



<http://hdl.handle.net/1765/129573>

**Erasmus MC**

Universitair Medisch Centrum Rotterdam



# Nederlandse Samenvatting



## Rationale voor dit proefschrift

Vandaag de dag is 3.5% van de wereldwijde mortaliteit te wijten aan leverziektes, een getal groter dan mortaliteit als gevolg van bijvoorbeeld HIV of tuberculose. Het spectrum leverziektes varieert van mild (vervetting of hepatitis zonder fibrose) tot ernstig (cirrose of hepatocellulair carcinoom).<sup>7</sup> Gelukkig overlijdt niet iedere patiënt met een leverziekte ook daadwerkelijk aan deze ziekte, want de meeste leveraandoeningen zijn (deels) reversibel. Bovendien zijn er andere –concurrerende– gezondheidsrisico's, met name cardiovasculair, waaraan patiënten kunnen overlijden. De meest voorkomende doodsoorzaak bij patiënten met *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), is inderdaad niet lever-gerelateerd, maar cardiovasculair.<sup>17</sup> NAFLD is de meest voorkomende leverziekte wereldwijd, met een geschatte prevalentie van reeds 25% onder volwassenen.<sup>7</sup> Nog verontrustender is dat hetzelfde geldt voor de prevalentie van NAFLD onder kinderen.<sup>363</sup> Ruim 20% van de kinderen met NAFLD heeft namelijk al een vorm van (pre)diabetes.<sup>18</sup> Deze epidemie heeft grotendeels te maken met een ongezonde (Westerse) leefstijl. Het bestuderen van het effect van leefstijl op de ontwikkeling van leverziektes vereist een grote onderzoekspopulatie. Wij konden, met non-invasieve diagnostiek, de prevalentie van leverziektes bestuderen bij een grote, oudere bevolking: de zogenaamde Rotterdam Studie. In dit proefschrift getiteld: "Liver health in the general population" hebben we ons gericht op de mildere kant van het spectrum van leverziektes, d.w.z. steatose en/of fibrose, waarbij niet-invasieve leefstijlinterventies een preventieve of therapeutische rol zouden kunnen spelen. In deel II richten we ons op de rol van koffie (en thee) als behandeling of ter voorkoming van leverziektes. In deel III hebben we de rol van voeding in relatie tot NAFLD bestudeerd. We hebben ons in deel IV gericht op het verband tussen lichaamsbouw (vet en spier) en NAFLD. En tot slot hebben we in deel V het microbioom bestudeerd in relatie tot steatose.

## Samenvatting & discussie

### Deel II: Koffie & De Lever

De rationale om het verband tussen koffie, thee en de gezondheid van de lever te bestuderen is voortgekomen uit eerdere studies die een verband lieten zien tussen koffie en thee met een lagere *overall* mortaliteit.<sup>125</sup> Deze relatie zou mogelijk te maken hebben met het gunstige effect dat koffie heeft op vele metabole factoren. Daarnaast was er voorzichtig wat bewijs voor een mogelijk beschermend effect van koffie en thee op de gezondheid van specifiek de lever.<sup>91,460</sup>

In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat het consumeren van 3 of meer koppen koffie per dag geassocieerd was met een lagere leverstijfheid en fibrose (gemeten met de Fibroscan®),

maar niet met leververvetting. Van de verschillende soorten thee was alleen kruidenthee (en geen groene of zwarte thee) geassocieerd met een lagere leverstijfheid. Met deze studie zijn wij de eerste en grootste studie die zowel koffie als thee heeft onderzocht in het kader van leverfibrose en steatose in de algemene populatie. Echter, inherent aan het design van deze observationele studie, konden we slechts speculeren over de pathofysiologie achter het gevonden verband. We hebben daarom een review geschreven die de experimentele rationale voor dit verband onder de loep neemt in **Hoofdstuk 4**. De meest bestudeerde bestanddelen van koffie waren de polyfenolzuren, cafeïne en koffie-lipiden. Verschillende *pathways* lijken bij te dragen aan het gunstige effect van koffie op de lever. Het anti-steatogene effect van koffie wordt toegeschreven aan de verhoogde vetzuur  $\beta$ -oxidatie en verminderde vetzuursynthese in de mitochondrie. Daarnaast had koffie een positief effect op de glutathion voorraad in de lever, waarvan bekend is dat het de oxidatieve stress reduceert en daarmee steatose en fibrose in de lever verlaagt. Het anti-fibrotische effect van koffie zou ook kunnen komen door de verlaging van TGF- $\beta$ . Cafeïne heeft daarnaast een direct antagonistisch effect op de adenosine A<sub>2A</sub>-receptoren, die de activering van de *hepatic stellate cells* beïnvloed. Tot slot lijken zowel de fibrogenese als de carcinogenese te worden onderdrukt doordat koffie apoptose moduleert evenals transcriptiefactoren en *extracellular signal-regulating proteinkinases*.

De studie uit **Hoofdstuk 3** heeft behoorlijk wat (pseudo-) wetenschappelijke media aandacht gekregen wat resulteerde in drie *letters to the editor*.<sup>462-464</sup> Op twee stukken hebben wij geantwoord met een kort schrijven, welke te vinden is in **Hoofdstuk 11** en **12**. Een belangrijk issue was dat het gunstige effect van kuidenthee werd betwist in relatie tot de gezondheid van de lever. Inderdaad, er is veel wetenschappelijk bewijs dat kruideninfusies en/of kruidenextracten eerder hepatotoxisch dan therapeutisch zijn.<sup>465</sup> We beamen dat de consumptie van kruiden niet zonder gevaar is en zelfs kan leiden tot leverbeschadiging en acuut falen. Echter dit betreft met name de non-FDA geregistreerde kruiden. Tevens is het belangrijk om te benoemen dat de consumptie van kruidenthee in onze oudere populatie laag was (met een mediane inname van 0.8 kop/dag) en doorgaans beperkt tot voorverpakte theeën zoals munt, kamille of Rooibos. Het is niet bekend dat deze theesoorten hepatotoxisch zijn.

### Deel III: Dieet & NAFLD

Dieet speelt een vitale rol in zowel de ontwikkeling van NAFLD als in de behandeling ervan. Eerdere studies lieten al zien dat gewichtsverlies van 5% of meer lichaamsgewicht een effectieve strategie is voor het omkeren van steatose. Bovendien leek gewichtsverlies van 10% of meer lichaamsgewicht al effect te hebben op de regressie van fibrose, zelfs bij niet-obese patiënten.<sup>240,241,329</sup> Echter, er zijn ook geluiden dat het aanhouden van een gezond dieet zonder gewichtsverlies of vermindering van calorie-inname persé, regres-

sie van NAFLD kan bewerkstelligen.<sup>59</sup> In deel III van dit proefschrift hebben we daarom gekeken naar de rol van kwaliteit/samenstelling van voeding bij NAFLD, onafhankelijk van calorie-inname of BMI.

In **Hoofdstuk 5** hebben we het verband tussen macronutriënten en NAFLD onderzocht. We zagen dat met name een hoge inname van dierlijk eiwit geassocieerd was met een hogere prevalentie van NAFLD bij zwaarlijvige deelnemers. Daarnaast leek er een trend te bestaan tussen een hoge inname van mono- en disachariden en een lagere prevalentie van NAFLD, dit was echter niet onafhankelijk van metabole factoren. Hoewel een plantaardig (i.p.v. dierlijk) dieet ook in overeenstemming is met het veelbesproken Mediterraanse dieet, bracht deze studie behoorlijk wat discussie teweeg. Klassiek worden koolhydraten namelijk juist gezien als het belangrijkste schadelijke macronutriënt binnen de ontwikkeling van NAFLD.<sup>243</sup> Echter, in de meeste studies die dit fenomeen bepleiten is het moeilijk om het effect van fructose te onderscheiden van dat van andere factoren die vaak met fructose-rijke voedingsmiddelen samengaan zoals een hoge calorie-inname.<sup>244</sup> Daarnaast hebben veel studies frisdank genomen als vertegenwoordiger voor het macronutriënt mono- en disachariden, terwijl een product als fruit bijvoorbeeld ook tot deze groep behoort. Ook werd betwist of dierlijk eiwit eigenlijk wel een schadelijke associatie heeft met steatose. Inderdaad, er zijn ook andere wetenschappelijke wetenschappelijke studies die een tegenovergesteld resultaat vinden. Zo is er bijvoorbeeld een klein experimenteel onderzoek dat liet zien dat dierlijk eiwit juist gunstig is voor de gezondheid van de lever.<sup>262</sup> Anderzijds is er momenteel een groeiend aantal onderzoeken die het schadelijke effect van dierlijk eiwit (en met name rood vlees) aantoont op de gezondheid van de lever.<sup>260,352</sup> Desalniettemin moet worden benadrukt dat een belangrijke boodschap uit onze studie is dat er geen substitutie-effecten waren wanneer het ene macronutriënt door het andere werd vervangen. Dit onderstreept het belang van een gevarieerd dieet in plaats van een restrictief dieet.

Ook op deze studie is een *letter to the editor* geschreven door Tang en Mann waarin zij hun zorgen uitten over de generaliseerbaarheid en relevantie van de resultaten gezien onze oudere studie populatie.<sup>458</sup> In **Hoofdstuk 13** hebben we op deze brief geantwoord door uit te leggen dat er uiteraard altijd voorzichtigheid geboden is bij het generaliseren van resultaten naar andere populaties. Echter, wij zijn van mening, dat onze resultaten relevant zijn ook al betreft het een oudere populatie. Want hoewel deze ouderen met steatose waarschijnlijk geen eindstadium leverziekte meer zullen ontwikkelen, hebben zij wel een grote kans om te overlijden aan hart- en vaatziekten, één van de belangrijkste gezondheidsrisico's van NAFLD en het metabool syndroom.

De pathofysiologie achter het verband tussen dierlijk eiwit en NAFLD is nog niet opgehelderd. Een van de hypothesen is dat een hoge inname van dierlijk eiwit bijdraagt aan een hogere *dietary acid load* (DAL). Deze hypothese hebben wij verder uitgediept in een spin-off studie, te vinden in **Hoofdstuk 6**.<sup>274</sup> De rationale voor deze hypothese is dat

een dieet met bouwstoffen die bijdragen aan een basische belasting (zoals citraat of bicarbonaat uit groenten en fruit) zorgen voor een lagere DAL. En dat een dieet met voedselproducten die bouwstoffen bevatten voor een zuurbelasting (zoals zwavelzuur uit vlees en vis) zorgen voor een hogere DAL. Als de samenstelling van het dieet zorgt voor een abnormale DAL dan zou dit het zuur-base evenwicht in het lichaam subtiel kunnen verstoren, en daarmee kunnen bijdragen aan andere metabole ontregelingen. Een drietal (gevalideerde) algoritmen zijn ontwikkeld om deze diëtaire zuurbelasting in te schatten. De participanten in onze onderzoekspopulatie bleken een relatief alkalisch dieet te hebben als we dit vergelijken met andere onderzoekspopulaties. Ook zagen we dat DAL onafhankelijk (maar niet lineair) geassocieerd was met NAFLD. De hoogste voorspelde prevalentie van NAFLD was 37% bij een zuur dieet en de laagste voorspelde prevalentie van NAFLD was 29% bij een alkalisch dieet. Dit onderstreept onze hypothese. Het was interessant om te zien dat het macronutrient mono-en disachariden omgekeerd evenredig geassocieerd was met DAL, waar het macronutrient dierlijk eiwit juist positief geassocieerd was met DAL. Opponenten van de DAL-hypothese beweren dat het gebruiken van DAL-proxies slechts een andere manier is om de kwaliteit/gezondheid van een dieet te meten. Dit argument valt niet volledig te weerleggen o.b.v. onze studie, maar de associatie tussen DAL en NAFLD werd niet volledig weggevangen na correctie voor de voedingscore gezond eten. Desalniettemin zou het interessant zijn om in de toekomst onderzoek te doen met acid-based biomarkers (zoals urine-ammonium) in plaats van algoritmes om de subklinisch metabole acidose objectiever te bestuderen.<sup>470</sup>

Eén van de belangrijkste beperkingen van de vorige twee studies was het cross-sectionele design, waardoor het niet mogelijk was causale verbanden te leggen. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 7** een longitudinaal onderzoek uitgevoerd naar de relatie tussen het volgen van bepaalde dieetpatronen en het risico op het ontwikkelen van NAFLD over de tijd. Na een follow-up periode van 4.5 jaar bleken de meest participanten regressie te hebben van NAFLD (30%), terwijl slechts 5% incident NAFLD had ontwikkeld. We selecteerden drie bekende zogenaamde *a-priori* (reeds bestaande) dieetpatronen voor deze studie. Dit zijn de Mediterraanse dieetscore, de WHO-score en de Nederlandse voedingsrichtlijn. Het volgen van het WHO dieet bleek relatie te houden met regressie van NAFLD. Daarnaast identificeerden we vijf zogenaamde *a-posteriori* dieetpatronen (met behulp van factor analyse), namelijk: *vegetable & fish*, *red meat & alcohol*, *traditional*, *salty snacks & sauces* and *fats & sweets*. Alleen het volgen van het *traditional* dieetpatroon, gekenmerkt door plantaardige oliën en stanolen, margarines en boter, aardappelen, volgranen, snoep en desserts – was gerelateerd aan de regressie van NAFLD. Alle bovengenoemde analyses waren gecorrigeerd voor BMI. Dit is zeer van belang aangezien BMI in de loop van de tijd afhankelijk was van de mate van het volgen van bepaalde dieetpatronen. Interessant ook is dat de dieetpatronen die gerelateerd waren aan regressie van NAFLD een macronutriënten

samenstelling hadden die voornamelijk plantaardig was en daarnaast veel vezels en relatief weinig vet bevatte.

## Deel IV: Lichaamsbouw & NAFLD

Buiten dieet om, weten we reeds dat lichaamssamenstelling zelf, en dan met name adipositas, ook sterk gerelateerd is aan NAFLD, Tegelijkertijd hebben niet alle zwaarlijvige personen NAFLD en vice versa. De relatie is dus niet zondermeer één op één. Eerdere studies toonden inderdaad dat BMI een suboptimale maat is voor adipositas. Recent onderzoek laat zien dat sarcopenie, een tekort aan spiermassa en –functie, naast adipositas óók bijdraagt aan de ontwikkeling van NAFLD.<sup>370,371</sup> Deze onderzoeken komen echter voornamelijk uit Azië, waar “lean NAFLD” (NAFLD bij mensen met een normaal BMI) veel vaker voorkomt dan in het Westen.<sup>12</sup>

In **Hoofdstuk 8** hebben daarom gekeken naar de associatie tussen lichaamsbouw (vet, spiermassa en de verhouding ervan) en NAFLD, gestratificeerd voor geslacht en BMI. In deze studie laten we zien dat een hogere skeletspiermassa geassocieerd is met een lagere prevalentie van NAFLD (en lagere leverstijfheid) bij *lean* vrouwen. Dit was onafhankelijk van het soort index dat we gebruikten voor het schatten van de relatieve skeletspiermassa. Een soortgelijke associatie vonden we ook bij *lean* mannen, echter deze associatie bleef niet overeind staan na correctie voor verschillende factoren. Ook zien dat het hebben van een hoge vetmassa een betere voorspeller was van NAFLD prevalentie dan een lage spiermassa. In het bijzonder, *android* vet (vet dat zich verzameld rond de taille) was geassocieerd met een hogere NAFLD prevalentie, terwijl *gynoid* vet (vet dat zich verzameld rond de heupen) was geassocieerd met een lagere prevalentie van NAFLD. Daaruit voortvloeiend, bleek de *android/gynoid* vet verhouding één van de beste voorspellers te zijn voor NAFLD prevalentie. Een vergelijkbare maat is de taille/heup ratio. In deze studie vonden we geen associatie tussen echte sarcopenie (lage skeletspiermassa én –functie) en NAFLD prevalentie. Maar dit zou goed kunnen komen door de relatief hoge mediane skeletspiermassa en dus het schaarse voorkomen van échte sarcopenie binnen onze populatie.

Het belang van zorgvuldige statistische correcties en analyses bij het bestuderen van lichaamsbouw wordt benadrukt in **Hoofdstuk 9**. In dit hoofdstuk hebben we een *letter to the editor* geschreven als reactie op het artikel van Wong et al. uit de Journal of Hepatology. In dit artikel wordt het belang van leefstijlinterventie benadrukt bij *lean* NAFLD.<sup>329</sup> Het laat zien dat in deze onderzoekspopulatie met 154 deelnemers zelfs participanten met *lean* NAFLD een voordeel hadden bij gewichtsverlies van 3% of meer. Als follow-up tool gebruikten de auteurs de *Fatty Liver Index* (FLI), een proxy om NAFLD mee te diagnosticeren. De FLI-score is een algoritme dat wordt berekend met de volgende parameters: taille-omtrek, BMI, triglyceriden en gamma-glutamyltransferase. De auteurs concludeerden dat participanten met overgewicht een hogere FLI-score hadden dan de *lean* participanten.

Dat is echter logisch gezien het feit dat BMI in het algoritme is geïncorporeerd. In ons communiceren laten we zien dat de sensitiviteit en specificiteit van FLI gestratificeerd voor BMI zeer beperkt is. We pleiten derhalve tegen het gebruik van het FLI-algoritme bij het analyseren van de lichaamssamenstelling en NAFLD.

## Deel V: Microbiom & Steatose

Eén van de meest populaire en relatief nieuwe aandachtsgebieden in wetenschappelijk onderzoek is de darmflora, ons 'nieuwe DNA'. Vanwege de anatomische verbinding tussen darm en lever (via de poortader) is er een directe relatie tussen het microbiom, de stoffen die het microbiom produceert, en de lever. Er wordt daarom gedacht dat de samenstelling van het microbiom betrokken is bij het ontstaan van lever steatose.<sup>471</sup>

In **Hoofdstuk 10** hebben we de diversiteit en samenstelling van het microbiom, de metaboliëten en de voorspelde functie ervan onderzocht in relatie tot steatose. Het is de grootste studie naar darmflora in steatose tot nu toe. In deze studie laten we zien dat een lagere alpha-diversiteit – minder soorten en slechtere verdeling van bacteriën – is geassocieerd met een hogere prevalentie van steatose en NAFLD. Daarnaast was de samenstelling van het microbiom significant verschillend tussen deelnemers met en zonder steatose. Zevenendertig genera zouden bijdragen aan dit significante verschil waarvan *Coprococcus3*, *Ruminococcus Gauvreauigroep* en *Ruminococcus Gnavusgroep* onafhankelijk geassocieerd bleven na multiple testing correctie en na correctie voor belangrijke factoren zoals BMI en dieet.

Binnen de *metabolomic* analyse zagen we dat deelnemers met steatose met name hogere concentraties *branched-chain amino-acids* (BCAA's), *aromatic amino acids*, *glycoproteïne acetyls* en een ongunstig lipidenprofiel hadden. Het is interessant om te zien dat het hebben van een hogere alpha-diversiteit juist geassocieerd was met lagere BCAA's, *glycoproteïne acetyls* en een gunstig lipidenprofiel. Hoge alpha-diversiteit had dus een tegengesteld metabool profiel dan steatose. *Ruminococcus Gnavusgroep* had een significante associatie met *glycoproteïne acetyls* (een acuut fase eiwit), dit is in lijn met eerder wetenschappelijk onderzoek waar de aanwezigheid van de *Ruminococcus Gnavusgroep* werd gevonden bij mensen met een lagere microbiële *richness* en cardiovasculaire ziekten. *Coprococcus3* had een associatie met lagere steatose prevalentie en deze bacterie is in eerdere studies geassocieerd met het hebben van een lager nuchter glucose en een hogere microbiële *richness*. De voorspelde functie van het microbiom in steatose liet zien dat de synthese van secundaire galzouten verhoogd zou zijn, wat in lijn is met de bevindingen van onderzoeksgroep Jiao et al. die ook een verhoogde secundaire galzuursynthese aantrof in NAFLD.<sup>442</sup>

Hoewel er geen causale verbanden kunnen worden getrokken uit deze studie, suggereren de resultaten dat er een belangrijke rol lijkt voor het microbiom en zijn alpha-diversiteit