die Spitzenflächen aller Metaboliten auf der ganzen Mittelspitzenfläche aller Proben in jeder Serie dieser Analyse (Screening und Replikation) normalisiert. Als nächstes wurden zwei Probenextraktionen unter Bewahrung des Durchschnitts zweier Spitzenflächen jedes Metaboliten verschmolzen. Als dritter Schritt wurde das Verhältnis der Mittelfläche jedes Metaboliten in den gemischten Standards (analytischer Verweis) in der Messungspartie im Vergleich mit dem gesamten Durchschnitt berechnet und die Zahlen der Metaboliten der Proben der Patienten wurden entsprechend angepasst.

Somit konnte eine eindeutige Zuordnung des gemessenen Metaboliten zur bestehenden Datenbank erfolgen und Verwechslungen aufgrund einer möglichen Messvariabilität reduziert werden.

Um eine Quantifizierung der signifikant erhöhten Metaboliten zu ermöglichen, wurden Referenzproben mit bekannter Inhaltsmenge erstellt. Somit konnten bei konstantem Verhältnis von Spitzenfläche der Analyten und der Menge im Fläschchen Aussage zur Menge in der Messprobe gewonnen werden.

2.6 NAFLD Mausmodel

Die Tierexperimente wurden mit 8-12 Wochen alten, erwachsenen, wildtypischen C57/BL6-Mäusen durchgeführt, die von Harlan Animal Research Laboratories (Boxmeer, Niederlande) erhalten wurden. Insgesamt 5 Tiergruppen (Kontrollgruppe, High-fat-Diet-Gruppe (markiert als HFD), High-fat-Diet mit Nikotinsäure (hier markiert als NA), High-fat-Diet mit Hydroquion (hier markiert als HQ) und High-fat-Diet mit tert-Butylhydroquinone (hier markiert als tBHQ) wurden in den Universitätstieranlagen mit einem Licht/Dunkelheitszyklus von 12 Stunden bei 22°C untergebracht. Über einen Zeitraum von 6 Wochen erhielt die erste Gruppen mit insgesamt 5 Tieren normales

Futter (NC: Fett: 4.5%, Protein: 18.5%, Fasern: 4.5%, N=5) und die zweite Gruppe mit insgesamt 10 Tieren fettreiche Diät (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) (HFD: 16.6% Fett [50% Schmalz 50% Kakaobutter], Protein 15.7%, Fasern 4.5%, N=10). Drei zusätzliche Tiergruppen (N=10) bekamen über 6 Wochen HFD mit Nikotinsäure (0.6%, HFD/NA), Hydrochinon (1%, HFD/HQ) oder tert-Butylhydroquinon (1%, HFD/tBHQ). Da die antioxidativen Eigenschaften von Hydrochinon (HQ) ein vielversprechendes pathophysiologisches Modell darstellen, wurde *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ) als ein zusätzlicher Wirkstoff in einem Tiermodell verwendet, um diese Linie der pathophysiologischen Intervention gründlich zu bewerten.

Nach der Fütterungsperiode wurden die Tiere unter allgemeiner Anästhesie geopfert (Ketamin [80 mg/kg] und Xylazin [10 mg/kg]). Von der unteren vena cava wurden Blutproben genommen und Lebergewebe wurde gesammelt. Ein Tier aus der HFD-Gruppe, zwei Tiere aus der HQ-Gruppe und ein Tier aus der tBHQ-Gruppe starben während der Fütterungsperiode. Zwei Mäuse aus der NA-Gruppe zeigten während der Anästhesie Symptome einer systematischen Infektion und wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Alle Prozeduren wurden nach der nationalen Gesundheitsverordnung zur Pflege und Verwendung der Versuchstiere der Schweiz ausgeführt. Das Experimentprotokoll wurde vom Komitee für Tierpflege des Kantons Bern in der Schweiz, vor Beginn dieser Arbeit bestätigt. Murine Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) wurden in der Abteilung für klinische Chemie der Universität Bern bei der Verwendung der Geräte von Boehringer AG, Mannheim, Deutschland mittels des BM/Hitachi 717 automatischen Analysators gemessen.

2.7 Leberhistologie

Humane Leberproben wurden für die reguläre Färbung mit Hematoxylin und Eosin (HE-Färbung) in 5 µm Schnitten in Formalin fixiert (4%) und in Paraffin eingelagert. Die murinen Proben wurden für eine Oil Red O (ORO) Färbung und RNS-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Der Grad der Steatose in den Leberproben der Mäuse wurde mittels der ORO-Färbung und der semi-quantitativen Analyse bewertet. 6 µm vereiste Schnitte wurden in 4% Formalin für 30 Minuten fixiert, mit 60% Isopropanol gespült, mit frisch-vorbereiteter ORO-Lösung für 15 Minuten gefärbt

(Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), abermals mit 60% Isopropanol gespült mit HE-Färbung gegengefärbt und befestigt. Die histologische Bewertung der Leberproben wurde von zwei unabhängigen Untersuchern blind auf einer Skala von 0 bis 5 in 0,5-Schritten ausgeführt (0 – keine Steatose; 5 – der Fettinhalt in der Leber überschreitet 85%).

2.8 Statistik

Während der Bearbeitung der Angaben und statistischen Analysen wurde R verwendet (www.r-project.org) (R Development Core Team, 2010). Für statistische Analysen der Verbindungen nach der Normalisierung wurde ein dekadischer Logarithmus (\log_{10}) der Zahlen der Metaboliten verwendet. Die gepaarte lineare Korrelationsanalyse von NAS und Metabolitenniveau nach Spearman wurde mittels der `cor.test()` Prozedur von R durchgeführt. Vergleich des Metabolitenniveaus und der Mausleberphänotypen wurden mithilfe der `wilcoxon.test()` Funktion in R errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Metabolomische Signatur der nichtalkoholischen Leberkrankheit im Lebergewebe

Es wurde eine globale zweistufige Analyse von Kleinstmolekülen aus humanem Lebergewebe im Sinne eines Screeningexperiments durchgeführt (Abbildung 8). Insgesamt konnten in der Screeninggruppe (englisch discovery set) von 33 humanen Leberproben 1.253 Metaboliten mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) identifiziert werden. Nach der Qualitätsfiltration wurden 252 Metaboliten in dieser Screeninggruppe als aussagekräftig herausgefiltert. Diese Screeninggruppe waren Patienten, die die gesamte Bandbreite von Leberhistologie, von normalem Lebergewebe bis hin zur nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) aufwiesen. Die Patienten wurden anhand des NAS (NASH Activity score) in Individuen mit normaler Leberhistologie ($\text{NAS} \leq 2$) und Patienten mit einer pathologischen NAS (>2) eingeteilt. Die Gruppe mit $\text{NAS} \leq 2$ bestand aus 16 Patienten und die Gruppe mit >2 betrug 17 Patienten. Jede der genannten Gruppen wurden nach Alter und Geschlecht gematcht. Das männliche Geschlecht betrug prozentual in der Gruppe mit $\text{NAS} \leq 2$ 44% und in der Untersuchungsgruppe bei den Patienten mit $\text{NAS} > 2$ 41%. Das Durchschnittsalter war in beiden Gruppen ähnlich und lag in der Untersuchungsgruppe mit $\text{NAS} \leq 2$ bei 51 Jahren und in der Gruppe mit $\text{NAS} > 2$ bei 47 Jahren. Wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen wiesen erwartungsgemäß der BMI der Patienten auf, dessen Durchschnitt bedeutsam höher (48 kg/m^2) in der Gruppe mit $\text{NAS} > 2$ war, als in der Gruppe mit $\text{NAS} \leq 2$ (26 kg/m^2). Der Leberfettanteil und die Entzündung waren erwartungsgemäß höher in der Gruppe mit $\text{NAS} > 2$, als bei den Patienten mit $\text{NAS} \leq 2$.

Zur weiteren Überprüfung der Ergebnisse wurde eine Replikationsanalyse an 66 Patienten durchgeführt. Diese wurden analog zur Screeninggruppe nach NAS in zwei Gruppen eingeteilt und gematcht.

Tabellarisch ist die Aufteilung der Screeninggruppe und der Replikationsgruppe in Tabelle 1 abgebildet. Hier ist der Median für alle quantitativen Variablen angegeben. Der Interquartilbereich steht in eckigen Klammern.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Patientenkohorte für die humanen Leberproben des zweistufigen Metaboliten-Screenings

	Screeninggruppe		Replikationsgruppe	
	(NAS ≤ 2)	(NAS > 2)	(NAS ≤ 2)	(NAS > 2)
N	16	17	45	21
Männlich (%)	44	41	29	31
Alter (Jahren)	51 [43-62]	47 [38-56]	49 [43-63]	46 [35-61]
BMI (kg/m ²)	26 [24-30]	48 [33-51]	28 [25-41]	33 [30-44]
Leberfettanteil (%)	0 [0-28]	70 [60-80]	10 [0-20]	70 [40-80]
Entzündung	0 [0.5-2]	1 [0-2]	0 [0-0.5]	0.5 [1.5-3]
NAS Score	0 [0-2]	5 [4-5]	1 [0-2]	4 [3-5]

Die gepaarte, lineare Korrelationsanalyse der Metaboliten mit NAS nach Spearman wurde als die primäre Analyse mit dem angepassten Signifikanzniveau von $p < 0.0002$ (0.05 für 252 Tests korrigiert) als Untersuchungsgrenzwert verwendet. Diesem Signifikanzkriterium entsprachen in der initialen Screeninggruppe insgesamt 6 von 252 Metaboliten (Abbildung 8, Tabelle 2). Diese sechs Metaboliten wurden im zweiten, ebenfalls nach Alter und Geschlecht gematchtem Satz von 66 Biopsien repliziert, wobei ein Grenzwert $p < 0.008$ für erfolgreiche Replikation ($p < 0.05$ für sechs Tests korrigiert) angewandt wurde. Es waren zwei Metaboliten, die in diesem zweistufigen Untersuchungsmodell den Testkriterien entsprachen, nämlich 1,4-Dimethoxybenzol (anders auch *p*-Dimethoxybenzol oder Hydrochinon-dimethylether) und Nikotinsäuremethylester.

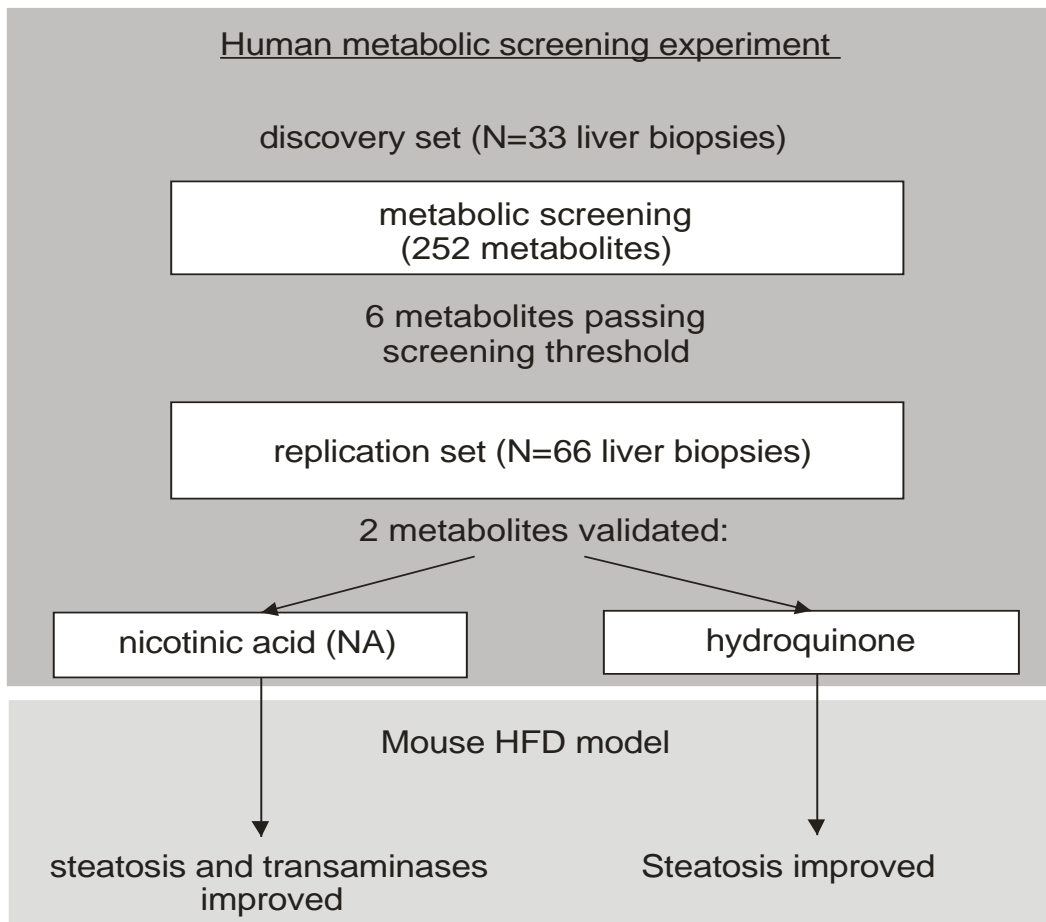


Abbildung 8: Studiendesign: Die replizierten Metaboliten, die in principal-component Analysen Histologie-assoziierte Unterschiede aufwiesen, wurden in einem High-Fat-Diet Mausmodell zu nicht-alkoholischer Leberverfettung evaluiert (von Schönfels et al. 2015).

Da alle Verbindungen im einstufigen Extraktions- und Denaturierungsprozess durch TMSH denaturiert wurden (vgl. Methoden 2.3), entsprechen diese Analyten Hydrochinon (HQ) und Nikotinsäure (NA) ihren betreffenden nicht-denaturierten Herkunftssubstanzen. HQ wurde mit NAS mit nominalen P-Werten von $2,0 \times 10^{-5}$ in der Screening-Untersuchung und $6,7 \times 10^{-3}$ im Replikationssatz korreliert. Für NA wurden nicht-korrigierte P-Werte von $2,6 \times 10^{-6}$ bzw. $6,7 \times 10^{-8}$ erhalten.

Die gemessenen Metaboliten konnten quantifiziert werden. Die somit errechnete Konzentration wurde mit den klinischen NAS-werten korreliert. Dabei konnte eine signifikante negative Korrelation von HQ (p-Wert $3,01 \times 10^{-5}$, Korrelationskoeffizient -0,66) in der Screeninggruppe und in der Replikationsgruppe (p-Wert $6,65 \times 10^{-3}$ Korrelationskoeffizient -0,33) gezeigt werden. Auch für NA konnte im Screeningexperiment eine signifikante negative Korrelation (p-Wert $3,55 \times 10^{-5}$, Korrelationskoeffizient -0,66)

gezeigt werden, die sich im Replikationsexperiment auch bestätigte (p-Wert $7,25 \times 10^{-8}$, Korrelationskoeffizient -0,63). Diese Ergebnisse sind graphisch in der Abbildung 9 dargestellt und in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Ergebnisse der zweistufigen Screening-Analyse
Die Ergebnisse der gepaarte, lineare Korrelationsanalyse der Metaboliten mit NAS nach Spearman (in Fettdruck) wurden als primäre Hypothesentests verwendet. Es werden Ergebnisse für die Metaboliten bereitgestellt, die die Bonferoni-korrigierte Signifikanzgrenze im Screeningsatz von Leberbiopsien überschreiten. Der Korrelationskoeffizient für NAS-Score mit dem Metabolitenspiegel (ρ_{SNAS}) wird ebenfalls bereitgestellt. Für jeden Meaboliten werden Post hoc Analysen zur Assoziation des Inflamationsgrades sowie der Verfettungsanteil in der Leberprobe angegeben.

Unmethylierte Verbindung	Screeningset				Replikationsset			
	ρ_{NAS}	ρ_{SNAS}	ρ_{INF}	ρ_{FAT}	ρ_{NAS}	ρ_{SNAS}	ρ_{INF}	ρ_{FAT}
Anisaldehyd	6,73E-07	-0,74	2,51E-04	1,60E-05	0,23	-0,15	0,45	0,11
1,4-Dioxacyclo-decane5,10dione	4,95E-06	0,70	5,45E-06	1,58E-04	0,78	0,06	0,72	0,50
2(5H)-Furanon	1,81E-05	-0,69	3,21E-03	4,27E-05	0,10	-0,22	0,32	0,06
Hydroquinon	3,01E-05	-0,66	2,17E-04	2,46E-04	6,65E-03	-0,33	0,12	4,74E-04
Thioessigsäure	3,38E-05	0,66	5,19E-06	1,32E-03	0,92	0,01	0,53	0,80
Nikotinsäure	3,55E-05	-0,66	6,00E-05	5,58E-04	7,25E-08	-0,63	6,68E-04	8,88E-08

Die Metabolitenkonzentration auf der Y-Achse wird als normalisierter log10 wiedergegeben und konnte aus den GC/MS-Daten errechnet werden. Die Korrelationskoeffizienten von HQ (ρ_S -0,66 bzw. -0,33) und NA (ρ_S -0,66 bzw. -0,63) waren übereinstimmend bei beiden Analysegruppen und zeigen eine negative Korrelation von Menge des Metaboliten und NAS (Abbildung 8). Jedes Individuum ist durch einen Datenpunkt im Diagramm dargestellt. Personen mit einem BMI > 28 als ausgefüllte Kreise, Personen mit einem BMI \leq 28 als offene Kreise.

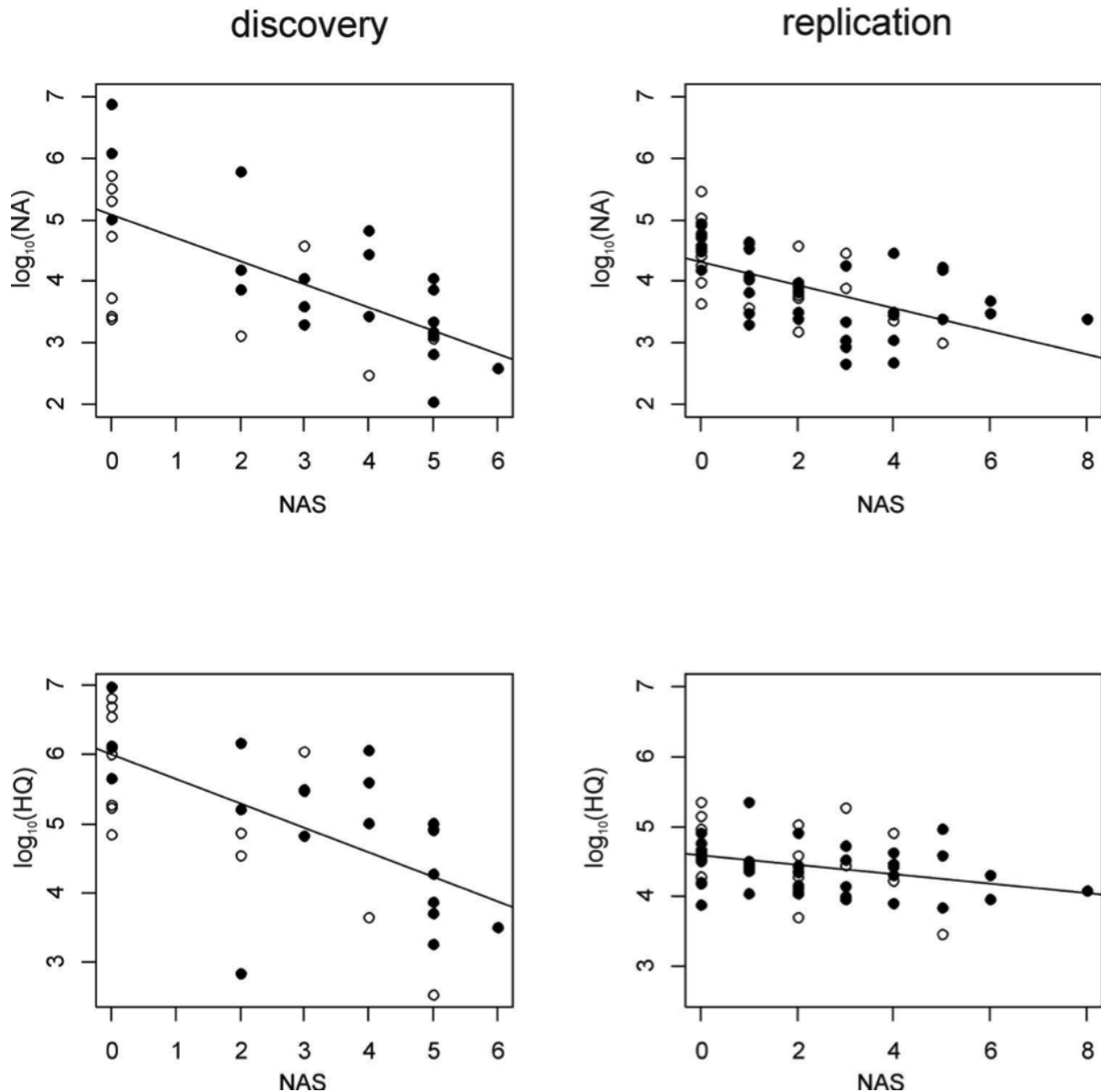


Abbildung 9: Ergebnisse von humanem Metaboliten-Screening: Die paarweisen Korrelationsanalysen der Metabolitenkonzentration mit dem NAS für NA und HQ

In weiteren post-hoc Analysen in der Screeninggruppe wurde HQ mit dem histologischen Entzündungsgrad und dem Grad der Leberverfettung korreliert. Das Niveau von HQ wurde mit gesicherter NASH (NAS ≥ 5) im Screeningsatz ($p=0.0012$) assoziiert und zeigte den suggestiven Assoziationsbeweis im Replikationssatz ($p=0.083$, Wilcoxon-Test). Für NA waren die Tests der Assoziation mit klinischer NASH signifikant in den beiden Sätzen der Leberbiopsien mit P-Werten von 2.9×10^{-5} bzw. 2.2×10^{-5} . Wenn die Analysen der Individuen mit dem BMI von $>28 \text{ kg/m}^2$ begrenzt wurden, wurden ähnliche Resultate für HQ ($p_{\text{cor}} = 0.0015$, $\rho_S = -0.66$ im Entdeckungssatz, $p_{\text{cor}} = 0.07$, $\rho_S = -0.29$ im Replikationssatz) und NA (Entdeckung: $p_{\text{cor}} = 8.8 \times 10^{-5}$,

$\rho_S = -0.76$ im Entdeckungssatz und $p_{cor} = 1.1 \times 10^{-4}$, $\rho_S = -0.60$) erhalten. Vor allem für NA konnte man von den erhaltenen Ergebnissen zwischen der Konzentration der Metaboliten bei adipösen Individuen und Patienten mit histologischem NASH-Beweis unterscheiden.

3.2 Diätische Intervention im NAFLD-Mausmodell

Die Analysen von HQ und NA beim NAFLD-Mausmodell zeigte eine hohe gepaarte Korrelation im Untersuchungssatz ($\rho_S = 0.90$, $p = 5.8 \times 10^{-8}$) und konnten aus diesem Grund unter Rücksichtnahme auf ihre individuelle Assoziation mit Leberphänotypen nicht getrennt werden. Weiterhin stellt das Metabolitenscreening eine rein deskriptive Analyse dar und kann nicht zwischen Assoziation und Ursache unterscheiden. Um den Wirkmechanismus der entsprechenden Metaboliten weiter darzustellen, wurden diese zwei relevant assoziierten Substanzen in einem NAFLD-Mausmodell mit einer hochfettigen Diät (HFD) (Gäbele et al. 2011) bewertet. Da die antioxidativen Eigenschaften von Hydrochinon (HQ) ein vielversprechendes pathophysiologisches Modell darstellen, wurde *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ) als ein zusätzlicher Wirkstoff in einem Tiermodell verwendet, um diese Linie der pathophysiologischen Intervention gründlich zu bewerten.

Nach 6 Wochen der fettreichen Ernährung sowie der Kontrolldiäten gab es signifikante Unterschiede zwischen den Leberhistologien der Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abbildung 10). Die Abbildung 10 zeigt repräsentative Abschnitte der Leberhistologie im Mausmodell in 4-facher und 10-facher Vergrößerung bei Hämatoxylin–Eosin- und Öl-Rot-Färbung aus der Kontrollgruppe, sowie Behandlungsgruppen mit High-fat-Diet (markiert als HFD), High-fat-Diet mit Nikotinsäure (hier markiert als NA), High-fat-Diet mit Hydroquinon (hier markiert als HQ) und High-fat-Diet mit *tert*-Butylhydroquinone (hier markiert als tBHQ). Die HFD-Mäuse zeigen eine deutlich veränderte Leberarchitektur mit höherer Fettakkumulation, Hepatozytenballonisierung und leichte Entzündung im Vergleich zu den Mäusen ohne Diät. Die Zugabe von NA zur HFD erwirkt eine deutlich veränderte Leberarchitektur im Sinne reduzierter Fettansammlung und Hepatozytenballonisierung ($p = 0,044$). Man sieht, dass die NA das Muster der Leber verbessert und die Ansammlung von Fett in Mäuselebern effektiv verhindert und somit nahezu vergleichbar mit den Ergebnissen der

Kontrollgruppe ist. Vergleicht man die HFD-Tiere (Mittelfettinhalt 4,25 Einheiten) untereinander, so ist die höchste Verminderung des Leberfettinhalts in der Gruppe mit der NA-Ergänzung (Mittelwert 0.5, $p=0.0012$) zu finden. Die NA konnte die Fettsammlung in der Leber entweder komplett bei allen Mäusen verhindern, oder es gab nur geringe Fettablagerungen im periportalen Leberbereichen. Die Ergänzung mit HQ (Mittelwert 1.0, $p=0.00043$) und tBHQ (Mittelwert 2.0, $p=0.0028$) vermindern auch den Leberfettanteil, der durch die Oil Red O Färbung gemessen wurde.

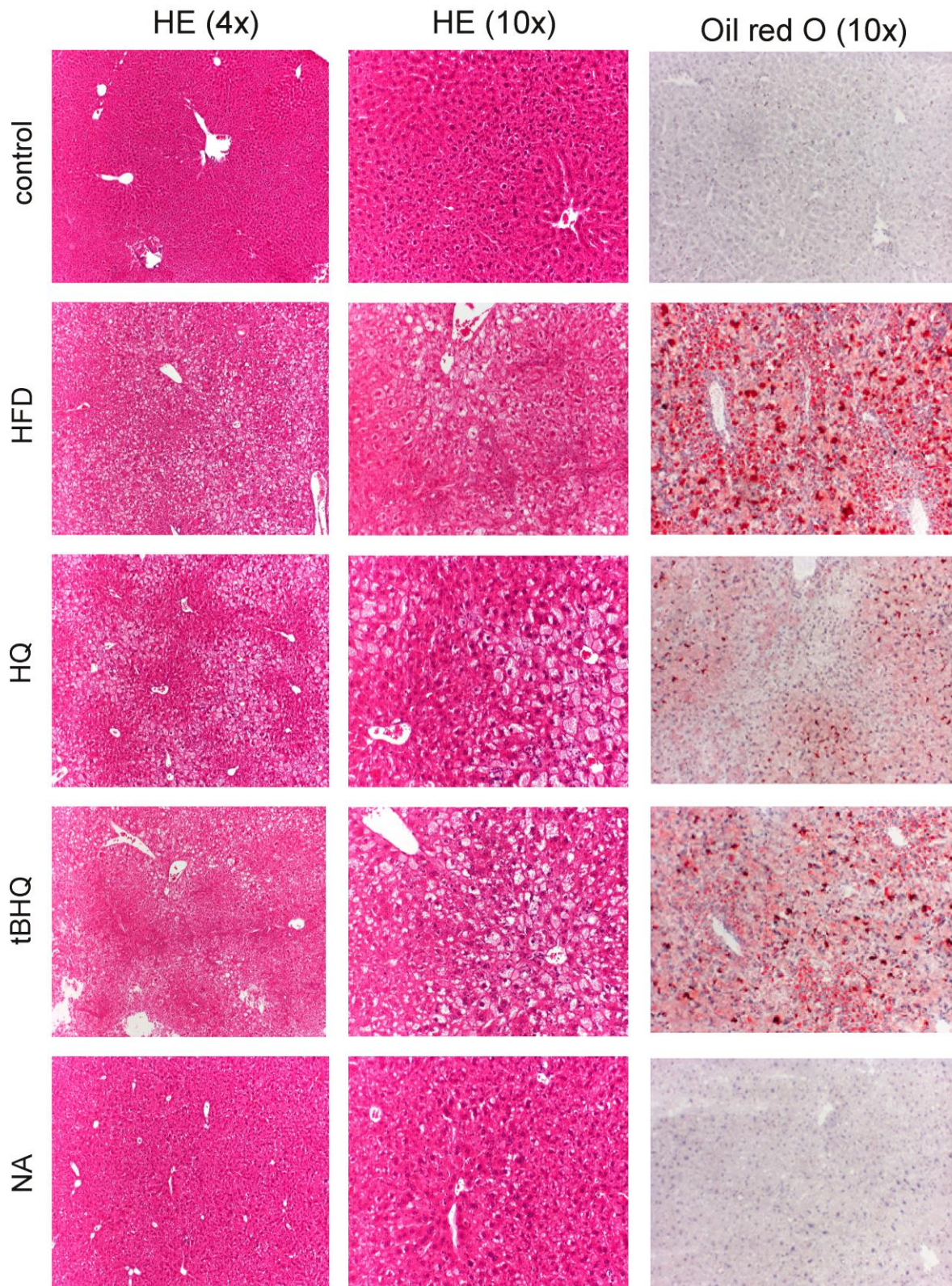


Abbildung 10: Repräsentative Abschnitte der Leberhistologie im Mausmodell in 4-facher und 10-facher Vergrößerung bei Hämatoxylin–Eosin- und Öl-Rot-Färbung aus den Behandlungs- und Kontrollgruppen

Ergebnisse

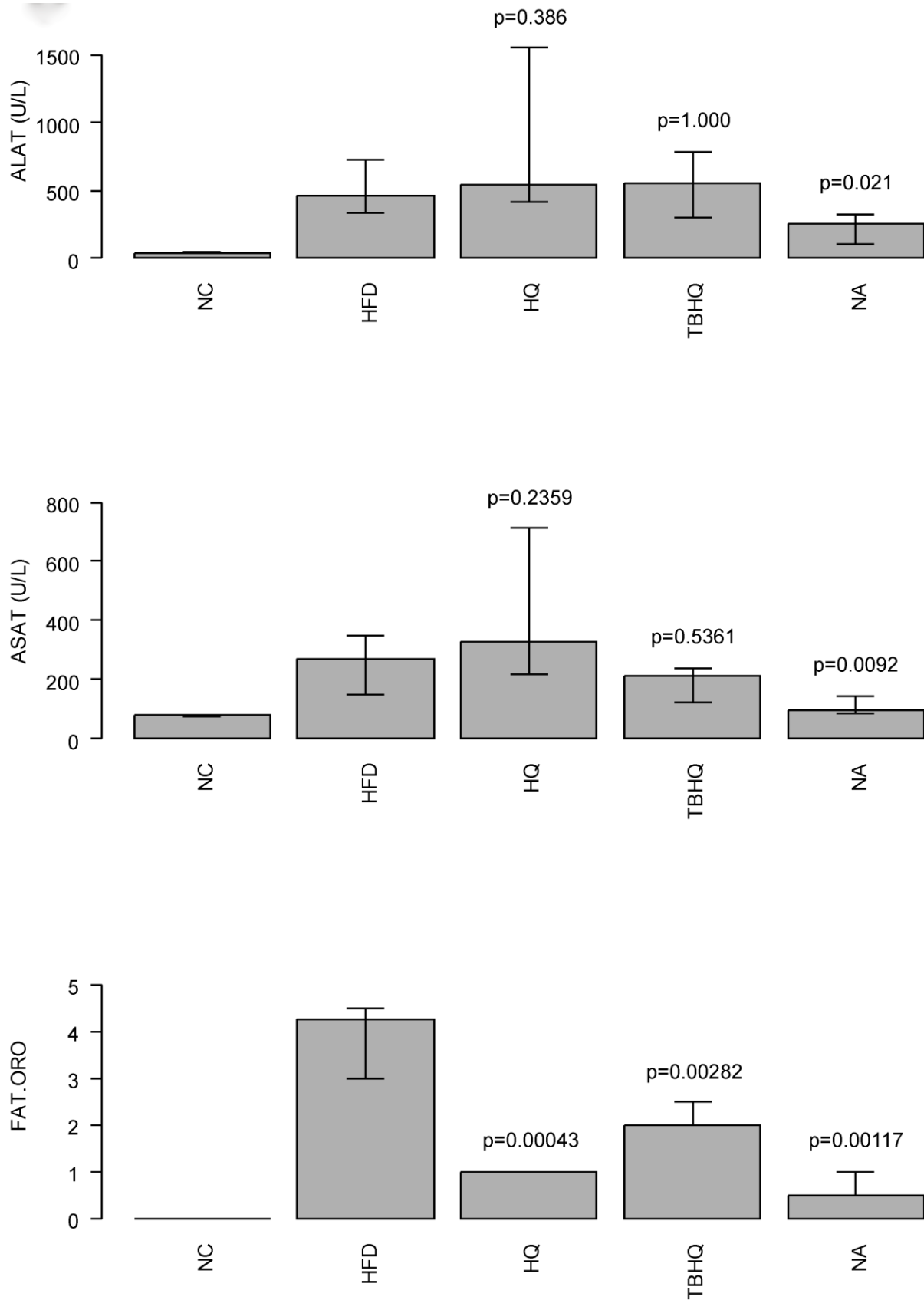


Abbildung 11: Statistische Analyse des Fettgehalts der Leber- und Transaminasenaktivität in Behandlungs- und Kontrollgruppen.

In Abbildung 11 wird die Konzentration der Transaminasen sowie der Fettgehalt der Leber in den 5 repräsentativen Tiergruppen (NC, HFD, NA, HQ, tBHQ) graphisch abgebildet. Auf der Y-Achse die Konzentration von ALAT (Alanin-Aminotransferase) und ASAT (Aspartat-Aminotransferase) angegeben, auf der X-Achse werden die Kontroll- und die Untersuchungsgruppen aufgezählt. Es zeigt sich deutlich, dass die Lebertransaminasen nur nach der NA-Ergänzung vermindert werden. Die NA-Ergänzung in der HFD-Diät verminderte die ASAT-Mittelaktivität von 270 U/L bis 95 U/L in der HFD-Gruppe ($p=0.0092$) und die ALAT-Mittelaktivität von 470 U/L bis 260 U/L ($p=0.021$).

3.3 Analyse der Ernährungsfragebögen

Die Angaben der durch die Patienten selbst ausgefüllten standardisierten Ernährungsfragebögen (europäischer Ernährungsfragebogen, Epidemiologie Abteilung, Deutscher Ernährungsinstitut, Potsdam Rehbrücke; siehe Anhang 7.1) (Kroke et al. 1999) von sechs Kontrollindividuen ($BMI \leq 25$, $NAS \leq 2$), zwölf NASH-Patienten ($NAS \geq 5$) und elf NAFL-Patienten ($\geq 20\%$ Steatose; $NAS < 5$) wurden analysiert. Diese Patienten stammen sowohl aus der Entdeckungs- als auch aus der Replikationsgruppe und waren die Patienten, die sich einer erneuten Kontaktaufnahme zum Ausfüllen des Fragebogens bereit erklärten. Die Hypothese, NA als einen potentiellen protektiven Metaboliten gegen histologische Progression von NASH, wurde in diesem Datensatz beim Vergleich der normalisierten Aufnahme des NA-Äquivalents zwischen den Gruppen der Patienten getestet. Passend zu den Ergebnissen der metabolischen Untersuchung und des Tierexperiments war die normalisierte NA-Mittelaufnahme deutlich höher in der Patientengruppe mit einfacher Steatose (Mittelwert $3.44 \mu\text{g}/\text{kJ}/\text{Tag}$), als bei den NASH-Patienten mit $NAS \geq 5$ ($2.76 \mu\text{g}/\text{kJ}/\text{Tag}$, $p = 0.0022$, einseitiger Wilcoxon-Test). Die Idee eines Schutzeffekts von NA auf die Progression von NAFLD wird damit unterstützt.

4 Diskussion

Mit dieser Arbeit wird das erste Mal ein Metabolomscreening aus humanem Lebergewebe präsentiert, das zur Identifizierung von metabolischen Markern, die mit histologischem NASH-Nachweis assoziiert sind, dient. Beide replizierbare Metaboliten, HQ und NA, zeigen eine protektive Wirkung gegen NAFLD, abhängig von ihrer Konzentration in dem humanen Lebergewebe. Die Effektivität dieser protektiven Wirkung gegen Lebersteatose konnte auch in einem Tierernährungsmodell von NAFLD nachgewiesen werden. In den Gruppen, in denen die Ernährung mit NA und HQ ergänzt wurde, lassen sich eine deutlich verbesserte Leberarchitektur im Sinne von geringeren Fettansammlungen und Hepatozytenballonierungen erkennen. Beim Messen der Wirkung der genannten protektiven Metaboliten in Assoziation mit erhöhten Lebertransaminasen zeigt sich, dass NA den Spiegel der Serumtransaminasen statistisch signifikant senkt. Eine signifikante Wirkung sowohl auf die Steatose, als auch auf die Transaminasen wird jedoch ausschließlich von NA hervorgerufen. Somit stellt NA hierbei ein gutes therapeutisches oder präventionelles Target gegen NAFLD dar. Des Weiteren zeigt sich bei der Analyse der Ernährungsfragebögen, dass eine normalisierte Nahrungsaufnahme von NA bei fettleibigen Risikoindividuen auch mit der NASH-Aktivität negativ korreliert.

Unter Rücksichtnahme auf die zentrale Rolle der Leberfunktion in der Körperhomöostase sind metabolische Untersuchungen der Leberstörungen – besonders NAFLD – eine interessante Methode, um diese Krankheiten besser zu verstehen. Solche Studien, besonders die mit humanem Gewebe, stellen viele wichtige Herausforderungen dar. Erstens ist eine perkutane Leberbiopsie mit einem geringen, aber unbestrittenen Risiko (für Blutung, Nachblutung, Galleleck, Verletzung benachbarter Organe) verbunden, wodurch die Menge des erhaltenen Lebergewebes sehr begrenzt ist. Insgesamt ist die Rekrutierung der Patienten und die Gewinnung von Leberproben sehr aufwändig, vor allem, weil das Biopsiematerial mit einem kleinen Überschuss des Lebergewebes nach der klinisch indizierten histopathologischen Analyse beschränkt ist. In der hier vorliegenden Arbeit war dies ein wichtiger Faktor bei der Wahl der bestimmten einstufigen Derivatisationsmethoden und der GC/MS-Analyse, denn sie

ermöglichte sehr kleine Überschussleberproben zu verwenden, die bei den perkutanen Biopsien erhalten wurden (5 mg).

Zweitens, soll das Gewebe zur metabolischen Analyse einem streng kontrollierten schnellen Vereisungsprotokoll entsprechen. Wegen vorheriger Reproduzierbarkeitsprobleme, die hier nicht weiter ausgeführt werden, wurde für diese Arbeit ein *de novo* Probensammelprotokoll eingeführt, welches gleiche *ex-vivo* Zeiten unter 30 Sekunden für alle Proben garantierte. Unter Rücksichtnahme auf diese Herausforderungen, wurden bei vielen in der Literatur berichteten metabolischen Analysen von NAFLD entweder Tiermodelle benutzt (Kroke et al. 1999; Puri et al. 2009; Tanaka et al. 2012), oder biologische Substrate, zum Beispiel Plasma, Serum oder Urin (Kroke et al. 1999; Moustafa et al. 2012), die bei Patienten auch nach strengen Standardarbeitsprozeduren einfacher zu gewinnen sind. Frühere Publikationen haben die lipidomische Signatur von NAFLD bei Menschen eingeführt (Puri et al. 2007; Soga et al. 2011). Die hier vorliegende Arbeit stellt jedoch, nach ausführlicher Literaturrecherche, das erste globale, hypothesenfreie, kleinmolekulare Screening der humanen NAFLD dar. Obwohl globale Analysen des Metabolismus immer häufiger zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Krankheit und Entdeckung der Biomarker beitragen (Sreekumar et al. 2009; Suhre et al. 2011; T. J. Wang et al. 2011; Z. Wang et al. 2011), befinden sich die Metabolomuntersuchungen noch in einem frühen Stadium. Diese Studie hat daher einige der Methodik geschuldete Einschränkungen, zum Beispiel eine begrenzte Anzahl von analysierten Metaboliten. Größere Proben und bessere Technologien sind erforderlich, um ein kompletteres Verständnis über das resultierende molekulare Modell offenzulegen.

Die aussagekräftigsten Daten über Funktion und Wirkungseffekt wurden in der vorliegenden Arbeit vor Allem zu NA gewonnen. Es wurde nachgewiesen, dass dieser Metabolit mit der histologischen NASH-Aktivität (englisch NAS-NASH Activity Score) in der Untersuchungs- und Replikationsgruppe der Metabolitenanalyse umgekehrt korreliert. Die Auswertungen der Ernährungsfragebögen entsprechen dieser vermuteten protektiven Wirkung von NA gegen die Entwicklung von NASH. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bewiesen, dass die Nahaufnahme der Nikotinsäure viel höher in fettleibigen Risikoindividuen mit gutartiger Steatose im Vergleich mit den Individuen mit NASH ist ($p=0.0022$), obwohl der BMI in beiden Gruppen ähnlich hoch ist ($p=0.71$, Mittel-BMI 48kg/m^2). Es ist interessant, dass Nikotinsäure als Arzneimittel

zugelassen ist und in vielen klinischen Experimenten als ein lipidvermindernder Stoff analysiert wurde (Carlson 2005; Donnelly et al. 2005). Schon im Jahr 1955 wurde gezeigt, dass NA den Cholesterinspiegel im Plasma in gesunden und hypercholesterolemischen Individuen senkt (Markel 2011).

Niacin, wie Nikotinsäure auch genannt wird, ist bei der Prävention von kardiovaskulären Krankheiten sehr effektiv. So vermindert zum Beispiel ein purer (unmittelbar freigesetzter) Wirkstoff nicht-fatale Infarkte um 27% in 5 Jahren und Sterblichkeit an Koronarkrankheiten um 11% in der Nachbehandlung 15 Jahre später (Knopp et al. 2009). In Zusammenhang mit Lebersymptomen des metabolischen Syndroms wurde NA noch nicht systematisch studiert. Die Erhöhung der Transaminasen ist ein typisches Problem in der medikamentösen Therapie von Hyperlipidämie und wurde aus diesem Grund bei einigen klinischen Untersuchungen für die Sicherheit der Arzneimittel gemessen. Hier wurden gegensätzliche Ergebnisse der Studien über senkende (Keenan et al. 1991) und erhöhende Wirkung auf Transaminasenlevel berichtet (Hernandez et al. 2010; Knopp et al. 1985; McKenney et al. 1994), die von der verwendeten Formulierung des Niacins abhängen. Die Gabe von Nikotinsäure ist mit Nebenwirkungen (meistens Flush-Symptomatik) verbunden, die ihre breite klinische Verwendung verlangsamt haben (Donnelly et al. 2005). Aus diesem Grund wurde dem Niacin Laropiprant beigefügt, was die Nebenwirkungen in klinischen Experimenten verminderte, jedoch möglicherweise auch die gewünschte Wirksamkeit beeinflusste. Deshalb musste der Hersteller das entsprechende Arzneimittel (Tredaptive®) vom europäischen Markt nehmen. Insgesamt betrachtet, bleibt die direkte klinische Verwendung von NA zur Therapie oder Prävention von NASH allenfalls eine Möglichkeit und erfordert dringend weitere Evaluation. Die Erforschung von den pathophysiologischen Hauptmechanismen ihrer Wirkung könnte wichtiges Ziel weiterer klinischer Untersuchungen sein, da NA hierbei ein gutes therapeutisches Target darstellen würde.

Das HFD-Mausmodell, das in der vorliegenden Arbeit sowohl als Interventions- als auch als Beobachtungsmodell genutzt wurde, scheint eine geeignete Plattform für ein besseres Verständnis der mechanistischen Wirkungen von NA auf den Lebermetabolismus darzustellen. Erstaunlich ist, dass NA bereits untersucht wurde, um die Lipidverminderungsweise in Mausmodellen aufzuklären (Kolovou et al. 2005), die Wirkung auf die Leberhistologie oder NASH-Modelle wurde jedoch nicht beachtet.

Die Verabreichung von NA in Nagetiermodellen bei alkoholischer Steatohepatitis stellte sich allerdings als effektiv in der Verminderung solcher Leberschädigung heraus (Y. H. Chen et al. 2008; Tupe et al. 2011). In einem Rattenmodell für Oxidationsstress wegen intraperitonealen Injektionen von Tert-Butyl-Hydroperoxid verbesserte die diätische NA-Ergänzung die Leberaufnahme von Zink und resultierte als hepatisch protektiv wirkend (Dinkova-Kostova und Wang 2011). Therapeutische Dosen von NA haben eine bedeutende Wirkung auf den systematischen und hepatischen Lipidmetabolismus, der auch von der Zugänglichkeit des Energiesubstrats und den Ko-Faktoren abhängig sein kann, wie es die Induktion der Lebersteatose bei einem Cholinmangel demonstriert (Chowdhry et al. 2010).

Hydroquinon ist neben anderen oxidierbaren Diphenolen ein Induktor eines zytoprotektiven Keap1/Nrf2 Stoffwechselzyklus (Dinkova-Kostova und Wang 2011). Somit könnte die Modifikation des Energiestoffwechsels durch HQ die mögliche Schutzwirkung darstellen. In einem murinen Knockout-Modell (Chowdhry et al. 2010), habe in der Tat der Verlust von Nrf2 zu einer deutlichen Progression von NAFLD geführt. Auch eine protektive Wirkung von HQ gegen Hirn- und Nierenschäden wurde bereits beschrieben (Jin et al. 2010; Li et al. 2011). Jedoch sind in Zukunft weitere systematische Studien an transgenen Versuchstieren erforderlich, um den genauen pathogenetischen Stoffwechselmechanismus der protektiven HQ-Wirkung zu erklären.

Gegenwärtige therapeutische Alternativen für NAFLD sind stark begrenzt, was den Bedarf an der Identifikation neuartiger therapeutischer Ziele und Wirkstoffe beim Menschen demonstriert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Metaboliten mit einem protektiven Wirkungsmechanismus in der humanen Leber nachgewiesen, die entweder direkt als potenzielle therapeutische Wirkstoffe verwendet werden können oder weitere mechanistische Studien über durch diese Substanzen ausgelösten Stoffwechselwege anregen. Diese Arbeit könnte als initialer Einblick in die komplexe metabolische Signatur der NAFLD dienen. Jedoch sind weitere umfangreiche Studien mit höheren Patientenzahlen, sowie besser entwickelte Technologien zur Metabolitenbeurteilung nötig. Solche Studien könnten letztlich auch dazu beitragen, die pathogenetische Klassifikation von NAFLD besser zu verstehen und voranzutreiben. Entsprechende mechanistische Tiermodelle könnten bei dieser Leberstörung eine Möglichkeit sein neuartige Therapie- oder Präventionsziele zu erkennen.

5 Zusammenfassung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)) ist die häufigste chronische Leberstörung in Industrieländern. Die Prävalenz von NAFLD beträgt abhängig von der Untersuchungsmethode zwischen 6,3% und 33% der Weltpopulation, mit einem Median von 20% (Vernon et al. 2011). In den Risikogruppen ist die Erkrankung sogar noch mehr verbreitet (z. B. bei Adipositaspatienten, die zu bariatrischen Operationen evaluiert sind, kann die Prävalenz 90% erreichen). Dennoch ist die genaue Pathophysiologie der NAFLD nur unvollständig verstanden. Vor Allem ist unklar, warum manche Risiko-Individuen eine normale Leberhistologie haben können, wobei andere eine rasche Progression zu Steatohepatitis aufweisen. Die Therapie der NAFLD begrenzt sich auf Behebung und Kontrolle der Risikofaktoren sowie Komorbiditäten wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ II oder Hyperlipidämie. Jedoch ist eine pathognomonische Therapie bis jetzt nicht bekannt. Metabolenscreenings könnten neue Einsichten in Krankheitsmechanismen erbringen und neue Therapieziele identifizieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche protektive Metaboliten der NAFLD mittels GC/MS zu identifizieren, die ein potentielles therapeutisches Target darstellen, oder einen Teil des regulatorischen Pathway sein könnten. Die replizierten Metaboliten, die Histologieassoziierte Unterschiede aufweisen, sollten in einem High-Fat-Diet Mausmodell zu nicht-alkoholischer Leberverfettung evaluiert werden. Zudem sollten die protektiven Eigenschaften der Metaboliten bei den Patienten mittels Ernährungsfragebögen überprüft werden.

Die Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie konzipiert, wobei die Häufigkeit von den Metaboliten in NAFLD-Patienten und Kontrollen verglichen wurden. Die Metaboliten wurden mittels GC/MS Entdeckungsplattform identifiziert. Somit wurden 33 humane Leberbiopsien und ein Replikationsset mit 66 Leberbiopsien mit jeweils der gesamten Bandbreite von Leberhistologien von normalem Lebergewebe bis hin zu nicht-alkoholischer Fettleberhepatitis (NASH) untersucht. Initial wurden 252 Metaboliten mittels GC/MS identifiziert. Hydrochynon (HQ, $p_{\text{combined}}=3.0 \times 10^{-4}$) und Nikotinsäure (NA, $p_{\text{combined}}=3.9 \times 10^{-9}$) korrelierten invers mit dem histologischen Schweregrad einer NAFLD im weiteren metabolischen Screening. Die zwei replizier-

baren Metaboliten, die Nikotinsäure und Hydroquinon, die in den genannten Metabolomanalysen histologieassoziierte Unterschiede aufwiesen, wurden in einem High-Fat-Diet Mausmodell zu nichtalkoholischer Leberverfettung evaluiert. Das High-Fat-Diet Mausmodell zu nichtalkoholischer Fettlebererkrankung konnte einen protektiven Effekt gegen NAFLD beider Substanzen zeigen: Nahrungsergänzung mit HQ reduzierte nur die Leberverfettung, Nikotinsäure reduzierte sowohl die Leberverfettung, als auch die Transaminasen und induzierte einen regulatorischen Genkomplex, der in globalen Expressionsanalysen klare Verbindungen zu NAFLD aufweist. Die Ergebnisse der Ernährungsfragebögen bestätigen einen protektiven Effekt gegen die Progression einer NASH durch Nahrungsergänzung mit Nikotinsäure.

Somit identifiziert diese Studie zum ersten Mal zwei replizierbare Metaboliten, die einen protektiven Effekt in Bezug auf die Entwicklung einer NASH zeigen. Es wird damit möglicherweise sowohl der therapeutische Einsatz von Nikotinsäure als auch ein Teil des regulatorischen Stoffwechselweges entdeckt. Metabolomweite Assoziationsstudien müssen noch folgen, damit die populationsübergreifenden genetischen und exogenen Risikofaktoren für die nichtalkoholische Fettlebererkrankung aufgedeckt werden können, um die Möglichkeiten der Therapie oder Prävention einer NAFLD zu erkennen.

6 Literaturverzeichnis

A

- Ahrén, B., Gudbjartsson, T., Al-Amin, aN., et al. (1999). Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas*, 18(1), 75–83.
- Amarapurkar, D., Kamani, P., Patel, N., et al. (2007). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Annals of Hepatology*, 6(3), 161–3.
- Armstrong, M. J., Gaunt, P., Aithal, G. P., et al. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 387(10019):679-90.
- Assy, N., Kaita, K., Mymin, D., et al. (2000). Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(10), 1929–1934.

B

- Belfort, R., Harrison, S. a, Brown, et al. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine*, 355(22), 2297–2307.
- Beymer, C., Kowdley, K. V, Larson, A., et al. (2003). Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery. *Arch Surg*, 138(11), 1240–1244.
- Boskey, A. L., and Mendelsohn, R. (2005). Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. In *Vibrational Spectroscopy* (Vol. 38, pp. 107–114).
- Boza C, Riquelme A, Ibañez L, et al. (2005). Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg.*, 15(8), 1148–53.
- Brown, S. C., Kruppa, G., and Dasseux, J. L. (2005). Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., et al. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*, 40(6), 1387–1395.
- Buettner, R., Schölmerich, J., and Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(4), 798–808.
- Butte, W. (1983). Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification. *Journal of Chromatography A*, 261, 142–145.

C

- Carlson, L. A. (2005). Nicotinic acid: The broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *Journal of Internal Medicine*.
- Chalasani, N., Guo, X., Loomba, R., et al. (2010). Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 139(5).
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., et al. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, 142(7), 1592–1609.
- Chavez-Tapia, N. C., Tellez-Avila, F. I., Barrientos-Gutierrez, T., et al. (2010). Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (1), CD007340.
- Chen, C. H., Huang, M. H., Yang, J. C., et al. (2007). Prevalence and etiology of elevated serum alanine aminotransferase level in an adult population in Taiwan. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(9), 1482–1489.
- Chen, Y. H., Wang, M. F., Liao, J. W., et al. (2008). Beneficial effects of nicotinamide on alcohol-induced liver injury in senescence-accelerated mice. *BioFactors*, 34(2), 97–107.
- Chen, Z., Chen, L., Dai, H., et al. (2008). Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(8), 616–22.
- Chowdhry, S., Nazmy, M. H., Meakin, P. J., et al. (2010). Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(2), 357–371.
- Colicchio, P., Tarantino, G., del Genio, F., et al. (2005). Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 49(5), 289–95.
- Conlon, B. A., Beasley, J. M., Aebbersold, K., et al. (2013). Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*. MDPI AG.

D

- Deleris, G., and Petibois, C. (2003). Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. In *Vibrational Spectroscopy* (Vol. 32, pp. 129–136).
- Day, C. P. (2006). From fat to inflammation. *Gastroenterology*, 130(1), 207–10.

Defernez, M., and Colquhoun, I. J. (2003). Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry*, 62(6), 1009–1017.

Dinkova-Kostova, A. T., and Wang, X. J. (2011). Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 192, pp. 101–106).

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., et al. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343–1351.

Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., and Newsome, P. N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 103(2), 71–83.

Dunn, W. B., Bailey, N. J. C., and Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *The Analyst*, 130(5), 606–25. j

Dunn, W. B., and Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285–294.

F

Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, et al. (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40(1), 185–194.

Fracanzani, A. L., Valenti, L., Bugianesi, E., et al. (2008). Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(3), 792–8.

Fraser, A., Longnecker, M. P., and Lawlor, D. A. (2007). Prevalence of Elevated Alanine Aminotransferase Among US Adolescents and Associated Factors: NHANES 1999-2004. *Gastroenterology*, 133(6), 1814–1820.

Frith, J., Day, C. P., Henderson, E., et al. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*, 55(6), 607–613.

G

Gäbele E, Dostert K, Dorn C, et al. (2011). A new model of interactive effects of alcohol and high-fat diet on hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*; 35: 1361–7.

H

Haentjens, P., Massaad, D., Reynaert, H., et al. (2009). Identifying non-alcoholic fatty liver disease among asymptomatic overweight and obese individuals by clinical and biochemical characteristics. *Acta Clinica Belgica*, 64(6), 483–493.

Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., et al. (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Internal Medicine*, 143(10).

Hernandez, C., Molusky, M., Li, Y., et al. (2010). Regulation of hepatic ApoC3 expression by PGC-1beta mediates hypolipidemic effect of nicotinic acid. *Cell Metabolism*, 12(4), 411–419.

J

Jin W, Ni H, Dai Y, et al. (2010) Effects of tert-butylhydroquinone on intestinal inflammatory response and apoptosis following traumatic brain injury in mice. *Mediators Inflamm*; 2010: 502564.

Joppien, S., Maier, S. L. and Wedling, D. S. (2011). *No Title. BASICS Experimentelle Doktorarbeit* (1st ed., Vol. 131). München: Elsevier GmbH, Urban und fischer Verlag.

Jou, J., Choi, S. S., and Diehl, A. M. (2008). Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*.

K

Keenan, J. M., Fontaine, P. L., Wenz, J. B., et al. (1991). Niacin revisited. A randomized, controlled trial of wax-matrix sustained-release niacin in hypercholesterolemia. *Archives of Internal Medicine*, 151(7), 1424–32.

Kim, S. J., Kim, S. H., Kim, J. H., et al. (2016). Understanding Metabolomics in Biomedical Research *Metabolomics Mass*, 7–16.

Kirk, E., Reeds, D. N., Finck, B. N., et al. (2009). Dietary Fat and Carbohydrates Differentially Alter Insulin Sensitivity During Caloric Restriction. *Gastroenterology*, 136(5), 1552–1560.

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313–1321.

Knopp, R. H., Ginsberg, J., Albers, J. J., et al. (1985). Contrasting effects of unmodified and time-release forms of niacin on lipoproteins in hyperlipidemic subjects: Clues to mechanism of action of niacin. *Metabolism*, 34(7), 642–650.

Knopp, R. H., Retzlaff, B. M., Fish, B., et al. (2009). The SLIM study: Slo-Niacin® and Atorvastatin Treatment of Lipoproteins and Inflammatory Markers in Combined Hyperlipidemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 3(3), 167–178.

Kolovou, G.D., Milkhailidis, D.P., Adamopoulou, E.N., et al. (2005). The effect of nicotinic acid and alcohol co-administration in Wistar rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 27(1), 17–23.

Kroke, A., Klipstein-Grobusch, K., Voss, S., et al. (1999). Validation of a self-administered food-frequency questionnaire administered in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study: comparison of energy, protein, and macronutrient intakes estimated with the doubly labeled water. *Am J Clin Nutr*, 70(4), 439–447.

L

- Landrock, A., and Richter, K. (2011). Method and system for internal chemical ionization with water in ion trap mass spectrometry. United States Patent Office.
- Lazo, M., Solga, S. F., Horska, A., et al. (2010). Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 33(10), 2156–2163.
- Lee, J. Y., Kim, K. M., Lee, S. G., et al. (2007). Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *Journal of Hepatology*, 47(2), 239–244.
- Lee SS, Park SH, Kim HJ et al. (2010) Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol*; 52:579-585
- Leite, N. C., Salles, G. F., Araujo, A. L. E., et al. (2009). Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 29(1), 113–9.
- Li, H., Wang, Y.-J., Tan, K., et al. (2009). Prevalence and risk factors of fatty liver disease in Chengdu, Southwest China. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 8(4), 377–382.
- Li H, Zhang L, Wang F, et al. (2011). Attenuation of glomerular injury in diabetic mice with tert-butylhydroquinone through nuclear factor erythroid 2-related factor 2-dependent antioxidant gene activation. *Am J Nephrol*; 33: 289–97.
- Lingohr, M. K., Buettner, R., and Rhodes, C. J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in Molecular Medicine*, 8(8), 375–384.

M

- Machado, M., Marques-Vidal, P., and Cortez-Pinto, H. (2006). Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *Journal of Hepatology*, 45(4), 600–606.
- Machado, M. V. and Cortez-Pinto, H., (2013). Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol*. 58(5):1007-19.
- Marcos, A., Fisher, R. A., Ham, J. M., et al. (2000). Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation. *Transplantation*, 69(11), 2410–5.
- Markel, A. (2011). The resurgence of niacin: from nicotinic acid to niaspan/laropiprant. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, 13(6), 368–374.
-

- Markelov, M., and Guzowski Jr., J. P. (1993). Matrix independent headspace gas chromatographic analysis. This full evaporation technique. *Analytica Chimica Acta*, 276(2), 235–245.
- McKenney, J. M., Proctor, J. D., Harris, S., and Chinchili, V. M. (1994). A comparison of the efficacy and toxic effects of sustained- vs immediate-release niacin in hypercholesterolemic patients. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 271, 672–677.
- Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., et al. (2005). Meta-analysis: High-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*.
- Moustafa, T., Fickert, P., Magnes, C., et al. (2012). Alterations in lipid metabolism mediate inflammation, fibrosis, and proliferation in a mouse model of chronic cholestatic liver injury. *Gastroenterology*, 142(1).
- Mummadi, R. R., Kasturi, K. S., Chennareddygari, S., and Sood, G. K. (2008). Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 6(12), 1396–402.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., and Pagano, G. (2011). Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of Medicine*, 43(August 2010), 617–649.
- N
- Nakamura, A., and Terauchi, Y. (2013). Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21240–57.
- Neuschwander-Tetri, B. A., Loomba, R., Sanyal, A. J., et al. (2015). FarnesoidX nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 385(89972); 956-65
- O
- Oakes, N. D., Cooney, G. J., Camilleri, S., et al. (1997). Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*, 46(11), 1768–1774.
- P
- Park, S. H., Jeon, W. K., Kim, S. H., et al. (2006). Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1), 138–143.
-

Puri, P., Baillie, R. a, Wiest, M. M., et al. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(4), 1081–90.

Puri, P., Wiest, M. M., Cheung, O., et al. (2009). The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 50(6), 1827–1838.

R

Ratziu, V., Harrison, S. A., Francque, S., et al (2016). Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -delta induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology*. 150(5):1147-59.e.5

R Development Core Team. (2010). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., et al. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, 40(12), 1461–5.

Roskams, T., Yang, S. Q., Koteish, A., et al. (2003). Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Pathology*, 163(4), 1301–11.

Roeb, E., Steffen, H. M., Bantel, H., et al. (2015). Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen. AWMF Register Nr 021-025

S

Sanyal, A. J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., et al. (2011). Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(1), 344–53.

Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V, et al. (2010). Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine*, 362(18), 1675–85.

Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., et al. (2011). Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *Journal of Hepatology*, 55(4), 896–905.

Sreekumar, A., Poisson, L. M., Rajendiran, T. M., et al. (2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 457(7231), 910–4.

Sreenivasa Baba, C., Alexander, G., Kalyani, B., et al. (2006). Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21(1 Pt 1), 191–198.

Suhre, K., Shin, S.-Y., Petersen, A.-K., et al. (2011). Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*, 477(7362), 54–60.

Suzuki, A., Angulo, P., Lymp, J., et al. (2005). Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology*, 41(1), 64–71.

Suzuki, A., Lindor, K., Saver, J. S., et al. (2005). Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 43(6), 1060–1066.

T

Tanaka, N., Matsubara, T., Krausz, K. W., et al. (2012). Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56(1), 118–129.

Tupe, R. S., Tupe, S. G., and Agte, V. V. (2011). Dietary nicotinic acid supplementation improves hepatic zinc uptake and offers hepatoprotection against oxidative damage. *The British Journal of Nutrition*, 105(12), 1741–9.

V

Vernon, G., Baranova, A., and Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*.

Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., et al. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*.

Villar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., et al. (2015). Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 149(2):367-78. e5

von Schönfels, W., Patsenker, E., Fahrner, R., et al. (2015). Metabolomic tissue signature in human non-alcoholic fatty liver disease identifies protective candidate metabolites. *Liver International*, 35(1), 207–214.

Vuppalanchi, R., and Chalasani, N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(1), 306–17.

W

Wang, T. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., et al. (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*, 17(4), 448–53.

Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., et al. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), 57–63.

Want, E. J., Cravatt, B. F., and Siuzdak, G. (2005). The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *ChemBioChem*.

- Weiß, J., Rau, M., and Geier, A. (2014). Non-alcoholic Fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(26), 447–52.
- Whalley, S., Puvanachandra, P., Desai, A., and Kennedy, H. (2007). Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clinical Medicine (London, England)*, 7(2), 119–124.
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., et al. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140(1), 124–31.
- Wong, V. W., Vergniol, J., Wong, G. L., et al. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(2):454-62
- Y
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., et al. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1366–1374.
- Yilmaz, Y. (2012). NAFLD in the absence of metabolic syndrome: different epidemiology, pathogenetic mechanisms, risk factors for disease progression? *Seminars in Liver Disease*, 32(1), 14–21.

7 Anhang

Ernährungshäufigkeitsfragebogen

EPIC-Potsdam Ernährungshäufigkeitsfragebogen (FFQ+)

für die NASH Studie des Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein

Entwickelt von der Abteilung Epidemiologie
des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke



©2008-2012

für Teilnehmer
490710001090



Hilfe

Allgemeine Hinweise zum Ausfüllen des Fragebogens

Wir sind Ihnen dankbar, wenn Sie uns bei der weiteren Bearbeitung Ihres Fragebogens unterstützen, indem Sie folgende Hinweise beachten:

Bitte möglichst

- alle Fragen vollständig beantworten
- nur in die eingerahmten Kästchen schreiben,
- große DRUCKBUCHSTABEN verwenden,
- bei Korrekturen das Wort durchstreichen und in den verbleibenden Kästchen weiterschreiben,
- für Ergänzungen die dafür vorgesehenen Zeilen auf der letzten Seite nutzen,
- keine Extrazettel verwenden!
- keinen Namen auf den Fragebogen schreiben, da er nur unter der Fragebogennummer eingelesen und ausgewertet wird.

Hinweise zum Ausfüllen der Fragen nach Ihrem Lebensmittelverzehr in den letzten 12 Monaten

Für jedes Lebensmittel oder jede Gruppe von Lebensmitteln finden Sie mehrere Verzehrshäufigkeiten.

- Bitte finden Sie zu jedem Lebensmittel die auf Sie am ehesten zutreffende Antwort und kreuzen diese an.
- Beachten Sie dabei die Maßangaben oder die Abbildungen, die Sie zu jedem Lebensmittel finden.
- Sollte Ihre übliche Portion größer oder kleiner als die Vorgabe sein, kreuzen Sie die entsprechend höhere oder niedrigere Häufigkeit an.
- Denken Sie bei der Beantwortung der Ernährungsfragen nicht nur an die Lebensmittel, die Sie zu Hause verzehrten, sondern auch an den Verzehr außerhalb (z. B. in der Kantine, im Restaurant oder bei Freunden).
- Beachten Sie bitte, dass für einige Gemüsesorten der Verzehr nur in der Saison gefragt ist. Sie sind entsprechend gekennzeichnet.

Beispiele

Zur Veranschaulichung sollen folgende Beispiele dienen:

Beispiel 1: Sie aßen 5-mal pro Woche Vollkornbrot. Bitte markieren Sie **Häufig**

Vollkornbrot, -brötchen Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Beispiel 2: Sie aßen 1-mal im Monat doppelt soviel Spinat wie die Abbildung zeigt. Bitte markieren Sie **2-3 Mal pro Monat**

Spinat, Mangold (eine Portion)



Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger

Kontakt

Ihre Fragen beantworten wir Ihnen gerne telefonisch unter 0431-597-4481. Sie erreichen uns auch per Email unter witigo.v.schoenfels@uksh-kiel.de.

Herzlichen Dank für Ihre Unterstützung!



Müsli, Getreideflocken
(3 Esslöffel)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Brottyp

Grau-, Roggen-, Mischbrot,
-brötchen

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Vollkornbrot, -brötchen

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Weiß-, Weizenbrot, -brötchen,
Toastbrot

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Knäckebröt

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Brotaufstrich

Fettaufstrich

Butter auf Brot

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Halbfettmargarine auf Brot

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Margarine auf Brot

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Schmalz auf Brot

- Nie Selten Manchmal Häufig Immer

Marmelade, Konfitüre, Gelee,
Honig (1 Teelöffel, gehäuft)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger



vegetarische Paste
(1 Teelöffel, gehäuft)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Milch & Joghurt

Kakao, Fruchtmilch (150ml)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Milch (150ml)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Naturjoghurt, Buttermilch,
Dickmilch, Kefir (150 g)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger



Fruchtjogurt (150 g)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Quark & Käse

Quark, Kräuterquark (kein
Früchtequark)
(1 Esslöffel, gehäuft)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Frischkäse (Rahmstufe,
Doppelrahmstufe)
(1 Esslöffel, gehäuft)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Weichkäse (z. B. Camembert,
Brie) (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger



Schnittkäse (z. B. Gouda, Emmentaler, Tilsiter, Edamer) (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Obst und Gemüse

Obst I

Apfel, Birne (1 ganze(r))



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Orange, Mandarine, Kiwi in der Saison (1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger



Banane (1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Pflaume, Pfirsich, Aprikose in der Saison (1 Hand voll)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Erdbeeren in der Saison (1 Hand voll)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger



Obst II

Rote Johannis-, Brom-,
Heidelbeeren in der Saison
(1 Hand voll)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Weintrauben in der Saison



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1-2 mal pro Tag
- 3 mal pro Tag oder häufiger

Obstkompott, Konservenobst
(1 Dessertschale)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Obstsalat, frisch
(1 Dessertschale)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger



Trockenobst & Nüsse

Trockenobst (z. B. Feigen,
Rosinen, Datteln) (1 Hand voll)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Nüsse (gesalzene, frische)
(1 Hand voll)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Leinsamen
(1 Esslöffel, gestrichen)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Rohkost

Möhren, roh oder gegart
(2 ganze oder 1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger



Tomaten, roh (1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

grüne Salate, Salatmischung,
Chinakohl, Weißkohl, roh
(1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Salatgurke (1/4 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Gemüsepaprika, roh (1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Essen Sie regelmäßig Knoblauch ?



- Roh Nein Ja
- Gegart, geröstet, eingelegt Nein Ja



gekochtes Gemüse

Sauerkraut (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Spinat (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Weiß-, Blumenkohl, Broccoli,
Kohlrabi (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Spargel in der Saison (4 Stangen)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Zucchini (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger



grüne Bohnen, junge Erbsen
(1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Gemüsemischung, Mischgemüse
(1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Gemüsezubereitung

Gemüse-, Kartoffeleintopf
(1 Suppenteller)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Linsen-, Erbsen-, Bohneneintopf
(1 Suppenteller)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Tomatensauce (auch
Tomatenkonserven, passierte
Tomaten) (1 Kelle)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger



Ketchup (1 Esslöffel, gestrichen)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Kartoffeln & Getreideprodukte

Kartoffeln, Kartoffelbrei,
Kartoffelklöße (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Bratkartoffeln (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Reis, Nudeln (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Ei, gekocht oder gebraten
(1 ganzes)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger



Fleisch & Fisch
Wurst

Leberwurst, Leberpastete
(1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Salami, Teewurst (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Jagd-, Fleisch-, Schinkenwurst,
Bierschinken (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Rot-, Blutwurst (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger



Fleischwaren

Schinken, Kassler,
Bratenaufschnitt (1 Scheibe)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Bratwurst (1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Boulette, Hamburger, Hackbraten
(ein(e) ganze(r) bzw. eine Scheibe)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Bock-, Knackwurst, Frankfurter
(1 ganze)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Fleisch & Fisch

Leber (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1 mal pro Woche oder häufiger



Schweinefleisch (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Rindfleisch (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Geflügelfleisch (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Hering, Thunfisch, Matjeshering,
Makrele, Lachs (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

sonstiger Fisch (z. B. Forelle,
Fischfilet, -stäbchen) (1 Portion)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Fleisch Herkunft

Wenn Sie folgende Produkte verzehrten, von welchem Tier waren diese? (Mehrere Antworten möglich)

Boulette, Hamburger, Hackbraten Schwein Rind Geflügel Weiß nicht/ verschieden

Bratwurst Schwein Rind Geflügel Weiß nicht/ verschieden



Bockwurst, Knackwurst,
Frankfurter

- Schwein Rind Geflügel Weiß nicht/ verschieden

Leber

- Schwein Rind Geflügel Weiß nicht/ verschieden

Aufläufe & Pizza

herzhafte Aufläufe (1 Portion)



- Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger

klare Brühe (z. B. Gemüse-,
Nudel-, Fleischbrühe)



(1 Suppentasse)

- Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger

Tofu (Sojaprotein, Fleischersatz)
(1 Portion)



- Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger

überbackenes Baguette, Pizza
(1 Pizza bzw. 2 Baguette)



- Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger

Fertigsalate (z. B. Fleischsalat,
Eiersalat) (1 Esslöffel, gehäuft)



- Nie
 1 mal pro Monat oder seltener
 2-3 mal pro Monat
 1-2 mal pro Woche
 3 mal pro Woche oder häufiger



Eierpfannkuchen, Crêpes
(2 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3 mal pro Woche oder häufiger

Speiseeis, Pudding, Früchtequark
(1 Dessertschale)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Kuchen & Süßwaren

Kuchen

Obstkuchen (1 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Hefegebäck, -kuchen (z. B.
Streuselschnecke, Bienenstich)
(1 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Sahne-, Creme-, Obsttorte,
Käsekuchen (1 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger



Diabetikerkuchen, -gebäck
(1 Stück bzw. 3 Kekse)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Sand-, Rühr-, Napfkuchen
(1 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Schlagsahne (1 Esslöffel, gehäuft)
(1 Esslöffel, gehäuft)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger

Kekse & Schokolade

Kekse, Plätzchen (3 Stück)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5 mal pro Woche oder häufiger



Schokolade, Pralinen (50g)



- Nie
- 1 mal pro Monat oder seltener
- 2-3 mal pro Monat
- 1-2 mal pro Woche
- 3-4 mal pro Woche
- 5-6 mal pro Woche
- 1 mal pro Tag oder häufiger

Getränke

Wasser & Limonade

Mineral-, Leitungswasser (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Limonade, Cola (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Säfte

Orangensaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |



Apfelsaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Schwarzer Johannisbeersaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Trauben-, Kirsch-, Ananassaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Multivitaminsaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Möhrensaft oder anderer Gemüsesaft (200 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |



Kaffee & Tee

Kaffee, mit Koffein (150 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Kaffee, ohne Koffein (150 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Tee, schwarz oder grün (150 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Früchte-, Kräutertee (150 ml)



- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Nie | <input type="radio"/> 3-4 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener | <input type="radio"/> 5-6 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat | <input type="radio"/> 7-8 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 1-3 mal pro Woche | <input type="radio"/> 9-10 mal pro Tag |
| <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche | <input type="radio"/> 11 mal pro Tag o. häufiger |
| <input type="radio"/> 1-2 mal pro Tag | |

Wie tranken Sie gewöhnlich Ihren Kaffee oder Tee? (mehrere Antworten möglich)

Kaffee

- | | | |
|--|----------------------------------|------------------------------------|
| <input type="radio"/> Trinke ich nicht | <input type="radio"/> Schwarz | <input type="radio"/> Mit Milch |
| <input type="radio"/> Mit Kondensmilch | <input type="radio"/> Mit Zucker | <input type="radio"/> Mit Süßstoff |

Tee, schwarz, grün

- | | | |
|--|----------------------------------|------------------------------------|
| <input type="radio"/> Trinke ich nicht | <input type="radio"/> Pur | <input type="radio"/> Mit Milch |
| <input type="radio"/> Mit Honig | <input type="radio"/> Mit Zucker | <input type="radio"/> Mit Süßstoff |



Früchte-, Kräutertee

- Trinke ich nicht Pur Mit Honig
 Mit Zucker Mit Süßstoff

Alkoholische Getränke

Wie oft tranken Sie in den letzten 12 Monaten die folgenden alkoholischen Getränke? Geben Sie auch Ihre übliche Menge (Portion) an! Bitte beachten Sie dabei den Genuss alkoholischer Getränke an besonderen Tagen (Fest- und Feiertagen).

Bier

- Nie 2-3 mal pro Woche
 1 mal pro Monat oder seltener 4-6 mal pro Woche
 2-3 mal pro Monat 1 mal pro Tag
 1 mal pro Woche 2 mal pro Tag o. häufiger

Portion: (Flasche mit 0,5 l)

Alkoholfreies Bier

- Nie 2-3 mal pro Woche
 1 mal pro Monat oder seltener 4-6 mal pro Woche
 2-3 mal pro Monat 1 mal pro Tag
 1 mal pro Woche 2 mal pro Tag o. häufiger

Portion: (Flasche mit 0,5 l)

Weißwein

- Nie 2-3 mal pro Woche
 1 mal pro Monat oder seltener 4-6 mal pro Woche
 2-3 mal pro Monat 1 mal pro Tag
 1 mal pro Woche 2 mal pro Tag o. häufiger

Portion: (Glas, 0,25 l)

Rotwein

- Nie 2-3 mal pro Woche
 1 mal pro Monat oder seltener 4-6 mal pro Woche
 2-3 mal pro Monat 1 mal pro Tag
 1 mal pro Woche 2 mal pro Tag o. häufiger

Portion: (Glas, 0,25 l)

Obstwein

- Nie 2-3 mal pro Woche
 1 mal pro Monat oder seltener 4-6 mal pro Woche
 2-3 mal pro Monat 1 mal pro Tag
 1 mal pro Woche 2 mal pro Tag o. häufiger

Portion: (Glas, 0,25 l)



Sekt/Schaumwein	<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat <input type="radio"/> 1 mal pro Woche	<input type="radio"/> 2-3 mal pro Woche <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche <input type="radio"/> 1 mal pro Tag <input type="radio"/> 2 mal pro Tag o. häufiger
	Portion: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (Glas, 0,1 l)	
Likör/Aperitif (z.B. Sherry, Portwein)	<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat <input type="radio"/> 1 mal pro Woche	<input type="radio"/> 2-3 mal pro Woche <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche <input type="radio"/> 1 mal pro Tag <input type="radio"/> 2 mal pro Tag o. häufiger
	Portion: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (Glas, 8 cl)	
Desertwein	<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat <input type="radio"/> 1 mal pro Woche	<input type="radio"/> 2-3 mal pro Woche <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche <input type="radio"/> 1 mal pro Tag <input type="radio"/> 2 mal pro Tag o. häufiger
	Portion: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (Glas, 0,1 l)	
Spirituosen (z.B. Cognac, Wodka etc.)	<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat <input type="radio"/> 1 mal pro Woche	<input type="radio"/> 2-3 mal pro Woche <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche <input type="radio"/> 1 mal pro Tag <input type="radio"/> 2 mal pro Tag o. häufiger
	Portion: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (Glas, 2 cl)	
Mixgetränke (z.B. Radler, Pina-Colada und weinhaltige Getränke)	<input type="radio"/> Nie <input type="radio"/> 1 mal pro Monat oder seltener <input type="radio"/> 2-3 mal pro Monat <input type="radio"/> 1 mal pro Woche	<input type="radio"/> 2-3 mal pro Woche <input type="radio"/> 4-6 mal pro Woche <input type="radio"/> 1 mal pro Tag <input type="radio"/> 2 mal pro Tag o. häufiger
	Portion: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (Glas, 0,2 l)	

Fette

Fettgehalt

Wenn Sie folgende Lebensmittel verzehrten, welchen Fettgehalt hatten diese im Allgemeinen?

Milch	<input type="radio"/> Enthrahmt (0,3% Fett) <input type="radio"/> Vollfett (3,5% Fett)	<input type="radio"/> Fettarm (1,5% Fett) <input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
-------	---	---



Fette → Fettgehalt

490710001090

Jogurt	<input type="radio"/> Entrahmt (0,3% Fett)	<input type="radio"/> Fettarm (1,5% Fett)
	<input type="radio"/> Vollfett (3,5% Fett)	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>		
Weichkäse	<input type="radio"/> Normal	<input type="radio"/> Fettarm <input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>		
Schnittkäse	<input type="radio"/> Normal	<input type="radio"/> Fettarm <input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>		
Fleisch	<input type="radio"/> Normal	<input type="radio"/> Fettarm <input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>		
Wurst	<input type="radio"/> Normal	<input type="radio"/> Fettarm <input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden

Fette & Öle

Wenn Sie Fleisch oder Fisch aßen, wie oft waren diese mit folgenden Fetten oder Ölen zubereitet?

Butter	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
Margarine	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
pflanzliches Kochfett (z.B. Biskin, Palmin)	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
tierisches Kochfett (z. B. Schmalz, Speck)	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
Olivenöl	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
Sonnenblumen-, Keimöl oder anderes Öl	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden

Wenn Sie Gemüse aßen, wie oft war es mit folgenden Fetten oder Ölen zubereitet bzw. wie oft wurden diese Fette oder Öle zugegeben?

Butter	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
Margarine	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
pflanzliches Kochfett (z. B. Biskin, Palmin)	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
tierisches Kochfett (z. B. Schmalz, Speck)	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden
<hr/>					
Olivenöl	<input type="radio"/> Nie	<input type="radio"/> Selten	<input type="radio"/> Häufig	<input type="radio"/> Immer	<input type="radio"/> Weiß nicht/verschieden



- Leinöl Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Sonnenblumen-, Distel-, Keimöl oder anderes Öl Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden

Saucen

Wenn Sie folgende Lebensmittel verzehrten, wie oft war Sauce dabei?

- Sauce zu Fleisch oder Fisch Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Sauce zu Gemüse Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Sauce zu Salat und Rohkost Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden

Salat-Zutaten

Wenn Sie Salat aßen, wie oft verwendeten Sie folgende Zutaten?

- Olivenöl Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Leinöl Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Sonnenblumen-, Distel-, Keimöl oder anderes Öl Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Mayonnaise Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Crème fraîche, Sahne Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- Jogurt Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden
-
- frische Kräuter Nie Selten Häufig Immer Weiß nicht/verschieden

Portionsangaben

Bitte denken Sie an eine gewöhnliche Woche im Winterhalbjahr (Oktober - März) oder Sommerhalbjahr (April - September). Wieviele Portionen der folgenden Lebensmittel verzehrten Sie pro Woche? (Weniger als eine Portion pro Woche = 0) Beispiel : Sie aßen 3 Portionen Obst am Tag. Umgerechnet auf eine Woche aßen Sie $3 \times 7 = 21$ Portionen Obst.

- | | | | |
|-------------------|----------------------|---|---------------------|
| gekochtes Gemüse | im Frühjahr & Sommer | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | Portionen pro Woche |
| | im Herbst & Winter | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | Portionen pro Woche |
| Salat und Rohkost | im Frühjahr & Sommer | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | Portionen pro Woche |
| | im Herbst & Winter | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | Portionen pro Woche |



Obst
 im Frühjahr & Sommer *Portionen pro Woche*
 im Herbst & Winter *Portionen pro Woche*

**Bitte denken Sie an eine gewöhnliche Woche in den letzten 12 Monaten. Wieviele Portionen folgender Lebensmittel verzehrten Sie durchschnittlich pro Woche? (Weniger als eine Portion pro Woche = 0)
 Beispiel : Sie aßen alle 2-3 Tage eine Portion Käse. Umgerechnet auf eine Woche waren das $7 / 2,5 =$ ca. 3 Portionen Käse.**

Käse *Portionen pro Woche*

Aufschnitt (Wurst, Bratenaufschnitt) *Portionen pro Woche*

Fleisch (einschl. Bratwurst, Boulette, Hamburger) *Portionen pro Woche*

Süßigkeiten (Schokolade, Bonbons etc.) *Portionen pro Woche*

Kuchen, Gebäck *Portionen pro Woche*

Warme Mahlzeiten *Warme Mahlzeiten pro Woche*

Körperliche Aktivität

Stellen Sie sich eine für Sie typische Woche vor und geben Sie an, wieviel Stunden pro Woche Sie die nachfolgenden Aktivitäten in den letzten 12 Monaten ausgeübt haben. Sommer, von April bis September, und Winter, von Oktober bis März, werden dabei getrennt betrachtet. Wieviele Stunden in der Woche verbringen Sie durchschnittlich mit folgenden Tätigkeiten ?

Zu Fuß gehen, spazierengehen, Weg zur Arbeit, Einkaufen gehen
 im Sommer *Stunden/Woche*
 im Winter *Stunden/Woche*

Radfahren
 im Sommer *Stunden/Woche*
 im Winter *Stunden/Woche*

Sport, ausser Radfahren
 im Sommer *Stunden/Woche*
 im Winter *Stunden/Woche*

Gartenarbeit
 im Sommer *Stunden/Woche*
 im Winter *Stunden/Woche*

Wieviele Stunden in der Woche verbringen Sie durchschnittlich mit folgenden Tätigkeiten ?

handwerkliche Arbeiten am Haus oder in der Wohnung (Reparaturen) *Stunden/Woche*



Danksagung

Diese Arbeit konnte nur durch die Mithilfe vieler Menschen entstehen, bei denen ich mich sehr herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle steht mein Doktorvater, Prof. Dr. Clemens Schafmayer, der mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat. Trotz seiner fordernden klinischen Tätigkeit hatte er über die Jahre immer ein offenes Ohr für jede Art von Fragen und Problemen. Ich möchte mich auch für die hervorragende Betreuung, das Engagement und die freundschaftliche Aufmunterung, sowohl in klinischen als auch in nicht-klinischen Bereichen, die für das Fortkommen dieser Arbeit, aber auch meiner persönlichen Entwicklung von unschätzbarem Wert waren, bedanken.

Ebenso wichtig für meine Arbeit ist Dr. Witigo von Schönfels. Als meinem „Zweitdoktorvater“ und Kopf der Forschungsgruppe gebührt auch ihm mein ganz besonderer Dank für die stets kompetente und freundliche Einführung in die wissenschaftlichen Arbeitstechniken, die Geduld bei der Beantwortung diesbezüglicher Fragen, starken Kaffee und die aufmunternden Worte in erfolglosen Phasen. Die gemeinsame Zeit wird mir stets als etwas Besonderes in Erinnerung bleiben.

Für die Mithilfe aller Patienten, deren Familien und für die Mitarbeit aller beteiligten Ärzte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. T. Becker für die Möglichkeit die Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ich möchte mich aber auch bei meiner Familie bedanken, die meine gesamte Karriere ermöglicht haben und meinen Freunden Bianca, Malwina, Guoda, Ruta und Familie Hüsecken, die wenn manchmal auch indirect aber durch Ihre Güte, Verständniss und persönlichen Vorbild mir Kraft und Glauben gegeben haben. Da wie Zaha Hadid einmal sagte „You have to really believe not only in yourself; you have to believe that the world is actually worth your sacrifices“.